

冰冻切片技术

谈点基础

1.从锋利的刀片开始 Start with a sharp blade

我发现使用新的锋利的刀片时常常做出高质量的片子。我觉得在医疗场合中某些尽量省钱的做法显得有些因小失大。一般我对每位患者的标本都使用一组新的刀片，当片子的质量开始下降时，我会立刻更换刀片。某些组织如质地较硬的胶原和钙化组织会使刀片很快变钝，因此，经常更换刀片显得很有必要，有时候我在切片过程中要连续更换2-3次刀片。

2.坐着还是站着 Sitting or standing

我切片时总是坐在一张凳子上。要学会把刷子作为一种便捷的辅助工具来操作，从而精细地控制显微厚薄程度的片子。切片时俯身弯腰，颈部过伸的姿势有些不妥，要尽量处于放松和舒适的姿势以便能最大程度控制你的左手。

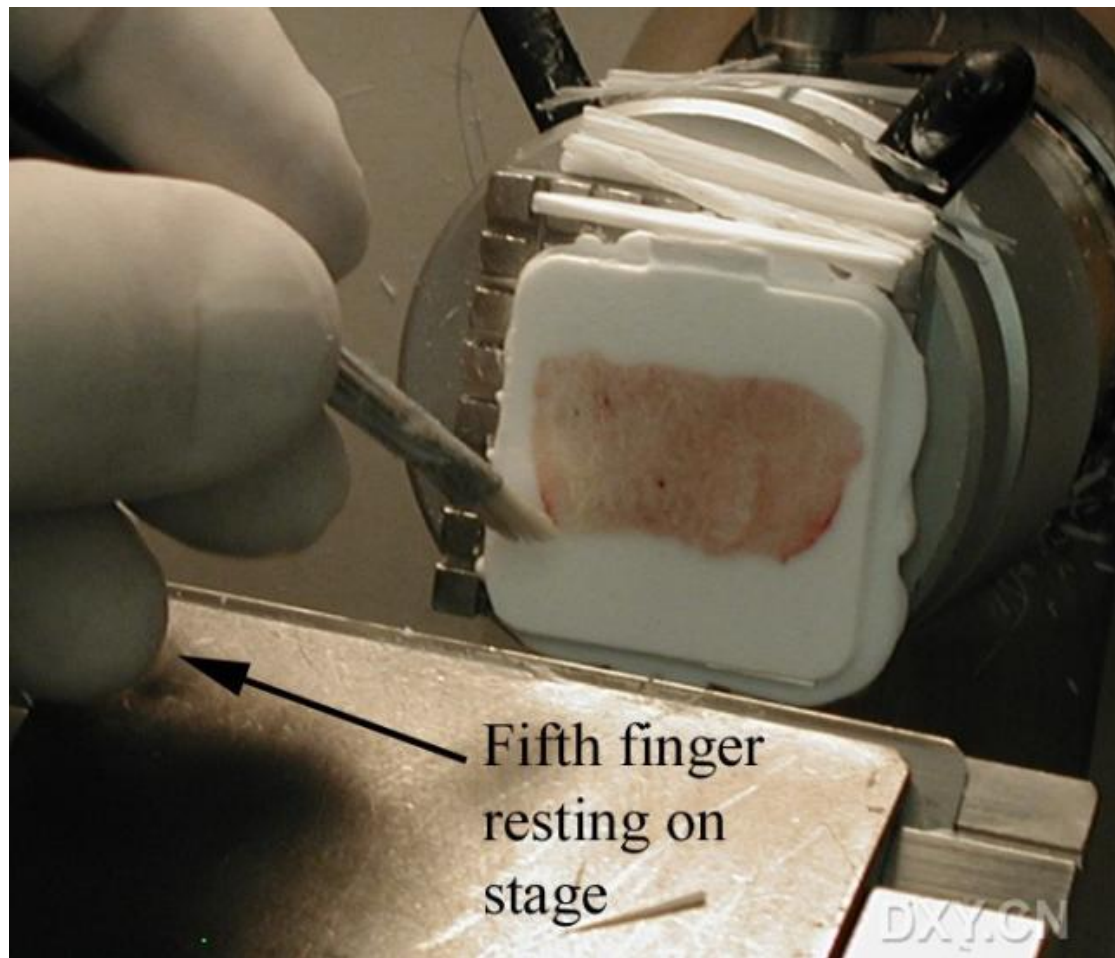
3.刷子 The Brush

我是一位刷子的使用者。我相信要想切好片子首先学会使用刷子。刷子的作用就在于粘住片子并把片子弄到台子上。冷冻的片子会自发的卷缩并从刷子上脱离下来，因此，我使用一把有硬毛、夹取面宽的刷子。我发现白色的野猪毛刷十分坚硬，非常管用（北京海德 :61735-01）。由于刷子是个有角的头端，握持刷子成一定的角度，这样刷子与组织接触时就会象扫帚一样的平。我不能理解为什么有人使用脆弱的骆驼毛刷子，组织片很容易从这些柔软的毛上掉下来。



4.握持刷子 Holding the brush

左手象拿笔一样握持刷子，将第五指轻压于台面上以稳定握笔的手(或根据手和切片机尺寸的大小置于你感觉合适的地方)，这样可以保证操作者动作的灵活及可控性。我把刷子削成一个角度，大致与左手握持刷子的角度相同，这样使刷子平着接触组织的1/4。

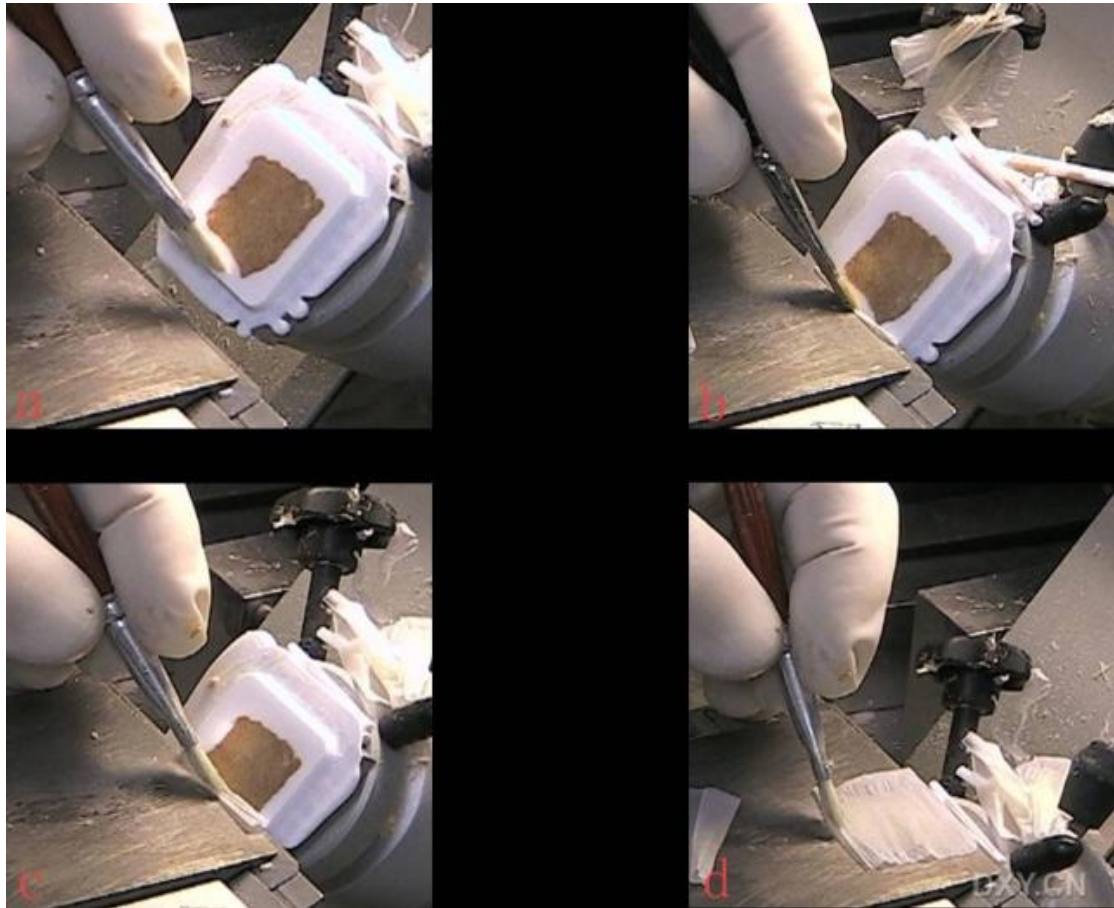


5. 摇柄的旋转 Turning the wheel

以连续均匀的力量转动切片机的摇柄，且要毫不犹豫。我看到很多冰冻切片者手握着刷子在开始切片时总要停一下，缓慢的抓取组织，然后再开始转动摇柄。依我的经验看来，这种动作增加了起始切片假象的可能，会使片子的厚度不均匀，也增加了处理脂肪类组织的难度。我切片时，象前面所说的那样手握刷子，以一种连续的动作抓取组织，这个动作与刀片接触组织同时开始并贯穿于整个过程。

6. 刷子的移动 Movement of the brush

组织块移向刀片时刷子也要同步地向下移动，当组织块刚好接触刀片时刷子轻轻停在其底部 2mm 处并迅速抽离。正是刷子的向下移动使你能连续地抓取组织，当开始的几毫米组织穿过刀片时便有自发卷曲的现象，这时，运动中的刷子立刻粘住其游离的边缘部分并水平地拖向切片者。刷子的运动路径是一个朝下的“肘”形，然后再朝向你自己，连续不断。但要注意有时候把组织压向台面时会使组织粘在台面上，可能会导致碎片，应尽量避免。当然预先将组织包埋起来可以使刷子不用接触到组织，切片也容易多了。



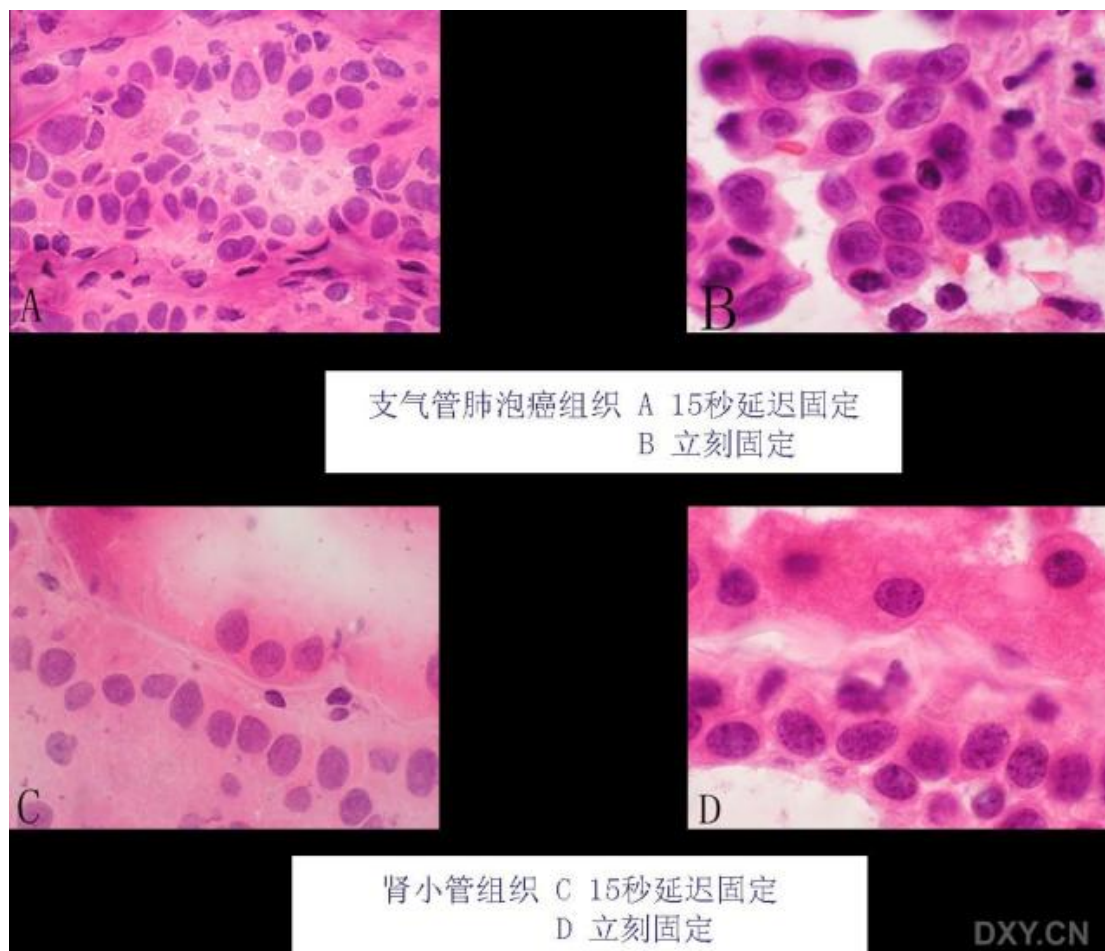
- a) Ride the block** - As the block descends toward the brush the brush keeps pace with the block by gently resting on the bottom 2-3 mm of the block and
- b) Gently lift up while crossing the blade** - As the brush and block meet the blade, the section will begin to form under the brush. The brush gently lifts up as it reaches the blade while holding onto the edge of the newly forming section.
- c) Hold onto the curl** - As the first few millimeters of the section passes the knife there will be some degree of curling of the section. As the curl begins, the moving brush is in position on top of this curl of the tissue and is holding onto it. With the curl in hand, the brush changes to a horizontal motion toward you. The path of the brush is an "elbow" shape down and then toward you in a continuous motion. The motion is much like a child coming down a slide.
- d) Glide the section across the stage** - The motion continues horizontally as the forming section is drawn across the stage. Figure 4c illustrates that by being extremely delicate with the brush; one can hold onto the edge of the curl and glide the section across the stage. Avoid pressing tissue to the cryostat stage which can result in adhesion of the tissue to the stage, especially in fatty tissues. This will result in a smeared section and a need to clean the stage

7. 贴片 Retrieving the section

可以从切片机的台面上也可直接从组织块面粘贴组织片，我一般采用前者。片子切好后，手持玻片(北京海德:71869-10)在片子上方，向下以一个角度粘住片子的一角，在静电作用下片子会吸附在玻片上并迅速融化。当然在周围涂一些包埋物对贴片有利，这种多余的包埋物可以保护片子的边缘免受皱缩的损坏。有时候碰到贴片困难，我会在切到最后 2mm 包埋物的时候停下来，让片子留在组织块上，然后倒转摇柄，使组织块退离刀片，再用刷子从边缘把组织片摊平，这样就可以从组织块面贴片了，这对卷曲的片子或者脂肪组织非常管用。

8.快速固定 Rapid fixation

我右手转动摇柄也同时拿着玻片，片子一切好，立刻粘起片子并将它浸没于固定液中。固定液需置于方便够到的地方，我一般将染色架放在染色缸的旁边，先将片子置于 95% 的乙醇溶液中固定，然后插于染色架上。如果组织固定延迟会出现风干的假象，我的经验是组织片还在切片机的台面时，风干效应很小，当组织片粘在有温度的玻片上时就会出现明显的风干假象，表现为核的细节丢失及胞浆液的溢出。下面几张图片是延迟 15 秒固定和立刻固定的相同组织的比较，差异非常明显。



9.切片的厚度 Thickness of the section

对于一般的手术病理我推荐切 6um 厚，这种厚度使染色更加饱满，层次清晰，病理学家通常在 2x 和 4x 的放大倍数下可以获得更多的信息。太薄的片子在这种放大倍数下显得苍白，容易忽略一些细节。6um 的片子可以有更多的时间去避免风干假象，也会减少冰晶所造成的细胞核空洞。当然特殊情况下可能需要更厚或更薄的片子。

10.为什么会掉片 Why did my tissue fall off?

我不能确定组织片粘附到玻片的具体机制，但我相信可能与组织内的液体与玻片发生分子交联有关。

下面我列出几种染色过程中组织片脱落的情况：

- 1) 本身非常干燥或过度脱水的组织；
- 2) 组织片的周长与面积比过大，象细条形的组织容易受染色缸内液体涡旋应力的影响而脱落，同样包括薄的纤维囊肿及不规则的坏死组织，太厚的组织也不例外；
- 3) 反蓝用的氨水浓度太高；
- 4) 少数情况需要使用100%的乙醇固定；
- 5) 一张玻片贴多个片子时，片子周围的包埋物相互重叠。

组织块的准备

1.调整好组织与刀片的方向 Orienting the tissue to the knife

这是冰冻切片准备中极为重要的方面，使用精准冰冻包埋专用套装(precision cryo-embedding system)

可以使这项工作变得简单，在我的工作中我总结出一些经验可供参考。(可参考北京海德

www.hedebio.com-精准冰冻包埋专用套装)

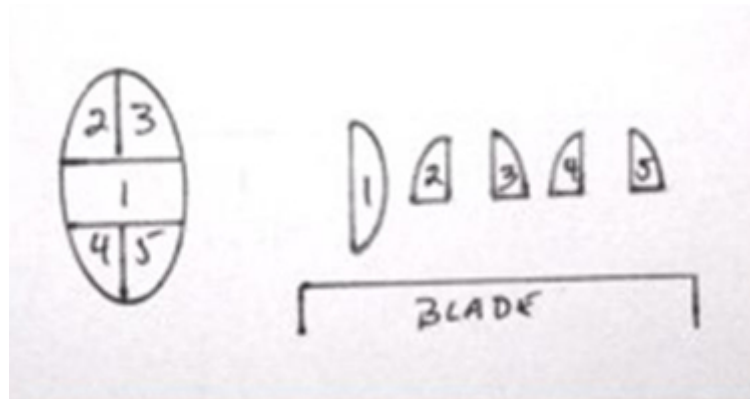
a.脂肪放在最后切。脂肪由于硬度不够，对绝大多数组织均合适的温度却切不好脂肪组织，如果一刀下去，组织中的脂肪先接触刀片，就会破碎并使整个片子损坏。如果脂肪最后接触刀片，则切片过程不受干扰。最糟糕的情况是脂肪部分先接触刀片而没有包埋物的保护，包埋物可以给片子提供一个起始的缓冲，如果没有包埋，脂肪就会切碎并把整个片子破坏。当切片过程中由于脂肪的出现而影响质量时，我要么把摇柄转回去尽量避免，要么把脂肪挖出来。

b.组织与刀片垂直或成角是关键。让我们假设组织由起始端、中间部分及末尾端三部分构成，起始端容易卷缩，或受到刷子的损害，还可能由于操作者的犹豫而引起片子的厚薄不均，这些都增加了假象的风险。末尾端在贴片时容易拉长，最好的是中间部分，最不可能出现假象，并且组织学上最干净，这是片子中最理想的部分。

非常坚实的组织容易产生横皱，切片时应包埋成角且尽可能的加温。成角包埋就像坐着船冲浪一样，如果你直线行驶，就会承受波浪线上最大的冲击，如果成角行驶，波浪线就会拉伸，所受的颠簸也会

减小。跟公路上的减速脊一样的原理。

上皮和粘膜贴附的组织如皮肤，胃肠，膀胱，子宫，颈部等，应当使上皮面垂直于刀片（见下图）。



当包埋椭圆形的皮肤时最先接触刀片的末端容易卷缩,上图提供了一种包埋小椭圆皮肤组织的方法,让组织的长面(2-5)最后接触刀面。

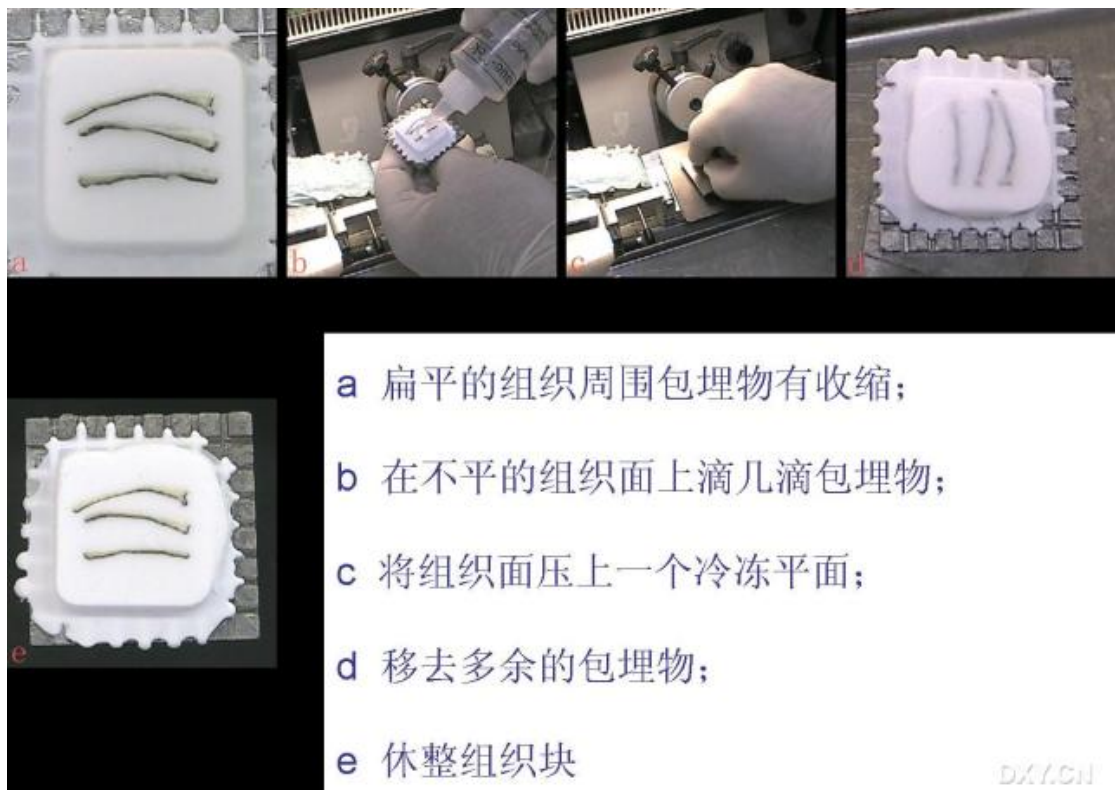
2. 组织块的温度 Temperature of the block

任何组织都有一个理想的切片温度，在此温度下切片，组织片以平滑均一的形式流过刀片，几乎没有卷缩。当温度、组织类型、刀片均处于理想状态时，切片十分流畅，几乎不用刷子。如果温度太低，片子容易卷曲和破碎；如果温度太高，片子就会皱成一堆。如果需要加温，只需要把大拇指置于组织块面几秒钟；如果需要降温，可以使用机子的精确低温包埋系统，简单的做法就是把过冻的冻台放在组织面上几秒钟，大多数的冰冻切片机都有一种热吸收器可以使用。

3. 组织块的填涂——基本的修复 Plastering Technique

填涂可以解决组织块自身的缺陷，下面我举个具体的例子。

扁平包埋组织的填涂:包埋扁平的组织时，只有一层薄薄的包埋物贴附在底面，而且包埋物会轻微地收缩与组织块分离,如果想以最小的修整开始切片，那么收缩的空间必须填涂上包埋物,如果不填涂，切片时组织便会与包埋物分离，从而很难获得一张完整的片子。下面这个简单的技巧可以使你获得一个整齐的组织面。



上图中用品：1.樱花冰冻切片包埋剂（北京海德：4583）

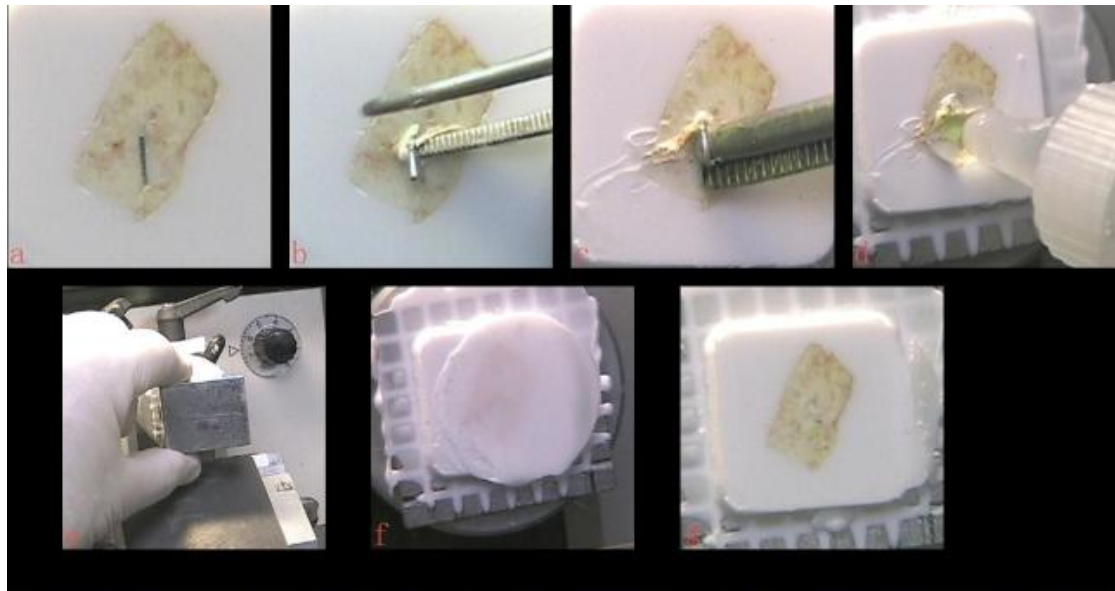
2.快速冷冻头，带网格图案的，不锈钢方形的，英文 Chuck（北京海德：61720-28，61721-36）

3.带小阱冷冻台，embedding bar（北京海德：61710-18，61710-24，61713-50）

4.冷冻头适配器，chuck adapter（北京海德 61731-01，61732-01）

针头的移除 Removing a staple:

在工作中经常会收到布满针头的标本，有时候针头会穿过整个组织，导致刀片的损坏并使片子一分为二，下面有一种简单的解决办法。



a 组织块内的针头；b 用钳子夹住针头；c 旋转钳子并将针头呈弧形拉出；d 在组织破损处滴几滴包埋物；e 用另一个冻台面压住组织面；f,g 修整前和修整后的组织面

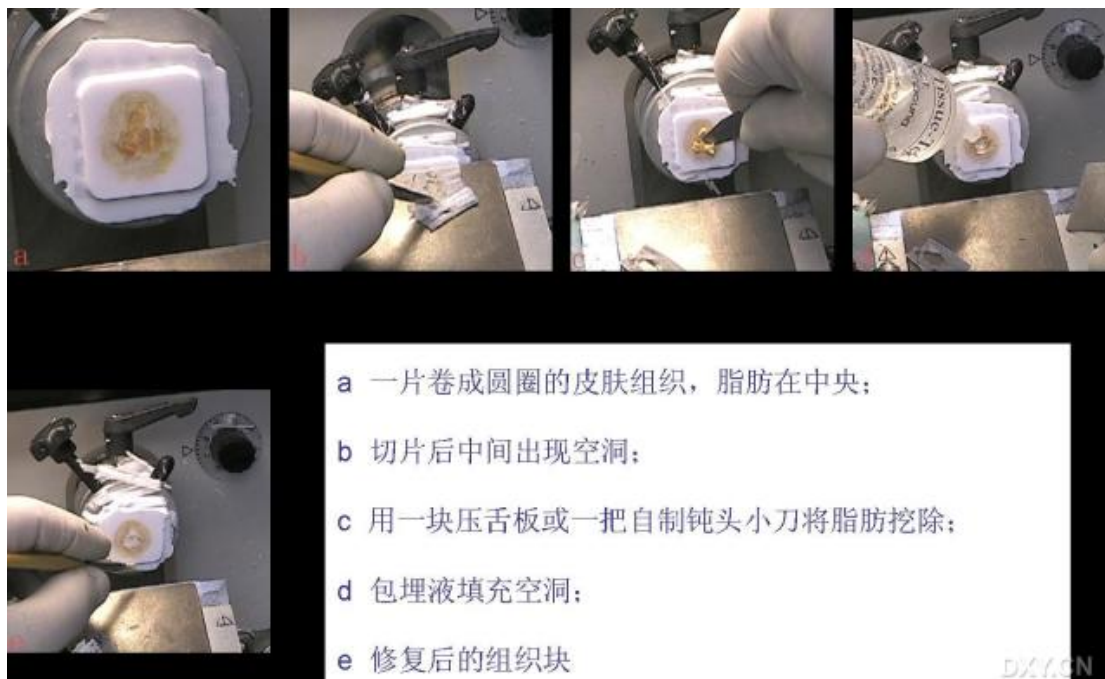
缝线的移除 Removing a suture

同样的方法移除组织块中的缝合线



挖凿的技术 The "Gouge"

当组织块中某些部分不需要或阻碍我们获得高质量的切片时，我们就可以将它挖除掉。最好的例子就是脂肪组织干扰切片，常见于切除的淋巴瘤用于检查是否癌转移。如果脂肪先于组织块中的其他部分接触刀片，你首先可以试着转动组织块，如果不行，就可以将它挖掉，然后用包埋物填充。

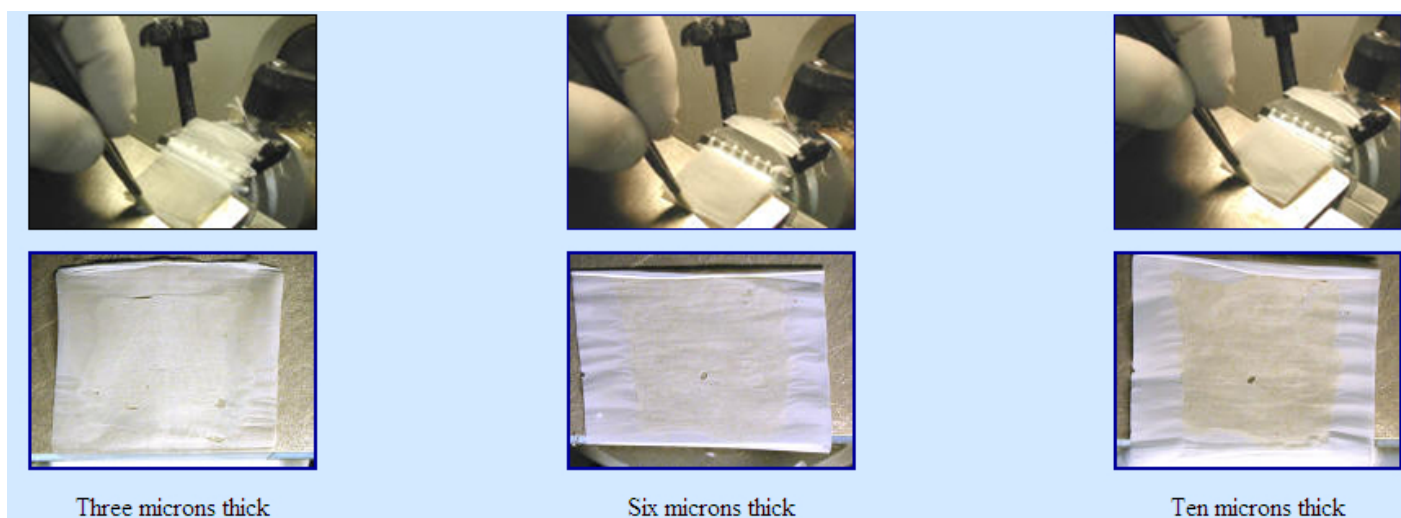


学会看片子 Looking at the section

这里指的是片子滑过刀片时就要辨别出质量的好坏，如果到镜下才发现片子的缺陷那就无法挽救。

1. 观察片子的厚薄 Too thick, too thin or just right

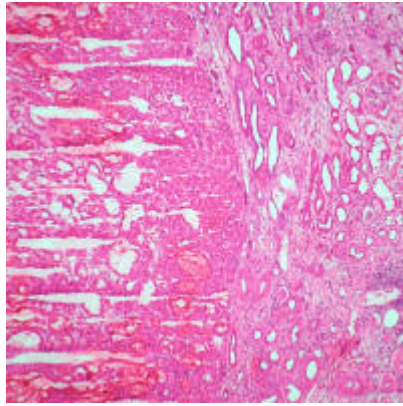
尽管冰冻切片机可以设置厚度，但人为辨别片子的厚度是否合适仍然很重要。片子太薄看起来象半透明的镜纸，片子太厚看起来混浊、柔性差，对我来说，5-6 μ m 的片子较合适，象一张薄的打印纸。



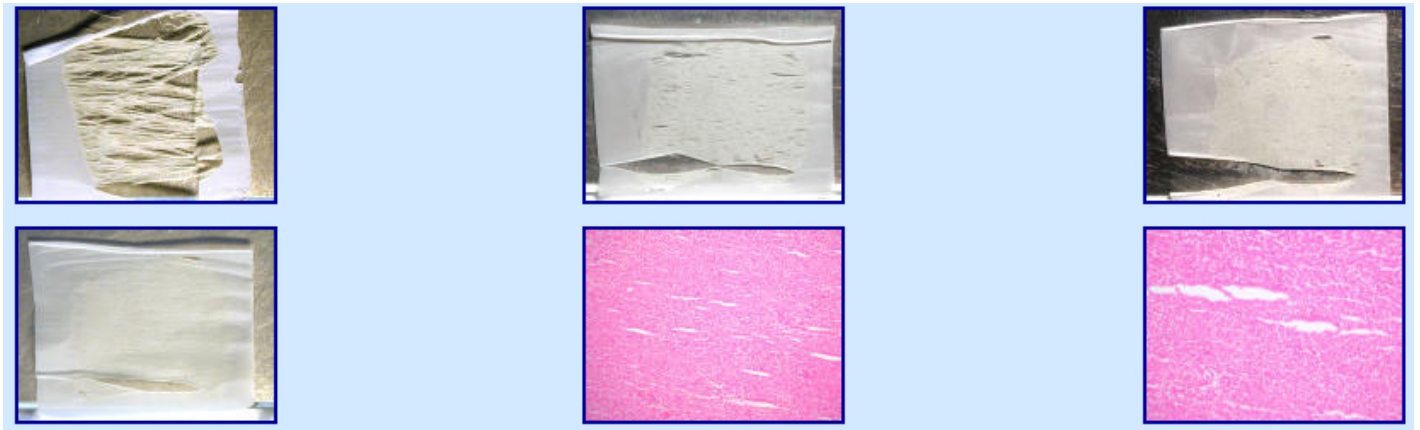
2. 片子破裂 Shattering

这种假象往往是组织块冷冻过度所致，可以通过升温来解决，含水量多的组织切片很容易破裂，必须

升高到一个合适的温度使裂开程度降到最小。水肿或血液组织经常有这种问题，活检的脑组织也很明显。下面的片子来源于肾肿瘤，含水量丰富，破裂也比较明显，我觉得水性的肿瘤组织在常规温度下冷冻将会变得异常的坚硬。



我觉得组织破裂的过程同一块湿布结冰一样的道理，当你用刀去挑这块湿布时它会自然弯曲，当湿布已经结冰时刀会将冰片弄裂。下面有6张片子，上面的3张破裂很明显，底部的3张很轻微，你必须仔细看才能发现，如果在切片时你集中注意力，你能感觉到甚至听到碎裂的声音。

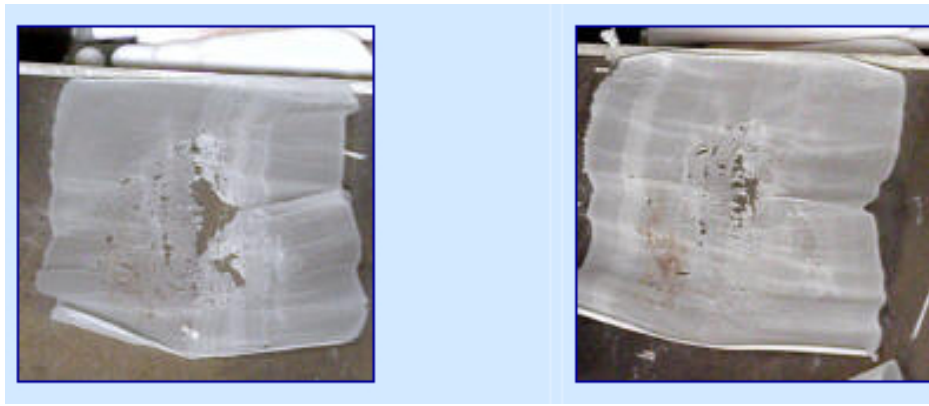


3. 片子上的条纹 Stripes on the section

垂直于刀片的细条纹为刀片缺口所致，这往往是切到钙化组织、针头或缝线的结果。



宽条纹，组织破碎或突然无法解释的切片困难往往意味着组织粘在刀片下面了，这在脂肪组织比较常见，这时刀片需要取下来清洗干净，注意清洗刀片时不要伤到自己。



4. 波浪线样的横皱 Wavy lines "Chatter"

这是切片机零件松动的征象，可能需要修理，切片时刀片有移动或支撑刀片的架子有移动时，往往有这种规则的条纹出现。为了获得干净整齐片子，所有固定刀片、刀架、支撑台、支撑栓子及切片机的旋钮、螺钉、轴承都必须上紧，并且不带有垃圾残骸，支撑台或刀片下面有一点包埋物都会影响切片的质量。



脂肪组织的处理 Wrestling the fat one!

脂肪组织无疑是冰冻切片者的绊脚石，道理很简单脂肪不会结冰，把温度降低让脂肪变硬可以切出较薄的片子，但是这个温度对同一组织中的其他成分来说显得太低而不合适切片，当脂肪破碎影响切片时这个问题就变得明显，下面是一些我的经验总结。

1. 尽可能的削掉不需要的脂肪组织 Whenever possible dissect off any unnecessary fat from the tissues

当我准备切淋巴结时，我会先检查一遍，小心翼翼地除掉表面及髓内的脂肪，髓内的脂肪用解剖刀刮擦掉，被膜线附近的脂肪用刀切除，这样就不需要切开整个淋巴结被膜。有人会说，我把一些组织去

掉后，可能导致漏判一些阳性的淋巴结，但我的经验是好的干净的片子比含有太多脂肪的差片子更容易获得阳性的结果。当你在修整组织或切片的过程中脂肪组织意外出现时，你也可以使用前面的挖苗技术。

2. 调整组织块的方向使脂肪最后接触刀片 Orient the tissue so that fat hits the blade last or by itself as I described above

切片时尽量避免脂肪先接触刀片，因为脂肪会脱离包埋物，在切片上留下一个洞，如果不能避免，也要在其周围加上包埋物，让包埋物先接触刀片。

3. 保证刀片、台面的干净及组织块的冷冻程度 Start with a clean stage and a very cold block

切片机的台面和刀片必须保持干净，假如你弄碎了一张片子必须即时用一块干纱布清理干净，但要防止刀片割手，如果你发现切出来的片子有条纹或者堆积成束，可能是组织粘着在刀片的下方了，必须除掉刀片上的组织，并将刀片清理干净。

组织块越冷就越容易切脂肪，只是其他非脂肪组织就变得坚硬难切，同时水性的组织会裂开，这就有必要在切片温度的最冷端和最温端取一个二者兼顾的中间值，以使脂肪和非脂肪组织都能切好。我一般将组织块冻在-24度，可以获得满意的结果，冷冻喷雾剂有用，但要注意先清掉切片机内的污秽。

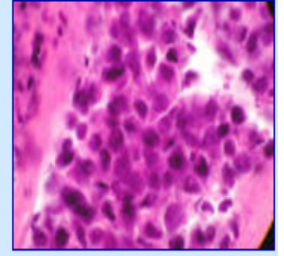
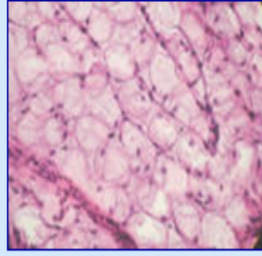
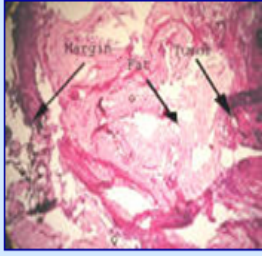
4. 灵活地转动摇柄而不犹豫 the clean swift turn of the wheel without hesitation and a sharp blade is most important

假如组织块是脂肪和结缔组织的混合物，那要好切于纯脂肪组织，有时候按照我前面所讲的技巧来做，片子会出乎意料的好。用运动的刷子快速粘住组织片并把它拖上台面，不要把刷子和组织片压上台面，以免粘在一起使切片完全中断。同样，好的刀片也很重要，如果你能用刷子敏捷地做出这套动作，那你肯定也能对脂肪组织切出理想的片子，脂肪在片子上会留下空的间隙，但它们之间的纤维条却保存完好。下面这块乳腺癌及其周围有数毫米覆盖着墨水的脂肪组织，假如你调整好组织块的方向使脂肪边缘垂直于刀片，肿瘤组织就切得好，脂肪切片的角度会有变动，也会留下空隙，但总有一条墨迹线指示着边缘的所在。很多时候我都用这种方法来区别肿瘤和脂肪组织。



5. 试着对脂肪过多的组织切厚些 Try a thick section in very fatty tissues

厚的片子对阅读薄片上的细节也是一种辅助，厚片可以通过各种方法获得，我先试着按一下切片机上的精细前进按钮，如果组织块保持完整，我继续尝试按一下粗前进按钮，这样会切出很厚的片子。你也可以调节机子的厚度刻度盘，或者让摇柄转两次，先向前1/4圈，再向后，再向前，采用这些技巧会切出厚度不一的片子。如果你连续均与地转动摇柄并配合使用刷子，你最后会在玻片上贴出良好的片子，后面的固定和染色还是一样的，只是时间可能要加倍或翻两番，染液中的片子轻拿轻放，不要剧烈搅动。费尽全力后最后回报给你的是一张有三维立体感染色优良的片子（见下图），而且脂肪组织也变得相当的透明清晰，你可以看到沿各个方向走行的毛细血管，我还可以幸运地识别非脂肪部分的结构，这种用墨迹标记组织边缘的方式包含于整个组织面，有助于解读脂肪边缘有缺损的薄片，粉刺癌中高度恶性的细胞核和坏死同样可以识别。在切脂肪组织的过程中，如果你连做了两三次而没做好，你可能会耗尽了一些宝贵的组织标本，可以在切那些乳腺癌组织之前用正常的脂肪练练手。



1) Thick section of fatty tissue. Relationships and architecture preserved. 20 x

2) Thick section of fatty tissue 200x. Can read through clear fatty cells.

3) Duct carcinoma in situ. Thick but still interpretable in conjunction with thin section above.

冰冻切片的局限 The Limitations of frozen section

1.时间的限制 Time

确实在冰冻切片室经常受到快速出结果的压力，我的经验是欲速则不达，急躁和慌乱容易出错。我们最好的办法就是树立自信，良好的态度及教育外科医生，受到加快制片的催促时应当学会从各方面抵制压力，假如你是一位专业的受过良好训练的冰冻切片家，从切片到染出一张片子只需要几分钟，如果你对组织的处理很粗糙，这个过程可能要几分钟到十分钟，碰到比较大的复杂的组织需要多重染色则需要的时间会更多，对病理学家来说，阅片需要几秒到数十秒的时间，有时候需要搜寻一些细小的线索，翻阅书籍，或向同行咨询等，所需时间会更多。考虑到外科医生的处境，我们必须动作迅速，但是当所做的结论会更改手术的进程时，我们会显得额外谨慎。我们会要求提供患者的详细资料以便得到正确的答案，即使耽误几分钟，总比重做手术或提供错误的结论所付出的代价小很多，如果连续碰到几例患者，或复杂的病例，多个标本，那我们只有寻求帮助，当然，在手术不过急的依赖冰冻切片的结果时，这些事情尽量不做。不要粗糙地准备和阅读片子，这是最可能出错的地方，同时，也要识别超出你个人能力的处境，很多需要寻求外界咨询的场合，我象一根树桩一样站在那里阅片，几分钟都无法得出结论，就象看到一只从来没有在后院出现过的老虎一样。这个时候我会不顾一切的寻找就近的帮助，并且告诉我的外科医生要耐心的等待。

2.特殊染色的局限 Limited special stains and studies

这个问题讨论起来很难，我们只能面对，当今时代如果没有免疫过氧化物酶染色和基因突变的检测，

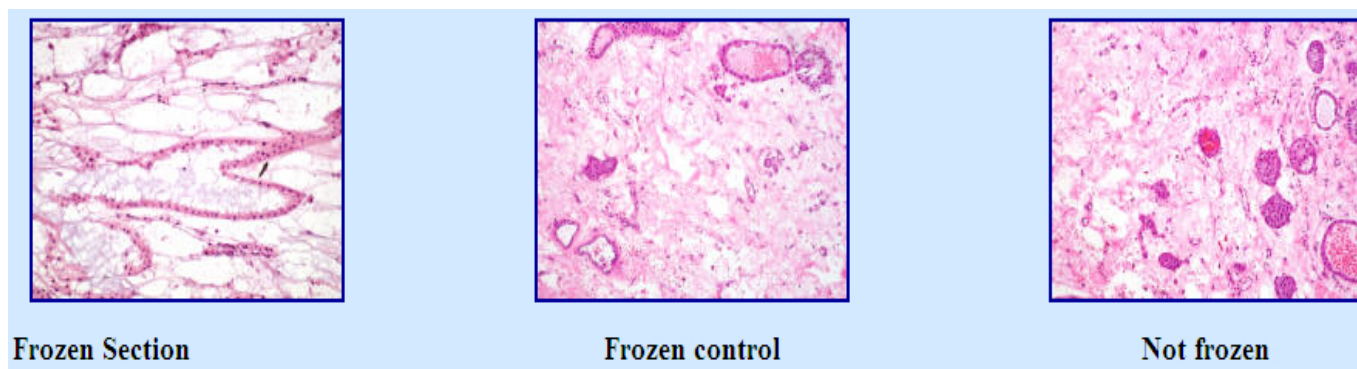
仍然无法对淋巴瘤和肉瘤及其他类似的疾病进行分类，也许不久的将来能有快捷的方法用于冰冻切片，但是现在，确实是一个缺陷。

3.冰冻假象 Freezing artifacts

这是水的特性，水在结冰时因氢键的交联而膨胀，正是这个原因，冰块才能浮在水面上。我相信组织在冰冻时候的变化与水结冰膨胀是密切相关的，在此，我会尽量解释冰冻片和石蜡片的差异。象处理其他病理假象一样，正确的识别这些冰冻假象有助于我们不至于误判。

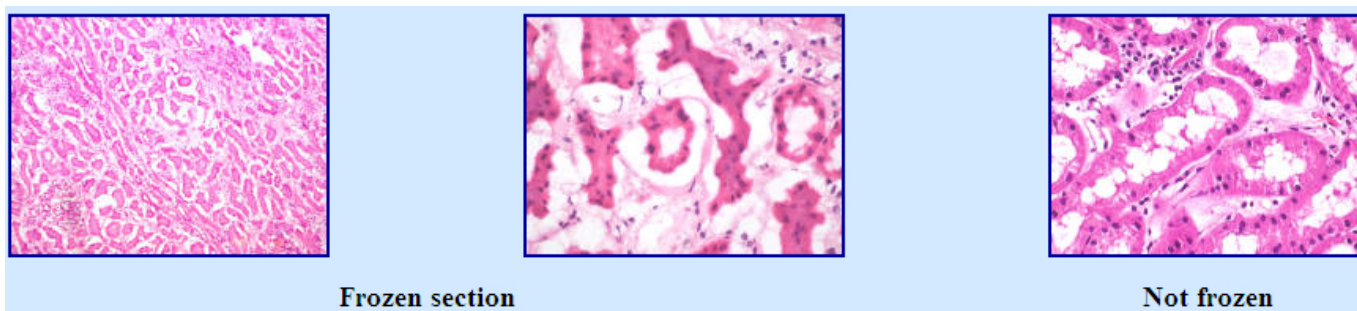
冰晶的形成 Ice Crystals ("bubbles") in edematous stroma

含水量特别多的组织冷冻时会出现肥皂泡样的空隙，我认为当组织中的水分凝固时形成球形的冰晶，挤压纤维组织条而产生泡沫样的形状。下面的冰冻对照显示当组织片进一步处理时泡沫样的水分又重新分布于间质，而未曾冷冻的组织显示出间质的水肿。这些水分巨多的组织在切片时很难保证不裂开，应尽可能高切片的温度。



挤压假象 Compression Artifacts

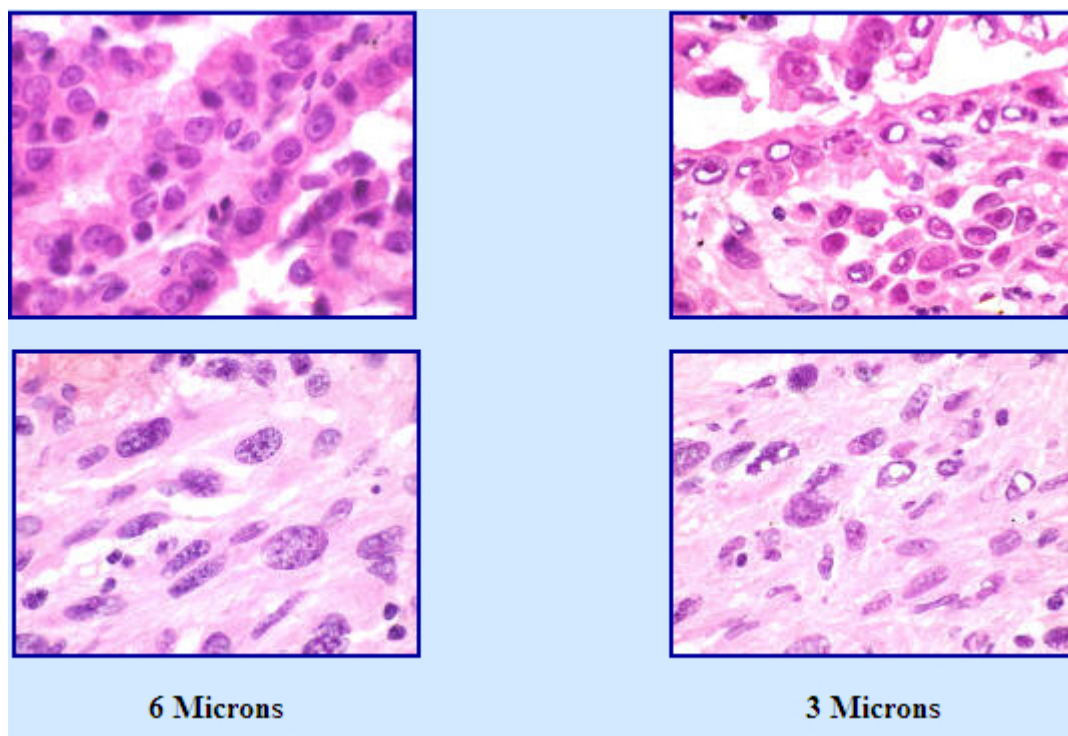
细胞实性的组织会受到冰泡膨胀的挤压，这在水肿组织非常明显，下面的肾细胞癌提供了一个很好的例子，中间的图片显示肾小管被透明的冰晶所挤压，右边的图片为来源于同一组织的非冷冻切片。



核性的冰晶 Nuclear ice crystals

细胞核产生冰晶的趋势不一，根据我的观察，这似乎跟组织的类型及状态有关，我注意到在损伤的组

织出现较多，从道理上讲也是如此，烧伤的组织或缺血损伤的组织由于失去了渗透压的平衡从而导致众多数量的核水肿，同时，囊状的核越多，核冰晶形成的可能性越大。我也注意到：片子切得越薄，这种冰晶越容易留下空洞，下面的例子可以很好的说明我的观点。



核染色质的改变 Nuclear chromatin changes in frozen control

中间这张片子先前冷冻过，显示染色质特别明显，与左边冰冻后立刻固定的图片相比，核的密度更大，更深染，注意到冰冻片中胞浆含有较多的空泡，也是冷冻假象的一种



---中文翻译全文到此结束，花费的时间不少,感谢丁香园论坛战友 IIUSION 五年前翻译的此文。英文原文接着讨论可以避免的一些限制 Avoidable limitations, 例如 Drying artifacts, Sampling error, Fat, The quality of the section is inferior, Inconsistency of training and performance, Embedding。

原文作者联系方式: petepath@yahoo.com