DOI:10.16016/j.1000-5404.1984.04.015

对酸性α-醋酸萘酯酶(ANAE)活性的探讨

姚云泉 朱梅刚

（第二附属医院 病理科）

提 要

本文通过对18例慢性扁桃腺炎等淋巴网状组织的新鲜标本立即作印片与按Mueller氏法处理行甲醇致冷器冰切与石腊切片作ANAE染色。并将剩余组织用10%甲醛液固定，然后在第10、20、30天分别取组织块作甲醇致冷器冰切与石腊切片作ANAE染色，检测各种标本的ANAE的点状阳性细胞率，相互作比较分析。其结论是新鲜组织甲醇致冷器冰切的阳性率最高，其次为印片与石腊切片。甲醛固定组织则存放时间愈长，ANAE酶活性愈低，直到第30天者全部消失。

业已证实ANAE反应检测法点状阳性反应是确定T细胞之标记[1][2]，弥漫性细颗粒阳性反应是单核组织细胞系的标记[3]。该法系目前研究和确定淋巴网状细胞及其肿瘤的分型。为此我们通过新鲜组织印片、冰切、石腊切片和甲醛固定组织不同时间观察ANAE活性的变化进行探讨。

材料与方法

一、材料：采用慢性增殖性扁桃体炎切除标本14例，淋巴结反应性增生4例，淋巴结结核2例，死婴胸腺1例。共21例标本。

二、方法：

1．除上述1例淋巴结反应性增生外，其它各例新鲜标本均作印片，-20℃甲醇致冷器冰冻切片（以下简称冰切），Mueller改良法固定的石腊切片[4]（以下简称石腊切片）观察ANAE阳性率。其中8例新鲜组织用10%甲醛液固定后再作冰切、石腊切片，并与上组ANAE阳性率进行比较。

2．取慢性扁桃体炎14例和死婴胸腺1例的剩余组织用10%甲醛液固定，固定后的第10天、20天、30天分别取各例组织块经Mueller法处理再作冰切、石腊切片，行ANAE阳性率检测比较。

3．每张印片与切片在高倍镜下观测点状阳性细胞百分率，分布不均时以最高百分率记录。凡有淋巴滤泡增生者，记录滤泡内外点状阳性细胞百分率。

4．印片、冰切、石腊切片的制备与染色方法：

（1）制备印片：新鲜组织未固定前，以最大面剖开，印片一张，冷风吹干，入（予冷4℃）甲醛－丙酮缓冲液内固定。冰切：取2—3 mm厚的新鲜组织块投入予冷（4℃）甲醛－蔗糖液或甲醛钙液中固定24小时（4℃冰箱），再放入Holt's液24小时（4℃冰箱），冷水洗5分钟，在－20℃甲醇致冷器冰切，4μ厚。室温或冷风吹干。石腊切片：制备法请参考中华医学检验杂志第三期154页，1981年。对凡已用10%甲醛液固定过的组织制备出的冰切与石腊切片，方法与新鲜组织相同，但事先需将组织块用自来水与蒸馏水冲洗数分钟。

（2）染色法：操作方法基本上按照Mueller法进行[1]。染色结果：凡成熟的T细胞胞浆内出现1—2个棕红色点状颗粒。

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

单核组织细胞系细胞胞浆内出现弥漫性小粒红色颗粒。

检测结果

一、除去胸腺和淋巴结结核共3例外，观察结果：18例中有2例印片与冰切阳性率相同或高于冰切，余16例印片阳性率均低于冰切。2例冰切与石腊切片阳性率相同，另16例冰切阳性率均高于石腊切片。印片、冰切、石腊切片三者的平均阳性率各自为34.4%、53.3%、31.3%。其中8例用10%甲醛液固定未经Mueller氏法处理作冰切与石腊切片阳性率均显著降低，尤其石腊切片5例皆为0。

二、15例组织经用10%甲醛液固定后第10、20、30天作冰切与石腊切片，其阳性率检测结果：总的情况表明冰切与石腊切片固定时间愈长酶活性丢失愈多。冰切在不同时间的平均阳性率为：新鲜组织为53.3%，10天为20.3%，20天为13%，30天为7%。石腊切片在不同时间的平均阳性率为：新鲜组织31.3%，10天13.3%，20天4.8%，30天4.5%。

三、15例慢性扁桃腺炎和胸腺均有不同程度的淋巴滤泡增生，在淋巴滤泡内呈点状阳性细胞最高为10%，一般为5%—3%，个别为0。此外在淋巴滤泡内外还有散在的固定的网织细胞与反应性组织细胞，小血管内皮细胞，淋巴窦内组织细胞以及结核灶类上皮细胞均呈弥漫细颗粒强阳性。其阳性率的变化与点状阳性率相一致。

总结分析

一、影响ANAE活性的因素：

1．组织愈新鲜酶的活性愈高，组织存放愈久则酶的活性不断丢失。根据本实验技术将10%甲醛液固定自第10、20、30天分次检测证明了这一点。因此当标本万一已作甲醛液固定，应力争尽快按Mueller法处理，行冰切，其阳性率仍可接近新鲜组织而获得直接检测。

2．合适的固定剂有利于酶活性的保存：本文证明常规应用10%甲醛液固定则酶活性丧失多。目前文献中提到pH6.7甲醛钙或甲醛蔗糖液为最佳固定液。

3．印片、冰切、石腊切片阳性率有异：实验结果证明－20℃冰切阳性率最高，高于石腊切片。而Chilost (1981)[3]作ANAE冰切与石腊切片观察比较，发现二者阳性率相同。但石腊切片反应较弱，从而提出石腊切片孵育时间应延长。本实验石腊切片阳性率较低可能与浸腊温度控制以及孵育时间不足等有关。印片由于细胞分布、数量和厚薄不易控制，所以阳性率低于冰切，再则不能定位，故只能作参考。

二、改进印片与石腊切片的意义：在国内一般单位因缺乏低温冰冻切片机，所以对印片与石腊切片易于开展，故改进操作提高阳性率有重大意义。作者认为印片常由于细胞分布、厚薄不均，混进血液、水分等因素而影响阳性率的观测。因此组织块绝不能湿水，剖面用干纱布轻拭，去掉渗血，用清洁干燥的玻片均匀地压印，使之能得到一张单层分布均匀的理想印片。石腊切片法国内外已获得成功，只是国内的阳性率低于冰切，故应从改进脱水剂，降低浸腊温度与时间，延长孵育时间等方面想法加以改进。

三、技术操作体会：

1．各项操作要认真仔细，对每一个环节均应严格控制条件。

2．孵育液与α－醋酸萘酯液均应新鲜配制，随用随配。前者用前需过滤，避免沉淀粘染切片，影响观察。

3．对一些影响酶活性的因素要进行摸索，不断改进方法。

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

参 考 文 献

1. Mueller J. et al: Nonspecific acid esterase activity, a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. Europ Immunol J 1975; 5:270

2. Rank A: Nonspecific esterase activity in human lymphocytes histochemical characterization and distribution among major lymphocyte subclasses. Clin Immunopath 1978; 10:47

3. Chilost M. et al: Enzyme histochemistry on normal and pathologic paraffin embedded lymphoid tissues. Am J Clin Pathol 1981; 76:729

4. 南京铁道医学院组胚教研室邢钊敏等：石腊切片酸性非特异性酯酶标记T淋巴细胞。中华医学检验学杂志，1981；4:151

Observations on the Emzymic Activity of Acid α-Naphthyl Acetate Esterase

Yau Yunquan, Zhu Meigang

(Department of Clinical Pathology, Second Teaching Hospital,
The Third Military Medical College)

Fresh lymphoreticular tissues obtained from 14 cases of chronic hyperplastic tonsillitis and 4 cases of reactive hyperplasia of tonsils were studied for the enzymic activity of the acid α-Naphthyl acetate esterase(ANAE). Imprints of the fresh lymphoreticular tissues were made. Then they were fixed according to the Mueller's method. Cryostal frozen section and paraffin section with ANAE stain were made. A part of the fresh lymphoreticular tissues was fixed with 10% formalin solution. Finally, cryostal frozen section and paraffin section with ANAE stain were made of the formalin-fixed tissues on the 10th, 20th and 30th day of fixation respectively.

The rates of the cells positive for dot-like positions of different preparations were compared. It was found that the positive rate was the highest in the fresh frozen sections, then in the fresh imprints and fresh paraffin sections. The longer the tissues were preserved with formalin, the lower the rate of the posititive cells. The positive rate was nearly zero in the tissues after 30 days of formalin fixation.

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