

[文章编号] 1000-1182 2006)06-0564-02

·方法介绍·

不脱钙的牙齿骨骼塑料包埋制片技术及方法探讨

吴哲¹, 马冬丽¹, 洪丽华², 孙宏晨³, 李成库³

(1.吉林大学口腔医院 修复科; 2.牙体牙髓科; 3.病理学教研室, 吉林 长春 130041)

[中图分类号] R780.2 [文献标识码] B

牙齿和骨骼中含有大量无机钙盐, 硬脆致密, 难切易碎。常规的牙齿骨骼石蜡切片方法需脱钙后变软才能切片, 这种切片不能对钙的分布等矿化程度进行观察研究。塑料包埋是一种新兴的制片技术, 能保留矿化结构进行组织病理形态学观察。本文介绍甲基丙烯酸甲酯 (methyl methacrylate, MMA)包埋制片技术并对其方法进行探讨。

1 方法

1.1 标本及固定

①因正畸需要拔除的人牙、不能保留的龋齿、恶性肿瘤手术切除的含牙的颌骨, 按唇舌方向将牙及牙周组织锯成3 mm厚片, 10%甲醛固定。②大鼠及犬等动物实验标本, 经4%多聚甲醛血管灌注固定后取材。

1.2 脱水

先采用60%乙醇~无水乙醇和正丁醇等量混合剂逐级脱水, 最后正丁醇彻底脱水。具体方法见参考文献[1]。

1.3 浸透

依次进行以下浸透: ①1:1的MMA和无水乙醇24 h; ②MMA 16~24 h; ③4:1的MMA和邻苯二甲酸二丁酯 (dibutylphthalate, DBP)24~36 h; ④MMA 80 mL、DBP 20 mL和无水过氧化苯甲酰 (benzoylperoxide, BPO)2 g, 于磁力搅拌器搅拌3~4 h, 充分溶解混合均匀后, 浸透36~48 h, 每天抽真空1~2 h。

1.4 配制包埋剂

先去除MMA中的阻聚剂, 方法是: 将1:1的MMA和5%氢氧化钠水溶液加入分液漏斗, 充分震荡混合均匀, 静止分层后漏弃下层。如此反复3次, 再用蒸馏水以同样方法洗3次, 去除氢氧化钠, 然后往分液漏斗内加无水氯化钙, 震荡混合后放置数分钟, 吸除水, 滤纸过滤除氯化钙。

包埋剂的配制方法: 取去除阻聚剂的MMA 80 mL, DBP 20 mL, 无水BPO 4 g放入烧杯中。50℃恒温磁力搅拌器搅拌3~4 h或更长时间至较粘稠, 密封存于4℃冰箱。使用前1~2 d配制, 使用前取出待升至室温后再启封用, 以免空气中潮湿的气体流入带进水。

1.5 包埋聚合

将经固定、脱水、浸透后的标本置入平底、薄壁、洁净、干燥和大小相适宜的小玻璃瓶内, 切面朝下, 标记编号。然后加包埋剂, 盖上胶盖, 盖上插入针头, 放在真空干燥器内连接真空泵抽2 h, 4℃冰箱放置10~16 h。为防止标本漂浮移动, 用针头或牙签穿过瓶盖顶住标本, 移置37℃温箱聚合。当包埋剂呈半聚合状态, 但还未完全凝固时取出固定标本的针头或牙签, 再次加包埋剂至标本上方约12 mm处, 盖上带针头的胶盖再抽真空2 h左右, 移回37℃温箱聚合。2~3 d即可凝固成透明的MMA包埋的组织块。用玻璃刀或钻石笔或小砂轮机划割玻璃瓶后, 敲碎玻璃瓶取出标本包埋块即可进行切、锯或磨片。

1.6 切片、伸展、裱贴及染色

先用平板金属锉或电动砂轮锉磨包埋块表面至露出组织平面。组织周围包埋剂过宽部分, 用钢锯或电动砂轮锯磨掉, 以减少切片机和切片刀的磨损。将修整好的组织包埋块固定在Polycat硬组织切片机上, 用D型钨钢刀削平切全后, 改用手动开关, 并调整厚度为5 μm, 慢慢慢退1次1片。为防止切片卷曲或皱褶不易展平, 用经40%乙醇湿润后的载玻片包装盒内的薄片贴在组织包埋块表面, 手持纸片的另一端随切片机同步移动, 切出的切片即贴在纸片上。将组织切片向上纸片朝下平放在40℃温水表面上, 轻轻抽动纸片, 借助乙醇与水混合反应所产生的表面张力, 使切片与纸片分离并漂浮在水面上。接着将切片捞贴在涂粘贴剂的洁净载玻片上, 再往切片上贴一塑料薄膜, 用圆玻璃瓶或其他圆柱体从切片中间向两侧滚压, 驱赶出水和气泡, 使切片与载玻片紧密地裱贴在一起。将数张裱贴好的载玻片夹在一起, 60℃以下温度烤干。

将组织切片上的塑料薄膜取下, 用3:1的甘油和0.01 mol/L的PBS封片 (pH 9~9.5), 荧光显微镜检查。用于光镜检查的切片, 需经乙二醇乙醚乙酸酯脱塑后再用甲苯胺蓝或改良的Gomori特殊染色法染色^[2]。

1.7 锯片及磨片

对于不能制作切片的标本, 如带金属种植体及其他口腔材料的标本等, 经MMA包埋后种植体等与组织凝固在一起, 可做锯片或磨片。用低速金刚石切割机安装上超薄金刚石锯片, 将标本连同金属种植体锯成100 μm厚的薄片, 用落射光偏光显微镜及扫描电镜进行观察和研究。锯片厚, 细胞重叠, 应用范围有限。如果需要进行细胞学观察研究, 可将锯

[收稿日期] 2006-03-08; [修回日期] 2006-07-13

[作者简介] 吴哲 (1970-), 女, 吉林人, 副教授, 博士研究生

[通讯作者] 孙宏晨, Tel: 0431-8796010

片磨至15 μm左右。无锯片机可采取磨片法,手工磨片的方法是先用砂轮机磨至1 mm厚,再将其中一面依次用粗油石加液体石蜡、400目、600目、800目及1 000目的砂纸及细油石加液体石蜡逐级磨平,细白绸布上磨光,洗涤精清水漂洗,滤纸吸干表面水,无水酒精脱水并洗除液体石蜡片刻,氯仿数分钟置换出酒精。玻璃板上放一滤纸,已磨好的标本面向上放在滤纸上,往组织片上滴加2:1的市售101胶和氯仿,立即将洁净的载玻片放在组织片上,夹子夹住压平,数分钟后粘帖牢固,接着手持载玻片用上述方法磨另一面至所需厚度。

2 讨论

许多口腔医学研究都需要制作不脱钙的牙齿和骨骼的切片、锯片或磨片,以观察研究牙齿骨骼的矿化程度、成骨情况、有无新生骨形成等。而常规的牙齿骨骼石蜡切片法,需脱钙后变软才能切片,不能对钙的分布等进行观察研究。MMA包埋制片则可保留矿化结构以便进行组织病理形态学观察研究。

2.1 组织脱水

MMA为疏水性包埋介质,溶于乙醇及正丁醇,微溶于水,故组织需经脱水后浸透包埋。关于乙醇脱水时间的报道差异甚大,最长为96 h^[3],最短为4~6 h^[4]。笔者认为牙齿和骨骼为坚硬致密的硬脆组织,含水量很少。故乙醇脱水时间不宜太久,否则会引起组织过度收缩硬脆,导致切片困难甚至切不成片。反之脱水不彻底,MMA不能充分地浸透到组织里,也会影响切片质量。笔者采用乙醇正丁醇混合剂逐级脱水和正丁醇彻底脱水不会引起组织过度收缩硬脆。

组织脱水后,是否使用二甲苯或氯仿浸透尚有争议。笔者认为可以用1:1的无水乙醇和MMA或直接用MMA浸透即可,勿需再用二甲苯或氯仿。因为MMA可与无水乙醇相混溶,这样既经济又实用,还避免了苯对环境的污染和对健康的危害。

2.2 包埋

笔者认为包埋时要注意以下事项:①增塑剂的含量决定MMA包埋的硬度,增塑剂少则硬,多则软。加速剂的多少关系到MMA聚合的速度和质量,量大聚合快质量差,气泡多;反之,聚合慢气泡少。包埋时根据标本和试剂的不同做相应调整。②BPO是强氧化剂,为防止爆炸出厂时加入了水,使用前需经温箱烘干才能使用。③MMA单体含对苯二酚或氢醌或芳胺等阻聚剂,配制包埋剂用的MMA时需去除阻聚剂才能聚合。另外还要洗除氢氧化钠和吸净水,否则会影影响聚合。④提纯去除阻聚剂后MMA约损失25%左右,并且聚合后体积也要缩小21%,故计算包埋剂用量时要考虑到去除阻聚剂和聚合体积缩小而需要增加的用量。⑤BPO较难溶解,配制含BPO的浸透剂和包埋剂时需要恒温磁力搅拌器长

时间充分搅拌,待完全溶解后再存放24 h才能使用。为此使用时须提前1~2 d配制。⑥配制浸透剂和包埋剂的温度不宜超过60℃,高温可引发爆聚成废品,另外聚合时的温度高会导致包埋块硬脆不易切片。⑦浸透和包埋前减压抽真空,可使浸透比较充分以避免或减少气泡,提高包埋质量。⑧MMA易挥发,对健康有害,操作时应注意防护,尤其是减压抽真空应在通风橱内进行。⑨MMA包埋剂溶解塑料制品,故要用玻璃容器、量具和包埋模具。⑩包埋块遇高温则变软甚至融化,紫外线、超声波、辐射等能影响包埋块的性质。故应将包埋块置入干燥器内密封闭光存放。

2.3 染色

经浸透、包埋、聚合进入组织和细胞内的MMA,与组织和细胞的分子结合形成共价键,阻碍组织和细胞与染料结合而染不上色。故有学者采取先染色后包埋切片的组织块染色法。但组织块染色法因色素与组织及细胞结合得不牢固,长时间的脱水、浸透等处理后就褪色,色调暗淡,对比不鲜明。为此,笔者探讨了先包埋切片后脱掉MMA的切片染色法,其优点是可按需要连续切片进行各种染色观察研究,染色结果较鲜明,但其也存在一些缺点,如操作麻烦、切片易与载玻片分离、皱褶碎裂等,因此尚需要对如何提高MMA包埋的切片染色效果进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 王 渝, 臧光祥, 孙宏晨, 等. 提高牙及牙周组织联合石蜡切片质量的探讨[J]. 中华口腔医学杂志, 2005, 40(5): 437-438.
(WANG Yu, ZANG Guang-xiang, SUN Hong-chen, et al. Study of improving the quality of teeth and periodontal tissue united slides[J]. Chin J Stomatol, 2005, 40(5): 437-438.)
- [2] 程 敏, 王 颖, 李保泉, 等. 改良的Gomori特殊染色在口腔硬组织切片中的应用[J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(2): 185-186.
(CHENG Min, WANG Ying, LI Bao-quan, et al. Application of an improved Gomori special staining technique in the research of oral hard tissue[J]. West China J Stomatol, 2006, 24(2): 185-186.)
- [3] 王东胜, 路正刚. 塑料包埋技术在口腔硬组织切片中的应用研究[J]. 现代口腔医学杂志, 2003, 17(3): 256-257.
(WANG Dong-sheng, LU Zheng-gang. Application of plastic embedding technique in the research of oral hard tissue and dental implant[J]. J Modern Stomatol, 2003, 17(3): 256-257.)
- [4] 吕 荣, 徐新智, 王 军. 塑料包埋不脱钙大块骨组织切片及染色[J]. 临床与实验病理学杂志, 2002, 18(3): 342.
(LV Rong, XU Xin-zhi, WANG Jun. Technique and stain for the study of undecalcified plastic embedding large bulk bone tissue section [J]. Chin J Clin Experiment Pathol, 2002, 18(3): 342.)

(本文编辑 李 彩)