

# 虎纹蛙舌肥大细胞组化及免疫组化

林旋,王寿昆\*,林树根,陈梅芳,李玲玲

(福建农林大学动物科学学院/福建省动物药物工程实验室,福州 350002)

**摘要:**应用改良甲苯胺蓝(MTB)、阿尔新蓝-藏红O(AB/SO)、甲基绿-派洛宁(MG-P)、天青II-伊红-瑞氏混合液等4种组化染色技术进行染色,并用小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体AA1通过Elivision™免疫组化染色方法,对虎纹蛙舌头肥大细胞进行染色。结果表明:虎纹蛙舌头中的肥大细胞,大小形态不一。虎纹蛙舌组织中分布有大量肥大细胞,主要分布于固有层的结缔组织中和舌头腺体之间,肌层也可见到大量的肥大细胞,并且有沿血管分布的特点。在用Elivision™免疫组化染色方法中,单克隆抗体AA1与虎纹蛙舌头组织中肥大细胞中的类胰蛋白酶有良好的交叉反应。类胰蛋白酶阳性细胞数量很少,分布于舌组织固有层和腺体之间。而人胃癌间质中可见多量类胰蛋白酶阳性细胞。

**关键词:**肥大细胞;虎纹蛙;异质性;类胰蛋白酶;组化性质

中图分类号:Q952

文献标识码:A

## Studies on the Mast Cells in the Tongue of Frog (*Rana tigrina rugulosa*) by Histochemical and Immunohistochemical Method

LIN Xuan, WANG Shou-kun\*, LIN Shu-gen,

CHEN Mei-fang, LI Ling-ling

(College of Animal Science, Fujian Agricultural and Forestry University /Animal Pharmaceuticals Engineering Laboratory of Fujian, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The mast cells of the back, abdominal skin and tongue of the frog, *Rana tigrina rugulosa*, were stained using modified toluidine blue (MTB), Alcian blue Safranin O (AB/SO), methyl green-Pyronine (MG-P), Azure II-Eosin-Wright mixture and a murine monoclonal antibody (AA1) that raised against human mast cell tryptase by Elivision™ immunohistochemical. The results showed that the mast cells in the tongue of the frog had different size and form. There were lots of mast cells in the tongue tissue of the frog which were mainly distributed between the connective tissue of lamina propria and lingual gland. Lots distributed in muscular layer and intended to be around blood vessels. With Elivision™ immunohistochemical staining method, the monoclonal antibody AA1 and the tryptase of the mast cells in the tongue tissue of the frog had an excellent cross-reaction. Small amount of the positive tryptase cells were found in the frog and mostly distributed between the lamina propria and gland of the tongue tissue. There were lots of tryptase-positive mast cell in the mesenchyme of the human gastric cancer.

**Key words:** Mast cells; *Rana tigrina rugulosa*; Heterogeneity; Tryptase; Histochemical property

肥大细胞(mast cells, MC)在人与动物体内广泛分布,是一种重要的免疫细胞,其胞浆颗粒内含有多种生物活性物质,如生物胺、蛋白多糖、中性蛋白酶等。肥大细胞通过脱颗粒释放出上述生

物活性物质而对人类及动物的抗病能力发挥重要作用,与人类和动物的某些变态反应性疾病、寄生虫感染、某些非特异性炎症及肿瘤性疾病等密切相关<sup>[1-2]</sup>。自Ehrlich首次在大白鼠结缔组织中发现并命名肥大细胞以来,人们对啮齿动物和人类肥大细胞的生物学特性进行了广泛而深入的研究<sup>[1-2]</sup>。目前,这一领域的研究已成为免疫学发展中的一个重要课题。近10年来,猪、牛、绵羊、山羊、鸡等动物的肥大细胞的研究取得了一定进展<sup>[3-6]</sup>。

收稿日期:2014-05-08

资助项目:福建省教育厅项目(JA11092)

作者简介:林旋(1979-),男,讲师,硕士,主要从事水产动物疾病学研究。

通讯作者:王寿昆,男,教授,硕士, E-mail: wsk138@163.com

与快速发展的哺乳动物免疫学,尤其是与人类免疫学研究相比,两栖动物免疫学的研究还相对比较薄弱。在国内近几年来对两栖动物肥大细胞的研究已有些报道<sup>[7-12]</sup>,随着野生蛙类养殖业的兴起,且作为巨大药物宝库的两栖动物也倍受许多学者的关注,特别是肥大细胞的异质性已成为目前肥大细胞研究的焦点之一。本研究应用改良甲苯胺蓝(MTB)、阿利新蓝-藏红O(AB/SO)、甲基绿-派洛宁(MG-P)和天青II-伊红-瑞氏混合液4种组化染色技术,以及应用小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AAI 通过 Elivision™ 免疫组化染色方法,对虎纹蛙舌头肥大细胞组化性质进行观察,为两栖动物肥大细胞的研究提供基础生物学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

取健康虎纹蛙(购自福州河鲜市场)5只,双毁脊髓后,立即取舌,分别固定于 Carnoy 氏液和 10% 中性缓冲甲醛(10%NBF),常规脱水、透明,石蜡包埋,切片厚度 6 $\mu$ m。

### 1.2 常规组织化学染色

#### 1.2.1 组织化学试剂

甲苯胺蓝、阿利新蓝、番红 O、派洛宁 Y 和伊红为 Amresco 产品,甲基绿和瑞特氏染料为 Sigma 产品。

#### 1.2.2 染色步骤

改良甲苯胺蓝染色法参考文献[13]的方法进行;阿利新蓝-藏红 O 复染法(AB/SO)参考文献[14]的方法进行;甲基绿-派洛宁(Methyl Green-Pyronine, MG-P)染色参考文献[15]的方法进行;天青 II-伊红-瑞氏混合液染色参考文献[16]的方法进行。

### 1.3 Elivision™ plus 免疫组化

#### 1.3.1 免疫组化试剂

鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AAI、即用型非生物素免疫组化 Elivision™ plus 检测试剂盒, Trypsin 胰蛋白酶试剂盒,多聚-L-赖氨酸, DAB 显示剂,人胃癌组织阳性对照片,均购自福州迈新生物技术有限公司。

#### 1.3.2 染色步骤

(1)石蜡切片脱蜡和水化后,用 PBS(pH7.4)冲洗 3 次,各 3 min;(2)抗原修复:胰蛋白酶 37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 15~20 min, PBS 洗 3 次,各 3 min;(3)每张切片加一滴或 50 $\mu$ L 类胰蛋白酶单克隆抗体 AAI, 4 $^{\circ}$ C 过夜;(4)PBS 冲洗 3 次,各 3 min;(5)每

张切片加 1 滴或 50 $\mu$ L 聚合物增强剂,室温下孵育 20 min;(6)PBS 冲洗 3 次,各 3 min;(7)每张切片加 1 滴或 50 $\mu$ L 酶标抗鼠/兔聚合物,室温下孵育 30 min;(8)PBS 冲洗 3 次,各 3 min;(9)每张切片加 2 滴或 100 $\mu$ L 新鲜配制的 DAB 显示液,显微镜下观察 3~10 min,阳性显示为棕色;(10)蒸馏水或自来水冲洗,苏木精复染数秒,自来水冲洗, PBS 冲洗返蓝。阴性对照片不加一抗,其它步骤同。

## 2 结果与分析

### 2.1 肥大细胞的形态及分布

各种常规染色显示,虎纹蛙舌头的肥大细胞所呈的形状和大小都不一,有圆形、椭圆形、梭形、棒状形以及不规则形等,它们有的成群分布,有的散布于结缔组织中。虎纹蛙舌组织中分布有大量肥大细胞,主要分布于固有层的结缔组织和舌头腺体之间,肌层也可见到大量的肥大细胞,并且有沿血管分布的特点。

### 2.2 肥大细胞的组化性质

在以上 4 种常规染色方法中,改良甲苯胺蓝染色法,肥大细胞胞质颗粒明显,且被染成紫红色(图 1、图 2);AB/SO 染色法,肥大细胞胞质被染成蓝色,细胞轮廓清楚,颗粒不及甲苯胺蓝染色的标本清楚,胞核呈淡褐色(图 3);MG-P 染色法,肥大细胞胞质被染成红色,形态清晰、颗粒感与 AB/SO 染色的标本一样(图 4);天青 II-伊红-瑞

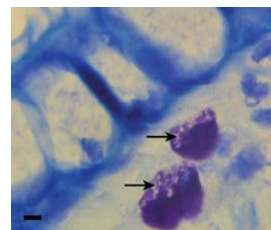


图 1 舌头固有膜肥大细胞  
(改良甲苯胺蓝染色)  
100 $\times$ 10

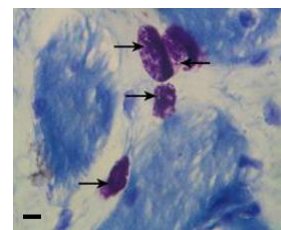


图 2 舌头肌层之间肥大细胞(改良甲苯胺蓝染色)100 $\times$ 10

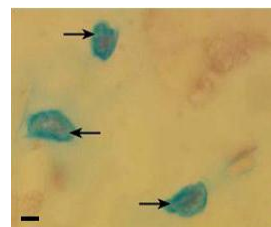


图 3 舌头腺体之间肥大细胞(AB/SO 染色)  
100 $\times$ 10

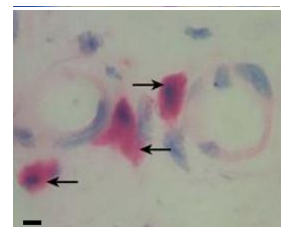


图 4 舌头固有膜肥大细胞(MG-P 染色)  
100 $\times$ 10

氏混合液染色法,肥大细胞胞质被染成深紫红色,颗粒感也不太清楚(图5)。

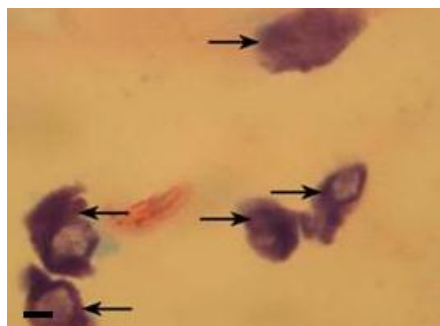


图5 舌头固有膜肥大细胞  
(天青Ⅱ-伊红-瑞氏混合液染色法)100×10

### 2.3 免疫组织化学染色

经NBF固定用Elivision™免疫组化染色的虎纹蛙的舌组织,类胰蛋白酶阳性细胞胞浆染成棕黄色,与上述4种组化方法比较,类胰蛋白酶阳性细胞数量很少,分布于舌固有膜、舌腺体和舌肌层之间(图6、图7)。而胃癌组织镜检时,在肿瘤

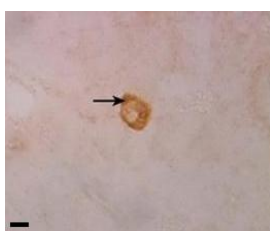


图6 舌头固有膜肥大细胞免疫组化  
100×10

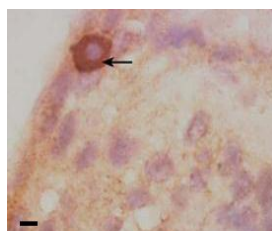


图7 舌头腺体之间肥大细胞免疫组化  
100×10

间质中均能观察到许多胞浆,胞浆颗粒清楚,颗粒颜色为深棕黄色的细胞,即类胰蛋白酶阳性细胞(图8)。阴性对照片胞浆无着色。

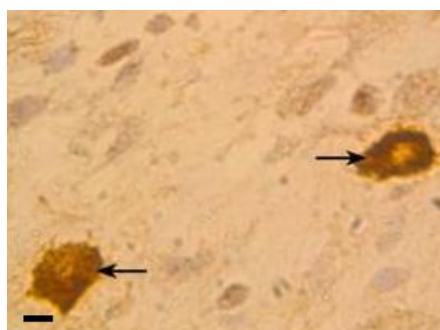


图8 人胃癌间质肥大细胞免疫组化 100×10  
(标尺=20μm)

## 3 讨论

肥大细胞广泛分布于大多数脊椎动物的组织

中,在舌、皮肤、消化道和呼吸道等接受外界刺激较多的部位数量较多,且有沿血管分布的倾向<sup>[17]</sup>。虎纹蛙舌组织中分布有大量肥大细胞,主要分布于固有层的结缔组织中和舌头腺体之间,肌层也可见到大量的肥大细胞,并且有沿血管分布的特点,与张书起等用MTB染色方法显示中华大蟾蜍舌头的肥大细胞主要分布于黏膜层的复层扁平上皮及固有层结缔组织内,肌层分布较少的描述略有不同<sup>[7]</sup>,虎纹蛙与中华大蟾蜍分类地位隶属不同科,相同部位肥大细胞的分布可能存在一些差异。虎纹蛙舌头中肥大细胞沿血管分布的特点与一些关于哺乳类动物肥大细胞分布研究相似,说明两栖类的肥大细胞和哺乳动物肥大细胞一样与血管有着密切的关系,有些学者认为,它们有可能是从血管内向血管外迁移或是参与血管反应<sup>[6,14,18-19]</sup>。Wasserman<sup>[1]</sup>发现呼吸道内肥大细胞常分布于浅表部位,他提出这一分布特点与防御作用有关<sup>[20]</sup>。而舌是与外界抗原直接接触的一个器官,虎纹蛙舌组织中分布了大量的肥大细胞与呼吸道浅表部位的肥大细胞及皮肤肥大细胞一样,对机体也有重要的防御保护作用。

本次研究用Carnoy氏液固定虎纹蛙舌组织,用改良甲苯胺蓝、AB/SO、MG-P和天青Ⅱ-伊红-瑞氏混合液4种组化染色技术进行染色,结果发现这4种方法显示虎纹蛙舌组织的肥大细胞效果都很好,特别是改良甲苯胺蓝法胞浆颗粒特别明显。AB/SO染色时,肥大细胞着蓝色是黏膜肥大细胞(MMC),着染为红色是结缔组织肥大细胞(TMC)。本研究表明,虎纹蛙舌组织肥大细胞胞浆均为着蓝色,即为黏膜型肥大细胞,说明虎纹蛙舌组织肥大细胞胞浆主要含肝素。另外,采用MG-P染色结果,虎纹蛙肥大细胞胞浆颗粒着红色,即肥大细胞胞浆主要含肝素,不含组胺。虎纹蛙这种组化性质类似于哺乳动物黏膜型肥大细胞,也类似于草鱼及胡子鲇肥大细胞的组化性质。揭示虎纹蛙舌组织中肥大细胞的免疫学属性,这对两栖类的生存、病理、种群等可能具有重要的作用。贾雪梅<sup>[21]</sup>研究显示,大鼠舌组织中肥大细胞含有P物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)和Y神经肽(NPY),且免疫反应阳性的肥大细胞与SP、VIP和NPY免疫反应阳性的神经纤维紧密相靠或直接接触或沿神经纤维长轴分布。表明肥大细胞与肽能神经纤维在解剖位置上有着密切关系,这对于维系器官正常生理活动、防御、保护及内环境稳定具有重要作用,蛙类舌组织是否存在SP、



VIP和NPY,有待于进一步研究。

在实验中,用鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AAl 通过 Elivision™ 免疫组化染色方法,对虎纹蛙舌组织肥大细胞进行染色。并分别以 PBS 代替一抗和患胃癌的切片作为阴性和阳性对照,结果发现虎纹蛙舌组织的肥大细胞和胃癌切片均呈良好的交叉反应,阳性细胞胞浆为棕黄色,胃癌的肥大细胞颜色更深,这说明在虎纹蛙的舌组织中的肥大细胞含有类胰蛋白酶,但类胰蛋白酶细胞数量少,主要见于 MMC 分布区域,仅分布在舌固有层和舌腺体之间,而在结缔组织型肥大细胞(CTMC)分布区域,如舌肌层之间和黏膜下的结缔组织中却未发现类胰蛋白酶阳性细胞。与杨冬梅对牛蛙的研究结果一致<sup>[12]</sup>。也说明并不是所有虎纹蛙肥大细胞都含有类胰蛋白酶,很可能是虎纹蛙的 MMC 中含有类胰蛋白酶,而 CTMC 中不含类胰蛋白酶。另外,相同的染色条件下,虎纹蛙肥大细胞类胰蛋白酶阳性反应明显比胃癌间质肥大细胞弱,说明虎纹蛙肥大细胞胞浆颗粒类胰蛋白酶含量较少。虎纹蛙属于低等脊椎动物,可能与生物进化水平较低有关,有待进一步研究。

参考文献:

- [ 1 ] Galli S L. New insight into The riddle of the mast cells micro environmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity[J]. Lab Invest, 1990(60): 146-157 .
- [ 2 ] 许乐仁,江萍.肥大细胞的中性蛋白酶[J].解剖科学进展,2002(8):249-253 .
- [ 3 ] 许乐仁,江萍,Carr M M,等.间接免疫过氧化物酶技术鉴定猪和牛的肥大细胞[J].动物学报,1997,43(3):294-302 .
- [ 4 ] 江萍,许乐仁.绵羊肥大细胞中类胰蛋白酶的证实[J].解剖学报,1996(27):92-94 .
- [ 5 ] 许乐仁.应用酶组织化学技术证实猫,犬肥大细胞中类胰蛋白酶的存在[J].贵州农学院学报,1992(11):29-32 .
- [ 6 ] 江萍,许乐仁.六种动物含类胰蛋白酶肥大细胞的酶组化分析[J].畜牧兽医学报,1997,28(5):416-421 .
- [ 7 ] 张书起,于洪川.中华大蟾蜍舌肥大细胞组化性质的研究[J].农业科学研究,2005,26(1):40-42 .
- [ 8 ] 张文学,赵良真,赵艳红,等.蟾蜍消化道肥大细胞的观察[J].河南师范大学学报(自然科学版),2005,33(4):176-182 .
- [ 9 ] 许乐仁,杨冬梅,欧德渊.牛蛙肥大细胞的组织化学与形态学[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2007,16(6):669-675 .
- [ 10 ] 于洪川,魏智清,张书起,等.蟾蜍和牛蛙皮肤肥大细胞的形态学研究[J].宁夏大学学报(自然科学版),2005,26(3):268-270 .
- [ 11 ] 杨冬梅,许乐仁,欧德渊,等.牛蛙肥大细胞超微结构及其与外周神经的关系[J].山地农业生物学报,2007,26(5):448-451 .
- [ 12 ] 杨冬梅,许乐仁.牛蛙肥大细胞中类胰蛋白酶的证实[J].水产学报,2008,32(4):572-577 .
- [ 13 ] 李芙燕,陈耀星,王子旭.三种饲料添加剂对肉鸡小肠肥大细胞数量分布的影响[J].动物医学进展,2006,27(2):65-68 .
- [ 14 ] Xu L R,Carr M M,Bland A P,et al.Histochemistry and morphology of porcine mast cells[J]. The Histochemical Journal, 1993(25): 516-522 .
- [ 15 ] 申姜颖,柳雅玲,黄庆玉,等.肥大细胞三种染色法的比较研究[J].泰山医学院学报,1997,18(4):255-257 .
- [ 16 ] 张爱子,王仲涛,赵春芳.改良的天青 II-伊红-瑞氏染色的应用[J].河北医学院学报,1995,16(2):93 .
- [ 17 ] 杨冬梅,欧德渊,许乐仁.两栖动物肥大细胞生物学研究进展[J].动物医学进展,2005,24(8):1-6 .
- [ 18 ] Xu L R,Ou D Y, Gao D Y. Histochemistry and morphology of mast cells of primary lymphoid organs in chicken[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry,2001,10(4): 449-455 .
- [ 19 ] 孙泉,余锐萍,王德成,等.肥大细胞在机体防御反应中的作用[J].动物医学进展,2007,28(8):83-86 .
- [ 20 ] Wasserman S I. The lung mast cell:Its physiology and potential relevance to defense of the lung[J]. Environ Health Persp, 1980(35): 153 .
- [ 21 ] 贾雪梅,王盛花,齐威琴,等.大鼠舌组织中肥大细胞与肽能神经纤维的分布[J].解剖学研究,2002,24(4):276-278 .