

doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2018.02.01

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-4432.2018.02.01>

## 三种特殊染色方法在角结膜原位癌基底膜染色中的应用

高欢欢, 张平, 林健贤, 张文忻, 唐丽娟, 李永平

(中山大学中山眼科中心临床病理科, 眼科学国家重点实验室, 广州 510060)

**[摘要]** 目的: 比较过碘酸-Schiff法(Periodic Acid-Schiff, PAS), 六亚甲基四胺银法(Grocott Methenamine silver, GMS), Gomori氏氢氧化银氨法(Gomori)三种特殊染色方法显示角结膜原位癌基底膜完整性的优缺点, 寻找较合适的染色方法。方法: 选取中山大学中山眼科中心2012年1月至2017年9月期间收治的20例角结膜原位癌标本, 分别采用PAS、GMS、Gomori三种染色, 显微镜下观察角结膜原位癌基底膜显示状态。结果: 三种染色方法都能显示角结膜原位癌基底膜, 但其鲜艳程度不同, 与背景反差程度不同。GMS染色基底膜呈深棕色而与黄棕色背景反差较小; Gomori染色基底膜显黑色与背景区分较明显, 但有较多银颗粒沉积而影响观察; PAS染色基底膜呈紫红色, 基底膜形态清晰可见, 背景浅, 反差明显。结论: 三种染色均可良好地显示角结膜原位癌基底膜, 其中PAS染色显色更为鲜明、与背景反差更明显、操作更为方便, 是一种理想的基底膜染色方法。

**[关键词]** 角结膜原位癌; 基底膜; 特殊染色

## Application of three special staining methods in the basement membranes in corneal and conjunctival carcinoma in situ

GAO Huanhuan, ZHANG Ping, LIN Jianxian, ZHANG Wenxin, TANG Lijuan, LI Yongping

(Department of Clinical Pathology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, State Key Laboratory of Ophthalmology, Guangzhou 510060, China)

**Abstract** **Objective:** To compare the advantages and disadvantages of Periodic Acid-Schiff (PAS), Grocott Methenamine silver (GMS) and Gomori special staining methods in displaying the basement membranes in corneal and conjunctival carcinoma in situ, and to find the more suitable staining method. **Methods:** Twenty samples of corneal and conjunctival carcinoma in situ in the Clinical Pathology Department of Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University from January 2012 to September 2017 were stained with three special staining methods of PAS, GMS and Gomori. We observed the staining results of basement membranes under microscope in cornea and conjunctiva carcinoma in situ. **Results:** The basement membranes in cornea and conjunctiva

收稿日期 (Date of reception): 2017-12-29

通信作者 (Corresponding author): 张平, Email: zhangping@gzzoc.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (30371515)。This work was supported by National Natural Science Foundation of China (30371515).

carcinoma in situ could be showed in all the three special staining methods. They were dark brown in GMS staining with yellow-brown background. They were black in Gomori staining with deposited silver particles in the background. The basement membranes were bright purple in PAS staining with light purple background and good contrast to background. **Conclusion:** PAS is an ideal method in showing basement membranes in corneal and conjunctival carcinoma in situ with bright color and strong contrast to background in these three special staining methods.

**Keywords** cornea and conjunctiva carcinoma in situ; basement membrane; special staining

原位癌, 又称Bowen氏病, 或上皮内上皮癌。多见于老年人, 好发于角结膜交界处, 为单眼发病的一种缓慢生长的交界性肿瘤<sup>[1]</sup>。其癌细胞仅局限于上皮层, 不破坏上皮基底膜, 完整而清晰的基底膜是本病的诊断要点。而HE染色常无法清楚显示基底膜, 导致无法判断肿瘤细胞是否已经侵犯破坏基底膜, 需通过特殊染色来确定基底膜是否完整。

文献[2-4]中报道的有关基底膜的染色方法主要有糖原染色的过碘酸-Schiff法(Periodic Acid-Schiff, PAS)和霉菌染色的银浸染法, 如六亚甲基四胺银法(Grocott Methenamine silver, GMS)、Gomori氏氢氧化银氨法(Gomori)。田澄等<sup>[5]</sup>观察微波辐射PAS染色法显示声带鳞状细胞癌早期基底膜改变, 为正确判断瘤细胞有无突破基底膜提供了依据; 戚晓东<sup>[6]</sup>采用过碘酸六铵银染色法显示肾小球基底膜; Pujar等<sup>[7]</sup>比较了PAS和荧光吡啶黄PAS观察口腔扁平苔藓中基底膜状态。有关角结膜原位癌基底膜染色的研究尚未见报道。

本文分别采用PAS染色法、GMS染色法、Gomori染色法观察角结膜原位癌基底膜状态, 比较这三种染色着色情况并分析, 旨在为角结膜原位癌找到一种简单、高效的基底膜染色法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

收集中山大学中山眼科中心2012年1月至2017年9月期间, 经两名病理医师确诊的20例角结膜原位癌的标本。其中男10例, 女10例。年龄42~86(平均61.5)岁。发生于角膜4例, 结膜6例, 角结膜10例。标本经10%甲醛溶液固定, 常规脱水、透明、石蜡包埋。每例标本连续切片8张, 厚度3  $\mu\text{m}$ , 随机分为四组, 每组两张: 1)常规HE染色组; 2) PAS染色组; 3) GMS染色组; 4) Gomori染色组。本文研究中涉及的人体组织标本获得中

山眼科中心医学伦理委员会审批。

### 1.2 试剂配制

参照梁英杰等编著《临床病理学技术》<sup>[8]</sup>, 1)PAS染色主要试剂: ①0.5%过碘酸水溶液: 过碘酸0.5 g, 蒸馏水加至100 mL。②无色品红液: 碱性品红1 g, 加入200 mL煮沸的蒸馏水中完全溶解, 冷却至50  $^{\circ}\text{C}$ , 加入1 mol/L盐酸20 mL, 待溶液冷至25  $^{\circ}\text{C}$ 左右, 加入偏重亚硫酸1.5 g, 于室温暗处24 h, 加入活性碳1.5 g, 静置1~2 h。双层滤纸过滤到小口砂塞瓶内, 此时溶液应完全无色, 即为无色品红, 又称Schiff氏液。2)GMS染色主要试剂: ①8%铬酸水溶液。铬酸8 g, 蒸馏水加至100 mL。②六胺银贮备液。将3%六次甲基四胺溶液50 mL, 加入2.5 mL 5%硝酸银溶液即形成白色沉淀, 摇动立即溶解。③六胺银工作液。取1.6 mL的5%四硼酸钠溶液, 加入8 mL的六胺银贮备液中, 最后加入蒸馏水20 mL。3)Gomori染色主要试剂: ①Gomori银氨液。10%硝酸银3 mL, 加入10%氢氧化钾1 mL, 即发生棕黑色颗粒沉淀, 观察此溶液的总量并记下, 加入约10倍以上的蒸馏水洗涤沉淀物, 倾去上层清液, 再加入蒸馏水, 如此反复洗涤3次, 最后加蒸馏水凑足原来记下的总量。逐滴滴入氢氧化铵, 并不断轻轻震荡, 直至沉淀物完全溶解。再一次加入10%硝酸银数滴至溶液稍变混浊, 再小心加入氢氧化铵1滴至数滴, 使溶液恰又变清。最后按原总量加蒸馏水10倍稀释, 用棕色瓶保存于4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用前取出恢复到室温。②0.5%  $\text{KMnO}_4$ 溶液。③2%草酸溶液。④2.5%铁明矾溶液。⑤10%甲醛溶液。

### 1.3 染色方法

1)常规HE染色组。所有切片进行HE染色。2) PAS染色组。切片常规脱蜡至水, 蒸馏水润洗。用0.5%过碘酸水溶液氧化10 min。流水冲洗, 再

用蒸馏水稍洗。滴加无色品红液覆盖组织, 于暗处加盖作用10~20 min。流水冲洗2 min。常规脱水透明。二甲苯透明。中性树胶封固。3) GMS染色组。切片常规脱蜡至水, 蒸馏水润洗。8%铬酸水溶液氧化10 min。蒸馏水稍水洗, 置入六胺银工作液, 微波炉中低火力2 min, 至切片呈黄褐色。蒸馏水洗。无水酒精脱水。二甲苯透明。中性树胶封固。4) Gomori染色组。切片常规脱蜡至水, 蒸馏水润洗。0.5%  $\text{KMnO}_4$ 水溶液氧化5 min, 水洗, 2%草酸水溶液1~2 min, 至切片漂白即可。水洗, 入2.5%铁明矾溶液3 min, 蒸馏水冲洗3 min, 氨银溶液浸染3~5 min。蒸馏水速洗后入10%甲醛还原1 min, 为避免染色不均, 染色时一直振荡切片。流水冲洗5~10 min。常规脱水透明, 中性树胶封固。

高倍( $\times 100$ ,  $\times 200$ )镜检下观察。比较三种染

色方法基底膜显示状态。

## 2 结果

### 2.1 常规 HE 染色结果

角结膜原位癌组织病理学上可见上皮细胞大小不等、排列紊乱, 核浆比增大, 有异型, 但基底膜欠清晰(图1)。

### 2.2 三种不同基底膜染色方法的结果

PAS染色角结膜原位癌, 基底膜清晰可见, 对比明显, 无背景色; GMS染色, 角结膜原位癌基底膜呈深棕色而与背景黄棕色反差较小, 区分不明显; Gomori染色法显示角结膜原位癌基底膜呈黑色, 对比强烈但是有较多的银颗粒沉积而导致背景着色(图2, 3)。

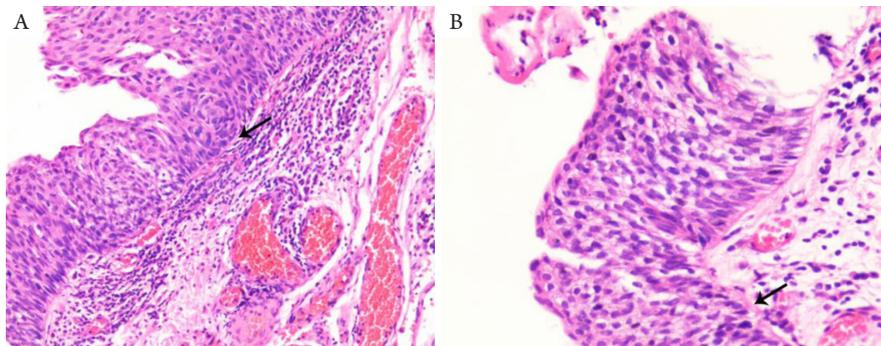


图1 角结膜原位癌HE染色图

Figure 1 HE staining of cornea and conjunctiva carcinoma in situ

(A)  $\times 100$ ; (B)  $\times 200$ . 箭头所示为基底膜。

(A)  $\times 100$ ; (B)  $\times 200$ . The solid arrows show basement membranes.

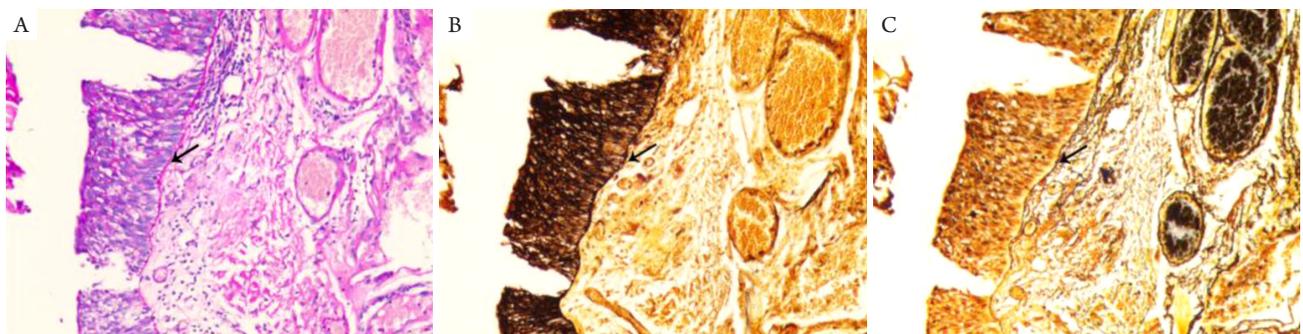


图2 三种角结膜原位癌基底膜染色图( $\times 100$ )

Figure 2 Three special staining methods of basement membranes in cornea and conjunctiva carcinoma in situ ( $\times 100$ )

(A) PAS染色; (B) GMS染色; (C) Gomori染色。箭头所示为基底膜。

(A) PAS staining; (B) GMS staining; (C) Gomori staining. The solid arrows show basement membranes.



图3 三种角结膜原位癌基底膜染色图( $\times 200$ )

Figure 3 Three special staining methods of basement membranes in cornea and conjunctiva carcinoma in situ ( $\times 200$ )

(A)PAS染色; (B)GMS染色; (C)Gomori染色。箭头所示为基底膜。

(A) PAS staining; (B) GMS staining; (C) Gomori staining. The solid arrows show basement membranes.

### 3 讨论

原位癌, 是一种复发率高的皮肤癌, 可发生在身体各个部位, 以头面部及颈肩部等暴露部位常见<sup>[9-10]</sup>。病理特点为原位癌肿瘤只局限于上皮层内, 未突破基底膜, 染色见基底膜完整; 而原位癌早期浸润, 突破基底膜, 染色见基底膜断裂缺失。常规病理切片HE染色显示基底膜着色不明显, 镜下观察困难且容易误诊。因此寻找好的特殊染色方法鉴别基底膜形态的完整性具有重要的意义。

本文通过比较PAS、GMS、Gomori三种特殊染色方法, 发现PAS染色法优于其他两种方法:

1)GMS染色角结膜原位癌基底膜呈深棕色而与背景黄棕色反差较小; Gomori染色虽基底膜显黑色较明显, 但是有较多银颗粒沉积的背景色。Gomori染色原理是通过染液中银离子与基底膜的糖蛋白结合, 前者经甲醛醛基还原为金属银, 银离子沉积于基底膜而呈黑色, 从而使基底膜显示出来。而氨银液很敏感, 受光或空气中氧的作用后均易解离出银盐而导致银颗粒沉积, 产生背景。

2)在应用GMS和Gomori染色时发现: 若染色过程中不注意染色细节, 极易造成组织切片染色效果不佳。对玻璃器皿要特别注意洁净, 如有杂质容易产生沉淀, 导致背景污浊; 总体不如PAS染色直观、容易操作。

因此观察角结膜原位癌基底膜, PAS染色为首选方法。染色结果较满意, 上皮细胞与基底膜形态学间相互关系一目了然, 有利于直观判断与

比较。

PAS染色方法常用来显示糖原、黏蛋白、真菌等物质, 在显示角结膜原位癌基底膜染色中, PAS染色有以下几个方面需注意:

1)高碘酸氧化时间一般为10 min, 若周围环境温度低于常温, 应适当延长氧化时间; 反之周围环境温度高, 适当缩短氧化时间。此步骤是PAS染色的关键步骤, 利用高碘酸的氧化功能, 充分氧化糖类及有关物质中的1,2-二醇基转为醛类, 醛与Schiff氏液结合生成品红色复合物而显色。因此, 氧化程度的好坏直接影响染色效果。

2)Schiff氏液使用前应注意是否无色, 是否有刺激性气味。正常Schiff氏液无色透明、含二氧化硫刺激性气味, 如果颜色变红、刺激性气味消失, 可加入少量偏重亚硫酸钠或数滴亚硫酸二氧。在Schiff氏液染片过程中, 应加盖以防二氧化硫气体挥发。染色时间方面, 一般为10 min, 若Schiff氏液试剂新鲜配制或储存时间短, 二氧化硫浓度高, 染色时间适当缩短5 min。此步染色时间的掌握比较重要, 不宜过长或过短。若染色时间短, 则糖原未能表达出来, 或着色过浅, 影响基底膜的观察。过长则除糖原着色外, 间质也将着色, 基底膜染色与背景区分不明显, 影响对比度, 不利于观察。笔者认为只要肉眼观察组织切片出现轻微的淡红色即可终止Schiff染色。

综上所述, 比较PAS、GMS、Gomori三种染色方法中, 在显示角结膜原位癌基底膜状态方面, PAS是一种相对简单、高效而且显示基底膜效果较好的染色方法。

## 参考文献

- 赵辨. 中国临床皮肤病学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001: 1519.  
ZHAO Bian. Clinical dermatology[M]. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 2001: 1519.
- 郑伟, 胡志坚, 张春梁, 等. 基底膜染色方法比较及在胃粘膜异型增生与胃腺癌中的应用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(2): 169-173.  
ZHENG Wei, HU Zhijian, ZHANG Chunliang, et al. Comparison between different staining methods of basement membrane and their application in gastric epithelial dysplasia and gastric adenocarcinoma[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2016, 25(2): 169-173.
- 郭效忠, 董建强. 六次甲基四胺-硝酸银基底膜染色改良法在肾活检组织中的应用[J]. 诊断病理学杂志, 2010, 17(3): 233.  
GUO Xiaozhong, DONG Jianqiang. The application of modified Grocott methenamine basement membrane staining in renal biopsy[J]. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2010, 17(3): 233.
- 王晓燕, 高俊岩, 王艳霞. 网状纤维染色在临床病理诊断中的应用及技术[J]. 中国医药导报, 2016, 13(9): 72-75.  
WANG Xiaoyan, GAO Junyan, WANG Yanxia. Introduction and role of reticular fiber staining in pathological diagnosis of tumors[J]. China Medical Herald, 2016, 13(9): 72-75.
- 田澄, 金玉兰, 赵晓丽, 等. 微波辐射PAS染色显示声带鳞状细胞癌早期的基底膜改变[J]. 诊断病理学杂志, 2011, 18(6): 450-453.  
TIAN Cheng, JIN Yulan, ZHAO Xiaoli, et al. Demonstration of early changes of basement membrane in squamous cell carcinoma of the vocal cords with modified PAS stain[J]. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2011, 18(6): 450-453.
- 戚晓东. 肾小球基底膜PAMS染色方法的应用体会[J]. 诊断病理学杂志, 2012, 19(2): 159.  
QI Xiaodong. The application and experience of glomerular basement membrane with PAMS staining[J]. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2012, 19(2): 159.
- Pujar A, Pereira T, Tamgadge A, et al. Comparing the efficacy of hematoxylin and eosin, periodic acid Schiff and fluorescent periodic acid Schiff-acriflavine techniques for demonstration of basement membrane in oral lichen planus: a histochemical study[J]. Indian J Dermatol, 2015, 60(5): 450-456.
- 梁英杰, 凌启波, 张威, 等. 临床病理学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 231.  
LIANG Yingjie, LING Qibo, ZHANG Wei, et al. Technology of clinical pathology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011: 231.
- 嵯欣欣, 康定华, 徐春兴. 鲍温病的治疗进展[J]. 皮肤病与性病, 2012, 34(5): 268-270.  
ZHUO Xinxin, KANG Dinghua, XU Chunxing. The advance treatment of Bowen's disease[J]. Journal of Dermatology and Venereology, 2012, 34(5): 268-270.
- 单葵, 李桂明. Bowen病的临床与病理分析[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(14): 2202-2204.  
SHAN Kui, LI Guiming. Clinical and pathological features of Bowen's disease[J]. China Journal of Modern Medicine, 2006, 16(14): 2202-2204.

本文引用: 高欢欢, 张平, 林健贤, 张文忻, 唐丽娟, 李永平. 三种特殊染色方法在角结膜原位癌基底膜染色中的应用[J]. 眼科学报, 2018, 33(1): 32-36. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2018.02.01

**Cite this article as:** GAO Huanhuan, ZHANG Ping, LIN Jianxian, ZHANG Wenxin, TANG Lijuan, LI Yongping. Application of three special staining methods in the basement membranes in corneal and conjunctival carcinoma in situ[J]. Yan Ke Xue Bao, 2018, 33(1): 32-36. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2018.02.01