

# 不同固定液及染色方法对显示肥大细胞的影响

张高英<sup>1</sup> 杨宇<sup>1</sup> 罗广生<sup>2</sup> 赵雅心<sup>1</sup> 彭克美<sup>1</sup> 刘华珍<sup>1\*</sup>

1. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070; 2. 玉林出入境检验检疫局, 玉林 537000

**摘要** 为寻求一种较好的显示肥大细胞的方法, 采用硫堇染色法和硫堇-甲苯胺蓝染色法分别对用不同固定液固定的兔肠系膜中肥大细胞进行染色。结果显示: Carnoy 氏液固定, 硫堇染色可清楚显示肥大细胞, 背景干扰小, 阳性细胞多且可见肥大细胞的脱颗粒现象; 硫堇-甲苯胺蓝法虽然也可显示肥大细胞, 但背景干扰大, 不利于对肥大细胞的观察; 甲醛-乙醇固定, 2 种染色方法都可清楚地显示肥大细胞, 但阳性细胞较少; 中性甲醛则完全阻断肥大细胞的着色, 2 种染色方法都不能显示肥大细胞。兔肠系膜肥大细胞有沿血管分布的趋势。研究结果表明: Carnoy 氏液及硫堇染液分别是兔肠系膜优良的固定液和染色液, 可清楚显示肥大细胞。

**关键词** 肥大细胞; 固定液; 染色; 兔; 肠系膜

中图分类号 S 852.16 文献标识码 A 文章编号 1000-2421(2010)02-0199-04

肥大细胞(mast cell, MC)广泛地分布于机体各个器官, 尤其是与外界环境接触的皮肤、消化道、呼吸道、肠系膜和神经末梢周围的结缔组织内密度很大。肥大细胞细胞质内充满了粗大而具有异染性的嗜碱性颗粒, 其颗粒中含有生物胺、蛋白多糖及中性蛋白酶等多种生物活性物质, 通过脱颗粒释放上述生物活性物质而在动物的健康和疾病中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。因此, 肥大细胞的基础生物学研究引起研究者的广泛兴趣。

显示肥大细胞的染色方法较多。其中低 pH 值的甲苯胺蓝染色法和阿利新蓝染色法是研究哺乳动物肥大细胞 2 种最典型的方法<sup>[2-3]</sup>。李艳等用不含冰醋酸的 Bouin 氏液固定, 甲苯胺蓝染色法显示绵羊子宫内肥大细胞, 结果肥大细胞异染成紫色<sup>[4]</sup>。刘雪梅等用 10% 中性福尔马林液(NBF)固定, 不同 pH 值甲苯胺蓝染色显示肾组织肥大细胞, 结果肥大细胞呈紫蓝色或紫红色<sup>[5]</sup>。许乐仁等研究发现, NBF 显著地阻断了阿尔新兰及甲苯胺兰对胡子鲶肥大细胞的着染能力<sup>[6-7]</sup>。杨筱珍等的研究结果显示, NBF 固定的草鱼组织中阿尔新兰及甲苯胺兰染色则完全不能鉴定出肥大细胞<sup>[8]</sup>。

上述研究结果表明, 肥大细胞对某些固定液、染

液及染色条件比较敏感, 染色效果很不稳定<sup>[9]</sup>。因此, 笔者选用肥大细胞密度较高的肠系膜为对象, 分别采用 3 种不同固定液及 2 种染色方法来探讨其对显示肥大细胞的影响, 旨在找到一种较好的显示肥大细胞的方法, 为肥大细胞的基础生物学研究积累资料。

## 材料与方 法

### 肠系膜铺片的制备

健康大白兔 5 只, 耳静脉注射空气致死后打开腹腔, 用脱脂棉轻轻吸去少量腹水后取肠系膜。将肠系膜展平在 12 mm × 12 mm 干净的盖玻片上, 用眼科剪沿盖玻片边缘剪下(注意剪的时候不要用力牵拉肠系膜, 否则容易回缩变厚), 稍微风干后连同盖玻片一起分别投入 Carnoy 固定液( $V_{\text{无水乙醇}} : V_{\text{氯仿}} : V_{\text{冰醋酸}} = 6 : 3 : 1$ )、甲醛乙醇液( $V_{\text{甲醛}} : V_{\text{无水乙醇}} = 1 : 9$ )、中性甲醛固定液中固定 1~2 h。

### 染 色

铺片连同盖玻片一起从固定液中取出, 浸入 100% 乙醇下行至 70% 乙醇各 1 min 后分别浸入染液<sup>[10-11]</sup>。

浸入硫堇染液(硫堇 0.5 g, 蒸馏水 100 mL) 30

收稿日期: 2009-05-26; 修回日期: 2009-11-12

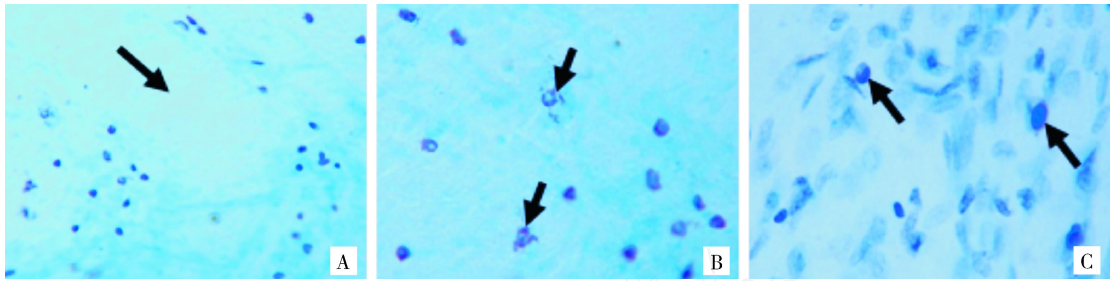
\* 国家自然科学基金项目(30800808)、华中农业大学科技创新项目(2007XCX010)资助

\*\* 通讯作者, E-mail: lhz219@mail.hzau.edu.cn

张高英, 女, 1984 年生, 硕士研究生, 研究方向: 解剖组织胚胎学, E-mail: zgzyu@yahoo.com.cn

min 后取出蒸馏水稍洗,用吸水纸吸去多余水分,稍晾干后用无水丙酮脱水(不能用乙醇脱水,极易掉色)2次,每次5 min,二甲苯透明后将中性树胶滴于干净的载玻片上,将盖玻片上有组织的一面朝下封固于载玻片上。

浸入0.5%硫堇水溶液(硫堇0.5 g,蒸馏水100 mL)染色5 min后取出蒸馏水洗,再浸入1%甲苯胺蓝乙醇溶液(甲苯胺蓝1 g,70%乙醇100 mL)染色5 min,蒸馏水洗,95%乙醇分色,显微镜下控制分色时间,无水乙醇脱水2次,每次5 min,二甲苯透明,按上述相同方法中性树胶封固。



A. 硫堇染色,紫红色肥大细胞数量多,沿血管分布,箭头所示为血管( $\times 200$ ) Stained with thionine, many prunosus mast cells locate along vascellum, the arrow shows vascellum( $\times 200$ ); B. 硫堇染色,可见肥大脱颗粒现象,如箭头所示( $\times 400$ ) Stained with thionine, the arrow shows degranulation of mast cells( $\times 400$ ); C. 硫堇-甲苯胺蓝染色,肥大细胞蓝紫色,如箭头所示,背景细胞深蓝色,对比度不明显( $\times 400$ ) Stained with thionine-toluidine blue, the arrow shows amethyst mast cells, the cells in background are mazarine and the contrast is not obvious( $\times 400$ ).

图1 Carnoy氏液固定后肥大细胞的染色结果

Fig. 1 The results of staining of mast cells fixed in Carnoy

### 液固定后染色结果

采用硫堇染色法和硫堇-甲苯胺蓝染色结果相似,都可清楚显示肥大细胞,背景为浅蓝色,肥大细胞呈紫红色,数量较少,沿小血管分布(图2-A),阳性细胞胞浆内有大量的紫红色颗粒(图2-B)。

### 中性甲醛固定后染色结果

中性甲醛固定的铺片分别用2种方法染色都未见有紫红色的阳性细胞,只有大量浅染的蓝色细胞(图3)。

## 讨论

肥大细胞是疏松结缔组织中常见的细胞,常成群地沿着小血管和小淋巴管分布,其数量随动物和器官的不同而异。肠系膜是典型的疏松结缔组织,富含大量的肥大细胞。以前都采用大白鼠或小白鼠的肠系膜制作疏松结缔组织铺片,但实验动物较小不便于取材与操作,且制作的铺片有可能厚薄不均

## 结果与分析

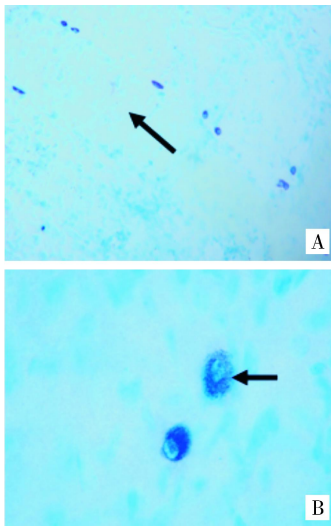
### 氏液固定后染色结果

采用硫堇染色法,可清楚显示肥大细胞,背景为浅蓝色,阳性肥大细胞呈紫红色(图1-A),数量较多。细胞椭圆形或卵圆形,还可见长梭形,胞浆内有大量的紫红色颗粒,胞核大而圆呈浅蓝色多位于中央,也有偏核,同时清晰可见肥大细胞的脱颗粒现象(图1-B)。阳性肥大细胞大部分沿血管分布。

采用硫堇-甲苯胺蓝染色法,阳性肥大细胞为蓝紫色,其它细胞被染成深蓝色,对比度减弱(图1-C)。

影响染色效果<sup>[11]</sup>。本试验采用大白兔为研究对象,盖玻片粘贴肠系膜直接染色,方法简单,不需别的处理且制作的铺片不易回缩变厚,不失为一种好的铺片制作方法。

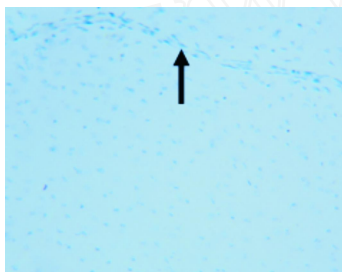
肥大细胞在组织化学染色及形态上具有极大的异质性,并且极大程度地受到固定液的影响<sup>[2]</sup>。肥大细胞中含有组织胺、肝素等染毒性物质,其与硫堇甲苯胺蓝结合后表现出异染性,呈现紫红色或蓝紫色。本试验证明 Carnoy 固定肥大细胞染色最好,与高登慧等研究结果<sup>[12]</sup>相同。FA 也为肥大细胞的一种较好的固定剂。硫堇染色对肥大细胞的显示效果最好,其它细胞几乎不着色或着浅蓝色,突显了肥大细胞,便于肥大细胞的观察与研究。硫堇与甲苯胺蓝都是研究肥大细胞常用的碱性染料,通常是单独使用来鉴别肥大细胞。而柳洁等<sup>[11]</sup>采用二者联合使用的方法来制取疏松结缔组织铺片,同时使肥大细胞与胶原纤维等着色。本试验借鉴该法,



A. 硫堇染色,肥大细胞数量较少,沿血管分布,箭头所示为血管( $\times 200$ ) Stained with thionine, a few prunosus mast cells locate along vascellum, the arrow shows vascellum ( $\times 200$ ); B. 硫堇-甲苯胺蓝染色,胞浆内有大量的紫红色颗粒,如箭头所示( $\times 400$ ) Stained with thionine-toluidine, there were lots of prunosus granules in mast cells ( $\times 400$ ).

### 图2 FA固定后肥大细胞的染色结果

Fig. 2 The results of staining of mast cells fixed in FA



### 图3 中性甲醛固定后肥大细胞的染色结果,箭头所示为血管( $\times 200$ )

Fig. 3 The results of staining of mast cells fixed in neutral formalin, the arrow shows vascellum ( $\times 200$ )

虽可显示肥大细胞但背景较深,不便于肥大细胞的观察。

试验中相同的组织同样的染色方法,由中性甲醛固定则完全不能显示肥大细胞。但有学者证实大鼠肥大细胞在甲醛固定甲苯胺蓝染色时数量改变不明显<sup>[13]</sup>。目前认为,甲醛对染料的阻断作用是可逆的,主要是有关的蛋白发生交联,形成蛋白质分子的弥散屏障,从而阻断了染料的扩散<sup>[3]</sup>。而笔者推测有几种可能:(1)甲苯胺蓝、硫堇等碱性染料是通过其中有染色作用的阳离子与组织细胞中酸性多聚阴

离子物质相结合而使细胞着色,由此推测可能是由于细胞中的多聚阴离子不同造成;(2)肥大细胞在不同物种之间存在不同的类型;(3)不同组织器官中的不同微环境影响了肥大细胞的功能,改变了其形态和颗粒内容物;(4)不同的固定液可以针对性地改变细胞内空间构型,从而起到固定的效果,进而影响了其染色结果。笔者认为在对肥大细胞的组织化学染色中存在诸多的易变因素,所以单纯地从组织学染色方面不足以证明肥大细胞的存在,可以从免疫组织化学方面如凝集素<sup>[14]</sup>等来进一步证明肥大细胞。以后研究组织中的肥大细胞一定要注意对固定液、染料及染色方法的选择。

本研究不但为肥大细胞的形态学研究提供了有益的资料,而且对显示肥大细胞染色方法的评价提出了有价值的参考依据。

## 参 考 文 献

- [1] IRANI A A, SCHWARTZ L B. Mast cell heterogeneity [J]. Clin Exp Allergy, 1989, 19(2): 143-155.
- [2] MA YRHOFFER G. Fixation and staining of granules in mucosal mast cells and intraepithelial lymphocytes in the rat jejunum, with special reference to the relationship between the acid glycosaminoglycans in the two cell types [J]. Histochem J, 1980, 12(5): 513-526.
- [3] WINGREN U, ENERBACK L. Mucosal mast cells of the rat intestine: a re-evaluation of fixation and staining properties, with special reference to protein blocking and solubility of the granular glucosaminoglycan [J]. Histochem J, 1983, 15(6): 571-582.
- [4] 李艳, 杨立霞. 绵羊子宫肥大细胞的观察 [J]. 呼伦贝尔学院学报, 2007, 15(1): 66-67.
- [5] 刘雪梅, 朱红艳, 甄晖, 等. 肾组织肥大细胞的形态学特点及染色方法 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2004, 20(2): 216-219.
- [6] XU L R, YANG X Z, GAO D H, et al. Mast cells in two species of freshwater fishes, grass fish (*Ctenpharyngodon idella*) and cat fish (*Claris fuscus lacepeda*) [J]. J Anim Vet Adv, 2003, 2(3): 191-195.
- [7] 许乐仁, 杨筱珍, 高登慧. 草鱼淋巴器官中的肥大细胞 [J]. 水产学报, 2003, 27(3): 233-237.
- [8] 杨筱珍, 高登慧, 许乐仁. 胡子鲇肥大细胞的组织化学及形态学 [J]. 中国水产科学, 2003, 10(2): 106-110.
- [9] JULIANA S R, HELIO C G. Mast cell heterogeneity between two different species of *Hoplias* sp. (Characiformes: Erythrinidae): response to fixatives, anatomical distribution, histochemical contents and ultrastructural features [J]. Fish Shellfish Im-

- munol,2007,22(3):218-229.
- [10] 杜卓民.实用组织学技术[M].北京:人民卫生出版社,1982:80.
- [11] 柳洁,马晓健.疏松结缔组织铺片显示肥大细胞的一种新方法[J].解剖科学进展,2005,11(3):282.
- [12] 高登慧,许乐仁,姚红艳.山羊肥大细胞组织化学及形态学研究[J].畜牧兽医学报,2000,31(1):88-93.
- [13] ALDENBORG F,ENERBACK L. Histochemical heterogeneity of dermal mast cells in athymic and normal rats[J]. Histochem J,1988,20(1):19-28.
- [14] SIVRIDIS N,GIATROMANOLAKI A,AGNANTIS N K,et al. Mast cell distribution and density in the normal uterus-metachromatic staining using lectins[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,2001,98(1):109-113.

## Effect of Different Fixatives and Stainings on Presenting Mast Cells

ZHANG Gao-ying<sup>1</sup> YANG Yu<sup>1</sup> LUO Guang-sheng<sup>2</sup>  
ZHAO Ya-xin<sup>1</sup> PENG Ke-mei<sup>1</sup> LIU Hua-zhen<sup>1</sup>

1. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;  
2. Yulin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yulin 537000, China

**Abstract** In the present study, rabbit mesentery was fixed in three different fixatives and stained with thionine and thionine-toluidine blue respectively in order to find a good method to display mast cells. The results showed that lots of positive mast cells with light background could be presented clearly by Carnoy fixative and thionine staining. In addition, degranulation of some mast cells could be observed clearly. However, it was difficult to observe positive mast cells by Carnoy fixative and thionine-toluidine blue staining because of high interferential background. Only a little positive mast cells could be observed through formaldehyde-alcohol fixative and the two staining methods. Neutral formalin blocked the staining of mast cells completely, for neither of the staining methods could display mast cells. Most of the positive mast cells were distributed along the blood vessels. The results demonstrated that Carnoy and thionine were superordinary fixative and staining solution for clearly displaying mast cells of rabbit mesentery, respectively.

**Key words** mast cell; fixative; staining; rabbit; mesentery

(责任编辑:边书京)