

· 实验研究 ·

肾组织肌纤维、胶原纤维、肾小球基膜和细胞的组合染色法研究

Compound staining method for muscular and collagen fibers, basement membrane and cells of glomeruli in renal tissue

龚志锦, 朱明华, 郑建明, 林万和, 陶文照

(第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 探讨显示人体和实验动物肾组织中的肌纤维、胶原纤维、肾小球基膜和红细胞等成分的复合染色法。方法: 选用 Periodic acid-Schiff-O range G-Iodine green (高碘酸、雪夫、橙黄 G 和碘绿, 简称 PA-S-O-IG) 组合染色法, Sirius red-Picric acid-Iodine green (天狼星红、苦味酸和碘绿, 简称 SR-PA-IG) 组合染色法和改进的 Masson 组合染色法对肾组织中的多种成分进行染色。结果: PA-S-O-IG 法显示肾小球基膜黏多糖呈紫红色, 细胞核呈绿色, 红细胞呈黄色。SR-PA-IG 法显示肾小球基膜和囊壁纤维组织增生的胶原纤维呈红色, 细胞核呈淡绿色, 背景呈黄色。Masson 法显示肾小球和小管等胶原纤维呈绿色或蓝色, 红细胞呈橙红色, 血管和间质的平滑肌纤维呈红色。结论: 3 种组合染色方法, 克服了原法染色单一、对比效果差的缺点, 能够更好地显示肾组织中的血管和间质平滑肌纤维、肾小球基膜和囊的黏多糖, 细胞核和红细胞、肾小球和肾小管的胶原纤维和细胞核等成分, 为肾脏疾病形态学诊断和研究, 提供了较为理想的组合染色法。

[关键词] 组合染色法; 肾小球基膜; 胶原; 肌纤维; 细胞核; 红细胞

[中图分类号] R 692; R 361.2 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X (2004) 10-1133-03

* 在肾组织的形态学中, 为了更好地观察多种成分与变化情况, 选用 Periodic acid-Schiff-O range G-Iodine green (高碘酸、雪夫、橙黄 G 和碘绿, 简称 PA-S-O-IG) 组合染色法, Sirius red-Picric acid-Iodine green (天狼星红、苦味酸和碘绿, 简称 SR-PA-IG) 组合染色法和改进的 Masson 组合染色法, 能够较好地显示肾组织血管和间质平滑肌纤维、肾小球基膜与囊壁的黏多糖、细胞核和红细胞、肾小球和肾小管的胶原纤维和细胞核等成分, 对比清晰, 色彩鲜艳, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料来源 组织来源于本校实验动物中心和本室尸检与活检组织, 及时用 15% 中性甲醛固定液固定, 常规组织脱水、透明、浸蜡和包埋后组织切片 (3~4 μm)。

1.2 试剂配制

1.2.1 碘绿染色液 碘绿 (Iodine green, 由上海试剂公司进口供应站售) 0.5 g, 蒸馏水 100 ml

1.2.2 橙黄 G 磷钨酸染色液 橙黄 G (Orange G, 由上海试剂三厂生产) 1.5 g, 磷钨酸 (Phosphotungstic acid, 由上海试剂三厂生产) 4 g, 蒸馏水 95 ml

1.2.3 Schiff 试剂染色液 碱性复红 (Basic fuchsin, 由上海标本模型厂生产) 2.5 g, 重亚硫酸钠 (亚硫酸氢钠, Sodium metabisulfite, 由上海试剂四厂生产) 4 g, 1 mol/L 盐酸 (由苏州振兴化工厂生产) 50 ml, 重蒸馏水 500 ml。先将蒸馏水煮沸, 关掉火焰, 缓慢加入碱性复红, 再煮沸 1 min, 室温下冷却至 40℃ 加入盐酸, 待 30 min 时盛棕色试剂瓶内, 同时加入重亚硫酸钠摇匀, 24 h 后变为无色或带微黄色液体, 贮存于冰箱内, 可用多年。

1.2.4 丽春红酸性复红橙黄 G 染色液 丽春红 S (Ponceau

S, 由上海试剂三厂生产) 1 g, 酸性复红 (Acid fuchsin, 由上海标本模型厂生产) 0.5 g, 橙黄 G 0.5 g, 冰醋酸 (Acetic acid glacial, 由苏州振兴化工厂生产) 1 ml

1.2.5 亮绿醋酸染色液 亮绿 (Brilliant green, 由上海化学试剂公司售) 1 g, 蒸馏水 98 ml, 冰醋酸 1 ml

1.2.6 苯胺蓝醋酸染色液 苯胺蓝 (Aniline blue, 由上海标本模型厂生产) 1 g, 蒸馏水 98 ml, 冰醋酸 1 ml

1.2.7 磷钼酸水溶液 磷钼酸 (Phosphomolybdic acid, 由上海试剂公司售) 2 g, 蒸馏水 98 ml

1.2.8 Sirius red 苦味酸染色液 0.5% 天狼星红水溶液 (Sirius red, 由上海试剂公司进口供应站售) 10 ml, 苦味酸饱和水溶液 (1.22%) 90 ml

1.3 显示肾小球基膜、细胞核和红细胞的 PA-S-O-IG 组合染色法 石蜡组织切片 3 μm, 常规脱蜡至水, 蒸馏水洗 2 次, 0.5% 高碘酸水溶液氧化 10 min, 蒸馏水洗 3 次。Schiff 试剂染色 15 min, 浸入自来水 2 min, 蒸馏水洗 2 次。碘绿染色 1 min, 蒸馏水洗 2 次。橙黄 G 磷钨酸染色 30 s, 蒸馏水洗 2 次。无水乙醇脱水, 过滤纸吸干, 二甲苯透明和中性树胶封固。

1.4 显示肾小球基膜、囊壁和细胞的 SR-PA-IG 组合染色法 石蜡组织切片 4 μm, 常规脱蜡至水, 蒸馏水洗 2 次。碘绿染色 2 min, 蒸馏水洗 2 次。Sirius red 苦味酸染色 4 min, 无水乙醇脱水, 过滤纸吸干, 二甲苯透明和中性树胶封固。

1.5 显示肌纤维、胶原纤维和细胞的 Masson 组合改良染色法 石蜡组织切片 4 μm, 常规脱蜡至水, 蒸馏水洗 2 次。丽春红酸性复红橙黄 G 染色 5 min, 蒸馏水洗 2 次。磷钼酸水溶液分化 2 min (必要时在镜下观察肌纤维深红色, 其他成分淡红

* [作者简介] 龚志锦 (1949-), 男 (汉族), 高级实验师

色)。蒸馏水洗 2 次。直接入亮绿醋酸染色液或苯胺蓝醋酸染色 3 min 左右。0.5% 冰醋酸水溶液洗 2 次, 无水乙醇脱水, 过滤纸吸干, 二甲苯透明和中性树胶封固。

2 结果

通过对尸体解剖、实验动物和活检肾组织的组合染色, 已分别得到较好的染色效果。PAS-O-IG 组合染色法, 显示肾组织中的肾小球基膜和球囊壁等黏多糖呈紫红色, 细胞核呈绿色, 红细胞呈黄色(图 1)。SR-PA-IG 组合染色法, 显示肾组织中的肾小球基膜和球囊壁纤维组织增生的胶原纤维呈红色, 细胞核呈淡绿色, 背景呈黄色(图 2)。Masson 组合染色法, 显示肾组织中血管壁和间质的平滑肌纤维呈红色, 胶原纤维呈绿色, 红细胞呈橙红色(图 3A); 肾小球与肾小管的细胞核呈棕色, 红细胞呈橙红色, 肾小球基膜和囊壁等胶原纤维呈绿色和蓝色(图 3B、3C)。

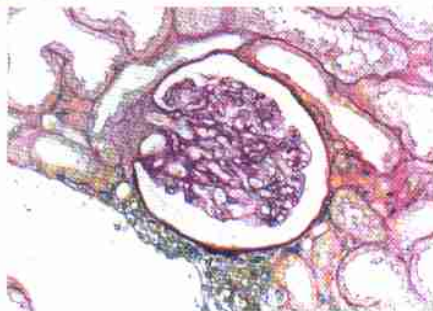


图 1 PAS-O-IG 组合染色肾小球基膜和球囊壁(×230) 黏多糖呈紫红色, 细胞核呈绿色, 红细胞呈黄色

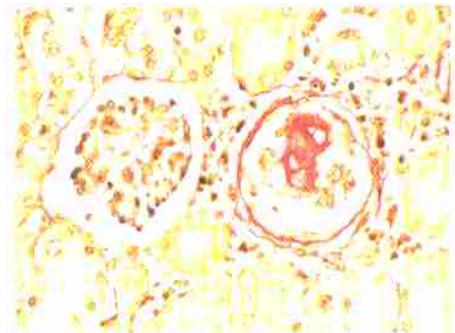


图 2 SR-PA-IG 组合染色肾小球和球囊壁(×230) 纤维组织增生的胶原纤维呈红色, 细胞核呈淡绿色, 背景呈黄色

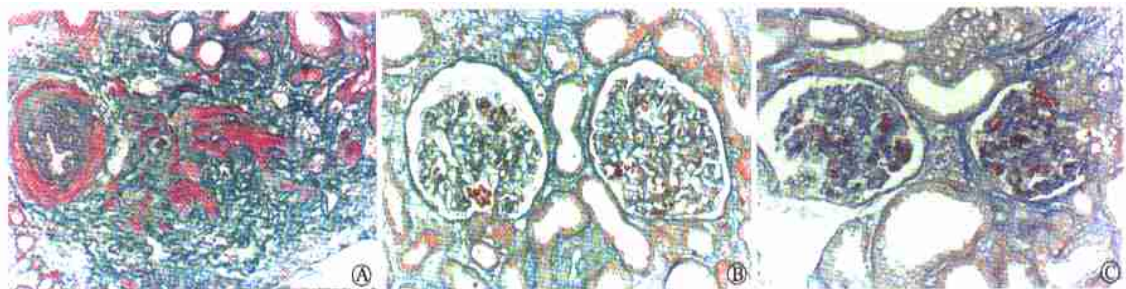


图 3 Masson 组合染色肾组织(×230) 血管壁和间质的平滑肌纤维呈红色, 胶原纤维呈绿色, 红细胞呈橙红色(A); 肾小球和肾小管细胞核呈棕色, 红细胞呈橙红色, 小球基膜和囊壁等胶原纤维呈绿色(B)和蓝色(C)

虽然能够显示肾小球基膜, 但是单一的对比染色效果比较差, 经过寻求理想碘绿碱性染料, 可直接溶于水后, 能够电离带正荷的助色团与细胞核中带负电荷的脱氧核糖核酸进行极性吸着, 使细胞核着色较快, 克服了传统的苏木精染色细胞核对比差的缺点, 为了证明红细胞成分和增强其他组织的色彩对比度, 再选用橙黄 G 染料^[3], 进行显色。这可能是红细胞中含有血红蛋白, 以碱式电离带有正电荷, 可被带负电的酸性染料阴离子结合反应^[4], 由于染色剂中的钨媒染作用, 能促使红细胞着色较快, 所以在染色中时间要短, 还能够较好地增强背景的色彩度。实验结果表明, 所进行的 PAS-O-IG 组合染

3 讨论

在人体与实验动物肾组织的特殊染色和组织细胞化学的应用中, 对肾小球等形态结构的多种成分染色要求较高, 为了更好地适应诊断和实验研究需要, 我们选用 PAS-O-IG 染色法, 能较好显示肾小球基膜、细胞核和红细胞的组织成分。肾小球基膜等组织细胞化学成分方面, 是由黏多糖和蛋白质构成, 含有氨基己糖和游离的己糖基, 不含有任何酸根或硫酸酯成分^[1]。易与多种染色和复合试剂进行结合。PAS-O-IG 中的过碘酸的充分氧化, 易将组织中所含糖分子的碳键打断, 游离的醛基与 Schiff 结合呈红色反应^[2]。所以氧化剂必须经常配制, 不能放置过久而影响氧化效果。Schiff 试剂的重亚硫酸钠不能用陈旧的, 防止含硫的成分挥发, 易失去反应效果。试剂贮存于冰箱内, 可分装部分小试剂瓶, 以便使用。

色, 使肾小球囊壁和基膜呈紫红色, 细胞核呈绿色, 红细胞呈橙黄色, 对比清晰, 是较为理想的组合染色方法。

为了证明肾小球组织胶原样改变, 通常选用原 Van Gieson 方法, 但是其显示胶原纤维成分不稳定, 色彩不鲜艳, 容易褪色, 特别是对于肾小球膜状结构的黏多糖和蛋白质, 在变成胶原蛋白的情况下, 需要有特异性较好的染料。胶原蛋白中含有一定的碱性氨基酸, 能够与酸性染料进行反应^[5]。经过对照实验后, 所选用的天狼星红与苦味酸混合液, 能够与胶原蛋白(纤维)牢固结合, 同时再选用碘绿碱性染料水溶液与细胞核进行对比染色, 这种 SR-PA-IG 组合染色

法,已较好地显示肾小球基膜和球囊壁的胶原纤维呈红色,细胞核呈淡绿色,背景呈黄色,可作为常用胶原纤维和细胞核的组合染色方法。

在显示肾组织的肌纤维、胶原纤维和细胞成分染色中,分别改进了Masson和Mallory的染色方法,更好显示胶原纤维和肌纤维的分布情况,选用苯胺蓝和亮绿对组织作用。苯胺蓝的相对分子质量为737.72,亮绿相对分子质量为792.72,由于分子量比较大,容易进入到疏松的结缔组织胶原纤维间隙。而混合液的丽春红S相对分子质量为480.42,酸性复红相对分子质量为585.53,橙黄G相对分子质量为452。由于小分子染料扩散性高,容易进入结构致密肌纤维和细胞中去^[6]。这些阴离子染料分子的大小和组织的渗透有密切关系。混合液染色后在冰醋酸和磷钼酸的分化作用下时间不能过长,应保持切片上带有一定的红色,使肌纤维着色较好,由于肾小球基膜和球囊壁等是一层高度含水性凝胶体的衬膜,具有渗透性,常与纤细的结缔组织纤维密切结合,能够与酸性染料苯胺蓝和亮绿染色剂分别进行亲和呈绿色和蓝色。醋酸分化后,直接用无水乙醇脱水,过滤纸吸干,二甲苯透明和中性树脂封固。不能将切片在空气中干燥时间过长或用热风吹干直接封固,易使组织细胞产生裂隙和黑色颗粒色

素^[7],而影响染色质量,在染色中要严格对照实验,按照诊断和研究目的,而选择应用试剂进行组合染色,使染色质量得到有效的控制。

[参考文献]

- [1] 龚志锦,詹懿洲.病理组织制片和染色技术[M].上海:上海科学技术出版社,1994.148-359.
 - [2] 刘介眉,严庆汉,路英杰,等.病理组织染色的理论方法和应用[M].北京:人民卫生出版社,1983.66-68.
 - [3] 北京化学试剂公司.化学试剂目录手册[M].北京:北京工业大学出版社,1993.532.
 - [4] 王伯坛,李玉松,黄高升,等.病理学技术[M].北京:人民卫生出版社,2000.51,119.
 - [5] 龚志锦,朱明华,郑建明,等.显示粘蛋白、弹力蛋白和胶原蛋白的复合染色法及其应用[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2003,11(4):504.
 - [6] 凌启波.实用病理特殊染色和组织化学技术[M].广州:广东高等教育出版社,1989.6-7.
 - [7] 龚志锦,张顺民,陈伟红.活检组织制片和染色的质量控制[J].中华国际医学杂志,2002,2(4):371-372.
- [收稿日期] 2004-02-03 [修回日期] 2004-07-18
[本文编辑] 李丹阳

· 临床研究 ·

不明原因消化道出血的数字减影血管造影分析

DSA for obscure gastrointestinal bleeding

李丹^{1,2}, 田建明¹

(1. 第二军医大学长海医院影像科, 上海 200433; 2. 湖北省宜昌市第一人民医院放射科, 宜昌 443000)

[摘要] 目的: 分析不明原因消化道出血的数字减影血管造影(DSA)检查结果及其临床意义。方法: 对118例不明原因消化道出血患者进行DSA检查,其中出血期检查21例,间歇期检查97例。4例胆道出血采用明胶海绵颗粒及弹簧钢圈栓塞。结果: 118例中检查阳性33例,其中有直接出血征象者12例(10.2%),血管畸形13例(11.0%),肿瘤8例(6.8%)。20例经手术病理证实。出血期检查阳性率52.4%(11/21),间歇期阳性率22.7%(22/97),两者有显著差异($P < 0.01$)。结论: DSA对不明原因消化道出血具有重要的诊断价值,血管畸形和肿瘤可能是不明原因消化道出血的主要原因。

[关键词] 消化道出血; 数字减影血管造影; 肿瘤; 血管畸形

[中图分类号] R 57 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2004)10-1135-03

* 消化道出血是临床工作中常见急症,内镜、钡餐造影等检查手段有时不能明确出血部位和原因。对于此类不明原因的消化道出血及时做数字减影血管造影(DSA)检查有着重要的临床意义。本文回顾性分析了长海医院影像科近年来118例不明原因消化道出血患者的DSA检查结果。

1 材料和方法

1.1 临床资料 1994年7月至2002年12月因消化道出血行DSA检查的患者118例,男性62例,女性56例,年龄

12~83岁,平均51.9岁。主要临床表现为黑便、血便以及呕血。初诊时因肝胆手术后“T”管引流出血4例,其余均经过胃镜、结肠镜检查未明确出血原因。118例患者分为出血期检查组21例,间歇期检查组97例。造影设备为GELCV/DLX或Philip Integris CV数字减影血管造影机,以每秒6幅采集图像,计12~15s;导管为5F Cobra导管或RH导管(Teru-

* [作者简介] 李丹(1968-),男(汉族),主治医师
Email: ychidan@tom.com