

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.05.030

骨组织脱钙方法探讨*

方捷迪, 王晓星, 李争艳, 周 琴, 易慕华[△]

(三峡大学附属仁和医院病理科, 湖北宜昌 443001)

摘 要:目的 比较不同的脱钙液对骨组织的脱钙能力和脱钙后 HE 染色效果, 寻找一种最佳的骨组织脱钙方法。方法 通过查阅文献资料, 把文献报道的 3 种相对较理想的脱钙液用于临床病理骨组织脱钙中, 对比 3 种脱钙液对骨和骨髓组织常规病理切片质量和 HE 染色效果。结果 3 种脱钙液脱钙时间的比较, 甲酸-甲醛脱钙液 > 改良 Jenkins 脱钙液 > 硝酸-甲醛脱钙液。3 种脱钙液脱钙效果的比较, 硝酸-甲醛脱钙液 > 改良 Jenkins 脱钙液 > 甲酸-甲醛脱钙液。3 种脱钙液对组织损伤的比较, 硝酸-甲醛脱钙液 > 甲酸-甲醛脱钙液 > 改良 Jenkins 脱钙液。结论 改良 Jenkins 脱钙液对组织损伤较小, 脱钙效果充分, 适当缩短脱钙时间, 切片染色质量上乘, 可以作为一种相对理想的骨组织脱钙剂推广应用。

关键词:骨组织; 脱钙方法; 改良 Jenkins 脱钙液; 硝酸; 甲酸**中图法分类号:**R361**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2018)05-0670-03

骨组织是由黏多糖和一些蛋白质纤维构成的骨样组织和沉着于其中的无机盐形成的, 是一种坚硬的结缔组织, 包括细胞及细胞外基质。细胞随其发育阶段可分为骨祖细胞、骨母细胞、骨细胞、破骨细胞^[1], 细胞外基质包括有机物和无机物, 有机物中包括胶原纤维和无定形基质, 无机物中主要为骨盐。脱钙是应用化学或物理化学的方法将骨组织成分中的钙盐与胶原纤维分离, 弃去钙盐^[2], 保留完整有机成分的一种方法。脱钙方法与脱钙液的选择与骨组织切片的制作质量有着密切的关系。骨组织在制片前必须用脱钙液将组织中的钙盐除去, 才能制成 4~5 μm 厚的切片^[3]。如果脱钙不完全, 切片时不仅损坏刀刃, 而且染色时组织易出现脱片等现象^[4]。如果脱钙过度, 会破坏组织结构, 使组织抗原丢失, 严重影响对送检标本的临床病理诊断^[5], 因此选择合适的脱钙方法很有必要。脱钙液有无机酸(硝酸、盐酸、硫酸)和有机酸(醋酸、甲酸)两大类^[6], 脱钙液是决定骨骼组织切片质量、染色效果的关键^[7]。目前在临床病理脱钙中, 有 3 种脱钙液较理想, 本研究通过比较 3 种脱钙液的脱钙效果和染色制片质量, 旨在选择一种最好的脱钙方法应用于临床骨组织脱钙。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院送检的骨肿瘤、病变骨及钙化组织标本 15 例, 组织离体后即 10% 中性缓冲甲醛溶液充分固定 12~24 h。

1.2 试剂及仪器 浓盐酸、硝酸、无水乙醇购自广东汕头西陇化工股份有限公司; 甲酸、氯仿、苏木素、伊红、中性树胶购自珠海 Baso 公司; 冰醋酸、二甲苯、甲醛购自武汉市中天化工有限公司。常州中威 TSJ-QX 型全自动封闭式组织脱水机, WB-3000 型包埋机, 徕

卡 2235 型切片机。

1.3 试剂配制 (1)改良 Jenkins 混合溶液:浓盐酸 5 mL, 冰醋酸 5 mL, 氯仿 10 mL, 无水乙醇 70 mL, 10% 中性缓冲甲醛 10 mL。(2)硝酸-甲醛液:甲醛 10 mL, 蒸馏水 90 mL, 纯硝酸 20 mL。(3)甲酸-甲醛液:甲酸 15 mL, 甲醛 5 mL, 蒸馏水 80 mL。(4)10% 中性缓冲甲醛液的配制:蒸馏水 1 000 mL, 37% 的甲醛溶液 100 mL, 磷酸二氢钠 4 g, 磷酸氢二钠 6.5 g, 用 1 mol/L 氢氧化钠调整 pH 至 7.2~7.4。

1.4 方法 (1)固定。组织要求及时充分固定, 大块骨组织应锯开固定, 用中性缓冲甲醛液固定时间不少于 12~24 h。(2)取材。骨髓穿刺标本一般长约 1 cm、直径 0.05~0.1 cm, 不需修块, 可直接用滤纸包好脱钙。大块的骨肿瘤、病变骨、钙化组织根据标本的不同用骨钳或骨锯处理成 1.5 cm×1.0 cm×0.2 cm 的骨组织块。(3)脱钙及终点判断。①物理方法:随时观察脱钙情况, 当组织块呈半透明状浮在液面上, 手指按压柔软有弹性, 用大头针可轻松刺入骨皮质表示脱钙完全。②化学方法:用吸管取脱钙液 1 mL, 加 10% 草酸钾 1 mL 摇匀, 以草酸盐结晶不析出为脱钙终点。(4)脱钙后的除酸处理。脱钙完全后, 标本用流水冲洗 5 min, 碳酸锂饱和水溶液 5 min, 冲洗 3 次; 再流水冲洗 10 min, 即可进行常规脱水, 染色时适当延长组织在苏木素中的时间, 而在伊红停留的时间适当缩短, 这样可以得到更好的对比度。

1.5 观察指标 骨组织脱钙时间、骨组织、HE 染色效果。

2 结 果

经上述方法比较得出:骨组织块经改良 Jenkins 液常温脱钙 4 d 左右脱钙完全, 组织损伤小, 常规制片

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(201407093);三峡大学科学基金资助项(KJ2014B085)。

[△] 通信作者, E-mail:33784817@qq.com。

效果好,切片平坦,薄厚均匀,镜下见组织结构完整,无皱缩、龟裂现象,细胞核呈蓝色,骨基质、纤维、软骨呈不同程度的红色,色泽鲜艳,对比度好。骨组织块在甲酸-甲醛脱钙液中 72~120 h 脱钙完全,组织损伤较小,切片结构完整,染色鲜艳均匀,对比度较好。骨组织块在硝酸-甲醛脱钙液中 48~60 h 到达脱钙终点,肉眼见组织稍发泡肿胀,颜色淡黄,切片容易出现刀痕;镜下见组织结构欠完整,胞核淡染着色弱,对比度欠佳。3 种脱钙液脱钙时间的比较,甲酸-甲醛脱钙液>改良 Jenkins 脱钙液>硝酸-甲醛脱钙液。3 种脱钙液脱钙效果的比较,硝酸-甲醛脱钙液>改良 Jenkins 脱钙液>甲酸-甲醛脱钙液。3 种脱钙液对组织损伤的比较,硝酸-甲醛脱钙液>甲酸-甲醛脱钙液>改良 Jenkins 脱钙液。

3 讨 论

脱钙是骨组织制片中的必要环节,如若脱钙不彻底,则组织切片困难,染色时易脱片,镜下观察骨组织结构模糊,胞核皱缩,部分区域折叠卷曲,影响病理诊断的及时性和准确性^[8]。寻找简便、快捷、有效的脱钙方法是骨组织病理学研究的重要课题之一。结合多年骨组织脱钙经验,笔者认为以下方面值得关注。

3.1 骨组织的固定 骨组织及时、充分的固定不仅能保存良好的骨组织形态结构,而且能防止组织自溶腐败,阻止细胞内外的酶对蛋白质的分解作用、保存组织细胞的抗原性^[9]。脱钙液中的酸对骨组织有不同程度的损伤,未固定的组织在酸性脱钙液中受到的损伤比已固定的组织大 3 倍,所以骨组织必须先固定后脱钙,或脱钙与固定同时进行,未经固定的骨组织不宜脱钙。

3.2 脱钙时应权衡的因素 (1)尽量减少脱钙液对组织和细胞成分的损伤,保护组织微细结构。(2)能充分去除钙质,又不影响后续 HE 和 IHC 染色。(3)脱钙方法简单,试剂价廉易得,适当兼顾脱钙时间^[10]。

3.3 脱钙后的中和酸处理 常规硝酸脱钙后的组织一般需要流水冲洗 10~12 h,费时又不环保,本文脱钙到达终点后先流水冲洗 5 min,然后饱和碳酸锂水溶液处理 5 min×3 次,再流水冲洗 10 min,只需短短 30 min 即完成整个除酸过程。具有以下优点:由于饱和碳酸锂水溶液是一种弱碱液,能很快渗入到组织细胞中中和酸,大大缩短了流水洗涤时间,经此改进除酸方法制成的切片对苏木素嗜染性强,效果稳定。

3.4 脱钙液的选择 本科室近年来一直采用 10% 硝酸脱钙,主要是因为其脱钙能力强,脱钙时间短,但这也使骨组织的脱钙程度较难掌握,容易过脱,对组织造成损伤。硝酸在脱钙过程中会产生二氧化碳,气泡从组织中溢出会使结缔组织分离^[11],破坏组织结构。另外,硝酸处理组织后染色效果差,胞核不着色或者

色浅,不均匀,对比度欠佳。甲酸又名蚁酸,其脱钙速度比硝酸慢,破坏组织的程度比硝酸轻,但脱钙时间稍长,疏松骨片需脱钙 48 h,致密骨片需 4~5 d,其中每 3 d 需更换新液 1 次^[1]。所以迫切需要寻找好的脱钙方法取而代之。通过查阅文献,综合比较文献介绍的较为理想的 3 种脱钙方法,发现 Jenkins 复合脱钙液弃硝酸而选用盐酸,对组织损伤小,不会使组织膨胀,而是使组织略有收缩。骨组织块经此液脱钙后,切片完整,平坦均匀,无返砂现象。不足之处同样在于组织处理时间过长,脱钙完全约需要 7 d 左右。2015 年初本科室摸索改良 Jenkins 原配方,争取缩短脱钙时间,实验中把盐酸的量由原来的 4 mL 增加为 5 mL,冰醋酸由原来的 3 mL 也增加为 5 mL,无水乙醇由原来的 73 mL 降为 70 mL,氯仿及甲醛剂量不变,经过近 50 例骨组织块脱钙观察,组织处理时间大为缩短,骨密度高的如股骨组织块常温下 72 h 即可彻底脱钙,骨密度较低的骨松质 36~48 h 也能脱钙完全,若加急则可以将脱钙液放入 37 ℃ 恒温箱中,骨组织块 24 h 左右即达到脱钙要求。此组合脱钙液中盐酸为强酸,增加盐酸用量旨在加快脱钙时间,同时又担心影响细胞核的着色,实际操作中观察发现,通过改善除酸方式,盐酸与生理盐水和氯仿混合后对细胞核的着色影响甚微,盐酸除了加快脱钙速度,还有使组织略收缩的功效,降低了冰醋酸对组织膨胀的影响^[12]。由于骨组织的致密性,固定剂的选用要求具有强的穿透力,Jenkins 复合脱钙液选用中性甲醛,甲醛具有穿透速度快、固定均匀、对组织收缩较小的特点,使得脱钙液不但具有脱钙作用,同时兼具较好的固定作用。冰醋酸具有在固定时穿透速度快,且有防止组织自溶变性的特点,同时还能使组织略膨胀,稍加量即可抵消盐酸及甲醛引起的组织收缩和硬化^[13]。骨组织在改良 Jenkins 液脱钙彻底后切片光滑细腻,厚度可达 4 mm,骨与骨周围组织形态保持完整,骨髓腔内的细胞清晰可见,胞质、胞核及骨小梁着色均匀,色彩鲜艳,对比度强,能较好地显示骨组织的各种结构,是一种较理想的用于临床病理工作的脱钙方法。

参考文献

- [1] 来茂得,丁伟,丁华野. 高级卫生专业技术资格考试指导用书:病理学高级教程[M]. 北京:人民军医出版社,2015:921-924.
- [2] 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.
- [3] WITTER K, MATULOVA P, MISEK I. The effects of two different decalcification procedures on size and structure of embryonic epithelial tissue in objects prepared for light microscopy[J]. Anat Histol Embryol,2000,29(6):

351-355.

[4] 黄少伟,苏俊芳,周莹,等. 三种骨组织脱钙方法的比较[J]. 解剖学研究,2016,38(1):76-78.

[5] 罗灿峤,莫木琼,钟觉民. 不同的脱钙液在骨组织制片中的比较应用[J]. 中国实用医药,2011,6(19):27-28.

[6] 黄勋福,毛荣军,房惠琼,等. 骨组织甲酸脱钙浓度探讨[J]. 实用医技杂志,2009,16(3):226.

[7] 李玉莲,徐晓艳. 临床病理检验中不同骨组织脱钙液效果的比较[J]. 山西医科大学学报,2014,45(10):996-997.

[8] 王珏,朱礼国,张健. 影响骨组织切片质量的原因分析[J]. 江西医学检验,2007,25(2):175.

[9] 万俊峰,王影,侯俊. 不同固定、脱钙方式对骨组织常规切片的影响[J]. 肿瘤预防与治疗,2012,25(3):181-183.

[10] 陈世梁,卢志承,董玉英. 介绍一种改良脱钙液在骨组织制片中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志,2009,25(5):557-558.

[11] 张大贵,林小芳,张普,等. 三种脱钙液对骨组织免疫组化染色的影响[J]. 中国现代医生,2012,50(24):101-103.

[12] 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.

[13] 白直成,鲁萍,顾栋桦,等. 骨组织病理制片三种脱钙液比较[J]. 中国现代医生,2011,49(29):75-76.

(收稿日期:2017-08-17 修回日期:2017-10-03)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 05. 031

大连地区表观健康人群同型半胱氨酸参考区间的建立*

刘 彤¹,马建军²,杨建敏²,王 波¹,薛邦禄¹

(1. 辽宁省大连市中心医院检验科 116033;2. 大连医科大学检验学院,辽宁大连 116044)

摘 要:**目的** 分析大连地区不同性别、不同年龄表观健康人群同型半胱氨酸(HCY)的水平,初步建立大连地区表观健康人群 HCY 参考区间。**方法** 使用循环酶比色法检测 2 449 例体检健康人群血清 HCY 水平,根据性别、年龄分组(分为男女各 6 个年龄组:≥20~29 岁、≥30~39 岁、≥40~49 岁、≥50~59 岁、≥60~69 岁、≥70 岁),对结果进行统计学分析。**结果** 男女性 HCY 水平差异有统计学意义($P<0.05$),不同年龄组组间两两比较,发现男女的 HCY 水平在年龄≥20~29 岁、≥30~39 岁、≥40~49 岁这 3 个年龄组差异均无统计学意义($P>0.05$);在年龄≥50~59 岁、≥60~69 岁、≥70 岁这 3 个年龄组差异也无统计学意义($P>0.05$)。男性 HCY 参考区间:≥20~49 岁为 8.12~24.08 μmol/L,≥50 岁为 8.73~21.53 μmol/L;女性 HCY 参考区间:≥20~49 岁为 5.84~17.77 μmol/L,≥50 岁为 6.52~16.43 μmol/L。**结论** 大连地区表观健康人群的 HCY 的参考区间与年龄、性别均有关系,因此可以根据不同年龄、性别建立各自的参考区间,对于临床有一定参考意义。

关键词:同型半胱氨酸; 表观健康人群; 循环酶比色法; 参考区间
中图法分类号:R446 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2018)05-0672-03

同型半胱氨酸(HCY)是蛋氨酸和半胱氨酸的代谢产物,是人体内的一种含硫氨基酸。如今已经证实 HCY 是一种血管损伤性氨基酸,高 HCY 是心脏、外周脑血管疾病的独立危险因素^[1]。高 HCY 血症与糖尿病并发的肾病具有相关性,动态监测血清 HCY 和尿微量清蛋白对糖尿病患者具有重要意义^[2]。血清 HCY 水平升高是脑卒中的一个独立危险因素,如果 HCY 水平过高,也会提高脑卒中的危险性^[3-4]。因此血清 HCY 对身体健康水平评估及临床疾病的诊治、预后有着重要意义。但目前为止,国内外对 HCY 水平的流行病学方面的探讨研究比较多,其参考区间的分析相对较少。且大多数医院在进行检测时选择以试剂说明书上的参考范围为标准,忽略了对不同地域、年龄、民族等差异性的分析。本研究采用循环酶

比色法检测体检 2 449 例表观健康人群,检测其血清 HCY 水平,探讨性别和年龄对 HCY 水平的影响,初步建立大连地区表观健康人群 HCY 参考区间。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取大连市中心医院体检中心 2015 年 12 月至 2016 年 12 月体检健康人群的血清标本 2 449 例,其中男 1 314 例(≥20~29 岁 273 例、≥30~39 岁 260 例、≥40~49 岁 361 例、≥50~59 岁 286 例、≥60~69 岁 102 例、≥70 岁 32 例);女 1 135 例(≥20~29 岁 267 例、≥30~39 岁 271 例、≥40~49 岁 238 例、≥50~59 岁 223 例、≥60~69 岁 108 例、≥70 岁 28 例)。

1.2 仪器与试剂 仪器为西门子 ADVIA 2400 全自动生化分析仪。试剂包括 HCY 体外诊断试剂盒、校

* 基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2014AA022304)。