

怎样制作好实验动物病理的石蜡切片

冀志锦

(中国人民解放军第二军医大学病理解教研室)

摘要 有关动物实验病理组织切片的制作文献报告甚少,本文小结了我们十多年来制作不同种类的实验动物病理组织切片的经验,对必须选用缓冲中性甲醛固定液和控制各类组织的脱水、透明浸蜡时间以及动物组织切片的过程特殊处理事宜作了说明。

随着科研工作的需要,对实验动物的病理组织切片的质量要求越来越引起重视。十多年来我们制作了大量的不同种类动物的病理组织切片,并不断地改进方法和总结经验教训。为此就如何制作好实验动物的石蜡切片谈几点体会。

(一) 材料和方法

1. 组织标本的固定 本室选用缓冲中性甲醛液配制的固定液(pH7.0)¹⁾,获得了较好的效果。其固定的时间按不同动物种类(如狗、兔、鼠等)、不同组织和组织块的大小而定。一般室温在20℃以上,固定三天,20℃以下,固定五天左右。

2. 固定好之后,应及时取材,通常将组织切成厚度0.2—0.3厘米。流水冲洗2—5小时(脑

组织应浸泡为宜,以免冲洗破损),后用蒸馏水洗二次,再脱水与透明。

3. 各类组织的脱水、透明和浸蜡时间(见表1)。至于7%、80%、95%酒精的系列脱水未列入表1,因为根据我们的经验,这些低浓度酒精的脱水时间长短均可²⁾,但从95%—无水酒精的脱水时间要严格控制(见表1)。

(二) 结果与讨论

1. 动物组织材料的固定充分与否是制作好病理组织切片的重要条件之一。要想得到质量高的切片,选用缓冲中性甲醛液进行固定是必须的。因此种固定液的渗透力强,引起组织收缩力少,作为还原剂可使蛋白质形成不溶性的

1) 无水磷酸氢二钠改为13克。

表 1 各类组织的脱水、透明和浸蜡的时间参考表*

项目	狗			兔			鼠						裸鼠	砂肺
	脑肺辜丸等	肠心胃肾皮肤等	肝脾淋巴结等	脑肺辜丸等	肠心胃肾皮肤等	肝脾淋巴结等	大鼠			小鼠				
							脑肺辜丸等	肠心胃肾皮肤等	肝脾淋巴结等	脑肺辜丸等	肠心胃肾皮肤等	肝脾淋巴结等		
95%酒精	6小时	4小时	3小时	5小时	4小时	3小时	4小时	3小时	3小时	4小时	3小时	2小时	3小时	4小时
95%酒精	8小时	6小时	5小时	7小时	5小时	4小时	6小时	5小时	3小时	5小时	4小时	3小时	4小时	5小时
无水酒精	1小时	30分	20分	40分	30分	20分	30分	30分	20分	20分	20分	15分	20分	20分
无水酒精	2小时	1小时	30分	1小时	40分	30分	30分	40分	30分	30分	30分	15分	20分	40分
无水酒精	2小时	1小时	1小时	1.5小时	1小时	40分	1小时	1小时	30分	40分	30分	20分	30分	1小时
二甲苯	40分	30分	20分	30分	20分	20分	30分	20分	15分	20分	20分	10分	10分	30分
二甲苯	40分	30分	30分	40分	30分	20分	40分	30分	20分	30分	20分	15分	20分	30分
二甲苯	1小时	40分	30分	50分	30分	30分	40分	30分	20分	40分	30分	20分	30分	40分
石蜡 56—58℃	30分	30分	30分	30分	30分	20分	30分	30分	15分	20分	20分	10分	20分	20分
石蜡 56—58℃	2小时	1小时	40分	1小时	1小时	30分	1小时	40分	20分	30分	30分	15分	20分	40分
石蜡 56—58℃	2小时	2小时	1小时	2小时	1小时	1小时	1.5小时	1小时	1小时	1小时	1小时	1小时	1小时	1小时

* 浸蜡温度为 60℃。70%、80%、90% 酒精的脱水时间各级不少于 5 小时。

化合物而固定，对脂类、糖类、神经和髓鞘等有较好的固定效果^[2]。并对特殊染色也提供了条件，同时也是冰冻切片的一种硬化剂。

2. 动物与人体组织在正常活体时其环境 pH 值为 7.0—7.4 之间。为了保持细胞、组织的生活时的形态，那么固定液就应符合其要求^[3]。固定的时间特别重要，以固定充分为标准，在一般情况下室温较高易固定，较低则难以固定。对固定不好的组织和固定时间较长的组织（二周以上），往往染色不够鲜艳。因为甲醛是一种还原剂，含 40% 的甲醛水溶液稀释后固定组织时间较长，或者温度较高的情况下都易产生甲酸，逐渐使溶液变为酸性，并使组织也带有酸性，尤其对细胞核的着色程度影响较大^[4]，所以说组织固定时间越长，组织切片的染色质量就受到影响。

3. 组织脱水、透明和浸蜡的要求 组织充分固定之后还必须进行及时充分脱水、透明和浸蜡，这也是制好切片的几个重要条件。对于动物组织在较低温度下进行到高浓度酒精脱水和二甲苯透明都不宜加温或者停留时间较长，

那样会使组织发生强烈的收缩及脆化。

对于常用的系列酒精脱水剂应准确保持其浓度，这是组织充分脱水的必要条件。有人提出系列脱水剂可反复应用，既从无水酒精浓变梯度依次下降，只增补无水酒精即可。此法表面上看有节约酒精的一面，但从脱水的准确浓度来说是不妥的。根据我们的经验，系列酒精用过一定时间以后，不但因脱水而稀释，浓度降低，更值得注意的是在脱水过程中，组织块中可溶于有机溶剂的脂质和一些其它杂质也进入酒精中，使酒精液体逐渐变稠，特别是在无水酒精中此现象更加明显，即使过滤也滤不干净。当组织块应用此种酒精脱水时，便产生乳白色沉淀，影响脱水效果。虽然用比重计测试这种酒精时，百分浓度改变可能不大，但实际上此时所测比重已不能准确反映酒精的真实百分浓度，因受进入酒精中的脂质和其它杂质影响，何况有人应用此法时，不是每次都用比重计测试酒精的百分浓度，则百分浓度更不准确。所以我们认为系列酒精脱水剂应用一段时间后，应全部更换新液才好。更换的时间要取决于酒精的

量和脱水的组织块多少而定,如酒精量多,而脱水的组织块少,脱水剂可应用较长时间。若酒精量少,脱水的组织块多,则较短时间就应更换。

组织脱水后应立即取出放在过滤纸上吸干或用冷吹风机稍吹干后进行透明。在更换二甲苯时要防止带有水滴的镊子进入二甲苯中。因为苯在水中的溶解度在 22℃ 时为 0.082 克/100 毫升,水的比重较二甲苯重^[9]。这样容易被透明的组织吸入而影响浸蜡。组织透明除了按参考时间外,还可用肉眼分辨透明的组织能透过光线,呈半透明或透明状态。

组织的浸蜡是最后的关键,直接影响切片质量。根据动物组织的性质和保存蜡块的需要,我们采用 56—58℃ 的石蜡,使浸蜡迅速,不会延长时间,即缩短了温箱中的停留时间,使组织不会过硬变脆,而不采用二甲苯混合蜡作为浸蜡的方法。因为组织浸蜡中有较多的二甲苯混入会延长组织浸蜡时间。

浸蜡的温度比石蜡的熔点高 2—3℃ 即可,温度的高低取决于蜡的熔点,石蜡的熔点和温箱的温度不宜太高,否则会使组织收缩变脆。我们还认为,组织蜡块没有完整保存下来的主要原因有:〈1〉由于组织没有充分脱水、透明和浸蜡。〈2〉包埋蜡中含有较多的二甲苯和低熔点石蜡(56℃ 以下)。〈3〉切片后蜡中组织块暴露在空气中时间长,没有及时封蜡或组织面封蜡太少。〈4〉没有将蜡块保存于干燥地方和适当通风。

4. 切片与染色 在通常的情况下,动物组织较人体组织硬脆些(如肝、脾和淋巴等)可将组织面提前修整,24 小时后不经冷却再切片,

减少硬脆度。重要的是应有锋利的切片刀。我们采用改造的磨砂玻璃进行磨刀^[6],效果良好。

脑组织易产生气泡影响染色。为了消除气泡,采用的方法是:首先将切出的脑片在展片箱中待完全平整展开,后再捞片,等切片充分凉干发白后,再进行烘片,防止气泡的产生。

对于皮肤组织(尤其烧伤皮肤)、矽肺组织、药物注射作用后的坏死组织以及血凝块等。其烘片的情况与上述不同,而是在展片后稍晾干即烘片。如果烘片不及时,会使组织拱起。

根据动物组织与人体组织不同,染胞核时,在 Harris 明矾苏木素中 3—5 分钟即可,后适当进行分化变蓝。其胞浆一般比人体组织伊红嗜染性强,因此选用了盐酸改造伊红的酒精配制方法,其效果良好。

在染色过程中为了防止少数组织脱片现象,所以选用 8% 火棉胶稀释液^[1]作为覆盖液,其方法是将切片脱蜡经无水酒精中取出后而滴加火棉胶液,应及时用冷风吹干再直接入 95% 酒精中,并下行至水,程序染色。

参 考 文 献

- [1] 杜卓民主编 1981 实用组织学技术 21—22 人民出版社。
- [2] 芮菊生等 1980 组织切片技术 8 人民教育出版社。
- [3] 郑若玄著 1986 实用细胞学技术 4 科学出版社。
- [4] 上海第一医学院病理教研组 1978 病理检验技术 233 上海科学技术出版社。
- [5] 湖南省劳动卫生研究所编 1975 苯中毒的防治 1 湖南人民出版社。
- [6] 孙继英 1978 用磨砂玻璃代替油石磨刀法 133 上海中华医学会论文汇编。

1) 取原装含 5% 的火棉胶液 8 毫升,加入 92 毫升无水酒精进行混合后使用。