

# 皮肤组织黑素细胞与胶原和弹力纤维的组合染色法研究

张顺民, 龚志锦, 陈伟红, 郑建明, 高 莉

(第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**寻找能显示皮肤组织黑素细胞与胶原纤维和弹力纤维的染色法。**方法:**选用 Masson Fontana silver nitrate-Ponceau S-Picric acid-Victoria blue(Masson Fontana 硝酸银、丽春红 S、苦味酸和维多利亚蓝,简称 MFSN-P-PA-VB)对实验动物皮肤组织进行组合染色。**结果:**皮肤黑素细胞颗粒呈黑色;胶原纤维呈红色,出血的红细胞呈黄色;弹力纤维呈绿色。**结论:**本组合染色方法克服了原法染色单一、对比效果较差的弱点。能够较好的显示皮肤组织中含有黑素细胞颗粒、胶原纤维及出血部位的红细胞和弹力纤维组织成分。

**[关键词]** 组合染色法;皮肤;黑素细胞;胶原纤维;弹力纤维

**[中图分类号]** R 446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0670-02

## A compound staining method showing collagenic, elastic fibers and melanocyte in skin tissues

ZHANG Shun-min, GONG Zhi-jin, CHEN Wei-hong, ZHENG Jian-ming, GAO Li(Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To develop a compound staining method showing collagenic, elastic fibers and melanocyte in skin tissues. **Methods:** A staining method combining Masson Fontana silver nitrate, Ponceau S, Picric acid and Victoria blue (MFSN-P-PA-VB) was used in the present animal skin experimental. **Results:** The melanin granule was black in the skin melanocyte, collagenic fibers were red, the red blood cells at hemorrhagic focus were yellow, and the elastic fibers were green by this MFSN-P-PA-VB staining method. **Conclusion:** This compound staining method has multicolor and fine contrast, and can better show melanins, the red blood cells at hemorrhagic focus, and collagenic and elastic fibers.

**[KEY WORDS]** compound staining method; skin; melanocyte; collagenic fiber; elastic fiber

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6): 670-671]

皮肤组织中的黑素细胞在正常情况下,分布于表皮的基础层细胞之间,也可见于表层或真皮层内。常规染色中的细胞着色较浅,难以鉴别。为了能够较好证明黑素细胞、胶原纤维和弹力纤维分布与变化的相互关系,本研究采用 Masson Fontana silver nitrate(硝酸银)-Ponceau S-Picric acid(丽春红-苦味酸)-Victoria blue(维多利亚蓝)(简称 MFSN-P-PA-VB 组合染色法),能够分别显示黑素细胞颗粒(呈黑色)、弹力纤维(呈绿色)和胶原纤维(呈红色),对比清晰,色彩鲜艳,现报告如下。

### 1 材料和方法

1.1 取材 实验动物大鼠来源于长海医院动物中心的整形外科动物皮肤模型组织,皮肤组织经中性甲醛磷酸盐缓冲液固定液<sup>[1]</sup>及时固定后取材,常规的梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡浸透和组织包埋与连续切片。

1.2 试剂配制 (1)Fontana 氨银染色液:10%硝酸银水溶液 50 ml,逐滴加浓氨水不停的摇动,至沉淀消失呈微乳白色,再加入蒸馏水 50 ml。此液贮存于棕色瓶内,在冰箱内保存可用 6 个月。(2)维多利亚蓝混合染色液:维多利亚蓝(Victoria blue)2 g,糊精 0.5 g,间苯二酚 4 g,蒸馏水 200 ml。将上述物质混合后加热煮沸,边煮边搅拌,约 5 min。然后,

用另一容器取 30%三氯化铁水溶液 25 ml,另行加热煮沸后慢慢倒入上述混合液中,继续煮沸 3 min,不断搅拌溶液呈胶体状。去火冷却过滤,将滤纸上的残渣连同滤纸放在 60℃恒温箱中烤干。残渣呈深蓝色细颗粒状粉末,再溶于 400 ml 的 70%乙醇液中。然后加浓盐酸 4 ml 和苯酚 5 g,放置至成熟后使用。(3)丽春红-苦味酸染色液:0.5%丽春红 S(Ponceau S,上海试剂三厂出品)15 ml,苦味酸(picric acid)饱和水溶液(1.22%)85 ml。(4)氯化金染色液:氯化金 1 g,蒸馏水 500 ml。

1.3 染色方法 (1)石蜡组织切片 4 μm,常规脱蜡至水。(2)蒸馏水浸洗 2 次,浸入 Fontana 氨银染色液中 15 h 左右。(3)蒸馏水浸洗 2 min,浸入氯化金溶液 2 min。(4)蒸馏水浸洗 2 次,70%乙醇浸洗 1 min。(5)浸入维多利亚蓝混合染色液 3 h 左右。95%乙醇分化 30 s 左右。(6)浸入蒸馏水内 2 min,然后再浸入丽春红-苦味酸染色液 5 min。(7)直接用无水乙醇脱水、二甲苯透明和中性树胶封固。

### 2 结果

实验动物组织的表层含有散在的黑素细胞颗粒呈黑色,

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

真皮中含有丰富的胶原纤维呈红色,出血的红细胞呈黄色和少量的黑色;真皮的上部分中含有胶原纤维,少量的弹力纤维呈绿色,真皮的下部分中有较多的出血红细胞和散在的胶原纤维及少量的黑素;真皮乳头层所伸出乳头隆起基部含有丰富的黑素细胞颗粒,网状层中含有胶原和弹力纤维;真皮乳头层中含有丰富的黑素细胞颗粒,网状层中含有丰富的胶原纤维和弹力纤维成分。见图1。

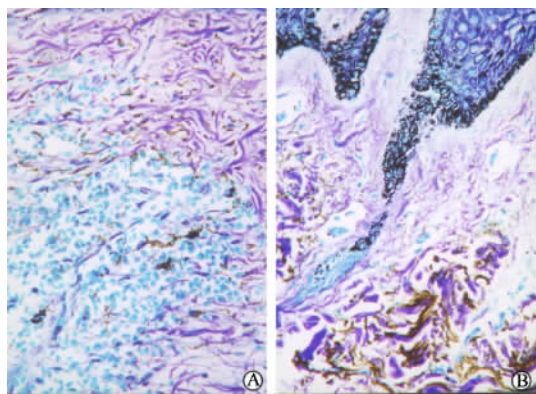


图1 MFSN-P-PA-VB法显示皮肤组织黑素细胞与胶原纤维和弹力纤维(3.3×20)

Fig 1 MFSN-P-PA-VB staining showing melanocyte and collagenic, elastic fibers in skin tissues(3.3×20)

A: Collagenic fibers are red and the elastic fibers are green; in the upper dermis, the red blood cells in hemorrhagic focus are yellow; a few melanocytes are black in the lower dermis; B: Abundant melanin granules are black in the melanocytes of dermis papilla; the collagenic fiber is red and the elastic fiber is green

### 3 讨论

黑素细胞的特点是胞质中有许多椭圆形的黑素小体,其黑素的量增多时候,就形成了黑素颗粒。在实验动物皮肤组织的黑素与结缔组织相互关系研究中,能够观察到黑素有明显的不同分布与变化异常,特别是含有大量灶性红细胞和结缔组织纤维增生情况。在内源性色素沉着物中,黑素细胞与其他色素有一定的相似性,常规染色中呈黄棕色和褐色,其颗粒形状大小不一,在变化不规则情况下,易与含铁血黄素和脂褐色素相混淆。必要时采用色素对照染色法,来鉴别黑素存在情况。而选用氨银染色液对黑素具有一定的敏感性,因为黑素细胞具有一定的还原性,能将硝酸银与氢氧化铵生成的氢氧化银离子还原成金属银而呈黑色<sup>[2]</sup>,而且着色的特异性较好,但是在操作程序上要求严格。在配制氨银液时,器皿要特别清洁,溶剂选用重蒸馏水,硝酸银和氢氧化铵

为分析纯。配好的溶液盛棕色瓶,贮存于冰箱内保存,使用时倒入方形或立式染色缸中染色。为了防止氨挥发,再将此液放到磨口的染色缸内进行染色。这样可使染色液反复应用多次,并保持较好的染色效果。对于皮肤组织的固定液,应选用中性甲醛磷酸盐缓冲固定液,能够提高固定效果。固定时不能在温度较高情况下进行,时间不宜太长,防止甲醛液产生白色沉淀而形成三聚甲醛后氧化成甲酸,变成甲醛色素,污染组织,影响染色质量。

在正常的皮肤真皮组织中,含有较多的结缔组织,但并没有区分何种纤维成分。为了观察实验动物模型的皮肤组织中的黑素细胞与胶原和弹力纤维的分布和变化情况,需要理想的胶原和弹力纤维染色法,根据染色机制,首先选用敏感性较好的染色剂对弹力纤维作用,由于这种纤维成分中含有20%~25%是弹性蛋白,还认为是一种凝胶,由随机交联盘绕的肽键组成,所以又被称为弹性蛋白<sup>[3]</sup>。这种蛋白易与Victoria blue混合染色液进行结合,因为试剂中含有间苯二酚、三氯化铁和盐酸等成分,而形成色淀的复合物,可能含有一种带弱电荷的染色剂与结缔组织致密内表面的弹性蛋白,并通过非极性吸着而显色。实验表明对于还原后金属银的黑素是比较牢固与稳定,经过弹力纤维染色液的作用,黑素是不受任何影响。

虽然结缔组织中的弹力纤维被显示,但还不能从中区分胶原纤维成分,这样就必须寻求对比较好的胶原纤维的染色剂。尽管胶原纤维能够与多种染料进行结合,但色差和效果是不一样的,由于Van Grieson酸性复红原法不稳定,使着色的胶原纤维不鲜艳,并且易褪色。经过选用Ponceau S Picric acid试剂后,提高了胶原纤维的着色力,同时,还增强与弹力纤维和黑素细胞颗粒及其背景的对比度。

实验证明所建立的复合染色法,能够较好的同时显示黑素细胞与胶原纤维和弹力纤维成分,这对于进一步研究组织细胞的形态变化与相互关系,具有一定的实用参考意义。

### [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,1994:10.
- [2] 凌启波. 实用病理特殊染色和组化技术[M]. 广州:广东高等教育出版社,1989:95.
- [3] 王伯云,李玉松,黄高昇,等. 病理学技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:146.
- [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.

[收稿日期] 2005-11-25

[修回日期] 2006-04-26

[本文编辑] 曹静