

改良 PAS 染色法在急性肝损伤中的应用

张 风¹ 陶艳艳^{1,2} 陈高峰^{1,2}

(1 上海中医药大学附属曙光医院·肝病研究所,上海,201203; 2 肝肾疾病病证教育部重点实验室,上海,201203)

摘要 目的:观察改良肝脏糖原 PAS 染色法,并观察肝脏糖原染色在急性肝损伤中的应用。方法:复制 CCl₄ 急性肝损伤模型,首次 100% CCl₄ 3 mL/kg 皮下注射,此后 50% CCl₄ 橄榄油溶液 2 mL/kg 每周 2 次共 4 次皮下注射,诱导大鼠急性肝损伤模型。计算大鼠肝体比;HE 染色观察肝组织炎症病理;试剂盒检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)、白蛋白(Alb)。肝脏常规 PAS 染色与改良 PAS 染色观察肝糖原染色。结果:与正常组相比,模型组 ALT、AST 活性与 TBil 含量明显升高($P < 0.05$),Alb 含量明显降低($P < 0.05$);HE 染色示,模型组肝小叶结构排列紊乱,肝细胞脂肪变、气球样变明显。常规 PAS 染色,正常组肝组织 PAS 染色阳性占肝脏面积为 $32.38\% \pm 5.50\%$;与正常组相比,模型组肝组织 PAS 阳性染色明显减少($P < 0.01$),占肝脏面积为 $8.60\% \pm 3.34\%$ 。改良 PAS 染色提示,正常组肝脏可见大量 PAS 阳性染色,占肝脏面积为 $75.50\% \pm 9.02\%$;与正常组相比,模型组肝组织 PAS 阳性染色明显减少($P < 0.01$),占肝脏面积为 $17.61\% \pm 3.53\%$ 。在空白对照组与模型肝组织中,肝糖原改良 PAS 染色阳性率明显高于常规 PAS 染色法($P < 0.01$)。改良 PAS 染色肝糖原阳性染色面积更真实反映急性肝损伤程度。结论:改良肝脏糖原 PAS 染色法有助于急性肝损伤程度评估。

关键词 肝糖原;急性肝损伤;PAS 染色法;改良

Application of improved PAS staining in acute liver injury

Zhang Feng¹, Tao Yanyan^{1,2}, Chen Gaofeng^{1,2}

(1 *Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China*; 2 *Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases (Shanghai University of Traditional Chinese Medicine), Ministry of Education, Shanghai 201203, China*)

Abstract Objective: To study in situ staining of glycogen by modified Periodic acid-schiff (PAS) staining on evaluating acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. **Methods:** Rats were randomly divided into 2 groups: normal group and model group. Except normal rats, all the other rats in model group were injected subcutaneously 100% CCl₄ 3mL/kg once, then 50% CCl₄ 2mL/kg two times a week for 4 times. All the rats were sacrificed on the 15th day. Liver body ratio of rats was calculated; The serum parameters of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBil), albumin (Alb) were assayed. Hepatic inflammation was observed with HE staining. Hepatic glycogen was stained by routine PAS staining and improved PAS staining. **Results:** Compared with the normal group, the activities of ALT and AST and TBil content increased significantly ($P < 0.05$). Alb content was significantly decreased compared with the normal group ($P < 0.05$). HE staining showed that serious structural damage, hepatic steatosis and ballooning degeneration were seen in model group. Routine PAS staining showed that PAS positive staining area accounted for $32.38\% \pm 5.50\%$ in normal group. Compared with the normal group, PAS positive staining area decreased significantly ($8.60\% \pm 3.34\%$, $P < 0.01$). Improved PAS staining showed that PAS positive staining area accounted for $75.50\% \pm 9.02\%$ in normal group. Compared with the normal group, Improved PAS positive staining area decreased significantly ($17.61\% \pm 3.53\%$, $P < 0.01$). In normal group and model group, improved hepatic glycogen staining showed positive staining of PAS was significantly higher than that of routine hepatic glycogen staining ($P < 0.01$). This suggests that the improved PAS staining of liver glycogen positive stained area more truly reflected the degree of acute liver injury. **Conclusion:** The improved of Periodic acid-schiff (PAS) staining method is helpful to improve the evaluation quality degree of acute hepatic injury.

Key Words Hepatic glycogen; Acute hepatic injury; Periodic acid-schiff (PAS); Improvement

中图分类号:R-331 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.02.007

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81102701);上海中医药大学实验技术人才队伍建设资助计划[编号:上中医(2012)人字18号];上海市中医临床重点实验室(编号:14DZ2273200)

作者简介:张风(1989—),女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治慢性肝病,E-mail:zhangfeng1002@126.com

通信作者:陈高峰(1974—),男,主管技师,E-mail:chengaofeng@126.com

肝脏是机体代谢的主要器官,对糖的存储、分布和调节起重要作用。血中葡萄糖可自由通过肝细胞,口服葡萄糖后约 60% 被摄取,进入肝细胞后经葡萄糖激酶迅速被磷酸化为 6-磷酸-葡萄糖(G-6-P),并进一步经糖原合成酶合成为糖原贮存^[1]。在肝脏,当机体需要时,便可分解成葡萄糖,转化为能量;当肝细胞发生弥漫性严重损害时,肝糖原合成障碍及贮存减少,主要表现为磷酸戊糖途径及糖酵解途径相对增强;糖有氧氧化及三羧酸循环运转不佳,肝中葡萄糖-6-磷酸酶活性增加,使肝糖原迅速分解为 6-磷酸-葡萄糖,并在限速酶糖原磷酸化酶催化下,生成葡萄糖补充血糖,导致肝糖原含量明显下降。在评价肝损伤程度时,肝糖原为常规检测项目,糖原的含量能说明肝损伤程度^[2]。肝脏糖原测定有蒽酮法^[3]、氧化酶法^[4]、PAS 染色法^[5],近期我们采用糖原染液试剂,改良肝组织固定方法,成功原位检测肝组织糖原表达位置与水平,用于急性肝损伤的评估。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 20 只,雄性,SPF 级,体重 160~170 g,购自北京维通利华实验动物有限公司,许可证号 SCXK(京)2012-0001,饲养于上海中医药大学实验动物中心,设施许可证号:SYXK(沪)2009-0069,所有动物均自由饮食。

1.2 主要试剂 四氯化碳(Carbon Tetrachloride, CCl_4),化学纯,批号 20140325;橄榄油,化学纯,批号 F20110402,均购自国药集团;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)、白蛋白(Alb)购自上海科华生物。肝糖原过碘酸希夫染色(Periodic Acid-schiff, PAS 染色)试剂盒糖原染液试剂盒(批号 20140925),购自南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 模型制备 CCl_4 急性肝损伤模型参照经典造模法^[6-9]并改进。本实验染毒 5 次,即第 1、4、7、10、13 天上午 9 点各 1 次。首次皮下注射 100% CCl_4 3 mL/kg 大鼠体重,此后 50% CCl_4 橄榄油溶液 2 mL/kg 大鼠体重。正常组大鼠皮下注射相同容积的橄榄油溶液。

2.2 分组 Wistar 大鼠 20 只,按照完全随机分组的原则,分为正常组 8 只,模型组 12 只。

2.3 肝系数与血清肝功能 实验第 14 天晚禁食,第 15 天早晨 9 点杀鼠。肝系数:杀鼠时称量体重、肝重,计算肝重(g)占体重(g)的百分比。腹主动脉

取血,分离血清,测定:1)丙氨酸氨基转移酶(ALT);2)天门冬氨酸氨基转移酶(AST);3)总胆红素(TBil);4)白蛋白(Alb),检测方法均参照试剂盒说明书。

2.4 肝组织病理学观察 实验第 15 天杀检时肉眼大体观察记录,取肝右叶相同部位组织常规 10% 用中性福尔马林液固定,石蜡包埋,作 HE 染色,光镜下观察肝脏组织病理病变。同时取肝右叶相同部位组织制作冰冻切片和 Carnoy 液固定,用于肝糖原染色。根据 CCl_4 急性肝损伤模型的肝组织病理病变特点,参考非乙醇性脂肪性肝病诊疗指南(2010 年修订版)^[10],常规进行肝细胞脂肪变与气球样变积分:1)肝细胞脂肪变:0 分(<5%);1 分(5%~33%);2 分(34%~66%);3 分(>66%)。2)肝细胞气球样变:0 分,无;1 分,少见;2 分,多见。

2.5 肝糖原染色 试剂盒常规肝糖原过碘酸希夫(Periodic acid-schiff, PAS)染色:试剂 A:主要由 1% 过碘酸组成。试剂 B:主要由碱性品红、偏重亚硫酸钠、活性碳等组成。试剂 C:主要由苏木素、乙醇、甘油等组成。乙醇-醋酸-氯仿固定液(卡诺固定液, Carnoy fixative)配方:纯乙醇 3 份+冰醋酸 1 份。常规 PAS 操作步骤:1)肝组织 Carnoy 液固定,常规脱水包埋;2)石蜡切片脱蜡入蒸馏水;3)自来水冲洗 2~3 min,再用蒸馏水浸洗 2 次;4)置于试剂 A 中,室温放置 5~8 min,一般不宜超过 10 min;5)自来水冲洗 1 次,再用蒸馏水浸洗 2 次;6)样本放入试剂 B,置于室温阴暗处,浸染 10~20 min;7)自来水冲洗 10 min;8)样本置于试剂 C 中,染核 1~2 min;9)自来水冲洗 10~15 min 后,更换双蒸水清洗,使其返蓝;10)逐级常规乙醇脱水;11)二甲苯透明;12)中性树胶封固。

改良肝糖原染色:1)肝组织冰冻切片(8 μm);2)置于试剂 A 中,室温放置 5~8 min(一般不宜超过 10 min);3)自来水冲洗 1 次,再用蒸馏水浸洗 2 次;4)样本放入试剂 B,置于室温阴暗处,浸染 10~20 min;5)自来水冲洗 10 min;6)样本置于试剂 C 中,染核 1~2 min;7)自来水冲洗 10~15 min 后,更换双蒸水清洗,使其返蓝;8)逐级常规乙醇脱水;9)二甲苯透明;10)中性树胶封固。

肝糖原面积分析:采用 DP71 软件(奥林巴斯公司,日本)拍摄图片,用奥林巴斯显微镜图像分析软件 Image-Pro Plus IPP 6.1 进行肝组织糖原面积半定量分析。

2.6 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 15.0 进

行统计分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态性和方差齐性的数据用配对 t 检验,不符合正态性或方差齐性的数据用非参数检验;等级资料(炎症分级与纤维化分期数据)进行 $Ridit$ 分析。

3 结果

3.1 CCl₄ 急性肝损伤模型大鼠肝脏系数与血清肝功能的变化 由表 1 可知,与正常组比较,CCl₄ 染毒后模型组体重明显降低($P < 0.01$),肝体比增加($P > 0.01$)。血清肝功能结果显示,与正常组相比,模型组的 ALT 与 AST 活性明显升高($P < 0.01$),TBil

含量明显增加($P < 0.01$),Alb 含量明显降低($P < 0.01$),出现明显的肝功能损害,提示 CCl₄ 染毒成功诱导大鼠急性肝损伤模型(表 1)。

3.2 CCl₄ 急性肝损伤模型大鼠肝脏组织病理学的变化 HE 染色示,正常组大鼠肝组织肝小叶结构正常、排列整齐、无出血、无肝细胞变性、坏死,未见脂肪沉积及炎症细胞浸润;模型组大鼠肝小叶结构排列紊乱,肝细胞脂肪变、气球样变明显加重。 $Ridit$ 分析结果显示,与正常组相比,模型组肝细胞脂肪变与气球样变化明显加重($P < 0.01$)。(图 1,表 2)

表 1 大鼠 CCl₄ 急性肝损伤模型肝脏系数与血清肝功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肝体比(%)	ALT/U · L ⁻¹	AST/U · L ⁻¹	TBiL/U · L ⁻¹	Alb(g/L)
正常组	8	3.07 ± 0.14	30.52 ± 5.81	120.21 ± 19.48	1.98 ± 0.19	29.90 ± 1.13
模型对照组	10	4.57 ± 0.50 **	1144.01 ± 522.15 **	1563.90 ± 761.74 **	6.99 ± 2.49 **	26.25 ± 1.03 **

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 正常组, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. 模型组。

表 2 大鼠 CCl₄ 急性肝损伤肝细胞脂肪变与气球样变半定量分析

组别	鼠数	肝细胞脂肪变 $Ridit$ 分析				肝细胞气球样变 $Ridit$ 分析			
		0	1	2	3	R-值	0	1	2
正常组	8	8	0	0	0	0.0769	8	0	0
模型组	10	1	2	7	1	0.8423 **	0	3	7

注:与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 3 大鼠 CCl₄ 急性肝损伤常规 PAS 染色与改良 PAS 染色肝糖原面积($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	常规肝糖原染色面积(%)	改良肝糖原染色面积(%)
正常组	8	32.38 ± 5.50	75.50 ± 9.02 ^a
模型组	10	8.60 ± 3.34 *	17.61 ± 3.53 * ^b

注:与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与正常组相比, ^a $P < 0.01$;与模型组相比, ^b $P < 0.01$ 。

3.3 CCl₄ 急性肝损伤模型大鼠肝组织糖原染色的变化 常规肝糖原染色结果,正常组肝细胞胞质及胞核内可见中等量玫瑰红色粗大颗粒(PAS 染色阳性),应用 Image-Pro Plus:IPP 6.1 半定量分析肝组织糖原含量占肝脏面积为 32.38% ± 5.50%;与正常组相比,模型组肝细胞胞质及胞核内玫瑰红色粗大颗粒明显减少($P < 0.01$),占肝脏面积为 8.60% ± 3.34%。改良肝糖原染色提示,正常组肝细胞胞质及胞核内可见大量玫瑰红色粗大颗粒(PAS 染色阳性),占肝脏面积为 75.50% ± 9.02%;与正常组相比,模型组肝细胞胞质及胞核内玫瑰红色粗大颗粒明显减少($P < 0.01$),占肝脏面积为 17.61% ± 3.53%。在正常肝组织与模型肝组织中,改良肝糖原染色法 PAS 染色阳性明显高于常规肝糖原染色法($P < 0.01$)。见表 3 与图 1。

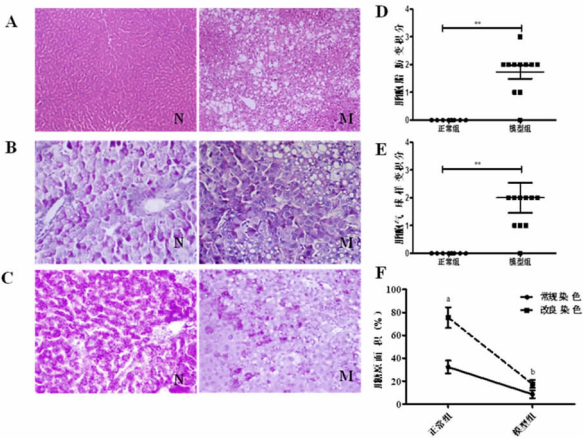


图 1 大鼠 CCl₄ 急性肝损伤 HE 染色、常规 PAS 染色与改良 PAS 染色

注:N 正常组,M 模型组;A:肝组织 HE 染色 × 200 倍;B:肝组织常规 PAS 染色 × 200 倍;C:肝组织改良 PAS 染色 × 200 倍;D:肝细胞脂肪变积分分析;E:肝细胞气球样变积分分析;F:肝组织常规 PAS 染色与改良 PAS 染色半定量分析。与正常组相比, ** $P < 0.01$;与正常组相比, ^a $P < 0.01$;与模型组相比, ^b $P < 0.01$ 。

4 讨论

CCl₄ 为急性肝损伤诱导^[11],CCl₄ 在肝内代谢裂解成三氯甲基 CCl₃⁻ 等自由基,这些自由基攻击肝细胞膜磷脂内不饱和脂肪酸碳链上的氢原子,消耗膜脂质中的不饱和脂肪酸,大量生成脂质过氧化物,导致肝细胞损伤^[12]。本实验表明 CCl₄ 诱导大鼠急性肝损伤,表现为血清中 ALT、AST 活性以及 T. Bil 含量与正常组有显著性升高;血清中 Alb 含量与正常组明显降低。肝组织 HE 染色显示,模型组大鼠肝小叶结构排列紊乱,肝细胞脂肪变、气球样变

明显加重。

如前所述,测定肝糖原的方法很多,其中蒽酮法受试剂、温度、方法稳定性差等因素的影响,结果重现性不好,而且使用试剂多,溶液配制和操作过程复杂。氧化酶法检测肝糖原含量的方法优于蒽酮法。其操作简便,结果稳定、重复性好,适合不同动物模型肝糖原含量的检测。但是若不用缓冲液调整水解液的 pH 值,直接用碱中和则往往会出现中和不足或过量的问题,很难掌握好中和点^[13]。而且蒽酮法与氧化酶法均不适合肝糖原原位检测。PAS 染色法^[5]是目前采用较多的肝糖原原位染色检测,常规 PAS 染色法采用乙醇-醋酸-氯仿固定液(卡诺固定液),能较好地保存糖原,但有使糖原流动到细胞一侧甚至漏出现象,一般认为是由于固定剂把细胞内的糖原推向固定剂对组织浸透的方向而造成^[14],与本实验中常规 PAS 染色肝糖原偏向肝细胞一侧并减少的显示结果一致。近期我们采用糖原染液试剂盒,简化实验流程,肝组织不采用卡诺固定液固定直接冰冻切片,成功原位检测肝组织糖原表达位置与水平,肝糖原均匀分布于整个肝细胞,肝糖原阳性染色明显强于常规 PAS 染色。大鼠皮下注射 CCl₄ 后可使肝细胞产生化学性损伤,因此肝细胞对葡萄糖的摄取减少,肝糖原的合成亦相应减少。本研究结果提示 CCl₄ 染毒 2 周后大鼠体重明显减轻、ALT 与 AST 活性明显升高,TBil 含量明显增加,Alb 含量明显降低,HE 染色可见肝细胞脂肪变、气球样变化明显,提示 CCl₄ 染毒成功诱导大鼠急性肝损伤。常规 PAS 染色与改良 PAS 染色均提示,模型组大鼠肝糖原面积较正常组大鼠明显减少。由于以往操作方法经常出现实验结果不理想,为此本实验取材于急性肝损伤的大鼠肝脏,参照常规 PAS 染色法,对实验中肝糖原染色方法的固定作了探索性的

改进,即采用肝组织冰冻切片,无须卡诺固定液固定,大大节省实验流程与时间,同时,更好的保留肝组织糖原,本实验结果表明改良 PAS 染色法切实可行,肝糖原阳性染色面积更符合急性肝损伤的程度。

参考文献

- [1] 戚仲铎,王友赤. 诊断学[M]. 4 版,北京:人民卫生出版社,1995: 406.
- [2] 陈文斌,陈永亮,卢灿荣,等. 肝糖原贮备对热缺血再灌注大鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 消化外科,2006,5(6):447-450.
- [3] 高珊,童英,熊晓燕,等. 蒽酮法与试剂盒法测定糖原含量的比较研究[J]. 首都公共卫生,2011,5(1):38-40.
- [4] 柳占彪,张少卓,李玉红,等. 应用氧化酶法对高糖高脂动物模型肝糖原含量的测定[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(1):34-36.
- [5] 王媛,邓锋,肖咏丽,等. 肝脏组织 PAS 染色方法的探讨[J]. 疾病预防控制通报,2012,27(1):5-6.
- [6] 龚峻梅,朴英杰,陈素云. 急性 CCl₄ 肝损伤的研究进展[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册,2002,22(3):308-310.
- [7] 陈雪龙. 实验性肝损伤动物模型的研究进展[J]. 实验动物科学,2008,25(3):47-59.
- [8] 黄正明,杨新波,曹文斌,等. 化学性及免疫性肝损伤模型的方法学研究[J]. 解放军药学报,2005,21(1):42-46.
- [9] 雷扬,周爱民,郭涛,等. 痰热清注射液对急性肝损伤大鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志,2013,38(8):1226-1230.
- [10] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学会. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010 年修订版)[S]. 胃肠病学和肝病学杂志,2010,19(6):483-487.
- [11] 陈成伟. 药物与中毒性肝病[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:11.
- [12] 汪涛,姜华,陆国才,等. 四氯化碳肝脏毒性机制的研究进展[J]. 毒理学杂志,2007,21(4):338-339.
- [13] 柳占彪,张少卓,李玉红,等. 应用氧化酶法对高糖高脂动物模型肝糖原含量的测定[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(1):34-36.
- [14] 陈小萍,吴钦穗. PAS 组织化学染色的几点体会[J]. 福建医药杂志,2006,28(6):178-179.

(2014-12-26 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 177 页)

- [6] Jing-huaPeng, Yi-yang Hu, Yang Cheng, et al. Effect of JIANPI HUOXUE decoction on inflammatory cytokine secretion pathway in rat liver with lipopolysaccharide challenge[J]. World Journal of Gastroenterology, 2008,14(12):1851-1857.
- [7] 傅琪琳,胡义扬,冯琴,等. 基于均匀设计的健脾活血方改善酒精性肠渗漏的主效应中药分析[J]. 中西医结合学报,2011,9(11):1234-1241.
- [8] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2009,9:799-809.
- [9] Sta-Lenert S, Das S, Batra SK, et al. Muc17 protects intestinal epithelial cells from enteroinvasive E. coli infection by promoting epithelial

barrier integrity[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 300:G1144-G1155.

- [10] Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004,286:C1213-C1228.
- [11] Förster C. Tight junctions, and the modulation of barrier function in disease[J]. Histochem Cell Biol, 2008,130(1):55-70.
- [12] Elamin E, Masclee A, Dekker J, et al. Ethanol disrupts intestinal epithelial tight junction integrity through intracellular calcium-mediated Rho/ROCK activation[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014,306(8):677-685.

(2014-12-26 收稿 责任编辑:洪志强)