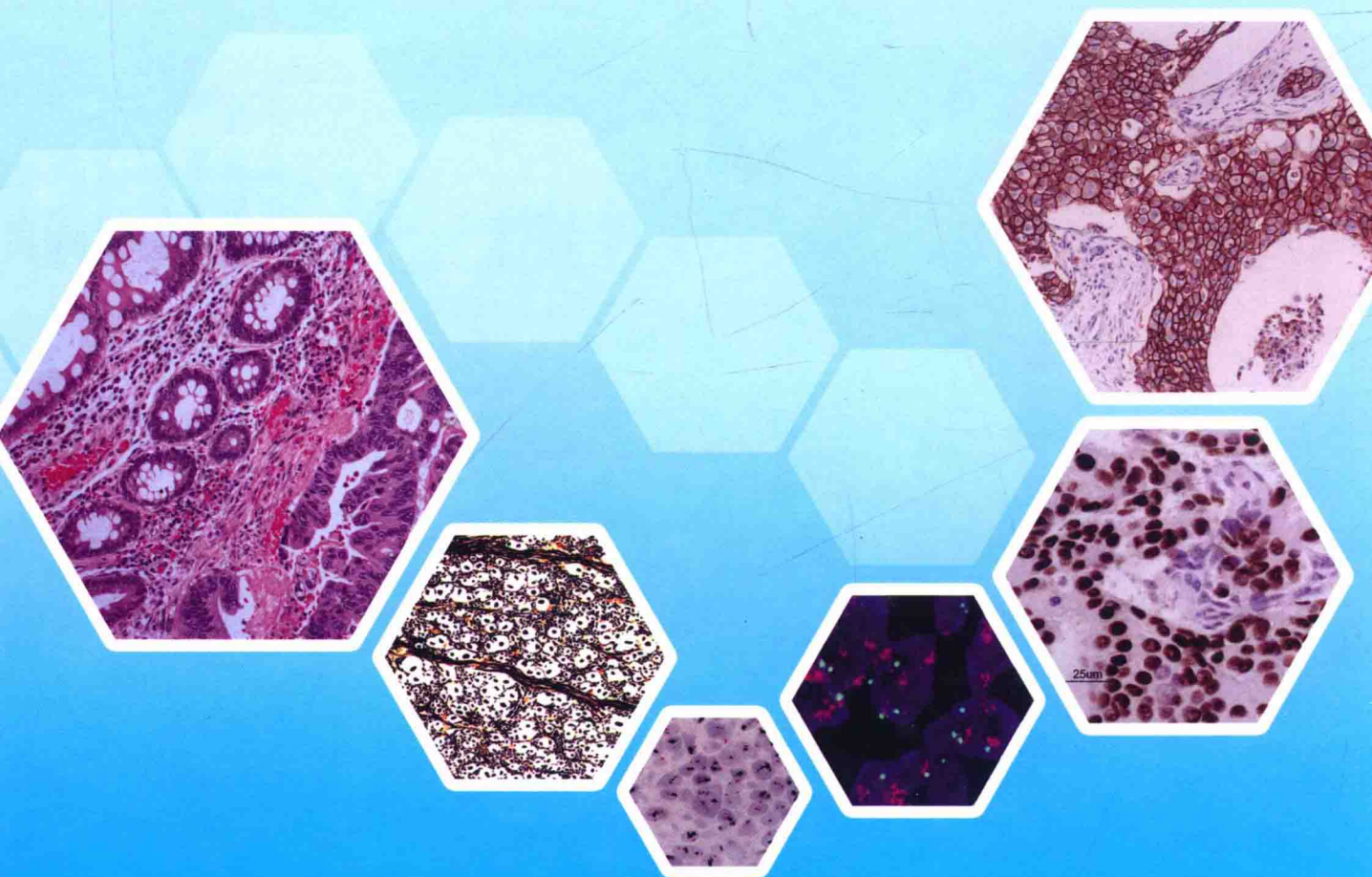


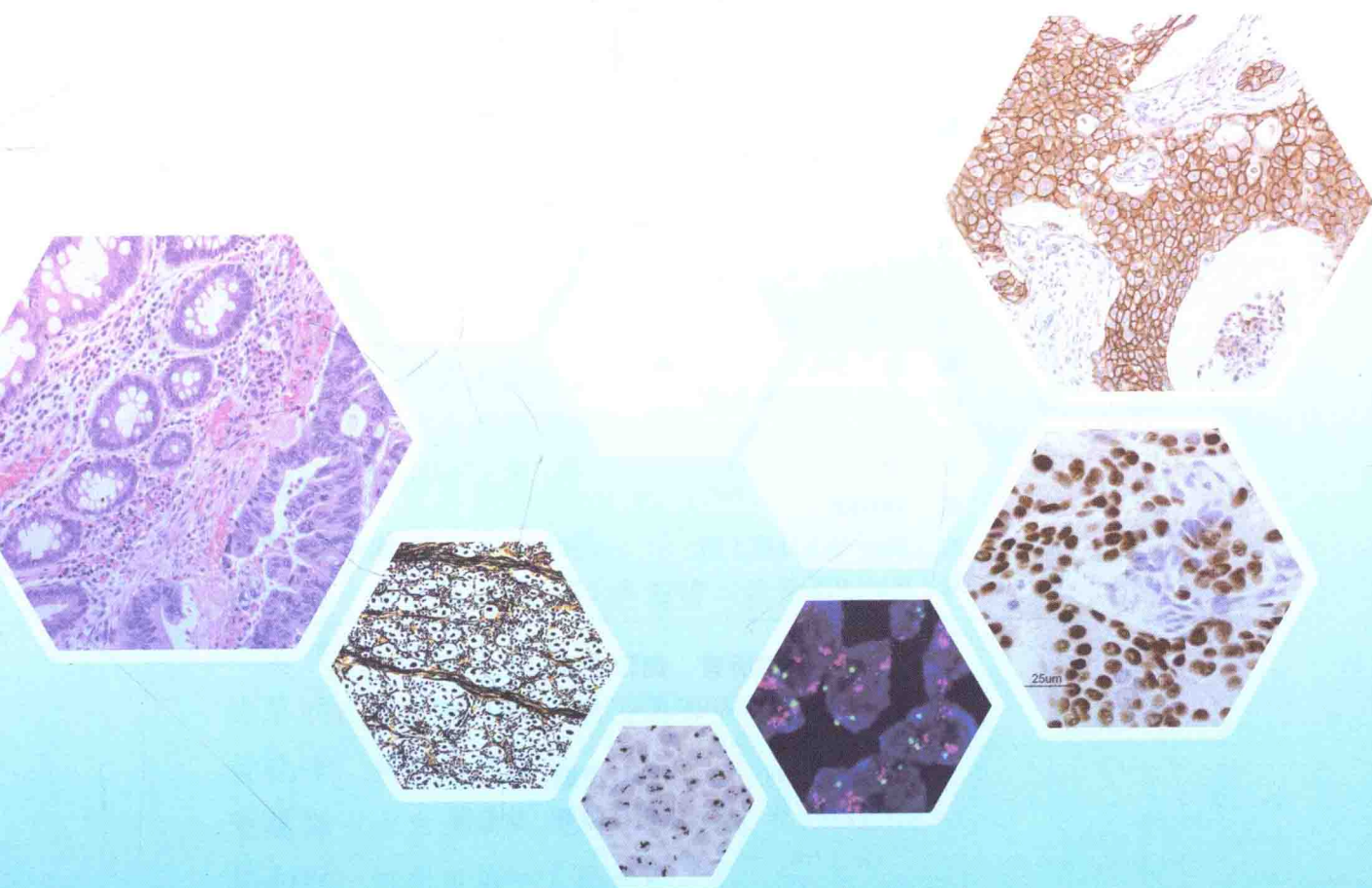
简明病理学技术

主 编 丁 伟 王德田
副主编 董建强 赵一岭 王文勇



简明病理学技术

主 编 丁 伟 王德田
副主编 董建强 赵一岭 王文勇



图书在版编目(CIP)数据

简明病理学技术 / 丁伟,王德田主编. —杭州: 浙江
科学技术出版社, 2014. 2
ISBN 978-7-5341-5914-5

I. ①简… II. ①丁…②王… III. ①病理学
IV. ①R36

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 013104 号

书 名 简明病理学技术
主 编 丁 伟 王德田

出版发行 浙江科学技术出版社
地址:杭州市体育场路 347 号 邮政编码:310006
联系电话:0571-85058048

排 版 杭州兴邦电子印务有限公司
印 刷 浙江海虹彩色印务有限公司
经 销 全国各地新华书店

开 本	890 × 1240 1/16	印 张	24.75
字 数	610 000		
版 次	2014 年 2 月第 1 版		2014 年 2 月第 1 次印刷
书 号	ISBN 978-7-5341-5914-5	定 价	178.00 元

版权所有 翻印必究

(图书出现倒装、缺页等印装质量问题,本社负责调换)

责任编辑 刘 丹 责任美编 金 晖
责任校对 张 宁 责任印务 徐忠雷

《简明病理学技术》编委会

主 编 丁 伟 王德田

副主编 董建强 赵一岭 王文勇

主 审 姚根友

编 者(按姓氏笔画排序)

丁 伟 浙江大学医学院附属第一医院

王 波 浙江大学医学院附属第一医院

王文勇 第四军医大学

王海军 浙江大学医学院附属第二医院

王德田 北京协和医院

田 侠 中国人民解放军总医院

李 琼 复旦大学附属华山医院

邹尹影 浙江大学医学院附属第一医院

应李雄 浙江大学医学院附属第一医院

周 萍 浙江大学医学院附属邵逸夫医院

周彩云 浙江大学医学院附属妇产科医院

郑舟军 浙江大学医学院附属第一医院

孟 群 浙江省人民医院

赵 菁 浙江大学医学院附属第一医院

赵一岭 第四军医大学

胡锦涛 浙江省肿瘤医院

姚洪田 浙江大学医学院附属第一医院

徐文娟 浙江省人民医院

徐黎明 浙江大学医学院附属第一医院

黄晓峰 第四军医大学

董建强 北京大学人民医院

黎向红 杭州市第一人民医院

主编简介

丁伟 1964 年出生,汉族,中国共产党党员,副主任技师。1981 年参加工作,从事病理技术研究。现任浙江大学医学院附属第一医院病理科副主任,中华医学会病理分会病理技术学组委员,卫计委病理质控评价中心病理技术组委员,中华医学会浙江病理分会委员、病理技术学组副组长,浙江省病理质量控制中心技术学组副组长,中国病理学工作者委员会常务委员,中国卫生行业人力资源库专家组成员。2001 年荣获中国优秀病理技术专家奖。

1998 年,创建了中国第一个专业病理技术网——中华病理技术网(www.dingw.com),也是迄今为止国内唯一的病理技术专业网站。一直以来,网站传播积极向上的思想,提供理论和实践知识,解决日常工作中碰到的各种实际问题,成为全国病理工作者学习和交流的平台。



王德田 中国共产党党员,1972 年参加工作,一直从事病理技术研究。现任中国医学科学院北京协和医院病理科技术组组长,中华医学会病理分会病理技术学组委员兼秘书,卫计委病理质控评价中心病理技术组副组长,中华医学会北京病理分会委员、病理技术学组副组长,北京市病理质量控制中心副主任委员兼技术学组组长。荣获中华全国总工会特别优秀奖,中国医学科学院和协和医院先进工作者、优秀共产党员和特殊贡献奖。2011 年荣获中国优秀病理技术专家奖。

序

病理技术是病理学的重要组成部分,有人说“病理技术是病理学之母”。由于有了各种解剖器械的发明、制造和使用,才产生了病理解剖学;有了显微镜和组织切片技术的发明与应用,才产生了细胞和组织病理学;有了现代电镜技术、免疫学技术、分子生物学技术的应用,才相继产生了超微病理学和分子病理学,所以病理学家们都十分重视病理技术的发展和新技术的应用。现在已进入信息病理学时代,病理学要不断吸收和创新先进技术,以服务于病理学教学科研和医疗。

培养病理技术人才和造就新一代病理技术专家是病理技术继承和发展的主要方面。只有不断提高人才素质,才能不断提升病理技术水平,赶上国际先进水平。近十年来,我国很重视病理技术专业的发展,全国病理技术专业资格职称考试和高级职称的评审制度的实施,推动了应考人员的培训和学习,提高了全国病理技术水平,培养和选拔了大量病理学人才。通过技士、技师和主管技师资格职称考试,提高了病理技术人员的基本理论和技术水平,提高了工作质量,也促进了人才的成长和公开、公平、公正的选拔。全国的病理技术从业人员以大专学历为主,部分大学本科、硕士、博士也加入了病理技术队伍,使我国病理技术人员的综合素质和工作能力有了很大的提升。

各级病理技术人员要不断学习和提高专业技术,教材是一个重要的学习资料。近十年来国内病理技术方面的专著出版很少,现在,丁伟、王德田、董建强、赵一岭、王文勇等编写的《简明病理学技术》一书的出版将填补这方面的空白,在此我表示祝贺。这五位编者都是我国优秀的病理技术专家,从事病理工作多年,精通病理学理论,具有精湛的技术和丰富的经验。全书内容包括传统技术、现代病理学新技术、计算机管理以及规范化、标准化和质量控制等,精练、实用。尤为可贵的是,编者把他们多年的实践经验和解决问题的方法图文并茂地向读者展示,传授他们的宝贵经验和创新,这是他们继承和发展病理技术的又一贡献。本书是病理技术人员和相关专业人员学习与参考的好教材,是一本很好的实验室手册。

王伯法

2013年6月10日于西安第四军医大学

前言

病理技术是病理诊断的基础。随着科技的发展,现代病理诊断越来越依赖病理技术的发展。所谓技术,一是代表先进性,有所创新;二是代表发现问题和解决问题的能力。病理技术人员不仅要能熟练地完成常规切片、特殊染色、免疫组化、分子病理等各种日常工作,更重要的是要不断地开展各种新技术,虚心学习,独立思考,发现工作中存在的问题,找出原因,解决问题,并在工作中学会科学研究,总结经验,研发新的技术。

稳定的质量是正确诊断的基础,因此必须提高病理技术从业人员的素质,建立完善的实验室操作制度并严格地按照制度规范化操作,才能做出优质的、长期稳定的、可重复的实验结果。病理技术操作过程中所产生的问题千变万化,没有一个固定的答案,也可能从书本上查不到直接的原因,这就要求病理技术人员具备丰富的物理、化学、医学和病理诊断知识,正确地判断各种结果,并把学会的知识融会贯通起来,进行逻辑推理,以找到问题的原因及解决的方法。随着免疫组化、分子生物学在病理学中的应用日益广泛,病理技术人员不仅要会操作,而且要对各种实验结果进行准确的判读和分析。基因检测、数字化切片、计算机自动识别等新技术的发展,都要求病理技术人员必须具备诊断知识和研发能力。病理技术队伍需要临床医学、生物工程、计算机、物理、化学等各学科的人才,并加以病理技术操作能力和病理诊断能力的培养,只有这样,才能与现代病理学相匹配,才能培养出新一代的病理技术专家。

本书力求简洁实用,通俗易懂,采用图文和实例相结合的方式,对常用病理技术进行深入浅出的讲解,为大家提供一些考虑问题、解决问题的思路。由于书中有很多内容基于作者个人的经验,不足之处在所难免,希望大家在学习时独立判断,正确引用,并恳请广大读者批评指正。

丁 伟

2013年7月

目录

第一章 常规切片的制作	1
第一节 取材	1
第二节 组织处理	4
第三节 染色	26
第四节 快速石蜡切片	44
第五节 冷冻切片	46
第二章 特殊染色技术	52
第一节 结缔组织染色法	53
第二节 肌肉组织染色法	66
第三节 脂类染色法	68
第四节 糖类染色法	70
第五节 病理性色素沉着染色法	78
第六节 纤维素染色法	84
第七节 淀粉样物质染色法	88
第八节 病原微生物染色法	91
第九节 神经内分泌染色法	106
第十节 核酸及核蛋白染色法	122
第三章 酶组织化学技术	125
第一节 酶组织化学检测的基本条件	125
第二节 酶组织化学检测的基本原理和方法	126
第三节 酶组织化学染色法	127
第四章 免疫组织化学染色技术	133
第一节 免疫组化标本的固定	133
第二节 免疫组化检测系统	136
第三节 抗体的类型及特点	140
第四节 免疫组化染色前的处理	141

第五节	抗体的最佳稀释度	149
第六节	免疫组化的显色及显色控制	151
第七节	免疫组化的复染	152
第八节	阴性、阳性对照	153
第九节	细胞培养免疫组化	155
第十节	细胞涂片免疫组化	155
第十一节	冷冻切片免疫组化	156
第十二节	免疫组化染色的自动化	157
第十三节	免疫组化染色常见问题及其解决方法	158
第十四节	免疫组化规范化的探讨	163
第五章	分子病理学实验技术	165
第一节	聚合酶链式反应	165
第二节	原位杂交	172
第三节	基因突变检测技术	190
第四节	荧光原位杂交技术	199
第六章	激光捕获显微切割(LCM)技术	218
第一节	LCM 技术的发展简史	218
第二节	LCM 的分类和原理	219
第三节	LCM 系统的组成	221
第四节	LCM 技术的应用	222
第五节	LCM 技术的优点及存在的问题	224
第六节	展 望	226
第七章	细胞学制片技术	229
第一节	细胞固定	229
第二节	细胞学样本制片	231
第三节	细针穿刺技术及制片	241
第四节	染 色	243
第八章	病理管理系统在病理科的应用	247
第一节	录 入	247
第二节	病理流程管理	249
第二节	自动识别、打印系统在病理管理中的应用	250
第四节	质量控制	251

第九章 病理设备的使用和保养	252
第一节 组织盒打印机	252
第二节 全封闭组织脱水机	257
第三节 石蜡包埋机	266
第四节 石蜡切片机	272
第五节 玻片打号机	275
第六节 全自动染色机	277
第七节 自动盖片机	281
第八节 冷冻切片机	290
第十章 病理科管理制度	297
参考文献	383

第一章

常规切片的制作

第一节 取材

一、标本接收

1. 查对接收 接收病理标本必须有严格的查对和签收制度,如必须查对病理送检申请单是否填写完整,申请单与送检标本的姓名、内容、数量是否相符,标本容器内是否有固定液(固定液量是否足够)等。如有不符之处,应立即与临床医师联系并作相应的处理。认真检查标本袋(瓶)内有无标本,如果没有,应拒绝接收,并在送检单及签收本上注明,以免事后发生纠纷。同时还要检查患者是否已经交费。在全部符合要求后,进行签收。

2. 异常标本的处理 对临床送检的手术标本,未经病理科医师同意,主要病灶已经剝出或一份标本送多处病理检查者,因病变不全面,病理科有权拒绝接收。如果送检标本未放固定液,应及时加入固定液并在送检单上注明。如标本发生严重自溶、腐败、干涸,应立即与临床医师联系,拒收退回或作其他相应的处理,并在送检单及签收本上注明。

3. 登记编号 当天的标本收集完毕后,应及时编号,并进行手工或电脑登记,登记簿、送检申请单、标本袋(容器)的姓名和编号必须一致。

4. 固定 送检大标本如不是当天取材,对胃、肠等有腔脏器,应剖开固定。体积较大的实体标本应注意外形后(有条件可摄影),行平行剖面剖开后固定。固定液必须高于标本表面,多于组织体积的4~10倍,并尽可能在标本的表面覆盖纱布或棉花,以防止组织表面干燥。通常在标本充分固定12~24小时后进行巨检、取材。

5. 妥善存放 由于现在很多医院都使用塑料标本袋,大标本可装入的固定液量普遍不够,当碰到室温过高或节假日休息,标本容易发生自溶、腐败,因此除加足固定液和剖开后固定外,应将标本放入4℃冷柜中待取。

6. 记录 临床医师在样本离体后应该记录离体时间,半小时内必须放入4%中性甲醛内固定,并记录固定时间。样本送到病理科后应记录接收时间(时间均精确到分)。

二、取材时的注意事项

取材医师除了应该根据各脏器取材规范要求取材外,同时还应该注意以下几点:

(1) 取材刀要锋利,在切割组织时要避免取材刀来回拖拉而挤压组织。

(2) 切取的组织块厚薄要均匀,一般厚度为0.2~0.3cm,大小以1.5cm×2.0cm为宜。取材组织的大小与厚薄不要把一次性包埋盒的空间全部占满,包埋盒的四周与上下都应该留有余地,有利于组织固定和脱水。特别是新鲜标本或固定不好的标本取材,一定要注意厚度,因为新鲜组织较软,手一按就

变得很薄,刀不容易切,切好后手一放,厚度就明显增加。所以要避免因组织太厚或组织新鲜与一次性脱水盒粘连,导致固定液不能渗透,组织固定不良、脱水不彻底,最终石蜡难以浸透到组织中去而无法起到支撑作用,难以切片。新鲜标本最好是切开固定 24 小时后再取材。

(3) 脂肪、肺、纤维性肿瘤、平滑肌瘤、癌组织等试剂不易渗入的组织应略取薄一点。

(4) 淋巴结取材时应尽量剔除周围脂肪组织,直径大于 0.3cm 的淋巴结应该修去两侧球冠。

(5) 如组织内有缝线、缝合针或骨组织,都必须除去或避开。如碰到不可避免的骨或钙化组织,应向技术组交代清楚,进行脱钙处理。

(6) 在切取纤维结缔组织时,应注意纤维的走向,尽可能选择与纤维的走向平行,并以此为长轴切取,以利于切片。

(7) 发现固定不佳的大体标本,应该查找原因,如固定液量少、固定液浓度不对、容器太小、固定液选择不适当(如乙醇),或错将其他非固定性液体当成固定液等,并立即和送检单位或送检医师联系,说明此类标本如果发生变质,可能最终无法诊断,以避免医疗纠纷和以后类似错误再次发生。在双方沟通确认、记录完毕后,才能将标本剖开切成薄片,并更换固定液,固定至第二天再取材。

(8) 包裹胃镜等小组织用的纸不要太大(以 $7\text{cm} \times 7\text{cm}$ 为宜),也不要多层,以免在处理过程中脱水试剂难以渗透或携带大量的液体,影响脱水的质量。包裹的材质也非常重要,尽可能不要使用纱布(会带入过多的前道液体)或纤维细丝的纸张(如擦镜纸,包埋时纸纤维很难去除干净,留在组织上难以切片),可以选择质地韧、透水性好、无纤维的纸张(如袋泡茶用的纸或桃花纸等)。包裹纸在折叠时,对角(A、B二角)要错开(图 1-1),不能对得很齐(否则技术员包埋时很难打开),然后将三面对角向内折成正方形,放入一次性包埋盒即可。不能将纸反复折叠成多层,以免影响试剂的渗入和交换,导致组织脱水不佳,组织在浸蜡时石蜡难以渗透,组织在高温下“干烤”而发脆、发硬。

(9) 取材完成后应该核对无误,移交给技术室,当面清点核对,取材医师和接收人员双方签字。

(10) 对有价值的大体标本应该及时进行大体标本摄影。

取材是病理标本处理的第一步。取材不规范,厚薄不均(主要是组织过厚),往往会引起组织固定、脱水、浸蜡不佳,最终导致难以切出好的切片。因为我们的标本都是成批处理的,有规定发报告的时间,因此,脱水时间的安排只能控制在一定范围内,没有足够的时间处理过厚的组织,那些过厚的标本

就会因处理时间不够而使细胞打滚甚至切不出片。没有良好的取材质量,就不会有优秀的切片,甚至会影响最后的诊断,这必须引起所有医师的重视。

最后,规范的取材记录也是病理诊断工作中的重要步骤,取材记录必须认真仔细,描述详细,书写端正。以后,用计算机输入进行取材记录描写(图 1-2)、用包埋盒打号机自动打号(图 1-3、图 1-4)会逐步广泛应用。

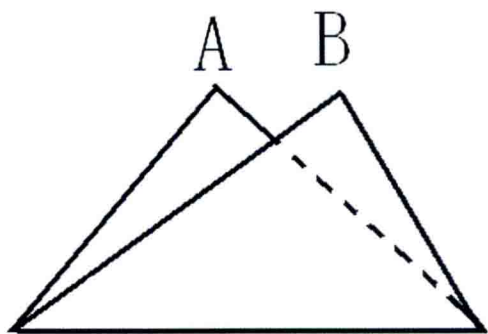


图 1-1 包裹纸折叠时对角错开

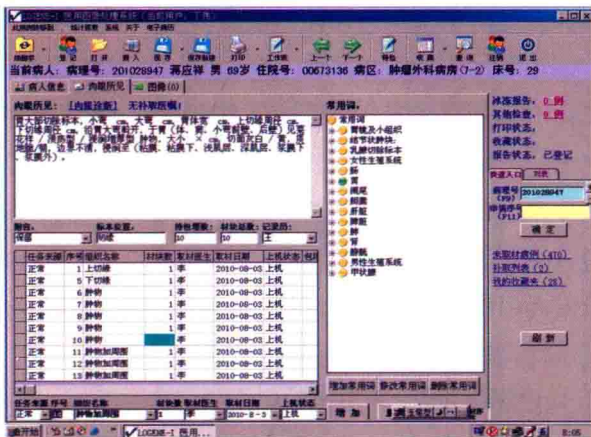


图 1-2 计算机取材记录系统



图 1-3 包埋盒打号生成系统
(也可由取材记录系统自动生成)



图 1-4 全自动包埋盒打号机



图 1-5 标本冷藏柜

三、标本的处理

取材完毕后,标本应加足固定液,按顺序排放,最好能保存在4℃冷藏柜中(图1-5),防止在存放过程中腐烂,以备复查之用。根据卫生部办公厅《关于印发〈病理科建设与管理指南(试行)〉的通知》中规定,组织标本保存期限为报告发出后2周,方可清理:倒去固定液,拿出送检容器(如金属盘、玻璃瓶等),集中焚烧或进行深埋处理。

四、环境安全与环境保护

甲醛是国际公认的致癌物。在病理取材过程中存在大量的甲醛,因此,病理科的下水管道应该纳入医院的专用污水处理系统,不得直接排入雨水管道中。标本处理后的甲醛必须集中由专业化学废液处理单位回收;也可以购买废液回收设备,利用分馏技术,将使用过的液体回收再使用。取材台排风系统的设计应该科学,由于甲醛的比重比空气略重,抽风口最好设置在台面的下侧方,上方有送风系统,切忌迎面向上抽吸。由于甲醛和二甲苯在室内墙地和家具上存在黏附和渗透现象,单一的排风系统并



图 1-6 微电脑智能控制生物安全取材工作站

不能保证室内空气符合相关的卫生要求。有条件的单位应该在取材室、标本处理室、包埋室、染色室等有害气 体产生的房间安装病理空气处理系统。该系统先控制上送下排的气流,再自动调节反应性粒子的浓度分解甲醛、二甲苯等有害气体,最后在废气外排环节再进行氧化除臭处理(或活性炭过滤),并自动监测和记录室内甲醛和二甲苯的浓度,从而更好地改善室内环境条件,减少对环境的污染(图 1-6、图 1-7)。

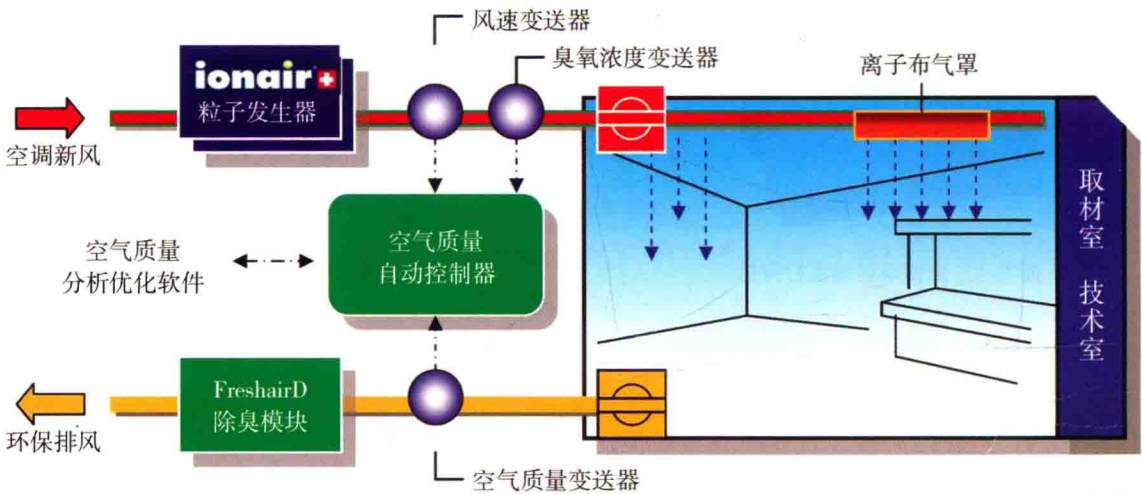


图 1-7 菲兰 ionair 病理空气处理系统示意图

第二节 组织处理

一、固定

固定是组织处理最重要的一步,也是在整个制片过程中最无法补救的一步。所谓“固定”,就是组织离体后,用各种办法使其细胞内的物质尽可能接近其生活状态时的形态结构和位置的过程。固定的目的是为了 防止组织、细胞自溶与腐败,防止细胞内酶对蛋白质的分解作用,使细胞内的各种成分如

蛋白质、脂肪、碳水化合物或酶类转变为不溶性物质,以保持原有的结构与生活时相仿。另外,组织固定后具有硬化作用,增加了组织的韧性,有利于取材和组织脱水。如果标本没有及时固定或固定不恰当,组织已经自溶或腐败,将无法逆转。

(一) 固定的注意事项

1. **固定必须及时** 组织离体后,必须立即固定(在 30 分钟内)。
2. **固定液的选择** 固定液的选择非常重要,应该根据制作要求选择合适的固定液。最常用的固定液是 4% 甲醛液或 4% 中性缓冲甲醛液。
3. **固定液的量** 固定液的量必须大于组织体积的 4~10 倍。
4. **固定液的浓度** 固定液的浓度必须准确,过稀或过浓都会影响组织的形态和固定效果。

5. **固定液的质量** 要注意固定液的有效期。发现固定液变质,如甲醛液体产生白色沉淀,应立即更换。

6. **固定的温度** 室温或放于 35~37℃ 的全封闭组织处理机(图 1-8)内。温度过高,会加快组织的自溶和组织的过度收缩,并破坏细胞内的抗原。

7. **固定的时间** 新鲜标本,应该剖开固定 12~24 小时后再取材。大标本取材后在室温下需再固定 4~6 小时。小标本取材后应该在室温下再固定 3~4 小时;如果是新鲜小标本取材,必须再固定 4~8 小时。如果室内温度过低,固定时间还需延长。需要做免疫组化或分子病理的标本,从标本离体至组织脱水开始,总固定时间一般不要超过 48 小时,但也不要少于 24 小时(厚度 2~3mm)。

(二) 最常用的固定液

1. **4% 甲醛液(10% 福尔马林液)** 甲醛(HCHO)是一种无色易溶的刺激性气体。市售甲醛水溶液的实际浓度为 40%,易挥发,日久会自行分解,产生白色沉淀(副醛:多聚甲醛或三聚甲醛),并有甲酸产生,影响组织的固定和细胞核的染色。长期保存应该加入碳酸镁、碳酸钙等碳酸盐中和。我们用作病理标本固定的为 4% 甲醛液(9 份水加 1 份浓甲醛液,实际含甲醛 4%)。甲醛是通过使蛋白质分子发生交联而产生固定作用的,穿透性好,组织收缩小,HE 染色对比鲜明,能完好地保存组织的形态。

优点:①渗透能力较强,固定均匀;②组织收缩小;③能保存脂肪和类脂体(冷冻切片法);④能增加组织的韧性;⑤有利于嗜银染色;⑥可固定高尔基体和线粒体。

缺点:①不能沉淀核蛋白和白蛋白;②溶解组织内的尿酸盐结晶;③经甲醛固定的陈旧组织较容易产生色素沉淀(可用碱性乙醇去除:浓氨水 1ml 加入 200ml 75% 乙醇内,切片脱蜡后浸入上述液体 30 分钟;或者 1% 氢氧化钾 1ml 加入 100ml 80% 乙醇内,切片脱蜡后浸入上述液体 10 分钟。如还没有去除干净,可以再延长,处理完成后用流水冲洗 5 分钟,常规染色)。

2. **4% 中性缓冲甲醛液(10% 中性缓冲福尔马林液)** 能完好地保存组织的形态,并使蛋白质、核酸等大分子在细胞内原位凝固沉淀,防止这些物质的崩解和弥漫流失,对大多数抗原和肿瘤基因等保存较好,是免疫组织化学和分子病理最常用的固定液,固定时间以 24~36 小时为宜。

4% 中性缓冲甲醛液配方:甲醛 100ml,蒸馏水 900ml,磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 4g,磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 6.5g,用 1N NaOH 调整 pH 至 7.0(由于国内甲醛质量不稳定,取甲醛 120ml、蒸馏水 880ml、磷酸二氢钠 4g、磷酸氢二钠 13g,效果更好)。



图 1-8 全封闭组织处理机

3. 笔者观点

(1) 4%甲醛液是最常用的病理标本固定液,由于免疫组化和分子病理的开展,国际上提倡使用4%中性缓冲甲醛液,以便更好地保存抗原及肿瘤基因。我们对很多组织分别使用4%中性缓冲甲醛液和4%甲醛液固定后进行免疫组化结果对照,发现多数抗原保存虽然差异并不是很明显,但还是存在差异,少数抗原和癌基因检测影响较为显著,因此应该使用4%中性缓冲甲醛液。如果星期六、星期日休息的单位,应该在固定时间结束后,把组织停留在75%或85%乙醇中,直至脱水程序开始。

(2) 由于HE染色核的等电点pH为3.3~3.6,经4%中性缓冲甲醛液固定后,在一定程度上改变了细胞核的pH,影响细胞核与苏木精染料的结合,导致细胞核容易发灰(图1-9),特别是在固定不充分的情况下。有学者认为,如能在染苏木精前调整组织切片的pH至酸性可改善染色效果,在脱蜡水化后把切片浸入3%的乙酸溶液(pH为3.0)内处理5分钟,用流水冲洗1分钟。常规苏木精染色,在一定程度上可以改善染色发灰现象,提高红蓝反差,但效果不明显。同时,胃镜等黏膜小标本在取材时,我们都喜欢在组织上加一点伊红,使小组织在包埋和切片时容易识别,容易包平和不容易漏包。在使用了4%中性缓冲甲醛液固定后,由于溶液的pH超出了伊红的着色范围,组织不能被伊红着色,这给包埋和切片带来了困难,这点可以在脱水乙醇(95%或无水)或二甲苯中溶解少许伊红粉末来解决。但此方法使用时间久后,可能会引起伊红在脱水机管路中沉淀、累积,导致机器堵塞。笔者认为,HE切片的质量是病理学诊断的重中之重,是诊断的基础,和免疫组化质量同样重要,甚至更重要。为了把对抗原的影响减小到最低程度,同时又保证HE切片的质量,我们选择了取材前小标本用4%中性缓冲甲醛液固定,取材后使用4%甲醛液再固定2~3小时的方法(如果送检时有要求进行分子病理检测的标本除外),能解决小标本在组织处理过程中伊红染不上色的问题,同时也在一定程度上减轻了细胞核发灰的现象。这种方法尽管对免疫组化和分子病理的影响很小,但各单位技术员在使用前,必须与科室主任和临床医师协商,在他们许可后才能使用。也可根据不同的要求,选用两种或两种以上的固定液,分别处理。有条件的单位还应该建立组织冷冻库,以适应各种特殊的需求。

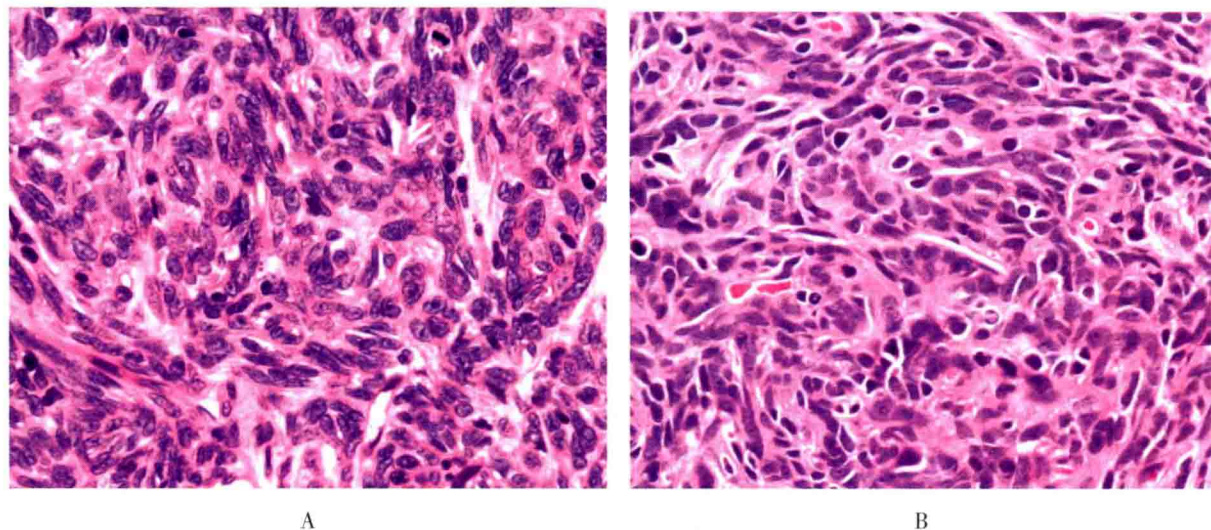


图1-9 A:用4%甲醛液固定24小时的组织,核染色质清晰,核浆对比鲜明 B:用4%中性甲醛液固定24小时的组织,核染色质呈均质状,核浆对比不鲜明

(3) 固定不佳的组织,由于脱水剂(乙醇)能使蛋白质发生凝固,使脱水剂难以渗入组织中,造成组织脱水不佳;同时乙醇又起到凝固性固定的作用,使交联与凝固性固定在不同程度上混合,对抗原的保存可能会起到不良的影响。因此,固定是组织处理过程中最重要的一步:固定充分的组织,由于固

定液已经全部渗透到组织中去并与组织结合,细胞质、组织结构都已经固定,脱水剂很容易将组织中的固定液和水分置换出来,因此很容易脱水;同时固定不足对抗原的影响远远超过了固定过度所造成的影响。

(4) 固定时间、固定液浓度与固定液渗透速度:手术切除器官及肿瘤标本的固定和取材后标本的固定不尽相同,手术切除标本由于具有一定的立体外形、包膜等,固定液不容易渗透。固定液浓度过高,往往会引起周围组织收缩,影响固定液浸透到组织深处,造成组织中央固定不佳;固定液浓度过低,容易造成组织边缘水肿而组织中央固定不佳的现象。当手术标本过大时,如脾、肾、全胃、肠等脏器,由于渗透速度的因素,甲醛与组织的结合速度会变慢,如4%甲醛固定液,24小时只能穿透2~3mm的实体组织和5mm的多孔疏松组织(渗透的速度受标本的致密度、包膜的厚度、包膜外有无脂肪包裹、固定液的量、温度等因素影响;而取材后的组织,由于上下两面组织被刀切过,固定液容易渗透)。如标本的厚度超过5mm,经24小时固定后,通常只有靠近边缘1~2mm的组织固定好,而中央的组织固定不佳(图1-10),甚至腐烂。因此此类标本应该切开固定,剖开标本厚度以3~5mm为佳,当标本超过此厚度后,甲醛与组织的结合速度会变慢。

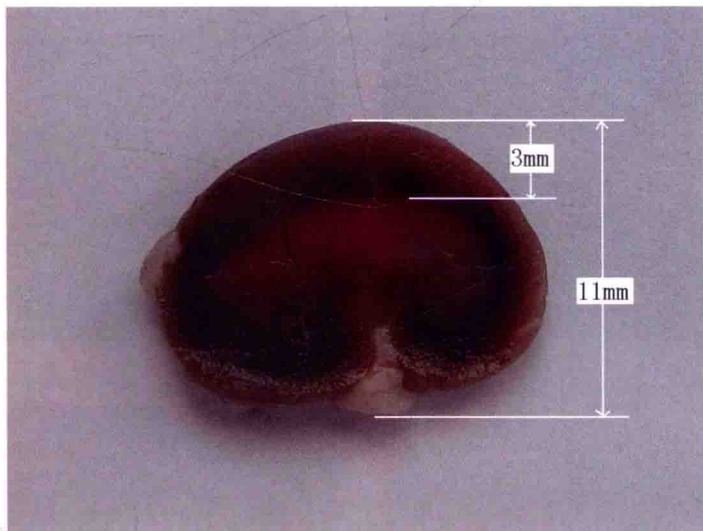


图1-10 大鼠肾(直径8mm),经4%中性甲醛液固定24小时后剖开时的固定效果:边缘深棕色部分已经固定,中央浅红色部分未固定

第二天取材后的标本,脱水前还应该再固定6~8小时。

在一定范围内,固定液浓度高,固定所需的时间短(但固定液浓度过高,组织容易发硬,细胞收缩明显);而固定液浓度低,固定所需的时间长(固定液浓度过低会导致组织水肿,还容易引起组织变质),如图1-11所示。因此,合适的固定液浓度不仅能快速地固定组织,还能保存其优良的细胞形态、结构和抗原。