

引用本文:张淑艳,康林,张秀智,等.环保试剂聚羟基丙烯酸和 Van-clear 用于 HE 染色效果分析[J].安徽医药, 2022, 26(4): 809-811. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.04.038.

◇临床医学◇



环保试剂聚羟基丙烯酸和 Van-clear 用于 HE 染色效果分析

张淑艳,康林,张秀智,徐明堂,马晓丽

作者单位:河北省人民医院病理科,河北 石家庄 050051

摘要: **目的** 探讨聚羟基丙烯酸和 Van-clear 在苏木精-伊红染色法(HE 染色)中的应用效果。**方法** 收集河北省人民医院 2018 年 1 月至 2019 年 1 月期间送检的脑组织(12 例)、脾组织(18 例)、骨髓组织(22 例)、淋巴结组织(50 例)、淋巴瘤组织(10 例)、乳腺纤维腺瘤组织(62 例)、宫颈腺癌组织(26 例)、子宫平滑肌瘤组织(74 例)、慢性宫颈炎组织(102 例)、胎盘组织(35 例)、脂肪组织(57 例),同一部位各取材两块,采用抽签法随机分为 A 组和 B 组。A 组采用传统甲醛和二甲苯处理 HE 切片 468 张,B 组采用环保试剂聚羟基丙烯酸和 Van-clear 处理 HE 切片 468 张,观察对比两组切片 HE 染色情况。**结果** 两组切片均取材完整、厚度适宜、未见褶皱或刀痕、HE 染色核浆清晰、红蓝适度、透明洁净、封裱美观;A 组优良率与 B 组优良率相比差异无统计学意义(98.08% 比 98.71%)($P>0.05$);将 A 组 HE 染色结果作为参照,B 组切片的优、良、中、差染色结果与 A 组染色结果的符合率分别为 97.4%(456/468)、98.2%(459/468)、99.4%(465/468)、100%(468/468),本研究符合率最小为 97.4%,将 A 组 HE 染色结果作为参照,B 组 HE 染色结果预期符合率较高。**结论** 聚羟基丙烯酸和 Van-clear 处理切片相较于甲醛和二甲苯更加环保、对病理工作人员的刺激性小、安全性高,在不改变任何处理程序的情况下效果相当,对于病理实验室而言具有运用推广意义。

关键词: 着色剂; 染色与标记; 丙烯酸树脂类; 环保试剂; 聚羟基丙烯酸; Van-clear; 苏木精-伊红染色法; 应用效果

Application of environmental protection reagents polyhydroxyacrylic acid and Van-clear in HE dyeing

ZHANG Shuyan, KANG Lin, ZHANG Xiuzhi, XU Mingtang, MA Xiaoli

Author Affiliation: Pathology Department, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China

Abstract: **Objective** To investigate the application effect of environmental protection reagents polyhydroxyacrylic acid and Van-clear in Hematoxylin eosin staining (HE staining). **Methods** Brain tissue (12 cases), spleen tissue (18 cases), bone marrow tissue (22 cases), lymph node tissue (50 cases), lymphoma tissue (10 cases), breast fibroma tissue (62 cases), cervical adenocarcinoma tissue (26 cases), uterine leiomyoma tissue (74 cases), chronic cervicitis tissue (102 cases), placenta tissue (35 cases) and Adipose tissue (57 cases) in Hebei Provincial People's Hospital from January 2018 to January 2019 were collected. Two pieces were taken from the same part. The pieces were assigned into group A and group B by lottery. In group A, 468 HE slices were treated with traditional formaldehyde and xylene, and in group B, 468 HE slices were treated with polyhydroxyacrylic acid and Van-clear. The HE staining of the two groups was observed and compared. **Results** Two groups of slices were taken intact, suitable thickness, no wrinkles or knife marks, clear HE staining pulp, moderate red and blue, transparent and clean, and beautiful mounting. There was no significant difference in the excellent and good rate between group A and group B (98.08% vs. 98.71%) ($P>0.05$). The HE staining results of group A were taken as a reference, and the Excellent, Good, Medium and Poor staining results of group B were 97.4% (456/468), 98.2% (459/468), 99.4% (465/468) and 100% (468/468) respectively in accordance with the staining results of group A. The minimum coincidence rate of this study was 97.4%. It was concluded that the expected coincidence rate of HE staining results in group A was higher than that in group B. **Conclusion** Compared with formaldehyde and xylene, polyhydroxyacrylic acid and Van-clear are more environmentally friendly, less irritating and safe for pathological workers. They have the same effect without changing any treatment procedures. They are of great significance for the application and popularization of pathological laboratories.

Key words: Coloring agents; Staining and labeling; Acrylic resins; Environmental protection reagent; Polyhydroxyacrylic acid; Van-clear; Hematoxylin-eosin staining; Application effect

苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法是石蜡切片技术中较常用的染色法之一,苏木精(H)染液主要使细胞核内的染色质以及细胞质内的核

酸着紫蓝色,伊红(E)主要使细胞质以及细胞外基质中的成分着红色^[1]。及时、准确地固定、透明、脱蜡处理是 HE 染色过程中的关键步骤,目前病理学

界中主要采用甲醛和二甲苯来处理标本切片,但有研究指出甲醛和二甲苯具有刺激性,病理工作者又需要长期接触这两种试剂,长此以往容易对病理工作者的身体健康造成严重影响^[2-3]。因此,寻找环保、安全性高的固定液和透明脱蜡液就显得尤为重要。本研究运用环保试剂聚羟基丙烯酸和 Van-clear 共同代替甲醛和二甲苯处理切片,结果如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集河北省人民医院 2018 年 1 月至 2019 年 1 月期间送检的脑组织(12 例颞叶癫痫病人病变组织)、脾组织(18 例脾功能亢进病人病变组织)、骨髓瘤组织(22 例)、淋巴结组织(50 例肺癌/胃癌手术中切除的淋巴结标本)、淋巴瘤组织(10 例)、乳腺纤维腺瘤组织(62 例)、宫颈腺癌组织(26 例)、子宫平滑肌瘤组织(74 例)、慢性宫颈炎组织(102 例)、胎盘组织(35 例子痫前期病人)、脂肪瘤组织(57 例),病人年龄范围 18.7~70.5 岁,年龄(41.8±5.2)岁。同一部位标本各取材两块,采用抽签法随机分为 A 组和 B 组。A 组采用环保试剂聚羟基丙烯酸和 Van-clear 制作 HE 切片 468 张,B 组采用传统甲醛和二甲苯制作 HE 切片 468 张,病人或其近亲属知情同意,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 试剂与设备 聚羟基丙烯酸固定液购自于广州艾发生物医学技术工程有限公司, Van-clear 环保透明脱蜡剂购自于上海创讯医疗器械有限公司,甲醛溶液购自于上海一基实业有限公司,二甲苯购自于上海一基实业有限公司,苏木精染液、伊红染液购自于上海谨生生物科技有限公司。SAKURA Tissue Tek VIP-5 全自动密闭式组织脱水机、DRS-2000J-D2 全自动染色机产自于日本樱花检验仪器株式会社, Thermo HM325 轮转石蜡切片机产自于德国 Thermo 公司,切片厚度为 2~3 μm, BJ43-PAS8000 病理图像分析仪产自于北京市中西集团公司, OLYMPUS BX51 荧光显微镜产自于日本奥林巴斯株式会社。

1.3 组织处理和制作切片 A 组采用 4% 的中性缓冲甲醛液固定,经全自动组织脱水机脱水、二甲苯透明、浸蜡等处理,B 组采用聚羟基丙烯酸固定液固定,经全自动组织脱水机脱水、Van-clear 透明、浸蜡等处理。过程中注意固定液的量需达到标本体积的 10 倍,标本固定 12 h 后取材。

1.4 HE 染色 A、B 组标本分别经过二甲苯或 Van-clear 脱蜡处理之后,采用 100% 乙醇×2 各 3 min,流水冲洗;苏木精染色 12 min,流水冲洗;1% 的盐酸乙醇分化数秒,水洗;1% 氨水返蓝,水洗;1% 醇溶性伊红染色 1 min,70% 乙醇各 30 s,95% 乙醇×2 各 30 s,

100% 乙醇×2 各 2 min, Van-clear 或二甲苯×2 各 2 min,最后中性树胶封固。操作过程中相关病理组织处理流程和时间均严格按照中华医学会病理学会病理技术的相关规定和流程进行^[4],两组组织切片的 HE 染色均在相同的条件中进行,以减少研究结果的误差,提高可信度。

1.5 HE 结果判断和评分 根据中国常规病理切片质控中心推荐的质控评分标准^[5]判断两组切片 HE 染色情况,判断的内容主要包括切片的脱蜡度、透明度、着色度、颜色鲜亮度等,采用优、良、中、差对切片的染色结果进行评定:优,切片的脱蜡度好、透明度好、着色度适中、颜色鲜亮度好;良,切片中组织染色程度较好,存在少量背景;中,切片中组织染色程度一般,存在大量背景;差,切片中组织染色程度差甚至未染色。

1.6 统计学方法 用 SPSS 21.0 对数据进行统计学分析。以率和百分比描述切片 HE 染色结果的优良率,采用 χ^2 检验比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。将 A 组的 HE 染色结果作为实验参照,判断 B 组的 HE 染色结果与 A 组的符合率。

2 结果

2.1 两组切片 HE 染色情况 两组切片均取材完整、厚度适宜、未见褶皱或刀痕、HE 染色核浆清晰、红蓝适度、透明洁净、封裱美观,具体可见图 1,2。

2.2 两组切片 HE 染色切片优良率比较 A 组与 B 组优良率差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 两组切片 HE 染色切片优良率比较/例

组别	例数/例	优/例	良/例	中/例	差/例	优良率/%
A 组	468	386	73	8	1	98.08
B 组	468	391	71	5	1	98.71

注:两组优良率比较, $\chi^2=0.61$, $P=0.435$ 。

2.3 B 组与 A 组 HE 染色结果符合率 将 A 组 HE 染色结果作为参照,B 组切片的优、良、中、差染色结果与 A 组染色结果的符合率分别为 97.4%(456/468)、98.2%(459/468)、99.4%(465/468)、100%(468/468),符合率最小为 97.4%,将 A 组 HE 染色结果作为参照,B 组 HE 染色结果预期符合率较高。

3 讨论

病理诊断是临床医学疾病诊断的金标准,而优质的 HE 切片一直是病理诊断的重要依据^[6]。HE 染色法可以将各种组织或细胞成分与病变的一般形态结构特点清晰分明地显示出来,是组织学、胚胎学、病理学教学以及科研中最基本和使用最广泛的染色方法^[7-8]。事实上,在近些年中,国内外学者一直尝试着使用各种环保试剂来替代甲醛和二甲苯

在 HE 染色中的作用且成绩斐然^[9]。

聚羟基丙烯酸是由多个羟基丙烯酸聚合而成,性质稳定的环保固定液,其固定组织的主要作用机制可能是羟基和羧基基团发生可逆的酯化反应,羧基和氨基基团中和反应,前者生成稳定的酯化物、硬化组织,后者维系稳定的反应条件,从而使聚羟基丙烯酸和蛋白质发生广泛的交联^[10]。Van-clear 是一种从桔皮或其他植物中提取的、不含芳香族化合物,性质稳定^[11]。本研究采用环保试剂聚羟基丙烯酸和 Van-clear 代替传统试剂甲醛和二甲苯来处理切片,研究结果显示,A、B 两组的切片处理优良率相比差异无统计学意义($P>0.05$);将 A 组 HE 染色结果作为参照,则 B 组 HE 染色结果预期符合率较高。研究结果说明环保试剂聚羟基丙烯酸和 Van-clear 处理切片与传统试剂甲醛和二甲苯处理切片 HE 染色效果相当,该结果与陈志强等^[12]研究结果一致。

4% 的中性甲醛水溶液一直是病理学界的权威固定溶液,通过与蛋白质分子发生交联而产生作用,其渗透性强,固定均匀,对组织收缩的影响较小^[13]。但有研究指出甲醛暴露可能导致蛋白质生理和病理功能的修改,干扰基因正常表达,且甲醛对环境具有污染性,可致癌和促癌^[14],在马德里召开的第二次国际会议也肯定了甲醛的毒性影响^[15]。而环保试剂聚羟基丙烯酸同样可以和蛋白质发生广泛的交联,但其安全性高、无挥发性、固定的效率与甲醛相当,环保程度较甲醛高^[16]。

100% 的乙醇不能与石蜡相溶。进行 HE 染色前需要脱去切片中的石蜡以利于染色剂更容易进入细胞和组织内,该过程称为脱蜡。透明脱蜡处理的作用机制主要是由于“相似相溶规律”,即溶质溶剂的结构相似而彼此相容^[17]。常用的透明剂为二甲苯,二甲苯是由苯环组成的芳香烃化合物,而石蜡中 80%~95% 的成分为直链烷烃,相关资料指出^[18-19],Van-clear 主要由 C8~C12 的饱和直链烷烃组合而成,与二甲苯的苯环结构相比更相似于石蜡^[11],因此可以推测 Van-clear 与石蜡更加互溶,脱蜡效果更好,更利于 HE 染料着色。

综上所述,聚羟基丙烯酸和 Van-clear 处理切片相较于甲醛和二甲苯更加环保、对病理工作人员的刺激性小、安全性高,在不改变任何处理程序的情况下效果相当,对于病理实验室而言具有运用、推广的意义。

(本文图 1,2 见封三)

参考文献

[1] 薛晓伟,王德田,张煜涵,等. Dako Coverstainer 全自动 HE 染色封片系统对提高常规病理染色均一性的作用[J]. 诊断病理学

杂志, 2017, 24(1): 70-71.

- [2] 丁雯,夏猛,侯学文,等. 淄博市 10 家医院病理科环境中甲醛、二甲苯危害的调查[J]. 中国工业医学杂志, 2015, 28(5): 374-375.
- [3] 刘磊,陈栋,程婷婷,等. 某医疗机构病理科甲醛和二甲苯职业健康风险评估[J]. 实用预防医学, 2020, 27(1): 68-72.
- [4] 中华医学会. 临床技术操作规范病理学分册[M]. 北京: 人民军医出版社, 2012: 33-36.
- [5] 王伯沅,李玉松,黄高昇,等. 病理学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 134-136.
- [6] 李金龙,陈婷婷,王高飞,等. 基于常规 HE 染色的组织最佳核染时间探索[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(6): 697-699.
- [7] 王海玮,柴丽丽,杨国青,等. 宫颈活组织病理检查及免疫组化 P16 蛋白检测在高危型人乳头瘤病毒阳性病人中的意义[J]. 安徽医药, 2019, 23(3): 495-498.
- [8] 梁龄尹,朱小兰,骆新兰. 小标本切片 HE 染色褪色后再进行 4 种特殊染色方法的探讨[J]. 诊断病理学杂志, 2020, 27(6): 443-444.
- [9] SRAVYA T, RAO GV, KUMARI MG, et al. Evaluation of bio-safe alternatives as xylene substitutes in hematoxylin and eosin staining procedure: a comparative pilot study[J]. J Oral Maxillo-fac Pathol, 2018, 22(1): 148.
- [10] 郑波,王鹏姣,薛丽燕,等. 复合型环保试剂超声组织快速处理技术对肿瘤活检标本蛋白及分子检测的影响[J]. 中华病理学杂志, 2019, 48(2): 116-119.
- [11] 陈志强,王莹,米贤军,等. Van-clear 替代二甲苯对乳腺癌 Her-2 蛋白表达的影响[J]. 诊断病理学杂志, 2017, 24(12): 918-921.
- [12] 陈志强,陈昂,米贤军,等. 聚羟基丙烯酸和 Van-clear 替代甲醛和二甲苯在苏木精伊红染色的应用比较[J]. 诊断病理学杂志, 2018, 25(6): 469-470, 476.
- [13] 吴平,张声. 无醛固定液与甲醛固定液对组织形态学保存效果比较[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(3): 343-345.
- [14] 陈国艳,汤红平,孔艳青,等. 新型环保无醛固定液的动物实验研究[J]. 诊断病理学杂志, 2016, 23(11): 877-880.
- [15] BOLT HM, PETER M. New results on formaldehyde: the 2nd international formaldehyde science conference (madrid, 19 - 20 april 2012)[J]. Arch Toxicol, 2013, 87(1): 217-222.
- [16] 陈志强,王莹,米贤军. 聚羟基丙烯酸和 4% 中性缓冲甲醛对苏木精伊红染色及荧光原位杂交检测乳腺癌 HER-2 基因影响的比较[J]. 中国癌症杂志, 2016, 26(2): 121-127.
- [17] 陈志强,王莹,叶才果,等. 环保透明脱蜡液 Van-Clear 与传统试剂在组织处理后 HE 染色及 FISH 法检测乳腺癌 HER2 基因中的比较[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2017, 46(4): 453-458.
- [18] QU L, XIAO Y, JIA Z, et al. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry for chemical constituents analysis of tripterygium glycosides tablets [J]. J Chromatogr A, 2015, 1400(4): 65-73.
- [19] 黄红浪,李卫华,张维,等. 应用 VAN-Clear 与低甲醛的病理组织处理改良方法的评价[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2021, 30(1): 65-74.

(收稿日期: 2019-12-03, 修回日期: 2020-02-12)