

特殊染色在非临床药物安全性评价中的应用

高广深, 王晶晶, 存庆, 张洲, 裴天仙, 张锐, 郭传敏, 郭景玥*

天津药物研究院新药评价有限公司 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

摘要: 病理学诊断中特殊染色具有重要的应用价值, 通过长期的改进与创新特殊染色能够有针对性地对组织成分进行染色, 使组织病理学评价更加完善精确。非临床药物评价中常用的特殊染色法有结缔组织染色的 Masson 三色染色法、肌肉染色的磷钨酸苏木素染色法、糖原染色的过碘雪夫染色法、脂质类染色的油红 O 染色法、色素类染色的 Masson-Fontana 染色法, 以及神经组织染色和病理沉着物染色等, 综述特殊染色的主要内容及应用中注意事项。

关键词: 特殊染色; 药物评价; 过碘雪夫染色法; 磷钨酸苏木素染色法; 油红 O 染色法

中图分类号: R965.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 08-1558-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.08.034

Application of special staining in nonclinical drug safety evaluation

GAO Guangshen, WANG Jingjing, CUN Qing, ZHANG Zhou, PEI Tianxian, ZHANG Rui, GUO Chuanmin, GUO Jingyue

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Assessment Co., Ltd., Tianjin 300301, China

Abstract: Special staining possesses important application value in pathological diagnosis. Owing to the perennial improvement and innovation of staining methods, special staining has already been used to stain the specific tissue components, which greatly improves histopathological evaluation and makes the results of assessments more precise. Many special staining methods are commonly used in the evaluation of nonclinical drugs, such as Masson trichrome staining of connective tissues, Mallory phosphotungstic acid hematoxylin staining of muscles, periodic acid-Schiff staining of glycogen, Oil red O staining of lipids, Masson-Fontana staining of pigments, other staining of nervous tissues and pathological deposits, et al. This review summarizes the methods and application of special staining.

Key words: special staining; drug evaluation; Periodic acid-Schiff staining; Mallory PTAH staining; Oil red O staining

药物非临床研究质量管理规范 (good laboratory practice for nonclinical laboratory studies, GLP) 是专门针对于非临床药物安全评价而制定的管理条例。病理学是其中一项重要的研究内容, 而特殊染色作为 GLP 实验室病理评价体系的重要辅助技术之一, 为受试药物所导致的组织病变提供可靠的诊断依据, 是非临床药物安全评价庞大的系统工程中不可或缺的环节^[1]。组织学技术中最常用的染色方法是苏木-伊红 (HE) 染色法, 简单、经济、技术成熟, 在病理染色中应用较为广泛。但是在 GLP 试验过程中经常遇到需要在病理形态学上确认细胞组织成分, 用以判定各种组织病变程度与修复情况, 而这是常规 HE 染色所无法观察到的, 即使借助生

物技术、电镜以及免疫组化等方法, 但也有试验条件不利于普及、耗材昂贵等问题, 特殊染色法的出现便解决了以上难题^[2-3]。

特殊染色是利用特定的染色试剂对被检脏器组织所对应的成分进行染色, 染色物质直接与染料结合呈色, 使组织或者细胞中存在的病变、病原体、以及病理过程中出现的异常物质得到明确的显示, 只有在特殊情况下才使用^[4]。其具有反应特异性、定性准确、步骤简单、成本低廉、结果可靠等优点。GLP 病理实验室中常用的特殊染色类型有结缔组织染色、肌肉染色、糖原与黏液的染色、脂质类的染色、色素类的染色、神经组织的染色、病理性沉着物的染色等。特殊染色能够对 HE 染色无法实现

收稿日期: 2018-01-02

第一作者: 高广深, 男, 本科, 助理实验师, 主要从事病理技术工作。Tel: (022) 84845246 E-mail: gaogs@tjipr.com

*通信作者: 郭景玥, 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事毒性病理研究。Tel: (022) 84845246 E-mail: guojy@tjipr.com

的特殊物质进行标记染色,以明确病变部位,进而可以定性、定位、定量地检测出病变组织细胞内的成分与特殊物质。

1 结缔组织的染色

结缔组织在体内分布广泛,具有防御、联结、修复、以及营养等功能。对于其中胶原纤维的鉴别最常采用 Masson 三色染色法,染色的结果使胶原纤维与肌纤维、胞质和红细胞得到了区分。为了得到良好的染色效果,对于组织标本的固定十分重要:除了对新鲜取材的标本及时固定外,固定液最好选用 Bouin 固定液,以便增强对组织细胞的渗透与固定。载玻片应经过浓硫酸浸泡蒸馏水冲洗以避免出现结晶黏附现象。染料尽量现用现配。因为固定液与试剂染料具有一定的毒性,染色过程中注意做好自我防护^[5]。

GLP 试验中主要用于观察组织器官的损伤程度以及鉴别 HE 染色无法区分的含有纤维成分的肿瘤。在 CCl₄ 诱发大鼠肝纤维化模型以及异种血清诱导大鼠肝纤维化模型中 Masson 三色染色可以非常清楚的显示肝小叶结构被破坏的程度、纤维组织增生分割肝小叶、假小叶的形成等。对组织病理学评价一些肝纤维化药物的治疗效果起着极其重要的作用。

其余还有改良以后的 Van Gieson 染色法、天狼星红染色等。如果需要鉴别弹性纤维和网状纤维,因为其具有嗜银的特点所以可以采用 Foot 染色法,染色结果使网状纤维染色呈黑色、胶原纤维与肌纤维分别为棕褐色和黄色,用于鉴别肿瘤的性质和恶性的程度以及组织中基底膜的变化;而如 Verhoeff 铁苏木素染色法、维多利亚蓝染色法则多用于显示皮肤组织中弹性纤维的变化。

2 肌肉的染色

肌肉组织主要是由肌细胞和少量的结缔组织组成,可根据形态和功能分为平滑肌、骨骼肌、心肌 3 类。利用染料对组织选择性着色的原理,采用 Mallory 磷钨酸苏木素 (PTAH) 染色法,此法操作简单,而且试剂易得;此外还有苏木素碱性复红苦味酸染色法 (HPFP) 以及四重染色法。染色结果使横纹肌呈现蓝色、胶原纤维与网状纤维呈现玫瑰红色,可以用来显示心肌和骨骼肌的基本结构。

实验室在配制 Mallory 染液时,通常会遇到染液成熟周期较长的问题,可以考虑在配制过程中滴加适量浓度的双氧水来促进染液的迅速成熟^[6],双氧水浓度与滴加量应该根据实验室实际情况反复试

验来获得最佳使用剂量。此外,染色时间的把控十分重要,不要过染。如果实验室有温箱的话,可以考虑反应温度在 60 ℃,加速反应时间,取得良好的染色效果。普通 HE 染色不能够清楚显示肌纤维的来源,而 Mallory PTAH 染色法能够更全面的显示肌纤维的多方面病变,对诊断不同肌纤维组织的脂肪变性、黏液变性、坏死及显示修复过程的病变,对于鉴别与区分横纹肌肉瘤有非常重要的意义。

3 糖原与黏液的染色

糖原主要分布在肝、心肌、骨骼肌的细胞质内,是动物体内重要的营养物质。常用的特殊染色法是过碘雪夫 (PAS) 染色法。结果使糖原及阳性物质显示红色,细胞核呈现蓝色。能够区分 HE 染色中的水样变与脂肪变、肾小球基膜的破坏或褶皱、异物寄生虫染色等^[7];判定某些特定肿瘤细胞的起源以及是否发生血管浸润以及对真菌疾病的诊断也有重要的意义^[8]。PAS 染色法是通过氧化剂过碘酸 (periodic acid) 氧化生成醛基,再与染色剂结合而形成紫红色。它可以显示 HE 染色无法确定的精子细胞头部的顶体结构,在生殖毒性试验研究中通过观察精子发生过程中生精上皮细胞组合的周期性形态学变化特点,对精子发生过程精确划分并进行生精上皮周期确定,把精子发生这一连续、复杂的动态过程静止化、具体化,从而更加精确评价睾丸生殖毒性病理学损伤特点。

但是在染色过程中经常会遇到染色效果不好、染色位置出现偏差等等情况,这主要是由于组织固定不及时导致糖原固定不透或不均,还应考虑过碘酸氧化是否完全、试剂有效期、染色时室温温度高低的问题;这样都可引起人工假像以及染色不良。所以对于糖原的固定十分重要,动物进行取材后应在第一时间固定,酒精的使用也能达到良好的效果;条件充分的实验室也可采用交联固定剂。能够保存细胞形态结构完整的前提下使蛋白质得到充分的固定,同样也适用于免疫组化染色^[9]。此外无论是反应中用到的高碘酸溶液或者 Schiff 试剂尽量做到现用现配。

黏液样染色最常用的也是 PAS 染色法,胞浆的红色深浅不一。

4 脂质类的染色

脂质是一类可溶于有机溶剂的混合物,可分为单纯脂质、复合脂质、衍生脂质 3 类^[3]。组织中含有脂质的常用切片方法是冰冻切片机切片法,常

用的特殊染色法是改良的油红 O 染色法。该方法操作简单,油红 O 染料具有和组织内三酰甘油(中性脂肪)着色的特异性,染色结果对比明显:脂肪呈鲜红色、细胞核呈深蓝色。其他的染色方法还有苏丹黑 B 染色法等。

在诊断脂肪变性,通过显示沉积类脂质检测在 GLP 试验中用以评价动脉粥样硬化动物试验、脂肪肝模型、诊断脂肪栓塞以及相关肿瘤的辨别,在一般毒性病理评价中由于试剂二甲苯会将脂滴溶解,细胞空泡变性与脂肪变性极难区分,所以体现了油红 O 染色的重要性。在染色中为了防止脱片,可以采用经过特殊处理的载玻片,油红 O 染料在新鲜配制后应给与足够的时间进行沉淀再使用,由于染料显色与颜料颜色相近,避免待观察组织附着上染料残渣造成人工假像,这也恰恰是试验人员必须注意的。经过多次染色结果比较,异丙醇参与染色的效果比乙醇要好,异丙醇易挥发的缺点可以用密封性较好的染色皿来弥补^[10]。

5 色素类的染色

色素位于细胞内或者细胞间,其种类很多,可以分为黑色素、脂褐素、含铁血黄素、胆色素等,也都有与之对应特殊染色法。GLP 试验中,镜下经常观察到黑色素和部分脂褐素,其在动物内分布广泛:皮肤、毛发、眼球、脉络膜以及软脑膜都可以检测到黑色素沉着^[11]。常规染色为黄棕色,容易混淆,为了证实黑色素等色素的存在,Masson-Fontana 黑色素染色法是常用的特殊染色法。这种发法染色结果稳定,易操作,非特异性染色干扰少^[12]。黑色素具有还原性,能够与氨银液中的银离子反应,镜下观察显示为黑色颗粒。细胞核经过中性红着色为红色。应用于黑色素细胞瘤及相关皮肤病的研究^[13-14],对于神经黑色素的研究也能提供相应的诊断依据。此种方法对反应环境十分苛刻,需要保证使用染色器皿的洁净,细微的沉渣颗粒或者是嗜银离子的存在都会造成误诊。为了解决反应时间过长的问题,可以考虑提高反应温度的方法来解决,目前常用的是微波快速反应法^[15]。

6 神经组织的染色

尼氏体又称尼氏小体,主要分布在神经细胞的胞质内,它的存在与消失是检测神经细胞损害的一项重要指标^[16]。根据尼氏体嗜碱性的特点,尼氏体染色在 GLP 实验室通常使用尼氏焦油紫法,染色结果尼氏体呈蓝紫色,细胞核呈蓝色。神经元与神经

纤维染色可以采用 Bielschowsky 改良法、Glees 和 Marsland 染色法,上述方法都是利用还原剂将硝酸银还原,使银颗粒附着于神经纤维的轴索中,故染色结果呈现黑色。在实验室常规染色中,因为髓鞘中的类脂质被溶解,不容易观察到其形态特点及物质成分,所以神经组织的研究与诊断中均需要特殊染色来证明观察。

特殊染色能够将髓鞘变性早期、中期、晚期 3 个阶段明显的表达出来^[17]。对于神经髓鞘的染色可以采用 Weil 法改良法、Loyez 苏木素染色法、Marchi 变性髓鞘钼酸染色法等。Marchi 变性髓鞘钼酸染色法是将变性的髓鞘选择性的进行染色,正常髓鞘不着色,而 Weil 法改良法的染色结果与之相反,只将正常髓鞘着色。对神经纤维进行特殊染色可以用来观察髓鞘的变性、脱失和崩解,进而为神经系统疾病提供理论依据^[18]。

7 病理性沉着物的染色

在非临床药物评价中病理性沉着物是动物试验经常出现的脏器病变之一,实验室最常用到的是对纤维素和淀粉样物质的检查。纤维素是由纤维蛋白原分子聚合成的特殊蛋白质,又称纤维蛋白^[17]。常用的特殊染色法是改良的 MSB 染色以及 Mallory PTAH 染色法,前者方法虽然步骤较多,但是容易掌握,染色结果能够使新鲜与陈旧的纤维素进行区分。

弥散性血管内凝血(DIC)时血管内出现的微血栓以及一些炎症通过染色可以证明组织内是否存在纤维素。淀粉样物质是由于蛋白质变性所致,属于糖蛋白成分,常沉积于血管壁和结缔组织之中。一般用刚果红(Congo red)染色法。该法染色效果好,易于操作。染色结果淀粉样物质呈现红色,细胞核为蓝色。GLP 试验中可以用于淀粉样变性肾病实验^[19],由于淀粉样变实验动物常自发于心脏、肝脏、肾脏、脾脏及一些相关腺体中,会导致所沉积的组织和器官出现不同程度的病变。实验室也通过刚果红染色区分淀粉样变性及其变性程度,为毒性病理的诊断提供依据^[20]。

8 结语

每种特殊染色法都有特定的染料,且操作流程复杂多变,进行特殊染色时,首先需要搜集染色的相关资料文献,了解染色步骤,且材料应准备齐全。还要确保取材组织新鲜性、病灶部位的完整性。每种固定液各有利弊,在为组织选择固定剂时,应根据组织自身特性做好权衡分析,以确保组织形态学

的清晰及稳定^[21]。常用的中性福尔马林固定液(NBF)、酸性固定液以及含有酒精的 Davison 固定液、Carnoy 固定液等^[22]。染色条件比一般染色要严苛,确保实验器皿的洁净,选择合适的反应环境(例如避光反应)。染色过程中应学会随时记录镜下染色结果,染色所需的时间、温度以及染料的浓度,甚至可替代染料都应根据实验室的实际条件进行调整。在进行毒性病理评价时,出现疑问时要随时对染色所存在的问题进行分析,尤其是人工假像对判读造成的影响更要注意^[23-25]。

不同的特殊染色法都有独特的适用领域、方法步骤、不同特异性的染料以及注意事项等。为了得到准确的染色结果,应该在掌握其共同原理的前提下进行不断的摸索创新,排除影响染色质量的干扰因素,探索出适合的方法。尽管新技术、新方法不断推陈出新,但是特殊染色依然在病理研究中仍占有重要的地位,为非临床药物安全评价提供坚实的评估依据。

参考文献

- [1] 刘昌孝. 药物评价学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 11.
- [2] 鞠学萍. 现代病理学技术条件下特殊染色的应用价值 [J]. 临床病理分析, 2016, 8(12): 35-36.
- [3] 胥维勇. 现代病理学技术条件下特殊染色的应用价值 [J]. 实用医技杂志, 2012, 19(3): 313.
- [4] 赵洁, 任炜, 于普燕, 等. 特殊染色及组织化学技术在病理诊断及科研中的应用 [J]. 临床病理分析, 2013, 28(5): 468.
- [5] 平国强, 唐锦玲, 杨春青. 改良 Masson 三色染色法在应用中的体会 [J]. 实用医技杂志, 2014, 21(6): 603.
- [6] 田玉旺, 李丽, 李琳, 等. 双氧水快速氧化法在 Mallory 磷钨酸-苏木素染色中的应用 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2006, 15(1): 108-109.
- [7] 陈锦, 史炯, 孟凡青, 等. PAS 改良染色法及其在病理诊断中的应用 [J]. 现代肿瘤医学, 2015(21): 3069-3071.
- [8] 祁珊珊. 过碘酸-Schiff(PAS)染色方法的改良及其在病理诊断中的应用 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(7): 826.
- [9] Wang Y, Zhu J, DeLuca H F. Where is the vitamin D receptor [J]. Arch Biochem Biophys, 2012 523(1): 26-33.
- [10] 田玉旺, 李丽, 李琳, 等. 介绍一种改良的油红 O 脂肪染色法 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(6): 100.
- [11] 舒文, 华明. 黑色素的研究进展 [J]. 国外畜牧学: 猪与禽, 2003, 23(2): 31-32.
- [12] Fobtna A. Verfahren zur intensiven und raschen farbung des treponema pallidum und anderer Spirochäten [J]. Dermatol Wochenschrift, 1912, 55: 1003.
- [13] 赵平, 罗金燕, 董蕾, 等. 大黄致豚鼠结肠黑变病动物模型的建立 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2006, 14(5): 308-310.
- [14] Czirbesz K, Gorka E, Balatoni T, et al. Efficacy of vemurafenib treatment in 43 metastatic melanoma patients with BRAF mutation. Single-institute retrospective analysis, early real-life survival data [J]. Pathol Oncol Res, 2017, (10): 2-4.
- [15] 赵炎. 普通银染技术与微波银染技术的比较 [J]. 解剖学杂志, 1995, 18(1): 86-89.
- [16] 付永娟, 朴月善, 卢德宏. 常用特殊染色在神经病理学诊断中的应用 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2014, 14(1): 6-10.
- [17] 刘增辉. 病理染色技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 11-218.
- [18] Wang B Y, Li Y S, Huang G S, et al. Pathological techniques [M]. Beijing: Peoples Medical Publishing House, 2000: 176-189.
- [19] Skorecki K, Chertow G M, Marsden P A, et al. Brenner and Rectors The Kidney [M]. 10th ed. Amsterdam: Elsevier Medicine, 2016: 1130-1132.
- [20] 董鸿瑞, 王艳艳, 杨敏, 等. 不同刚果红染色及观察方法对肾脏淀粉样变病诊断的研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(11): 956-958.
- [21] Eltoun I E, Fredenburgh J, Grizzle W E. Advanced concepts in fixation: effects of fixation on immunohistochemistry and histochemistry, reversibility of fixation and recovery of proteins, nucleic acids, and other molecules from fixed and processed tissues, special methods of fixation [J]. J Histotechnol, 2001, 24(1): 201-210.
- [22] Bancroft J D, Gamble M. 周小鸽, 译. 组织学技术的理论与实践 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2010: 205-208.
- [23] Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Morawietz G, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice-part 1. A joint publication of the RITA and NACAD groups [J]. Exp Toxicol Pathol, 2003, 55(2/3): 91-106.
- [24] Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice-part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups [J]. Exp Toxicol Pathol, 2004, 55(6): 413-431.
- [25] Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice-part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups [J]. Exp Toxicol Pathol, 2004, 55(6): 433-449.