

·基础研究·

## 新型环保试剂在病理制片及免疫组化中的应用

李洁莹<sup>1</sup>, 梁淑君<sup>1</sup>, 丁英<sup>1</sup>, 刘树迎<sup>1</sup>, 秦丽娜<sup>1,2,3</sup>, 潘昭良<sup>1</sup>, 冯炼强<sup>1</sup>, 袁慧杰<sup>1</sup>

(1. 中山大学中山医学院基础医学实验教学中心, 广东 广州 510080; 2. 中山大学中山医学院法医学系, 广东 广州 510080; 3. 广东省法医学转化医学工程技术研究中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨环保型试剂与传统试剂在组织处理、组织切片、苏木精-伊红(HE)染色、特殊染色及免疫组化中的应用效果。【方法】选取小鼠及新西兰兔的胰腺、肾脏、脾脏、肝脏、肺、骨骼肌、心脏组织, 随机分为传统组(A组)、环保试剂I组(B组)、环保试剂II组(C组)。对三组组织处理后进行石蜡切片、HE染色、磷钨酸苏木素染色、Mallory三色染色, 胰腺组织切片进行免疫组化检测胰岛素蛋白。评估指标包括: 组织形态完整性、包埋操作性、切片质量以及染色效果。【结果】三组样本在固定效果、包埋操作、切片质量等方面无明显差异。经HE染色后, 各组组织核质染色鲜艳、对比清晰, 优良率分别为A组98%、B组99%、C组97%, 差异无统计学意义(A vs. B,  $P=0.561$ ; A vs. C,  $P=0.651$ )。在磷钨酸苏木素染色中, A组和C组的横纹肌及胶原纤维结构对比清晰、染色鲜艳, B组存在染色不均等问题。优良率分别为A组100%、B组10%、C组95%, A组与B组差异有统计学意义( $P<0.01$ ), A组与C组差异无统计学意义( $P=0.311$ )。在Mallory三色染色中, A组和B组的效果优于C组。优良率分别为A组95%、B组90%、C组15%, A组与C组差异有统计学意义( $P<0.01$ ), A组与B组差异无统计学意义( $P=0.548$ )。免疫组化结果显示, A组背景干净, 无非特异性染色, B组和C组存在明显的非特异性染色, 组间非特异性染色率差异有统计学意义(A vs. B, 5% vs. 100%,  $P<0.01$ ; A vs. C, 5% vs. 100%,  $P<0.01$ )。【结论】在HE制片中, 环保型试剂的组织固定效果良好, HE染色效果与传统试剂的相当, 能满足教学的需求。特殊染色中, B组、C组分别在Mallory三色染色、磷钨酸苏木素染色中的表现较佳。但环保型试剂在免疫组化中存在非特异性问题, 有待进一步优化。

**关键词:** 环保试剂; 石蜡切片; HE染色; 特殊染色; 免疫组化

中图分类号: R331 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2026)03-0509-09

DOI: 10.11714/jssu.med.YX20250190

## Application of Novel Environmentally Friendly Reagents in Pathological Section Preparation and Immunohistochemistry

LI Jieying<sup>1</sup>, LIANG Shujun<sup>1</sup>, DING Ying<sup>1</sup>, LIU Shuying<sup>1</sup>, QIN Lina<sup>1,2,3</sup>,

PAN Zhaoliang<sup>1</sup>, FENG Lianqiang<sup>1</sup>, YUAN Huijie<sup>1</sup>

(1. Basic Medical Experimental Teaching Center, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080, China; 2. Faculty of Forensic Medicine, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Guangdong Province Translational Forensic Medicine Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: YUAN Huijie; E-mail: yuanhj6@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】 To explore the application effects of environmentally friendly reagents versus traditional reagents in tissue processing, paraffin sectioning, hematoxylin-eosin (HE) staining, special staining, and immunohistochemistry. 【Methods】 Pancreatic, renal, splenic, hepatic, pulmonary, skeletal muscle, and cardiac tissues

收稿日期: 2025-12-12

录用日期: 2026-04-27

基金项目: 中山大学中山医学院2025年教学质量与教学改革工程类项目(教务[2025]67号); 中山大学中山医学院2026年教学质量与教学改革工程类项目(教务[2026]36号)

作者简介: 李洁莹, 第一作者, 研究方向: 形态学、医学实验教学, E-mail: lijy829@mail.sysu.edu.cn; 袁慧杰, 通信作者, E-mail: yuanhj6@mail.sysu.edu.cn

were collected from mice and New Zealand rabbits, and randomly divided into a traditional group (Group A), an environmentally friendly reagent I group (Group B), and an environmentally friendly reagent II group (Group C). The processed tissue sections from all three groups were subjected to paraffin sections, HE staining, phosphotungstic acid-hematoxylin staining, and Mallory trichrome staining. The pancreatic tissue sections were subjected to immunohistochemical detection of insulin protein. Evaluation criteria included tissue morphological integrity, embedding operability, section quality, and staining effects. 【Results】 No significant differences were observed among the three groups of samples in terms of fixation efficacy, embedding operations, and section quality. After HE staining, all groups exhibited bright nuclear and cytoplasmic staining with clear contrast, with excellent-and-good rates of 98%, 99%, and 97% for Groups A, B, and C, respectively, showing no statistically significant differences (A vs. B,  $P=0.561$ ; A vs. C,  $P=0.651$ ). In phosphotungstic acid-hematoxylin staining, Groups A and C showed clear structural contrast and bright staining for striated muscle and collagen fibers, whereas Group B exhibited uneven staining. The excellent-and-good rates were 100%, 10%, and 95% for Groups A, B, and C, respectively, with significant differences between Group A and Group B ( $P<0.01$ ) but no statistical difference between Group A and Group C ( $P=0.311$ ). In Mallory trichrome staining, Groups A and B outperformed Group C. The excellent-and-good rates were 95%, 90%, and 15% for Groups A, B, and C, respectively, with significant differences between Group A and Group C ( $P<0.01$ ), but no statistical difference between Group A and Group B ( $P=0.548$ ). Immunohistochemical results showed that Group A had a clean background with no non-specific staining, while Groups B and C exhibited significant non-specific staining, with statistically significant differences in non-specific staining rates between the groups (A vs. B, 5% vs. 100%,  $P<0.01$ ; A vs. C, 5% vs. 100%,  $P<0.01$ ). 【Conclusion】 In HE staining, environmentally friendly reagents demonstrated effective tissue fixation and staining results comparable to traditional reagents, meeting the teaching requirements. For special staining, Group B and Group C performed better in Mallory trichrome staining and phosphotungstic acid-hematoxylin staining, respectively. However, environmentally friendly reagents exhibited non-specific staining issues in immunohistochemistry, where further optimization is required.

**Key words:** environmentally friendly reagents; paraffin section; HE staining; special staining; immunohistochemistry

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2026, 47(3): 509-517]

组织制片是组织学与胚胎学、病理学的重要教学内容,也是科研中常用的关键技术。然而其操作过程中常用的甲醛、二甲苯、中性树胶等有毒试剂,对操作者及环境构成了严重威胁。甲醛是一种常用的组织固定液,其具有较强的组织渗透力、组织形态固定良好、价格便宜等优点<sup>[1]</sup>。然而,甲醛具有致癌性和致畸性,急性暴露会对眼睛、皮肤、上呼吸道等产生刺激、致敏作用,甚至导致急性中毒<sup>[2]</sup>。长期接触甲醛则可能对人体神经系统、呼吸系统、免疫系统造成严重损伤<sup>[3]</sup>。Cammalleri等<sup>[4]</sup>收集了2004年1月1日至2019年9月30日期间发表的43篇关于甲醛职业暴露风险的研究,指出大体解剖实验室和病理实验室等是甲醛暴露风险最高的职业场所。二甲苯作为目前应用较为广泛的一种透明剂、脱蜡剂,以及中性树胶的溶剂,尽管价格低廉且效果显著,但长时间接触同样会损伤神经系统、血液系统、呼吸系统及皮肤等<sup>[5-7]</sup>。鉴于甲醛和二甲苯的严重危害,寻找毒性更低且效果相当的新

型环保试剂,以降低对实验技术人员及学生的健康风险,已成为迫切需求。本研究旨在系统对比评估环保型试剂与传统试剂在组织处理、HE染色、特殊染色及免疫组化中的应用效果,筛选甲醛、二甲苯和中性树胶的替代方案,以期将其应用于实验教学中,从而改善实验教学生态,为师生创造一个安全、环保的实验环境。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验选用6~8周龄的健康SPF级昆明小鼠,性别不限,18~22 g,由中山大学实验动物中心提供(生产许可证号:SCXK(粤)2021-0029);9~11周龄的健康普通级新西兰兔,性别不限,2.1~2.5 kg,由中山大学实验动物中心提供(生产许可证号:SCXK(粤)2019-0023)。本研究中的实验动物已获中山大学实验动物中心批准(批准号:SYSU-IACUC-

2025-002212, SYSU-IACUC-2025-000626), 整个实验过程中严格遵循动物伦理规范。实验动物由动物中心统一饲养,可自由获取水和食物,饲养环境维持在12 h光照-黑暗循环、恒温恒湿条件下。

## 1.2 仪器

石蜡切片机(达科为 MT1),组织包埋机(Thermo HistoStar),组织脱水机(Thermo Excelsior AS),切片扫描仪(Motic Easyscan 1)。

## 1.3 试剂

甲醛(广州牌)、FineFIX固定液(Milestone)、组织固定液(无醛,九州柏林)、二甲苯(广州牌)、环保型脱蜡透明液(Servicebio)、改良Harris苏木素染色液(麦克林)、伊红(SIGMA)、体积分数1%盐酸酒精(BASO)、环保型封片胶(BASO)、中性树胶(上海懿洋)、无水乙醇(广州牌)、磷钨酸苏木精试剂盒(迪普曼)、重铬酸钾(广州牌)、醋酸(麦克林)、苯胺蓝(源叶生物)、橙黄G(索莱宝)、磷钼酸(麦克林)、酸性品红(麦克林)、Anti-Insulin/INS Antibody(博士德, BM4310)、兔IgG两步法免疫组化试剂盒(博士德, SV0002)、DAB显色试剂盒(博士德, AR1027)、0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液、PBS-Tween-20溶液、PBS溶液。

主要试剂的配制:①重铬酸钾醋酸液:重铬酸钾2.5 g+醋酸5 mL+蒸馏水95 mL,溶解、混匀即可。②苯胺蓝橙黄G液:苯胺蓝0.5 g+橙黄G 2 g+磷钼酸1 g+蒸馏水100 mL,搅拌溶解。

试剂分组:①传统组(A组):固定液:体积分数10%福尔马林固定液;脱水试剂:梯度乙醇;透明液:二甲苯;封片胶:中性树胶。②环保试剂I组(B组):固定液:FineFIX固定液;脱水试剂:梯度乙醇;透明液:环保型脱蜡透明液;封片胶:环保型封片胶。③环保试剂II组(C组):固定液:九州柏林组织固定液(无醛);脱水试剂:梯度乙醇;透明液:环保型脱蜡透明液;封片胶:环保型封片胶。

## 1.4 方法

1.4.1 组织固定、脱水、透明、浸蜡 将小鼠/新西兰兔处死后,立即对胰腺、肾脏、脾脏、肝脏、肺、骨骼肌、心脏进行取材,将组织随机分至传统组(A组)、环保试剂I组(B组)、环保试剂II组(C组)。A组用体积分数10%福尔马林固定液进行组织固定40 h,随后依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明及58℃组织浸蜡。B组和C组分别使用FineFIX固定液和九州柏林组织固定液(无醛)进行组织固定40 h,经梯度乙醇脱水后,使用环保型脱蜡透明液

替代二甲苯进行组织透明,最后58℃浸蜡。

1.4.2 石蜡包埋、切片 利用组织包埋机将组织包埋制作成蜡块,用石蜡切片机对蜡块进行切片,厚度为4 μm。

1.4.3 HE染色 取小鼠胰腺、肾脏、脾脏、肝脏、肺,按1.4.1、1.4.2流程进行组织固定、脱水、透明、浸蜡、包埋和切片,每组100张切片,随后进行HE染色。染色流程如下:①将A组切片使用二甲苯常规脱蜡至水,B、C组使用环保透明脱蜡液脱蜡至水。②苏木素染色10 min,蒸馏水洗10 s。③体积分数1%盐酸酒精分化5 s。④流水冲洗30 min。⑤5 g/L伊红水溶液染色5 min,蒸馏水洗10 s。⑥常规梯度乙醇脱水。⑦A组经二甲苯透明后用中性树胶封片,B、C组经环保透明脱蜡液透明后用环保封片胶封片,切片扫描仪扫描。

1.4.4 特殊染色 (1)磷钨酸苏木素染色:取小鼠骨骼肌,按1.4.1、1.4.2流程进行组织固定、脱水、透明、浸蜡、包埋和切片,每组20张切片,随后进行磷钨酸苏木素染色。染色流程如下:①将A组切片使用二甲苯常规脱蜡至水,B、C组使用环保透明脱蜡液脱蜡至水。②将高锰酸钾溶液与硫酸溶液等比例混合,滴到组织上,氧化5 min,蒸馏水洗1 min。③滴加草酸溶液漂白1~2 min,蒸馏水洗2 min。④滴加磷钨酸苏木精溶液,45℃3~4 h。⑤体积分数95%乙醇溶液迅速洗去染液,无水乙醇脱水。⑥A组经二甲苯透明后用中性树胶封片,B、C组经环保透明脱蜡液透明后用环保封片胶封片,切片扫描仪扫描。

(2)Mallory三色染色:取新西兰兔心脏,按1.4.1、1.4.2流程进行组织固定、脱水、透明、浸蜡、包埋和切片,每组20张切片,随后进行Mallory三色染色。染色流程如下:①将A组切片使用二甲苯常规脱蜡至水,B、C组使用环保透明脱蜡液脱蜡至水。②重铬酸钾醋酸液处理约10 min,流水冲洗2 min,蒸馏水稍洗。③移入5 g/L酸性品红水溶液浸5~8 min,蒸馏水稍洗。④入苯胺蓝橙黄G液浸染10~20 min。⑤分色:切片直接用体积分数95%乙醇溶液分色,镜检细胞核呈红色,胶原纤维蓝色,对比清晰为止,约需2~4 min;无水乙醇脱水。⑥A组经二甲苯透明后用中性树胶封片,B、C组经环保透明脱蜡液透明后用环保封片胶封片,切片扫描仪扫描。

1.4.5 免疫组化 取小鼠胰腺组织,按1.4.1、1.4.2流程进行组织固定、脱水、透明、浸蜡、包埋和切片,每组20张切片,随后进行免疫组化。免疫组化流

程如下:(1)将A组切片使用二甲苯常规脱蜡至水,B、C组使用环保透明脱蜡液脱蜡至水。(2)按照Anti-Insulin/INS Antibody、兔IgG两步法免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒说明书进行免疫组化。(3)苏木素复染细胞核3~10 s,流水冲洗5~10 min,常规梯度乙醇脱水。(4)A组经二甲苯透明后用中性树脂封片,B、C组经环保透明脱蜡液透明后用环保封片胶封片,切片扫描仪扫描。

1.4.6 染色评价标准 ①HE染色及特殊染色评分标准:细胞结构清晰(3分)、核质对比分明(3分)、染色鲜艳(2分)、透明度良好(2分)。分值9~10分为优秀,7~8分为良好,≤6分为不合格。优良率=(优秀切片数+良好切片数)/总切片数×100%。②免疫组化非特异性染色率:镜下观察,以胰岛处出现棕褐色,非胰岛区域无棕褐色为阳性结果;以胰岛处出现棕褐色,非胰岛区域亦出现棕褐色为非特异性染色结果。非特异性染色率=非特异性染色切

片数/总切片数×100%。

## 1.5 统计学分析

数据采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,组间比较采用卡方检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 环保试剂对组织固定、包埋、切片质量的影响

A、B、C三组的组织经固定后均表现出良好的固定效果,组织质感较硬而富有弹性。组织经九州柏林组织固定液(无醛)固定后,色泽偏白。随后,组织统一进行常规脱水处理,脱水后组织硬度适中,易于后续包埋操作。透明后,组织呈透明状,无白色浑浊物质。切片时,大部分组织均容易切出4 μm切片,切片厚薄均匀,无皱褶,但个别组织偶有裂缝(表1)。

表1 三组试剂组织固定、包埋、切片质量比较

Table 1 Comparison of tissue fixation, embedding and sectioning quality among three groups

	A	B	C
Tissue morphology after fixation	Fixed well, with a hard and elastic texture; Color brown or gray white	Fixed well, with a hard and elastic texture; Color brown or gray white	Fixed well, with a hard and elastic organizational texture; The color is grayish white with a hint of whiteness
Transparency	The tissue is transparent without any white turbid substances	The tissue is transparent without any white turbid substances	The tissue is transparent without any white turbid substances
Embedding	Normal hardness, easy to embed	Normal hardness, easy to embed	Normal hardness, easy to embed
Paraffin section	Easy to cut 4 μm slices, uniform thickness, no wrinkles, occasional cracks in some tissues	Easy to cut 4 μm slices, uniform thickness, no wrinkles, occasional cracks in some tissues	Easy to cut 4 μm slices, uniform thickness, no wrinkles, occasional cracks in some tissues

A: traditional group; B: environmentally friendly reagent I group; C: environmentally friendly reagent II group.

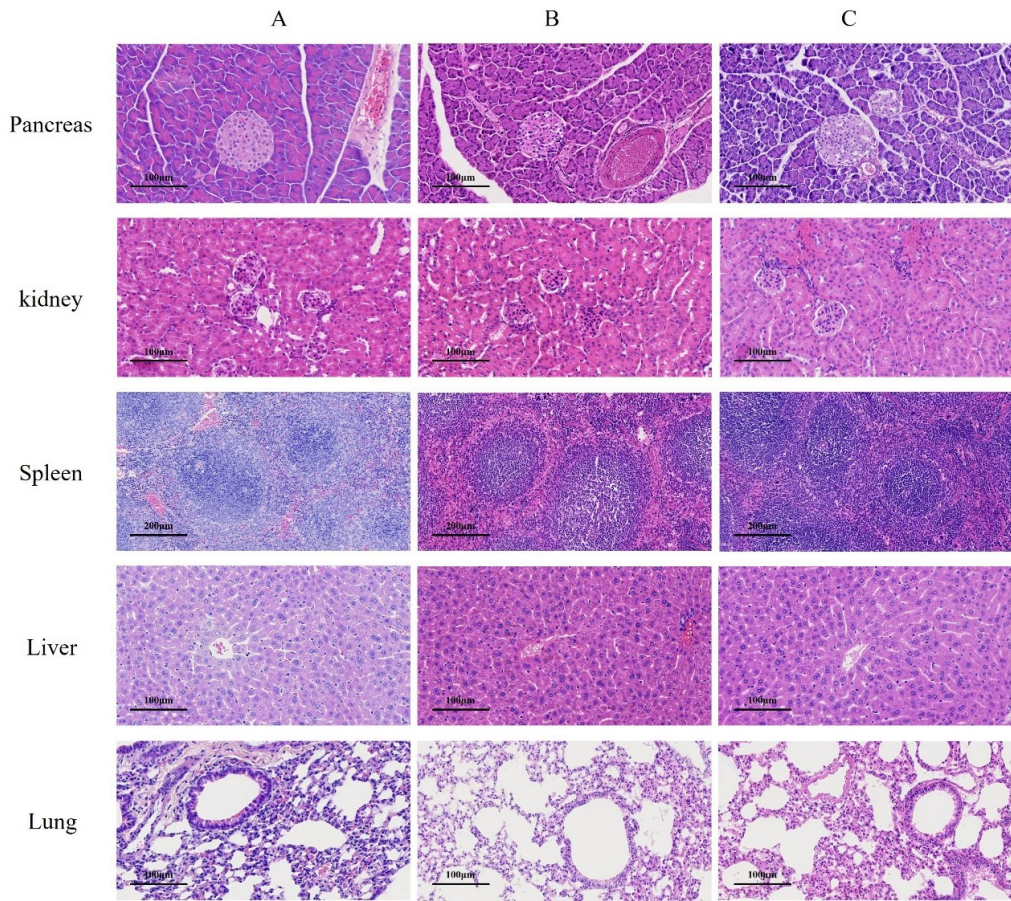
### 2.2 环保试剂与传统试剂HE染色结果对比

经HE染色后,三组小鼠组织的细胞核被染成蓝色,胞质被染成红色,结构均对比清晰、染色鲜艳、透明度好,充分显示出相应的组织细胞结构,达到优质HE切片的要求(图1)。HE染色质量评价结果显示,A、B、C三组试剂的HE染色优良率分别为98%、99%、97%,环保试剂组与传统组相比差异无统计学意义(A vs. B,  $\chi^2=0.338$ ,  $P=0.561$ ; A vs.

C,  $\chi^2=0.205$ ,  $P=0.651$ ;表2)。

### 2.3 环保试剂与传统试剂特殊染色结果对比

2.3.1 磷钨酸苏木素染色 A组和C组染色效果较佳,横纹肌的横纹呈深蓝色,胶原纤维呈棕红色,能较好地显示横纹肌和胶原纤维的结构,对比清晰、染色鲜艳、透明度好。B组的部分横纹肌蓝色过深偏黑,横纹结构不清晰,部分横纹肌偏红,染色不均,难以与胶原纤维区分(图2)。磷钨酸苏木素



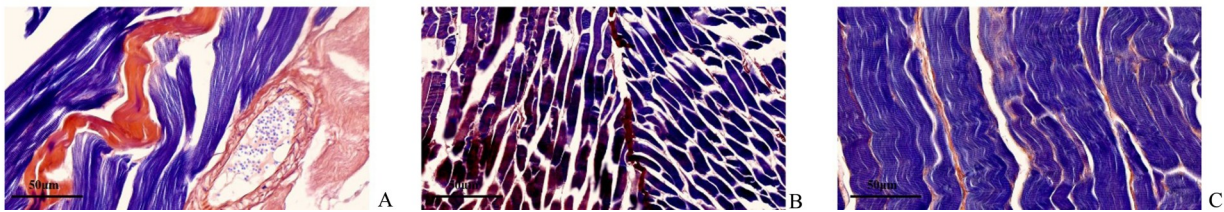
A: traditional group; B: environmentally friendly reagent I group; C: environmentally friendly reagent II group. Pancreas, kidney, liver, lung (magnification x200), spleen (magnification x100).

图1 小鼠组织HE染色结果

Fig.1 HE staining results of mouse tissues

染色质量评价结果显示, A、B、C三组试剂的HE染色优良率分别为100%、10%、95%, A组与B组试剂的优良率差异有统计学意义( $\chi^2=32.737, P<0.01$ ),

而A组与C组试剂的优良率差异无统计学意义( $\chi^2=1.026, P=0.311$ ;表2)。



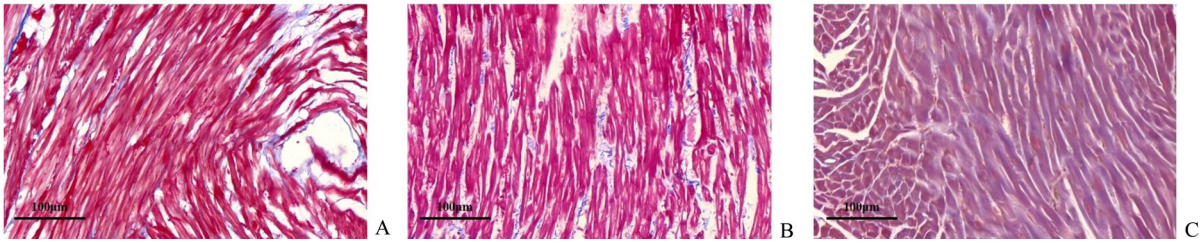
A: traditional group; B: environmentally friendly reagent I group; C: environmentally friendly reagent II group. Magnification x400.

图2 小鼠骨骼肌组织磷钨酸苏木素染色结果

Fig.2 Results of phosphotungstic acid-hematoxylin staining in mouse skeletal muscle tissue

2.3.2 Mallory 三色染色 A组和B组染色效果较佳,胶原纤维呈蓝色,肌纤维呈红色,细胞核呈橙红色,能较好地显示胶原纤维和肌纤维的结构,对比清晰、染色鲜艳、透明度好。C组染色效果不佳,整体较为模糊,对比不清晰(图3)。Mallory 三色染色

质量评价结果显示, A、B、C三组试剂的HE染色优良率分别为95%、90%、15%, A组与C组试剂的优良率差异有统计学意义( $\chi^2=25.859, P<0.01$ ), 而A组与B组试剂的优良率差异无统计学意义( $\chi^2=0.360, P=0.548$ ;表2)。



A: traditional group; B: environmentally friendly reagent I group; C: environmentally friendly reagent II group. Magnification  $\times 100$ .

图3 兔心肌组织 Mallory 三色染色结果

Fig.3 Mallory trichrome staining results of rabbit myocardial tissue

表2 三组试剂 HE 染色及特殊染色质量分析

Table 2 HE staining and special staining quality analysis among three groups

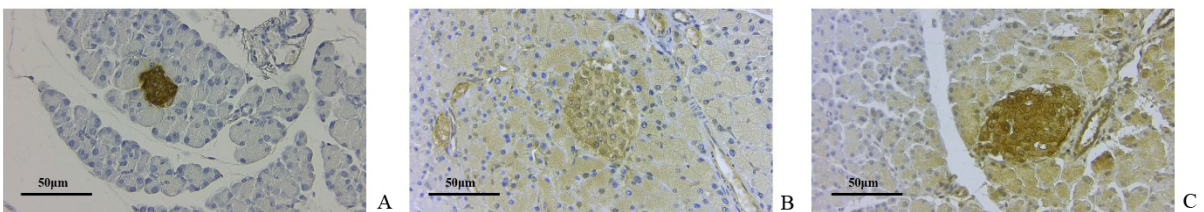
Staining method	HE staining			phosphotungstic acid-hematoxylin staining			Mallory trichrome staining		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Group	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Total number of slices	100	100	100	20	20	20	20	20	20
Excellent	91	90	94	18	0	15	16	14	0
Good	7	9	3	2	2	4	3	4	3
Unqualified	2	1	3	0	18	1	1	2	17
Excellent-and-good rate/%	98	99	97	100	10	95	95	90	15
$\chi^2$		0.338	0.205		32.727	1.026		0.360	25.859
<i>P</i> value		0.561	0.651		< 0.01	0.311		0.548	< 0.01

A: traditional group; B: environmentally friendly reagent I group; C: environmentally friendly reagent II group.

#### 2.4 环保试剂与传统试剂免疫组化结果及非特异性染色率分析

A组的胰岛细胞被染成棕褐色,而其他部位未被染成棕褐色,背景干净,无非特异性染色。而B组和C组的胰岛细胞及其周围区域均被染成棕褐

色或浅棕色,存在非特异性染色(图4)。A、B、C三组试剂的免疫组化非特异性染色率分别为5%、100%、100%,传统试剂与环保试剂的非特异性染色率差异有统计学意义(A vs. B,  $\chi^2=36.190, P<0.01$ ; A vs. C,  $\chi^2=36.190, P<0.01$ ;表3)。



A: traditional group; B: environmentally friendly reagent I group; C: environmentally friendly reagent II group. Magnification  $\times 400$ .

图4 兔胰腺组织免疫组化结果

Fig.4 Immunohistochemical results of rabbit pancreatic tissue

### 3 讨论

固定是制作石蜡切片的关键步骤,良好的固定液应具有较强的组织渗透力,适中的组织硬度,

良好的形态保存能力,染色后清晰的细胞组织结构展示能力。甲醛是应用最为广泛的固定液,然其对实验操作人员及学生的毒性问题不容忽视。传统上,二甲苯常被用于组织透明、石蜡切片脱蜡和透

表3 三组试剂免疫组化非特异性染色率分析  
Table 3 Analysis of non-specific staining rates in immunohistochemistry among three groups

Group	Total number of slices	Specific staining	Non-specific staining	Non-specific staining rate/%	$\chi^2$	<i>P</i>
A	20	19	1	5		
B	20	0	20	100	36.190	< 0.01
C	20	0	20	100	36.190	< 0.01

A: traditional group; B: environmentally friendly reagent I group; C: environmentally friendly reagent II group.

明以及中性树胶的溶剂。然而,二甲苯的危害远不止对神经系统、血液系统、呼吸系统及皮肤的损伤<sup>[5-7]</sup>, Mohammadzadeh 等<sup>[8]</sup>通过荟萃分析发现,二甲苯等苯系物直接或间接损害精子活力、DNA完整性和形态,进而对男性生殖功能产生不良影响。因此,寻找甲醛、二甲苯、中性树胶的替代品以改善实验教学质量,是重要的课程改革内容之一。

本研究发现,新型环保固定液在固定效果、包埋操作及切片质量等方面与甲醛相比无明显差异。经HE染色后,环保试剂I组(B组)和环保试剂II组(C组)的组织核质染色鲜艳、对比清晰,与传统组(A组)效果相当,能达到优质HE切片的要求。在特殊染色中,环保型试剂表现呈现差异性:磷钨酸苏木素染色中,C组的横纹肌和胶原纤维结构对比清晰、染色鲜艳,而B组存在蓝色过深偏黑,结构模糊,局部偏红,染色不均问题; Mallory三色染色中,B组能较好地显示胶原纤维和肌纤维的结构,而C组片子模糊、组织结构不清晰。特殊染色的结果提示,不同类型的环保型试剂(特别是固定液的种类)并不通用于所有特殊染色实验中,需进行相关测试选择适当的试剂组合或优化参数以达到最佳的染色效果。免疫组化结果显示,B组和C组均存在非特异性染色。总体而言,环保型试剂在HE染色中表现优异,能满足教学需求;在特殊染色,需针对性选择适配的试剂组合;而在免疫组化中,则需进一步优化实验条件。环保型试剂的使用,将显著减少传统有毒试剂在形态学实验室日常教学及制片中的使用,推动形态学实验室的绿色化转型。

在国外,科研人员早已开始探索低毒固定液作为甲醛的替代品。近年来,国内外也陆续有关于无醛固定液的研究报道<sup>[9-11]</sup>,然而,这些替代品种类繁多,且尚未得到大量应用检验。FineFIX是一款无醛水基浓缩固定液,工作液需用乙醇稀释。研究发

现,FineFIX固定液在维持核酸完整性上表现出一定优势,在组织化学染色、原位杂交等方面也可与甲醛固定液相媲美<sup>[12-14]</sup>。九州柏林组织固定液(无醛)以醇溶试剂为主,在胸水细胞、人体病理组织等多种组织固定中均有报道<sup>[15-17]</sup>。乙醇通过脱水作用间接促进细胞结构的稳定,但其硬化组织及导致核染色不良的缺点限制了单独使用。而FineFIX和九州柏林组织固定液(无醛)为醇类多元试剂,其低毒性添加剂配方克服了使用纯乙醇或乙醇基固定剂常见的缺点。此外,环保型脱蜡透明液(Servicebio)与石蜡相容性好,无色无味且挥发速率极低,在近年研究中多见应用<sup>[18-19]</sup>。环保型封片胶不含二甲苯等有害有机溶剂,以环保型的烷烃类化合物作为溶剂,与树胶比例加热溶解混匀而成,切片透明度高且不影响染色稳定性,已在临床病理中应用<sup>[20-21]</sup>。本研究中,B组(99%)和C组(97%)HE切片细胞结构清晰、染色鲜艳、核质对比分明、透明度良好,验证了环保试剂在HE染色中的可行性。

特殊染色作为HE染色的补充,是形态学实验教学 and 临床病理诊断的重要技术之一。DeJarnatt等<sup>[22]</sup>用犬类和猫类的睾丸、卵巢和子宫组织,对乙二醛和甲醛的固定效果进行了比较,发现乙二醛在胶体铁染色、网质纤维银染色、瑞氏染色和PAS染色等特殊染色中与甲醛效果相当。信芳杰等<sup>[23]</sup>和苗金红等<sup>[24]</sup>使用格林GS新型环保试剂系列进行特殊染色时,发现环保试剂在多种特殊染色中效果良好,能应用于病理诊断。本研究选取了磷钨酸苏木素染色和Mallory三色染色进行验证,发现两种方法均可筛选出适配的环保试剂组合,但同时也暴露出特定问题:B组在磷钨酸苏木素染色中出现的横纹肌染色过深,以及C组在Mallory三色染色中的结构模糊现象。以醇类为基础的固定液在特殊

染色上不具备普适性,可能与固定时间过长相关。本研究立足于实验教学,考虑到学生的课程安排故选取40 h的通用固定时间,后续可缩短环保固定液的固定时间、调整染色时间及温度等以改进染色效果。

在免疫组化上,以乙醇为基础的固定液的应用效果仍存在争议。部分研究<sup>[14, 25-26]</sup>证实FineFix固定液在HBME-1、CK19、细胞表面蛋白、细胞角蛋白和Er $\alpha$ 等抗体的检测中表现良好。但Hanley等<sup>[27]</sup>发现乙醇固定后的人乳腺癌细针穿刺细胞块中PR表达水平异常,HER2的阳性率也偏高。本研究中,针对小鼠胰腺组织的胰岛素免疫组化检测显示,FineFix组和九州柏林组在胰岛细胞周围甚至非胰岛区域存在大片非特异染色。为提高环保试剂在免疫组化上的普适性,除上文提到缩短固定时长,抗原修复强度可能也是需要调整的重要因素之一。尽管有研究将以醇类为基础的固定液和甲醛固定液的抗原修复条件等同化<sup>[26]</sup>,但乙醇对组织抗原的封闭作用较甲醛弱,抗原修复过度可能导致假阳性,有研究表明环保试剂是否需要进行抗原修复及修复方式与靶标相关<sup>[28]</sup>。此外,还可通过降低一抗的浓度、缩短一抗的孵育时间等以减少非特异染色。

本研究初步验证了环保型试剂在形态学实验教学中替代传统有毒试剂的可行性。在保证教学

质量的基础上,环保型试剂的使用不仅从源头上解决了传统试剂对实验技术人员、教师和学生的危害,还减少了对环境的污染。然而,环保型试剂在制片过程也存在一些问题,如环保型固定液使用过后的存放时间不如甲醛、多次固定后效果变差,环保型脱蜡透明液多次使用后的脱蜡效果不如二甲苯。因此,在使用环保型试剂时,需要定期观察固定液的颜色变化、玻片的脱蜡效果,通过加强试剂的更换频率、增加脱蜡液缸数等以保证制片效果。另外,经成本分析:环保型脱蜡透明液和二甲苯价格相当;环保封片胶的价格约为中性树胶的2倍,但因其用量少,单玻片成本不高;环保固定液的价格约为甲醛的7倍,但其可循环使用特性大幅降低了单组织块处理成本。更重要的是,传统试剂产生的废气和废液污染不仅需要持续投入通风设备升级和废液专业处理费用,更对实验人员健康构成潜在威胁。在国家大力推进碳中和目标、践行“双碳”战略的背景下,从源头控制实验室污染虽需承担更高的初始投入,却能有效减少后期污染治理成本,同步实现经济效益与生态效益的双重提升,这正是绿色实验室建设的核心价值所在。展望未来,我们计划将环保型固定液应用于实验教学中,并收集学生的评价及建议,持续优化实验教学条件,以为师生创造一个更加安全、健康、环保的实验环境。

#### 参考文献

- [1] Rueda-Esteban RJ, Camacho FD, Rodríguez C, et al. Viability and characterization trial of a novel method as an alternative to formaldehyde and Walter-Thiel cadaveric preservation for medical education and surgical simulation[J]. *Cir Esp (Engl Ed)*, 2022, 100(9): 573-579.
- [2] 李佳乐,李帆,尹楠,等.解剖病理实验室甲醛危害控制方法[J]. *职业卫生与应急救援*, 2023, 41(3): 389-392.  
Li JL, Li F, Yin N, et al. Control of formaldehyde hazards in anatomical pathology laboratories[J]. *Occup Health & Emerg Rescue*, 2023, 41(3): 389-392.
- [3] Thulluri SP, Selvaraj K, Yerraguntla DP, et al. A review of the protective effects of ferula asafoetida on the liver, kidney, and testes against formaldehyde-induced damage[J]. *Cureus*, 2025, 17(2): e79545.
- [4] Cammalleri V, Pocino RN, Marotta D, et al. Occupational scenarios and exposure assessment to formaldehyde: a systematic review[J]. *Indoor Air*, 2022, 32(1): e12949.
- [5] 田欣鑫,王丽东,王玥,等.低浓度苯和甲苯及二甲苯对工人生化和血常规的影响[J]. *工业卫生与职业病*, 2024, 50(3): 268-271.  
Tian XX, Wang LD, Wang Y, et al. The effects of low concentrations of benzene, toluene, and xylene on the biochemical and blood routine of workers[J]. *Ind Hlth & Occup Dis*, 2024, 50(3): 268-271.
- [6] Liao QL, Zhang Y, Ma R, et al. Risk assessment and dose-effect of co-exposure to benzene, toluene, ethylbenzene, xylene, and styrene (BTEXS) on pulmonary function: a cross-sectional study[J]. *Environ Pollut*, 2022, 310: 119894.
- [7] Fustinoni S, Campo L, Spinazzè A, et al. Exposure and management of the health risk for the use of formaldehyde and xylene in a large pathology laboratory[J]. *Ann Work Expo Health*, 2021, 65(7): 805-818.
- [8] Mohammadzadeh M, Khoshakhlagh AH, Calderón-Garcidueñas L, et al. Inhaled toxins: a threat to male

- reproductive health [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 286: 117178.
- [9] Skopnik-Chicago M, Poblete-Cordero K, Zamora N, et al. Comparison of haptic and biometric properties, bacterial load, and student perception of fixative solutions: formaldehyde versus chilean conservative fixative solution with and without formaldehyde in pig kidneys [J]. *Anat Sci Educ*, 2021, 14 (6): 836-846.
- [10] Ryska A, Sapino A, Landolfi S, et al. Glyoxal acid-free (GAF) histological fixative is a suitable alternative to formalin: results from an open-label comparative non-inferiority study [J]. *Virchows Arch*, 2024, 485 (2): 213-222.
- [11] 缪琛,贺骁,韩雪,等.比较两种固定液过度固定乳腺癌组织对FISH法检测HER2基因的影响[J].*临床与实验病理学杂志*,2024,40(3):323-325.
- Miao C, He X, Han X, et al. Comparison of the effects of two types of fixatives on over-fixed breast cancer tissues in detecting HER2 gene by FISH [J]. *J Clin Exp Pathol*, 2024, 40(3): 323-325.
- [12] Dotti I, Bonin S, Basili G, et al. Effects of formalin, methacarn, and FineFIX fixatives on RNA preservation [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2010, 19(2): 112-122.
- [13] Moelans CB, Oostenrijk D, Moons MJ, et al. Formaldehyde substitute fixatives: effects on nucleic acid preservation [J]. *J Clin Pathol*, 2011, 64(11): 960-967.
- [14] Aydin I, Yörükoglu K, Cingöz S, et al. The effect of the alternative solutions to formaldehyde and xylene on tissue processing [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2013, 56 (3): 221-230.
- [15] 赵栋梁,脱颖,康继辉.不同环保固定试剂在胸水细胞蜡块中的应用[J].*临床与实验病理学杂志*,2023,39(12): 1528-1530.
- Zhao DL, Tuo Y, Kang JH. Application of different environmentally friendly fixed reagents in pleural fluid cell wax blocks [J]. *J Clin Exp Pathol*, 2023, 39 (12): 1528-1530.
- [16] 朱卫东.新型病理环保系列试剂在病理常规技术中的应用[J].*临床与实验病理学杂志*,2016,32(6):713-714.
- Zhu WD. Application of new environmentally friendly pathological reagents in routine pathological techniques [J]. *J Clin Exp Pathol*, 2016, 32(6): 713-714.
- [17] 张立红,邹泽阳.新型环保试剂在常规HE制片中的应用[J].*诊断病理学杂志*,2022,29(1):86-88.
- Zhang LH, Zhou ZY. Application of new environmentally friendly reagents in conventional HE pathological section [J]. *J Diag Pathol*, 2022, 29(1): 86-88.
- [18] Liu CQ, Liu DX, Zheng X, et al. Munc13-4 mediates tumor immune evasion by regulating the sorting and secretion of PD-L1 via exosomes [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 9080.
- [19] Yan ZJ, Ye MS, Li JX, et al. Early transcriptional and cellular abnormalities in choroid plexus of a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2025, 20 (1): 62.
- [20] 高欢欢,林健贤,唐丽娟,等.环保试剂在眼组织病理技术中的应用[J].*眼科学报*,2026,41(2):114-122.
- Gao HH, Lin JX, Tang LJ, et al. Utilization of environmentally-sustainable reagents in ophthalmic pathology techniques [J]. *Eye Sci*, 2026, 41(2): 114-122.
- [21] 范玲丽.淋巴结组织切片的制作体会[J].*诊断病理学杂志*,2024,31(2):165-166.
- Fan LL. Experience in preparing lymph node tissue sections [J]. *J Diag Pathol*, 2024, 31(2): 165-166.
- [22] DeJarnatt V, Criswell SL. Glyoxal: a proposed substitute for formalin in H&E and special stains [J]. *J Histotechnol*, 2021, 44(1): 37-45.
- [23] 信芳杰,管静静,邵世宏,等.环保型GS试剂在特殊染色中的应用[J].*临床与实验病理学杂志*,2014,30(7):807-808.
- Xin FJ, Guan JJ, Shao SH, et al. The use of environmentally friendly GS reagents in special staining [J]. *J Clin Exp Pathol*, 2014, 30(7): 807-808.
- [24] 苗金红,田玉旺,朱红艳.GS环保试剂在特殊染色中的应用[J].*诊断病理学杂志*,2013,20(11):736.
- Miao JH, Tian YW, Zhu HY. Application of GS environmentally friendly reagents in special staining [J]. *J Diag Pathol*, 2013, 20(11): 736.
- [25] Lassalle S, Hofman V, Marius I, et al. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives [J]. *Thyroid*, 2009, 19(11): 1239-1248.
- [26] Nykänen M, Kuopio T. Protein and gene expression of estrogen receptor alpha and nuclear morphology of two breast cancer cell lines after different fixation methods [J]. *Exp Mol Pathol*, 2010, 88(2): 265-271.
- [27] Hanley KZ, Birdsong GG, Cohen C, et al. Immunohistochemical detection of estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 expression in breast carcinomas: comparison on cell block, needle-core, and tissue block preparations [J]. *Cancer*, 2009, 117 (4): 279-288.
- [28] Moelans CB, Ter Hoeve N, Van Ginkel JW, et al. Formaldehyde substitute fixatives. analysis of macroscopy, morphologic analysis, and immunohistochemical analysis [J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 136(4): 548-556.