维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第2期 重庆医科大学学报 Vol.19 No.2
1994 ACTA UNIVERSITATS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

胃肿瘤，癌，诊断，乙酰葡萄糖胺

146~147

β-N-乙酰葡萄糖胺酶组织化学改良法在胃癌诊断中的应用

病理学教研室 黄幼蓉 苗德林 R735.204

中图分类号 R446.8

为探讨水解酶的活性与癌细胞的浸润关系而采用了Hayashi显示B-N-乙酰葡萄糖胺酶的酶组织化学法，在实验过程中对原法的孵育液的PH值及孵育时间稍作改良后，应用于胃癌科研组织切片染色上，取得了稳定和满意的结果。

材料与方法

外科切除的胃癌标本50例，其中粘液细胞癌10例，管状腺癌(以高分化为主)18例，低分化腺癌12例，未分化癌10例，所有的标本都新鲜取材，恒冷切片，用改良的Hayashi偶氮偶联法染色。

1、孵育液的配制

(1) 萘酚AS-BI-β-N-乙酰葡萄糖胺3mg溶于0.3ml的乙二醇单甲醚中(原法用二甲基甲酰胺)我们则认为乙二醇单甲醚溶解底物的效果更佳。

(2) 缓冲六偶氮对品红液

a.六偶氮对品红液

ⓐ盐酸对品红(P-rosaniline hydrochloride) 100mg加入0.5ml浓盐酸，用玻棒调成糊状后再加入2ml蒸馏水，搅拌溶解后过滤，过滤液取0.3ml

ⓑ4%亚硝酸钠液0.3ml临用前将两液混合，(ⓐⓑ两液可预先制备，临用时根据需要等量混合)

b.0.1M柠檬酸缓冲液PH5 5ml

c.重蒸馏水 5ml

将上述a b c三液混合后用1N的NaOH调PH至4.8，然后将底物液(1)与其混合后稍停过滤待用。(原法认为β-N-乙酰葡萄糖胺酶的最适PH为4—5之间，为了找出最佳的染色所需的PH，我们分成四个实验组染色；即PH各为4，4.5，4.8及5。比较结果以PH4.8实验组孵育45mim染色效果最佳，背景清晰，酶定位准确，无弥散，当PH小于4.8时，显色较差，有时甚至不着色，而PH大于4.8时，则需延长孵育时间，易引起酶扩散)。

2、操作步骤

(1) 新鲜组织恒冷切片8—10μm，将其贴附于24×24mm的盖玻片上晾干或冷风吹干后，10%中性甲醛冷固定1min(−4℃)

(2) 进入新鲜配制的孵育液中37℃孵45min(原法认为在37℃中孵育30min至2h，为了取得稳定的染色效果，我们在孵育时间上分了五个实验组，各为30min、45min、60min、90min、120min比较结果以45min组染色效果最佳最为稳定。少于45min染色显淡，多于45min则引起酶扩散，影响定位。)

(3) 蒸馏水洗后，2%甲基绿染胞核5min

(4)蒸馏水洗晾干，DPX封固

3、染色结果

β-N-乙酰葡萄糖胺酶阳性反应呈红色，粘液细胞癌胞浆呈淡红色或红色，间质中大噬细胞呈桃红色，高分化腺癌为阴性(但腔内分泌物为阳性)。部份低分化腺癌在不完全腺腔缘呈红色线状分布。

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨　论

β-N-乙酰葡萄糖胺酶(β-N-AG)是溶酶体释放的水解酶之一，它最初在内质网内合成，故在上述两种细胞器内均呈阳性，该酶分解B-N-乙酰氨基葡萄糖的胺基糖苷键，其反应如下：2-乙酰氨基-2-脱氧β-D-吡喃葡萄糖苷 $+H_2O\rightleftharpoons$N-乙酰葡萄糖胺＋配基，亦可催化寡糖分子末端的β-N-乙酰半乳糖苷水解，β-N-乙酰葡萄糖胺酶活性高低亦反应了溶酶体的活跃状态，从本实验的组织化学反应结果，显示胃粘液细胞癌的β-N-乙酰葡萄糖胺酶的活性较管状腺癌为高，由于人体结缔组织中蛋白多糖含有β-N-乙酰葡萄糖胺及寡糖分子末端的β-N-乙酰半乳糖胺结构，故该酶可水解上述化合物，从而破坏结缔组织网状屏障，而有利于癌细胞浸润。

本实验采用有实用价值的萘酚AS--BI-β-N-乙酰葡萄糖胺作为β-N-乙酰葡萄糖胺酶的底物，选择酶组化中效果较好的六偶氮对品红为偶联剂配制孵育液，通过不同实验组的多次实验，在原法基础上找到最佳效果的pH和孵育时间，从而保证了染色的稳定性和可靠性。胃癌恒冷组织切片经其偶氮偶联反应后，形成无定形或小结晶产物，在切片上显示出β-N-乙酰葡萄糖胺酶在细胞内的定位。

β-N-乙酰葡萄糖胺酶组织化学改良法，也可用于肠癌、乳癌及其它浸润癌的恒冷组织切片中研究应用。

采用萘酚AS衍生物较其它底物水解快，与六偶氮对品红偶联，可显示最好的定位，但由于它不能以稳定的盐长期保存，必须临用前配制。

该酶组织化学方法，操作简便，易于同行掌握应用。

参　考　文　献

1　Walken R A J path 1984;143:39
2　Hayashi M, et al. J, Histochem, Cytochem 1964;12:293
3　苗德林，等. 中华病理学杂志 1987;16(14):269
4　陈啸梅，等. 组织化学手册 人民卫生出版社1982

(收稿日期1993-09-22)

(上接145页)

增加。故《临床化学诊断方法大全》认为缩短反应时间可以提高Bc测定的特异性。

温度主要影响1分钟的Bc测定，所以如采用1分钟反应时间应统一温度。并严格控制温度与时间。

参　考　文　献

1　叶应妩，等. 全国临床检验操作规程 第一版，南京:东南大学出版社 1991: 218
2　Chan K-M, et al. Chin chem 1985 31(9): 1560
3　林其燧，等. 临床化学诊断方法大全 第一版　北京: 北京大学出版社 1990: 928

(收稿日期　1994-01-20)