

三种特殊组织化学染色在急性心肌缺血猝死病例中的对比研究

马 婷, 刘智峰, 陈 焱, 杨婷婷, 马 晶, 陈玉瑞, 陈安宁, 张玉玲, 刘红梅, 常 越*

宁夏医科大学, 宁夏 银川

Email: 1284680757@qq.com, *cy197837@126.com

收稿日期: 2021年5月24日; 录用日期: 2021年6月13日; 发布日期: 2021年6月28日

摘 要

目的: 探讨三种组织化学染色方法在急性心肌梗死中的染色规律及其在心肌梗死早期的形态变化上的应用价值。方法: 采用HE染色、Nagar-Olsen染色、Heidenhain染色(铁矾-苏木素-伊红染色)和Heidenhain氏苏木精法染色, 对9例建模成功的急性心肌梗死大鼠心脏标本和15例急性心肌梗死猝死者心肌标本进行染色, 并设5例正常大鼠心肌标本和5例假手术组大鼠心肌标本作为对照。结果: Nagar-Olsen染色、Heidenhain染色、Heidenhain氏苏木精法染色在急性心肌梗死心肌中阳性表达率分别为75%、54%、50%, 在正常心肌组表达均呈阴性。对35例标本均进行了HE染色, 结果显示细胞核的改变只在梗死区出现, 在非梗死区心肌纤维表现为细胞水肿, 胞质红染, 胞核无明显病变, 很难与对照组心肌鉴别。上述三种方法在组间的阳性表达率比较未见差异($P > 0.05$)。但急性心肌梗死组与假手术组及对照组阳性表达率比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组均行HE染色, 显示在梗死区出现细胞核的改变, 在非梗死区心肌纤维表现为细胞水肿, 胞质红染, 胞核无明显病变, 与对照组心肌很难鉴别。结论: Nagar-Olsen染色、Heidenhain染色、Heidenhain氏苏木精法染色在急性心肌缺血猝死诊断中均有应用价值, 在实际工作中可以通过HE染色结合Heidenhain氏苏木精法染色以提高诊断率; 通过HE染色结合Nagar-Olsen染色确定梗死区的范围。

关键词

急性心肌梗死, 特殊染色, 猝死

Comparative Study of Three Special Histochemical Stains in Sudden Acute Myocardial Ischemia

Ting Ma, Zhifeng Liu, Han Chen, Tingting Yang, Jing Ma, Yurui Chen, Anning Chen, Yuling Zhang, Hongmei Liu, Yue Chang*

Ningxia Medical University, Yinchuan Ningxia

*通讯作者。

文章引用: 马婷, 刘智峰, 陈焱, 杨婷婷, 马晶, 陈玉瑞, 陈安宁, 张玉玲, 刘红梅, 常越. 三种特殊组织化学染色在急性心肌缺血猝死病例中的对比研究[J]. 临床医学进展, 2021, 11(6): 2866-2871. DOI: 10.12677/acm.2021.116416

Email: 1284680757@qq.com, *cy197837@126.com

Received: May 24th, 2021; accepted: Jun. 13th, 2021; published: Jun. 28th, 2021

Abstract

Objective: To investigate the staining regularity of three histochemical staining methods in acute myocardial infarction and their application value in the morphological changes in the early stage of myocardial infarction. **Methods:** HE staining, Nagar-Olsen staining, Heidenhain staining and Heidenhain's hematoxylin staining were used to stain the cardiac 9 cases of successful acute myocardial infarction rat heart specimens and 15 patients with sudden death due to acute myocardial infarction. The myocardial specimens of 5 normal rats and 5 sham rats were used as control. **Results:** The positive expression rates of Nagar-Olsen staining, Heidenhain staining and Heidenhain's hematoxylin staining in the myocardium of acute myocardial infarction were 75%, 54% and 50%, respectively, and the expression in normal myocardial group was negative. HE staining was performed on all 35 specimens, and the results showed that the changes in the nucleus only occurred in the infarct area. In the non-infarct area, the myocardial fibers showed cellular edema, cytoplasmic red staining, and no obvious lesions in the nucleus, which was difficult to differentiate from the myocardium in the control group. **Conclusion:** Nagar-Olsen staining, Heidenhain staining and Heidenhain's hematoxylin staining have application value in the diagnosis of acute myocardial ischemic sudden death. In practice, HE staining combined with Heidenhain's hematoxylin staining can improve the diagnostic rate. HE staining combined with Nagar-Olsen staining was used to determine the extent of the infarct.

Keywords

Acute Myocardial Infarction, Special Staining, Sudden Cardiac Death

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

急性心肌梗死是临床中常见急症,也是成年人在日常生活及临床工作中引起猝死最常见的原因之一。急性心肌梗死早期不具有典型的形态改变,使判断死亡的原因造成困难,为了探讨组织化学染色方法对法医实践中的诊断及鉴别的帮助作用,进一步确定 Nagar-Olsen 染色、Heidenhain 染色、Heidenhain 氏苏木精法染色在急性心肌梗死猝死鉴定中的应用价值,本研究采用 HE 染色、Nagar-Olsen 染色、Heidenhain 染色(铁矾-苏木素-伊红染色)和 Heidenhain 氏苏木精法染色对实验大鼠作比较性研究,以便寻找到简易可行、结果可靠的染色方法,为急性心肌梗死的早期形态诊断提供可靠依据。

2. 材料和方法

2.1. 材料

实验用 SD 大鼠均由宁夏医科大学实验动物中心提供,实验设备由宁夏医科大学基础医学院实验平台提供,急性心肌梗死猝死者心肌标本来自 2016 年~2018 年病理学系法医病理检验案例。

2.2. 实验步骤

2.2.1. 分组

6~8 周龄健康雄性 SD 大鼠 19 只, 体重 200~250 g, 随机将大鼠分成假手术组 5 只, 心肌梗死组 9 只和对照组 5 只。

2.2.2. 准备实验器材及试剂

狗兔二用解剖台、手术灯、电子秤、双凹夹、止血带、大鼠固定用泡沫砖、大头针、固定线、1 ml 注射器、手术刀、手术剪、止血弯钳、眼科剪、培养皿、缝针、非吸收性外科缝线、无菌纱布、无菌棉球、一次性使用灭菌橡胶外科手套、生理盐水、水合氯醛(300 mg/kg)、利多卡因(1 mg/kg)、生理信号采集处理系统。各梯度乙醇, 二甲苯, 1% 盐酸乙醇, 苏木精, 伊红, 明矾苏木素液, 碱性复红染色液, 蒸馏水, 纯丙酮, 0.1% 苦味酸纯丙酮液, 5% 硫酸铁铵溶液。

2.2.3. 麻醉

- 1) 称重: 将大鼠放在电子秤上, 读数并记录;
- 2) 计算麻醉剂量: 大鼠腹腔注射水合氯醛(300 mg/kg)。

2.2.4. 冠状动脉左前降支结扎及关胸

- 1) 保持大鼠于自然呼吸状态, 仰卧位固定于手术台, 连接 BL-420 生物机能实验系统, 记录心电图变化;
- 2) 大剪刀剪除大鼠胸前区毛, 碘伏消毒, 使用一次性灭菌橡胶外科手套;
- 3) 用手术剪沿大鼠胸骨左缘 4~5 肋间隙剪开皮肤约 2 cm, 围皮层切口做一荷包缝合(4 针缝法);
- 4) 用手术剪沿肌肉走行钝性分离胸大肌和前锯肌;
- 5) 助手持止血弯钳于胸骨左缘第 4 肋间稍用力穿透肋间肌进入胸腔, 并迅速沿肋间隙方向撑开肋骨以暴露心脏;
- 6) 同时助手左手拇指置于左侧胸腋部, 食指、中指、无名指置于大鼠右侧胸腋部, 适当用力将心脏快速挤出;
- 7) 术者在左心耳与肺动脉圆锥交界处平左心耳下缘约 2 mm 处, 以 6-0 带线缝合针快速结扎左冠状动脉前降支(LAD), 进针深度 1.5~2 mm;
- 8) 结扎后立即将心脏放回胸腔, 助手快速双手手指挤压两侧胸廓排出胸腔空气, 同时术者拉紧荷包外科打结关闭胸腔, 无菌纱布覆盖伤口[1];
- 9) 假手术组左冠状动脉前降支下心肌缝线, 但不结扎;
- 10) 记录结扎后 60、120、180 min II 导联心电图。测定 J 点及 T 波电压, 计算其变化值。

2.3. 染色方法

2.3.1. HE 染色

- 1) 中性甲醛液固定组织, 石蜡切片, 常规脱蜡至水; 2) 放入苏木精染色 5~20 分钟; 3) 水洗, 显微镜下观察细胞核的深浅, 推测分化的时间; 4) 1% 盐酸乙醇分化数秒; 5) 水洗, 显微镜下观察细胞核的深浅是否合适, 决定是否蓝化或需要重染或再分化; 6) 染色深浅适中的切片自来水蓝化 5 分钟; 7) 伊红染数秒; 8) 75% 85% 乙醇洗涤 30 秒; 9) 95% 乙醇 I 洗涤 0.5~2 分钟; 10) 95% 乙醇 II 脱水 2~5 分钟; 11) 无水乙醇 I 脱水 2~5 分钟; 12) 无水乙醇 II 脱水 2~5 分钟; 13) 二甲苯 I 透明 1 分钟; 14) 二甲苯 II 透明 1 分钟; 15) 中性树胶封固[2]。

2.3.2. Nagar-Olsen 染色

1) 中性甲醛液固定组织, 石蜡切片, 常规脱蜡至水; 2) 入明矾苏木素液 10~30 s; 3) 自来水 5 min, 用蒸馏水洗 2 次; 4) 碱性复红染色液 3 min; 5) 蒸馏水洗 5~10 s; 6) 纯丙酮洗 5 s; 7) 0.1% 苦味酸纯丙酮液迅速分化 5~15 s; 8) 纯丙酮脱水, 二甲苯透明和中性树胶封固[3]。

2.3.3. Heidenhain 染色(铁矾 - 苏木素 - 伊红染色)

1) 切片脱蜡至水; 2) 媒染于 5% 硫酸铁铵 7 min; 3) 水洗 15 min; 4) 苏木精液染色 7 min; 5) 水洗 5 min; 6) 5% 硫酸铁铵分化(镜下控制到正常心肌纤维无色为止); 7) 流水冲洗 10 min; 8) 70% 乙醇 1 min; 9) 伊红 40 s; 10) 85% 乙醇 40 s; 11) 95% 乙醇 1 min; 12) 无水乙醇 1 min × 2 次; 13) 二甲苯 1 min × 3 次; 14) 中性树胶封固[4]。

2.3.4. Heidenhain 氏苏木精法染色

1) 石蜡切片脱蜡至水; 2) 5% 硫酸铁铵水溶液中媒染 60 min; 3) 蒸馏水急洗 5~10 s; 4) 放入 Heidenhain 氏苏木精溶液内 60 min; 5) 以 5% 硫酸铁铵水溶液与蒸馏水 1:1 稀释分化并流水冲洗交替进行(镜下控制); 6) 流水冲洗 10 min; 7) 脱水、透明、树胶封片[5]。

2.4. 判定标准

HE 染色结果判定标准: 正常心肌纤维染色为粉红色, 胞质、胞核显示清晰, 细胞膜完整, 细胞排列规则, 细胞间隙适中[2]。

Nagar-Olsen 染色结果判定标准: 缺氧心肌、红细胞呈红色; 正常心肌呈黄色或黄棕色, 细胞核呈蓝色[3]。

Heidenhain 染色(铁矾 - 苏木素 - 伊红染色)结果判定标准: 正常心肌纤维呈红色, 胞核呈灰色; 病变心肌呈黑褐色, 缺血心肌、红细胞呈灰黑色[4]。

Heidenhain 氏苏木精法染色结果判定标准: 正常心肌呈棕黄色, 心肌纤维胞质内未见黑点; 病变心肌梗死区大部分心肌纤维胞质内出现黑点, 呈灶状或片状分布, 胞核也呈黑色[5]。

2.5. 统计学分析

应用 SPSS19.0 软件包进行分析, 各组间阳性率比较采用 χ^2 检验。各种方法比较采用秩和检验。

3. 结果

3.1. HE 染色结果

对 35 例标本均进行了 HE 染色, 对照组心肌纤维染色为粉红色, 胞质胞核及组织结构清晰; 急性心肌梗死组梗死区心肌纤维可出现凝固性坏死、核固缩、碎裂、消失, 胞质均呈不规则粗颗粒状, 间质水肿, 有少量中性粒细胞浸润。非梗死区心肌纤维表现为细胞水肿, 胞质红染, 胞核无明显病变, 与对照组心肌很难鉴别。

3.2. Nagar-Olsen 染色结果

Nagar-Olsen 染色显示对照组及假手术组心肌呈浅棕色, 无艳红的缺氧心肌存在; 急性心肌梗死组在梗死区周围可见心肌呈艳红色, 呈灶状或片状分布。

3.3. Heidenhain 染色结果

Heidenhain 染色显示对照组心肌呈红色, 无黑色的缺氧心肌存在; 急性心肌梗死组梗死区大部分心

肌纤维胞质内出现黑点，呈灶状或片状分布。

3.4. Heidenhain 氏苏木精法染色结果

Heidenhain 氏苏木精法染色显示，对照组及假手术组心肌呈棕黄色，心肌纤维胞质内未见黑点；急性心肌梗死组，梗死区大部分心肌纤维胞质内出现黑点，呈灶状或片状分布，胞核也呈黑色。

3.5. 不同染色方法在各组表达的结果

表 1 结果显示 Nagar-Olsen 染色、Heidenhain 染色、Heidenhain 氏苏木精染色在大鼠急性心肌梗死模型组中阳性表达率分别为 70%，50%和 50%；在急性心肌梗死猝死组中阳性表达率分别为 73%，53%和 53%；在正常心肌组表达均呈阴性。上述三种方法在以上两组的阳性表达率比较未见统计学差异($P > 0.05$)。

Table 1. The positive rate of three kinds of histochemical staining in each group

表 1. 三种组织化学染色法在各组表达的阳性率

分组	Nagar-Olsen 染色					Heidenhain 染色					Heidenhain 氏苏木精染色				
	-	+	++	+++	阳性率%	-	+	++	+++	阳性率%	-	+	++	+++	阳性率%
对照组	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
假手术组	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
大鼠急性心肌梗死模型组	3	2	3	2	70	5	1	2	2	50	5	3	1	1	50
急性心肌梗死猝死组	4	5	4	2	73	7	2	4	2	53	7	3	4	1	53

与大鼠急性心肌梗死模型组及急性心肌梗死猝死组比较，* $P < 0.01$ ；三种方法两两经秩和检验比较 P 值分别为 0.375, 0.245, 0.16。

4. 讨论

猝死是指平时看起来健康的人，因为潜在的自然疾病突然发作或者恶化，而发生的急骤性死亡。世界卫生组织将猝死定义为 6 h 内发生的非创伤性、不能预期的死亡，但更多学者主张定义为发病后 1 h 内死亡。其特点是急骤性和意外性。从病因学方面分类，根据其是否合并心血管疾病，猝死可分为心源性猝死(SCD)和非心源性猝死(非 SCD)。SCD 约占全部猝死病例的 80%，而非 SCD 约占全部猝死的 20% [6]。因此，应用病理学新技术，进行冠心病猝死的早期诊断的研究，成为法医病理学研究的重要课题之一。

虽然急性 SCD 的早期病理改变常规的组织病理学检查有时很难发现典型的形态学改变，但我们对各组标本均进行了 HE 染色，是为了确定梗死区的范围和观察梗死区边缘心肌缺血的病理变化。与此同时观察到在梗死区内有明显的细胞核的改变，而在三组染色标本中非梗死区心肌纤维的形态没有明显差别。因此 HE 染色在观察早期心肌缺血方面应以胞质的变化为主。其正常心肌主要表现为纤维染色为粉红色胞质、胞核及组织结构清晰；缺血心肌纤维浊肿、嗜酸性增强，心肌肌浆凝固、横纹不清或消失，呈波浪状改变。

寻找更灵敏有效且操作简便的染色方法并将其用于病理实践中，对鉴别和诊断早期心肌缺血具有非常重要的意义。特殊组织学染色灵敏度高、特异性强，价格低廉，是一种有实践价值的诊断早期心肌缺血性改变的方法。目前，主要常用于心肌缺血诊断的组织学染色方法有 Heidenhain 染色、Nagar-Olsen 染色等。Heidenhain 氏苏木精染色是一种传统的染色方法，用于细胞核的染色观察，能够清晰地显示染色体、染色质以及细胞质中线粒体的位置。除此之外，还可以使髓鞘染色。

本研究对上述三种特殊染色方法和 HE 染色进行比较，Heidenhain 染色对照组心肌纤维染色为粉红色，胞浆、胞核及组织结构清晰；疑似心肌缺血缺氧组中有不同程度的心肌肥大、局灶性肌浆凝集、嗜酸性

变等心肌缺血改变；心肌梗死组心肌改变明显，表现为心肌纤维浊肿、嗜酸性增强、心肌肌浆凝固、横纹不清或消失、呈波浪状改变，胞浆胞核结构消失，并有散在的中性白细胞浸润[7]。同时，本研究也发现缺血 15 min 时 Nagar-Olsen 染色在左室心内膜及乳头肌处见点状心肌纤维阳性着色，并随缺血时间的延长阳性着色面积进一步扩大。该方法阳性结果清晰，对比度好，但要求实验人员技术熟练，特别是苦味酸丙酮浸润这一步兼有对比染色和分化的双重作用，分化程度较难掌握，浸染时间过长或过短可产生假阴性或假阳性结果[8]。Nagar-Olsen 染色在梗死区周围的心肌显示为明显的艳红色并大致勾勒出坏死的边缘，有助于确定梗死区的范围及面积。研究还显示 Heidenhain 染色、Heidenhain 氏苏木精染色虽然方法不同，操作步骤不一样，但结果基本一致，且在急性心肌梗死组中，Heidenhain 染色强阳性率为 40%，显著高于 Heidenhain 氏苏木精染色的强阳性率 20%。因此，文献中大多采用的是 Heidenhain 染色[3]。

5. 结论

综上所述，Heidenhain、Nagar-Olsen 和 Heidenhain 氏苏木精染色法均能运用于日常尸体检验和病理检查中，在常规取材和组织处理、石蜡切片等一般条件下，其能较好地显示心肌缺血和心肌梗死的形态改变。上述三种特殊染色方法应用于心源性猝死的诊断和鉴别且对提高心源性猝死的诊断和鉴别水平具有重要的促进作用。

基金项目

2019 年大学生创新创业训练计划项目(S201910752032)。

参考文献

- [1] 陈科, 唐正伟, 万峰, 刘金铜, 张洪艳, 张龙, 孙永宁. 大鼠自主呼吸下建立急性心肌梗死模型[J]. 四川动物, 2012, 31(1): 135-138.
- [2] 王伯运, 李玉松, 黄高昇, 张远强. 病理学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 30-31.
- [3] 丁伟, 王德田. 简明病理学技术[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2014: 148-149.
- [4] 龚志锦, 詹铭州. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 92.
- [5] 陈冰, 陈阳, 闫宜峰, 陶香香, 何雷. 不同组织化学染色在急性心肌缺血猝死鉴定中的应用研究[J]. 山西医科大学学报, 2013, 44(2): 99-102+166.
- [6] 张道琴, 杨呈伟, 彭明亮, 黄连军. 心源性猝死防治的最新研究进展[J]. 中国医药, 2020, 15(11): 1799-1803.
- [7] 胡志红, 王庭, 吴萍. 心肌 Heidenhain 染色在冠心病猝死诊断中的应用观察[J]. 九江学院学报(自然科学版), 2011, 26(1): 46-49.
- [8] 毕海涛, 杨莹, 刘霞, 黄建业, 王松军, 李英敏, 丛斌. 3 种特殊染色在急性心肌梗死死后诊断中的应用比较[J]. 中国法医学杂志, 2013, 28(4): 330-332+361.