



1例育成期比格犬皮下肿瘤的组织病理染色分析

饶干, 欧兆佳, 何嘉欣, 石观稳, 龙海斌, 赵志宏, 周治东, 胡敏华*

(广州医药研究总院有限公司 国家犬类实验动物资源库, 广东广州 510240)

摘要:犬皮肤肿瘤的发病常受到犬的品种和年龄影响, 常见于老龄犬而鲜见于育成犬, 尤其少见于育成期的比格犬。本文报告了1例育成期比格犬自发性肿瘤的病例, 并对其组织进行组织采样、病理染色分析和鉴别。肿瘤组织苏木精-伊红染色检查发现, 犬肿瘤组织位于真皮层, 呈局灶性分布, 内含大量嗜酸性胞质, 细胞核形态异常。免疫组织化学结果表明, 组织 Vimentin 和 CK 为阳性, 而 α -SMA、KI67、S-100 和 CD₃₄ 均为阴性。结合病理染色结果分析, 初步判定可能是纤维组织细胞瘤。本次病例报告有望为今后的犬肿瘤疾病诊断提供依据, 也为实验用比格犬的质量控制工作提供新的视角。

关键词:成纤维细胞瘤; 苏木精-伊红染色; 免疫组织化学染色; 病理诊断

[中图分类号] S858.29

[文献标志码] A

[文章编号] 1004-6704(2025)-03-0060-05

Histopathological Staining Analysis of a Subcutaneous Tumor in Beagle during Breeding Period

RAO Gan, OU Zhaojia, HE Jiaxin, SHI Guanwen, LONG Haibin,
ZHAO Zhihong, ZHOU Zhidong, HU Minhua*

(Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., National Canine Laboratory
Animal Resources Center, Guangzhou, Guangdong 510240, China)

Abstract: The incidence of skin tumors in canine is often influenced by breed and age. They are more common in elderly and rarely seen in growing dogs, especially in growing Beagles. This article reports a case of spontaneous tumor in a beagle during the growing period, and conducts tissue sampling, pathological staining analysis and identification. Hematoxylin-eosin staining of the tumor tissue revealed that the canine tumor was located in the dermis, distributed focally, and contained a large amount of eosinophilic cytoplasm with abnormal nuclear morphology. Immunohistochemical results showed that Vimentin and CK were positive, while α -SMA, KI67, S-100 and CD₃₄ were negative. Combined with the analysis of pathological staining results, the preliminary conclusion was probably fibrous histiocytoma. This case report provides a basis for the future diagnosis of canine tumor disease and new perspective for the quality control of beagle.

Key words: fibroblastoma; hematoxylin-eosin staining; immunohistochemical staining; pathological diagnosis

犬皮肤肿瘤诱因相对复杂, 病毒感染、过敏、内分泌紊乱等因素均能引起其皮肤肿瘤^[1]。发病部位

在四肢、头部、会阴臀尾、背部和腹部的病例均有报道, 雌性犬的发病率略高于雄性犬^[2]。而且, 有文献报道表明, 其肿瘤发生概率与品种存在潜在关联, 如贵宾犬、金毛寻回犬等犬种的皮肤肿瘤发病率远高于中华田园犬, 即纯种犬的发病概率高于杂种犬^[3-4]。此外, 皮肤肿瘤多发于老龄犬, 尤其以 9 岁为高风险发病年龄段, 表现为皮肤表面疣状突起, 病灶界限清晰且有一定的角质化, 严重者或不加干预

[收稿日期] 2024-12-19

[基金项目] 广东省重点领域研发计划项目(2023B0303040004)

[第一作者] 饶干(1996-), 男, 硕士研究生, 执业兽医师, 主要从事比格犬质量控制与资源共享方面的工作。
E-mail: 1807654842@qq.com

* [通信作者] 胡敏华, E-mail: 85539817@qq.com

可能会引起破损溃疡^[5]。然而,关于育成期犬的皮肤肿瘤报道极为少见。比格犬是国际公认的犬类实验动物,由于其品系稳定、突变概率低,已广泛应用于新药安评与研发、公共卫生、生命科学以及人类医学等领域^[6]。因此,在实验比格犬中发现良性肿瘤的存在,并做出鉴别诊断意义重大。本文对 1 例 8 月龄雌性比格犬皮肤肿瘤进行样品采集、病理染色和免疫组织化学染色观察,结合国内外相关参考资料,对该病例肿瘤做出鉴别诊断,为今后的犬肿瘤疾病诊断提供依据,也为实验用比格犬的质量控制工作提供新的视角。

1 材料和方法

1.1 肿瘤来源

本次病例来源于广州医药研究总院实验动物中

心兽医室。病例月龄为 8 月龄,雌性,肿瘤位于左前肢及足趾部。均位于体表,直径均在 0.5 cm 以内。所采集的肿瘤其外观图片如图 1 所示。

1.2 试剂与器材

1.2.1 实验试剂 见表 1。

1.2.2 实验器材 见表 2。

1.3 苏木精-伊红染色

采集肿瘤瘤体及附件健康组织样本,PBS 洗净血液后,迅速放进 4%多聚甲醛溶液中。随后组织放进塑料盒,流水冲洗超过 12 h 后取出,依次浸入二甲苯和浓度由低到高的乙醇中脱水。再浸入乙醇和二甲苯完成组织透明。透明后样品体积缩小,并且呈现暗红色代表透明成功。组织透明完成后,浸入石蜡二甲苯溶液中,完成浸蜡,再用 55 °C 石蜡液完成包埋,并切片成 4 μm 的薄片。持续烘片 36 h

表 1 实验试剂

Table 1 Experimental reagents

试剂名称	厂家	货号
通用型组织固定液	武汉塞维尔生物科技有限公司	G1101
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	10023418
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	100092683
苏木素染液	武汉塞维尔生物科技有限公司	G1004
α -SMA	武汉塞维尔生物科技有限公司	GB111364
Vimentin	武汉塞维尔生物科技有限公司	GB11192
KI67	武汉塞维尔生物科技有限公司	GB111499
S-100	武汉塞维尔生物科技有限公司	GB15359
CD ₃₄	武汉塞维尔生物科技有限公司	GB15013
CK	武汉塞维尔生物科技有限公司	GB122053
DAB 显色液	武汉塞维尔生物科技有限公司	G1212
山羊抗兔 IgG	武汉塞维尔生物科技有限公司	GB23323
山羊抗鼠 IgG	武汉塞维尔生物科技有限公司	GB23301

表 2 实验器材

Table 2 Experimental apparatus

名称	厂家	型号
脱水机	DIAPATH	Donatello
包埋机	武汉俊杰电子有限公司	JB-P5
冻台	武汉俊杰电子有限公司	JB-L5
病理切片机	上海徠卡仪器有限公司	RM2016
组织摊片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司	KD-P
烤箱	天津市莱玻璃仪器设备有限公司	GFL-230
粘附载玻片	武汉塞维尔生物科技有限公司	G6012-1
包埋框(单格)	武汉塞维尔生物科技有限公司	EF-1
包埋成形框	武汉塞维尔生物科技有限公司	WGK2424

后,采用二甲苯中脱蜡、梯度酒精脱水、苏木精染色液染色、盐酸酒精分色、双蒸水中 15 min 终止分色、梯度酒精脱水、伊红染色液浸染、无水乙醇浸泡后,二甲苯中透明。透明完成后,将切片用中性树脂封片,置于阴凉处保存,待树脂凝固后即可在显微镜下观察组织学病变。

1.4 免疫组织化学染色

组织切片完成脱蜡复水,采用柠檬酸缓冲液进行抗原修复,随后依次采用 85% 甲醇处理、30% H_2O_2 灭活内源性酶、10% 马血清封闭。对组织采用 α -SMA、Vimentin、KI67、S-100、 CD_{34} 和 CK 抗体在 4 °C 下孵育 16 h。然后,样品与相对应的 HRP 标记的二抗孵育,用二氨基联苯胺(DAB)进行阳性表达可视化,并用苏木素完成细胞核染色。对每个切片随机截取 6 个视野拍摄图像并采用 Image J 完成定量分析,最后将定量分析结果以其阴性对照组为参照进行归一化并作图分析。

本文结果采用全景切片扫描仪完成扫描,3DHISTECH(Hungary)扫描浏览软件完成图片采集,结果图片预处理和排版采用 Adobe Photoshop 2020 完成。

2 结果与分析

2.1 犬肿瘤外观

由图 1 可知,犬皮肤肿瘤呈圆形局灶性结节,颜色较白质地硬,边界清晰且体积较为均一,直径均在 0.5 cm 左右。

2.2 犬肿瘤组织苏木精-伊红染色

犬肿瘤组织苏木精伊红染色结果如图 2 所示。可见皮肤组织表皮,厚薄不均,棘层肥厚,并可见皮突向下延伸(a)。少量皮突相互交织,真皮层胶原纤维交错排列,皮肤附属器毛囊以及皮脂腺等散在分布,数量丰富;真皮层胶原纤维交错排列,局部真皮与皮下分界不清,且皮肤附属器毛囊以及皮脂腺数量减少(b)。

黑色方框表示高倍镜视野,可见肿物位于真皮层,呈局灶性分布。含有大量嗜酸性细胞质,细胞核具有明显多形性,大小不等且偏于一侧,可见双核细胞(c);淋巴细胞、粒细胞和巨噬细胞浸润(d)。胞核固缩、碎裂或溶解,胞质嗜酸性红染,坏死周围可见少量多核巨细胞浸润(e)。

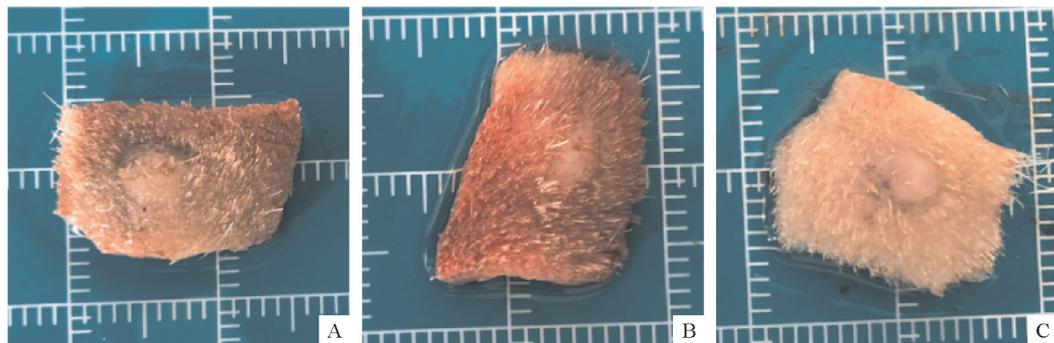


图 1 犬皮下肿瘤外观

Fig. 1 Appearance of subcutaneous tumors in canine

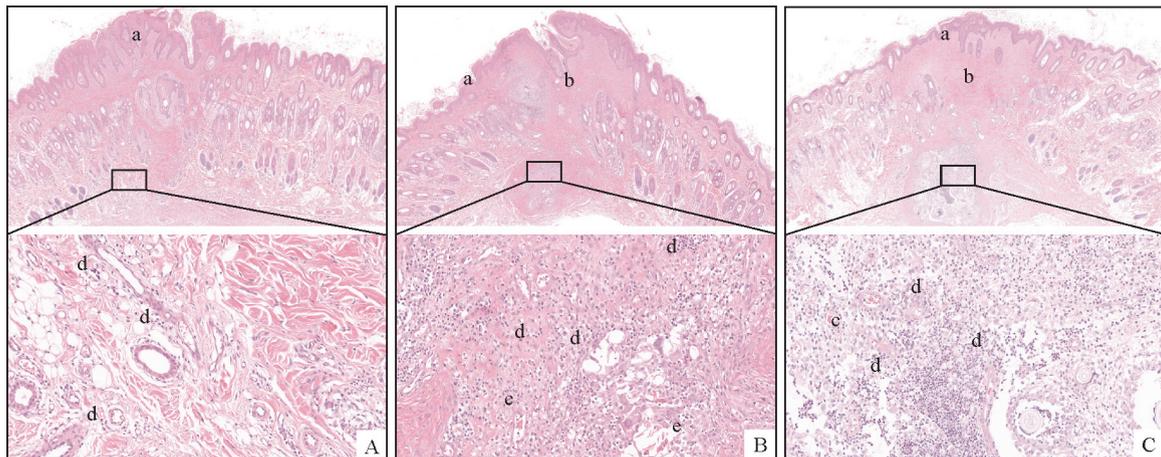


图 2 犬皮下肿瘤 HE 染色结果

Fig. 2 HE staining results of subcutaneous tumor in canine

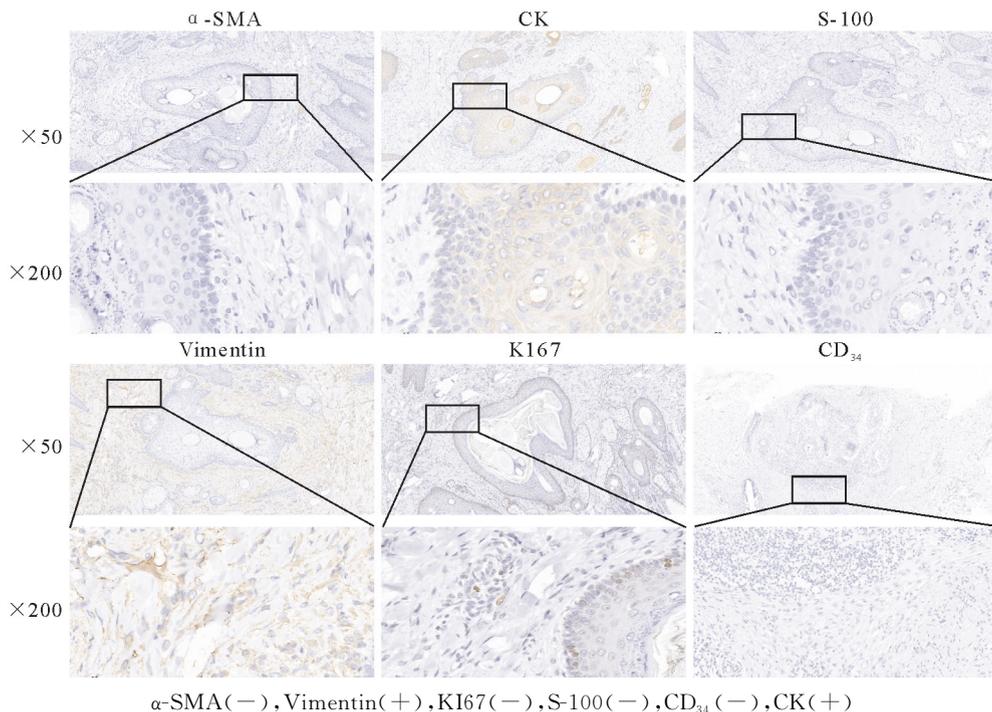


图 3 犬皮下肿瘤免疫组化染色结果

Fig. 3 Results of immunohistochemical staining of canine subcutaneous tumor

2.3 犬肿瘤组织免疫组化染色

由图 3 可知犬皮肤肿瘤区免疫组化染色结果发现,瘤区 CK 和 Vimentin 呈阳性,其他指标均为阴性。

3 讨论

犬肿瘤疾病的发生严重影响其生存质量,恶性肿瘤的迁移则会导致其预后不佳,因此,对犬肿瘤疾病需要及时发现和鉴别诊断,才能针对性地完成治疗工作。比格犬作为试验专用的模式动物,一般以其发病少,品系稳定,突变概率低而被广泛应用于生物医药试验与研发行业,因而做好其繁育过程中的疾病防治和质量控制工作意义重大。加之犬肿瘤疾病多发于老龄犬,在育成期发现体表异常肿物的案例极为少见。而本次病例首次发现了育成期比格犬也存在皮肤肿瘤,分布于前肢跖部。通过外观观察其体积较为均一旦界限清晰,初步判定为良性肿瘤,然而,具体分型还需要结合病理染色结果和免疫组化进行分析鉴别。

病理染色结果发现,真皮层内存在局灶性肿物,细胞核多型,且出现固缩、碎裂,棘层肥厚等。刘红等^[7]在对 1 例纤维组织细胞瘤的诊断过程中,发现病例瘤区位于真皮组织内的局限性增生,棘层肥厚,可见核分裂象,与本次病例的肿瘤组织病理分析结果有一定的相似性。杨宝凤等^[8]对 14 例纤维组织细胞瘤的病例样本进行病例分析,结果发现瘤区位

于真皮层,界限清晰,组织细胞核形态多样。此外,赵洋等^[9]对 5 例纤维组织细胞瘤样本进行病理分析,发现其瘤界清晰,位于真皮层,瘤体外有纤维性包膜环绕。本次病例发现的皮肤肿瘤的 HE 染色结果与上述病例有一定的共同表征,初步指向纤维组织细胞瘤,但是,其鉴别诊断还需要结合免疫组化染色结果。

本次免疫组化染色参照旷冬梅等人对犬肿瘤组标记物进行免疫组织学染色检测,选取了 α -SMA, CK, KI67, S-100, CD₃₄ 和 Vimentin^[10]。结果发现,瘤区组织 CK 和 Vimentin 呈阳性而其他肿瘤标记物均为阴性。CK 又称上皮角蛋白,是上皮细胞的主要骨架成分,一般用于上皮源性肿瘤的鉴别诊断,并且通常与 Vimentin 联合来看确定肿瘤来源^[11]。Vimentin 又称为波形蛋白,是细胞骨架中间丝蛋白质之一,其主要参与细胞迁移、神经细胞与胶质细胞发育,并且有证据表明其在成纤维细胞和内皮细胞中存在特异性高表达^[12]。现有研究表明 Vimentin 既可通过整合素结合引起蛋白质的磷酸化引起信号放大的级联反应,又可通过作为活化的钙蛋白酶和基质金属蛋白酶(MT1-MMP)的中间联系影响细胞外基质重塑、血管生成、脂质代谢等过程促进肿瘤的发生发展^[13]。此外,肿瘤组织的 Vimentin 高表达可上调肿瘤细胞的粘附及迁移能力,从而影响预后^[14]。陈虎等^[15]报道了在对 7 例软组织肿瘤组织进行 Vimentin 免疫组织化学染色,结果发现有 3 例

组织 Vimentin 均为强阳性,占比 42%。更有报道表明,在纤维组织增生性肿瘤组织内,发现瘤细胞排列紧密,出现细胞坏死,并且伴有 Vimentin 阳性的免疫表型^[16]。因此,Vimentin 的强阳性能一定程度的指向肿瘤组织内有大量的纤维组织增生。因此,可以通过 Vimentin 的强阳性表达,结合瘤体位置处于真皮层,可以指向性地推断瘤区有大量成纤维细胞。综合以上结果,推断该病例可能是成纤维细胞瘤。

4 结 论

结合犬肿瘤发病部位、病理染色及肿瘤标志物表达情况,初步判定其为犬成纤维细胞瘤。

参考文献:

- [1] 何 丹,王金秋,李 志,等.犬皮肤肿物 74 例[J].中国兽医杂志,2013,49(1):61-63.
HE D, WANG J Q, LI ZH, et al. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 49(1): 61-63.
- [2] 叶桐桐.犬肿瘤临床病例的病理组织学特征分析[D].石河子:石河子大学,2023.
- [3] 刘皓乾,何晓晖,孙嘉徐,等.华北地区 141 例犬皮肤肿瘤回顾性分析[J].中国兽医杂志,2024,60(1):1-8.
LIU H Q, HE X H, SUN J X, et al. Retrospective analysis of 141 cases of canine cutaneous tumors in northern China[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2024, 60(1): 1-8.
- [4] 宋金星.郑州市犬皮肤肿瘤疾病组织病理学诊断及流行病学分析[D].郑州:河南农业大学,2017.
- [5] 蔡雯雯.犬体表肿包的诊断与治疗[J].中国工作犬业,2021(2):52-53.
- [6] 汪荣根,周治东,赵志宏,等.两种配合饲料对比格幼犬饲喂效果的比对[J].广东畜牧兽医科技,2024,49(3):93-96.
WANG R G, ZHOU ZH D, ZHAO ZH H, et al. Comparing the effects of two types of formula feed on beagle puppies[J]. Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science, 2024, 49(3): 93-96.
- [7] 刘 红,谢 凯,毕兆华,等.细胞型皮肤纤维瘤一例[J].中国麻风皮肤病杂志,2023,39(9):683-685.
LIU H, XIE K, BI ZH H, et al. Cellular dermatofibroma: A case report[J]. China Journal of Leprosy and Skin Diseases, 2023, 39(9): 683-685.
- [8] 杨宝凤,伏利兵,张 楠,等.血管瘤样纤维组织细胞瘤 14 例临床病理学观察[J].临床与实验病理学杂志,2024,40(8):818-823.
YANG B F, FU L B, ZHANG N, et al. Angiomatoid fibrous histiocytoma: A clinicopathologic study of fourteen cases[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2024, 40(8): 818-823.
- [9] 赵 洋,吴宁琪,舒莉珊,等.5 例血管瘤样纤维组织细胞瘤临床病理特征分析[J].诊断病理学杂志,2023,30(8):752-756.
ZHAO Y, WU N Q, SHU L SH, et al. Angiomatous fibrous histiocytoma: A clinicopathological analysis of five cases[J]. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2023, 30(8): 752-756.
- [10] 旷冬梅,李小敏,冯 强,等.两例犬恶性黑色素瘤的病理诊断[J].畜牧兽医杂志,2024,43(3):140-142.
KUANG D M, LI X M, FENG Q, et al. Two case of pathological diagnosis of canine malignant melanoma [J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2024, 43(3): 140-142.
- [11] 古彩虹,谢晓丹,陈思琦. CK 免疫组化联合 EBER 原位杂交在鼻咽癌诊断中的作用分析[J].系统医学,2021,6(13):24-26.
GU C H, XIE X D, CHEN S Q. Analysis of the role of CK immunohistochemistry combined with EBER in situ hybridization in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma[J]. Systems Medicine, 2021, 6(13): 24-26.
- [12] PAULIN D, LILIENBAUM A, KARDJIAN S, et al. Vimentin; Regulation and pathogenesis[J]. Biochimie, 2022, 197: 96-112.
- [13] ZARYCHTA E, LEPINAY K, SZUBERT S, et al. Wilms' tumor 1 antigen immunoreactivity in epithelial ovarian cancer-diagnostic and prognostic value[J]. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2020, 58(3): 198-207.
- [14] 姜柏余.免疫组化标志物在卵巢癌中的表达及意义[D].长春:吉林大学,2023.
- [15] 陈 虎,朱 丽,李 静,等.原发性滑膜肉瘤的免疫组化及影像征象分析[J].中国临床研究,2022,35(12):1 727-1 731.
CHEN H, ZHU L, LI J, et al. Immunohistochemical and imaging findings of primary synovial sarcoma[J]. Chinese Journal of Clinical Research, 2022, 35(12): 1 727-1 731.
- [16] 曹 洁,朱 燕,杨其昌.腹股沟促纤维组织增生性小圆细胞肿瘤 1 例[J].诊断病理学杂志,2024,31(11):1 112-1 113.
CAO J, ZHU Y, YANG Q CH. Desmoplastic small round cell tumor in inguinal region: a case report[J]. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2024, 31(11): 1 112-1 113.