

实验动物组织血管铁质反应与胶原、弹性纤维和肌纤维的组合染色法

张顺民 郑建明 陈伟红 王 洋 高 莉
(第二军医大学附属长海医院病理科 上海 200433)

摘要: 在进行实验动物组织染色反应中, 为了证明血管铁质物质与胶原、弹性纤维和肌纤维的分布情况, 选用丽春红 S 苦味酸 (Ponceau S picric acid)、间苯二酚碱性复红 (Resorein basic fuchsin) 与 Perls 铁法 (简称 P-PA-R-BF-P 法), 对大鼠组织进行组合染色, 能够较好显示组织血管中铁质物质与胶原、弹性纤维和肌纤维, 铁质物质呈蓝色, 胶原纤维呈红色, 弹性纤维呈棕色, 肌纤维呈黄色。这是一种相互对比清晰的组合染色方法。

关键词: 铁质物质; 胶原弹性纤维; 肌纤维; 组合染色法

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250 3263(2009)04-78 04

A Compound Staining of the Collagen, Elastic and Muscular Fibers and Iron in the Blood Vessel

ZHANG Shun Min ZHENG Jian Ming CHEN Wei-Hong WANG Yang GAO Li
(Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: A compound staining method composed of the Ponceau S picric acid, Resorein basic fuchsin and Perls stainings was used to show the distribution of collagen, elastic and muscular fibers and iron in the blood vessel. It was found that the compound staining displayed the red collagen, brown elastic and yellow muscular fibers, as well as green iron. The compound staining method could clearly identify different fibers in the blood vessels.

Key words: Iron; Collagen; Elastic fiber; Muscular fiber; Compound staining

为了显示血管内所含有的铁质物质与管壁胶原、弹性纤维和肌纤维的分布情况。经过反复实验后, 选用丽春红 S 苦味酸 (Ponceau S picric acid)、间苯二酚碱性复红 (resorein basic fuchsin) 与 Perls 铁法 (P-PA-R-BF-P 法) 组合染色, 能够同时观察到多种组织结构成分与铁质存在的相互关系, 得到了较好的染色效果。

1 材料与方法

1.1 材料 取实验动物大鼠的肝、肺组织, 选用 15% 中性甲醛固定液以提高组织的渗透能力^[1], 解剖的动物组织经过充分固定, 再进行及时取材固定 24 h 后, 常规梯度乙醇脱水、二甲

苯透明和石蜡浸透, 进行组织包埋与切片。

1.2 试剂配制

1.2.1 丽春红苦味酸染色液 0.5% 丽春红 S (上海试剂三厂) 水溶液 12 ml; 苦味酸 (广东台山粤桥化工厂) 饱和水溶液 88 ml。

1.2.2 间苯二酚碱性复红染色液 间苯二酚 (上海化学试剂公司) 4 g, 碱性复红 (上海化学试剂公司) 2 g, 30% 三氧化铁 (ferric chloride, 金山化工厂) 5 ml, 盐酸 5 ml, 蒸馏水 500 ml。先

第一作者介绍 张顺民, 男, 主管技师; 研究方向: 组织细胞化学; E-mail: smzhang520@126.com

收稿日期: 2008-10-20, 修回日期: 2009-05-15

将碱性复红溶于蒸馏水后, 加入间苯二酚搅拌均匀, 经加热煮沸后, 再加入三氯化铁搅拌煮沸 5 min。室温冷却, 将过滤纸上的沉淀一起放在隔水式恒温箱中 58~60℃ 烤干, 然后将干燥的沉淀物放置试剂瓶内, 加入 95% 乙醇 300 ml 进行充分溶解后, 再加入 5 ml 盐酸。室温保存备用。

1.2.3 Perls 铁法染色液 5% 亚铁氰化钾 (potassium ferrocyanide, 上海化学试剂公司) 20 ml, 5% 盐酸 20 ml, 临时等量配制混合液即用。

1.3 染色方法 石蜡组织连续切片 (4 μm), 常规脱蜡至水。蒸馏水浸洗 2 次, 浸入立式染色缸中的 Perls 铁法染色液 15 min。蒸馏水浸洗 2 次, 浸入间苯二酚碱性复红染色液中 30 min。95% 乙醇分色 10 s, 浸入自来水中 30 s, 蒸馏水浸洗 2 次。丽春红苦味酸染色液 5 min, 无水乙醇快速脱水。滤纸吸干, 二甲苯透明和中性树胶封固。

2 结果与讨论

肝组织血管周围含有分布较多的铁质物质呈蓝色, 胶原纤维呈红色 (图版 I: 1)。肺组织血管内铁质物质呈蓝色, 红细胞呈黄色, 管壁的肌纤维呈黄色, 胶原纤维呈红色 (图版 I: 2)。肺组织小血管中间部位含有铁质物质呈蓝色, 另一端伴血栓形成物质呈黄色, 管壁的弹性纤维呈棕色, 胶原纤维呈红色 (图版 I: 3)。肺组织动脉血管中含有铁质物质呈蓝色, 红细胞呈黄色, 管壁的弹性纤维呈棕色, 肌纤维呈黄色, 胶原纤维呈红色 (图版 I: 4)。

在进行实验动物大鼠铁质物质的实验性研究中, 为了能够证明铁质在不同组织中的分布情况, 选用 P-PA-R-BF-P 法发现, 铁质不但沉积于细胞内和组织间隙中, 还能沉积于血管腔内, 这尚少见, 这就需要探讨血管不同组织纤维和铁质的相互关系。经过多种染色剂实验, 发现选用 P-PA-R-BF-P 法对血管不同纤维成分有较强的对比性, 而且还对管腔中的铁质有较强的增色作用。实验结果已能够在显微镜下同时观察到血管中含有铁质物质与血管壁的多种组织

纤维结构成分。

铁质物质是由小肠吸收, 并输送到骨髓进行储存的铁蛋白络合物, 在正常骨髓和脾中含有铁的成分, 可被化学试剂反应为三价铁离子。这种血红蛋白源性色素, 在组织中含量较多的情况下, 经过常规 H. E 染色, 可见到大小不等的颗粒呈棕黄色或金黄色, 所以被称为含铁血黄素。在疾病变化和长期异常大量铁质进入机体的情况下, 由于红细胞释放出血红蛋白分解产物, 其主要成分为氢氧化铁和铁蛋白的络合物, 可沉积于各种不同的组织内。而铁蛋白分子中含有高铁盐 (Fe^{3+}), 经用亚铁氰化钾与盐酸混合试剂作用后即可产生蓝色, 被称为普鲁士蓝反应^[2]。这种组化反应法的要求较高, 对于较多的实验动物大鼠模型组织, 需要及时制作组织切片, 因为铁质易溶于酸, 防止在甲醛固定时间较长, 特别是温度较高的情况下, 甲醛易氧化成甲酸, 使铁质成分被溶解丢失^[3]。要注意配制 Perls 铁法染色液的器皿要清洁, 溶剂需用重蒸水, 防止铁离子与组织内的钙盐结合产生假阳性反应, 染色时间不能过长, 否则易使背景加深, 影响对比度。

为了能够可靠显示铁质物质与血管的不同组织纤维而进行组合染色, 在保持铁质成分不受任何影响下, 选用不同的染色试剂对血管的弹性纤维、胶原纤维和肌纤维的作用。血管壁的弹性纤维由糖蛋白构成, 是一种不溶性的蛋白质, 可被认为是一种凝胶, 由随机交联盘绕的一些肽键组成, 所以又称弹性蛋白^[4], 这种蛋白易与间苯二酚、碱性复红、三氯化铁和盐酸作用, 可形成复合物, 使结合后的弹性纤维着色。从染色程序上对反应的含铁物质无干扰作用, 但对比色彩较差, 这样就必须选用对比度较好的染色剂来区别胶原纤维与肌纤维成分。由于胶原纤维是由纤维母细胞组成, 以糖蛋白合成的形式, 转变为糖蛋白物质。平滑肌纤维也是肌原纤维组成的含糖物质, 均可被不同的酸性染料着色。这可能与组织纤维密度及纤维含糖物质成分的多少与染色剂分子量大小和发色团的亲和力有密切联系。因此选用丽春红 S 与苦

味酸染色剂相互混合后而分别着色。这可能由于苦味酸染色剂分子量较小(229.1),扩散性较高,容易进入结构致密的肌纤维狭孔间隙中,而丽春红分子量较大(556.49),扩散性较低,容易进入疏松结构组织的胶原纤维间隙^[5]。上述染料能够牢固的结合,同时切片存放时间较长,还具有不褪色的优点,是一种较好的对比染色方法。

经过组合染色法,能够同时观察到血管腔中含有的铁物质和红细胞成分。这就充分表明铁质物质不但存在于细胞内与组织间隙中,而且存在于不同大小的血管内,并可见小血管腔内伴有血栓形成,则另一端沉积较多的铁质物质。血管组织中含有弹性纤维与肌纤维,管壁

周围分布较多的胶原纤维成分。这为组织铁质代谢程度定位与血管的相互关系研究提供了组合染色方法。

参 考 文 献

- [1] 龚志锦,胡凤仙,郑建明等.制作尸体解剖组织制片的质量控制.解剖学杂志,2000,23(6):584.
- [2] 凌启波编著.实用病理特殊染色和组化技术.广州:广东高等教育出版社,1989,97.
- [3] 龚志锦,詹洲编著.病理组织制片和染色技术.上海:上海科学技术出版社,1994,177.
- [4] 皮尔斯 A C E 著.组织化学理论和实用(卷二)分析技术.北京:中国医学科技出版社,1990,117.
- [5] 王伯,李玉松,黄高等.病理学技术.北京:人民卫生出版社,2000,144.

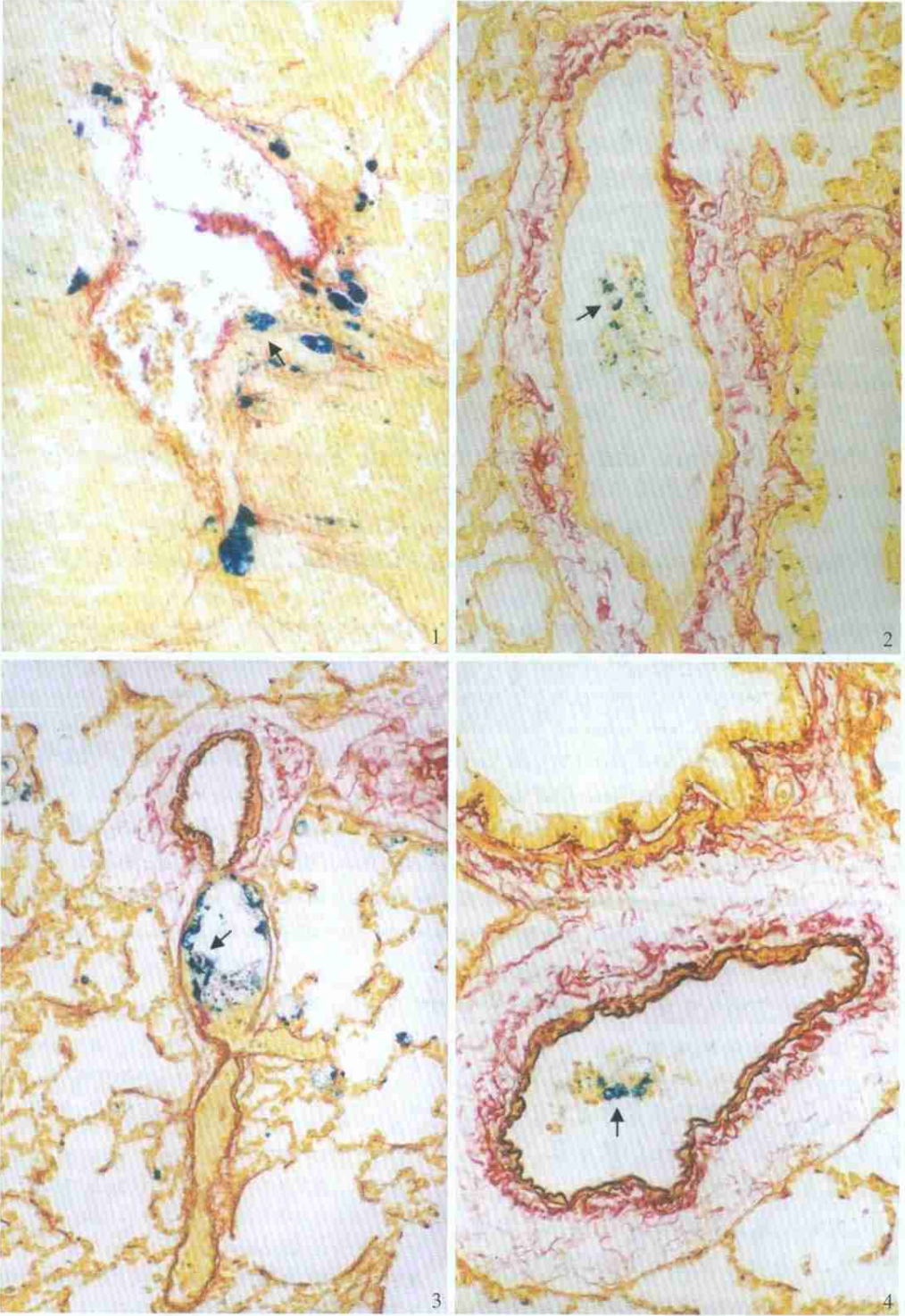
图 版 说 明

1. 肝血管周围的铁质物质呈蓝色,胶原纤维红色(箭头); 2. 肺血管内铁质物质呈蓝色,肌纤维黄色,胶原纤维红色(箭头); 3. 肺小血管中间部位含有铁质物质呈蓝色,另一端伴血栓呈黄色,血管壁弹性纤维呈棕色,胶原纤维呈红色(箭头); 4. 肺动脉中铁质物质呈蓝色(箭头),弹性纤维呈棕色,胶原纤维红色。×20

Explanation of Plate

1. The irons are dyed blue, and the collagen fibers are dyed red (arrow) near the liver blood vessel; 2 The irons are dyed blue, the muscle fibers yellow, and the collagen fibers red (arrow) in blood vessel of the lung; 3 The irons are dyed blue, the thrombus yellow, the elastic fibers brown, and the collagen fibers (arrow) red in small blood vessels of the lung; 4 The irons are dyed blue(arrow), the elastic fibers brown, and the collagen fibers red in the pulmonary artery. ×20

张顺民等: 实验动物组织血管铁质反应与胶原、弹性纤维和肌纤维的组合染色法 图版 I
ZHANG ShunMin *et al.*: A Compound Staining of the Collagen, Elastic and Muscular
Fibers and Iron in the Blood Vessel Plate I



图版说明见文后