

# 不同酸类酸化的伊红溶液在病理活检小标本预染色中的应用研究

李金龙<sup>1</sup>, 马叶艳<sup>2</sup>, 张旭东<sup>2</sup>, 宋欣<sup>1</sup>, 马亚琪<sup>1</sup>

(1. 中国人民解放军总医院第一医学中心病理科, 北京 10086; 2. 长治医学院基础医学部, 山西长治 046000)

**摘要:** **目的** 探讨不同酸类酸化的伊红溶液在活检小标本预染色中的染色效果。**方法** 从中国人民解放军总医院病理科日常收取的病理标本中随机选取直径小于0.5cm的胃肠镜组织和穿刺组织共计90例, 随机均分成3组, 每组均30例, 所有标本取材均使用相同规格的三角滤纸包埋组织防止漏检, 分别滴加2~3滴冰醋酸化伊红溶液、盐酸化伊红溶液和水溶性伊红溶液进行预染色, 相同机器及程序进行脱水包埋, 制片染色流程, 肉眼和显微镜下分别观察组织蜡块及镜下组织染色效果, 按染色评分标准进行评分。**结果** 肉眼观察组织蜡块, 水溶性伊红溶液组滴染组织着色较淡, 不易识别, 包埋后组织与石蜡对比不明显, 冰醋酸化伊红溶液组和盐酸化伊红溶液组滴染组织着色均较深, 易识别, 包埋后组织与石蜡对比明显, 冰醋酸化伊红溶液和盐酸化伊红溶液组比较差异无统计学意义( $\chi^2=0.215$ ,  $P>0.05$ ), 两组酸化伊红溶液组与水溶性伊红溶液组比较差异均有统计学意义( $\chi^2=5.221 \sim 6.923$ , 均 $P<0.05$ ); 显微镜下观察, 三组染色切片的结构清晰, 核质对比分明, 没有明显差异。醋酸酸化伊红溶液较盐酸酸化伊红溶液配制简单, 时间短。**结论** 醋酸酸化伊红溶液对活检小标本的预染效果优于水溶性伊红溶液的预染效果, 且配制方法优于盐酸酸化伊红溶液, 在包埋过程中易于识别, 能提高包埋速度和质量, 值得推广。

**关键词:** 酸化伊红; 小标本; 预染色; 脱水; 包埋

中图分类号: R446.8 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414 (2019) 06-120-04

doi:10.3969 / j.issn.1671-7414.2019.06.030

## Application of Eosin Solution with Different Acids in Pre-staining of Small Pathological Biopsy Specimens

LI Jin-long<sup>1</sup>, MA Ye-yan<sup>2</sup>, ZHANG Xu-dong<sup>2</sup>, SONG Xin<sup>1</sup>, MA Ya-qi<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. Department of Basic Medicine, Changzhi Medical College, Shanxi Changzhi 046000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of eosin solution acidified with different acid solution on prestaining of small biopsy specimens. **Methods** A total of 90 cases of gastrointestinal endoscopy and puncture tissues less than 0.5 cm in diameter were randomly selected from pathological specimens collected by the Pathology Department of the General Hospital of the People's Liberation Army of China. They were randomly divided into three groups, each group was divided into 30 cases. All specimens were taken with triangular filter paper of the same specifications to prevent tissue from being missed. Then 2~3 drops of glacial acetated eosin solution, hydrochloric acid eosin solution and water-soluble eosin solution were added for pre-dyeing. The same machine and procedure were used for tissue dehydration, tissue embedding, slicing and dyeing process. The effect of tissue wax and microscopic tissue dyeing was observed under naked eye and microscope respectively. The color grading standard was used for grading. **Results** By macroscopic observation group wax block, the drip dyeing of water-soluble eosin solution group was light and difficult to identify, and group compared and salt solution group. All drop staining of tissue deep, it was easy to identify, after embedding tissue compared with paraffin, glacial acetic acid acidification eosin eosin solution and salt solution group of comparison difference had no statistical significance ( $\chi^2=0.215$ ,  $P>0.05$ ). Compared with water soluble eosin group similar between the two groups was statistically significant ( $\chi^2=5.221 \sim 6.923$ , all  $P<0.05$ ). Microscopically, the three groups of staining sections showed clear structure and clear nucleo-cytoplasmic contrast without obvious differences. The preparation of eosin acetate solution was simpler and shorter than that of eosin hydrochloride solution. **Conclusion** The predyeing effect of acetic acid yihong solution on small biopsy specimens was better than that of water-soluble yihong solution, and the preparation method was better than that of hydrochloric acid yihong solution. It was easy to identify in the embedding process, and could

**基金项目:** 解放军总医院临床科研扶持基金《宫颈癌相关分子检测及临床应用研究》, 项目编号: 2015FC-TSYS-1025。

**作者简介:** 李金龙 (1993-), 男, 医学学士, 研究方向: 病理技术, E-mail: 969763726@qq.com。

improve the embedding speed and quality, which was worthy of promotion.

**Keywords:** acidified eosin; small biopsy specimens; prestaining; dehydration; embedding

活检小标本的包埋制作是病理技术工作中的一大难题。由于取材的局限性,取材组织数量少、体积小给技术员在制片过程中带来了一定的困难<sup>[1]</sup>。虽然目前国内外对于小标本的预处理方法不尽相同,但大多都是采用不同酸类溶液酸化的伊红溶液进行脱水前或(和)脱水中滴染的方法进行标本的预染色,然而由于试剂的易得程度、配置方法、滴加剂量等方面都没有一个统一标准的方案,大多数单位的小标本的预处理效果并不令人满意,由此给后续的常规及免疫组化(或分子病理)等过程造成了较大的影响,在此,笔者通过对三组常规小标本分别滴加水溶性伊红溶液、醋酸化伊红溶液和盐酸化的伊红溶液进行预染色的方法,对比脱水后三组蜡块的肉眼颜色区别及制片后的镜下颜色区别,对比分析不同酸类酸化的伊红溶液对小标本预染色的效果。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 从解放军总医院病理科的日常病理标本中随机选取组织直径均小于0.5cm的胃肠镜活检组织和穿刺组织标本共计90例,均分为3组,每组30例,均由中性福尔马林溶液固定。本实验选用的组织标本必须符合以下标准:(1)正常临床活检的标本;(2)组织标本均采用中性福尔马林溶液固定,符合临床试验的相关要求。

### 1.2 试剂和仪器

**1.2.1 实验试剂:**0.810g/cm<sup>3</sup>的乙醇溶液,伊红染液,盐酸酒精溶液,氨水溶液,盐酸溶液,冰醋酸溶液等均由实验室按照标准操作配置,水溶性伊红Y粉剂、中性福尔马林溶液、无水乙醇等其他试剂均购自国药,分析纯。

**1.2.2 仪器设备:**全自动组织脱水机LEICA ASP200S,包埋机,冷冻台,切片机,水浴展片机,烤片机,罗氏VENTANA HE 600全自动染色系统,显微镜等。

**1.2.3 不同伊红溶液试剂配制<sup>[2-4]</sup>:**①水溶性伊红溶液:将1g伊红Y粉剂溶于少许蒸馏水中,用玻璃棒搅拌溶解后,加蒸馏水至100ml。②冰醋酸化伊红溶液:将1g伊红Y粉剂溶于少许蒸馏水中,用玻璃棒搅拌溶解后,加蒸馏水至100ml,充分搅拌后加冰醋酸至pH值5~6之间。③盐酸化伊红溶液:伊红Y用蒸馏水充分溶解加浓盐酸10ml,搅拌均匀,放置过夜,析出沉淀,用滤纸过滤,滤液不要,沉淀物与滤纸一起放恒温箱干燥,用0.810g/cm<sup>3</sup>的乙醇1000ml配成沉淀酸化伊红Y乙醇储存液,临用时,取饱和液1份,加0.810g/cm<sup>3</sup>的乙醇

2份,配成工作液,待用。

### 1.3 方法

**1.3.1 组织脱水:**将固定好的活检组织小标本由医生取材完毕后,分成三组,每组均为30例,共计90例,分别滴加冰醋酸化伊红溶液、盐酸化伊红溶液及对照水溶性伊红溶液,然后放入同一脱水机进行脱水。

#### 1.3.2 组织包埋、修块

#### 1.3.3 切片、捞片与烤片

**1.3.4 组织常规HE染色:**染色均使用罗氏VENTANA HE600全自动滴染氏染色机进行染色,排除染色染液污染和染色力等影响因素,染色效果均一稳定,染色玻片间无交叉污染<sup>[5]</sup>。

**1.3.5 镜下观察及肉眼观察:**将染好的切片置于镜下观察、对比;将制成的蜡块进行肉眼观察并按判定标准评分。

**1.3.6 评分标准:**根据蜡块组织判定标准进行评判,判定标准<sup>[6]</sup>:组织呈鲜红色判定为(++),组织呈淡红色判定为(+),无伊红着色判定为(-);

镜下评判标准依据《临床技术操作规范-病理学分册》中对于细胞核、细胞质染色以及交叉污染的评分标准进行判读。

**1.4 统计学分析** 采用SPSS16.0软件对数据进行统计学分析,组间比较采用秩和检验分析。 $P>0.05$ ,差异无统计学意义; $P<0.05$ ,差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 三组蜡块着色比较** 脱水后进行组织包埋观察:水溶性伊红溶液滴染组组织着色较淡,不易识别,包埋后组织与石蜡对比不明显,冰醋酸化伊红溶液组和盐酸化伊红溶液组滴染组织着色均较深,易识别,包埋后组织与石蜡对比明显。盐酸化伊红溶液组呈鲜红色的共28例,淡红色的2例;醋酸化伊红溶液组呈鲜红色的共27例,淡红色的3例;水溶性伊红溶液组呈鲜红色的共20例,淡红色的6例,无伊红着色4例;经脱水包埋后,肉眼观察蜡块着色情况按评分标准评判,分析数据后可得:盐酸化伊红溶液组着色鲜明且没有脱色,与水溶性伊红溶液组比较差异有统计学意义( $\chi^2=6.923$ ,  $P=0.009$ );醋酸化伊红溶液组着色鲜明且没有脱色,与水溶性组比较伊红溶液有统计学意义( $\chi^2=5.221$ ,  $P=0.022$ );盐酸化伊红溶液组和醋酸化伊红溶液组均着色鲜明没有脱色,两组比较差异无统计学意义( $\chi^2=0.215$ ,  $P=0.643$ )。常规组织染色后,镜下观察三种溶液滴染的组织切

片,发现其组织结构均清晰,颜色对比分明,三者之间无明显区别(图1~3)。统计学分析结果显示:盐酸化伊红溶液组与醋酸化伊红溶液组相比,蜡块着色无明显差异( $P>0.05$ ),结果无统计学意义,其

余每两组间蜡块着色差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),可认为两种酸化方法对活检小标本的预染色无显著差异,水溶性伊红溶液与两种酸化伊红溶液对活检小标本的预染色有显著差异。

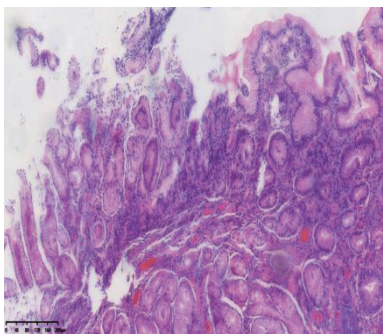


图1 醋酸化伊红溶液组胃窦, HE 低倍

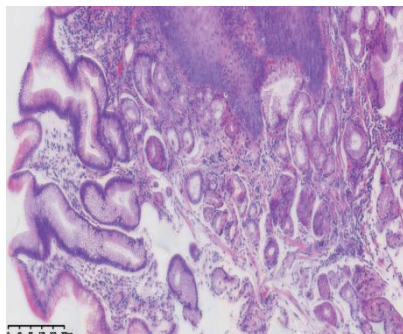


图2 盐酸化伊红溶液组胃体, HE 低倍

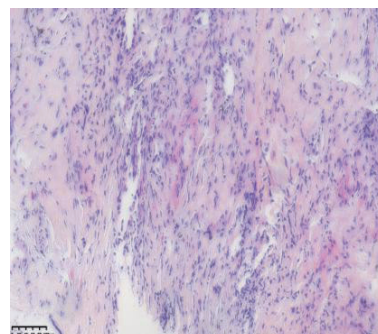


图3 水溶性伊红溶液组右肺穿刺组织, HE 低倍

2.2 三种伊红染色液使用效果比较 见表1。三种伊红染色液使用效果比较,水溶性伊红溶液着色效果不稳定,容易出现脱色现象,该溶液配制简便,用时短且无额外成本;盐酸化伊红溶液着色效果稳定,偶有脱色,该溶液配制过程繁琐,用时较长且成本偏高;醋酸化伊红溶液着色效果稳定,偶有脱色,该溶液配制方法简便,用时较短且成本不高。

表1 不同酸类酸化的伊红溶液使用效果对比

项 目	水溶性伊红溶液	冰醋酸化伊红溶液	盐酸化伊红溶液
pH 值	不稳定	稳定	稳定
配置时间	用时短	用时长	用时较长
预染色效果	着色稍慢	着色快速	着色快速
洗脱效果	易洗脱	不易洗脱	不易洗脱
包埋时颜色	组织颜色稍浅	组织颜色鲜明,方便包埋	组织颜色鲜明,方便包埋
切片效果	颜色较浅,不影响切片	组织颜色鲜明,清楚辨别切片深度	组织颜色鲜明,清楚辨别切片深度
对染色的影响	无影响	无影响	无影响
制作成本	无额外成本	廉价	成本偏高

### 3 讨论

本院内镜活检及穿刺活检组织工作量较大,在固定液中加入伊红,会增加工作量并造成试剂的浪费,所以本科室采用取材时对组织滴染水溶性伊红溶液的方法及在脱水机程序的第一缸酒精中滴加伊红的方法来处理该问题。然而在本科室的实际使用情况中发现,在脱水机程序的第一缸酒精中滴加伊红的方法虽然能使包埋滤纸充分着色,但是同样也会造成由于组织与包埋滤纸均着色而导致两者不易

区分,进而影响包埋效果的情况出现,更容易造成组织漏包少包的现象。取材时对组织滴染伊红溶液也存在滴入量缺乏有效量化的问题,只能根据个人经验滴加,容易造成染色效果的不稳定性<sup>[6]</sup>,实际运用过程中也往往出现包埋时组织着色不均的情况。

经查阅文献,pH 值对于染色至关重要,残留在污渍中的水或试剂即可改变 pH 值并改变染色特异性<sup>[7]</sup>。伊红溶液是酸性染料,在水中离解成带负电荷的阴离子,与蛋白质的氨基正电荷(阳离子)结合而使细胞质染色,加入冰醋酸后,可以影响组织中蛋白质的等电点,从而影响蛋白质的电离,促进组织与染料以离子键牢固结合。伊红溶液中加入冰醋酸,起到促染作用,只增强染料的染色能力,不参与染色反应。所以在伊红溶液里滴加冰醋酸使伊红溶液的 pH 值调节是胞质染色的关键<sup>[8]</sup>。酸化伊红可以促使细胞质着色,在配制染液中,我们加入适量的酸,其目的是为了增强组织细胞的染色力<sup>[9]</sup>。因此,笔者根据文献配置不同酸类酸化的伊红溶液后滴染活检小标本,并制作组织切片观察染色效果。效果显示,酸化的伊红确实比水溶性伊红着色力强,且不易脱色,也不参与后期试剂反应;但从经济角度、配制方法及使用时间来看,冰醋酸化法较盐酸化法染色液的配制更简便易得,也更实惠。

综上所述,小标本取材时采用冰醋酸化的伊红溶液滴染组织,着色效果好,配制简单,可提高病理标本制作的工作效率,值得推广。

### 参考文献:

- [1] 王剑,文建力,涂贵兰,等.组织脱水机脱水剂中添加伊红在病理组织标本预染色中的应用[J].甘肃医药,2017,36(6):497-498.  
WANG Jian, WEN Jianli, TU Guilian, et al. Application of adding eosin in the dehydrating (下转 152 页)