文章编号:1000-5404(2009)23-2399-02

短篇论著

临床病理检验常用骨组织脱钙液效果的比较

曹　颖　　(第三军医大学西南医院病理学研究所, 重庆 400038)

摘　要: 目的　比较几种骨组织的脱钙溶液与脱钙方法的效果, 获得快捷、简便、适用于临床病理检验的脱钙技术。**方法**　考察在常温、恒温、搅拌状态下,几种常用的脱钙液对猪干骨中段脱钙、染色效果。**结果**　40 ℃恒温搅拌条件下,盐酸-氯化钠脱钙液(脱钙液Ⅰ)、高浓度盐酸-甲酸-氯化钠脱钙液(脱钙液Ⅳ)、低浓度盐酸-甲酸-氯化钠脱钙液(脱钙液Ⅶ)、Plank-Rycho 脱钙液(脱钙液Ⅸ),都具有脱钙时间短、组织损伤小、不影响染色效果。**结论**　恒温搅拌条件下,脱钙液Ⅰ是最适合于临床病理检验的脱钙溶液。

关键词: 脱钙液;骨组织;临床病理
中图法分类号: R446　　**文献标识码**: A

脱钙是决定骨骼、牙齿、病理性钙化或骨化组织切片质量、染色效果的重要技术关键之一。简单、便捷、快速、有效的骨组织脱钙方法,有利于保持骨组织结构和组织中的抗原物质,对于临床正确诊断具有重要的意义。目前报道的脱钙液和脱钙方法比较多[1-8],但尚无公认的理想方法[2],为此我们拟在恒温搅拌条件下,对几种备受推崇的脱钙液进行实验比较,期望获得适合于临床病理检验的骨组织脱钙液组成与脱钙方法。报告如下。

1　材料与方法

1.1　材料

取新鲜的猪干骨,手术刀去除软组织与骨膜,大量水漂洗,用骨锯切取干骨中段,获得组织体积为 10 mm×5 mm×1.5 mm 的骨块,在 4% 中性甲醛液内固定 24 h,用于脱钙实验。

1.2　脱钙液组成

选取文献报道比较多的几种脱钙溶液,用于考察操作条件、脱钙溶液组成对骨组织的脱钙效果。各种脱钙溶液的组成及配制如下:盐酸-氯化钠脱钙液(脱钙液Ⅰ):5 ml HCl + 15 g NaCl + H_2O 至 100 ml。盐酸-甲醛-甲酸脱钙液(脱钙液Ⅱ):30 ml HCl + 30 ml 甲醛 + 20 ml 甲酸 + H_2O 至 100 ml。盐酸-醋酸-水杨酸脱钙液(脱钙液Ⅲ):8 ml HCl + 5 ml 冰醋酸 + 10 g 水杨酸 + H_2O 至 100 ml。高浓度盐酸-甲酸-氯化钠脱钙液(脱钙液Ⅳ):8 ml HCl + 15 g NaCl + 20 ml 甲酸 + H_2O 至 100 ml。硝酸-尿素-甲酸脱钙液(脱钙液Ⅴ):8 ml HNO_3 + 3 g 尿素 + 20 ml甲酸 + H_2O 至 100 ml。硝酸-尿素脱钙液(脱钙液Ⅵ):8 ml HNO_3 + 3 g 尿素 + H_2O 至100 ml。低浓度盐酸-甲酸-氯化钠脱钙液(脱钙液Ⅶ):5 ml HCl + 15 g NaCl + 10 ml 甲酸 + H_2O 至 100 ml。EDTA 脱钙液(脱钙液Ⅷ):10 g EDTA 二钠 + H_2O 至 100 ml。Plank-Rycho 脱钙液(脱钙液Ⅸ):8.5 ml HCl + 7 g $AlCl_3$ + 5 ml 甲酸 + 10 ml 甲醛 + H_2O 至 100 ml。

1.3　脱钙方法

将 5 块体积为 10 mm×5 mm×1.5 mm 的骨块置于 100 ml 脱钙液中,在搅拌与静置实验条件下,分别考察室温和恒温 40 ℃的脱钙效果。整个脱钙进程中不更换脱钙液。脱钙终点判断:随时观察脱钙情况,用大头针试探能穿入骨密质即可。病理切片,HE 染色,显微镜下观察组织的结构。

2　结果

在静置与搅拌操作方式下,不同温度与脱钙溶液组成对猪干骨的脱钙结果,见表 1。实验结果表明,对于同一种脱钙溶液,搅拌状态下的脱钙时间小于静置状态;40 ℃恒温条件下的脱钙时间比常温条件下短。在所有的脱钙液中,脱钙液Ⅱ需要的时间最短,脱钙液Ⅷ的脱钙时间最长,其余的各种脱钙液的脱钙时间相差不大。在脱钙骨基质的外观完整性方面,利用脱钙液Ⅱ和脱钙液Ⅲ脱钙后,骨基质外部明显破损,而其他脱钙溶液均能获得完整的骨基质。在常规 HE 染色效果方面,除了脱钙液Ⅱ脱钙液Ⅲ外,用其他脱钙液脱钙后,切片的染色效果佳,表明脱钙过程对组织结构影响不明显(图 1A、B)。同时,组织的抗原保持完整(图 1C)。

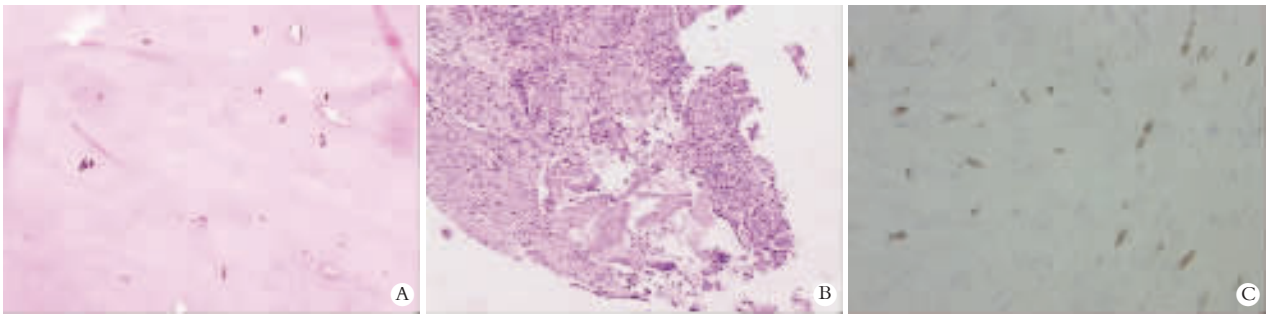
表 1　不同脱钙液与脱钙条件对脱钙时间及基质完整性的影响(h)

脱钙实验条件	静态脱钙		搅拌脱钙	
	室温	40 ℃	室温	40 ℃
脱钙液Ⅰ	72 ~ 78	66 ~ 70	64 ~ 68	58 ~ 62
脱钙液Ⅱ	43 ~ 75 [a]	39 ~ 43 [a]	39 ~ 43 [a]	38 ~ 42 [a]
脱钙液Ⅲ	70 ~ 74 [a]	66 ~ 70 [a]	64 ~ 68 [a]	61 ~ 65 [a]
脱钙液Ⅳ	71 ~ 75	63 ~ 67	64 ~ 68	57 ~ 61
脱钙液Ⅴ	70 ~ 74	63 ~ 67	64 ~ 68	57 ~ 61
脱钙液Ⅵ	70 ~ 74	66 ~ 70	65 ~ 69	56 ~ 58
脱钙液Ⅶ	69 ~ 73	63 ~ 67	63 ~ 67	59 ~ 63
脱钙液Ⅷ	368 ~ 392	228 ~ 252	252 ~ 268	172 ~ 188
脱钙液Ⅸ	73 ~ 77	65 ~ 69	61 ~ 65	58 ~ 62

a:表示脱钙后,骨基质外观结构不完整

作者简介:曹　颖,女,湖南省长沙市人,主管技师,主要从事临床病理技术方面的研究。电话:(023)68765462,E-mail: chenji63@163.com

收稿日期:2009-06-22;**修回日期**:2009-07-13



A:脱钙猪密质骨 (HE×200); B:脱钙人肌纤维肿瘤 (HE×200); C: 脱钙人肌纤维肿瘤 Ki67 (S-P×400)

图1 脱钙液Ⅰ恒温搅拌脱钙后组织结构与抗原观察

3 讨论

简便、快捷、有效的脱钙方法是骨组织病理学研究的重要步骤之一。脱钙技术和溶液多种多样,在众多的脱钙液中,螯合剂脱钙溶液因对骨的有机质损害最小、抗原保持最完整,是备受推崇的一种脱钙方法。但是,脱钙时间特别长,尤其是对于大块的骨组织样品更是如此。为了提高脱钙处理效率,许多学者研究了微波脱钙技术[3,8],但微波处理需要多次间歇操作,需要专门人员守护,这在一定程度上限制了微波络合剂脱钙方法在临床上的应用。酸类脱钙溶液是传统的脱钙方法,脱钙技术成熟、操作简便,也可以通过微波、升温、搅拌等方式加速脱钙进程[1,3,8],如李玲等[1]研究了新西兰兔双侧桡骨,在恒温、室温、微波条件下脱钙,结果表明,对于选定的3种脱钙溶液,恒温和微波脱钙速度显著高于常温,而恒温与微波脱钙时间无统计学差异,组织切片、染色的效果也相当。

本实验结果显示,除了Ⅱ溶液和 Ⅲ溶液外,其他脱钙液均具有脱钙完全,对组织损害小,不影响染色效果的特点。其中,脱钙溶液Ⅰ、Ⅳ、Ⅶ、Ⅸ都含有HCl,虽然各溶液的含酸浓度各不相同,但脱钙的时间和效果相差不大。这可能是由于脱钙的速度取决于溶解的钙离子、磷酸根离子在组织中的扩散(搅拌状态下,脱钙时间缩短是扩散过程决定脱钙速度的佐证之一),由于增大酸度并不能显著改变扩散速度,所以这4种脱钙溶液脱钙速度与效果相当。但是,脱钙液Ⅰ用酸量最少,成分组成最简单,配制最简便,脱钙成本低,并且废液无害化处理容易。脱钙溶液Ⅰ、Ⅳ、Ⅶ、Ⅷ都含有大量的NaCl强电解质,氯化钠具有降低溶液中离子的活度,导致骨组织中无机盐(羟基磷灰石)的溶解度增加、胶原的酸解程度降低,保证了脱钙骨组织的结构完整性;脱钙溶液Ⅸ则是利用溶液中的铝离子在基质上的吸附、溶液中离子活度的降低,达到保护组织不受破坏的目的。脱钙溶液Ⅴ和Ⅵ中的硝酸氧化性比较强,对于抗原具有一定的破坏作用,不利于抗原的检测。脱钙液Ⅲ(HAS溶液)是一种较快速的脱钙溶液。但是,对本实验的密质骨脱钙效果不理想,组织破坏也严重。究其原因,可能是水杨酸对胶原松弛作用,使得骨组织表面有机质很快被酸解,并形成保护膜,阻碍了脱钙溶剂进入骨组织内部,而降低脱钙速率,并严重破坏脱钙骨基质表层的有机质结构。

综上所述,笔者认为,恒温搅拌条件下,应用脱钙液Ⅰ、Ⅳ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ脱钙具有:脱钙完全、快速,对组织影响小,不需要专人守护,操作简便等特点。其中,脱钙液Ⅰ还具有用酸量最少,成分组成最简单,配制最简便,脱钙成本低,废液无害化处理容易的优势。因此,在恒温搅拌条件下,脱钙液Ⅰ是最适合于临床病理检测的脱钙溶液。

参考文献:

[1] 李 玲,赵 燚,曹湘玫,等. 室温、恒温与微波骨组织脱钙实验方法的比较[J]. 宁夏医学院学报, 2008,30(3):395-397.

[2] 刘大维,初同伟,张 良,等. EDTA微波脱钙骨的免疫组化染色[J]. 第三军医大学学报, 2003,25(1):77-78.

[3] 薛世泉,李红兵,王 渝,等. 骨和牙切片的甲酸氯化铝脱钙液及脱钙方法[J]. 中华病理学杂志, 2006,35(6):372-373.

[4] 谢 玲, 邹丽宜,张志平, 等. 改良脱钙液制作脱钙骨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): 2125- 2128.

[5] 熊正文,李德炳,冯骥良, 等. 不同脱钙条件对骨组织免疫组织化学染色抗原性的影响[J]. 实用医技杂志, 2005,12(5A): 1092-1094.

[6] 刘 洋, 刘亚丽. 骨组织脱钙及其脱钙后染色的研究[J]. 临床与实验病理学杂志, 2005, 21(6): 764.

[7] 连丽琴, 夏凌志, 钟惠霞. 三种脱钙液对骨组织脱钙后切片染色效果分析[J]. 武警医学, 2008, 19(10):937-938.

[8] 熊正文, 李永申, 彭东长, 等. 光波-微波辐射技术在骨组织快速脱钙与免疫组化染色中的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(8): 491-494.

(编辑 王 红)