

· 新技术应用 ·

软硬组织切磨技术在口腔医学研究中的应用

武登诚[△], 李盛林

(北京大学口腔医学院·口腔医院颌面外科研究室, 北京 100081)

[关键词] 口腔医学; 标本制备; 显微切片术

[中图分类号] R780.2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-167X(2007)01-0094-02

软硬组织切磨技术是将不能用常规方法制备成组织切片的口腔特有的软硬组织标本制成组织切片, 并保持软硬组织、组织与植入物之间的原有组织结构形态, 如牙-骨-软组织、骨-种植体-软组织等。切磨技术与常规方法不同, 组织标本经过固定及脱水处理后, 用光固化树脂浸透、包埋, 再行锯片、磨片、染色等步骤制成厚约 10 μm 的组织切片。软硬组织切磨技术能为口腔硬组织疾病的研究、口腔新材料的生物相容性研究和种植体研究等提供可靠的组织学评价依据。

因为口腔颌面部组织结构的特点: 疾患发生在特殊的硬组织(如龋齿); 同时与硬、软组织有关(如根尖病); 义齿的修复、颌骨缺损的修复也具有鲜明的口腔特点; 金属、高分子化合物、陶瓷、羟基磷灰石等常作为修复的重要材料并直接植入骨和软组织内。所以能够同时保持各种软硬组织原有结构形态的组织切片对于此领域的研究无疑是非常有用和必需的。软硬组织切磨技术与常规的石蜡包埋技术完全不同, 它需要特殊的包埋、切片和磨片设备。由于软硬组织切磨技术复杂、成本较高, 以前在国内应用受到了一定限制。但随着我国科研环境的不断改善, 近年对此技术的需求不断增加。以下介绍本研究室数年来应用此技术的一些体会。

1 材料与方 法

1.1 仪器设备

组织切磨系统(德国 EXAKT); 组织锯片机、组织磨片机、下载片真空吸附机、平行载片真空精密吸附机、光固化包埋机、组织脱水浸透仪、数显千分尺等。

1.2 组织标本固定

初固定: 10% (体积分数) 中性甲醛溶液, 4 ℃ 固定 12 ~ 24 h。组织标本分切: 将初固定的标本用组织锯片机切割成厚约 2 ~ 4 mm 的组织块。终固定: 分切后的标本继续甲醛溶液中固定 6 ~ 12 h。

1.3 组织标本脱水

终固定后的标本梯度乙醇脱水每级需 12 ~ 24 h。

1.4 光固化树脂浸透

将脱水后的标本逐级浸入 70%, 50% 和 30% (体积分数) 的无水乙醇树脂 (Technovit7200VLC) 中。每个步骤至少需 1 d。最后浸入纯光固化树脂中 7 ~ 12 d。

1.5 包埋和聚合

将浸透完善的标本置入合适的包埋模内, 放入光固化包

埋机内聚合。聚合过程分两步完成: (1) 为防止包埋块产生裂隙, 先置标本块远离光源聚合 2 h; (2) 将标本移近光源, 继续聚合 6 ~ 12 h。

1.6 附加下载片

将组织块的非切割面与下载片黏合。为了获得平行组织面, 首先将标本的组织面暂时用双面胶带与载片黏贴, 然后吸附在下载片真空吸附机上。用树脂 (Technovit4000) 将下载片黏合在标本的非切割面。取下用胶带黏贴的载片, 暴露组织面, 在磨片机上用 2 000 目的砂纸磨成光滑的平面, 磨到露出所要观察的组织为止。

1.7 附加平行载片

将组织块的组织面与平行载片黏合。用平行载片真空精密吸附机将平行载片黏在磨平的组织面上(黏着剂 Technovit 7210VLC)。特别强调的是要防止组织面与载片之间产生气泡, 使黏着树脂均匀分布在组织面上, 光固化 10 min。

1.8 切片

用组织锯片机切割组织块。如果要切厚度为 100 μm 的切片, 用 100 μm 厚的单面胶纸贴附在平行载片上。将下载片吸附在标本托上, 使平行载片上的胶纸轻轻接触到刀片, 然后开始切片(图 1)。

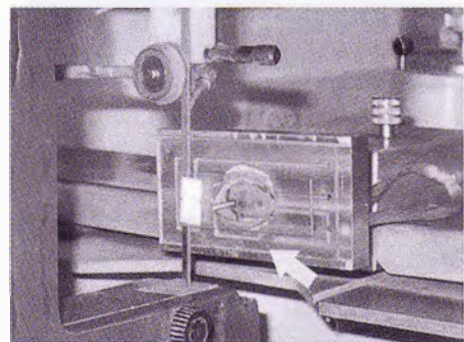


图 1 加了载片的组织块(箭头)吸附在锯片机上

Figure 1 The specimen (arrow) is adhered to the saw

1.9 磨片

用数显千分尺测量切片的厚度, 进而准确测量组织片的厚度。用切割标本的厚度减去平行载片及黏着剂的厚度, 在磨片机上根据测量厚度调定零点进行磨片。分别用 800, 1 200 和 2 000 目的砂纸磨片, 直到达到最终切片的厚度

[△] Corresponding author's e-mail, wbch179@sina.com

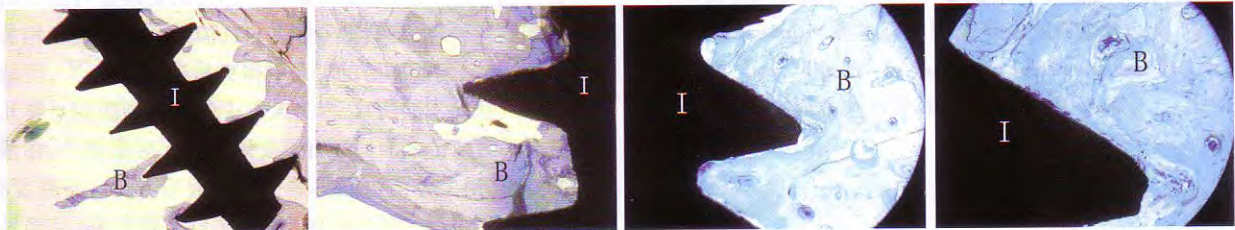
为止。每次更换砂纸需重新测量厚度调定零点。整个切磨过程中厚度的测量甚为关键:总厚度 $C = A + B + X$ 。A = 标本块的厚度 + 下载片的厚度, B = 平行载片的厚度, X = 黏着剂的厚度(图2)。在测量上述各点数值时,应根据标本的大小选择2~4个测量点,以保证测量的准确性。测量应在同一温度下进行。

1.10 切片染色

切磨技术常规采用甲苯胺蓝染色或苏木素-伊红染色。甲苯胺蓝染色:(1)清洁载片;(2)在30%(体积分数)的双氧水中摇动浸泡5 min。(3)自来水充分冲洗,蒸馏水洗;(4)甲苯胺蓝液中着色5~15 min。(5)自来水冲洗,蒸馏水冲洗;(6)干燥载片;(7)光固化树脂封片。

染液配制方法 染液A:蒸馏水800 mL,四硼酸钠8.0 g,甲苯胺蓝8.0 g,搅拌15 min。染液B:蒸馏水200 mL,Pyronin G 2.0 g。A;B液混合搅拌15 min 过滤后待用。

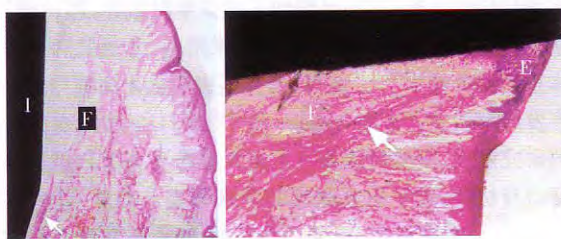
苏木精-伊红染色:(1)清洁载片;(2)苏木素染液中着色10~40 min。(3)在1%(质量分数)冰醋酸中洗1 min。(4)自来水冲洗至蓝色;(5)在伊红液中着色1~5 min。(6)自来水冲洗,蒸馏水冲洗;(7)干燥载片;(8)光固化树脂封片。



I, implant; B alveolar.

图3 种植体-牙槽骨切磨片,甲苯胺蓝染色显示不同放大倍数下种植体与骨组织界面

Figure 3 The ground slice of the implant-alveolar bone Stained by toluidine blue to show the interface of the implant-bone at different magnification



I, implant; B, alveolar; E, epithelia; F, fibers.

图4 种植体(钛)-牙槽骨-牙龈切磨片。甲苯胺蓝-碱性品红染色显示种植体周围软硬组织不同染色效果及纤维走向

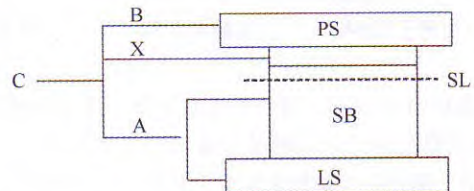
Figure 4 The ground slice of the implant(titanium)-gingiva stained by toluidineblue-alkaline Fuchsin to show the different staining effect of soft and hard tissues surrounding the implant and the running direction of fibers

3 讨论

软硬组织切磨技术适用于颞下颌关节,上、下颌骨,有牙充填物的颌骨,带种植体的颌骨,冠桥,牙等组织标本。切磨

2 结果

采用软硬组织切磨技术制备的口腔软硬组织切磨片能清楚准确地观察到组织的解剖结构及其之间的相互关系。选用本研究室制做的切磨片显示其最终效果。种植体(金属)-牙槽骨切磨片:图3为颌骨内种植体的切磨片,显示骨与种植体界面为骨性接触。种植体-牙槽骨-牙龈切磨片:图4为3种不同硬度的组织切片。主要观察种植体周围的纤维走向。



PS, parallel slide; SB, specimen block; LS, lower specimen; SL, section line.

图2 测量切片厚度模式图

Figure 2 Diagram for showing measurement of the thickness of the section

的组织标本大小取决于切磨系统的参数,最大为50 mm × 100 mm。根据本研究室的经验,标本越大制片难度愈大。切磨技术的应用解决了常规石蜡切片技术无法解决的问题。常规石蜡切片技术对于带有生物材料(如金属、陶瓷)的组织标本难以处理,切磨技术则很好的解决了这个难题。以下五点对于制备高质量的软硬组织切磨片十分重要 (1)完善的标本固定:采取两步固定法,对于较大标本十分必要;(2)准确的组织分切:对带有骨内植入体的标本,必要时需借助X线准确定位后再分切;(3)完善的组织脱水和浸透:标本的脱水和浸透是制备切磨片的关键步骤,脱水和浸透不完善直接影响切磨片的质量和成败;(4)切磨片的厚度:掌握切磨片厚度的关键在于厚度的准确测量,应十分认真和仔细,最好选择有机玻璃载片并防止脱片;(5)仪器的良好使用和日常保养。

(2006-12-05 收稿)

(本文编辑:王 蕾)