DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.042

改良的 Ab-PABF 与 Ab-PAS 组织化学染色法在小鼠小肠粘液染色中的应用比较

Comparison of improved Ab-PABF and Ab-PAS histochemical methods in mouse intestinal mucous staining

刘贤华 白晓东 栗永萍 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室)重庆,630038

在研究某些伤后(如烧伤、放射损伤)小肠粘液分泌的病理改变时,通常采用 Ab-PAS 组化染色法(即阿利新兰-Schiff 试剂)来显示组织中的粘液物质性质。文中采用了改良后的 Ab-PABF(即过碘酸-碱性品红-阿利新兰)组化染色法来显示小鼠小肠组织中不同类型的粘液物质。并将 Ab-PAS 组化染色法与 Ab-PABF 组化染色法所显示的连续切片的两种染色结果作了真彩色图像分析,并进行了染色效果、试剂配制、试剂用量等多方面的比较。通过比较发现改良后的 Ab-PABF 组织化学染色法明显优于 Ab-PAS 法。改良的 Ab-PABF 组织化学染色法为研究小肠粘液组化提供了更先进的技术。

1 材料与方法

1.1 改良的 Ab-PABF 组化染色法[1]

试剂:0.2%碱性品红水溶液;1%过碘酸水溶液;1%氨醇溶液;0.5%盐酸酒精液;1%阿利新兰(含2%冰醋酸)水溶液。

染色步骤:①小鼠小肠常规石蜡切片脱蜡至蒸馏水;②切片入1%阿利新兰水溶液染色10 min;③蒸馏水洗,切片入1%氨醇溶液中分化1 min;④蒸馏水洗,切片入 PABF 染液中染色4 min(PABF 配制:0.2%碱性品红水溶液2份与1%过碘酸水溶液4份,临用前按比例混合);⑤蒸馏水洗,切片入0.5%盐酸酒精液分化,直至无红色染液从切片流下来为止;⑥蒸馏水洗,切片入1%氨醇溶液1 min;⑦蒸馏水洗,系列酒精脱水,二甲苯透明,DPX 封固。

1.2 Ab-PAS 组化染色法[2]

试剂:0.5%过碘酸水溶液;1%阿利新兰(含2%冰醋酸)水溶液;Schiff 试剂:首先将100 ml 双蒸水煮沸,缓缓加入碱性品红0.5 g 再煮沸几分钟,冷却至50℃过滤后加1N 盐酸液20 ml,降至25℃时再加偏重亚硫酸钠2 g,封口置暗处或冰箱内12～24 h 后如无色透明即可用。

染色步骤:①小鼠小肠常规石蜡切片脱蜡至蒸馏水;②切片入0.5%过碘酸水溶液中氧化5 min;③自来水洗后再用蒸馏水洗;④切片入1%阿利新兰水溶液中染色5～10 min;⑤自来水洗后再用蒸馏水洗;⑥切片入 Schiff 试剂中染色10～20 min;⑦自来水洗后切片入蒸馏水中浸泡10 min;⑧系列酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.3 图像分析[3]

将 Ab-PABF 组化染色法所显示的切片和 Ab-PAS 组化染色法显示的切片置于真彩色图像分析系统中,选择典型红染的中性粘液与典型蓝染的酸性粘液区域,分析它们各自的红色色素与蓝色色素构成,并计算其红蓝比值,用 R/B 表示。

1.4 数据统计

采用第四军医大学统计学教研室 SPLM 软件包单因素方差分析,$P<0.05$为显著水平。

2 结果

2.1 改良的 Ab-PABF 组化染色结果

酸性粘液 蓝色
中性粘液 红色
混合粘液 紫色

2.2 Ab-PAS 组化染色结果

酸性粘液 蓝色
中性粘液 红色
混合粘液 紫色

2.3 改良的 Ab-PABF 与 Ab-PAS 法显色比较

通过图像分析与统计处理,我们发现在显色方面,Ab-PABF 法中红色的 R/B 与 Ab-PAS 法中红色的 R/B 相比,两者相差不显著($P>0.05$);而 Ab-PABF 法中蓝色的 R/B 略大于 Ab-PAS 法中蓝色的 R/B,但统计学上两者差异没有显著性($P>0.05$)(见附表)。这证明:在显示小肠粘液方面,Ab-PABF 组化染色法达到了 Ab-PAS 组化染色法同样的显色效果。

附表 改良的 Ab-PABF 法与 Ab-PAS 法中 R/B 比较

	Ab-PABF		Ab-PAS	
切片号	蓝色($10^{\triangle}$)	红色($10^{\triangle}$)	蓝色($10^{\triangle}$)	红色($10^{\triangle}$)
1	0.44±0.13	1.06±0.06	0.32±0.13	0.98±0.09
2	0.45±0.05	0.94±0.05	0.34±0.15	0.98±0.05
3	0.38±0.11	0.96±0.05	0.34±0.11	0.96±0.04
4	0.43±0.13	1.02±0.05	0.34±0.15	0.98±0.05
5	0.53±0.19	1.18±0.07	0.32±0.09	0.99±0.04

△:计数10个粘液细胞/片

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

Ab-PABF 组化染色法的染色原理与 Ab-PAS 组化染色法有所不同。Ab-PAS 组化染色法的染色原理是：阿利新兰染料分子中带正电荷的盐基和酸性物质负电荷的酸基结合形成蓝色反应。应用过碘酸这一强的氧化剂把含有糖类物质氧化而产生双醛(CHO-CHO)，醛可以与 Schiff 试剂反应，亚硫酸品红与双醛结合便形成了紫红色反应物。而 Ab-PABF 组化染色法的染色原理是：首先应用阿利新兰染料分子中带正电荷的盐基与酸性物质的负电荷的酸基结合形成蓝色反应，与此同时便阻断了酸性粘液的羧酸分子中的乙二醇基，而切片进入 PABF 染液时，只有中性粘液物质中的乙二醇基或氨醇基才能和未经脱色的碱性品红与过碘酸结合形成红色的最终反应物。

小肠粘液可分为中性与酸性两大类。为了使这两种粘液物质能在同一张切片中同时显示出来，我们将5组小鼠小肠组织的连续切片分别应用了 Ab-PABF 组化染色法与 Ab-PAS 组化染色法显示其中不同的粘液类型。并将这两种染色方法所得到的染色结果进行了彩色图像分析与统计处理，证明了 Ab-PABF 组化染色法达到了 Ab-PAS 组化染色法同样的显色效果；Ab-PABF 组化染色法同样可在同一张切片上同时显示不同的粘液类型，且着色对比清晰，反差大，而更重要的是，Ab-PABF 组化染色法克服了 Ab-PAS 组化染色法中诸多的缺陷与不足，而表现出以下几方面的优点：Ab-PABF 组化染色法比 Ab-PAS 组化染色法操作简单。Ab-PAS 组化染色法中涉及了 Schiff 试剂的配制，而 Schiff 试剂的配制必须经过加热煮沸、冷却、过滤、吸附等一系列过程，Ab-PABF 组化染色法中省去了 Schiff 试剂配制的繁琐步骤，只需在临染色前将碱性品红水溶液与过碘酸水溶液按比例混匀即可使用。此外，Ab-PABF 组化染色法与 Ab-PAS 组化染色法容易掌握。Ab-PAS 组化染色法对实验条件要求比较高，如过碘酸氧化作用时的温度，作用时间都对染色结果有很大的影响。如果温度过高，作用时间过长，则可使某些物质成分发生非特异性反应而致染色结果出现假阳性。而 Ab-PABF 组化染色法则避免了上述条件的影响，且要求室温控制在30℃即可，极少发生非特异性染色，背景显得十分干净。另外，Ab-PABF 组化染色法比 Ab-PAS 组化染色法更加经济、实用。Ab-PAS 组化染色法中碱性品红的用量是0.5～1 g/100 ml，而 Ab-PABF 组化染色法中碱性品红的用量只需0.2 g/100 ml 即可，后者比前者节约试剂2～5倍。由于试剂的用量减少，节省经费对于广泛开展 Ab-PABF 组化染色显示小肠粘液物质提供了方便。

关键词 粘液；改良的 Ab-PABF 组化染色；Ab-PAS 组化染色；图像分析

中图法分类号 R329－34

参考文献

1 Perera PAC. Periodic Acid-Basic fuchsin (PABF) technique for the demonstration of carbohydrates and mucosubstances in paraffin sections: an alternative to PAS technique. The Journal of histotechnology, 1991; 14(3): 155

2 易家农. 组织学与组织化学技术. 湖南医学院, 1986: 200～201

3 蔡文琴，王伯沄主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都：四川科学技术出版社, 1994: 182～183

(收稿：1995-09-26；修回：1996-01-20)

(编辑 冷怀明、汪勤俭)

梯度洗脱高效液相法测定脑组织三磷酸腺苷及其代谢产物

Determination of adenosine triphosphate and its metabolities in brain tissue by gradient elution high-performance liquid chromatography

黄永平 黄林清 徐传福 周世文 张诗平 (第三军医大学附属新桥医院中心实验室) 重庆，630037

能量代谢是组织细胞赖以维持其结构和功能正常的物质前提。脑组织能量物质的测定是研究脑组织在生理、病理条件下代谢变化的重要指标，而三磷酸腺苷(ATP)是脑组织中的主要能量物质。为配合我院脑移植的研究，我们建立了测定脑组织 ATP 及其代谢产物的梯度洗脱高效液相色谱技术，以了解胎兔脑组织

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net