维普资讯 http://www.cqvip.com

第24卷 第1期 重庆医科大学学报 Vol.24 No.1
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

固定液对恒冷箱切片组织结构与染色效果的比较观察

基础医学院组胚教研室 王正义* 柏 戚 王亚平

提 要 对Wistar大鼠6种器官进行恒冷箱新鲜冰冻切片，采用9种固定液分别固定切片，在同等条件下做H.E染色，观察不同固定液对器官组织结构与染色效果的影响，以寻找适用于恒冷箱切片的最佳固定液。结果表明：10%中性甲醛固定的切片，器官的组织结构清晰，染色好，镜下与石蜡切片相似。我们推荐在恒冷箱切片H.E染色时选用10%中性甲醛作为固定液，这对提高恒冷箱切片染色技术和临床病理快速诊断的准确性，有一定指导意义。

关键词 恒冷箱；H.E染色；固定液
中图分类号 R.336

采用恒冷箱做新鲜组织切片H.E染色时，由于所使用的固定液不同，切片组织结构的保存和染色效果也不尽一样。许多固定液并不适用于恒冷箱冰冻切片，它们导致结构不清晰和染色不均匀。从目前国内有关技术书和文献上还未见有关恒冷箱冰冻切片固定液的评论。本文选用了国外技术书[1,2,3]中所有介绍的6种固定液和组织学技术常用的3种固定液作比较观察，从而寻找最适合于恒冷箱切片的固定液，旨在为提高临床病理快速诊断的准确性和确定常规恒冷箱切片H.E染色的固定液提供实验技术指导。

1 材料和方法

1.1 **实验动物** 3～5月龄雄性Wistar大鼠，体重200g±，本校实验动物中心提供。

1.2 **固定液**

1.2.1 Picro Acetic固定液

甲醛	10ml
氯化钠	0.18gm
苦味酸	0.15gm
无水乙醇	56ml
冰醋酸	5ml
蒸水 至	100ml

切片固定3min，70%酒精漂洗。

(该液由英国BRIGHT恒冷箱公司介绍用于H.E切片染色，1987年)

1.2.2 10%甲醛甲醇液

甲醛	10ml
甲醇	90ml

切片固定60s，蒸水漂洗。

1.2.3 无水乙醇

切片固定60s，蒸水漂洗。

1.2.4 乙醚·酒精

乙醚	50ml
无水乙醇	50ml

切片固定60s，蒸水漂洗。

1.2.5 Wolman's液

冰醋酸	5ml
无水乙醇	95ml

切片固定3min，水洗。

1.2.6 醋酸－甲醛固定液

冰醋酸	5ml
甲醛	10ml
蒸水	85ml

*男，1951－07出生，实验师

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 切片质量评分结果

固定液	器官					
	心	肝	脾	肾	大脑	睾丸
Picro Acetic	+++	+++	++→+++	++→+++	++	+
10%甲醛甲醇	++	+→++	+	++	+	+
无水乙醇	+++	++→+++	++→+++	++	+	+
乙醚·酒精	++	+	+	+	+	+
Wolman's	+→++	+→++	++	++	+	+
醋酸—甲醛	++	+++	+++	++++	+++→+++	++++
10%中性甲醛	++++	++++	++++	+++	++++	+++
甲醇	++	++	+	+	+→++	++
Bouin	++	+	++	+→++	++	++→+++

注："+"愈多表示切片组织结构愈清晰染色愈好。

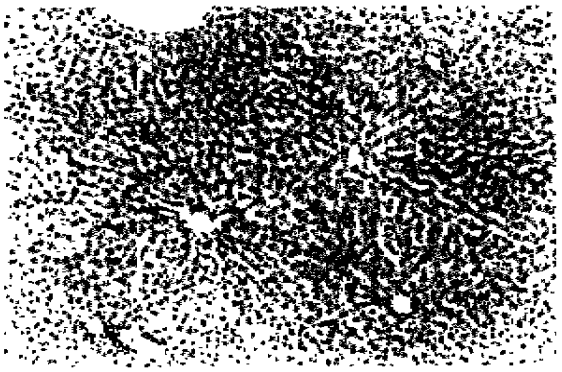


图1 肝，10%中性甲醛固定，组织结构清晰，染色×33

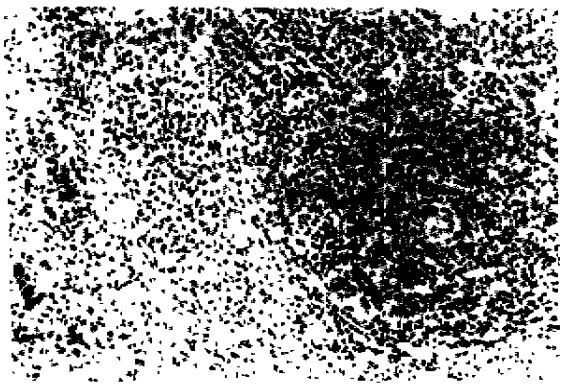


图2 脾，10%中性甲醛固定，组织结构清晰，染色均匀×66

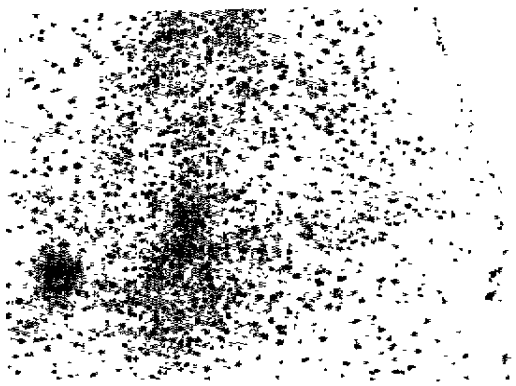


图3 大脑，10%中性甲醛固定，组织结构清晰，染色正常×33

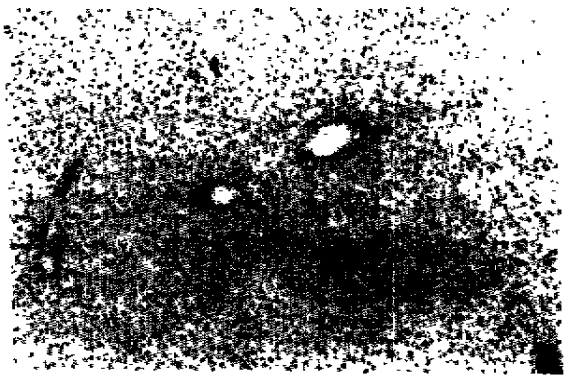


图4 肝，10%甲醛甲醇固定，组织结构模糊，细胞质染色极淡，反差，镜下不易识别是何脏器×33

维普资讯 http://www.cqvip.com



图5 脾.乙醚·酒精固定,不清晰,云雾状,染色不均×33



图6 大脑.Wolman's液固定,锥体细胞染色都减弱,组织模糊,反差低×33

切片固定20s,水洗。

1.2.7 10%中性甲醛

碳酸锂饱和甲醛液	10ml
蒸水	90ml

切片固定1min,水洗。

1.2.8 甲醇

切片固定1min,70%酒精漂洗。

1.2.9 Bouin固定液

切片固定2min,70%酒精漂洗。

1.3 恒冷箱切片机英国BRIGHT恒冷箱,5030型。

1.4 切片.染色与观察 活杀大鼠,取心、肝、脾、肾、大脑和睾丸,立即冷冻切片(厚度6μm)。每种组织连续切片18张(每种固定液2张切片)。切片贴于载玻片上,吹干后用上述9种固定液分别固定。在同等条件下进行H.E染色,封片后光镜观察。根据器官组织结构是否完好、清晰及染色效果对固定液进行评比。

2 结果

经观察不同固定液固定的切片在切片质量上的主要差别是组织结构清晰与模糊,染色均匀与不均匀上的差别。因此根据组织结构是否清晰和染色好与差来评定各切片"+"号的多与少。从表1看出,最好的固定液是10%中性甲醛及醋酸甲醛液(如图1,2,3)。尤其是前者固定的切片,组织结构完好清晰,染色正常,反差好,与石蜡切片相似。较差的固定液有乙醚·酒清、10%甲醛甲醇液、Wloman's液、甲醇、Bouin及无水乙醇,经这些固定液固定的切片均存在不同程度的组织结构不清和染色不均(如图4,5,6)。Picro Acetic固定液的效果没有10%中性甲醛和醋酸甲醛好,因它固定的切片也有一定的模糊状,只是程度较轻微些,所以该液效果视为一般。

3 讨论

为什么一些固定液会造成组织模糊和染色不均? 从结果来看,除10%中性甲醛和醋酸甲醛外都存在不同程度的这些缺点。我们分析可能与这些固定液中的甲醇和乙醇有关。甲醇和乙醇能固定血膜及其它涂片,而10%甲醛和醋酸甲醛则不能。未经固定的新鲜组织冰冻切片后,当切片从零下十几度贴附到零上十几度甚至更高的载玻片上时,必将发生解冻融化。切片内组织液和细胞内液体由凝固变为融解.融化的液体覆盖整个切片,醇能将这些液体中的蛋白质凝固在切片上和玻片上[1]。所以我们观察到这些固定液的切片组织中的一些大的管腔内充满一层均匀的模糊物质,而经10%甲醛和醋酸甲醛固定的相同切片中的这些管腔内却是清亮无物的。10%甲醛可能不能将这种均匀覆盖物保留下来,反而使得组织结构清晰,染色更好。本实验前6种固定液都是国外技术书中介绍,但作者比较赞赏Bancroft Stevens一书中推荐的醋酸甲醛固定液,除10%中性甲醛外就它较好。我们也作了10%中性甲醛与10%甲醛比较试验,从小白鼠肝和唾液腺的结果看,似乎两者没

维普资讯 http://www.cqvip.com

多大差别。

恒冷箱切片已广泛用于临床病理快速诊断和医学生物学的各项研究工作中，在现代免疫组化技术中也大量使用。我们常见免疫组化经丙酮固定后的切片组织结构不清晰，尤其是肝和肾常被误认为组织自溶，实际上这是丙酮这一固定液的结果，因丙酮与乙醇有极相似的固定作用[1]。因此，研究固定液对恒冷箱切片组织结构保存和染色的影响，对所有采用恒冷箱切片的各项医学生物学研究工作都有帮助和借鉴，而本实验的H.E染色只是众多染色方法中的代表。

本研究得到了差别明显的比较结果，对适合恒冷箱新鲜组织切片的固定液提高了认识，筛选出了10% 中性甲醛作为常规恒冷箱切片H.E染色的最佳固定液，这对于建立和完善恒冷箱切片技术和外科快速诊断技术有重要意义和实用价值。

参 考 文 献

1.Brown GG. An introduction to histotechnology. New York; Apploton－Century－Crofts, 1978;148; 35

2.Drury R.A.B, et al. Carleton's histological technique 5th ed. Oxford University Press 1980;104

3.Bancroft JD, et al. Theory and Practice of histological technique 5thed. Edinburgh, London, New York; Longman Group UK limited 1990;88

(收稿日期 1998－03－30)

The influence of different fixatives on tissue structures and their stain by cryostate Section

Wang Zhengyi, et al

Department of histology and ewbryology, college of basic medical sciences

The 6 kinds of fresh tissue were taken from Wistar rats and respectively treated with different fixatives in the same condition. By using the technigues of cryostate section and H.E stain, the in fluence of 9 types of fixative on tissue structures and their stain was observed. The results indicated that the material fixed with 10% neutral formaldehyed had wonderful structures and fine stain. We suggest that 10% neutral formaldehyde be recommended as an ideal fixative in preparing tissue sections.

KEY WORDS Fixative; H.E stain; Cryostate section