



两种脱钙法植被鼠尾病理切片的比较

刘向云, 朱正盛, 孙祖越

(上海市计划生育科学研究所药理毒理室, 中国生育调节药物毒理检测中心, 上海 200032)

【摘要】 目的 探讨制作大鼠尾巴标本石蜡切片的方法。方法 采用盐酸脱钙液运用两种脱钙方法制作大鼠尾巴标本石蜡切片。结果 两种方法制作的石蜡切片完整、无破碎, HE染色观察组织结构细胞形态完整, 核浆分明, 红蓝适度。结论 两种方法都能制作理想大鼠尾巴标本石蜡切片, 可保证病理诊断质量。

【关键词】 石蜡切片; 尾巴; 脱钙; 大鼠

【中图分类号】 R361.2; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)07-0071-02
doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.07.016

Comparison of Two De-calcification Methods in Making Rat-tail Paraffin Sections

LIU Xiang-yun, ZHU Zheng-sheng, SUN Zu-yue

(Department of Pharmacology and Toxicology, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research; National Evaluation Center for the Toxicology of Fertility Regulation Drugs, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To determine the effect of de-calcification method in making rat-tail section. **Methods** Rat tail paraffin sections were made by using two different de-calcification methods. **Result** Both of paraffin sections made by two methods were even and integrated, in which clear structures of rat-tail cells were shown by HE staining. **Conclusion** The two de-calcification methods are available to make ideal rat-tail paraffin sections in pathological diagnosis.

【Key words】 Paraffin sections; Tail; Decalcification; Rat

大鼠是常用的实验动物,其应用十分广泛,在生物医学研究中所用实验动物中大鼠占20%以上^[1]。大鼠尾静脉注射给药是动物实验中常用的给药途径,为观察大鼠尾巴注射局部的药物反应需制作尾巴标本石蜡切片以供病理诊断。大鼠尾巴为周围皮肤等软组织环绕中心尾骨的结构,作横切片时若未脱钙处理,则切片易断裂破碎且切片刀磨损严重;若用硝酸脱钙液处理,则易损害组织结构,影响染色效果。我室采用盐酸脱钙液运用两种脱钙方法制作的大鼠尾巴标本石蜡切片完整无破碎,

HE染色效果较好,组织结构未可见损坏。现将制作方法介绍如下。

1 材料和方法

1.1 材料

标本:取自SD大鼠(SD大鼠体重400~450g,上海BK公司提供[SCXK(沪)2003-0002])。尾巴,横切0.5cm左右。

盐酸脱钙液:盐酸8.5mL、甲酸5mL、无水三氯化铝7g,加入100mL蒸馏水中^[2]。

[基金项目] 上海市研发公共服务平台(编号:09DZ2291000)和上海市“创新行动计划”实验动物研究(09140900500)。

[作者简介] 刘向云(1976-),女,副研究员,研究方向:前列腺药理毒理学和毒性病理学。E-mail: h6yf@163.com。

[通讯作者] 孙祖越(1964-),男,研究员,研究方向:前列腺药理毒理学和药物临床前安全性评价。E-mail: sunzy64@163.com。

1.2 方法

A 组:大鼠尾巴标本以福尔马林溶液充分固定后浸入盐酸脱钙液中脱钙,脱钙液早晚各更换一次,以针刺入尾骨无阻力感为脱钙终点。脱钙完成后流水冲洗 1 h,常规脱水、透明、浸蜡、包埋直至切片、HE 染色。

B 组:大鼠尾巴标本以福尔马林溶液充分固定、流水冲洗后,常规脱水、透明、浸蜡、包埋。修切蜡块,然后将蜡块切面向下置于存有盐酸脱钙液的培养皿中。标本脱钙处理时应在培养皿底部衬垫两层滤纸,以避免蜡块切面与培养皿底部粘连影响脱钙液的浸润。脱钙 3 h 即可切出满意切片,若需切片数量多可延长脱钙时间。蜡块脱钙后流水冲洗 30 min,常规切片、HE 染色。

对照组:大鼠尾巴标本不作脱钙处理,常规制片。

2 结果

2.1 制片时间

A 组完成脱钙需要 12 ~ 36 h(脱钙时间与大鼠尾巴标本直径相关);B 组只需要数小时,制片周期大大缩短。

2.2 切片质量

A、B 两组均能获得厚薄均匀、完整无破碎的切片,且切片刀磨损较小;对照组切片破碎断裂、不完整,且切片刀磨损严重(封底图 1)。

2.3 染色效果

HE 染色后镜下观察:组织结构未见破坏,细胞形态完整,胞核蓝染、胞质红染,核浆分明,红蓝适度,A、B 两组切片染色效果无明显差异;对照组组织破碎不完整,缺失较多,且有脱落的组织碎片沾染于切片上,组织重叠,着色深浅不一(封底图 2、图 3)。

3 讨论

未经脱钙处理的尾巴标本,其尾骨质脆易碎,切片时破碎且牵拉周围组织脱落而致切片破裂不完整、缺失较多,标本无法观察完全,易造成漏诊;并且切片组织极易被脱落的碎片沾染,细胞重叠致使阅片时难以准确诊断。这些都影响研究结论的准确、可信。同时硬质的尾骨对刀片有较大磨损,极易使刀片出现缺口,降低切片质量。

大鼠尾巴标本石蜡切片制作的关键在于脱钙

液的选择。大鼠尾巴的组织结构决定需要选择既能迅速充分脱去尾骨钙质又不损害周围皮肤等软组织、影响 HE 染色效果的脱钙液,同时由于尾骨被周围软组织包绕在内,阻碍了脱钙液与尾骨的接触,迟缓钙质交换,延长脱钙时间,脱钙液的选择更需慎重。硝酸脱钙液脱钙迅速但缺陷较大:脱钙时间难以掌握易严重破坏组织细胞细微结构、脱钙过程中产生二氧化碳分离结缔组织造成组织不完整、易形成亚硝酸使组织黄染影响脱钙速度且妨碍随后的染色反应、硝酸在脱钙的同时酸化组织导致 HE 染色时细胞核着色欠佳造成染色效果不理想^[3]。EDTA 脱钙液对组织无损伤,对组织抗原性的损伤也较小,但脱钙速度缓慢,需数周才能脱钙完毕^[4]。本文所用的盐酸脱钙液性质温和,脱钙速度快于 EDTA 脱钙液。盐酸脱钙液中的甲酸脱钙速度较硝酸缓慢,但对组织的破坏程度较轻,因而脱钙时间范围较广,脱钙完成后即使在脱钙液中继续存放 1 ~ 2 d 也不会破坏组织结构。脱钙液中的盐酸成分可明显增加脱钙速度,它不会使组织膨胀,而是使组织略有收缩。无水三氯化铝是保护剂,脱钙液中的铝离子易被吸附而起到保护作用,同时铝离子又是常规 HE 染色苏木精等色素的媒染助染剂^[5],可抵消盐酸对细胞核着色的影响。胥维勇、杨群^[6]报道此脱钙液脱钙处理标本后可不经中和及流水冲洗而直接进入脱水、透明、浸蜡和包埋等后续制作步骤。故而本文所用盐酸脱钙液脱钙速度较快,脱钙后染色效果较好,是理想的脱钙液。

B 组所用脱钙方法是利用酸性溶液能够穿透石蜡的特性,将常规包埋块中的钙化组织(如钙化上皮瘤、甲状腺瘤伴钙化及肋骨组织等)与脱钙液直接接触进行快速脱钙^[7]。大鼠尾骨不是致密骨,骨质较为疏松,适于此法进行快速脱钙。此法脱钙时间短,数小时即能切出高质量的切片(尾巴直径较粗者可适当延长脱钙时间),与 A 组相比较,制片周期大大缩短。用此法脱钙,脱钙液处理组织的时间很短,最大程度减轻了对组织细胞结构的破坏,HE 染色效果理想,能保证制片质量。因此,推荐 B 组脱钙方法:修切蜡块,然后将蜡块切面向下置于存有盐酸脱钙液的培养皿中,再切片。

参考文献:

- [1] 胡建华,姚明,崔淑芳. 实验动物学教程[M]. 上海:上海科学技术出版社,2009:70.

(下转第 78 页)

- [J]. *J Exp Med* ,1906 ,8(3) :400 -409.
- [35] Grimm D ,Elsner D ,Schunkert H , et al. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. [J]. *Cardiovasc Res* ,1998 ,37(1) :91 -100.
- [36] Muders F ,Friedrich E ,Luchner A , et al. Hemodynamic changes and neurohumoral regulation during development of congestive heart failure in a model of epinephrine-induced cardiomyopathy in conscious rabbits. [J]. *J Card Fail* ,1999 ,5(2) :109 -116.
- [37] Muders F ,Luchner A ,Friedrich E B , et al. Modulation of renal blood flow by endogenous endothelin-1 in conscious rabbits with left ventricular dysfunction. [J]. *Am J Hypertens* ,1999 ,12(8 Pt 1) :835 -838.
- [38] Arber S ,Hunter J J ,Ross J J , et al. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization , dilated cardiomyopathy , and heart failure. [J]. *Cell* ,1997 ,88(3) :393 -403.
- [39] Kubota T ,Mctiernan C F ,Frye C S , et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . [J]. *Circ Res* ,1997 ,81(4) :627 -635.
- [40] Anderson M E. Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias. [J]. *Pharmacol Ther* ,2005 ,106(1) :39 -55.
- [41] Zhang T ,Maier L S ,Dalton N D , et al. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. [J]. *Circ Res* ,2003 ,92(8) :912 -919.
- [42] Toko H ,Takahashi H ,Kayama Y , et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II δ causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy. [J]. *Circulation* ,2010 ,122(9) :891 -899.
- [43] Griffiths-Jones S ,Saini H K ,van Dongen S , et al. miRBase: tools for microRNA genomics. [J]. *Nucleic Acids Res* ,2008 ,36(Database issue) :D154 -D158.
- [44] Lewis B P ,Burge C B ,Bartel D P. Conserved seed pairing , often flanked by adenosines , indicates that thousands of human genes are microRNA targets. [J]. *Cell* ,2005 ,120(1) :15 -20.
- [45] van Rooij E ,Sutherland L B ,Liu N , et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2006 ,103(48) :18255 -18260.
- [46] Tijssen A J ,Creemers E E ,Moerland P D , et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. [J]. *Circ Res* ,2010 ,106(6) :1035 -1039.
- [47] Fukushima Y ,Nakanishi M ,Nonogi H , et al. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. [J]. *Circ J* ,2011 ,75(2) :336 -340.

(修回日期)2011-05-05

(上接第 72 页)

- [2] 王伯运 ,李玉松 ,黄高昇 ,等. 病理学技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社 ,2000: 82.
- [3] 谢玲 ,邹丽宜 ,张志平 ,等. 改良脱钙液制作脱钙石蜡切片与传统方法的比较 [J]. *中国组织工程研究与临床康复* ,2008 ,12(11) :2127.
- [4] 王伯运 ,李玉松 ,黄高昇 ,等. 病理学技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社 ,2000: 82.
- [5] 程敏 ,王颖 ,李保泉 ,等. 改良的 Gomori 特殊染色在口腔硬组织切片中的应用 [J]. *华西口腔医学杂志* ,2006 ,24(2) :185 -186.
- [6] 胥维勇 ,杨群. 脱钙方法与脱钙液的选择及应用 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志* ,2002 ,11(3) :263.
- [7] CFA·卡林. 组织病理学与组织化学技术手册 [M]. 北京: 科学出版社 ,1982: 61 -71.

(修回日期)2011-04-06



图 1 各种制作方法切片大体比较

Fig. 1 Comparison of various methods in making sections

a、b 两组切片完整无缺损, c 组切片破碎断裂, 大部分缺失

The sections of group A and group B are intact, while the control group cracked, fractured, and most absent

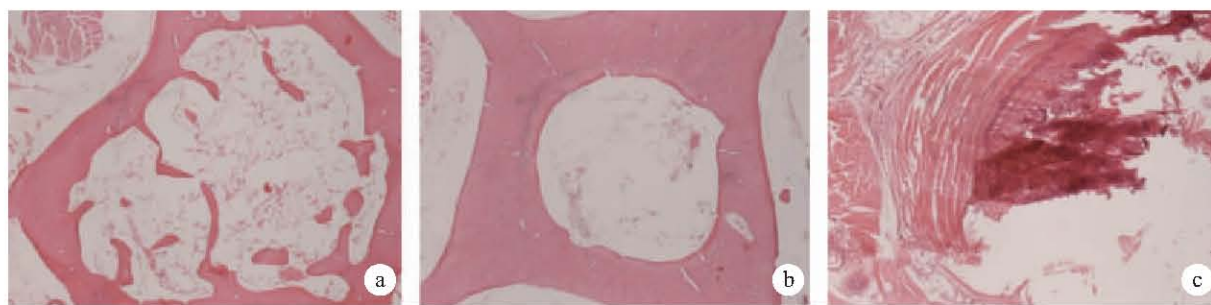


图 2 石蜡切片 HE 染色比较(尾骨)

Fig. 2 Comparison of various methods in making sections by HE staining(bone)

a、b 尾骨组织形态完整, 骨小梁清晰, 着色良好, c 尾骨破碎重叠

a,b:the tailbone tissue is intact with clear trabecula due to good staining. c:the tailbone fractures and overlaps

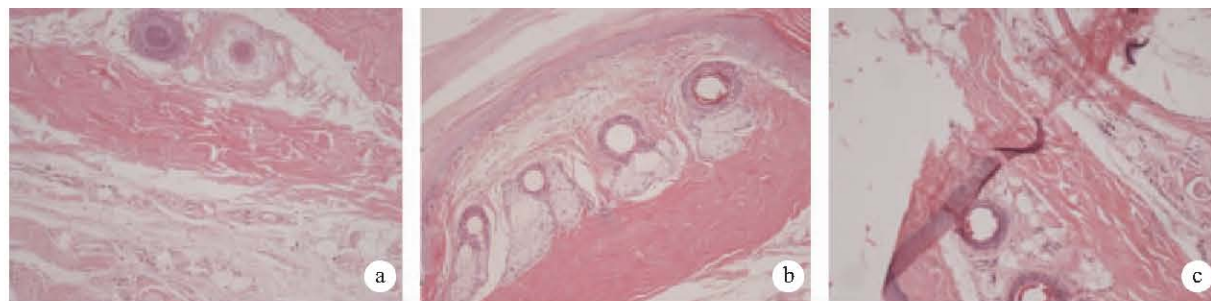


图 3 石蜡切片 HE 染色比较(鼠尾植被)

Fig. 3 Comparison of various methods in making sections by HE staining(soft tissue)

a、b 组织细胞结构完整, 核浆分明, 红蓝适度; c 切片破碎断裂, 脱落碎片沾染, 组织细胞重叠

a,b:the cell structure is intact,with the clear borders between nuclear and cytoplasm;red and blue staining is moderate.c:the sections are cracked and fractured;the falling fragments stick together with overlapping cells