

3种硬骨鱼类消化道肥大细胞的组织化学与免疫组化

林旋*, 林树根, 王寿昆, 李志刚, 陈梅芳

(福建农林大学动物科学学院,福建福州 350002)

摘要:类胰蛋白酶已被作为人类和某些哺乳动物组织中肥大细胞的标志。为检测鱼类肥大细胞胞浆中是否含有类胰蛋白酶,采用小鼠抗人类肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1 通过 Elivision™ plus 免疫组化染色技术,对尼罗罗非鱼、日本鳗鲡和欧洲鳗鲡消化道组织以及人胃癌组织石蜡切片中的肥大细胞进行染色,同时应用 AB/SO 和改良甲苯胺蓝法进行组织化学染色。结果表明,应用 AB/SO 和改良甲苯胺蓝染色都能较好显示尼罗罗非鱼肥大细胞, AB/SO 染色法对日本鳗鲡和欧洲鳗鲡效果较差,改良甲苯胺蓝染色在上述两种鱼中未能检出肥大细胞;采用小鼠抗人类肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1 通过 Elivision™ plus 免疫组化染色技术,首次证实了尼罗罗非鱼肥大细胞胞浆中类胰蛋白酶的存在,但类胰蛋白酶阳性细胞数量很少,主要分布于尼罗罗非鱼消化道各段的黏膜上皮细胞基部和黏膜固有层,而日本鳗鲡与欧洲鳗鲡消化道均未检出类胰蛋白酶阳性细胞。说明不同鱼类肥大细胞胞浆颗粒中生物化学组分存在差别。人胃癌间质中可见多量类胰蛋白酶阳性细胞。

关键词:尼罗罗非鱼;日本鳗鲡;欧洲鳗鲡;肥大细胞;类胰蛋白酶;组织化学;免疫组化

中图分类号:Q 954.6; S 917

文献标识码:A

肥大细胞(mast cell, MC)广泛分布于鱼类、两栖类、家禽类和哺乳动物的多种组织器官中^[1-5]。肥大细胞特征性的胞浆颗粒中含有生物胺、蛋白多糖及中性蛋白酶等多种生物活性物质。通过脱颗粒释放上述生物活性物质而在动物的健康和疾病预防中发挥重要作用^[6]。肥大细胞在不同动物、不同组织器官中存在着形态、分布、颗粒化学成分、染色特性及超微结构和功能等方面的差异性,某些动物的肥大细胞被区分为黏膜肥大细胞(mucosal mast cell, MMC)与结缔组织肥大细胞(connective tissue mast, CTMC)^[6]。肥大细胞的基础生物学研究已引起免疫学家们的广泛关注。

在1960年首次通过组织酶染色法发现了与肥大细胞有关的胰蛋白酶样(trypsin-like)活性^[7],之后 Schwartz 等^[8]在对这些物质进行纯化后发现这些物质90%以上具有胰蛋白酶样活性,故命名为类胰蛋白酶(trypsin)。类胰蛋白酶是一

种中性丝氨酸蛋白酶,分子量为134 ku,由4个相同的亚单位和肝素糖蛋白组成,单体间通过疏水性和静电相互作用结合在一起^[9]。类胰蛋白酶是肥大细胞含量最多的介质,其在肥大细胞中的贮存和表达具有高度选择性,不能在其它类型细胞中被检出,故类胰蛋白酶成为鉴定人肥大细胞的特异性标志^[7-10]。Walls 等^[11]制备出小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1 并采用间接免疫过氧化物酶技术鉴定人肥大细胞。于是小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体及其免疫组化技术,以及鉴定人肥大细胞类胰蛋白酶的酶组织化学技术应运而生,并借此发现猪、牛、绵羊、犬、猫、大鼠和牛蛙等多种动物的肥大细胞中存在类胰蛋白酶^[12-15]。

20世纪20年代起,国外的一些研究者就证实了某些硬骨鱼类的多种组织中肥大细胞的存在,之后不同的研究者采用不同的组织化学技术,在多种硬骨鱼类的不同组织中鉴定出的肥大细

胞^[2,16-18]。但迄今为止,尚未见有关鱼类的肥大细胞是否含有中性蛋白酶的研究报道。本实验采用小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AAI,应用 Elivision™ plus 免疫组化染色法对尼罗罗非鱼 (*Tilapia niloticus*)、日本鳗鲡 (*Anguilla japonicus*) 和欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*) 消化道组织中类胰蛋白酶阳性肥大细胞存在的可能性进行了探索性研究。并应用阿利新蓝—藏红 O (AB/SO) 复染法和改良甲苯胺蓝染色法对上述 3 种鱼进行组化研究。为证实该技术的可靠性,同时使用人胃癌组织作为阳性对照,并与大细胞的进行了比较。

1 材料与方 法

1.1 材 料

市售健康尼罗罗非鱼 400 ~ 500 g 4 尾,日本鳗鲡 300 ~ 400 g 4 尾,欧洲鳗鲡 250 ~ 300 g 4 尾。剖开腹腔,取食管、胃贲门、胃体、胃幽门,小肠(前肠、中肠、后肠)于 10% 中性缓冲甲醛(10% NBF)和 Carnoy 分别固定,常规脱水、透明,石蜡包埋,切片厚度 6 μm 。

1.2 主要试剂

鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AAI,即用型非生物素免疫组化 Elivision™ plus 检测试剂盒,Trypsin 胰蛋白酶试剂盒,多聚-L-赖氨酸,DAB 显示剂,人胃癌组织阳性对照片,均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 Elivision™ plus 免疫组化染色步骤

(1)石蜡切片脱蜡和水化后,用 PBS (pH 7.4) 冲洗 3 次,各 3 min;(2)抗原修复:胰蛋白酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 15 ~ 20 min,PBS 洗 3 次,各 3 min;(3)甩去 PBS 液,每张切片加一滴或 50 μL 类胰蛋白酶单克隆抗体 AAI,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;(4)PBS 冲洗 3 次,各 3 min;(5)甩去 PBS 液,每张切片加 1 滴或 50 μL 聚合物增强剂,室温下孵育 20 min;(6)PBS 冲洗 3 次,各 3 min;(7)甩去 PBS 液,每张切片加 1 滴或 50 μL 酶标抗鼠/兔聚合物,室温下孵育 30 min;(8)PBS 冲洗 3 次,各 3 min;(9)甩去 PBS 液,每张切片加 2 滴或 100 μL 新鲜配制的 DAB 显示液,显微镜下观察 3 ~ 10 min,阳性显示为棕色;(10)蒸馏水或自来水冲洗,苏木精复染数秒,自来水冲洗,PBS 冲洗返蓝。阴性对照片不加一抗,其它步骤与上述过程相同。

1.4 常规组织化学染色

阿利新蓝—藏红 O 复染法 (AB/SO) 根据参考文献[19]的方法进行,切片下行至水,转入 PBS(0.01 mol/L,pH 7.3)中 5 min,随即在含 0.5% 阿利新蓝的 3% 醋酸水溶液中染色 40 min,PBS 冲洗 5 min,再入含 0.25 mol/L 的盐酸中染色 1 min,PBS 冲洗 5 min,快速脱水、透明、树胶封片。

改良甲苯胺蓝染色法 根据参考文献[20]方法进行,切片下行至水,放入用蒸馏水煮沸配制的 8 g/L 甲苯胺蓝和 6 mL/L 高锰酸钾混合液中浸染约 30 s,蒸馏水洗两次后用 90% 酒精分色(显微镜下控制),无水酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

2 结 果

2.1 免疫组化染色

NBF 固定的尼罗罗非鱼食管、胃、肠组织中,类胰蛋白酶阳性细胞胞浆染成棕黄色,数量很少,分布于食管黏膜固有层(图版-1)、胃腺体之间(图版-2)和黏膜固有层(图版-3)、小肠上皮细胞基部和黏膜固有层(图版-4,5)。细胞形态圆形或椭圆形;而日本鳗鲡与欧洲鳗鲡未检出类胰蛋白酶阳性细胞。胃癌组织镜检时,在肿瘤间质中均能观察到许多胞浆为棕黄色的细胞,即类胰蛋白酶阳性细胞(图版-6)。阴性对照片胞浆无着色。

2.2 常规组织化学染色

AB/SO 染色 尼罗罗非鱼的肥大细胞数量多,胞质颗粒呈深蓝色,胞核呈淡褐色,肥大细胞胞体较大(图版-7);着染的细胞数量多,广泛分布于各段消化道黏膜上皮下方、黏膜固有层和黏膜下层结缔组织,少量分布于肌层结缔组织和外膜结缔组织。许多肥大细胞有沿血管周围分布的特点。而日本鳗鲡和欧洲鳗鲡的肥大细胞胞质颗粒呈浅蓝色,细胞体较小,肥大细胞数量少,主要分布于黏膜上皮下方和黏膜固有层结缔组织。

改良甲苯胺蓝染色 尼罗罗非鱼肥大细胞胞浆颗粒呈紫红色,颗粒清晰可见,胞核呈紫蓝色(图版-8);着染的肥大细胞数量也多,分布于各段消化道黏膜上皮下方、黏膜固有层和黏膜下层结缔组织,少量分布于肌层结缔组织和外膜结缔组织。肥大细胞也有沿血管周围分布的特点。而日本鳗鲡和欧洲鳗鲡应用改良甲苯胺蓝染色,经多

次的实验均未能检出肥大细胞。采用 NBF 固定液固定,在人食管癌间质中,改良甲苯胺蓝染色,肥大细胞的胞浆均被染成紫红色。甲苯胺蓝染色阳性细胞的分布与类胰蛋白酶免疫染色阳性细胞的分布相似。

3 讨论

采用 Carnoy 氏液固定,AB/SO 染色,都能不同程度显示尼罗罗非鱼、日本鳗鲡和欧洲鳗鲡的肥大细胞,这与许乐仁等^[2]对草鱼肥大细胞和杨筱珍等^[18]对胡子鲇肥大细胞的研究结果一致。研究反复地证实 Carnoy 氏液固定,AB/SO 染色是鉴定各种哺乳动物、禽类和蛙类肥大细胞的优良的组织化学技术,它可使多种动物的肥大细胞都得到良好的固定和染色^[4-5,21]。本研究也进一步证实,该染色技术也同样适用于尼罗罗非鱼、日本鳗鲡和欧洲鳗鲡肥大细胞的鉴定。实验发现 AB/SO 染色虽然能显示日本鳗鲡和欧洲鳗鲡的肥大细胞,但染色效果明显不如尼罗罗非鱼,两者的肥大细胞淡染,着染的细胞数量少且胞体小。Romieu^[22]采用 Bouin 氏固定,甲苯胺蓝染色在太阳鱼(*Qrthagoriscus mola*)的结缔组织中鉴定出肥大细胞。Temkin 等^[23]及 Chiarini-Garcia 等^[24]分别采用 Helly 氏液固定,异丁烯酸包埋,甲苯胺兰染色技术,在鲫(*Carassius auratus*)及虎利齿脂鲤(*Hoplias malabaricus*)的肠道中观察到对甲苯胺兰异染性的肥大细胞。杨筱珍等^[18]采用 Carnoy 氏固定,TB/SO 染色技术鉴定出胡子鲇淋巴器官和肠组织有异染性肥大细胞的存在,而许乐仁等^[2]采用 Carnoy 氏固定,TB/SO 染色技术在草鱼淋巴器官组织中未能鉴定出肥大细胞。本研究采用 Carnoy 氏固定,改良甲苯胺蓝染色技术在尼罗罗非鱼消化道组织中也证实了大量异染性肥大细胞的存在,而日本鳗鲡和欧洲鳗鲡消化道组织中未能显示肥大细胞的存在。日本鳗鲡和欧洲鳗鲡 AB/SO 染色效果明显不如尼罗罗非鱼,且甲苯胺蓝未能显示肥大细胞,说明硬骨鱼类不同种类之间组织化学性质存在一定的差异,或者是硬骨鱼类肥大细胞的染色性质很不稳定,对日本鳗鲡和欧洲鳗鲡采用其他组织化学技术进行染色条件的摸索,有待今后继续深入研究。

本研究采用小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1,应用 ElivisionTM plus 免疫组化染

色技术,同时对尼罗罗非鱼、日本鳗鲡、欧洲鳗鲡进行免疫组化染色,结果发现单克隆抗体 AA1 可与中性缓冲甲醛固定的尼罗罗非鱼组织的肥大细胞获得良好的交叉反应,首次证实尼罗罗非鱼肥大细胞胞浆颗粒中也存在类胰蛋白酶;而日本鳗鲡和欧洲鳗鲡均未能检测到类胰蛋白酶阳性细胞,似乎说明不同鱼类肥大细胞胞浆颗粒中生物化学组分存在差别。事实上,在所有被检的由低等到高等的哺乳动物肥大细胞中均发现有类胰蛋白酶的存在^[25],采用小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1 及其免疫组化技术或酶组化技术也证实多种动物肥大细胞中类胰蛋白酶的存在^[12-15]。本实验证实尼罗罗非鱼肥大细胞中有类胰蛋白酶的存在。这一研究结果说明,尽管鱼类与人类和哺乳动物之间在生物进化水平方面存在着很大距离,但它们的肥大细胞均可表达类胰蛋白酶,且这些类胰蛋白酶具有一定的同源性。尼罗罗非鱼肥大细胞中具有特征性类胰蛋白酶的存在。这一发现为鱼类肥大细胞免疫功能和特性的研究提供了依据,有助于深化对鱼类肥大细胞生物学的认识。

实验发现,尼罗罗非鱼组织中 AA1 免疫染色阳性细胞的分布,与 AB/SO 和改良甲苯胺兰染色阳性细胞的分布存在较大的差异:尼罗罗非鱼类胰蛋白酶阳性细胞数量很少,且阳性反应比人胃癌间质肥大细胞弱,主要分布于消化道黏膜上皮下方和固有层,少量分布于肠绒毛基底部及食管腺和胃腺周围;而 AB/SO 和改良甲苯胺兰染色阳性细胞数量多,广泛分布于消化道黏膜固有层、黏膜下层、腺体之间、肌间及外膜结缔组织,与杨冬梅等^[15]对牛蛙研究的结果基本一致。也说明并不是所有的尼罗罗非鱼肥大细胞都含有类胰蛋白酶。很有可能是,尼罗罗非鱼粘膜部位少量的肥大细胞中含有类胰蛋白酶,而其它结缔组织部位的肥大细胞不含类胰蛋白酶。尼罗罗非鱼类胰蛋白酶阳性细胞数量很少,且阳性反应比人胃癌间质肥大细胞弱,说明尼罗罗非鱼肥大细胞胞浆颗粒类胰蛋白酶含量较少,尼罗罗非鱼属于低等脊椎动物,可能与生物进化水平较低有关,有待进一步研究。

人类的肥大细胞则根据其胞浆颗粒内中性蛋白酶组分的差异,被区分为仅含类胰蛋白酶(trypsin)的 T 肥大细胞(MCT),同时含类胰蛋

白酶及类糜蛋白酶(chymase)的 TC 肥大细胞(MCTc)以及仅含类糜蛋白酶的 C 肥大细胞(MCC)3 个类型^[1]。类胰蛋白酶和类糜蛋白酶都是肥大细胞的特异性标志酶,已有学者利用类糜蛋白酶和类糜蛋白酶的双重免疫标记技术来区分肥大细胞的不同亚型^[26]。采用小鼠抗人肥大细胞类糜蛋白酶单克隆抗体做进一步的免疫组化染色,检测尼罗罗非鱼的肥大细胞是否也如人类那样存在 MCTC 或 MCC 亚群,或许可从酶组分的角度发现尼罗罗非鱼肥大细胞的不同亚型。

参考文献:

- [1] Galli S L. New insight into "The riddle of the mast cells" micro environmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity [J]. *Lab Invest*, 1990, 60: 146 - 157.
- [2] 许乐仁, 杨筱珍, 高登慧. 草鱼淋巴器官中的肥大细胞 [J]. *水产学报*, 2003, 27(3): 233 - 237.
- [3] 张文学, 赵良真, 赵艳红, 等. 蟾蜍消化道肥大细胞的观察 [J]. *河南师范大学(自然科学版)*, 2005, 33(4): 176 - 182.
- [4] Xu L R, Ou D Y, Gao D Y. Histochemistry and morphology of mast cells of primary lymphoid organs in chicken [J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2001, 10(4): 449 - 455.
- [5] 高登慧, 许乐仁, 姚红艳. 山羊肥大细胞组织化学及形态学研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31(1): 88 - 93.
- [6] Irani A A, Schwatz L B. Mast cell heterogeneity [J]. *Clin Exp Allergy*, 1989, 19: 143 - 155.
- [7] Glenner G C, Cohen L A. Histochemical demonstration of species-special trypsin-like enzyme in mast cells [J]. *Nature (London)*, 1960, 185: 846 - 852.
- [8] Schwartz L B. Monoclonal antibodies against human mast cell tryptase demonstrate shared antigenic sites on subunits of tryptase and selective location of the enzyme to mast cells [J]. *Immunol*, 1985, 134(1): 526 - 531.
- [9] 林青, 张慧云, 何韶衡. 肥大细胞类胰蛋白酶在其相关疾病中作用的研究 [J]. *中国热带医学*, 2008, 8(5): 844 - 847.
- [10] 许乐仁, 江萍. 肥大细胞的中性蛋白酶 [J]. *解剖科学进展*, 2002, 8(3): 249 - 253.
- [11] Walls A F, Jones D B, Williams M K, et al. Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase [J]. *J Pathol*, 1990, 162: 119 - 126.
- [12] Xu L R, Jiang P, Carr M M, et al. Identification of porcine and bovine mast cells by an indirect immunoperoxidase technique [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1997, 43(3): 294 - 302.
- [13] 江萍, 许乐仁. 绵羊肥大细胞中类胰蛋白酶的证实 [J]. *解剖学报*, 1996, 27(1): 92 - 94.
- [14] 许乐仁. 应用酶组织化学技术证实猫、犬肥大细胞中类胰蛋白酶的存在 [J]. *贵州农学院学报*, 1992, 11(2): 29 - 32.
- [15] 杨冬梅, 许乐仁. 牛蛙肥大细胞中类胰蛋白酶的证实 [J]. *水产学报*, 2008, 32(4): 572 - 577.
- [16] Reite O B. The mast cell nature of granular cells in the digestive tract of the pike, *Esox lucius*; similarity to mammalian mucosal mast cells and globule leucocytes [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 1996, 6: 363 - 369.
- [17] Xu L R, Yang X Z, Gao D H, et al. Mast cells in two species of freshwater fishes, grass fish (*Ctenpharyngodon idella*) and cat fish (*Claris fuscus lacepeda*) [J]. *J Anim Vet Adv*, 2003, 2(3): 191 - 195.
- [18] 杨筱珍, 高登慧, 许乐仁. 胡子鲇肥大细胞的组织化学及形态学 [J]. *中国水产科学*, 2003, 10(2): 106 - 110.
- [19] 张书起, 于洪川. 中华大蟾蜍舌肥大细胞组化性质的研究 [J]. *农业科学研究*, 2005, 26(1): 40 - 42.
- [20] 李芙燕, 陈耀星, 王子旭. 三种饲料添加剂对肉鸡小肠肥大细胞数量分布的影响 [J]. *动物医学进展*, 2006, 27(2): 65 - 68.
- [21] 许乐仁, 杨冬梅, 欧德渊. 牛蛙肥大细胞的组织化学与形态学 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2007, 16(6): 669 - 675.
- [22] Romieu M. Contribution a l'etude des mastocytes des poissons osseux [C]. *Societe de Biologie, Paris, Comptes Rendus*, 1924, 91: 655 - 657.
- [23] Temkin R J, McMillan D B. Gut-associated lymphoid tissue (GALT) of the goldfish, *Carassius auratus* [J]. *J Morphol*, 1986, 190: 9 - 26.
- [24] Chiarrini-Garcia H, Ferreira R M A. Histochemical evidence of heparin in granular cells of *Hoplias malabaricus* Bloch [J]. *J Fish Biol*, 1992, 41: 155 - 157.
- [25] Stevens R. Human and mouse mast cell tryptase in mast cells and basophils [M]. *Academic Press*,

- Harcourt Publishers, 2000:235-249. 技术鉴定肥大细胞亚型[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29
[26] 何韶衡, 李萍, Mark G B, 等. 应用双重免疫标记 (5):383-384.

Study on the mast cells in the digestive tract of three teleostean fishes by histochemical and immunohistochemical methods

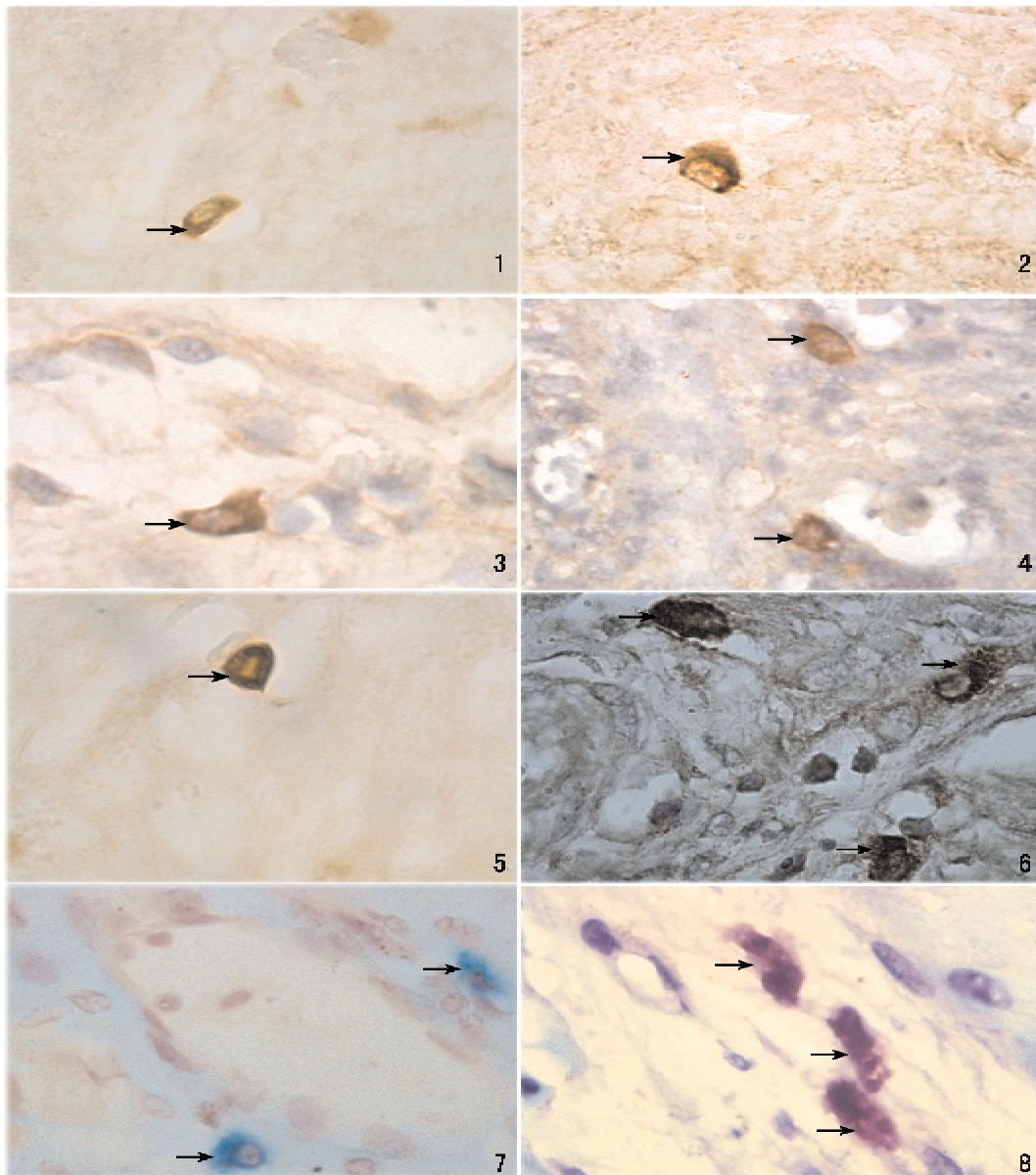
LIN Xuan*, LIN Shu-gen, WANG Shou-kun, LI Zhi-gang, CHEN Mei-fang

(College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Tryptase has been considered as a cellular marker of mast cells in the tissues of human and some mammals. In order to detect whether or not fish mast cells contain tryptase in their cytoplasm, a murine monoclonal antibody (AA1), raised against human mast cell tryptase, was used to stain the paraffin sections of the digestive tract tissue collected from *Tilapia nilotica*, *Anguilla japonica* and *Anguilla anguilla* and gastric cancer tissue (as a positive control) from an adult man by ElivisionTM plus immunohistochemical techniques, Alcian blue Safranin O staining and the modified toluidine blue staining were used as histochemical staining at the same time. The results showed: Nile tilapia mast cells were displayed better by Alcian blue Safranin O staining and the modified toluidine blue staining, while the effects of *A. japonica* and *A. anguilla* were not very good by Alcian blue Safranin O staining, and the mast cells could not be examined in *A. japonica* and *A. anguilla* by the modified toluidine blue staining. It was firstly demonstrated that Nile tilapia mast cells contain tryptase in their cytoplasm by ElivisionTM plus immunohistochemical techniques with a murine monoclonal antibody AA1 raised against human mast cell tryptase. Small amount of the positive tryptase cells were found in Nile tilapia tissues and mostly lie in the base of mucosal epithelial cells and lamina propria in the sections of digestive tract. While the tryptase-positive mast cells had not been examined in *A. japonica* and *A. anguilla*. It showed that there was difference of biochemical element in cytoplasm granules among different fish mast cells. There were lots of tryptase-positive mast cells in the gastric carcinoma interstitium of human.

Key words: *Tilapia nilotica*; *Anguilla japonica*; *Anguilla anguilla*; mast cell; tryptase; histochemistry; immunohistochemistry

Corresponding author: LIN Xuan. E-mail: linkaixuan79@hotmail.com



图版说明

1. 食管固有膜肥大细胞免疫组化, $\times 1\ 000$; 2. 胃贲门部固有膜肥大细胞, $\times 1\ 000$; 3. 胃体部固有膜肥大细胞免疫组化, $\times 1\ 000$; 4. 前肠固有膜肥大细胞免疫组化, $\times 1\ 000$; 5. 中肠固有膜肥大细胞免疫组化, $\times 1\ 000$; 6. 人胃癌间质肥大细胞免疫组化, $\times 1\ 000$; 7. 前肠固有膜肥大细胞(AB/SO 染色), $\times 1\ 000$; 8. 胃体部固有膜肥大细胞(改良甲苯胺蓝染色), $\times 1\ 000$

Explanation of Plates

1. The immunohistochemistry of mast cell in the esophagus lamina propria, $\times 1\ 000$; 2. The immunohistochemistry of mast cell in the stomach cardiacus lamina propria, $\times 1\ 000$; 3. The immunohistochemistry of mast cell in the stomach fundus lamina propria, $\times 1\ 000$; 4. The immunohistochemistry of mast cell in the foregut lamina propria, $\times 1\ 000$; 5. The immunohistochemistry of mast cell in the midgut lamina propria, $\times 1\ 000$; 6. The immunohistochemistry of mast cell in gastric carcinoma interstitium of human, $\times 1\ 000$; 7. Mast cell in the foregut lamina propria (Alcian blue Safranin O staining), $\times 1\ 000$; 8. Mast cell in the stomach fundus lamina propria (The modified toluidine blue staining), $\times 1\ 000$