

大鼠胰腺组织神经胆碱酯酶、弹力纤维和胶原纤维的组合染色

张顺民*, 郑建明, 朱明华, 陈伟红
(第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 阐明大鼠胰腺组织中的神经胆碱酯酶与弹力纤维和胶原纤维等分布情况。**方法:** 将大鼠断头处死后取胰腺组织, 冰冻连续切片(厚度 8 μm), 选用 Karnovsky-Roots 和 Victoria blue-Ponceau-Picric acid(简称 K-R-VB-P-PA 法)组合染色法观察其中神经胆碱酯酶、弹力纤维和胶原纤维的分布情况。**结果:** 胰腺组织腺泡间隙、胰岛及其血管的神经胆碱酯酶呈棕红色, 弹力纤维呈蓝绿色, 胶原纤维呈淡红色, 平滑肌纤维呈黄色。**结论:** K-R-VB-P-PA 组合染色法, 能够同时观察到胰腺组织中的神经胆碱酯酶、弹力纤维、胶原纤维和平滑肌纤维的分布情况及其相互伴随关系。

[关键词] 神经组织; 胆碱酯酶类; 弹性蛋白; 胶原; 染色与标记

[中图分类号] R 361.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0901-02

A combined-staining method for neural cholinesterase and elastic and collagen fibers in rat pancreatic tissues

ZHANG Shun-min*, ZHENG Jian-ming, ZHU Ming-hua, CHEN Wei-hong (Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the distribution of neural cholinesterase and elastic and collagen fibers in rat pancreatic tissues. **Methods:** Rats were decapitated and the pancreatic tissues were harvested, frozen and made into 8 μm serial sections. A combined-staining method (K-R-VB-P-PA method, a combination of Karnovsky-Roots and Victoria blue-Ponceau-Picric acid) was used for staining and the distribution of neural cholinesterase and elastic and collagen fibers was observed. **Results:** The results showed that the neural cholinesterase was brown, the elastic fibers were cyan, the collagen fibers were light red, and the smooth muscle was yellow in the pancreatic acinar, islet of Langerhans and blood vessels. **Conclusion:** K-R-VB-P-PA combined staining method can demonstrate the distribution of neural cholinesterase, elastic and collagen fibers and smooth muscle fibers in the pancreatic tissues synchronously.

[KEY WORDS] nerve tissue; cholinesterases; elastin; collagen; staining and labeling

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(8): 901-902]

酶组织化学和特殊染色在人体和实验动物组织中应用较广, 为了研究大鼠组织中的胆碱酯酶与组织纤维分布及相互关系情况, 本研究选用针对酶与结缔组织纤维的 K-R-VB-P-PA (Karnovsky-Roots and Victoria blue-Ponceau-Picric acid) 组合染色法, 能够同时显示神经胆碱酯酶、弹力纤维和胶原纤维等组织成分, 现将情况报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 组织来源于 SD 大鼠(第二军医大学实验动物中心)胰腺组织, 将动物断头处死后取材, 采用冰冻连续切片 8 μm 厚度, 并及时将切片置于 4℃ 冰箱中冷藏保存。

1.2 试剂 硫酸铜液: 硫酸铜(copper sulfate)75 mg, 蒸馏水加至 10 ml。柠檬酸钠液: 柠檬酸钠(sodium citrate)194 mg, 蒸馏水加至 10 ml。铁氰化钾液: 铁氰化钾(potassium ferricyanide)16.5 mg, 蒸馏水加至 10 ml。Karnovsky-Roots(K-R)孵育液: 配制时先将碘化乙酰硫代胆碱(acetylthiocholine iodide)10 mg 溶解于 2 ml 蒸馏水内, 然后加入 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.5)13 ml, 最后再依次加入柠檬酸钠 1 ml, 硫酸铜液 2 ml, 铁氰化钾液 2 ml。临用前 30 min 内配制, 充分摇匀后测 pH 值为 5.5~5.6。甲醛钙液: 甲醛(formaldehyde)10 ml, 蒸馏水 90 ml, 无水氯化钙(calcium chloride, anhydrous)1 g。维多利

亚蓝(VB)改造染色液: 配制时将维多利亚蓝 2.5 g、糊精 1 g 和间苯二酚 5 g 与 400 ml 蒸馏水混合, 加热煮沸, 同时搅拌约 5 min。然后用另一容器将已配好的 30% 三氯化铁水溶液 30 ml 加热溶解后慢慢倒入上述混合液中, 继续煮沸 3 min, 不断搅拌, 可见溶液呈胶体状, 去火冷却后过滤。将滤纸上的残渣连同滤纸一起放在 60℃ 隔水式恒温箱中烤干, 其残渣为蓝色细颗粒状粉末。再将这些干燥染料溶于 500 ml 的 70% 乙醇中, 然后再加入浓盐酸 5 ml 和苯酚 6 g, 室温放置 1 周后使用。Ponceau-Picric acid 染色液: 0.5% 丽春红(Ponceau S)10 ml, 饱和苦味酸(picric acid)90 ml。

1.3 酶组织化学反应法 将已贴于载玻片的冰冻切片置于冷甲醛钙液固定 10 min。蒸馏水浸洗 2 次, 再加入恒温箱中的 K-R 孵育液 37℃ 作用 1.5~2 h, 可见呈淡棕红色, 必要时在镜下观察。如果未着色, 则用蒸馏水浸洗后, 再用 K-R 孵育液孵育 1 h 左右。将已反应好的组织片用蒸馏水浸洗 3 次。用甘油明胶封固剂^[1], 及时进行封固。

1.4 K-R-VB-P-PA 染色法 将已反应着色的组织切片用显微镜拍照后, 把切片浸入蒸馏水中浸泡 1 h 左右。用 70%

[作者简介] 张顺民, 主管技师。
* Corresponding author. E-mail: smzhang520@126.com

乙醇浸洗 2 次,置入立式染色缸 VB 改造染色液 2 h。浸入 95%乙醇中分色 1 min 左右,浸入自来水中浸洗,可在镜下观察深浅度。浸入蒸馏水中 1 min,用 P-PA 染色液 3 min。直接用无水乙醇脱水,过滤纸吸干。二甲苯透明和中性树胶封固。

2 结 果

大鼠胰腺组织冰冻切片经酶组织化学反应法处理后,清

楚显示血管旁神经胆碱酯酶呈棕红色,血管壁仅可见轮廓,背景无色(图 1A);经 VB 改造液复染后,血管壁弹力纤维呈蓝绿色,平滑肌纤维呈黄色,神经胆碱酯酶呈棕红色(图 1B);胰腺腺泡神经节周围胆碱酯酶呈红色,另所见两处血管壁弹力纤维蓝绿色,周围附着的神胆碱酯酶呈棕红色(图 1C);胰岛内分泌细胞间隙中含有丰富的神经胆碱酯酶呈棕红色,并在一处可见弹力纤维呈蓝绿色,胰岛周围含有胶原纤维呈淡红色,背景呈黄色(图 1D)。

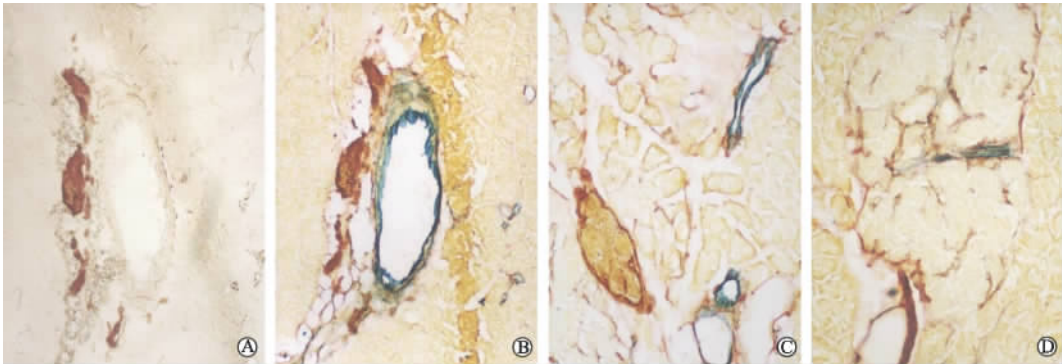


图 1 K-R-VB-P-PA 法显示神经胆碱酯酶、弹力纤维和胶原纤维

Fig 1 Neurocholinesterase and elastin and collagen after K-R-VB-P-PA staining

A: The neurocholinesterase was brown-red around the blood vessels(3.3×10);B: Elastin was blue-green, smooth muscle was yellow, and neurocholinesterase was brown-red(3.3×10);C: Neurocholinesterase was red, elastin was blue-green, and neurohistocase was brown-red(3.3×10);D: Nerocholinesterase was brown-red, elastin was blue-green, and collagen around islet was pink with yellow background (3.3×40)

3 讨 论

胆碱酯酶(cholinesterase)属于特异性酯酶,也是神经系统中的羧基酯酶,常见于肌肉和胰腺等组织中,为了能够在组织形态上观察到胆碱酯酶与结缔组织纤维的分布与相互关系,本研究进行了复合染色研究。胆碱酯酶的化学反应主要是碘化乙酰硫代胆碱释放出硫代胆碱和乙酸。硫代胆碱中的巯基(-SH)把铁氰化钾还原为亚铁氰化钾,再与硫酸铜离子结合形成不溶性的亚铁氰化铜沉淀物质^[2]。这种胆碱酯酶在胰腺和肌肉组织中可见分布,胰腺组织的腺泡中未见酶的活性,但在腺泡周围的间隙和胰岛中含有丰富的胆碱酯酶,特别是在大血管旁周围和小血管壁上附着酶的沉淀物。

同时在血管中含有大量的弹力纤维,其组织化学成分属于弹力蛋白,它是由随机交联盘绕的一些肽链组成的蛋白弹力结构模型^[3]。对于显示弹力蛋白传统方法有多种,但都未能得到满意的效果。VB 染色液与其他染色试剂的机制相似,VB 改造染色液可能含有一种带有弱电荷的染色剂,能与结缔组织表面致密的弹力蛋白通过非极性吸着而牢固的结合^[4](这种染色液浸染后再回收可反复使用,室温下保存数年染色效果不减,还可以缩短染色时间,提高对组织的敏感性,优于其他染色剂,是理想的弹力蛋白染色液)。但是这种结合并不能显示血管壁中的肌纤维成分,因此还需要另一种可靠的色彩对比染色剂。可靠的染色液的选择有一定的困难,要求其保持胆碱酯酶神经纤维和弹力纤维不受任何影响,还能够提高染色的对比强度。

经过反复实验,本研究选用丽春红与苦味酸混合液,能

够较好地显示肌纤维和胶原纤维成分,其机制是在胶原纤维分子中含有的碱性氨基酸能够与酸性染料进行结合^[5],也可能是苦味酸作为小分子染料(相对分子质量 229.1)扩散性高,容易进入结构致密的狭孔(如肌纤维)的间隙,扩散性低的丽春红分子染料(相对分子质量 566.49)则只能进入结缔疏松的宽孔组织(如胶原纤维)的间隙,而且染色后不易褪色。在本法使用中为了保持胆碱酯酶神经纤维的彩色度应缩短染色时间,使肌纤维对比清晰。复合染色法能够同时在组织中显示弹力纤维(呈蓝色)、肌纤维或背景(呈黄色)、神经纤维的胆碱酯酶(呈棕红色),这为人体与实验动物的形态组织结构研究提供了参考方法。

[参 考 文 献]

[1] 龚志锦,詹谔洲. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 37-38.

[2] 凌启波. 实用病理特殊染色和组化技术[M]. 广东: 广东高等教育出版社, 1989: 292.

[3] 龚志锦, 朱明华, 郑建明, 等. Ziehl-Neelsen-维多利亚蓝-碘绿复合染色法显示抗酸杆菌[J]. 北京大学学报(医学版), 2003, 35: 85-86.

[4] 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, 2002, 11: 504-505.

[5] 龚志锦, 朱明华, 郑建明, 等. 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[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25: 1133-1135.