

显示 AgNOR 的改良染色效应在实验动物肿瘤中的应用

龚志锦 陶文照 詹镭洲 郑唯强

(第二军医大学病理解剖学教研室 上海 200433)

摘要 本文报道的 AgNOR 组化反应,是我们经过反复实验,重新建立的染色浓度、染色时间和温度的系列程序,其结果表明了所显示 AgNOR 成分的对比清晰度较强,而适用于实验动物肿瘤组织的形态学观察、图象分析系统的定量研究和诊断的价值。

关键词 核仁组成区嗜银蛋白 实验动物肿瘤组织 AgNOR 染色方法

核仁组成区嗜银蛋白 (Nucleolar organizer regions 简称 NORs) 是位于某些染色体上特殊部位的核糖体基因 (rDNA), 通过其转录而形成核糖体 rDNA, 在蛋白合成中起重要作用^[1]。NOR 内存在嗜银蛋白 (Argyrophilic), 所以称为核仁组成区嗜银蛋白 (AgNOR), 为了使这种组化反应更好地适应实验动物肿瘤模型组织形态学观察, 以及定量分析计算机图象处理研究需要, 我们进行了反复实验, 根据染色机理, 选用了多种试剂浓度对温度和时间的作用, 从而提出了实验动物肿瘤的 AgNOR 系统改良组化染色方法。

1 材料和方法

1.1 材料选用 取新鲜动物肿瘤组织进行印片、涂片和冰冻切片, 用 15% 的中性甲醛固定组织进行石蜡切片。

1.2 试剂配制和染色程序

1.2.1 AgNOR 染色液配制 a. 取硝酸银 25g, 溶解于双蒸馏水至 100ml 放置冰箱中备用。b. 取 1.5g 明胶溶于 1.5% 甲酸双蒸馏水中 (需要在 60℃ 恒温箱中充分溶解), 于室温中保存。c. AgNOR 工作染色液: 在临用前取之硝酸银水溶液 10ml, 明胶甲酸水溶液 20ml。

1.2.2 染色程序 a. 石蜡切片 3 微米, 脱蜡至水。冰冻切片 8 微米, 印片和涂片固定后经

75% 酒精 1 分钟, 用蒸馏水洗多次; b. 双蒸馏水洗后, 在 AgNOR 工作液中进行反应 (见表 1); c. 切片浸入蒸馏水中更换二次; d. 直接用无水酒精洗二次; e. 人二甲苯-石碳酸 (4:1) 中 1 分钟; f. 人二甲苯中 (二节), 中性树胶封固。

2 结果

2.1 小鼠肺组织肿瘤细胞核中的 AgNOR 呈黑色颗粒; 正常细胞核中含有少数黑色颗粒, 背景淡黄色 (见图 1)。

2.2 裸鼠肝组织癌细胞核中含有许多不同大小的 AgNOR 黑色颗粒, 正常细胞核中含有少数的 AgNOR 黑色颗粒, 背景呈淡黄色 (见图 2)。

3 讨论

AgNOR 能反应细胞核内的 rDNA 转录水平及蛋白质合成活性, 可作为判断细胞增生与分化程度的形态定量指标。在应用于实验动物肿瘤中, 对个体癌细胞和癌区域测量, 发现正常组织与癌及癌周组织之间所含 AgNOR 有显著的差别, 为人体肿瘤细胞的对比研究, 而提供了一定的参考价值。

在常规的 Haematoxylin Eosin (简称 HE) 染色中, 其人体与动物组织切片和染色方法的

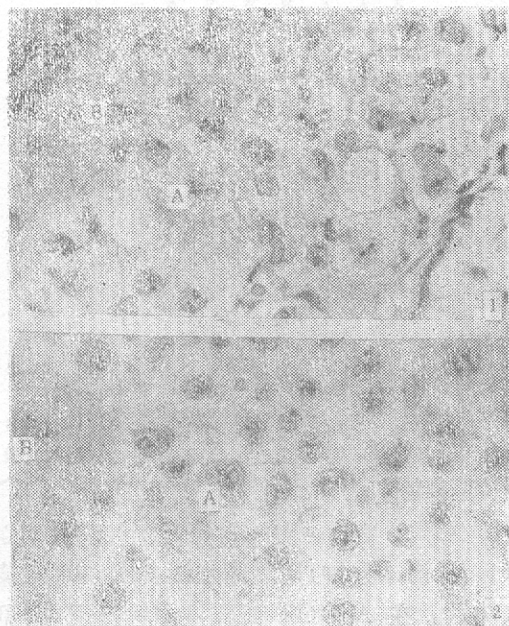


图1 小鼠肺组织

A. 肿瘤细胞核中的 AgNOR 含有许多黑色颗粒; B. 正常细胞核中的 AgNOR 含少数的黑色颗粒。×1260。

图2 裸鼠肝组织

A. 癌细胞核中含有许多不同大小的 AgNOR 黑色颗粒; B. 正常细胞核中只含有少数的 AgNOR 黑色颗粒。×1260。

处理方面就有所不同,而对于此种组化反应 AgNOR 原法^[2]在实验中已不适应动物组织的反应需求,易使 AgNOR 的颗粒融合和对比较差的现象。根据染色机理,因为组成蛋白质的嗜银性,能与一定浓度的硝酸银结合,当甲酸作还原剂时,可将结合的银迅速还原成黑色金属银,并在原位上被显示出来^[3],在反复的对照实验中发现,AgNOR 在一定的温度下,其反应时间快,当工作液超越极短时间,即可出现嗜染现象。证明动物组织的着色力明显较强,这可能与组织细胞生长的生物学活性代谢有关。

表1 AgNOR 工作液与温度和时间的参考表

项目	印片和涂片		冰冻切片		石蜡切片	
	温度(°C)	时间(min)	温度(°C)	时间(min)	温度(°C)	时间(min)
AgNOR 液 (室温)	18	30	18	32	18	35
	20	25	20	27	20	30
	25	20	25	22	25	25
	30	15	30	17	30	20
	35	10	35	12	35	15
AgNOR 液 (加温)	30	45	30	47	30	50
	35	40	35	42	35	45
	40	35	40	37	40	40
	45	30	45	32	45	35
	50	25	50	27	50	30
	55	20	55	22	55	25
	60	15	60	17	60	20
	65	10	65	12	65	15

为了使 AgNOR 能够较好的适应实验动物肿瘤中的应用。因此总结了使用系列性 AgNOR 与温度时间参考表(见表1),同时还应注意以下方面:(1)新鲜组织印片、涂片和冰冻切片,应及时固定和染色。(2)加温滴染反应须在有玻璃湿盒中进行。(3)AgNOR 工作液显色后即浸入蒸馏水中二次。(4)对于 AgNOR 染色的最后脱水与透明和封固中,防止在空气中干燥易形成色素颗粒,而影响高倍镜观察和正确的计数处理。对于上述改进的系统性 AgNOR 染色法,在实验动物各种肿瘤组织模型中,而具有一定的实用性。

参 考 文 献

- 1 Walker, RA. *Histopathology*. 1988, 12: 211.
- 2 詹谔洲,郑唯强,龚志锦等.第二军医大学学报增刊.:1. 1989.
- 3 黄进,周晓军,张太和.临床与实验病理学杂志,1990,6 (3):211.