

I 病理学选修课程资料

临床病理讨论

第五版

（供临床医学专业本科生与专升本使用）

江汉大学医学与生命科学学院

病理学与病理生理学教研室

2004年2月

病例(1)

男性,32岁。右腿间歇性跛行四年,足趾溃烂半年。

四年前患者感右小腿麻木,发凉,疼痛,易疲劳。继而症状加重,走路时被迫停步休息。后疼痛逐渐明显加重,夜间尤甚。经内科治疗症状无缓解。近半年来右足趾开始出现溃烂。患者自述重度嗜烟。

体检:小腿肌肉萎缩,皮肤干燥,苍白,足背动脉搏动微弱。足趾皮肤灰褐色,干枯。足趾坏死区与足背皮肤分界清楚,可见暗红色的分界带。右小腿肢体血流图波形呈峰值下降。动脉造影见趾背动脉呈节段性阻塞。

讨论题:

- 1、怎样根据该患者的临床表现和检查所见推断病理诊断?
- 2、为什么该患者右下肢会由麻木,发凉,疼痛发展到皮肤的溃烂?
- 3、若该患者行截肢治疗,其切除肢体镜下可有哪些发现?
- 4、该患者的重度嗜烟与本病的发生发展有什么关系?

病例(2)

男性,23岁。因皮肤大面积烧伤而急诊入院。

体检:体温 37.8℃,脉搏 110 次/分,呼吸 23 次/分,血压 130/90mmHg。面部、双上肢、躯干大部分、左下肢均可见大面积的红斑、水疱及焦痂。住院期间从右股静脉反复多次输血、输液,历时 50 天,终因抢救无效死亡。

讨论题:

- 1、根据临床表现、检查结果以及治疗经过怎样作出诊断?
- 2、该患者的死因是什么?其诱因可能有哪些?
- 3、分析该患者可能会出现哪些病变?

病例 (3)

A、 男性,42 岁。自高处跌落,腰部跌伤,肠扭转,急诊入院后行腹部手术。术后五天突然发生呼吸困难,口唇青紫而死亡。

B、 女,27 岁。在家顺产一婴儿后感觉双下肢疼痛并逐渐加重,急诊入院。入院后于 X 线胸部检查时突然气促死亡。

C、 男性,48 岁。因十二指肠球部溃疡大出血而行胃次全切除和胃肠吻合术,术后起床活动时突然昏倒死亡。

讨论题:

- 1、上述三患者疾病的发生发展有哪些相似之处?其病理学基础是什么?
- 2、上述三患者的尸检应重点检查什么部位?为什么?

病例(4)

男性,30 岁,一小时前被大火烧伤而急诊入院。

体检:面部,胸部及背部皮肤大片红斑,并形成大水泡,伴剧痛。部分水泡破裂不断溢出黄色清亮液体。两前臂皮肤有焦痂,微痛。体温 38.2℃,脉搏 92 次/分,呼吸 20 次/分,血压 80/60mmHg。经清创,抗休克及暴露治疗,病情逐渐好转出院。

讨论题:

- 1、该患者皮肤的病变属于什么类型?皮肤水疱的形成机制有哪些?
- 2、为什么患者会出现疼痛?
- 3、若治疗不得当或不及时,最有可能发生什么继发病变?为什么?

病例(5)。

女性,38 岁。无意中发现左乳腺有一个蚕豆大的肿块后立即就诊。初诊医生

经触诊后诊断为乳腺纤维腺瘤，建议口服中药治疗。两个月后，该患者自觉肿块未见明显缩小，继续就诊。

体检:左乳腺外上象限可扪及 $2 \times 1\text{CM}$ 大小的肿块一个,边界清楚,可移动,无压痛感。同侧腋下可扪及 2 粒黄豆大小的结节,质地较硬。外科医生建议乳腺肿块和腋窝内的结节活检。

讨论题:

- 1、怎样评价初诊医生的诊断与建议?
- 2、根据临床病史和检查发现,外科医生为什么要建议活检?
- 3、病理医生在病理报告中至少应报告些什么内容?为什么?

病例(6)。

男性,58 岁。因肝区疼痛,纳差,腹胀加重一个月于 1981 年 11 月 19 日入院。患者于 1981 年 1 月初起感乏力,肝区疼痛,纳差,体重下降,多次检查肝功能均在正常范围内。10 月中旬自觉上述症状加重,在外院检查 AFP(甲胎蛋白)阳性,B 超及同位素扫描均提示肝右叶占位性病变,诊断为原发性肝癌入院。

既往史:1959 年诊断为黄疸性肝炎。1960 年因胃小弯溃疡而行手术治疗,术中发现肝硬变。

体检及实验室检查:

体温及脉搏正常,血压 $130/70\text{mmHg}$ 。皮肤巩膜无黄染。全身淋巴结不肿大。心肺正常。肝上界在第 5 肋间,下界达右肋 5CM,剑突下 10CM(正常成人在肋缘下 0.5CM)。有触痛,质地硬,表面有结节感。血红蛋白 $107-132\text{g/L}$,白细胞 $3.7-8.3 \times 10^9/\text{L}$,中性 $0.62-0.80$,血小板 $1.71-5.9 \times 10^9/\text{L}$ 。尿粪常规均正常。凝血酶原时间 16-22 秒(对照 14 秒)。白蛋白/球蛋白:4.5/2.6。转氨酶 40u (正常对

照 40u)。血清 AFP 强阳性(4,200ng/L),HBsAg 弱阳性。

B 超:肝左、右叶多个强回声团,胆囊颈部有 2 个强回声团,提示肝内占位性病变及胆囊结石。

住院经过:入院后给予积极支持治疗后开始对右肝区行局部放疗,放疗后病情稳定,肝脏缩小。20 天后突感右上腹绞痛,经检查发现右上腹胆囊区有 5×5CM 的肿块,表面光滑,压痛明显,次日体温上升至 39°C,巩膜黄染,经治疗后缓解。两个月后继续放疗。一周后又出现右上腹绞痛发作,此后症状加重,食欲锐减,黄疸加深。20 天后病情逐渐恶化,血清胆红素由 23.9nmol/L 升至 188nmol/L,血清 AFP 升至 20,000ng/L。两个月后死亡。

思考题:

- 1、患者入院时无黄疸,死前明显黄疸,其病变的基础是什么?
- 2、根据病史诊断为原发性肝癌有哪些依据?
- 3、分析死亡原因。

讨论题:

- 1、小结该患者的病变特点,列出诊断依据,作出病理诊断。
- 2、分析该患者的死亡原因,描述该患者疾病发生发展的过程。

病例(7)

女性,36 岁,农民。心慌,气急反复发作一年,一周来加剧,不能平卧。

患者 1963 年 7-8 月间起,劳动后感觉心慌,气急,下肢浮肿,休息后好转。近半年来浮肿加剧,经常感觉心慌气急,当地卫生所诊断为心脏病,服药后浮肿消失,心慌减轻。近一周来上述症状又加重,不能平卧,并且有发热及关节疼痛。

既往史:经常感觉关节酸痛。

体检:端坐呼吸,指唇发绀,颈静脉怒张,两肺底可闻及少许湿性罗音,心尖部有舒张期及收缩期杂音,以舒张期杂音为主。肝在肋缘下 5CM,有移动性浊音,两下肢凹陷性水肿。

住院经过:入院后给氧,强心等治疗无效,于 1964 年 12 月 10 日死亡。

讨论题:

1、怎样根据检查所见,列出诊断依据,作出临床诊断?

2、怎样用病变解释下列临床表现?

劳动后感觉心慌气急 下肢浮肿休息后好转 端坐呼吸 颈静脉怒张

舒张期和收缩期杂音以舒张期为主

病例(8)

男性, 38 岁。2 天前因小事与他人发生口角后发展为殴打。次日上午 10 时去医院就诊, 诊断为“左胫骨下端骨折”作简单处理后, 下午 4 时许被他人搀扶回家。晚 8 时发现已经死在床上。

既往无心血管病、高血压病史记载。嗜烟酒。

讨论题:

1、 该患者的死亡原因可能是什么?

2、 该患者尸检时应重点检查什么部位? 为什么?

病例(9)

男性, 52 岁。一个月前因纠纷被人打伤。次日感头痛, 全身不适, 未就诊。第三天晨起后感头痛加重, 出现呕吐、行走困难, 即去医院就诊。检查示“蛛网膜下腔出血”。病情迅速进展恶化, 出现昏迷, 大小便失禁。第 4 天死亡。

既往有高血压病史。长期嗜烟酒。

讨论题:

- 1、 该患者为什么在第三天迅速出现病情进展?
- 2、 高血压病史与该患者的死亡有什么联系?

病例(10)

女婴,10个月。发热10天,咳嗽,气急5天。

体检:患儿精神萎靡,口唇发绀,鼻翼煽动。体温39℃,脉搏160次/分,呼吸50次/分。两肺可闻及细小湿性罗音。X检查见两肺散在灶状阴影。虽经积极治疗,但患儿气急,紫绀进行性加重,最终死亡。

讨论题:

- 1、 怎样根据检查所见,列出诊断依据,作出诊断?
- 2、 用病变解释下列临床表现:

口唇发绀 鼻翼煽动 两肺细小罗音

病例(11)

男性,30岁。自25岁起常有饭后心窝部疼痛,返酸,嗝气,服一般胃药可缓解。去年曾有解出柏油样黑便史。患者自述嗜烟酒。入院前一天因吵架,饮酒后突感上腹部不适,数小时后又感右下腹部疼痛并逐渐扩展到全腹部。

体检:体温39℃,脉搏110次/分,呼吸40次/分,血压120/80mmHg。面色苍白,四肢湿冷,腹肌紧张,压痛及反跳痛明显。白细胞计数 $12 \times 9^9/L$,白细胞分类:中性白细胞0.90。X线检查膈下有游离气体。

临床诊断:慢性消化性胃溃疡穿孔合并急性弥漫性腹膜炎

讨论题:

1、临床诊断是否正确?怎样结合病变去分析该患者的病情和疾病发生发展的过程?

2、该患者去年曾经有过何种并发症?

3、该患者若行手术治疗,其切除的标本肉眼和镜下可发现哪些病变?

病例(12)

患儿,男性,10岁。因眼睑浮肿,尿少2-3天入院。患儿3周前曾经患有皮肤脓疱疮,经治疗后痊愈。

体检:体温 37.3℃,脉搏 112 次/分,呼吸 32 次/分,血压 130/90mmHg。神志清楚,面色苍白,眼睑浮肿。两侧扁桃体肿大,咽红。心肺(-)。肝脾未发现肿大。

实验室检查:24 小时尿量 520ml,尿比重 1.020,蛋白(+++),红细胞(+),透明,颗粒管型(+)。血红蛋白 108/L,红细胞 $3.8 \times 10^{12}/L$,白细胞总数 $8.1 \times 10^9/L$,中性粒细胞 0.60,淋巴细胞 0.30,单核细胞 0.08,嗜酸性白细胞 0.02。

入院后经低盐,抗感染及降血压治疗,住院 60 天,症状全部消失,各项检查均恢复正常后出院。

讨论题:

1、该患者最有可能的病理诊断是什么?

2、若对该患者进行肾脏穿刺活检,镜下可见哪些主要病变?

3、病孩的家长询问为什么会出现下列症状,您将怎样解释?

眼睑浮肿 尿少 血压升高 血尿及蛋白尿

4、该患者发病前的皮肤病变与本病有什么关系?

病例(13)

患者,女性,32岁,农民。在家流产后流血不止,作清宫术两次仍未见好转,尿妊娠实验阳性。刮宫取血块样组织作病理学检查,镜下可见增生的滋养叶细胞,以细胞滋养细胞为主,均有明显的异型性。临床医生根据病理检查的结果决定行子宫切除术。术后标本送病理学检查,肉眼见子宫体明显增大,切面可见子宫底肌壁内有44CM大小的出血坏死灶,与肌组织界限不清。镜下见大量增生的有明显异型性的滋养叶细胞,在一处肌组织内找到一个完整的绒毛结构。

讨论题:

- 1、根据检查所见,该患者患有何种疾病?诊断依据有哪些?
- 2、滋养细胞的肿瘤常见有哪些?主要的鉴别依据是什么?

病例(14)

患儿,女,1岁半。发热咳嗽半月余,呼吸困难五天。

既往史及家族史:七月早产,母乳喂养。既往常发热咳嗽。母亲有结核病史。

体检:体温38℃,呼吸40次/分,脉搏125次/分,血压100/75mmHg。一般情况差,呼吸急促,鼻翼煽动,神志清楚,面色苍白。双肺闻及湿性罗音。未作X线检查。

临床诊断:支气管肺炎合并心衰。

住院经过:入院后虽经积极的抗感染,抗心衰治疗,病情未见明显好转反而逐渐恶化,入院一周后死亡。

讨论题:

- 1、该病例死于何种疾病,其主要诊断依据是什么?其首发病变是什么?继发病变又是什么?

- 2、 结合病变描述该例疾病的发生发展过程。
- 3、 该病是怎样扩散的?怎样解释肺部病变?

临床病理讨论资料---尸检及活检结果

病例(1):

送检截取的右足趾。

巨检:右足趾呈灰黑色,部分软组织已脱落。足趾坏死区与足背皮肤分界清楚,可见暗红色和淡黄色的分界带。

镜检: ①、足趾区见凝固性坏死;

②、足背动脉及静脉可见节段性内膜炎,管壁纤维素样坏死,中性白细胞浸润,血栓形成。可见多处机化的血栓。

临床病理讨论资料---尸检及活检结果

病例(2)

尸检:皮肤大面积严重烧伤并且有严重细菌感染。右股静脉,门静脉及脾静脉,肠系膜上,下静脉内均可见圆柱形固体物附着于内膜面,该固体物较干燥,灰红色并与血管壁紧密粘连。右肺中叶可见一暗红色楔形病灶。

临床病理讨论资料---尸检及活检结果

病例(3)

A: 尸检发现肠系膜下静脉内有血栓形成。

B: 尸检发现盆腔静脉及髂静脉内有血栓形成。

C: 尸检发现肠系膜静脉内有血栓形成。

临床病理讨论资料---尸检及活检结果

病例(5):

活检:送检组织为 2×1CM 的肿块一个,似有包膜,切面为灰白色,未见明显的出血和坏死。另送检直径 0.5、0.7CM 的(腋窝)淋巴结两个,质硬,切面呈灰白色。镜下:见成片的核大浓染的细胞排列成腺管样结构,部分细胞出现坏死(凝固性坏死),核分裂像多见。(腋窝)淋巴结内可见上述细胞成份,并排列在淋巴结的边窦内或淋巴窦内。

临床病理讨论资料---尸检及活检结果

病例(6):

尸检:巩膜及皮肤黄染.全身皮肤有散在出血点。两下肢凹陷性水肿腹腔内积液 2700ml,黄色清亮。肝重 2750mg,大小 29×19×12.5CM。自行观察大标本(病-6)。胆总管,胆囊管及胆总管交界处的胆管显著扩张,内有 6×4×2CM 肿块,质硬。切开后见左,右肝管,胆总管上端内填塞有坏死组织和胆泥形成的块状物,部分于管壁粘连。

自行观察切片(病-6)。

双肺暗红色,切面可见灰白色病灶。镜下见支气管粘膜变性坏死脱落,肺泡内充满大量中性白细胞,并融合成大片。双肾肿大,切面呈浅绿色,有灶状出血。镜下见大部分肾小管上皮变性坏死。

脑重 1550g,脑膜血管扩张,充血,脑沟变浅,脑回变宽。右侧小脑扁桃体有明显压迹,为小脑扁桃体疝。

临床病理讨论资料---尸检及活检结果

病例(7):

尸检:女性尸体, 身高 153CM。背部尸斑明显, 下肢轻度水肿, 两瞳孔等大, 直径 0.6CM。

心脏:重 450g, 心尖钝圆, 左心房膨出。剪开左心见房室口呈不规则形, 瓣膜闭锁缘可见少量灰白色赘生物, 瓣膜变形, 增厚, 部分卷曲机粘连, 腱索缩短。剪开右心, 见右心室及右心房腔均扩大。镜下见左心瓣膜内有纤维素样坏死。

肺:呈暗红色。肺泡间隔增宽, 纤维结缔组织增生, 可见散在的含铁血黄素细胞, 毛细血管扩张。肺泡腔内充满大量淡红色均质物。肺泡上皮肿胀。

肝:呈暗红色, 肿大。镜下见中央静脉扩张, 肝窦内充满红细胞, 小叶中央肝细胞内可见大量空泡。

临床病理讨论资料---尸检及活检结果

病例(8):

左冠状动脉前降支狭窄 (IV级), 粥样斑块形成。心肌细胞萎缩, 以左心室为主。

病理诊断: 冠状动脉粥样硬化性心脏病。

临床病理讨论资料---尸检及活检结果

病例(9):

- 1、 脾细动脉玻璃样变；
- 2、 左心室壁厚>3；
- 3、 左冠状动脉前降支狭窄（Ⅱ级），粥样斑块形成；
- 4、 蛛网膜下腔内出血；
- 5、 双侧肾小球纤维化、玻璃样变，部分肾小球代偿性肥大。

临床病理讨论资料---尸检及活检结果

病例(10)：

尸检：两肺散在多数实变病灶，灰白色，呈梅花瓣状排列，部分融合成大片。

镜下：病变以细支气管为中心，管腔内见脱落的变性坏死的上皮细胞，周围肺泡内有大量的中性白细胞。肝，脾及肾脏均有不同程度的淤血。

临床病理讨论资料---尸检及活检结果

病例(14)：

尸检：女婴尸体，身长 94CM，营养欠佳，发育尚好。背部皮肤已出现尸斑，下颌关节及上肢关节有尸僵存在，胸前及小腿皮肤有少数散在出血点，口唇青紫，体表淋巴结不肿大。

胸腔无积液，双肺各叶表面和切面均可见大量弥漫分布的大小相仿粟粒样大小灰黄色病灶，呈干酪样，部分病灶中央已软化，液化（已发生扩大的液化灶）。右侧肺门淋巴结显著肿大，色灰黄，切面见干酪样，右侧气管旁淋巴结肿大，如蚕豆大小，大部分发生干酪样坏死。

镜下：上述粟粒大小病灶镜下部分为干酪样坏死，在其周边尚可见到

一些单核细胞，淋巴细胞等渗出性病变，病灶周围肺泡内大量单核细胞及少数淋巴细胞浸润。

抗酸染色：可见较多抗酸染色阳性菌。

肺原发灶：镜下主呈干酪样坏死，右肺门及气管旁淋巴结呈广泛干酪样坏死改变。

右心室前壁心外膜处可见一些粟粒大小灰黄色结节。腹腔无积液。肝800g, 19×19×4cm，表面及切面见多数灰黄色结节，镜下为渗出性病变伴干酪样坏死，肝小叶周边区脂肪变性，肝窦及中央静脉扩张充血。脾脏表面及切面见多数灰黄色粟粒结节，镜下为渗出性病变，可见干酪样坏死，脾窦明显充血。胰腺，大肠及小肠粘膜，肾脏表面及切面均可见渗出性粟粒性结节。脑及软脑膜呈充血及水肿，肉眼及镜下均未找到渗出性粟粒性结核结节。

临床病理讨论第一单元自测题

- 1、全身营养不良时，最早发生萎缩的细胞或组织是（ ）
 - A. 脂肪组织
 - B. 心肌
 - C. 脑
 - D. 骨骼肌
 - E. 肝细胞
- 2、细胞坏死的主要形态标志是（ ）
 - A. 线粒体肿胀
 - B. 核碎裂
 - C. 胞质嗜酸性增强
 - D. 胞质脂滴增加
 - E. 自噬泡增多
- 3、“虎斑心”是指心肌细胞发生（ ）
 - A. 淤血
 - B. 脂肪变性
 - C. 粘液变性
 - D. 坏死
 - E. 淤血及坏死
- 4、为证实毛玻璃样肝细胞，可用（ ）
 - A. 刚果红染色
 - B. 免疫酶标法检查
 - C. P A S 染色
 - D. 铁酸染色
 - E. 苏丹III染色
- 5、关于干性坏疽的叙述，下列哪项是正确的（ ）
 - A. 常见于肺、子宫等内脏
 - B. 其机制是动脉阻塞，静脉回流正常
 - C. 坏死组织与周围组织无分界线
 - D. 腐败菌感染严重
 - E. 全身中毒症状重

- 6、气性坏疽的坏死组织肉眼所见为（ ）
- 污黑或暗绿色并湿润
 - 污黑或暗绿色并干燥
 - 呈蜂窝状
 - 黑色，周边有出血带
 - 暗红色
- 7、下肢动脉发生动脉粥样硬化使管腔闭塞后可引起（ ）
- 下肢皮肤坏死
 - 下肢凝固性坏死
 - 下肢湿性坏疽
 - 下肢干性坏疽
 - 下肢脂肪坏死
- 8、关于湿性坏疽的叙述，下列哪项是正确的（ ）
- 常见于四肢末端
 - 其机制是动脉阻塞，静脉回流受阻，感染重
 - 坏死组织与周围组织有明显的分线
 - 坏死局部不利于腐败菌大量繁殖
 - 全身中毒症状轻
- 9、在触发凝血过程中起核心作用的是（ ）
- 血小板的活化
 - 组织因子的激活
 - 血栓素 A₂ 的释出
 - 第VII因子的激活
 - 纤维蛋白网形成
- 10、血栓闭塞性脉管炎多累及（ ）
- 四肢动脉及其分支
 - 心冠状动脉
 - 主动脉及其分支
 - 中等大的动脉和静脉
 - 下肢的细动、静脉

临床病理讨论第二单元自测题

- 1、混合血栓见于（ ）
- 毛细血管内
 - 静脉血栓的尾部
 - 动脉血栓的起始部
 - 主动脉瘤内血栓
 - 急性风湿性心内膜炎的瓣膜闭锁缘上
- 2、延续性血栓的形成顺序为（ ）
- 白色血栓、混合血栓、红色血栓
 - 混合血栓、红色血栓、白色血栓
 - 红色血栓、白色血栓、混合血栓
 - 混合血栓、白色血栓、红色血栓
 - 红色血栓、混合血栓、白色血栓
- 3、肱静脉血栓形成可引起（ ）
- 上肢坏疽
 - 桡动脉栓塞
 - 脑动脉栓塞
 - 肾动脉栓塞
 - 肺动脉栓塞
- 4、白色血栓发生于（ ）
- 血流不变时
 - 血流较快时
 - 血流减慢时
 - 血流停滞时
 - 组织出血时
- 5、在循环血液中出现不溶于血液的异常物质，随着血液流动，阻塞血管腔，这种现象称为（ ）
- 栓塞
 - 血栓形成
 - 梗死
 - 血管阻塞
 - 血栓栓塞
- 6、引起肺出血性梗死的主要原因是（ ）
- 肺静脉阻塞，肺动脉淤血，侧支循环不能建立
 - 左心衰竭，肺静脉回流受阻
 - 肺动脉阻塞，肺静脉压增高，支气管动脉供血不足，侧支循环不能建立
 - 肺动脉及支气管动脉同时阻塞
 - 肺静脉及支气管动脉同时阻塞
- 7、大量空气迅速进入血液循环引起死亡的原因是（ ）
- 脑栓塞
 - 心肌梗死
 - 心脏破裂

- D. 肺梗死
E. 急性心功能衰竭和呼吸衰竭
- 8、关于腠静脉内血栓脱落引起的栓塞，下列叙述哪项不正确（ ）
- A. 大多栓塞于肺
B. 都发生出血性梗死
C. 如栓塞于肺动脉主干常引起猝死
D. 伴有左心衰竭时可发生相应部位的梗死
E. 如有室间隔缺损亦可栓塞于脑
- 9、手术后好发血栓的部位是（ ）
- A. 下肢静脉
B. 冠状动脉
C. 肾动脉
D. 颈静脉
E. 门静脉
- 10、透明血栓最常见于（ ）
- A. 小静脉 B. 小动脉
C. 毛细血管 D. 中动脉
E. 大静脉

临床病理讨论第三单元自测题

- 1、慢性炎症灶内主要的炎性细胞是（ ）
- A. 淋巴细胞
B. 中性粒细胞
C. 嗜酸性粒细胞
D. 肥大细胞
E. 多核巨细胞
- 2、败血症是指（ ）
- A. 细菌入血
B. 毒素入血
C. 细菌入血大量繁殖，产生毒素
D. 细菌和毒素入血
E. 化脓菌引起多发性脓肿
- 3、肉芽组织和肉芽肿的区别点于（ ）
- A. 是否为慢性炎症
B. 是否导致局部纤维化
C. 是否由急性转化而来
D. 组成成份不同
E. 最后结局不同
- 4、假膜性炎渗出物中特征成分是（ ）
- A. 浆液
B. 纤维蛋白
C. 中性粒细胞
D. 淋巴细胞
E. 单核细胞
- 5、癌和肉瘤的主要不同点在于（ ）
- A. 病人年龄
B. 肿瘤质地
C. 组织来源
D. 转移途径
E. 染色特征
- 6、诊断癌最直接的依据是（ ）
- A. 中老年人
B. 肿瘤呈浸润性生长
C. 细胞异形，多见核分裂相
D. 肿瘤间质丰富
E. 增生的间变细胞呈巢状排列
- 7、临床检查肿瘤病人的局部淋巴结，其目的在于（ ）
- A. 确定肿瘤良、恶性
B. 鉴别肿瘤或炎症
C. 了解是否存在淋巴瘤
D. 判定有无多发性肿瘤可能
E. 了解肿瘤有无淋巴道转移
- 8、最易被临床检查发现原位癌的部位是（ ）
- A. 乳腺
B. 结肠
C. 子宫颈
D. 支气管
E. 膀胱
- 9、乳腺癌最常见的病理组织学类型是（ ）
- A. 浸润性导管癌

- B. 浸润性小叶癌
 - C. 鳞形细胞癌
 - D. 髓样癌
 - E. 胶样癌
- 10、浆液性卡他的发病部位是（ ）
- A. 关节
 - B. 心包
 - C. 皮肤
 - D. 粘膜
 - E. 肺泡壁

临床病理讨论第四单元自测题

- 1、发展为门脉性肝硬化最常见的病毒性肝炎类型是（ ）
 - A. 急性重型肝炎
 - B. 急性普通型肝炎
 - C. 慢性活动性肝炎
 - D. 慢性持续性肝炎
 - E. 急性黄疸性肝炎
- 2、急性普通型肝炎最常见的结局是（ ）
 - A. 急性肝功能衰竭
 - A. 急性肝功能衰竭
 - B. 肝硬化
 - C. 慢性活动性肝炎
 - D. 肝细胞癌
 - E. 逐渐恢复
- 3、原发性肝癌最常见的组织学类型是（ ）
 - A. 肝细胞癌
 - B. 肝管上皮癌
 - C. 未分化癌
 - D. 类癌
 - E. 混合性肝癌
- 4、原发性肝癌是指（ ）
 - A. 肝细胞发生的癌
 - B. 胆管上皮发生的癌
 - C. 肝细胞和肝内胆管上皮发生的癌
 - D. 来自枯否细胞的恶性肿瘤
 - E. 肝细胞和胆管上皮发生的癌
- 5、下列哪种情况应首先考虑为肝癌（ ）
 - A. 肝脏单个肿块呈圆形，有包膜.
 - B. 肝脏局部肿块，其周围有小结节
 - C. 肝脏弥漫性肿大
 - D. 肝脏肿块触之有波动感
 - E. 肝脏有无数结节，大小相近
- 6、急性普通型肝炎的病变性质是（ ）
 - A. 以肝细胞变性为主的炎症
 - B. 以肝细胞坏死为主的炎症
 - C. 以汇管区渗出为主的炎症
 - D. 以肝细胞增生为主的炎症
 - E. 以汇管区间质增生为主的炎症
- 7、门脉性肝硬化最严重的并发症是（ ）
 - A. 脾肿大
 - B. 腹水
 - C. 肝性脑病
 - D. 痔静脉曲张
 - E. 睾丸萎缩
- 8、下列哪种类型肝硬化无明显的假小叶形（ ）
 - A. 门脉性肝硬化
 - B. 坏死后性肝硬化
 - C. 血吸虫性肝硬化
 - D. 酒精性肝硬化
 - E. 肝炎后肝硬化
- 9、我国门脉性肝硬变的常见原因是（ ）
 - A. 慢性酒精中毒
 - B. 毒物中毒
 - C. 药物中毒
 - D. 病毒性肝炎
 - E. 营养不良
- 10、能分泌甲胎蛋白（AFP）的肿瘤通常是（ ）
 - A. 肺癌
 - B. 前列腺癌
 - C. 胰腺癌
 - D. 肝细胞性肝癌
 - E. 肾腺癌

临床病理讨论第五单元自测题

- 1、风湿热病变最严重的部位是（ ）
 - A. 关节
 - B. 血管
 - C. 小脑
 - D. 心脏
 - E. 皮肤
- 2、风湿小体最多见于（ ）
 - A. 心肌细胞之间
 - B. 心肌间质血管旁
 - C. 皮下结缔组织
 - D. 心外膜血管旁
 - E. 心内膜下结缔组织
- 3、风湿性性心内膜炎最常见侵犯（ ）
 - A. 主动脉瓣
 - B. 三尖瓣+肺动脉瓣
 - C. 二尖瓣+主动脉瓣
 - D. 二尖瓣
 - E. 以上都不是
- 4、疣状心内膜炎疣赘物的实质是（ ）
 - A. 风湿性肉芽肿
 - B. 机化的瘢痕
 - C. 混合血栓
 - D. 白色血栓
 - E. 增生的肉芽组织
- 5、引起左心衰竭最常见的原因是（ ）
 - A. 二尖瓣狭窄
 - B. 高血压病
 - C. 冠心病
 - D. 主动脉瓣狭窄
 - E. 主动脉瓣关闭不全
- 6、动脉粥样硬化合并血栓形成的最主要原因是（ ）
 - A. 内膜损伤，胶原暴露
 - B. 局部血液凝固性增高
 - C. 局部血流缓慢
 - D. 血流漩涡形成
 - E. 以上都不是
- 7、原发性高血压最常损害的血管是（ ）
 - A. 全身细、小静脉
 - B. 全身中、小动脉
 - C. 全身大、中动脉
 - D. 全身细、小动脉
 - E. 全身中、小静脉
- 8、高血压病脑出血最常见的部位是（ ）
 - A. 豆状核和丘脑
 - B. 内囊和基底节
 - C. 蛛网膜下腔
 - D. 侧脑室
 - E. 大脑皮质
- 9、慢性肺淤血的特点不包括（ ）
 - A. 切面暗红色
 - B. 肺泡腔内有心衰细胞
 - C. 细胞壁毛细血管扩张充血
 - D. 肺泡间隔增宽
 - E. 肺内支气管扩张
- 10、槟榔肝的特点不包括（ ）
 - A. 肝细胞脂肪变性
 - B. 肝细胞萎缩
 - C. 胆小管增生
 - D. 肝小叶中央静脉和肝窦扩张充血
 - E. 肉眼切面呈红黄相间的花纹状

临床病理讨论第六单元自测题

- 1、下列哪项能反映小叶性肺炎的本质 ()
 - A. 卡他性炎症
 - B. 纤维索性炎症
 - C. 化脓性炎症
 - D. 许多传染病的并发症
 - E. 出血性炎症
- 2、下列哪种疾病属纤维性炎症 ()
 - A. 流行性脑膜炎
 - B. 白喉性心肌炎
 - C. 阿米巴痢疾
 - D. 风湿性关节炎
 - E. 大叶性肺炎
- 3、女, 60岁, 咳嗽、咳痰8~9年。入院体查: 可平卧, 桶状胸, 两肺少量湿罗音, 剑突下可见收缩期搏动, 三尖瓣区可听见收缩期杂音, 肝脾不大, 下肢无水肿。其诊断可能为 ()
 - A. 慢性支气管炎
 - B. 慢性支气管炎、肺气肿
 - C. 慢性支气管炎、肺气肿、肺心病代偿期
 - D. 慢性支气管炎、肺心病、右心衰
 - E. 慢性支气管炎、支气管扩张
- 4、矽肺的特征性病变是 ()
 - A. 胸膜纤维化
 - B. 肺质地变硬
 - C. 肺气肿
 - D. 肺门淋巴结肿大
 - E. 矽结节
- 5、病毒性肺炎的主要诊断依据是 ()
 - A. 淋巴细胞、单核细胞浸润
 - B. 间质性肺炎
 - C. 透明膜形成
 - D. 肺泡性肺炎
 - E. 上皮细胞内病毒含体
- 6、胃溃疡病变部位最常见于 ()
 - A. 胃大弯及胃底
 - B. 胃前壁
 - C. 胃小弯近贲门处
 - D. 胃小弯近幽门处
 - E. 胃后壁
- 7、胃溃疡病最常见的并发症是 ()
 - A. 幽门狭窄
 - B. 出血
 - C. 穿孔
 - D. 癌变
 - E. 粘连
- 8、慢性胃溃疡的肉眼形成通常是 ()
 - A. 2cm以内圆形溃疡, 幽门侧边缘耸直状
 - B. 2cm以内圆形溃疡, 贲门侧边缘耸直状
 - C. 2cm以上火山口状或不规则溃疡
 - D. 2cm以上较浅之溃疡, 边缘不整齐
 - E. 2cm以上较不规则之溃疡, 底部不平
- 9、溃疡型胃癌与胃溃疡在病理形态上主要不同点是 ()
 - A. 溃疡面坏死
 - B. 溃疡合并穿孔
 - C. 溃疡深入肌层
 - D. 溃疡直径大于2cm
 - E. 溃疡处有间变细胞
- 10、肠上皮化生(intestinalization)常见于 ()
 - A. 急性胃炎
 - B. 十二指肠溃疡
 - C. 慢性肠血吸虫病
 - D. 慢性萎缩性胃炎
 - E. 溃疡性结肠炎

临床病理讨论第七单元自测题

- 1、肾小球肾炎是一种（ ）
- 以变质为主的炎症
 - 以渗出为主的炎症
 - 以增生为主的炎症
 - 以出血为主的炎症
 - 化脓性炎症
- 2、与弥漫性毛细血管内增生性肾小球肾炎有关的病原菌主要是（ ）
- 葡萄球菌
 - 肺炎球菌
 - 链球菌
 - 病毒
 - 寄生虫
- 3、弥漫性毛细血管内增生性肾小球肾炎最重要的病变是（ ）
- 肾小球毛细血管扩张充血及血栓形成
 - 毛细血管内血栓形成及基底膜增生
 - 中性炎细胞浸润及肾球囊上皮细胞增生
 - 毛细血管壁纤维样坏死
 - 毛细血管内皮细胞及系膜增生
- 4 肾小球肾炎中显示免疫荧光阳性物质的最佳答案为（ ）
- 抗原
 - 抗体
 - 补体
 - 抗体、补体
 - 细菌、抗体、补体
- 5 弥漫性毛细血管内增生性肾小球肾炎中增生的主要细胞是（ ）
- 肾球囊壁层上皮细胞及系膜细胞
 - 肾球囊脏层上皮细胞及毛细血管内皮细胞
 - 肾小球系膜细胞及毛细血管内皮细胞
 - 肾小球周围的纤维母细胞
 - 肾球囊脏层细胞和壁层细胞
- 6、肺出血肾炎综合症的肾脏病变特点是（ ）
- 主要表现为膜性肾小球肾炎
 - 主要表现为新月体肾小球肾炎
 - 主要表现为大量嗜酸粒细胞浸润
 - 主要表现为不连续颗粒状荧光
 - 主要表现为膜性增生性肾小球肾炎
- 7、慢性肾炎晚期肾小球最主要的变化是（ ）
- 肾小球纤维化、玻璃样变
 - 肾小球周围纤维化
 - 入球小动脉玻璃样变
 - 毛细血管内皮细胞增生
 - 肾球囊壁层上皮细胞增生
- 8、肾盂肾炎最常见的致病菌是（ ）
- 变性杆菌
 - 大肠杆菌
 - 产气杆菌
 - 链球菌
 - 葡萄球菌
- 9、肾盂肾炎最常见的感染途径是（ ）
- 血源性感染
 - 上行性感染
 - 外伤性感染
 - 医源性感染
 - 多途径感染
- 10、病人血浆中可检测到抗肾小球基膜抗体，应考虑肾小球肾炎（以下简称肾炎）是（ ）
- 肺出血肾炎综合症
 - 膜性肾炎
 - 微小性变性肾炎
 - 局灶性节段性肾小球硬化
 - 膜性增生性肾炎

临床病理讨论第八单元自测题

- 1、结核病的基本病变属于（ ）
 - A. 急性增生性炎
 - B. 纤维素性炎
 - C. 化脓性炎
 - D. 变质性炎
 - E. 特殊性炎
- 2、典型结核结节的中心部分往往有（ ）
 - A. 郎罕巨细胞
 - B. 类上皮细胞
 - C. 干酪样坏死
 - D. 朗格罕细胞
 - E. 变性、坏死的中性粒细胞
- 3、关于肺原发综合征的叙述，下列哪些是正确的（ ）
 - A. 原发病灶由典型的结核结节融合而成
 - B. 肉眼观察其淋巴管炎呈明显串珠状
 - C. 原发灶常位于肺通气不良的部位
 - D. 原发灶常是多灶性渗出性病变
 - E. 肺门淋巴结的干酪样坏死显著
- 4、原发性肺结核病的原发灶多位于（ ）
 - A. 肺尖
 - B. 肺上叶下部或下叶上部的胸膜处
 - C. 肺锁骨下区
 - D. 肺上叶的上部
 - E. 肺下叶的下部
- 5、结核性脑膜炎的病变特点是（ ）
 - A. 脑底部有脓性渗出液
 - B. 脑底部有黄色混浊胶冻样结节
 - C. 脑底部常布满粟粒状结核结节
 - D. 蛛网膜下腔弥漫性出血性浆液性渗出物
 - E. 蛛网膜下腔弥漫性结核性肉芽组织形成
- 6、结核病基本病变的转归中，最好的方式是（ ）
 - A. 吸收消散
 - B. 纤维化
 - C. 纤维包裹和钙化
 - D. 病灶扩大
 - E. 溶解播散
- 7、继发性肺结核病的特点是（ ）
 - A. 病变常位于肺上叶下部或下叶上部通气良好的部位
 - B. 肺门淋巴结常有明显干酪样坏死
 - C. 病变再肺内主要经受累的支气管播散
 - D. 空洞的形成比原发性肺结核病少见
 - E. 随着机体免疫增强，常迅速痊愈
- 8、关于结核球的叙述，下列哪项是正确的（ ）
 - A. 主要为增生性病变，形成许多结核结节

- B. 由于抗痨药物的应用，有明显增多的趋势
 - C. 为一种开放性肺结核，常形成空洞和经支气管播散
 - D. 常出现明显的结核中毒症状和体征
 - E. 及时给予强有力的抗痨治疗，常可在半年内痊愈
- 9、以单核巨噬细胞系统为主要病变部位的肉芽肿病变是（ ）
- A. 伤寒小结
 - B. 矽结节
 - C. 结核结节
 - D. 风湿小结
 - E. 梅毒树胶样肿
- 10、结核病灶中易查见大量结核杆菌的是（ ）
- A. 渗出性病变
 - B. 结核结节
 - C. 钙化灶
 - D. 结核球
 - E. 干酪样坏死、液化

I 教师用书

临床病理讨论资料

供临床医学专业理科实验班使用

（英文第一版）

江汉大学医学与生命科学学院

病理学与病理生理学教研室

刘丽江 舒细记 镇鸿燕 邢昊 周红艳

2004年3月

I Case1

CLINICAL HISTORY:

This 11-year-old male was admitted to the hospital with a complaint of 8 hours of severe pain in the right lower quadrant of the abdomen accompanied by nausea, vomiting, and diarrhea. Additional features on admission included a temperature of 101° F and a leukocytosis of 21,200 cells/cmm

with a [shift to the left](#). An exploratory laparotomy revealed an inflamed appendix, retrocecal in location, which was adherent to the wall of the colon.

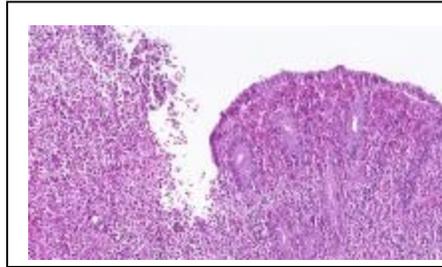
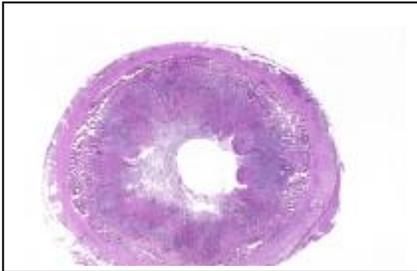
The serosal surface of the appendix was covered with friable granular material. The lumen was dilated and contained a purulent exudate as well as a fecalith. The wall measured up to 0.4 cm in thickness.

AUTOPSY FINDINGS: GROSS



This is a gross photograph of the appendix which was removed from this patient with acute appendicitis. Note the rough, shaggy material (arrows) on the surface due to deposition of fibrin and inflammatory cells.

Click to enlarge



Questions

1. What is the difference between a transudate and an exudate?
2. What is the friable, granular, grayish-red material present on the surface of the appendix in this case and where did it come from?
3. What are some of the chemoattractants that are involved in recruiting inflammatory cells to this appendix?
4. Which molecules are responsible for causing pain and fever?

DISCUSSION

Appendicitis

Acute inflammation of the vermiform appendix.

Etiology and Incidence

Although acute appendicitis is the most common disease of the appendix, other potential pathologic conditions affecting the appendix include swallowed foreign bodies, pinworms, fecaliths, carcinoids, cancer, villous adenomas, and diverticula. The appendix may also be involved in idiopathic ulcerative colitis or the ileocolitis of Crohn's disease.

Except for hernia, acute appendicitis is the most common cause in the USA of an attack of severe, acute abdominal pain that requires abdominal operation. Because symptoms and signs vary widely and because delay before operation is so hazardous, it is accepted that nearly 15% of operations for acute appendicitis lead to other findings at laparotomy or even to findings of no disease.

Symptoms and Signs

Typical symptoms and signs of acute appendicitis appear in < 50% of patients; they consist of sudden-onset epigastric or periumbilical pain followed by brief nausea and vomiting and, after a few hours, shifting of pain to the right lower quadrant. Direct tenderness and rebound tenderness in the right lower quadrant, localized pain on cough, low-grade fever (rectal temperature 37.7 to 38.3° C [100 to 101° F]), and leukocytosis (12,000 to 15,000/ μ L) characterize appendicitis.

Classic right lower quadrant tenderness is located at McBurney's point (junction of the middle and outer thirds of the line joining the umbilicus to the anterior superior spine). Rovsing's sign (pain felt in the right lower quadrant resulting from palpation of the left lower quadrant) suggests the possibility of appendicitis. The psoas sign (an increase in pain from passive extension of the right hip joint, which stretches the iliopsoas muscle) or adductor pain (pain produced by passive internal rotation of the flexed thigh) may suggest both the anatomic location of the appendix and progression of the inflammatory process.

Many variations in symptoms and signs can occur. Pain may not be localized, particularly in infants and children. Tenderness may be diffuse or noted only on rectal or pelvic examination; in rare instances, tenderness is absent and abdominal pain, persistent fever, and leukocytosis are the only signs. Bowel movements are usually less frequent or are absent; if diarrhea is a sign, a retrocecal appendix should be suspected. A few RBCs may be present in the urine. Atypical symptoms are also common in the elderly and in pregnant women; in particular, pain is less severe, and local tenderness is less acute.

Diagnosis

Usually diagnosis must be based on clinical examination. Surgery must follow rapidly to prevent uncontained perforation and generalized or diffuse peritonitis. In cases of early appendicitis, x-ray, ultrasound, and CT do not aid in diagnosis, and barium enemas are dangerous. In late stages of the disease, ultrasound and CT can help diagnose abscesses, particularly in pelvic and subphrenic areas. Laparoscopy can be of aid in some cases, particularly in women with pelvic inflammatory disease (PID).

Alternative diagnoses must be considered: immediate operation is necessary for perforated peptic ulcer, acute gangrenous cholecystitis, and acute intestinal obstruction. In a woman, if a normal appendix is found at laparotomy, careful inspection of the pelvic organs for an ovarian cyst, salpingitis, or ectopic pregnancy should be performed. In both men and women, the distal small bowel is examined for a distance of about 2 m (6 ft) to rule out a Meckel's diverticulum or ileitis (Crohn's disease or *Yersinia enterocolitica*). Mesenteric adenitis (hyperplastic lymph nodes) may be found in the mesentery of the terminal ileum. Operation should be avoided for renal colic, ruptured ovarian follicle (unless there is severe bleeding), early PID in women, or acute gastroenteritis.

Prognosis

With early operation, the mortality is low, the patient is usually discharged within a few days, and convalescence is normally rapid and complete. With complications (rupture and either formation of an abscess or peritonitis that is localized or generalized), the prognosis is more serious; although antibiotics have lowered mortality to nearly zero in many institutions, repeat operations and long convalescence may follow.

Treatment

Because perforation may occur < 24 h after the onset of symptoms, laparotomy is the only safe procedure when appendicitis is a reasonable diagnosis. Treatment of acute appendicitis is **appendectomy**; the surgeon can usually remove the appendix, even in the presence of perforation or some other disease. Occasionally, the appendix is difficult to locate; in these cases, it usually lies behind the cecum or the ileum and mesentery of the right colon. A contraindication to appendectomy is inflammatory bowel disease involving the cecum. However, in cases of terminal ileitis and a normal cecum, the appendix usually is removed.

Appendectomy should be preceded by IM or IV **antibiotics**, which are again given during the operation and continued during the early postoperative period. Third-generation cephalosporins are preferred. Suspected acute appendicitis should not be treated by antibiotics alone unless an operation is impossible.

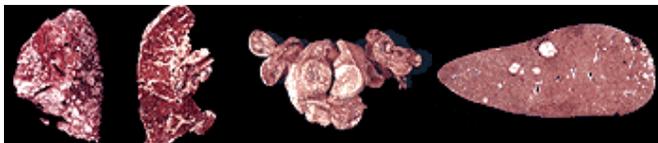
When a large inflammatory mass is found involving the appendix, terminal ileum, and cecum, resection of the entire mass and ileocolostomy are preferable. In some late cases, a pericolic abscess already has formed; it can be drained either by an ultrasound-guided percutaneous catheter or by open operation with appendectomy to follow at a later date. Unless the procedure is prevented by extensive inflammation around the appendix, a Meckel's diverticulum should be removed concomitantly with the appendectomy.

I Case2

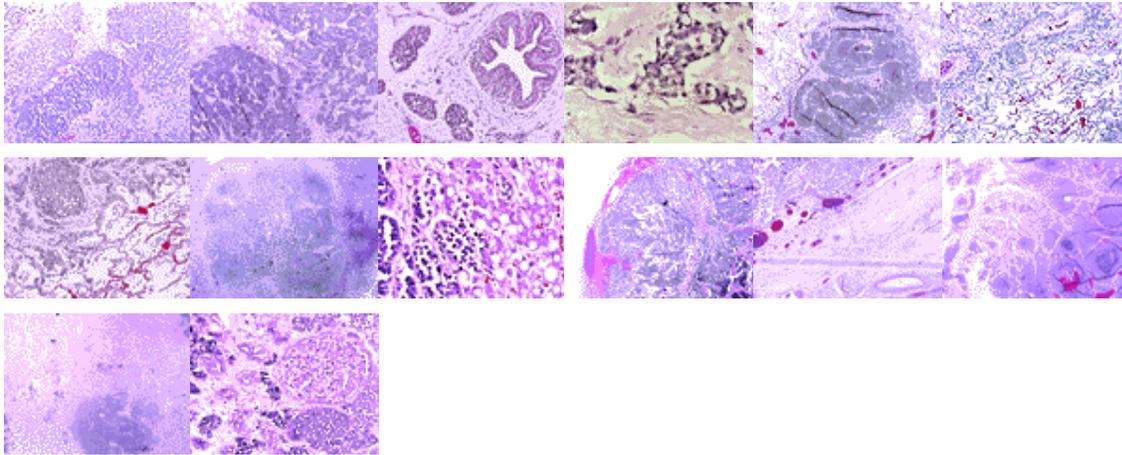
PATIENT HISTORY:

The patient was a 35 year old African American woman with a history of diabetes, hypertension, and obesity. (Twenty years earlier, she had been treated with one year of prophylactic antibiotics after a positive PPD test.) She presented with shortness of breath and a chest x-ray demonstrated bilateral pulmonary infiltrates. She was treated with antibiotics for a suspected viral pneumonia and failed to improve. She was admitted and treated with intravenous antibiotics, clinically improved, and was discharged. A follow-up chest x-ray two weeks later demonstrated no clearing of the pulmonary infiltrates. She had a non-productive cough and dyspnea on exertion. The patient was re-admitted with increased pulmonary infiltrates in a diffuse and alveolar pattern. On physical examination, she had moderate jugular venous distension, bilateral expiratory wheezes, a temperature of 99.4F, tachycardia at 136 beats per minute, and tachypnea at 24 breaths per minute. She was treated with bronchodilators and oxygen supplementation. The patient developed respiratory distress and was intubated. She became bradycardic and in spite of vigorous attempts at resuscitation, she expired.

GROSS DESCRIPTION



MICROSCOPIC DESCRIPTION



FINAL DIAGNOSIS:

WIDELY METASTATIC INFILTRATING DUCTAL CARCINOMA WITH MUCINOUS DIFFERENTIATION

Questions

1. What is the most difference between a tumor and a pneumonia?
2. What is the main reason of misdiagnosis in this case ?
3. What presented condition of illness in this case ?
 - shortness of breath
 - moderate jugular venous distension
 - bilateral expiratory wheezes
4. Which pathological lesions are responsible for causing shortness of breath and fever?

DISCUSSION (Contributor's Note):

During the patient's admission, an open lung biopsy and a breast biopsy were performed. Nodules found on her diaphragm were also biopsied. The breast mass demonstrated an infiltrating ductal carcinoma with mucinous differentiation. The other biopsies were histologically similar. Her additional work-up also revealed a posterior choroidal mass involving one orbit.

At least 25% of breast carcinomas metastasize to distant sites. When this occurs, 95% of the patients so affected die of metastatic disease. Breast carcinoma metastasizes to distant sites by way of the angiolymphatic system. The first lymph nodes to be seeded with tumor cells are the axillary nodes, followed by the supraclavicular nodes and the mammary nodes. Distant sites of metastases include the skeletal system, lungs and pleurae, liver, ovaries, adrenal glands, and central nervous system including the leptomeninges and eyes.

Breast carcinoma may be undiagnosed at the time that a patient presents with masses involving various body sites. Such cases require thorough physical examination and complete work-up for proper diagnosis. This case points out some of the varied presentations of advanced breast carcinoma.

This patient's malignancy presented as an atypical pneumonia. The decline of her pulmonary status with antibiotic treatment, as demonstrated by increasing bilateral pulmonary infiltrates, was significant. This patient demonstrated numerous lung metastases, as well as widely disseminated metastases. Other patients, however, may present with pulmonary metastases after diagnosis, and treatment of, breast carcinoma. Complete resection of a solitary pulmonary metastasis may result in complete remission with prolongation of survival time. A study by Salat and others found that patients who underwent complete resection of isolated lung metastases had a mean survival time of 79 months, while those

who underwent incomplete resection, or had no surgical intervention, had mean survival times of 15.5 and 9 months, respectively. There was no statistical significance between the last two groups. It is now currently accepted that such surgical intervention carries a low morbidity rate and prolongs survival time.

Secondly, the occurrence of ocular metastases secondary to breast carcinoma has been documented and is more common than previously suspected. Patients may present with what clinically appears to be a diffuse, infiltrative, inflammatory syndrome. In 20% of these cases, there is bilateral involvement of the eyes. Again, such cases warrant a thorough medical history and complete physical examination. Close ophthalmologic monitoring is necessary for patients previously diagnosed with breast carcinoma. As the eyes are actually an embryologic outpouching of the rudimentary brain, they exhibit the brain's propensity for seeding by breast carcinoma cells. Visual disturbances are a warning clue to these ocular metastases. Eyeball enucleation to resect such metastases may result in increased survival time. Finally, this patient's primary breast carcinoma developed in the subareolar region, an area more difficult to image with mammography. This case, therefore, points to the importance of breast self-exam and regular complete physical examinations. At the time of presentation, this patient, unfortunately, had never practiced breast self-examination.

References:

- Bodzin GA, Staren ED, Faber LP. Breast carcinoma metastases. *Chest Surgery Clinic N Am* 1998; 8:145-156.
- Chang HT, Mok KT, Wu TT. Ocular metastases from breast carcinoma: a report of two cases. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih* 1998; 61:223-229.
- Geiss CS, Keating DM, Osborne MP, Ng YY, Rosenblatt R. Retroareolar breast carcinoma: clinical, imaging, and histopathologic features. *Radiology* 1998; 207:669-673.
- Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*, 8th edition. (1998):1621-1622. Mosby
- Salat A, Murabito M, Groeger A, Staffen A, Muller MR. Significant extension of survival by complete resection of isolated lung metastases after breast carcinoma. *Chirurg* 1998; 69:735-740.
- Toller KK, Gigantelli JW, Spalding MJ. Bilateral orbital metastases from breast carcinoma. A case of false pseudotumor. *Ophthalmology* 1998; 105:1897-1901.

I Case3

CLINICAL HISTORY:

This 49-year-old married white male school teacher was a 2 pack/day smoker with a history of diabetes mellitus, hyperlipidemia and obesity, and a family history of coronary artery disease. He was awakened from his sleep at 03:00 with crushing substernal chest pain which radiated to his left arm and was accompanied by shortness of breath. When paramedics arrived, they found the patient cool, clammy, bradycardic and hypotensive. Intravenous fluids and atropine were given and he was transported to a suburban hospital.

On arrival in the emergency department at the hospital, the patient was in considerable distress. He was still bradycardic. He had no jugular venous distention. He had decreased breath sounds with occasional expiratory wheezes. At 04:01 his white blood cell count was 7,900/cu mm, hematocrit 45.8%, platelets 246,000/cu mm, creatine phosphokinase (CPK) 89 IU/L and troponin-I <0.4 ng/ml. Electrocardiogram showed ST-segment elevation in leads II, III, AVF and V4-V6. Chest x-ray showed borderline cardiomegaly without signs of pulmonary edema.

The patient was treated with morphine, atropine and aspirin, but he remained bradycardic and hypotensive. He had decreasing pulse oximeter blood oxygen saturation despite supplemental oxygen and he became cyanotic. He was intubated. A transcutaneous pacemaker was placed. A dopamine drip was started, resulting in an increase in the patient's blood pressure. He was started on heparin and emergency cardiac catheterization showed non-critical disease of the left anterior descending and left circumflex arteries but a dominant right coronary artery which was totally occluded proximally. Percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) was attempted but failed to re-open the right coronary artery. An intra-aortic balloon pump was placed and the patient was transferred via helicopter to the university hospital. At the university hospital, his total CPK rose to 4422 IU/L (MB isoenzyme 223.8 ng/ml, relative index 5.1). The evolving clinical data made it clear that his prognosis was extremely grim. He was given comfort measures and he died peacefully.

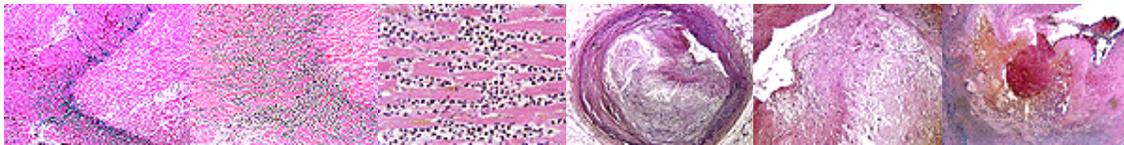
AUTOPSY FINDINGS: GROSS

Postmortem examination showed a very large right coronary artery; it continued in the posterior atrioventricular groove past the septum and over the left heart, supplying the posterolateral left ventricle, after having given off a large posterior descending artery. This right coronary artery was obstructed to a probe 1.6 cm from the ostium and heavily calcified. The left coronary artery was obstructed to a probe 3 cm from the ostium. The small left circumflex coronary artery tapered to an undissectable size before reaching the lateral left ventricular wall. Following dissection from the heart, fixation and decalcification, serial sectioning of the coronary arteries revealed severe, approximately 90% luminal narrowing of the proximal right coronary. The left circumflex coronary artery had severe atherosclerosis producing up to 90% luminal narrowing. The left anterior descending coronary artery had moderate had focally severe, approximately 75%, narrowing.

The heart was mildly enlarged; it weighed 570 grams. The epicardium was smooth. The endocardium was thin and translucent. The heart valves were thin, pliable and free of vegetations. The heart showed mild four-chamber dilatation and diffuse severe softening ("flabbiness") of the myocardium.

Sectioning the heart revealed extensive pallor of the myocardium, which was transmural and maximal in the apex. The cardiac apex was focally thinned to 0.6 cm. The pallor was minimal in the upper anterior left ventricle, and there was focal mottling of the muscle in the high portion of the septum.

AUTOPSY FINDINGS: MICROSCOPIC



The anterior left ventricle showed pale myocytes with fading nuclei and markedly decreased cross-striations, with blood vessels containing basophilic debris, bordered by a thin subepicardial zone of acute inflammation, extravasation of blood and myocyte cytoplasmic contraction banding, leaving only a small subepicardial corner of normal myocytes above the zone of inflammation. There was diffuse interstitial edema. The cardiac apex also showed diffuse interstitial edema and pale myocytes with fading nuclei and decreased striations, with a thin subepicardial zone of acute inflammation, extravasation of blood and myocyte cytoplasmic contraction banding. The subepicardial myocardium is illustrated in Images 01, 02 and 03.

The base of the posterior papillary muscle showed diffuse interstitial edema, a small area of acute inflammation and extravasation of blood, focal myocyte cytoplasmic contraction banding and areas of subendocardial hypereosinophilic myocytes. The posterior left ventricle showed multifocal myocyte contraction banding, diffuse interstitial edema and focal acute inflammation. The septum had a large area of pale staining myocytes associated with a nearby necrotic small intramyocardial coronary artery and a border of moderate acute inflammation and extravasation of blood.

Three sections of the most proximal portion of the right coronary artery showed severe atherosclerotic intimal thickening with old sclerotic disease in the deepest portions of the intima and areas of superimposed young atheroma resulting in 80-85% luminal narrowing; there was focal superimposed thrombus deposition adding approximately 5% more luminal narrowing. Five sections of the next most proximal right coronary artery all showed severe sclerotic intimal thickening with superimposed atheroma producing 70-80% luminal narrowing, one with superimposed condensing fibrin thrombus deposition adding approximately 20% more narrowing (for a total of 90% luminal stenosis), but the others with mostly postmortem thrombus in their residual lumens. The balance of the proximal right coronary artery showed sclerotic disease with superimposed atheroma producing 70-80% luminal narrowing, with primarily postmortem thrombus in the residual lumens.

The left circumflex artery showed severe intimal thickening with one section showing two-sided large young atheromas with numerous cholesterol clefts, numerous macrophages and lymphocytes, and a few multinucleated giant cells, resulting in approximately 95% luminal narrowing and a slit-like lumen. The proximal left anterior descending artery showed intimal thickening with calcification and areas of young atheroma resulting in luminal narrowing of 60-80%. The coronary arteries are illustrated in Images 04, 05 and 06.

FINAL DIAGNOSES:

ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION DIFFUSELY INVOLVING THE LEFT VENTRICLE WITH FOCAL SPARING OF THE ANTERIOR WALL.

Questions

1. What is the pathological diagnosis in this case?
2. What is the main reason of death in this case ?
3. What presented condition of illness in this case ?

“He was awakened from his sleep at 03:00 with crushing substernal chest pain which radiated to his left arm and was accompanied by shortness of breath. When paramedics arrived, they found the patient cool, clammy, bradycardic and hypotensive.”

DISCUSSION

Early atherosclerosis is characterized by atheromatous plaques, which are 0.3-1.5 cm raised white-yellow fibro-fatty lesions composed of central soft yellow lipid-rich "atheroma" covered by a firm white fibrous cap.¹ On microscopic examination, atheromas are primarily composed of amorphous eosinophilic debris, cholesterol clefts, fibrin and foam cells (lipid-laden macrophages and smooth muscle cells). Their fibrous caps are primarily composed of collagen, proliferating smooth muscle cells, macrophages, lymphocytes and foam cells. The thickening of the tunica intima causes neovascularization, ingrowth of capillaries through the tunica adventitia and tunica media into the tunica intima, creating abnormal vessels prone to rupture.

In the later stages of disease, atherosclerosis is complicated by calcification, ulceration, fissure, rupture, intraplaque hemorrhage or superimposed thrombosis.¹ Calcification causes hardening and loss of adaptability of the arteries. Ulceration or rupture of an atherosclerotic plaque can release atheroemboli, which can cause sudden ischemia or infarction. Intraplaque hemorrhage due to rupture of one of the small abnormal neovascular channels can acutely expand a plaque, causing ischemia or infarction. An acute change in a plaque, which exposes subendothelial collagen and atheroma to platelets, causes adhesion, aggregation and activation of platelets. These platelets then release adenosine diphosphate (ADP), aggregating more platelets. The platelets also release thromboxane A₂, serotonin and platelet factors 3 and 4, all of which predispose to coagulation and vasospasm. Release of tissue thromboplastin from an atheroma can activate the extrinsic pathway of coagulation.² Thrombosis superimposed on atherosclerosis of a coronary artery is associated with transmural myocardial infarction, but it is a dynamic process, with only 60% of coronary thromboses showing total occlusion after 12-24 hours.

Myocardial infarction is irreversible necrosis of heart muscle from prolonged ischemia (>20 minutes). There are approximately 1.5 million myocardial infarctions/year in the US. Acute myocardial infarction is classically associated with substernal chest pain, frequently described by the patient as a "tightness", "squeezing" or "pressure". This chest pain radiates to the left arm, shoulder or neck in 80% of cases. The patients commonly also have sweating, nausea, vomiting, dyspnea, low-grade fever, an S₄ gallop, an S₃ gallop (if the heart is failing), a friction rub (if there is pericarditis), mitral regurgitation (if the left ventricle is severely dilated) and low-grade leukocytosis. Transmural infarction involves the full thickness of the heart wall and is associated with plaque rupture in approximately 75% of cases and is associated with occlusive thrombosis superimposed on complicated plaque with an acute change in approximately 90% of cases. Subendocardial infarction involves the inner portion of the heart, and is associated with the risk of subsequent extension. Subendocardial infarction is sometimes patchy or in the distribution of multiple coronary arteries (e.g. if due to shock). The clinical diagnosis of acute myocardial infarction is based on the history, physical examination, EKG findings and laboratory blood test results. The classic EKG findings of ST segment elevation, followed by T wave inversion and Q waves, are associated with transmural infarction, while ST segment depression and T wave inversion alone are associated with subendocardial infarction. The laboratory diagnosis of myocardial infarction since the 1970s has been based on elevation of creatine phosphokinase (CPK), with an MB fraction >5% of the total CPK or a relative index >3 (if the MB fraction is measured in mass units instead of activity units). The elevation of CPK begins around 8 hours after the onset of infarction, peaks around 18 hours and ends around 48 hours. The late diagnosis of myocardial infarction can be based on elevation of lactate dehydrogenase (LDH), with an LDH-1 fraction >40% of the total LDH or LDH-1/LDH-2 ratio >1, because this peaks around 5 days. Recently, the early and late diagnosis of acute myocardial infarction has been increasingly based on elevated serum levels of cardiac troponin. This elevation begins around 4 hours after the onset of infarction and lasts longer than LDH; this test has a sensitivity similar to CPK-MB fraction and better than LDH.³ For the diagnosis of acute myocardial infarction even earlier than detectable by troponin levels, myoglobin can be tested. Elevated levels of myoglobin can be detected around 2 hours after the onset of infarction, but this has only about 60% specificity for the heart. A new type of test being evaluated for the diagnosis of acute myocardial infarction is CPK MB isoform assay, which has a 96% sensitivity and 93% specificity for infarction within 6 hours of onset of chest pain.⁴ The combination of CPK MB and troponin testing can have even higher sensitivity and is increasingly employed for the purpose of "ruling out" myocardial infarction.⁵

One-third of patients with acute myocardial infarction die of it and the anatomic pathologic diagnosis of acute myocardial infarction at autopsy is based on gross and microscopic features. Acute myocardial infarction up to 12 hours old is associated with minimal gross pathologic findings, but over the period of 12-24 hours following infarction the myocardium manifests progressive pallor. During the period of 2-4 days following infarction, the dead muscle becomes yellow and softened, and 4-10 days following infarction it develops a hyperemic border and a softened yellow shrunken depressed center.

Thin wavy myocytes are the earliest light microscopic finding of acute myocardial infarction, visible as early as one hour following the onset of infarction.⁶ Coagulation necrosis, characterized by hypereosinophilia and nuclear pyknosis, followed by karyorrhexis, karyolysis, total loss of nuclei and loss of cytoplasmic cross-striations, is generally first visible in the period from 4-12 hours following infarction.² Necrotic myocytes may retain their striations for a long time.⁷ Neutrophilic infiltration (acute inflammation), edema and hemorrhage are also first visible at 4-12 hours but generally closer to 12 hours. Acute inflammation is generally present in a narrow band of the periphery at 24 hours, in a broad band of the periphery at 48 hours and tends to be maximal around 72 hours, with extensive basophilic debris from degenerating neutrophils.⁷ Infiltration by macrophages, lymphocytes, eosinophils, fibroblasts and capillaries begins around the periphery at 3-10 days. Contraction band necrosis, characterized by hypereosinophilic transverse bands of precipitated myofibrils in dead myocytes is usually seen at the edge of an infarct or with reperfusion (e.g. with thrombolytic therapy).⁸ Reperfusion of an infarct is also associated with more hemorrhage, less acute inflammation, less limitation of the acute inflammation to the periphery in the first few days, reactive stromal cells, more macrophage infiltration earlier and a more patchy distribution of necrosis, especially around the periphery.⁸

Dating myocardial infarctions is an inexact science. The largest and most definitive study of the dating of myocardial infarctions by histopathologic criteria was based on the analysis of 192 cases in which the age of the infarct could be determined accurately.⁷ In this study, however, all of the 50 cases with death within the first day were lumped together and contrasted with the 23 cases with death within the second day and so on, so it provides data to support only dating an infarct within a particular day. Furthermore, there is data for only 4 cases with death within the sixth day, 3 cases for the seventh day and 1 case for the eighth day, so this study provides data to support only dating an infarct within a particular week, after the first week. The limitations of the scientific data and the biological variability of human disease leave ample room for the subjective experience and interpretation of the anatomic pathologist in the diagnosis and dating of acute myocardial infarction.

REFERENCES

Schoen FJ. Blood vessels. Chapter 11 in Robbins Pathologic Basis of Disease, fifth edition, 1994, Cotran RS, Kumar V, Schoen FJ, eds., Philadelphia, W.B.Saunders, pp.467-516.

Schoen FJ. The heart. Chapter 12 in Robbins Pathologic Basis of Disease, fifth edition, 1994, Cotran RS, Kumar V, Schoen FJ, eds., Philadelphia, W.B.Saunders, pp.517-582.

Brown CS, Bertolet D. Cardiac troponin: See ya later, CK. Chest 1997;111:2-4.

Roberts R. Early diagnosis of myocardial infarction with MB CK isoforms. Clinica Chimica Acta 1998;272:33-45.

Chung-Che C, Ip MPC, Hsu RM, Vrobel T. Evaluation of a proposed panel of cardiac markers for the diagnosis of acute myocardial infarction in patients with atraumatic chest pain. Arch Pathol Lab Med 1998;122:320-324.

Bouchardy B, Majno G. Histopathology of early myocardial infarcts. Am J Pathol 1974;74:301-330.

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. Chest 1978;73:843-849.

Reichenbach D, Cowan MJ. Healing of myocardial infarction with and without reperfusion. Chapter 5, in Cardiovascular Pathology, 1991, Virmani R, Atkinson JB, Fenoglio JJ, eds., Philadelphia, W.B.Saunders, pp. 86-98.

I Case 4

PATIENT HISTORY:

The patient was a 48-year-old male with a history of asthma, smoking and possible ethanol abuse, who was otherwise in good health and not on any medication. The patient suffered a traumatic injury to his head after falling down a flight of stairs, while under the influence of alcohol, on the evening of Day 1. It is unclear whether or not the patient suffered a loss of consciousness at that time; he went to bed and complained of a severe headache when awakened around noon the next day

An initial CT scan of the patient's head showed a small right-sided temporoparietal intraparenchymal hemorrhage. His glucose, hemoglobin, hematocrit, platelets, PT, PTT and INR were all within normal limits. The patient remained neurologically stable and was admitted with a diagnosis of intracranial hemorrhage.

A CT scan of the head performed on Day 3 (Figures 1 & 2), showed a right temporal contusion, subarachnoid hemorrhage and an old left frontal traumatic injury. It also showed possible bilateral mastoiditis with fluid in both middle ears and scattered mastoid air cells, suggesting a possible temporal bone fracture. The patient remained alert and oriented with no focal neurological deficits. He was placed on phenytoin prophylaxis against seizures, and discharged home.

Two days later, on Day 5, the patient presented to an outside hospital with a headache. He described his pain as constant since his discharge two days earlier, worsening to the point of interfering with concentration, physical activity and sleep. The patient also reported feeling nauseated and weak. On exam, he was alert and oriented, but lethargic at times; his pupils were normally reactive. He had a nonproductive cough, with rhonchi in the right posterior lung base and scattered rales. The patient's temperature was 36.3 degree, pulse 80 beats per minute, blood pressure (BP) 175/102 mmHg and respirations 20 per minute. The patient's temperature rose to 37.4 degree and his skin became pale, moist and clammy; he was then transferred to our medical center for further evaluation.

Upon arrival at the emergency room, the patient was alert and oriented, complaining of headache but able to follow commands. He had no focal neurologic deficits; his pupils were equal and reactive and he was moving all extremities with 2+ reflexes. His neck was supple and tympanic membranes were clear bilaterally. The patient was afebrile, with a pulse of 72 bpm, BP of 150/94 mmHg and respiratory rate of 20. The lungs were clear to auscultation and a chest x-ray showed no abnormalities.

Laboratory results from Day 5 (Table 1) showed an elevated white blood cell count of 13,800 per cu mm (87% polymorphonuclear cells).

Table 1: Laboratory Results from Day 5

Laboratory Parameter	Patient Results	Normal Range
WBC	13.8 ×10E+09/L	3.8-10.6
BANDS	6 %	0-5
BASOPHILS	0 %	0-1
EOSINOPHILS	0 %	0-6

LYMPHOCYTES	3 %	13-44
MONOCYTES	4 %	4-13
POLYS	87 %	44-77
RBC	4.88 × 10E+12/L	4.13-5.57
HEMATOCRIT	43.5 %	38.0-48.8
HEMOGLOBIN	15.4 g/dL	12.9-16.9
PLATELETS	259 × 10E+09/L	156-369
APT	10.4 sec	10.0-12.8
APTT	24.5 sec	24.4-33.2
INR	0.9	
NA	137mEq/L	136.0-146.0
K	5.7 mEq/L	3.5-5.0
CL	102 mEq/L	95-110
CO2	22 mEq/L	21.0-31.0
BUN	11mg/dL	5-20
CREATININE	0.8mg/dL	0.5-1.4
GLUCOSE	152 mg/dL	70.0-110.0

The patient was admitted at 7:30 PM on Day 5, after he started moaning and became agitated and uncooperative. He was given Ativan, phenytoin, folate and thiamine (due to concerns of possible ETOH withdrawal), but remained non-verbal and did not follow commands.

By 3:45 AM on Day 6, the patient had ceased to move his lower left extremity spontaneously and in response to stimuli; the movement of his right extremity was minimal. His pupils were fixed and non-reactive. A CT scan showed stable cortical hemorrhage in the right temporal lobe with no hydrocephalus or new areas of hemorrhage.

The patient's temperature rose to 40.5 degree at around 5:30 AM on Day 6. His laboratory findings at that time (Table 2) included a white blood cell count of 10,900 per cu mm (60% polys, 28% bands with toxic granulations and Dohle bodies).

Table 2: Laboratory Results from Day 6

Laboratory Parameter	Patient Results	Normal Range
WBC	10.9 X 10E+09/L	3.8-10.6
BANDS	28 %	0-5
BASOPHILS	0 %	0-1
EOSINOPHILS	0 %	0-6
LYMPHOCYTES	7 %	13-44
MONOCYTES	5 %	4-13
POLYS	60 %	44-77
RBC	4.68 X 10E+12/L	4.13-5.57
HEMATOCRIT	41.4 %	38.0-48.8
HEMOGLOBIN	14.8 g/dL	12.9-16.9
PLATELETS	174 X 10E+09/L	156-369
APT	10.3 sec	10.0-12.8
APTT	28.2 sec	24.4-33.2

INR	0.9	
NA	135 mEq/L	136.0-146.0
K	3.9 mEq/L	3.5-5.0
CL	100 mEq/L	95-110
CO2	18 mEq/L	21.0-31.0
BUN	10 mg/dL	5-20
CREATININE	0.9 mg/dL	0.5-1.4
GLUCOSE	157 mg/dL	70.0-110.0
CA	9.3 mg/dL	8.5-10.5
MG	1.2 mEq/L	1.3-2.1
PHOS	1.0 mg/dL	2.5-4.5
TBILI	1.2 mg/dL	0.3-1.5

An extraventricular drain was placed with drainage of 50 ml of purulent cerebrospinal fluid (CSF). Analysis of the CSF showed 2,680 leukocytes per cu mm (100% neutrophils), 1,900 erythrocytes/cu mm, a protein level of 761 mg/dL and a glucose level of < 20 mg/dL (see Discussion for comparison to normal CSF findings). A Gram stain of the CSF (Figures 3 & 4) showed red blood cells, many neutrophils and gram-positive cocci in pairs. The patient was diagnosed with acute bacterial meningitis and placed on vancomycin and cefepime. A stat electroencephalogram (EEG) showed no meaningful brain function on the right and hyperactive brain function on the left, with no evidence of seizure activity.

The patient did not show any improvement and soon lost his corneal reflexes. His blood pressure dropped shortly thereafter and his EEG became flat. His examination showed no evidence of meaningful neurologic activity and he was judged to have suffered brain death. The patient was pronounced dead at 10:30 AM on Day 6 after his initial fall.

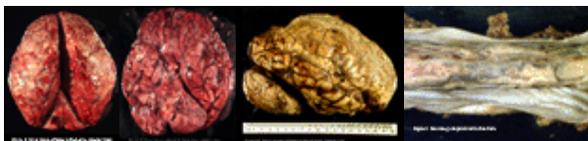
CSF cultures later yielded heavy *Streptococcus pneumoniae*. Peripheral blood cultures taken on Day 6, postmortem blood and lung-tissue cultures were all subsequently reported positive for *S. pneumoniae*.

MICROBIOLOGY DIAGNOSIS:

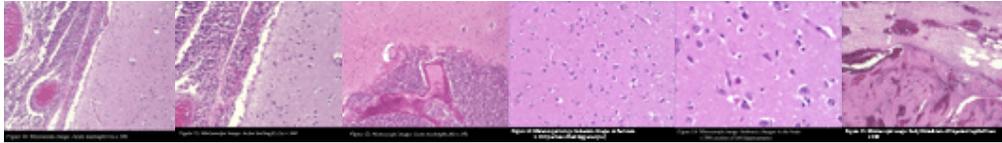
Streptococcus pneumoniae bacteria are gram-positive cocci arranged in chains and pairs (diplococci) on microscopic examination. A green, α -hemolytic, zone surrounds *S. pneumoniae* colonies on blood-agar plates. Pneumococci can be differentiated from other catalase-negative viridans streptococci by their susceptibility to Optochin and solubility in bile salts. Molecular methods for detection of *S. pneumoniae*, many of which are PCR-based, can also be used.

AUTOPSY FINDINGS:

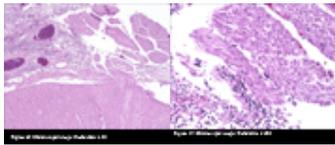
CENTRAL NERVOUS SYSTEM:



Gross examination of the brain in both fresh (Figures 6 & 7) and fixed (Figure 8) states revealed dull, opaque and focally hemorrhagic leptomeninges with extensive purulent exudates along the cerebral convexities, longitudinal fissure, dural cap, base of the brain and spinal cord (Figure 9). Extensive purulent exudates were also noted within the superior sagittal sinus, which appeared partially thrombosed. The brain was moderately edematous with no signs of herniation.

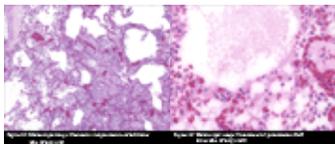


Microscopic examination of the brain and leptomeninges showed acute meningitis (Figures 10, 11 & 12), in addition to acute hypoxic encephalopathy with acute ischemic cell change in scattered neocortical neurons and subiculum (Figures 13 & 14). Early thrombosis of the superior sagittal sinus was also microscopically evident (Figure 15)



Microscopic examination of the spinal cord shows radiculitis (Figures 16 & 17) due to involvement of spinal nerves and nerve roots by the inflammatory exudate.

LUNGS:



The lungs showed mild pulmonary edema, moderate emphysema, with bullae up to 2 cm, and focal scarring of the upper lobes of both lungs. Microscopic examination revealed the presence of multifocal acute pneumococcal pneumonia in the lower lobe of the left lung (Figures 18 & 19).

FINAL PATHOLOGIC DIAGNOSES:

SEVERE, ACUTE PNEUMOCOCCAL MENINGO-ENCEPHALO-RADICULITIS WITH ACUTE HYPOXIC ENCEPHALOPATHY, MODERATE BRAIN EDEMA AND EARLY THROMBOSIS OF THE SUPERIOR SAGITTAL SINUS.

FOCAL, ACUTE PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA OF THE LOWER LOBE OF THE LEFT LUNG.

PNEUMOCOCCAL BACTEREMIA AND POSSIBLE SEPTICEMIA.

Questions

1. What did every symptom and sign mean?
2. What was the main cause of the death of this patient?
3. What possible pathological findings could be seen during the disease?
4. What possible pathological findings could be seen in the autopsy?
5. How will you deal with this patient if you are the doctor?

DISCUSSION:

Streptococcus pneumoniae is the major cause of otitis media, sinusitis, meningitis and community-acquired bacterial pneumonia, as well as an infrequent cause of peritonitis, pelvic infections in women, septic arthritis, osteomyelitis, soft tissue infections and purulent endo- and pericarditis. Particularly severe or unusual pneumococcal infections can be seen in HIV-positive patients. 1, 2

The major host protection mechanism against pneumococcal infections is opsonophagocytosis. One of the most important virulence factors of *S. pneumoniae* is the presence of a polysaccharide capsule, which allows it to escape phagocytosis. However, anti-capsular antibodies acquired by exposure to the organism, or by vaccination, are effective in conferring protection against pneumococcal infections. The currently available pneumococcal vaccine incorporates 23 of the most pathogenic of the 80+ antigenically distinct capsular types that have been identified. 1, 2, 3

Other important pneumococcal virulence factors include: the teichoic acid and peptidoglycan constituents of the bacterial cell wall, surface proteins, pneumolysin (a cytoplasmic toxin released by autolysis of the cell) and, possibly, hyaluronidase (a glycosidase that degrades components of the extra-cellular matrix). 2, 3, 4

A number of conditions predispose to pneumococcal infections, including: defective antibody formation (congenital or secondary to conditions such as chronic lymphocytic leukemia, lymphoma or HIV infection); complement deficiency or dysfunction; neutropenia or neutrophilic dysfunction; splenectomy or splenic dysfunction; prior respiratory infections and inflammatory conditions such as cigarette smoking, asthma and COPD (chronic obstructive pulmonary disease). Multifactorial conditions, such as diabetes mellitus, renal insufficiency, liver cirrhosis, malnutrition, glucocorticosteroid therapy, alcoholism, cold exposure, stress, fatigue and excess likelihood of exposure to *S. pneumoniae* (such as occurs in daycare centers, college dormitories and military training camps), also contribute to host susceptibility to pneumococcal infection. 1, 2 Some factors that increase the risk of pneumococcal meningitis in particular are: chronic otitis media, head trauma with basilar skull fracture and cerebrospinal fluid (CSF) rhinorrhea. 5, 6

Bacterial meningitis is a severe, acute purulent infection of the leptomeninges and subarachnoid space. Extension of the inflammatory reaction into the brain parenchyma (meningoencephalitis) can result in increased intracranial pressure, seizures, stroke, coma and death. The mortality rate of bacterial meningitis can reach 25%, while adverse neurological outcomes are seen in upwards of 50% of survivors. 1, 4

Wide-spread use of the Haemophilus influenzae type b vaccine, and the emergence and increasing prevalence of penicillin and cephalosporin-resistant strains of *S. pneumoniae*, have led to changes in the epidemiologic profile of bacterial meningitis in the United States. *Streptococcus pneumoniae* is now the major cause of this disease, particularly in adults, accounting for around 15% of total meningitis cases in the United States, or approximately 1.1 cases per 100,000 population/year; it is also the leading cause of meningitis following head trauma, skull fractures and CSF leakage. 1, 2, 4, 5

The exact pathogenesis of pneumococcal meningitis remains unclear. The process begins by pneumococcal colonization of the nasopharynx, which can be followed by invasion into the perivascular space, bacteremia with subsequent seeding of the choroid plexus and breach of either the blood-brain barrier or the blood-CSF barrier by as yet unknown mechanisms. Direct extension of *Streptococcus pneumoniae* from the sinuses or middle ear into the subarachnoid space, particularly in trauma cases, represents an alternative route of CSF access. 2, 4, 5

Pneumococci can multiply rapidly in the CSF due to the absence of effective host defense mechanisms within it. 4, 5 However, it is not the pathogen itself that causes neurological complications, rather, it is

the inflammatory reaction towards the invading pathogen that is responsible for the observed tissue damage and clinical manifestations of meningoencephalitis. 2, 3, 5

The polysaccharide capsule of *Streptococcus pneumoniae* lacks inflammatory potential and acts mainly as a protection against phagocytosis. The peptidoglycan and teichoic acid constituents of the pneumococcal cell wall are critical inducers of the inflammatory response. Lyses of bacteria and release of cell wall components in the subarachnoid space stimulates production of cytokines and chemokines by microglia, astrocytes, monocytes, microvascular endothelial cells and white blood cells (WBCs) in the CSF. The resulting inflammatory processes alter the permeability of the blood-brain barrier, leading to cerebral edema and leakage of serum proteins into the CSF, contributing to the formation of a purulent exudate in the subarachnoid space. The purulent exudate impedes the flow of CSF causing interstitial edema, obstructive and communicating hydrocephalus; it also engulfs the large arteries at the base of the brain causing vasculitis with narrowing of the arterial lumens, which, in turn, results in cerebral ischemia. The inflammatory process can involve the venous system leading to thrombosis of the major sinuses and thrombophlebitis of cerebral cortical veins. Increased intracranial pressure, resulting from cerebral edema, alterations of CSF hemodynamics and loss of cerebrovascular autoregulation, is an important consequence of the inflammatory reaction, and one which leads to further cerebral ischemia. 2, 3, 5

Direct neurotoxicity is another important mechanism of brain damage in pneumococcal meningoencephalitis. Pneumolysin, cytokines and other bacterial components and inflammatory agents induce the production of excitatory amino acids (such as glutamate), reactive oxygen and nitrogen agents (free oxygen radicals, nitric oxide, peroxynitrite, etc.) and other mediators in the brain which bring about massive apoptosis of brain cells. 2, 3, 5

Bacterial meningitis classically presents with a triad of headache, fever and stiff neck. The stiff neck is a result of inflammation surrounding and involving spinal nerves and nerve roots; it is a pathognomonic sign of meningeal irritation that can occasionally be absent. Other signs and symptoms that can be seen in bacterial meningitis include: lethargy, altered mental status, focal neurologic deficits, seizure activity, coma, nausea, vomiting, and photophobia, in addition to findings related to increased intracranial pressure such as papilledema. The disease may progress rapidly, over a few hours, or it may become progressively worse over several days. 2, 5, 6, 7

Neuroimaging does not usually aid in the diagnoses of purulent meningitis, but can be useful in diagnosing complications such as abscesses, hydrocephalus or ischemia. 5, 7 The "gold standard" for diagnosis of bacterial meningitis is direct examination, chemical analysis, gram stain and culture of the CSF. Cerebrospinal fluid abnormalities in bacterial meningitis include a markedly increased opening pressure (>180 mm H₂O), increased presence of white blood cells (normal: 0-5 lymphocytes/ mm³, bacterial meningitis: 10 - 10,000 WBCs/mm³ with polymorphonuclear predominance), decreased glucose content (normal: 45-85, bacterial meningitis: < 40 mg/dL) and increased protein concentration (normal: 15-45, bacterial meningitis: >50 mg/dL). Red blood cells (RBCs) are usually absent from both normal and bacterial meningitis CSF; however, RBCs can be seen in both cases if the spinal tap was traumatic. Not all cases of bacterial meningitis have typical CSF findings, and some values, particularly glucose concentration, need to be interpreted within the clinical context. CSF glucose values are normally 50-70% of blood glucose values, therefore, use of a CSF/serum glucose ratio can correct for a decreased CSF glucose value masked by hyperglycemia. A CSF/serum glucose ratio of 0.31 or less is highly suggestive of bacterial meningitis. 5, 6 Gram stains of the CSF show gram-positive cocci in 70 to 90+ % of untreated pneumococcal meningitides; blood or CSF cultures are almost always positive in these cases as well. Tests to detect pneumococcal antigens in the CSF, such as latex agglutination (LA), are useful in the diagnosis of bacterial meningitis in patients who have already been started on antibiotic therapy, and in whom the gram stain and culture results are negative. However, a negative LA test does not rule out bacterial meningitis because the sensitivity of these tests may not always high enough. 2, 5, 6

The initial treatment of pneumococcal meningitis consists of supportive therapy and anti-microbials, including vancomycin (because of its certain anti-microbial efficacy) and a β -lactam (because it crosses the blood-brain barrier reliably and the organism may be susceptible to it). However,

susceptibility testing of the cultured *Streptococcus pneumoniae* strain must be performed, and therapeutic agents modified accordingly, for definitive anti-microbial treatment. 2, 5, 6

REFERENCES:

Koneman EW; Allen SD; Janda WM; Schreckenberger PC; Winn Jr WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th edition: Lippincott Williams & Wilkins, 1997.

Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell, Bennett and Dolin, ed. Principles and Practice of Infectious Diseases. Vol. 2: Churchill Livingstone, 2000:2128-2147.

Gillespie SH, Balakrishnan I. Pathogenesis of pneumococcal infection. J Med Microbiol 2000; 49:1057-67.

Meli DN, Christen S, Leib SL, Tauber MG. Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. Curr Opin Infect Dis 2002; 15:253-7.

Roos KL. Acute bacterial meningitis. Semin Neurol 2000; 20:293-306.

Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA, ed. Current Medical Diagnosis & Treatment 2002: Appleton & Lange, 2002.

Gray F, Nordmann P. Bacterial infections. In: Graham DI, Lantos PL, ed. Greenfield's Neuropathology, 6th edition: Arnold, 1997.

I 学生用书

临床病理讨论资料

供临床医学专业理科实验班使用

(英文第一版)

江汉大学医学与生命科学学院

病理学与病理生理学教研室

刘丽江 舒细记 镇鸿燕 邢昊 周红艳

2004年3月

I Case1

CLINICAL HISTORY:

This 11-year-old male was admitted to the hospital with a complaint of 8 hours of severe pain in the right lower quadrant of the abdomen accompanied by nausea, vomiting, and diarrhea. Additional features on admission included a temperature

of 101° F and a leukocytosis of 21,200 cells/cmm with a shift to the left.. An exploratory laparotomy revealed an inflamed appendix, retrocecal in location, which was adherent to the wall of the colon.

Questions:

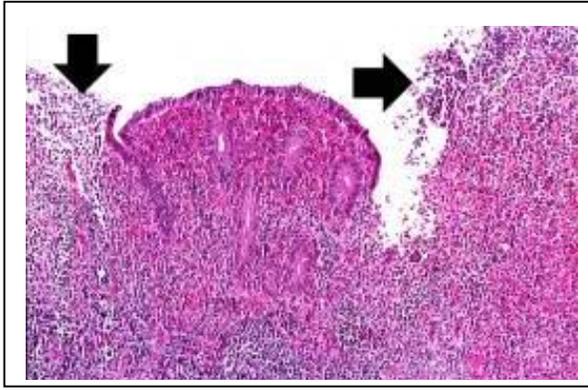
- 1.What is the difference between a transudate and an exudate?
- 2.What is the friable, granular, grayish-red material present on the surface of the appendix in this case and where did it come from?
- 3.What are some of the chemoattractants that are involved in recruiting inflammatory cells to this appendix?
- 4.Which molecules are responsible for causing pain and fever?

I Case1 images:

GROSS DESCRIPTION



MICROSCOPIC DESCRIPTION



I Case1

DISCUSSION

FINAL DIAGNOSIS:

Appendicitis

Acute inflammation of the vermiform appendix.

Etiology and Incidence

Although acute appendicitis is the most common disease of the appendix, other potential pathologic conditions affecting the appendix include swallowed foreign bodies, pinworms, fecaliths, carcinoids, cancer, villous adenomas, and diverticula. The appendix may also be involved in idiopathic ulcerative colitis or the ileocolitis of Crohn's disease.

Except for hernia, acute appendicitis is the most common cause in the USA of an attack of severe, acute abdominal pain that requires abdominal operation. Because symptoms and signs vary widely and because delay before operation is so hazardous, it is accepted that nearly 15% of operations for acute appendicitis lead to other findings at laparotomy or even to findings of no disease.

Symptoms and Signs

Typical symptoms and signs of acute appendicitis appear in < 50% of patients; they consist of sudden-onset epigastric or periumbilical pain followed by brief nausea and vomiting and, after a few hours, shifting of pain to the right lower quadrant. Direct tenderness and rebound tenderness in the right lower quadrant, localized pain on cough, low-grade fever (rectal temperature 37.7 to 38.3° C [100 to 101° F]), and leukocytosis (12,000 to 15,000/μL) characterize appendicitis.

Classic right lower quadrant tenderness is located at McBurney's point (junction of the middle and outer thirds of the line joining the umbilicus to the anterior superior spine). Rovsing's sign (pain felt in the right lower quadrant resulting from palpation of the left lower quadrant) suggests the possibility of appendicitis. The psoas sign (an increase in pain from passive extension of the right hip joint, which stretches the iliopsoas muscle) or adductor pain (pain produced by passive internal rotation of the flexed thigh) may suggest both the anatomic location of the appendix and progression of the inflammatory process.

Many variations in symptoms and signs can occur. Pain may not be localized, particularly in infants and children. Tenderness may be diffuse or noted only on rectal or pelvic examination; in rare instances, tenderness is absent and abdominal pain, persistent fever, and leukocytosis are the only signs. Bowel movements are usually less frequent or are absent; if diarrhea is a sign, a retrocecal appendix should be suspected. A few RBCs may be present in the urine. Atypical symptoms are also common in the elderly and in pregnant women; in particular, pain is less severe, and local tenderness is less acute.

Diagnosis

Usually diagnosis must be based on clinical examination. Surgery must follow rapidly to prevent uncontained perforation and generalized or diffuse peritonitis. In cases of early appendicitis, x-ray, ultrasound, and CT do not aid in diagnosis, and barium enemas are dangerous. In late stages of the disease, ultrasound and CT can help diagnose abscesses, particularly in pelvic and subphrenic areas. Laparoscopy can be of aid in some cases, particularly in women with pelvic inflammatory disease (PID).

Alternative diagnoses must be considered: immediate operation is necessary for perforated peptic ulcer, acute gangrenous cholecystitis, and acute intestinal obstruction. In a woman, if a normal appendix is found at laparotomy, careful inspection of the pelvic organs for an ovarian cyst, salpingitis, or ectopic pregnancy should be performed. In both men and women, the distal small bowel is examined for a distance of about 2 m (6 ft) to rule out a Meckel's diverticulum or ileitis (Crohn's disease or *Yersinia* enteritis). Mesenteric adenitis (hyperplastic lymph nodes) may be found in the mesentery of the terminal ileum. Operation should be avoided for renal colic, ruptured ovarian follicle (unless there is severe bleeding), early PID in women, or acute gastroenteritis.

Prognosis

With early operation, the mortality is low, the patient is usually discharged within a few days, and convalescence is normally rapid and complete. With complications (rupture and either formation of an abscess or peritonitis that is localized or generalized), the prognosis is more serious; although antibiotics have lowered mortality to nearly zero in many institutions, repeat operations and long convalescence may follow.

Treatment

Because perforation may occur < 24 h after the onset of symptoms, laparotomy is the only safe procedure when appendicitis is a reasonable diagnosis. Treatment of acute appendicitis is **appendectomy**; the surgeon can usually remove the appendix, even in the presence of perforation or some other disease. Occasionally, the appendix is difficult to locate; in these cases, it usually lies behind the cecum or the ileum and mesentery of the right colon. A contraindication to appendectomy is inflammatory bowel disease involving the cecum. However, in cases of terminal ileitis and a normal cecum, the appendix usually is removed. Appendectomy should be preceded by IM or IV **antibiotics**, which are again given during the operation and continued during the early postoperative period. Third-generation cephalosporins are preferred. Suspected acute appendicitis should not be treated by antibiotics alone unless an operation is impossible.

When a large inflammatory mass is found involving the appendix, terminal ileum, and cecum, resection of the entire mass and ileocolostomy are preferable. In some late cases, a pericolic abscess already has formed; it can be drained either by an ultrasound-guided percutaneous catheter or by open operation with appendectomy to follow at a later date. Unless the procedure

is prevented by extensive inflammation around the appendix, a Meckel's diverticulum should be removed concomitantly with the appendectomy.

I Case1 self-exam

1. Upon stimulation, which of the following is released from platelet granules?

- A. Thromboxane A₂
- B. Arachidonic acid
- C. Serotonin
- D. Eosinophilic chemotactic factor
- E. Platelet-activating factor (PAF)

2. Which of the following activates Hageman factor?

- A. Thrombin
- B. Calcium phosphate
- C. Complement C5a
- D. Negatively charged surfaces
- E. Complement Clq

3. Eosinophils typically increase in number in response to which of the following?

- A. Gram-negative bacteria
- B. Suppressor T cells
- C. Parasites
- D. Mycobacteria
- E. Gram-positive cocci

4. Granulomas are typically seen in association with all of the following EXCEPT:

- A. Tuberculosis
- B. Pneumococcal pneumonia
- C. Leprosy
- D. Schistosomiasis
- E. Talc inhalation

5. All of the following produce superoxide anion EXCEPT:

- A. Monocytes
- B. Macrophages
- C. Platelets
- D. Eosinophils
- E. Neutrophils

6. Epithelioid cells within granulomas are derived from which of the following?

- A. Plasma cells
- B. Platelets
- C. Neutrophils
- D. Macrophages

- E. Lymphocytes
7. All of the following are true regarding platelet-activating factor (PAF) EXCEPT:
- A. Induces platelet aggregation
 - B. Stimulates platelet secretion
 - C. Is an acylated lysophospholipid
 - D. Enhances arachidonic acid metabolism in neutrophils
 - E. Causes endothelial cell necrosis
8. Predominant cell types in typical chronic inflammatory reactions include all of the following EXCEPT:
- A. Macrophages
 - B. T helper lymphocytes
 - C. Plasma cells
 - D. Polymorphonuclear leukocytes
 - E. B lymphocytes
9. Which of the following cell types responds the earliest in acute inflammatory responses?
- A. Activated T helper cells
 - B. Activated B cells
 - C. Cytotoxic killer T cells
 - D. Mast cells
 - E. Plasma cells
10. Which of the following regarding thromboxane A₂ is true?
- A. It stabilizes endothelial cells
 - B. It activates lymphocytes
 - C. It stimulates platelet aggregation
 - D. It is produced via the lipoxygenase pathway
 - E. It degrades basement membranes

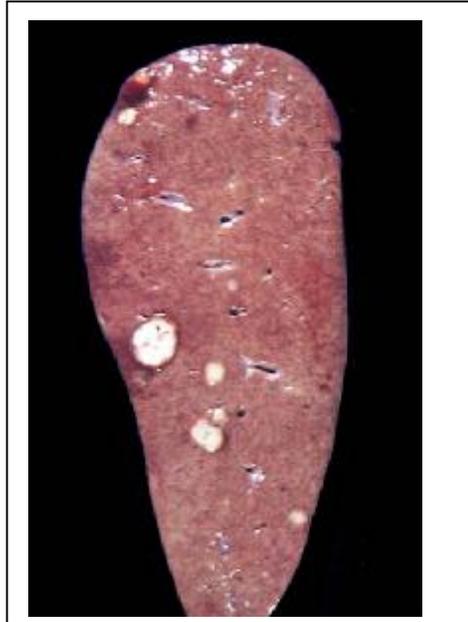
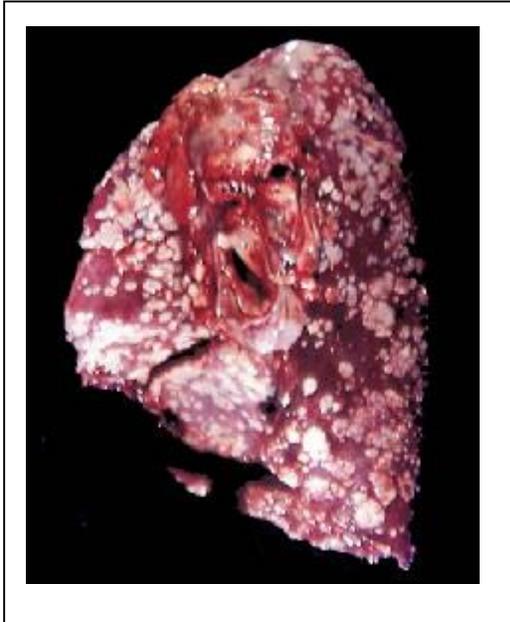
I Case2

PATIENT HISTORY:

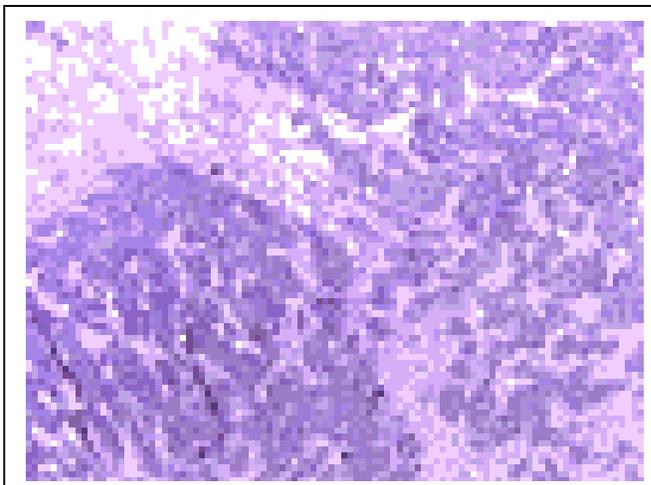
The patient was a 35 year old African American woman with a history of diabetes, hypertension, and obesity. (Twenty years earlier, she had been treated with one year of prophylactic antibiotics after a positive PPD test.) She presented with shortness of breath and a chest x-ray demonstrated bilateral pulmonary infiltrates. She was treated with antibiotics for a suspected viral pneumonia and failed to improve. She was admitted and treated with intravenous antibiotics, clinically

improved, and was discharged. A follow-up chest x-ray two weeks later demonstrated no clearing of the pulmonary infiltrates. She had a non-productive cough and dyspnea on exertion. The patient was re-admitted with increased pulmonary infiltrates in a diffuse and alveolar pattern. On physical examination, she had moderate jugular venous distension, bilateral expiratory wheezes, a temperature of 99.4F, tachycardia at 136 beats per minute, and tachypnea at 24 breaths per minute. She was treated with bronchodilators and oxygen supplementation. The patient developed respiratory distress and was intubated. She became bradycardic and in spite of vigorous attempts at resuscitation, she expired.

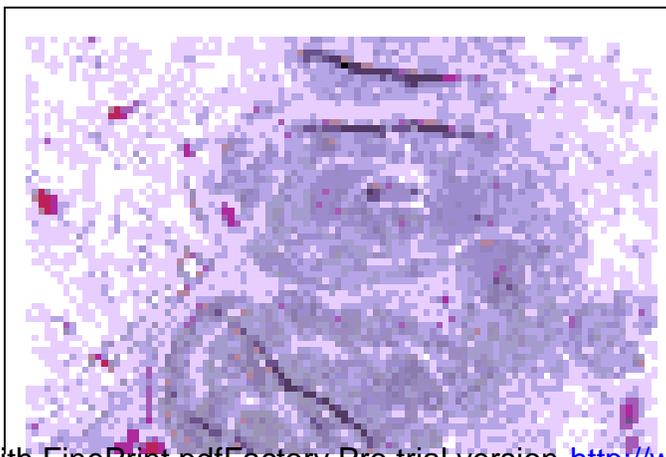
GROSS DESCRIPTION



MICROSCOPIC DESCRIPTION



Section of breast tissues



Questions:

1. What is the most difference between a tumor and a pneumonia?
2. What is the main reason of misdiagnosis in this case ?
3. What presented condition of illness in this case ?

shortness of breath

moderate jugular venous distension

bilateral expiratory wheezes

4. Which pathological lesions are responsible for causing shortness of breath and fever?

FINAL DIAGNOSIS:

WIDELY METASTATIC INFILTRATING DUCTAL CARCINOMA WITH MUCINOUS DIFFERENTIATION

DISCUSSION:

During the patient's admission, an open lung biopsy and a breast biopsy were performed. Nodules found on her diaphragm were also biopsied. The breast mass demonstrated an infiltrating ductal carcinoma with mucinous differentiation. The other biopsies were histologically similar. Her additional work-up also revealed a posterior choroidal mass involving one orbit.

At least 25% of breast carcinomas metastasize to distant sites. When this occurs, 95% of the patients so affected die of metastatic disease. Breast carcinoma metastasizes to distant sites by way of the angiolymphatic system. The first lymph nodes to be seeded with tumor cells are the axillary nodes, followed by the supraclavicular nodes and the mammary nodes. Distant sites of metastases include the skeletal system, lungs and pleurae, liver, ovaries, adrenal glands, and central nervous system including the leptomeninges and eyes.

Breast carcinoma may be undiagnosed at the time that a patient presents with masses involving various body sites. Such cases require thorough physical examination and complete work-up for proper diagnosis. This case points out some of the varied presentations of advanced breast carcinoma.

This patient's malignancy presented as an atypical pneumonia. The decline of her pulmonary status with antibiotic treatment, as demonstrated by increasing bilateral pulmonary infiltrates, was significant. This patient demonstrated numerous lung metastases, as well as widely disseminated metastases. Other patients, however, may present with pulmonary metastases after diagnosis, and treatment of, breast carcinoma. Complete resection of a solitary pulmonary metastasis may result in complete remission with prolongation of survival time. A study by Salat and others found that patients who underwent complete resection of isolated lung metastases had a mean survival time of 79 months, while those who underwent incomplete resection, or had no surgical intervention, had mean survival times of 15.5 and 9 months, respectively. There was no statistical significance between the last two groups. It is now currently accepted that such surgical intervention carries a low morbidity rate and prolongs survival time.

Secondly, the occurrence of ocular metastases secondary to breast carcinoma has been documented and is more common than previously suspected. Patients may present with what clinically appears to be a diffuse, infiltrative, inflammatory syndrome. In 20% of these cases, there is bilateral involvement of the eyes. Again, such cases warrant a thorough medical history and complete physical examination. Close ophthalmologic monitoring is necessary for patients previously diagnosed with breast carcinoma. As the eyes are actually an embryologic outpouching of the rudimentary brain, they exhibit the brain's propensity for seeding by breast carcinoma cells. Visual disturbances are a warning clue to these ocular metastases. Eyeball enucleation to resect such metastases may result in increased survival time.

Finally, this patient's primary breast carcinoma developed in the subareolar region, an area more difficult to image with mammography. This case, therefore, points to the importance of breast self-exam and regular complete physical examinations. At the time of presentation, this patient, unfortunately, had never practiced breast self-examination.

References:

- Bodzin GA, Staren ED, Faber LP. Breast carcinoma metastases. *Chest Surgery Clinic N Am* 1998; 8:145-156.
- Chang HT, Mok KT, Wu TT. Ocular metastases from breast carcinoma: a report of two cases. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih* 1998; 61:223-229.
- Geiss CS, Keating DM, Osborne MP, Ng YY, Rosenblatt R. Retroareolar breast carcinoma: clinical, imaging, and histopathologic features. *Radiology* 1998; 207:669-673.
- Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*, 8th edition. (1998):1621-1622. Mosby
- Salat A, Murabito M, Groeger A, Staffen A, Muller MR. Significant extension of survival by complete resection of isolated lung metastases after breast carcinoma. *Chirurg* 1998; 69:735-740.
- Toller KK, Gigantelli JW, Spalding MJ. Bilateral orbital metastases from breast carcinoma. A case of false pseudotumor. *Ophthalmology* 1998; 105:1897-1901.

I Case2 self-exam

1. Neoplasms are best characterized as:
 - A. Malignant tumors
 - B. Tumors that have a metastatic potential
 - C. A proliferation of cells that does not have a metastatic potential
 - D. A cellular proliferation in which growth is for the most part autonomous
 - E. A proliferation of cells that is characterized by its ability to invade contiguous structures
2. The best definition for dysplasia is:

- A. An in situ carcinoma
 - B. Carcinoma which has been confined to within a basement membrane
 - C. The induction of a fibrous response by malignant cells
 - D. The heterogeneity of a primary neoplasm
 - E. The ability of tumor specific membrane receptors to localize glycoproteins
3. The decision to treat cancer with chemotherapy is based mostly on:
- A. The stage of the tumor
 - B. The nucleocytoplasmic ratio
 - C. The degree of nuclear anaplasia
 - D. Tumor pleomorphism
 - E. The degree of histologic differentiation
4. A reciprocal chromosomal translocation that places the c-myc gene next to the immunoglobulin genes has been implicated in:
- A. Retinoblastoma
 - B. Chronic myelogenous leukemia
 - C. Chronic lymphocytic leukemia
 - D. Hodgkin's disease
 - E. Burkitt's lymphoma
5. Proto-oncogenes are:
- A. Viral sequences that have been placed into host cells
 - B. Cellular copies of oncogenes that were first found in RNA viruses
 - C. Viral genes that are uniquely contained within RNA viruses
 - D. DNA viral sequences that are known to infect human cells and have been implicated in neoplasia
 - E. Cellular sequences that are not oncogenes themselves, but are strong promoter sequences that flank the true oncogene
6. Which of the following is a malignant tumor?
- A. Fibroma
 - B. Lymphoma
 - C. Papilloma of skin
 - D. Teratoma
 - E. Chondroid hamartoma of the lung
7. Paraneoplastic syndromes refer to:
- A. The desmoplastic response of connective tissue next to an invasive tumor
 - B. An immune reaction that stimulates the proliferation of a neoplasm
 - C. The remote effects of cancer not attributable to tumor invasion or metastasis
 - D. The local effect of a metastatic tumor on an organ, i.e. compression of the spinal cord by metastatic lung cancer
 - E. The expansion of the primary organ involved which would influence by compression the function of adjacent organs

8. A surgical pathologist examines a tumor from the skin of the ear in a 80-year old man. It is composed of spindle shaped cells that infiltrate the dermis. Because he is uncertain of the diagnosis, he orders immunoperoxidase stains which show that the tumor is cytokeratin negative, S100 negative (not of neurocrest histogenesis), but is positive for vimentin. It can be stated that this tumor is a:
- A. Melanoma
 - B. Basal cell carcinoma
 - C. Squamous cell carcinoma
 - D. Tumor of mesenchymal cells
 - E. Tumor metastatic from a glioblastoma
9. A metastatic tumor is examined by electron microscopy. It contains well-formed cytoplasmic neuroendocrine granules. The most likely primary site would be:
- A. The ovary
 - B. The prostate
 - C. The breast
 - D. The adrenal medulla
 - E. The brain
10. The bone marrow biopsy of a 55-year old woman exhibits large, anaplastic cohesive cells by immunohistology, that are positive for cytokeratin. The most likely diagnosis is:
- A. Acute myeloid leukemia
 - B. Chronic myeloid leukemia
 - C. Chondroma
 - D. Metastasis of a carcinoma
 - E. Kaposi sarcoma

I Case3

CLINICAL HISTORY:

This 49-year-old married white male school teacher was a 2 pack/day smoker with a history of diabetes mellitus, hyperlipidemia and obesity, and a family history of coronary artery disease. He was awakened from his sleep at 03:00 with crushing substernal chest pain which radiated to his left arm and was accompanied by shortness of breath. When paramedics arrived, they found the patient cool, clammy, bradycardic and hypotensive. Intravenous fluids and atropine were given and he was transported to a suburban hospital.

On arrival in the emergency department at the hospital, the patient was in considerable distress. He was still bradycardic. He had no jugular venous distention. He had decreased breath sounds with occasional expiratory wheezes. At 04:01 his white blood cell count was 7,900/cu mm, hematocrit 45.8%, platelets 246,000/cu mm, creatine phosphokinase (CPK) 89 IU/L and troponin-I <0.4 ng/ml. Electrocardiogram showed ST-segment elevation in leads II, III, AVF and V4-V6. Chest x-ray showed borderline cardiomegaly without signs of pulmonary edema.

The patient was treated with morphine, atropine and aspirin, but he remained bradycardic and hypotensive. He had decreasing pulse oximeter blood oxygen saturation despite supplemental oxygen and he became cyanotic. He was intubated. A transcutaneous pacemaker was placed. A dopamine drip was started, resulting in an increase in the patient's blood pressure. He was started on heparin and emergency cardiac catheterization showed non-critical disease of the left anterior descending and left circumflex arteries but a dominant right coronary artery which was totally occluded proximally. Percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) was attempted but failed to re-open the right coronary artery. An intra-aortic balloon pump was placed and the patient was transferred via helicopter to the university hospital. At the university hospital, his total CPK rose to 4422 IU/L (MB isoenzyme 223.8 ng/ml, relative index 5.1). The evolving clinical data made it clear that his prognosis was extremely grim. He was given comfort measures and he died peacefully.

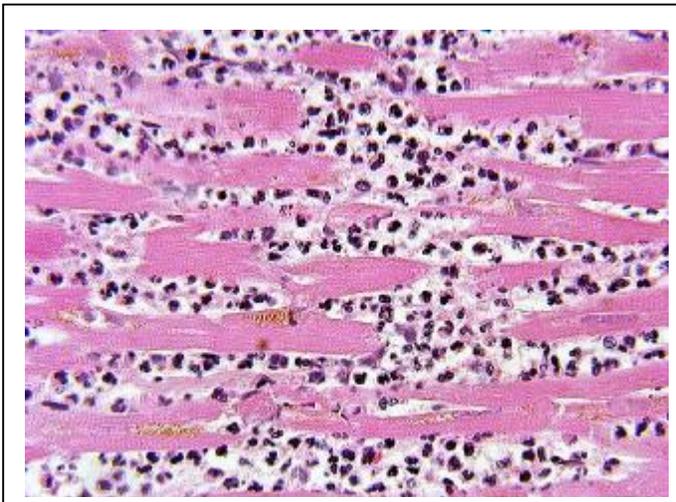
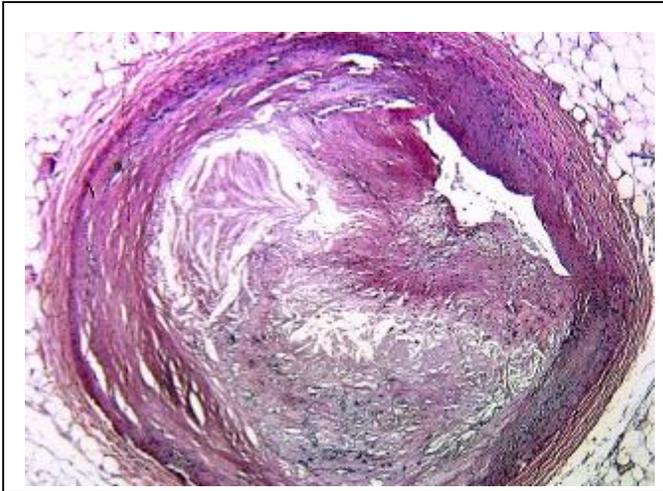
AUTOPSY FINDINGS: GROSS

Postmortem examination showed a very large right coronary artery; it continued in the posterior atrioventricular groove past the septum and over the left heart, supplying the posterolateral left ventricle, after having given off a large posterior descending artery. This right coronary artery was obstructed to a probe 1.6 cm from the ostium and heavily calcified. The left coronary artery was obstructed to a probe 3 cm from the ostium. The small left circumflex coronary artery tapered to an undissectable size before reaching the lateral left ventricular wall.

Following dissection from the heart, fixation and decalcification, serial sectioning of the coronary arteries revealed severe, approximately 90% luminal narrowing of the proximal right coronary. The left circumflex coronary artery had severe atherosclerosis producing up to 90% luminal narrowing. The left anterior descending coronary artery had moderate to focally severe, approximately 75%, narrowing.

The heart was mildly enlarged; it weighed 570 grams. The epicardium was smooth. The endocardium was thin and translucent. The heart valves were thin, pliable and free of vegetations. The heart showed mild four-chamber dilatation and diffuse severe softening ("flabbiness") of the myocardium. Sectioning the heart revealed extensive pallor of the myocardium, which was transmural and maximal in the apex. The cardiac apex was focally thinned to 0.6 cm. The pallor was minimal in the upper anterior left ventricle, and there was focal mottling of the muscle in the high portion of the septum.

Microscopic :



Questions:

1. What is the pathological diagnosis in this case?
2. What is the main reason of death in this case ?
3. What presented condition of illness in this case ?

“He was awakened from his sleep at 03:00 with crushing substernal chest pain which radiated to his left arm and was accompanied by shortness of breath. When paramedics arrived, they found the patient cool, clammy, bradycardic and hypotensive.”

FINAL DIAGNOSES:

ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION DIFFUSELY INVOLVING THE LEFT VENTRICLE WITH FOCAL SPARING OF THE ANTERIOR WALL.

DISCUSSION

Early atherosclerosis is characterized by atheromatous plaques, which are 0.3-1.5 cm raised white-yellow fibro-fatty lesions composed of central soft yellow lipid-rich "atheroma" covered by a firm white fibrous cap.¹ On microscopic examination, atheromas are primarily composed of amorphous eosinophilic debris, cholesterol clefts, fibrin and foam cells (lipid-laden macrophages and smooth muscle cells). Their fibrous caps are primarily composed of collagen, proliferating smooth muscle cells, macrophages, lymphocytes and foam cells. The thickening of the tunica intima causes neovascularization, ingrowth of capillaries through the tunica adventitia and tunica media into the tunica intima, creating abnormal vessels prone to rupture.

In the later stages of disease, atherosclerosis is complicated by calcification, ulceration, fissure, rupture, intraplaque hemorrhage or superimposed thrombosis.¹ Calcification causes hardening and loss of adaptability of the arteries. Ulceration or rupture of an atherosclerotic plaque can release atheroemboli, which can cause sudden ischemia or infarction. Intraplaque hemorrhage due to rupture of one of the small abnormal neovascular channels can acutely expand a plaque, causing ischemia or infarction. An acute change in a plaque, which exposes subendothelial collagen and atheroma to platelets, causes adhesion, aggregation and activation of platelets. These platelets then release adenosine diphosphate (ADP), aggregating more platelets. The platelets also release thromboxane A₂, serotonin and platelet factors 3 and 4, all of which predispose to coagulation and vasospasm. Release of tissue thromboplastin from an atheroma can activate the extrinsic pathway of coagulation.² Thrombosis superimposed on atherosclerosis of a coronary artery is associated with transmural myocardial infarction, but it is a dynamic process, with only 60% of coronary thromboses showing total occlusion after 12-24 hours.

Myocardial infarction is irreversible necrosis of heart muscle from prolonged ischemia (>20 minutes). There are approximately 1.5 million myocardial infarctions/year in the US. Acute myocardial infarction is classically associated with substernal chest pain, frequently described by the patient as a "tightness", "squeezing" or "pressure". This chest pain radiates to the left arm, shoulder or neck in 80% of cases. The patients commonly also have sweating, nausea, vomiting, dyspnea, low-grade fever, an S₄ gallop, an S₃ gallop (if the heart is failing), a friction rub (if there is pericarditis), mitral regurgitation (if the left ventricle is severely dilated) and low-grade leukocytosis. Transmural infarction involves the full thickness of the heart wall and is associated with plaque rupture in approximately 75% of cases and is associated with occlusive thrombosis superimposed on complicated plaque with an acute change in approximately 90% of cases. Subendocardial infarction involves the inner portion of the heart, and is associated with the risk of subsequent extension. Subendocardial infarction is sometimes patchy or in the distribution of multiple coronary arteries (e.g. if due to shock).

The clinical diagnosis of acute myocardial infarction is based on the history, physical examination, EKG findings and laboratory blood test results. The classic EKG findings of ST segment elevation, followed by T wave inversion and Q waves, are associated with transmural infarction, while ST segment depression and T wave inversion alone are associated with subendocardial infarction. The laboratory diagnosis of myocardial infarction since the 1970s has been based on elevation of creatine phosphokinase (CPK), with an MB fraction >5% of the total CPK or a relative index >3 (if the MB fraction is measured in mass units instead of activity units). The elevation of CPK begins around 8 hours after the onset of infarction, peaks around 18 hours and ends around 48 hours. The late diagnosis of myocardial infarction can be based on elevation of

lactate dehydrogenase (LDH), with an LDH-1 fraction $>40\%$ of the total LDH or LDH-1/LDH-2 ratio >1 , because this peaks around 5 days.

Recently, the early and late diagnosis of acute myocardial infarction has been increasingly based on elevated serum levels of cardiac troponin. This elevation begins around 4 hours after the onset of infarction and lasts longer than LDH; this test has a sensitivity similar to CPK-MB fraction and better than LDH.³ For the diagnosis of acute myocardial infarction even earlier than detectable by troponin levels, myoglobin can be tested. Elevated levels of myoglobin can be detected around 2 hours after the onset of infarction, but this has only about 60% specificity for the heart. A new type of test being evaluated for the diagnosis of acute myocardial infarction is CPK MB isoform assay, which has a 96% sensitivity and 93% specificity for infarction within 6 hours of onset of chest pain.⁴ The combination of CPK MB and troponin testing can have even higher sensitivity and is increasingly employed for the purpose of "ruling out" myocardial infarction.⁵ One-third of patients with acute myocardial infarction die of it and the anatomic pathologic diagnosis of acute myocardial infarction at autopsy is based on gross and microscopic features. Acute myocardial infarction up to 12 hours old is associated with minimal gross pathologic findings, but over the period of 12-24 hours following infarction the myocardium manifests progressive pallor. During the period of 2-4 days following infarction, the dead muscle becomes yellow and softened, and 4-10 days following infarction it develops a hyperemic border and a softened yellow shrunken depressed center.

Thin wavy myocytes are the earliest light microscopic finding of acute myocardial infarction, visible as early as one hour following the onset of infarction.⁶ Coagulation necrosis, characterized by hypereosinophilia and nuclear pyknosis, followed by karyorrhexis, karyolysis, total loss of nuclei and loss of cytoplasmic cross-striations, is generally first visible in the period from 4-12 hours following infarction.² Necrotic myocytes may retain their striations for a long time.⁷ Neutrophilic infiltration (acute inflammation), edema and hemorrhage are also first visible at 4-12 hours but generally closer to 12 hours. Acute inflammation is generally present in a narrow band of the periphery at 24 hours, in a broad band of the periphery at 48 hours and tends to be maximal around 72 hours, with extensive basophilic debris from degenerating neutrophils.⁷ Infiltration by macrophages, lymphocytes, eosinophils, fibroblasts and capillaries begins around the periphery at 3-10 days. Contraction band necrosis, characterized by hypereosinophilic transverse bands of precipitated myofibrils in dead myocytes is usually seen at the edge of an infarct or with reperfusion (e.g. with thrombolytic therapy).⁸ Reperfusion of an infarct is also associated with more hemorrhage, less acute inflammation, less limitation of the acute inflammation to the periphery in the first few days, reactive stromal cells, more macrophage infiltration earlier and a more patchy distribution of necrosis, especially around the periphery.⁸

Dating myocardial infarctions is an inexact science. The largest and most definitive study of the dating of myocardial infarctions by histopathologic criteria was based on the analysis of 192 cases in which the age of the infarct could be determined accurately.⁷ In this study, however, all of the 50 cases with death within the first day were lumped together and contrasted with the 23 cases with death within the second day and so on, so it provides data to support only dating an infarct within a particular day. Furthermore, there is data for only 4 cases with death within the sixth day, 3 cases for the seventh day and 1 case for the eighth day, so this study provides data to support only dating an infarct within a particular week, after the first week. The limitations of the scientific data and the biological variability of human disease leave ample room for the subjective experience and interpretation of the anatomic pathologist in the diagnosis and dating of acute myocardial infarction.

REFERENCES

Schoen FJ. Blood vessels. Chapter 11 in Robbins Pathologic Basis of Disease, fifth edition, 1994, Cotran RS, Kumar V, Schoen FJ, eds., Philadelphia, W.B.Saunders, pp.467-516.

Schoen FJ. The heart. Chapter 12 in Robbins Pathologic Basis of Disease, fifth edition, 1994, Cotran RS, Kumar V, Schoen FJ, eds., Philadelphia, W.B.Saunders, pp.517-582.

Brown CS, Bertolet D. Cardiac troponin: See ya later, CK. Chest 1997;111:2-4.

Roberts R. Early diagnosis of myocardial infarction with MB CK isoforms. Clinica Chimica Acta 1998;272:33-45.

Chung-Che C, Ip MPC, Hsu RM, Vrobel T. Evaluation of a proposed panel of cardiac markers for the diagnosis of acute myocardial infarction in patients with atraumatic chest pain. Arch Pathol Lab Med 1998;122:320-324.

Bouchardy B, Majno G. Histopathology of early myocardial infarcts. Am J Pathol 1974;74:301-330.

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. Chest 1978;73:843-849.

Reichenbach D, Cowan MJ. Healing of myocardial infarction with and without reperfusion. Chapter 5, in Cardiovascular Pathology, 1991, Virmani R, Atkinson JB, Fenoglio JJ, eds., Philadelphia, W.B.Saunders, pp. 86-98.

I Case3 self-exam

1. Which of the following is a common complication of bacterial endocarditis?
 - A. Abscesses in brain, kidneys and spleen
 - B. Pulmonary emboli
 - C. Polyarteritis nodosa
 - D. Chronic pericarditis
 - E. Systemic lupus erythematosus

2. Microscopic examination of the myocardial infarction in a patient who expired 24-48 hours following the occlusion of the coronary artery shows:
 - A. Well-developed granulation tissue
 - B. Necrosis of myocardium and infiltrates of polymorphonuclear leukocytes
 - C. Plasma cell infiltrates
 - D. Fibroblastic proliferation
 - E. Extensive infiltration of myocardium with mononuclear cells

3. Hematuria and flank pain are observed in a patient with a seven-day history of trans-mural myocardial infarction. What is the most likely underlying cause?
 - A. Emboli from ventricular mural thrombi
 - B. Emboli from atrial mural thrombi
 - C. Emboli from aortic valve vegetations
 - D. Acute pyelonephritis
 - E. Emboli from mitral valve vegetation

4. A patient with a massive myocardial infarction dies suddenly on the sixth hospital day. Autopsy reveals:
 - A. Lymphocytic infiltrate of myocardium

- B. Plasma cell infiltrate of coronary arteries
 - C. Bilateral occlusions of coronary sinuses
 - D. Fibrotic lesion in right ventricular wall
 - E. Rupture of left ventricle and hemopericardium
5. In addition to pulmonary stenosis and ventricular septal defect, Tetralogy of Fallot includes:
- A. Dextroposition of aorta and right ventricular hypertrophy
 - B. Dextroposition of aorta and left ventricular hypertrophy
 - C. Right ventricular hypertrophy and left atrial dilatation
 - D. Right ventricular hypertrophy and aortic stenosis
 - E. Aortic stenosis and left ventricular hypertrophy
6. Aneurysmal dilatation of the left ventricle:
- A. Leads to aortic stenosis
 - B. Is a late complication of myocardial infarction
 - C. Follows a subendocardial myocardial infarction
 - D. Is associated with pulmonary stenosis
 - E. Occurs in the first week following a massive myocardial infarction
7. Endomyocardial biopsy is indicated in the workup of a cardiac patient for:
- A. Endocarditis
 - B. Coronary artery disease
 - C. Tetralogy of fallot
 - D. Aortic stenosis
 - E. Amyloidosis
8. The major manifestations of rheumatic fever include all the following except:
- A. Chorea
 - B. Pancarditis
 - C. Subcutaneous nodules
 - D. Ankylosing spondylitis
 - E. Arthritis
9. All of the following are complications of myocardial infarction except:
- A. Cor pulmonale
 - B. Cerebral emboli
 - C. Dissecting aortic aneurysm
 - D. Cardiac tamponade
 - E. Arrhythmia
10. Hypertensive cerebral hemorrhage is a typical complication of
- A. Pulmonary stenosis
 - B. Coarctation of the aorta

- C. Transposition of great vessels
- D. Interventricular septal defect, with a left to right shunt
- E. Patent foramen ovale

I Case 4

PATIENT HISTORY:

The patient was a 48-year-old male with a history of asthma, smoking and possible ethanol abuse, who was otherwise in good health and not on any medication. The patient suffered a traumatic injury to his head after falling down a flight of stairs, while under the influence of alcohol, on the evening of Day 1. It is unclear whether or not the patient suffered a loss of consciousness at that time; he went to bed and complained of a severe headache when awakened around noon the next day

An initial CT scan of the patient's head showed a small right-sided temporoparietal intraparenchymal hemorrhage. His glucose, hemoglobin, hematocrit, platelets, PT, PTT and INR were all within normal limits. The patient remained neurologically stable and was admitted with a diagnosis of intracranial hemorrhage.

A CT scan of the head performed on Day 3 (Figures 1), showed a right temporal contusion, subarachnoid hemorrhage and an old left frontal traumatic injury. It also showed possible bilateral mastoiditis with fluid in both middle ears and scattered mastoid air cells, suggesting a possible temporal bone fracture. The patient remained alert and oriented with no focal neurological deficits. He was placed on phenytoin prophylaxis against seizures, and discharged home.

Two days later, on Day 5, the patient presented to an outside hospital with a headache. He described his pain as constant since his discharge two days earlier, worsening to the point of interfering with concentration, physical activity and sleep. The patient also reported feeling nauseated and weak. On exam, he was alert and oriented, but lethargic at times; his pupils were normally reactive. He had a nonproductive cough, with rhonchi in the right posterior lung base and scattered rales. The patient's temperature was 36.3 degree, pulse 80 beats per minute, blood pressure (BP) 175/102 mmHg and respirations 20 per minute. The patient's temperature rose to 37.4 degree and his skin became pale, moist and clammy; he was then transferred to our medical center for further evaluation. Upon arrival at the emergency room, the patient was alert and oriented, complaining of headache but able to follow commands. He had no focal neurologic deficits; his pupils were equal and reactive and he was moving all extremities with 2+ reflexes. His neck was supple and tympanic membranes were clear bilaterally. The patient was afebrile, with a pulse of 72 bpm, BP of 150/94 mmHg and respiratory rate of 20. The lungs were clear to auscultation and a chest x-ray showed no abnormalities.

Laboratory results from Day 5 (Table 1) showed an elevated white blood cell count of 13,800 per cu mm (87% polymorphonuclear cells).

Table 1: Laboratory Results from Day 5

Laboratory Parameter	Patient Results	Normal Range
WBC	13.8 ×10E+09/L	3.8-10.6
BANDS	6 %	0-5
BASOPHILS	0 %	0-1

EOSINOPHILS	0 %	0-6
LYMPHOCYTES	3 %	13-44
MONOCYTES	4 %	4-13
POLYS	87 %	44-77
RBC	4.88 × 10E+12/L	4.13-5.57
HEMATOCRIT	43.5 %	38.0-48.8
HEMOGLOBIN	15.4 g/dL	12.9-16.9
PLATELETS	259 × 10E+09/L	156-369
APT	10.4 sec	10.0-12.8
APTT	24.5 sec	24.4-33.2
INR	0.9	
NA	137mEq/L	136.0-146.0
K	5.7 mEq/L	3.5-5.0
CL	102 mEq/L	95-110
CO2	22 mEq/L	21.0-31.0
BUN	11mg/dL	5-20
CREATININE	0.8mg/dL	0.5-1.4
GLUCOSE	152 mg/dL	70.0-110.0

The patient was admitted at 7:30 PM on Day 5, after he started moaning and became agitated and uncooperative. He was given Ativan, phenytoin, folate and thiamine (due to concerns of possible ETOH withdrawal), but remained non-verbal and did not follow commands.

By 3:45 AM on Day 6, the patient had ceased to move his lower left extremity spontaneously and in response to stimuli; the movement of his right extremity was minimal. His pupils were fixed and non-reactive. A CT scan showed stable cortical hemorrhage in the right temporal lobe with no hydrocephalus or new areas of hemorrhage.

The patient's temperature rose to 40.5 degree at around 5:30 AM on Day 6. His laboratory findings at that time (Table 2) included a white blood cell count of 10,900 per cu mm (60% polys, 28% bands with toxic granulations and Dohle bodies).

Table 2: Laboratory Results from Day 6

Laboratory Parameter	Patient Results	Normal Range
WBC	10.9 X 10E+09/L	3.8-10.6
BANDS	28 %	0-5
BASOPHILS	0 %	0-1
EOSINOPHILS	0 %	0-6
LYMPHOCYTES	7 %	13-44
MONOCYTES	5 %	4-13
POLYS	60 %	44-77
RBC	4.68 X 10E+12/L	4.13-5.57
HEMATOCRIT	41.4 %	38.0-48.8
HEMOGLOBIN	14.8 g/dL	12.9-16.9
PLATELETS	174 X 10E+09/L	156-369
APT	10.3 sec	10.0-12.8
APTT	28.2 sec	24.4-33.2
INR	0.9	
NA	135 mEq/L	136.0-146.0
K	3.9 mEq/L	3.5-5.0
CL	100 mEq/L	95-110
CO2	18 mEq/L	21.0-31.0
BUN	10 mg/dL	5-20
CREATININE	0.9 mg/dL	0.5-1.4
GLUCOSE	157 mg/dL	70.0-110.0
CA	9.3 mg/dL	8.5-10.5
MG	1.2 mEq/L	1.3-2.1
PHOS	1.0 mg/dL	2.5-4.5
TBILI	1.2 mg/dL	0.3-1.5

An extraventricular drain was placed with drainage of 50 ml of purulent cerebrospinal fluid (CSF). Analysis of the CSF showed 2,680 leukocytes per cu mm (100% neutrophils), 1,900 erythrocytes/cu mm, a protein level of 761 mg/dL and a glucose level of < 20 mg/dL (see Discussion for comparison to normal CSF findings). A Gram stain of the CSF showed red blood cells, many neutrophils and

gram-positive cocci in pairs. The patient was diagnosed with acute bacterial meningitis and placed on vancomycin and cefepime. A stat electroencephalogram (EEG) showed no meaningful brain function on the right and hyperactive brain function on the left, with no evidence of seizure activity.

The patient did not show any improvement and soon lost his corneal reflexes. His blood pressure dropped shortly thereafter and his EEG became flat. His examination showed no evidence of meaningful neurologic activity and he was judged to have suffered brain death. The patient was pronounced dead at 10:30 AM on Day 6 after his initial fall.

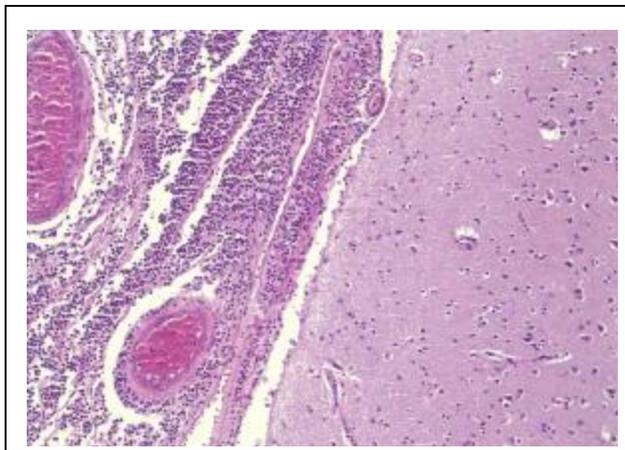
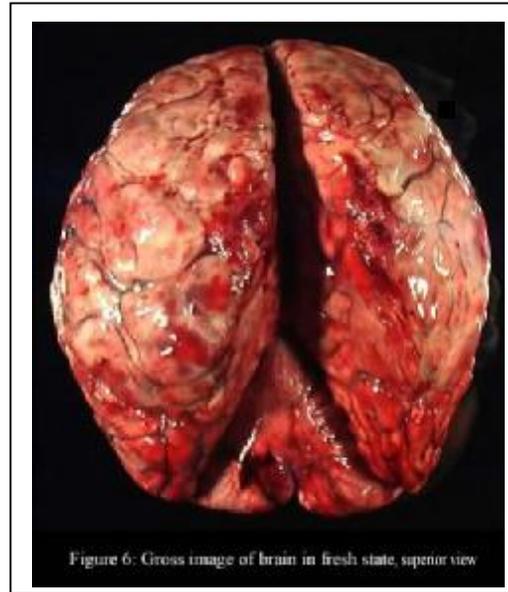
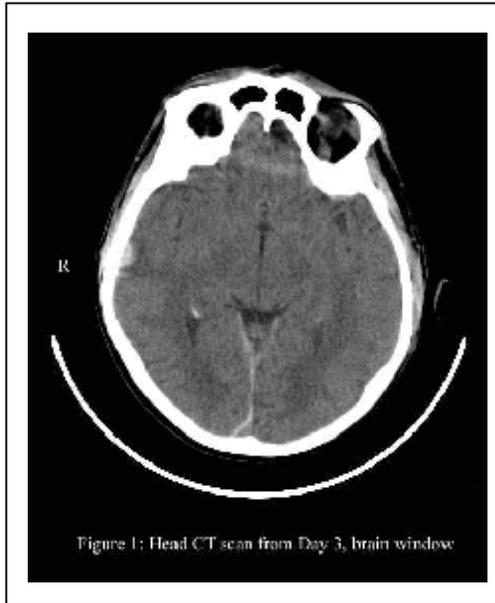
CSF cultures later yielded heavy *Streptococcus pneumoniae*. Peripheral blood cultures taken on Day 6, postmortem blood and lung-tissue cultures were all subsequently reported positive for *S. pneumoniae*.

MICROBIOLOGY DIAGNOSIS:

Streptococcus pneumoniae bacteria are gram-positive cocci arranged in chains and pairs (diplococci) on microscopic examination. A green, α -hemolytic, zone surrounds *S. pneumoniae* colonies on blood-agar plates. Pneumococci can be differentiated from other catalase-negative viridans streptococci by their susceptibility to Optochin and solubility in bile salts. Molecular methods for detection of *S. pneumoniae*, many of which are PCR-based, can also be used.

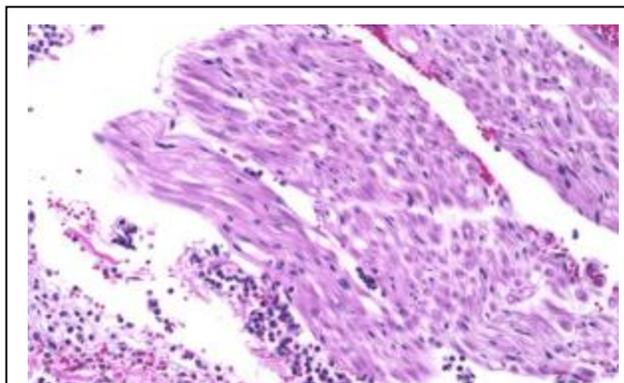
AUTOPSY FINDINGS:

GROSS SECTIONS

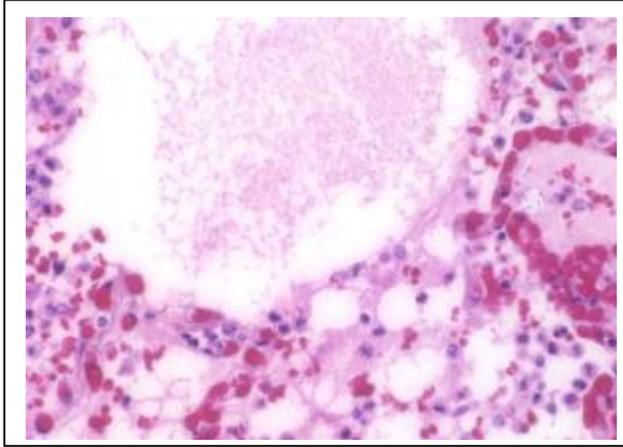


Microscopic sections

Section of brain tissues



Section of spinal cord tissues



Section of lung tissues

Questions:

1. What did every symptom and sign mean?
2. What was the main cause of the death of this patient?
3. What possible pathological findings could be seen during the disease?
4. What possible pathological findings could be seen in the autopsy?
5. How will you deal with this patient if you are the doctor?

FINAL PATHOLOGIC DIAGNOSES:

**SEVERE, ACUTE PNEUMOCOCCAL MENINGO-ENCEPHALO-RADICULITIS WITH ACUTE HYPOXIC ENCEPHALOPATHY, MODERATE BRAIN EDEMA AND EARLY THROMBOSIS OF THE SUPERIOR SAGITTAL SINUS.
FOCAL, ACUTE PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA OF THE LOWER LOBE OF THE LEFT LUNG.
PNEUMOCOCCAL BACTEREMIA AND POSSIBLE SEPTICEMIA.**

DISCUSSION:

Streptococcus pneumoniae is the major cause of otitis media, sinusitis, meningitis and community-acquired bacterial pneumonia, as well as an infrequent cause of peritonitis, pelvic infections in women, septic arthritis, osteomyelitis, soft tissue infections and purulent endo- and pericarditis. Particularly severe or unusual pneumococcal infections can be seen in HIV-positive patients. 1, 2

The major host protection mechanism against pneumococcal infections is opsonophagocytosis. One of the most important virulence factors of *S. pneumoniae* is the presence of a polysaccharide capsule, which allows it to escape phagocytosis. However, anti-capsular antibodies acquired by exposure to the organism, or by vaccination, are effective in conferring protection against pneumococcal infections. The currently available

pneumococcal vaccine incorporates 23 of the most pathogenic of the 80+ antigenically distinct capsular types that have been identified. 1, 2, 3

Other important pneumococcal virulence factors include: the teichoic acid and peptidoglycan constituents of the bacterial cell wall, surface proteins, pneumolysin (a cytoplasmic toxin released by autolysis of the cell) and, possibly, hyaluronidase (a glycosidase that degrades components of the extra-cellular matrix). 2, 3, 4

A number of conditions predispose to pneumococcal infections, including: defective antibody formation (congenital or secondary to conditions such as chronic lymphocytic leukemia, lymphoma or HIV infection); complement deficiency or dysfunction; neutropenia or neutrophilic dysfunction; splenectomy or splenic dysfunction; prior respiratory infections and inflammatory conditions such as cigarette smoking, asthma and COPD (chronic obstructive pulmonary disease). Multifactorial conditions, such as diabetes mellitus, renal insufficiency, liver cirrhosis, malnutrition, glucocorticosteroid therapy, alcoholism, cold exposure, stress, fatigue and excess likelihood of exposure to *S. pneumoniae* (such as occurs in daycare centers, college dormitories and military training camps), also contribute to host susceptibility to pneumococcal infection. 1, 2 Some factors that increase the risk of pneumococcal meningitis in particular are: chronic otitis media, head trauma with basilar skull fracture and cerebrospinal fluid (CSF) rhinorrhea. 5, 6

Bacterial meningitis is a severe, acute purulent infection of the leptomeninges and subarachnoid space. Extension of the inflammatory reaction into the brain parenchyma (meningoencephalitis) can result in increased intracranial pressure, seizures, stroke, coma and death. The mortality rate of bacterial meningitis can reach 25%, while adverse neurological outcomes are seen in upwards of 50% of survivors. 1, 4

Wide-spread use of the Haemophilus influenzae type b vaccine, and the emergence and increasing prevalence of penicillin and cephalosporin-resistant strains of *S. pneumoniae*, have led to changes in the epidemiologic profile of bacterial meningitis in the United States. *Streptococcus pneumoniae* is now the major cause of this disease, particularly in adults, accounting for around 15% of total meningitis cases in the United States, or approximately 1.1 cases per 100,000 population/year; it is also the leading cause of meningitis following head trauma, skull fractures and CSF leakage. 1, 2, 4, 5

The exact pathogenesis of pneumococcal meningitis remains unclear. The process begins by pneumococcal colonization of the nasopharynx, which can be followed by invasion into the perivascular space, bacteremia with subsequent seeding of the choroid plexus and breach of either the blood-brain barrier or the blood-CSF barrier by as yet unknown mechanisms. Direct extension of *Streptococcus pneumoniae* from the sinuses or middle ear into the subarachnoid space, particularly in trauma cases, represents an alternative route of CSF access. 2, 4, 5

Pneumococci can multiply rapidly in the CSF due to the absence of effective host defense mechanisms within it. 4, 5 However, it is not the pathogen itself that causes neurological complications, rather, it is the inflammatory reaction towards the invading pathogen that is responsible for the observed tissue damage and clinical manifestations of meningoencephalitis. 2, 3, 5

The polysaccharide capsule of *Streptococcus pneumoniae* lacks inflammatory potential and acts mainly as a protection against phagocytosis. The peptidoglycan and teichoic acid constituents of the pneumococcal cell wall are critical inducers of the inflammatory response. Lyses of bacteria and release of cell wall components in the subarachnoid space stimulates production of cytokines and chemokines by microglia, astrocytes, monocytes, microvascular endothelial cells and white blood cells (WBCs) in the CSF. The resulting inflammatory processes alter the permeability of the blood-brain barrier, leading to cerebral edema and leakage of serum proteins into the CSF, contributing to the formation of a purulent exudate in the subarachnoid space. The purulent exudate impedes the flow of CSF causing interstitial edema, obstructive and communicating hydrocephalus; it also engulfs the large arteries at the base of the brain causing vasculitis with narrowing of the arterial lumens, which, in turn, results in cerebral ischemia. The inflammatory process can involve the venous system leading to thrombosis of the major sinuses and thrombophlebitis of cerebral

cortical veins. Increased intracranial pressure, resulting from cerebral edema, alterations of CSF hemodynamics and loss of cerebrovascular autoregulation, is an important consequence of the inflammatory reaction, and one which leads to further cerebral ischemia. 2, 3, 5

Direct neurotoxicity is another important mechanism of brain damage in pneumococcal meningitis. Pneumolysin, cytokines and other bacterial components and inflammatory agents induce the production of excitatory amino acids (such as glutamate), reactive oxygen and nitrogen agents (free oxygen radicals, nitric oxide, peroxynitrite, etc.) and other mediators in the brain which bring about massive apoptosis of brain cells. 2, 3, 5

Bacterial meningitis classically presents with a triad of headache, fever and stiff neck. The stiff neck is a result of inflammation surrounding and involving spinal nerves and nerve roots; it is a pathognomonic sign of meningeal irritation that can occasionally be absent. Other signs and symptoms that can be seen in bacterial meningitis include: lethargy, altered mental status, focal neurologic deficits, seizure activity, coma, nausea, vomiting, and photophobia, in addition to findings related to increased intracranial pressure such as papilledema. The disease may progress rapidly, over a few hours, or it may become progressively worse over several days. 2, 5, 6, 7

Neuroimaging does not usually aid in the diagnoses of purulent meningitis, but can be useful in diagnosing complications such as abscesses, hydrocephalus or ischemia. 5, 7 The "gold standard" for diagnosis of bacterial meningitis is direct examination, chemical analysis, gram stain and culture of the CSF.

Cerebrospinal fluid abnormalities in bacterial meningitis include a markedly increased opening pressure (>180 mm H₂O), increased presence of white blood cells (normal: 0-5 lymphocytes/mm³, bacterial meningitis: 10 - 10,000 WBCs/mm³ with polymorphonuclear predominance), decreased glucose content (normal: 45-85, bacterial meningitis: < 40 mg/dL) and increased protein concentration (normal: 15-45, bacterial meningitis: >50 mg/dL). Red blood cells (RBCs) are usually absent from both normal and bacterial meningitis CSF; however, RBCs can be seen in both cases if the spinal tap was traumatic. Not all cases of bacterial meningitis have typical CSF findings, and some values, particularly glucose concentration, need to be interpreted within the clinical context. CSF glucose values are normally 50-70% of blood glucose values, therefore, use of a CSF/serum glucose ratio can correct for a decreased CSF glucose value masked by hyperglycemia. A CSF/serum glucose ratio of 0.31 or less is highly suggestive of bacterial meningitis. 5, 6 Gram stains of the CSF show gram-positive cocci in 70 to 90+ % of untreated pneumococcal meningitides; blood or CSF cultures are almost always positive in these cases as well. Tests to detect pneumococcal antigens in the CSF, such as latex agglutination (LA), are useful in the diagnosis of bacterial meningitis in patients who have already been started on antibiotic therapy, and in whom the gram stain and culture results are negative. However, a negative LA test does not rule out bacterial meningitis because the sensitivity of these tests may not always high enough. 2, 5, 6

The initial treatment of pneumococcal meningitis consists of supportive therapy and anti-microbials, including vancomycin (because of its certain anti-microbial efficacy) and a β -lactam (because it crosses the blood-brain barrier reliably and the organism may be susceptible to it). However, susceptibility testing of the cultured *Streptococcus pneumoniae* strain must be performed, and therapeutic agents modified accordingly, for definitive anti-microbial treatment. 2, 5, 6

REFERENCES:

Koneman EW; Allen SD; Janda WM; Schreckenberger PC; Winn Jr WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th edition: Lippincott Williams & Wilkins, 1997.

Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell, Bennett and Dolin, ed. Principles and Practice of Infectious Diseases. Vol. 2: Churchill Livingstone, 2000:2128-2147.

Gillespie SH, Balakrishnan I. Pathogenesis of pneumococcal infection. J Med Microbiol 2000; 49:1057-67.

Meli DN, Christen S, Leib SL, Tauber MG. Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15:253-7.

Roos KL. Acute bacterial meningitis. *Semin Neurol* 2000; 20:293-306.

Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA, ed. *Current Medical Diagnosis & Treatment 2002*: Appleton & Lange, 2002.

Gray F, Nordmann P. Bacterial infections. In: Graham DI, Lantos PL, ed. *Greenfield's Neuropathology*, 6th edition: Arnold, 1997.

I Case4 self-exam

1. Pneumocystis pneumonia is characterized by:
 - A. Granulomas
 - B. Atelectasis
 - C. Foamy intraalveolar exudate
 - D. Purulent exudate in the alveoli
 - E. Pleural empyema
2. All the following statements about lung cancer are true EXCEPT:
 - A. It is one of the most common tumors in the United States
 - B. Has a high mortality rate
 - C. Has recently become more common in females than males
 - D. It is related to smoking
 - E. It is to a large extent a preventable form of cancer
3. The following are important causes of the adult respiratory distress syndrome except:
 - A. Shock
 - B. Gram-negative septicemia
 - C. Cytotoxic agents
 - D. *Legionella pneumophila*
 - E. Oxygen
4. All of the following are true about chronic bronchitis except that it is:
 - A. Primarily related to cigarette smoking
 - B. Defined as chronic sputum production
 - C. Related to the hypersecretion of mucus in response to chronic injury
 - D. Characterized by hyperplasia and hypertrophy of mucus-secreting apparatus
 - E. Often caused by alpha-1-antitrypsin deficiency
5. A 60-year old man with a 30 year history of smoking presents with fever, cough and mucopurulent sputum. On the x-ray a left hilar mass measuring 6 cm in diameter was seen. Left lower lobe appeared consolidated by the xray. There was fluid in the left hemithorax. The bronchial biopsy revealed small atypical cells with hyperchromatic nuclei and scant cytoplasm. The cells were arranged into solid sheets and showed no evidence of keratinization or glandular differentiation. This tumor most likely :
 - A. Originated from the trachea
 - B. Originated from the main bronchus
 - C. Originated from the alveoli and spread to the hilus
 - D. Is a metastasis from the pleura

E. Is a metastasis from some other extrathoracic site

6. A 60-year old man with a 30 year history of smoking presents with fever, cough and mucopurulent sputum. On the x-ray a left hilar mass measuring 6 cm in diameter was seen. Left lower lobe appeared consolidated by the x-ray. There was fluid in the left hemithorax. The bronchial biopsy revealed small atypical cells with hyperchromatic nuclei and scant cytoplasm. The cells were arranged into solid sheets and showed no evidence of keratinization or glandular differentiation. What is the most likely diagnosis deduced from the histologic findings described above?

- A. Squamous cell carcinoma
- B. Adenocarcinoma
- C. Oat cell carcinoma
- D. Bronchiolo-alveolar carcinoma
- E. Mesothelioma

7. Pulmonary hypertension is a consequence of all of the following EXCEPT:

- A. Idiopathic hypoventilation
- B. Recurrent pulmonary emboli
- C. Congenital left-to-right shunts
- D. Lobar pneumonia
- E. Left ventricular failure

8. Which of the following best characterizes the pathology of extrinsic allergic alveolitis:

- A. Lymphocytic interstitial pneumonitis
- B. Honeycomb lung
- C. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia
- D. Granulomatous interstitial pneumonitis
- E. Acute bronchopneumonia

9. Fat emboli are especially likely to occur in which group of patients?

- A. cancer patients
- B pregnant women at vaginal delivery
- C person undergoing leg surgery
- D person sustaining severe fractures
- E person with varicose veins

10. Which factors are especially important in development of phlebothrombosis ?

A abnormally thick glycocalyx coat and DIC(disseminated intravascular coagulation)

- B ingrowth of granulation tissue
- C endothelial injury and stasis
- D activation of plasminogen
- E paradoxical inhibition of blood coagulation factors X and XIII

病理检验技术

江汉大学医学与生命科学学院

病理学与病理生理学教研室

2004年4月

内 容 提 要

本书介绍组织病理学常用的多种技术。包括常见的技术，即福尔马林固定、石蜡包埋、HE染色技术，同时也介绍了常用的特殊染色技术，免疫组织化学技术，并简明地介绍了分子生物学技术的基本理论以及在组织病理学中的应用。

全书理论与实践并重，经典与改良结合，内容丰富，通俗易懂，实用性强，为实验室工作的必备参考书。适合从事病理学、组织学、生物学、法医学等的科研教学和临床工作的技术人员、教师、医师和研究生使用。同时也适合临床医学检验专业中专、专科生使用以及临床医学专业专升本学生和临床医学专业本科生选用。

第一篇 石蜡切片技术

第一章 组织标本的处理

第一节 取材	5
第二节 组织的固定	6
第三节 大体标本的处理和固定	14
第四节 陈列标本的固定	15
第五节 脱钙	16

第六节 组织的冲洗	18
第二章 石蜡包埋技术	
第一节 脱水	19
第二节 透明	21
第三节 浸蜡	22
第四节 包埋	22
第三章 切片技术	
第一节 切片刀	25
第二节 切片机	27
第三节 石蜡切片的制作	27
第四节 特殊组织石蜡切片的制作	29
第五节 石蜡切片的异常及处理	29
第四章 染色与染色剂	
第一节 染色的基本原理	31
第二节 染色剂染色的化学基础	33
第三节 染色剂的分类	34
第四节 常用染色剂及配制	35
第五节 苏木素—伊红染色法	39
第六节 封固剂	41
第五章 特殊染色技术	
第一节 结缔组织染色法	43
第二节 脂类染色法	47
第三节 糖原及粘液染色法	48
第四节 色素染色法	50
第五节 神经组织染色法	52
第六节 核酸及核蛋白染色法	52
第七节 肌肉组织染色法	53
第八节 病原微生物染色法	54
第九节 特殊染色技术的应用	57
第二篇 免疫组织化学和亲和免疫组织化学技术	
第一章 免疫组织化学技术	
第一节 基本原理	62
第二节 染色步骤	67
第三节 常用试剂的配制	72
第二章 亲和免疫组织化学技术	
第一节 基本原理	77
第二节 染色步骤	80
第三篇 分子生物学技术	
第一章 核酸原位杂交技术	
第一节 核酸原位杂交的基本原理	83
第二节 核酸原位杂交的主要过程	84
第三节 核酸原位杂交的基本操作步骤	86
第四节 常用试剂的配制	87
第五节 核酸原位杂交的应用	89
第二章 原位 PCR 技术	
第一节 基本原理	91

第二节 基本类型 91
 第三节 基本步骤 92
 第四节 原位 PCR 技术的应用 93

第一篇 石蜡切片技术

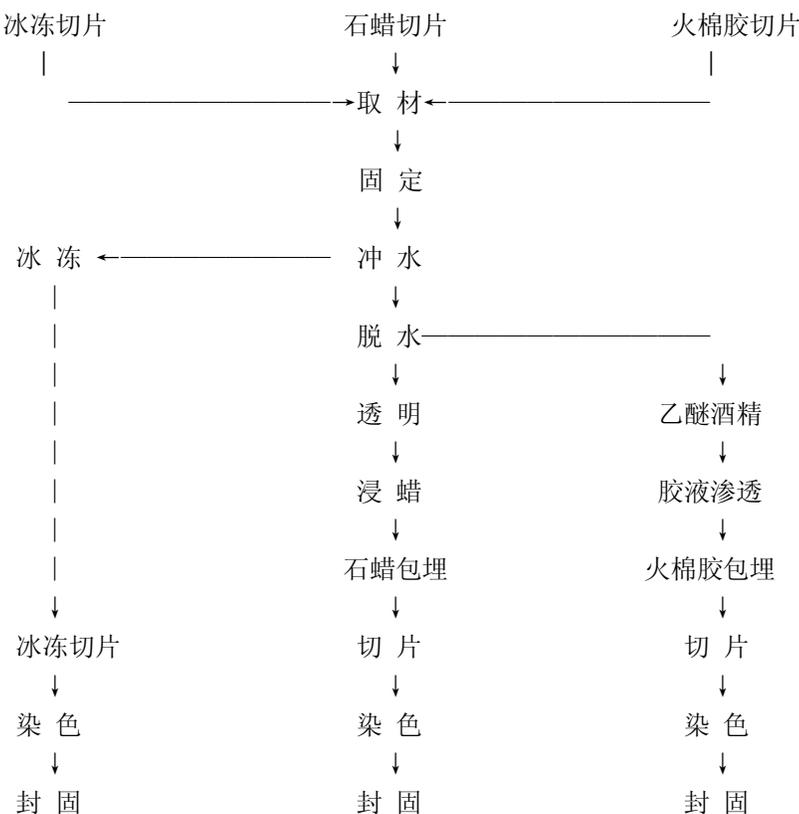
切片技术的应用到现在已有一百年多的历史了。

最早应用的只是冰冻切片，随着冰冻切片的应用和实践又进一步利用石蜡的硬度，将要检查的组织块浸渍并包埋于这种坚实的介质之中，制成了石蜡切片。后来又利用明胶，火棉胶等物质的韧性来包埋组织，制成了明胶切片和火棉胶切片。

切片技术随着生物学和医学的发展，经过不断地改进而逐渐的完善起来，随着光学仪器和切片机器的日益的精密和不断向前发展。现代切片技术已成为生物形态学微观结构研究的一个重要方面，更是病理检验技术中不可缺少的一个组成部分。

将各种组织制成非薄的切片标本，需要经过一系列比较繁杂的过程，每一步都要求病理技术工作者要认真，耐心，细致地使整个过程一环扣住一环，才能获得优良结果。

制作切片的主要过程有：(1)取材，(2)固定，(3)脱水，(4)包埋，(5)切片，(6)染色，(7)封固。在这七个主要过程中，又包括着若干步骤，(详见切片制作程序表)。



凡欲制作切片的组织，首先必须固定，以防止组织自溶而产生死后变化。组织经过固定之后，再以流水冲洗。如为冰冻切片，即可直接将组织冰冻进行切片。如欲制石蜡切片或火棉胶切片，为了使石蜡或火棉胶渗透到组织中去，以能包埋组织，在固定水洗之后，还须经过脱水，媒剂（透明），石蜡火棉胶的渗透，才能包埋切片。在切片以后，为了便于观察，还要对其进行不同的染色，最后将切片封固，制成长久保存的组织切片标本。

第一章 组织标本的处理

第一节 取材

取材是制作切片程序中的首要步骤，取材不当，将直接影响病理诊断和科研工作的效果。组织标本的选用非常重要，不能随意的切取组织来制作组织切片，否则病理检验的结果是不会令人满意的。

一、取材工具：取材刀具必须锋利。切取标本不应该挤压和揉擦，不应使用有钩镊子或血管钳等手术器械镊取标本，以免损害组织造成人为组织变化，给诊断带来困难或导致错诊，漏诊。

二、标本的选取：应选择病变或可疑病变的组织。必要时选取病变与正常组织交界处。切取标本的原则是求准而不是求量多，所以切取组织宜小不宜大，以不超过 $24 \times 24 \text{mm}^2$ 为佳，厚度以 3—5mm 为度，过大过厚会影响对标本的固定，另一方面也影响切片的制作。特殊目的者应属例外。

- 1、为了使组织切片的结构清楚，取材要及时，组织块必须争取时间及时固定。组织的固定以愈新鲜愈好。
- 2、取材时对大体标本（肉眼标本）绘制图象，进行仔细描述。包括形状、大小，硬度，颜色，病灶（或可疑病变）部位等。对所取的组织应定位编号。
- 3、切取各组织块时，切勿挤压损伤，对典型或具有教学和科研价值的肉眼标本，不能因取材而对标本造成人为的“病变”。肠粘膜组织上沾有少量粪便，也不应以手拭去或以水洗去。
- 4、下的组织块应尽量防止其弯曲扭转，如胃肠等组织，应先平展于草纸上粘着以后，慢慢地放入固定液中（故应在动手剖验之前做好准备）。固定液的量要充足，应为固定组织的 10 倍。
- 5、组织采取应在正常与病灶交界之处。组织形状最好为方形或长方形，这样有利于制片。切不可以形状定位，组织厚薄要均匀。因为组织块的厚度决定固定的速度，要充分满足它在一定时间内全部达到适宜的固定。如组织厚薄不均，在脱水时将会引起标本变形或曲，而影响制片。在典型病变部位不妨多切数块，以备日后添制教学切片或研究的需要。
- 6、微量标本和易碎标本，为避免破损或丢失应以纱布包裹，但包裹前纱布必须浸湿，以免标本粘附纱布上。
- 7、各组织块应包括各脏器的重要结构，如肾脏组织包括皮质部分和髓质部分。在有浆膜的脏器（如胃等）组织块中，要至少有一块带有浆膜。
- 8、组织内的钙化病灶或骨质，应在充分固定之后进行脱钙，组织内的非病理性异物应予剔除。
- 9、标本上（组织块）附着的软组织如脂肪等，如属非病变成分，则应在不影响病理诊断的原则下，尽量剥去或切除，以利制片。
- 10、组织块的固定时间不宜过长或过短，不同的固定液，固定时间有所不同，固定后的组织需要用流水冲洗，再进行脱水制片。
- 11、切取镜检组织块后，可将剩余的组织放入 70%酒精中保存，这样有利于日后再取材切片时的细胞染色。

第二节 组织的固定

一、固定的意义

固定是指将各种组织浸入防腐剂内，使细胞内的物质为不溶性。固定的作用即是用一种方法将组织尽可能保持在它原来的形态，且能适于某些研究程序。

凡是需要制作病理检验标本的各种组织，无论是制作切片标本，还是制作大体标本，首先必须固定。在制作切片过程中，固定最为重要的步骤，一张优秀的组织学切片是建立在适当而完全的固定基础之上的。固定不良在以后制片的任何阶段皆不能补救。因此制片的优劣首先取决于最初固定适当与否。

重要的是，被固定组织在动物死后或从活体切取后要尽可能立即固定。及时的取材给迅速固定提供了先决条件。如果不迅速固定，造成固定不良，将导致染色不良后果。组织的良好固定，应该是一次性的；某些

固定剂还具有助染的作用，可使细胞各部易于着色。固定不良的组织，即使进行补充固定也起不到改善染色的效果。

二、固定的目的和效果

固定组织的目的是设法得到接近正常生命状态的细胞结构，有人说“形态学的美是良好固定产物”，这说明固定的特殊重要作用。

1、抑制自溶和腐败：

组织的固定能保持细胞与生活时的形态相似。因为当机体生命活动停止、或局部器官、组织割离机体之后，组织细胞的代谢功能即行丧失，新鲜组织如果不经固定，任意放置，由于细胞内酶对蛋白质的分解，以及细胞的孳生等各种因素的作用，则易因细胞繁殖而致组织腐烂。细胞内的蛋白质分解酶将蛋白质分解为氨基酸后脱离细胞而引起组织的自溶。

2、保存：

细胞经过固定，不但可以防止自溶和细菌性腐败，而且能沉淀或凝固组织内的各种成份和病理代谢产物，如蛋白质，脂及脂蛋白、脂肪、糖类、色素，其它碳水化合物，无机成份，微生物等都可以经过固定而保存下来，并在制片过程中不为其他试剂溶解破坏。

3、硬化：

固定剂的硬化作用能使柔软组织（如脑）的质地变硬而易于操作。

4、胶质物体的固化：

固定能使细胞正常的半液体状（溶胶）变为不能逆转的固体状（凝胶）粘度。

5、肉眼鉴别：

固定可将各种细胞和组织成分的析光率作不同程度的改变，增强组织的析光指数，这样能使各种染色成份较之未固定时更容易辨认。

6、对染色的影响：

某些固定剂尚具有一定的媒染作用而增进染色（如苦味酸对于染色的媒染作用）可使细胞各种部位易于着色，所以组织固定后有利于制片染色和在显微镜下的观察。此外，固定剂有时也会影响染色效果，导致着色效果不理想（如福尔马林对水溶猩红 S 染色的影响）。

7、渗透和固定：

固定还可以使组织和细胞的各种渗透压不再发生改变，在制片时就能在最大范围内保持组织和细胞的原来形态。

三、固定的方法及注意事项：

为使组织固定充分，应做到固定容器要合适、固定时间要充足，固定液量要足够。

固定组织时，应选择合适的容器、一般容器的容积是组织的 10~15 倍以上。标本瓶应选择瓶口较大的为宜，这样便于固定后的标本经小口瓶硬塞进去，这样不仅不利于标本易于取出，还可能造成人为挤压组织而致形态变化，对大件的标本应按巨检常规切片后放于容器固定。

组织固定的时间要足够，根据标本体积大小不同，固定时间应有所不同，组织越大越厚，固定时间应越长，反之。一般 4—12 小时或更长。在温箱内将固定液稍加温，可使固定作用加快而缩短固定时间。

固定组织时，应该使用足量的固定液，多比少好，一般应为组织体积的 5—10 倍，最少也不应于五倍。标本最好悬浮于固定液之中，漂浮于固定液之上或沉于固定用器之底部，都不利于固定液对标本的渗入。如标本块多时，固定时不应重叠。不要先将标本块放入容器后再注入固定液，以免标本贴付于器皿，形成固定不均匀之弊。新鲜标本应及时固定，否则或因组织陈旧，或因固定不当，而使组织原有结构消失而影响观察。

标本经固定后，应及时制作切片，如不能及时制片，而该固定液又不能作为保存液时，应改换适当的保存液。

在配制混合液时，应了解每种固定剂的理化性质，氧化剂不能与还原剂混合，以免引起化学反应，失去固定作用。

对于某些需要制作神经染色和酶反应等组织的固定，要求较一般严格，组织的大小，固定的时间，温度

的适当都应慎重考虑，尤其是对于酶反应的固定液，一般都要置于冰箱，在低温的条件下进行固定。固定不好，是得不到满意的切片和合乎标准的反应效果的。

任何固定液对人体都有损害作用，因此固定液的容器必须密闭，以防挥发损伤器官和眼睛，忌用手与固定剂直接接触，以免损伤皮肤。

四、固定剂的选择

理想的固定剂应该具备下列几种性能：

1、渗透性强：固定剂必须能迅速渗入组织，这样组织内各种成分才能尽快地被固定在原位置，而不致弥散。

2、组织在固定液的作用下，不应发生显著的收缩和膨胀现象。实际上经过固定后的组织，由于蛋白质发生凝固或沉淀，必然导致组织出现不同程度的收缩或膨胀。因此，良好的固定剂应尽量减少组织发生这类变化。

3、固定剂应该有利组织切片和染色，这其中含有两种意义：

(1) 固定剂对固定后的组织应有利于染色剂的染色。例如：重铬酸钾对于类脂质具有一定媒染作用；中性福尔马林比一般福尔马林所固定组织更优于核的染色。

(2) 固定剂能将组织或细胞中某些必须观察的成分予充分固定而保存下来，以便染色。例如：酸可以渗入脂类物质使其固定下来而不至在制片过程中为酒精和二甲苯溶解或较少地溶解，并可用石蜡包埋进行切片。糖原的证明，则宜使用非水溶性固定剂如无水酒精、Camoy 氏固定液等。

4、固定液应该同时也是一种较好的保存液。

实际上，没有哪一种固定液，无任是单一固定液或混合固定液都能够完全达到上述要求。各种固定剂性能和作用都不尽相同，因此，对标本的固定应根据组织的制片目的和要求去选择适当的固定剂。

五、固定剂的种类

组织制片技术上所使用的固定剂种类繁多，性能各有不同，有的为氧化剂，有的为还原剂；有的呈酸性，有的呈碱性；有的渗透力强，有的渗透力弱；有些易使组织收缩，有些则使组织发生轻微膨胀现象。一般地说，单一固定剂要想使组织固定后达到某种特殊染色要求是比较困难的。因此，在标本固定中常使用两种以上成分（固定剂）的混合固定液。

六、用做固定剂的试剂

1、单一固定剂：

仅由一种化学物质加水溶解后用以固定标本的固定液叫单一固定液。常用单一固定试剂有甲醛，酒精，冰醋酸，苦味酸，重铬酸钾，饿酸，氧化汞，丙酮等。除福尔马林，酒精和丙酮常用作单一固定剂外，其它多作混合液中的一种成分。

甲醛 formaldehyde (H · CHO)

甲醛是一种气体，约有 40% 重量溶于水。这是一种还原剂，颇易挥发，这种饱和溶液称为甲醛溶液；其商品名叫福尔马林。

10% 福尔马林的组成系：

甲醛溶液（福尔马林）	10ml
水	90 ml

甲醛是一种使用广泛、简便的固定剂，同时又是一种良好别的标本保存液。经它固定的标本，可适应一些特殊染色。它的渗透性较强，固定均匀，能增加组织的韧性，组织 缩轻微，硬性大于酒精。

福尔马林主要是由甲醛的聚合形式构成，然而聚合形式的固定效果低于单体形式构成的 10% 福尔马林，为阻止在放置一定时间的重聚作用，一般将溶液的 PH 值调节至中性或偏碱性。

甲醛与蛋白质是在分子间的交联上起反应，最终产生一种不溶性产物。它经过络合交联，使蛋白质固定，能较好地保存脂类；对肝糖也有固定作用，但必须及时固定及时处理，以免产生水解。

甲醛当长期贮存，特别于寒冷气候下，自行分解，可变混浊，有白色沉淀物，这种沉淀即三聚甲醛，是甲醛的一种聚合形式（加热可重新分解成甲醛）。商品福尔马林用甲醇阻止聚合作用。有时由于溶液不纯或甲醛氧化产生的甲酸成分使溶液呈酸性，酸性的甲醛溶液使标本嗜染酸性、严重时可导致细胞核的嗜酸性染色。因此，在备用的甲醛中宜放入小量的碳酸镁或碳酸钠作为中和剂。如果每 100 毫升的福尔马林固定液中加入 5ml 的吡啶，则可调整 PH 为 7。不过，这些方法不能永久保持其 PH 值；欲望使其长期保持中性，则需以磷酸缓冲液作溶剂进行配制。其配制方法如下：

10% 福尔马林 1000ml
磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4) 4g
磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 6.5g

固定小的组织块数小时即可达到固定要求。如需要快速固定时，可加温到 70~80℃，经过 10 分钟即可达到固定要求。在甲醛溶液中短时固定的标本，冲洗时间在 10 分钟至 2 小时即可，但固定时间较长的标本需要较长时间的流水冲洗。一般要冲洗 24 小时，甚至延长 48 小时，否则，由于甲酸的沉淀将会影响染色的结果。

甲醛能保存脂肪和类脂体，对染色体，线粒体，高尔基体，具有良好的固定作用。

经甲醛固定的陈旧组织，尤以多血的肝脾组织内常可出现棕黑色的福尔马林色素颗粒，这种色素不溶于水，酒精及丙酮等，如欲与含铁血黄素加以区别，可用普鲁士兰反应进行鉴别。福尔马林色素不含有铁，因此，福尔马林色素呈阴性反应，用中性或微碱性福尔马林固定的效果能显著增加对铁离子的检出速度且可完全避免福尔马林色素的形成。此外也可以使用其他试剂以浸洗方法除去福尔马林色素的沉淀，如：

(1) 苦味酸饱和酒精 (90%) 溶液浸洗 30 分钟后经 70% 酒精再水洗后进行染色。

(2) 什端氏 (Schriade) 法：

70% 酒精 200ml
28% 氨水 1ml

将石蜡切片在脱蜡以后放于上述液体中 30 分钟，再用流水冲洗，而后染色。若甲醛产生的色素沉淀仍未被其洗去，则可在 Schriade 氏液中延长时间。此法并不损害组织。

(3) 费罗氏 (Verocay) 法：

80% 酒精 100ml
1% KOH 1ml

将切片在脱蜡至 80% 酒精后，浸入上液 10 分钟，再流水冲洗 5 分钟，入 80% 酒精之后水洗染色。

福尔马林固定的标本，经酒精脱水收缩较大，是其缺点。

酒精 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

可单独用作固定液；亦可作混合固定液，因为酒精（乙醇）是一种还原剂，所以不可与铬酸，重铬酸钾或钼酸等氧化剂相混合使用。在氧量不足时酒精易氧化成乙醛；氧量充足则能生成醋酸，所以在正常情况下，酒精是偏酸性试剂。

酒精为常用的有机溶剂，能溶解多种有机物，高浓度酒精能凝固白蛋白，球蛋白和核蛋白，对肝糖有固定作用，核蛋白和肝糖经酒精固定成水溶性状态，因此，经酒精固定的标本如果固定后用水洗涤，则核着色欠佳，肝糖也将被水解。作为一种脂溶剂，浓度在 50% 以上的酒精可溶解脂肪和类脂体，因此，对脂类的证明，高尔基氏体，线粒体等染色不宜使用酒精作固定剂。

酒精还可溶解血红蛋白和损害多数其他色素，因此，如果证明组织蛋白的色素时也不宜以酒精作为固定剂。

浓酒精有较大的收缩力，被它固定的组织收缩显著，表面发硬，因而酒精较难渗入到组织中去，组织必须用酒精固定时宜先用 80% 的酒精固定数小时，然后再换 95% 酒精，这样可以避免组织过度收缩，因此它的穿透力缓慢且与组织长期接触能使之硬化，如需要证明尿酸结晶和保存糖类，则须用 100% 酒精固定。

酒精既有固定作用，又有脱水作用，经酒精固定的标本不需洗涤，可用较高浓度酒精直接进行脱水，也可暂存于 70% 酒精中。

醋酸 (CH_3COOH)

纯醋酸为无色，具有强烈刺激性的酸性液体，温度低于 17°C 时呈固体状，形成冰样结晶体。所以，一般称为冰醋酸。

醋酸因使胶原纤维肿胀，故不能单独使用；但在混合固定液中有抗其它试剂使细胞皱缩的作用。因此，醋酸常同酒精配制成为混合固定液来抵消经过固定所引起组织的高度收缩和硬化的作用。

醋酸可与水，酒精等溶剂相混合。一般使用浓度为 $0.3\sim 5\%$ ，以 5% 为备用液。用醋酸固定后的组织不必水洗，即可直接投入 50% 或 70% 酒精之中。醋酸的渗透性很强，一般较小的组织块只须 1 小时即可。

醋酸可使核蛋白沉淀，因此染色质固定很快，是染色质良好的固定液。对蛋白质具有保存作用，对脂类、糖不产生影响，高浓度醋酸则可溶解脂肪及类脂，并使线粒体和高尔基体被破坏或变形。所以，一般配制含醋酸的混合液时，其浓度都不超过 5% 。

苦味酸 ($\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3\text{OH}$)

苦味酸是一种具毒性的黄色结晶体，味苦，在空气中干燥时有爆炸性，故需保湿保存，最好是储存在一层水下。一般情况下，制片室将苦味酸制成饱和溶液作为常备用液，通常固定的浓度是饱和液，其饱和度为 $0.9\% \sim 1.2\%$ 。苦味酸溶于酒精，二甲苯，固定后的组织经酒精脱水即可。苦味酸也是一种良好的组织染色剂，经苦味酸固定剂固定的组织作三色染色可使颜色对比鲜艳。

苦味酸能沉淀一切蛋白质，并与其结合形成苦味酸盐，遇水时，其中有的部分可溶与水，因此在一般情况下，组织经苦味酸或含有苦味酸的固定剂固定后，这种水溶性苦味酸盐在与水接触前需先经酒精处理使其呈不溶性，可以 70% 酒精浸洗，在酒精内加上少量碳酸锂或氨水即可被洗去。或者是不经水洗，直接投入 70% 酒精脱水。在脱水过程中，苦味酸可被各级酒精溶解洗去。即使不能全部洗去，亦不妨碍染色，脱水酒精虽被染黄，但亦不失其脱水效果。

通常苦味酸沉淀红细胞，可移走铁离子，特别是仅少量存在时可使 RNA 抵抗核糖核酸酶的消化。

重铬酸钾 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

重铬酸钾为一种橘红色有毒性的块状结晶体，溶于水，不溶于酒精，为一种强氧化剂。所以其水溶液不应与酒精，福尔马林等还原剂相混合使用。在某些情况下，同福尔马林混合固定标本时，只能在使用前相混合，过久即失去固定作用。经重铬酸钾固定后的组织应及时进行水洗脱水，否则标本变硬脆化，不易制成切片。如不能当即制作切片，可将标本保存于福尔马林液内。

重铬酸钾对蛋白质的结合作用像福尔马林一样，固定胞浆不易引起沉淀作用。但在溶液中加入醋酸，PH 为 3.75 时，会使染色质和细胞浆硬化，使之产生铬酸，才能使蛋白质呈网状沉淀。重铬酸钾对细胞质，染色质固定良好，但染色质则被溶解。未酸化的重铬酸钾虽不能沉淀蛋白质，但可使蛋白质变为不溶性，还可以保护磷脂类，亦能固定类脂物，使其不溶解于脂溶剂。因此，可以固定高尔基氏体和线粒体。

重铬酸钾不是糖的固定液，用重铬酸钾（或铬酸）固定的组织几乎完全不会发生收缩，但经酒精脱水时，则收缩明显。所以在脱水之前，组织需用流水冲洗 $16\sim 12$ 小时。如把含铬组织直接转移到酒精内，会形成一种非溶性低氧化物而不易除去。

重铬酸钾有溶解染色质的缺点，一般备用液为 5% 水溶液，固定液使用浓度为 $1\% \sim 3\%$ 水溶液。

铬酸 (CrO_3)

为暗红色或带暗紫色的块状结晶，具有强酸性及腐蚀性，剧毒，易潮解，为强氧化剂，应置于暗处。它是 Orth 氏液或 ZenRer 氏液等复合固定剂中的一种成分，不应同酒精、福尔马林等还原剂混合使用。铬酸与乙醇，乙醚少许接触即可引起爆炸。

铬酸可沉淀所有的蛋白质，使不溶于水，并可保存糖类。铬酸水解 DNA 系将其戊糖转变为一种醛；亦可将糖类转变为醛。因此 DNA 和糖类不需经过常规 PAS 或 Feulgen 反应的预先处理即与 Schiff 试剂呈阳性染色。

铬酸的渗透力较低，对标本收缩轻微，经铬酸固定剂固定的组织像用重铬酸钾固定一样需彻底水洗，将组织中铬酸全部洗去，否则在脱水过程中，铬酸与酒精作用生成氧化铬的沉淀，使组织脆化，且不易于组织

的着色。铬酸适合固定的浓度为0.5%~1%。

四氧化锇 (OsO₄)

为微黄色结晶，通常密装于安瓿内出售，为强氧化剂，一般认为它使未饱和键氧化。对饱和脂肪不起反应，未饱和脂类可还原OsO₄，易氧化为黑色氢氧化物，溶液呈中性，挥发性强，在操作四氧化锇时应小心，因其气体有刺激性，会引起结膜炎。遇热和光时易还原，故应贮于冷暗处。平时溶液密闭有色瓶中，并置于冰箱内。

四氧化锇是脂肪和类脂质的固定液，用以显示脂类（例如髓脂类）。能使单个细胞或小组组织的微细构造得以极好地保存，因此几乎是用于电子显微术最佳固定剂。组织经固定后，脂肪，类脂呈黑色，微溶于二甲苯及酒精，脱水后最好以苯作透明剂。

四氧化锇的渗透力弱。组织块如过2—3厘米厚度则穿透不良和不均。所有含四氧化锇固定剂的固定作用皆很不均匀；固定不良的组织切片表现周围有一圈过度固定的暗色区带；中心为固定不足致使细胞微细结构不清的区域。有些成分变暗是由于无色的OsO₄转变为黑色水合物OsO₄·5H₂O形式。

四氧化锇常与铬酸，醋酸，重铬酸钾等混合使用，固定后的组织需经流水冲洗，否则在脱水酒精中易被还原产生沉淀，不利于核着色，在每10毫升溶液中加入1滴饱和氯化汞水溶液有助于制止还原作用。

氯化汞（又名升汞或二氯化汞HgCl₂）

氯化汞为白色粉末或针状结晶，后者为化学纯品，易升华，能溶于水和酒精。一般固定用其饱和溶液。

氯化汞是一种能迅速透入并使组织硬化的蛋白沉淀剂。通常像别的金属离子那样，它与蛋白质的酸基以及核蛋白的磷酸基相结合，亦特异地与氢硫基起反应。因而经Hg固定后的蛋白质不溶于水，大多数蛋白反应可被利用。可惜，它的透入速度于最初几毫米后就急骤降低，因此组织块厚度如超过5毫米常使外围过度固定致坚硬而中心固定不足仍柔软，只宜固定薄片组织。由于此缺点加之使组织收缩剧烈，很少单独使用；当与拮抗此缺点的试剂如醋酸，福尔马林，重铬酸钾等结合使用时，氯化汞仍是很多优良常规固定剂的一种成分。用氯化汞固定的组织使染色特别对胞浆着色比较鲜丽。

凡用含氯化汞的固定剂固定的组织如超过规定时间会使组织过度硬化，而难切薄片。组织内常存有汞盐，切片时能损伤切片刀，所以在脱水前应予以洗去。常用方法是用70%酒精加入少量碘（0.5%）浸洗，再进行充分的冲洗或以70%酒精洗后进行脱水。也可在切片染色前用含碘的70%酒精漂洗数分钟，再以5%硫代硫酸钠漂洗，水洗后进行染色。

氯化汞常备溶液为饱和（约7%）水溶液，固定用浓度常为5%水溶液。用升汞饱和液固定组织时，临时须加5%冰醋酸。固定2—3mm厚的组织块须经6—18小时，然后用水洗24小时，再保存于80%酒精中。

氯化汞腐蚀金属，混有此试剂的固定液不能使用金属容器盛装或用金属镊子夹持。氯化汞有剧毒，应妥善保管。

固定剂的选择取决于研究工作当时和下一步的需要，在选择混合固定剂时，应注意各种试剂的平衡，如使组织收缩的试剂可配以使组织膨胀的试剂，渗透力弱的可与渗透力强的混合使用。但是，氧化剂原则上不与还原剂混用，如需要时，只能在使用前临时混合。一种混合固定剂内不宜有两种以上的盐类，以免产生复盐影响对组织的固定，如氧化钠和氯化钠同时应用时，常将氯化钠改用硫酸钠。技术工作者和病理工作者都应了解各种固定剂的性能。固定液的选择恰当，才能获得满意的制片结果。

混合固定液的种类很多，本章内所述的固定剂皆是较常用的，特殊染色所需的固定剂皆列在相应的标题下。

Miiller氏液

配方：重铬酸钾	2.5g
硫酸钠	1.0g
蒸馏水加至	100ml

此液固定作用缓慢，但颇均匀，收缩亦小。多用于媒染和硬化神经组织，在这种固定溶液中，重铬酸钾未经酸化，所以对染色质无固定作用。不适用于一般细胞学染色。除用于骨骼标本外，此液是一种不常用的固定剂。固定时间数天至数周，在固定过程中，需要每日更换新液并置暗处，固定后的组织用流水冲洗，再

放入酒精中脱水。

Orth氏液（Mullr氏液+福尔马林）

配方：重铬酸钾 2.5g
硫酸钠 1.0g
福尔马林 10ml
蒸馏水 加至 100ml

一般以Mullr氏液为备用液，用前以9份Mullr氏液加1份福尔马林混合而成，因为重铬酸钾是氧化剂，福尔马林为还原剂，混合后久放即失去固定作用。

固定0.5厘米的标本块约需3—4日，每日需更换新液，标本固定后要充分水洗，然后进行脱水包埋。如固定过久，标本变脆，颜色由棕黄转变为黑色，则不能制作切片，标本经固定后如不能及时制片时，应将标本保存于福尔马林内或70%酒精中。

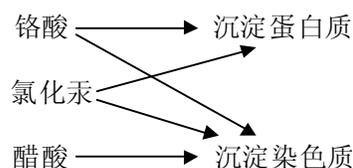
Orth氏液对染色质，线粒体有较好的固定效果。硫酸钠在固定液中有助于渗透作用，在一般情况下，可省去不用。

Zenker氏液（以Muller液为基液加入氯化汞在临用前再加醋酸混合而成）

配方：重铬酸钾 2.5g
硫酸钠 1.0g
氯化汞 5.0g
蒸馏水 加至 100ml
冰醋酸（临用时加入） 5ml

Muller液加入醋酸后则不能贮存，未加醋酸的溶液（Zenker氏原液）可保存较久。此液加入冰醋酸后，与重铬酸钾作用生成铬酸，是蛋白质的良好固定剂，其穿透力迅速而均匀硬化组织能力强，经它固定后的标本利于盐基性染色剂着色，胞核和胞浆染色颇为清晰，是一种优良的常规固定剂。

Zenker氏固定液中含有两种蛋白质和三种染色质的固定剂：



所以Zenker氏液在组织学和病理学方面均较广泛使用，固定作用通常于12小时内完成。固定薄组织块2—4毫米时，固定12—14小时，然后用流水冲洗过夜（以除去多余的铬化物，汞色素须用碘来脱除）后进行脱水，或保存于80%酒精中。

Heely氏液

Heely氏液将Zenker氏液中的醋酸以福尔马林替代，并名之为Helly氏液。液中重铬酸钾未经酸化，对细胞质固定较好，对造血系统（骨、髓、脾、肝）等为良好固定液。用于结缔组织染色效果也好。

配方：重铬酸钾 2.5g
硫酸钠 1.0g
氯化汞 5.8g
蒸馏水 加至 100ml
临用前加福尔马林 5ml

此液配好后24小时内有效，组织固定12—24小时后，流水冲洗，脱水。

Bouin氏固定液

配方：苦味酸饱和水溶液 75ml

福尔马林（40%甲醛液） 25ml
冰醋酸 5ml

此固定液保存性良好，渗透速度快，穿透力迅速而均匀，且很少引起收缩，不使组织变硬和变脆，固定后的组织用三色染色法着色鲜艳绚丽，过量苦味酸使组织呈黄色，但并不妨碍染色，毋须洗净除去。

此液也是皮肤组织较好的固定液，它可以软化表皮不使其变硬变脆。利于切片，对蛋白质核酸有较好的固定作用，一般固定时间为数小时至一日。

Carnoy氏固定液

配方：无水酒精 60ml
氯仿 30ml
冰醋酸 10ml

此液穿透力非常快、固定力强，对核固定良好，并可保存糖原也用于糖类的固定。于脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA）的固定。一般组织固定2—3小时后即可直接投入95%酒精和纯酒精中进行脱水，因此也可作快速固定的固定剂，厚度2—9毫米的小块组织仅需15分钟即可，外检胸腹水经过离心沉淀后，将沉淀物用Carnoy氏液固定可制作石蜡切片。

醋酸—酒精—福尔马林混合固定液

配方：福尔马林 10ml
冰醋酸 5ml
70%酒精 85ml

这种混合固定液通常简称“AAF”固定液。使用较广泛，配制时一般可以酒精作为溶剂，然后加入福尔马林，醋酸。酒精可因组织种类不同而采用不同的浓度，在常规切片中，我们常采用浓度为95%酒精。

此液对糖原的固定佳良，就是说在蛋白质成分完全固定之前可以防止糖类溶解，加入醋酸以保证蛋白质的固定，由于酒精和福尔马林二者皆为迅速穿透的试剂，这是一种相当好的快速固定剂，对临床外检工作特别有利，福尔马林对组织染色效果较好，醋酸可以防止酒精而引起的收缩。常温下，5毫米厚的组织固定4小时即可，加温（60℃）条件下，一般组织半小时内可固定良好，固定后组织直接放入95%酒精中脱水。

AAF固定液的缺点是组织固定后对细胞膜上的蛋白质和细胞内的某些结构有一定破坏作用，而对免疫组织化学染色有一定影响（详见免疫组织化学技术一章）。

其它常用固定液配方

10%甲醛生理盐水液

配方：福尔马林 100ml
氯化钠 9.0g
蒸馏水 900ml

Gendre液

配方：苦味酸饱和于95%酒精溶液 80ml
福尔马林 15ml
冰醋酸 5ml

用此液在室温下3—4小时即可使糖原固定良好。

缓冲福尔马林液

配方：福尔马林 10ml
磷酸二氢钠（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ） 0.4g
磷酸氢二钠（ Na_2HPO_4 ） 0.65g
蒸馏水 100ml

缓冲福尔马林固定剂具有能较好地保存细胞结构和某些细微结构，适于免疫组织化学染色和电镜观察，并且可较长时间保存组织（半年至一年）而又不影响制片和染色。是近年来越来越受到重视的固定剂。

第三节 大体标本的处理和固定

解剖所得的脏器标本，可提供临床病理讨论及教学和科研之用，除对有典型的病变脏器制成标本外，对有重要病变的脏器亦应固定保存，条件允许可将全部脏器切成需要的大小保留。

通常所用的固定液是10%甲醛（即福尔马林）水溶液（市售甲醛溶液用水稀释1：9）。这样既可使组织内的蛋白和脂类等成分凝固，又可使组织不致腐烂。为了保存组织内的各种水溶性成分、如粘液、肝淀粉和尿酸盐结晶等，应在剖验时将部分脏器切成组织块放入纯酒精液固定，切不可着水。

只有细心且有计划地进行尸体剖检，并在切除器官后仔细处理才能获得良好地陈列标本。剖检过程中的粗心和草率，很容易破坏一个有价值的标本。因为今天的常见病明天会成为罕见病例，为此重要的是保持这些病理标本原有的形态和色泽。有时外科手术摘除的标本，如经适当处理也可以成为最好的陈列标本。

常规的福尔马林固定后，大体标本常呈灰褐色，用下述方法拟可保存大体标本的色泽，使之更接近自然色彩。

配方： 甲醛 20ml
硝酸钾 3g
醋酸钾 3g
生理盐水 加至 100ml

固定时间视标本的大小而定，一般24—72小时。固定后经充分的流水冲洗后再放入下述保存液中长期保存。

甘油 20ml
醋酸钾 4g
麝香草酚 0.2g
蒸馏水 加至 100ml (PH=8)

第四节 陈列标本的固定

一. 为供日后临床病理讨论、教学和研究用的标本，必须将有关主要病变的脏器和其它继发变化的脏器一并保留，这样就保持了各脏器病变的联系性和整体性。

二. 将每一尸体的内脏放入一个较大的玻璃缸内。这种缸应有紧密的玻璃盖，使之不漏气。缸内先装半缸10%甲醛液，再将需要保留的各脏器放入，一定要浸在固定剂内，若听任露在液面外的组织变干，则会造成一块永久的暗色区。

三. 各标本如肝、脾和肾等应具有一光滑平整地切面（须以锋利的长刃刀一次切出）。轻放在缸内，以免弯曲变形，缸内切不可多装标本，特别是新鲜的软标本和对有教学价值的标本要分别固定，以免挤压、防止固定不足和变形而失去原有的特征。缸内固定液的量是标本体积的4—5倍。一般实质性脏器制作标本时，其厚度宜在1.5厘米左右，过厚则固定液不易渗透入内，过薄则易变形翘起。

四. 肺脏标本比重较轻，易漂浮在液面，可用薄层脱脂棉花覆盖其表面、借以棉花纤维的虹吸现象，可不断地浸湿标本。在有条件的情况下，为保证充分固定，应尽可能向标本内灌注固定剂。

五.标本放入固定液12小时后应加以翻转,以使标本与缸底或缸壁接触部分能很好浸透固定液。

六.具有空腔的脏器(如大、小肠)膜组织(如胸膜、腹膜等),皮肤等则应在剪开后用扣针将其边沿钉在硬纸板上,标本朝下浸到固定液内,以保持病变的形态,使用的扣针需防锈(也可用玻璃,竹签或不锈钢针)以免污染标本。

七.囊腔组织如果没有打开可用注射器注入固定液使之充盈;如已打开则需填入浸有固定剂的脱脂棉以保持其自然状态。

八.被胆汁污染或含胆汁的标本,必须分别固定贮存,否则会污染别的标本。

九.标本的外观、标签和目录也同样重要,大体标本的编号最好用布条,用碳素墨水书写解剖号码,然后将布条浸渍溶化的石蜡,冷却后将标签系于标本上或投入缸内,标本缸外面亦须贴上解剖号码,以便随时取验。

十.大体标本的保存和管理必须予以重视,应定期加入甲醛溶液以补充平时之挥发。液体内混和少量麝香草酚,作为防霉剂。平时也勤加管理,以防止发霉和标本腐烂。除有明确病变需要保留的标本外,对废旧标本亦须妥善处理。一般相隔3—6个月后,集中装于草包内焚化或深埋。

第五节 脱 钙

组织里存有钙盐可妨碍用常规方法制作良好切片。骨组织及钙化病灶,经过固定后,必先将钙盐除去使组织软化,才能进行常规切片。如脱钙不全则切片易撕开或碎裂并损伤切片刀刃。脱去钙盐的过程——称为脱钙。脱钙时应注意:

1.骨组织固定24小时后,锯下不超过0.5mm厚的薄骨片,再以10%福尔马林固定后进行脱钙。(未固定的组织在酸性脱钙液中受到的损伤比已固定的组织约大三倍)。骨组织过厚则需延长脱钙时间,长时间浸于强酸影响切片染色效果。

2.在不影响诊断的条件下,应将骨组织周围的软组织全部剥去。如果切片目的在于观察骨髓病变或骨组织肿瘤,最好除去一部分正常的致密的骨组织,以利于脱钙和制片。

3.脱钙前最好先将骨组织进行脱脂。

4.脱钙要彻底,脱水应充分,在脱水过程中,要注意不使其过度硬化。

脱钙剂

优质脱钙剂的标准是:

- (a) 完全脱钙。
- (b) 不损伤组织细胞或纤维。
- (c) 不妨碍以后的染色技术。
- (d) 适当的脱钙速度。

一、强酸脱钙剂

1.含甲酸脱钙液

Gooding和Stewart氏液(甲酸—福尔马林液)

配方: 甲酸 5—25ml
 福尔马林 5ml
 蒸馏水 加至 100ml

5%的甲酸是一种良好的常规脱钙剂，速度适当，组织损害小。当甲酸成分增至25%则增快脱钙速度，加入甲醛可适当保护组织不受酸损害，但应切记，增加脱钙速度只能靠牺牲细胞微细构造来获得。

根据组织的厚度和钙化程度，在5%甲酸液内2—4天可完全脱钙，横切的肋骨需36—48小时。

2. 含盐酸脱钙液

Von Ebner氏液

配方：浓盐酸 15ml
氯化钠 7.5ml
蒸馏水 加至 100ml

盐酸脱钙易使组织收缩，作用速度较快，用氯化钠作为溶剂则效果良好，牙齿脱钙时盐酸可增至10—20%。脱钙时，每日应加盐酸（0.5%）直至完成脱钙，横切的人肋骨（5毫米厚度）于36—72小时内脱钙。

3. 硝酸脱钙液

是最常用的脱钙剂，用硝酸作脱钙液的缺点是形成亚硝酸而使溶液呈黄色，产生颜色即迅速影响脱钙速度，且组织的黄染会妨碍随后的染色反应。在硝酸内加入0.1%尿素可以防止变黄而使之无色，但尿素仅有暂时作用，一旦硝酸显淡黄时需要加入。

福尔马林—硝酸液（Clayden氏液）

配方：福尔马林 5ml
硝酸（比重1.41） 7.5—15ml
蒸馏水 加至 100ml

此处方中甲醛可部分地抑制硝酸的浸软作用，这即具有脱钙作用，又具有固定作用，硝酸脱钙迅速，组织不膨胀，掌握好脱钙时间可直接脱水，不影响染色效果。但最好先洗去硝酸。

横切人肋骨（5mm）用含7.5%硝酸液于1—2天内脱钙。

硝酸水溶液

配方：硝酸（用0.1尿素稳定） 5—10ml
蒸馏水 加至 100ml

此液用作常规脱钙剂，作用迅速，对组织不膨胀，对细胞的保存和染色比前者更好，能适用多种染色技术，但每日需要更换新鲜溶液，最好早晚各一次，一般1—3天完成。

横切人肋骨（5mm）在12—24小时内脱钙。

二、螯合剂脱钙

乙二胺四乙酸（EDTA）是用以脱钙地螯合剂。为有机化合物，有结合某些金属的能力，能结合钙盐，15%的溶液即起脱钙作用，组织用此方法脱钙，对组织破坏性小，即放置数月亦不致引起对组织的破坏，对以后大多数的染色技术皆可得到满意结果。

经10%中性福尔马林盐固定后，将组织移到50倍用磷酸盐缓冲剂缓冲至PH值等于7的5.5%EDTA内。

不超过5毫米厚度的小块组织在此液内每4—5天换液一次，更换三次后再每天换液一次以便较准确的确定脱钙终点。脱钙“终点”可用X射线方法或用草酸盐化学方法。

完全脱钙后将组织直接移到70%酒精内常规脱水，浸蜡，石蜡或火棉胶包埋。

三、脱钙步骤

1. 取材：骨组织固定于10%福尔马林24小时后再锯取厚度约0.5厘米骨片。
2. 固定：再以10%福尔马林固定2天。
3. 将组织置于脱钙剂中，每日更换新鲜液、直至组织软化为止。
4. 流水冲洗24小时（除酸）。
5. 进行常规脱水，透明，浸蜡，切片。

四、鉴定脱钙是否彻底

确定脱钙“终点”三种方法：

1. 最常用的是最简单的方法——针刺，如果很容易被刺透，而且不感到阻力时，说明组织基本上脱钙完全，否则应继续脱钙。靠组织的柔软性测验脱钙作用靠不住，而且这种插入一根针以察觉钙沉淀的方法会造成组织损伤。

2. 用 X 射线检查：看组织内是否仍有钙质。

3. 用化学实验检查：

取 5ml 脱钙液用 2M 的 NaOH（氢氧化钠）调整至中性，再加 5% 草酸钠或草酸铵 1ml，液体混浊表示有钙质。迟至 5 分钟仍不混浊表示脱钙液中不含有钙质。

组织中仍有钙质时，一定量的钙离子会溶于脱钙液中，游离的钙会干扰脱钙作用的完成。显然，应在每次试验时完全更换，再试验中必须经过 2—3 小时间隔让钙溶解。

五. 酸的中和

脱钙后水洗 24 小时，目的是除去组织中经无机酸浸渍后过多的酸，以免影响染色。再冲洗前应将组织用一种碱处理以使之脱酸呈中性，可用 5% 硫酸钾或硫酸钠处理过夜。（否则会引起组织膨胀）但直接转移到稀酒精（70%）内过 12—18 小时换液 2 次，再继续脱水，经无水酒精，氯仿透明，石蜡包埋，切片，整个过程其酸已全部除去，在多数情况下不仅不膨胀且对染色反应能有所改善。因此不冲洗对染色也没大碍，只是脱水剂被酸化。

第六节 组织的冲洗

组织经过固定后，脱水之前应进行冲洗，将组织内的固定液洗干净，否则残留组织内的固定液有碍制片和染色，而有些固定液则可在组织中继续起到脆化组织的作用，以至于损坏组织，给制片工作带来不利。在冲洗时，冲洗剂的选择应依固定液的种类和性质而有所不同。

冲洗时应注意以下事项：

1. 水溶性的固定剂：需用流水冲洗。
2. 酒精溶剂的固定剂：应用同浓度的酒精浸洗。
3. 含苦味酸的固定剂：（苦味酸与甲醛混合液除外），须用 70% 酒精浸洗，以免水洗后固定作用消失。
4. 含有升汞固定剂：组织经固定后应在冲洗剂—水或酒精中加碘以洗去组织内汞的沉淀。
5. 含有铬酸的固定剂：组织在冲洗时最好置于暗处，以免产生沉淀或使组织硬化而影响制片。

第二章 石蜡包埋技术

制作石蜡切片，切片前须将石蜡渗透组织包埋于石蜡中，而水与石蜡又是不相混合的，所以在浸蜡，包埋前必须将组织内所含的水分脱去。而大多数的组织固定剂是水溶液，随后的水冲洗也使其含有大量水分，因此必须先行脱水，一般是浸入逐级增加浓度的酒精来完成。由于酒精和石蜡不能混合，须再用一种石蜡的溶剂来置换酒精，因大多数石蜡溶剂有使组织的折光率增高并表现为透明或半透明状，所以此步骤又称透明。最后用石蜡浸渍组织并铸制成坚实的蜡块。

常规的石蜡包埋过程包括五个基本步骤，即固定，脱水，透明，浸蜡和包埋，前一章中已述过固定。

第一节 脱水

脱水就是用脱水剂完全除去组织内的水分，为下一步透明及浸蜡创造条件。此外，脱水还可以使组织再次发生一定的硬化，脱水剂必须是与水在任何比例下均能混合的液体。

一. 常用的脱水剂

1. 酒精：是制片最常用的试剂，可与水在任何比例下相混合，酒精的脱水能力比较强，又能硬化组织。但是酒精的脱水速度很快，对于组织会有明显的收缩作用。因此在以酒精作为脱水剂时，应该先从浓度较低的酒精开始，然后递增其浓度，这样可以避免组织过度收缩。

第一瓶酒精浓度随固定剂，脱水组织的大小和种类而异，经水溶性固定剂固定的细柔组织需要慢慢脱水，从 50% 酒精开始。如眼球，组胚组织等大多数组织标本则是从 70% 酒精开始，再经 80%，95% 以至无水酒精。但是有时为了某种特殊要求，例如要做糖元的切片标本或是要做尿酸结晶染色切片标本，为了防止糖元和尿酸结晶在水中消失却要直接投入无水酒精中固定，而不需要经过水洗和低浓度酒精的脱水过程。经无水酒精固定后的组织只需要再经过换一次无水酒精脱水即可。

用 AAF 固定液固定的组织可直接置于 95% 酒精开始脱水。用醇性固定剂（如 Carnoy）则可置于高浓度无水酒精内，但应多次换液以除酸。

一般情况下，组织经过 70%，80%，90%，95%，以至无水酒精的脱水程序，即可达到脱水的要求。但是为了使大量的组织块同时进行脱水，则要求保持液体的浓度以保证脱水的作用，最好是以两次 95% 酒精，两次 100% 酒精重复进行脱水，以保证组织的水分脱净。脱水时间应视组织种类，组织块大小，厚薄和固定剂的不同而异。如脱钙的骨组织，实质性脏器等的脱水过程宜短，而疏松结缔组织，脂肪组织等，脱水过程则宜适当延长。水分必须脱干净，脂肪必须溶去。含有铬酸的固定剂固定的组织，脱水时间不宜过长，而镀银组织更应注意，脱水时间应比镀银的同类组织要短。

脱水的基本原则：从低浓度酒精开始逐渐升到高浓度酒精，以保持组织中的水分完全脱净。一般 1cmX1cmX0.2cm 大小的组织，脱水全过程仅需要数小时即可达到完全脱水。在各级浓度酒精内处理的最短时间分别减少到 2—4 小时也能获得满意的结果。如果组织脱水不尽，随后的透明，浸蜡都会受到影响，致使切片很难以完成。较差质量的切片，很容易造成在染色时脱片，这样的组织蜡块，因其含有一定的水分，一经与空气接触即干燥而凹陷。脱水不尽的组织是不能切出很好的切片的。

外检标本的制作，目前都采用快速脱水的方法。科研标本，教学标本的脱水时间比较长，其目的在于更充分脱水，并适当加强了组织的硬度。

酒精脱水剂使用不宜太久，应适时更换新液。当酒精混浊，变黄或酒精滴于水中出现乳白色混浊时，说明酒精中溶解了过量的脂类，这种情况一出现，将会影响脱水，则应及时更换。

各种浓度酒精的配制：

切片室内应常备有 70%，80%，85% 等各种浓度的酒精。配制时应以 95% 酒精作为基液加水稀释，不要用无水酒精去配制，因无水酒精的价格较高，极不经济。

配制方法如下：

1. 先将高浓度酒精注入量杯，其量同将要稀释酒精浓度数字相等。
2. 加入蒸馏水，致总量达到原酒精浓度的数字量。例如：

(一)用 95% 酒精配制成 70% 酒精时：

(1)取 95% 酒精 70 毫升；

(2)加蒸馏水使达到 95 毫升；

稀释后的酒精即为 70% 的酒精。

(二)用 80% 酒精配制成 60% 酒精时：

(1)取 80% 酒精 60 毫升；

(2)加蒸馏水使达到 80 毫升；

稀释后的酒精即为浓度为 60% 的酒精。其余类推，其他的试剂的稀释也均可以参照此方法进行配制。

2. 丙酮(Acetone)：可用作固定液，也是一种比较好的脱水剂。脱水能力强、速度快，可配制不同浓度进行脱水。但一般情况下，多用在无水酒精的补充脱水。

丙酮脱水时间比酒精强，但容易使组织过度硬化，所以应当掌握脱水时间。

3. 正丁醇(γ -Buty alcohol)：正丁醇脱水能力较酒精弱，可与水、酒精相混合，而且也能溶解石蜡，因此正丁醇不仅可以替代酒精使组织脱水，还可以代替二甲苯使组织透明。平常在稀释时都与酒精按照一定比例配制使用，

或将组织脱水至 90%酒精后移入正丁醇,正丁醇再脱水后可直接投入石蜡。用正丁醇脱水,组织比较少引起收缩和硬化等不良结果。

4.二氧乙环(Dioxan):二氧乙环是一种有毒物质,易挥发(使用场所必须通风),能同水、酒精、二甲苯相混合并能溶解石蜡,是一种既可以脱水,也具有透明效果的液体。脱水一般可以 70%开始,再经过 90%至纯二氧乙环,然后浸入石蜡。二氧乙环脱水对组织无收缩和硬化等不良现象,对较硬的组织或易收缩的组织可使用二氧乙环。

二.组织的摇震

为加快脱水进程可将标本放入各级酒精内借助机器或手工震摇,还可以加温促进脱水。即将标本装在塞紧的玻璃瓶置于包埋箱或温箱内,因液体受热产生的正压可增加溶液的对流。但热酒精会使组织过硬,并有爆裂危险,除急诊外,最好不用此方法。

第二节 透 明

组织脱水后,还要经过一个浸蜡的媒剂透明过程。目的是使石蜡渗透到组织中去,达到包埋的支持作用。常用的脱水剂如酒精等,不能溶解石蜡与之相混合,因此必须使用一种既可以同酒精又能同石蜡相混合的媒剂,当组织脱水后,浸蜡之前将组织投入这种媒剂中。由于两剂能相混合,另一方面也由于这种媒剂比酒精比重大,组织中的酒精就被该媒剂取代,待酒精完全被该媒剂完全取代后,组织即成透明状态,因此我们长称这种媒剂为透明剂,在制片中的这一过程就称为透明过程。实质上透明仅是一种过程而非目的,其所以出现透明现象使其折光系数改变的缘故。从组织的状态上看,由于组织经过媒剂的作用之后,其折光系数近于组织蛋白的折光系数,从而显示出透明状态。组织一旦呈现透明状态,也说明脱水剂已被媒剂所取代。透明后就可以将组织浸入溶解的石蜡进行浸蜡。

透明剂

透明剂很多,一般常用的有二甲苯,苯,甲苯,氯仿,香柏油等。

1.二甲苯:是最为常用的一种透明剂,它能与酒精,丙酮相混合,又是石蜡的溶剂。在透明过程中,组织继续发生硬化,由于二甲苯对组织的收缩性强,作用迅速,因此,组织在二甲苯中时间不宜过长,否则组织容易变脆变硬,一般是达到组织的透明为度,小块组织在半至一小时内透明。为了不使组织过度硬化,苯则是更好的一种透明剂,它较甲苯和二甲苯的作用稍缓,对组织收缩较少,不易变脆。但苯较二甲苯毒性大,挥发快,故应注意安全使用。

2.氯仿:也是一种很好的媒剂,它的作用缓和。组织在此液内过夜也不至于过硬变脆,这一点较苯,二甲苯和甲苯优良。但氯仿比重较大,折光率较小,不能改变组织的折光率,组织在氯仿中不易呈现二甲苯那样的透明现象,所以组织要比实际需要浸渍更长时间保证完全渗透和置换出酒精。

3.香柏油:是研究处理细柔组织的最佳透明剂,因它的硬化作用极小,组织在此液体内较长时间甚至几个月也可无妨。过硬的组织脱水后,(如皮肤和致密纤维组织)用香柏油透明,经此处理后的组织容易切片。不过香柏油的浓度大,渗透力弱,同石蜡混合不及其他透明剂效果好,故常规石蜡切片一般不用。

透明时间的长短因组织的大小而异。例如脑组织和有血块的组织,就应该缩短在二甲苯内留置时间,而一些肌肉组织和胃肠组织则应该稍延长在二甲苯内留置时间,最好先投入酒精和透明剂等量混合液半小时,再入透明剂,并更换一次透明剂,待组织完全透明后进行浸蜡,一般需要半小时至 2—3 小时。

脂肪组织由于其结构不同透明最快,但是这并不能说明组织中脱水剂已完全被透明剂取代,因脂肪组织本身折光率与透明剂(二甲苯)相近,所以应在透明剂中多浸一段时间使脂肪组织尽可能为透明剂所溶解,才有利于石蜡的侵入。

透明过久是否会导致组织过度硬化变脆,这取决于脱水的彻底与否,如果组织脱水完全彻底,则不会导致过度硬化和变脆,个别含胶样物质过多的组织例外。

第三节 浸 蜡

组织经媒剂的透明作用之后，移入熔化的石蜡内浸渍，石蜡逐渐浸入组织间隙，取代透明剂，这一程序就叫浸蜡。根据所用石蜡的熔点，浸蜡需要能够保持于 54—60℃ 温箱内进行。石蜡的质量和熔度与切片质量密切相关，因此对石蜡的选择应以注意。

用作浸蜡的石蜡不应含有尘粒，杂质及其他异物，不含水分，质地均匀成半透明状，触之感觉滑而不腻，结晶及颗粒少。石蜡中如有水分会结晶而变为白斑可用加热搅拌的方法除去。所有的蜡在使用前按常规必须用标准滤纸在漏斗内过滤到搪瓷杯里储存于浸蜡箱中。最好将石蜡于小锅中加热煮至近沸，冷却再煮反复数次后空气可以排除，挥发性油脂类在煮的过程中挥发。处置后的石蜡置于恒温箱中保持液体状态备用。所用的石蜡有一定的熔点和硬度，熔点高，硬度大。一般要求在 52—56℃ 之间，这既可以支持硬组织也可使切片成条。使用时应根据组织类型以及制片时的温度和气候而异。夏季采用高熔点的石蜡，冬季则采用低熔点的石蜡。

石蜡的熔点越低，其质地相应的较为疏松。硬蜡（熔点 60℃）用于硬纤维组织。软蜡用于胎儿和乳腺组织，这些尽为研究工作的需要。为了增加石蜡的韧性，可在石蜡中加入一些混合剂，常用蜂蜡，硬脂酸，松香等。

1.蜂蜡：又叫黄蜡，是蜜蜂用来造巢的淡黄色蜡，熔点在 54℃ 左右，质地柔软，滑润有韧性。为了使低熔点的石蜡硬一些，可加入 10—20% 的蜂蜡。它能增加蜡的熔点而不必使组织浸在高温内，便于切片。也要根据组织的种类而异，一般常规用量不超过 5% 为度。

2.硬脂酸：为有光泽的白色片状结晶体，不溶于水，而溶于乙醇，醚和氯仿。熔点 64—71℃，在浸蜡中加入少量的硬脂酸可增加石蜡的渗透性。有人用硬脂酸和石蜡混合液置于温箱中代替二甲苯透明。

3.松香：为棕黄色半透明的固体。质硬而脆，遇热熔解，呈胶体状，同石蜡混合时，可增加石蜡的硬度，由于松香质脆，混合后可增加硬度但韧性不足。

组织浸蜡时间也应视组织种类大小和结构不同而异。在整个浸蜡过程中，标本大小对完成浸蜡所需的时间有很大影响。较厚的组织需要较长时间才能使蜡浸入中心，而且厚的组织常带入的透明剂比较多，故需要多次浸蜡才能将透明剂除去。即使少量透明剂也会沾污石蜡而产生结晶，致使切片时切片易碎裂。也要考虑组织的种类，骨，皮肤和中枢神经系统等致密组织要比软组织如肝肾等需要加倍时间。含血多的组织，肌肉和纤维束在蜡内易过硬而发脆，故浸蜡时间应缩短。疏松组织，脂肪，消化道组织等浸蜡时间可以适当延长一些。为了尽可能排除透明剂，浸蜡可以分两级或三级进行。以熔点较低的软石蜡作为第一步，然后再换为熔点较高的石蜡作为第二步，第三步。浸蜡时间 1—4 小时，或更长，并使之过夜则较易切割，如此浸渍的组织切片在干燥箱内干燥也不易卷曲和龟裂。

第四节 包 埋

包埋，就是将已经经过固定，脱水，透明，浸蜡的组织块从最后的蜡浴取出置入充满熔融石蜡的包埋框内，包埋成块，使组织和包埋剂相熔一体并迅速冷却，这个程序称为包埋。包埋剂凝固后，进一步加强了组织的硬度和韧度而便于进行切片。

一. 石蜡包埋法

石蜡包埋法是制作光学显微镜切片的常规方法，它有许多优点，操作简易便于掌握，可进行连续切片，包埋后的组织可以长期保存。

包埋的方法有自动包埋机包埋和手工包埋两种。手工包埋的步骤如下：

1.组织浸入石蜡后，包埋前将组织移入包埋用石蜡杯内。从恒温箱取出置于三角架上，其下点燃酒精灯，以保持石蜡的溶解状态。

2.准备好包埋框，将包埋用的镊子在酒精灯上加温（防止镊子粘蜡）后，左手持蜡杯，右手把加温的镊子放在蜡口（直立状）倒蜡时让石蜡沿镊子注入包埋框内。

3.迅速镊取组织块放入包埋框石蜡内，切面朝下放正置入框底并轻轻压平，以保证不再有气泡。

4.待石蜡表面凝固前将标签贴于其上，需注意勿使标签与标本混淆，当蜡块冷至蜡面有一层透明蜡膜时，浸入冷水中迅速使其冷却，否则蜡内常形成结晶。

5.蜡块完全硬固后除去铜框，以保证蜡彻底凝固，立即修切，准备制成切片或储藏备用。

二. 石蜡包埋的注意事项

1.作为包埋组织使用的石蜡不仅由于气候的不同需要加以选择，而且与组织的硬度也有密切关系，过硬的组织最好用硬度较高的石蜡包埋，反之，软组织则应以硬度较低的石蜡包埋。其熔点一般要求再 60°C 左右。

2.包埋用石蜡加温不可过高，以保持其不凝固为度，温度过高容易将组织烫坏，使得组织变硬，变脆，并发生卷曲，收缩变形而不利于切片，甚至影响诊断。另外注意埋蜡的温度和组织本身的温度，两者是否合适，温度不一致常可造成组织与周围石蜡脱裂的现象，而达不到包埋的作用。

3.包埋用石蜡应掌握用量，以组织全部包埋完毕，石蜡也恰好用完为宜。

4.包埋应注意组织病变面放在下面，并尽可能使组织放平，在不损伤组织的情况下可用镊子轻压。

5.囊壁和消化道等组织包埋时更应注意组织方位，应将组织块直立拉平，不要卷曲。

6.相同组织如包埋于一个蜡块时，除包平外，还要注意方向的一致，以利切片。

7.多块组织和碎组织包埋于一个蜡块内时，组织的排列一定要密挤靠拢，以求成直线或方块行，这样有利于切片。

8.石蜡包埋后，不宜冷凝过慢，特别是室温较高时，石蜡凝固后应立即投入冷水中加速冷却可增加石蜡密度，韧性和硬度。但冷凝过速也会因为内外温差过大造成蜡块裂损。

三. 石蜡包埋程序

1. 组织取材 2 毫米厚度，固定于福尔马林数小时后再换以新鲜福尔马林固定数小时。

2. 组织流水冲洗 6—12 小时。

3. 70%酒精 2—4 小时。

4. 85%酒精 2—4 小时。

5. 95%酒精（I）2—4 小时。

6. 95%酒精（II）2—4 小时。

7. 100%酒精（I）2—4 小时。

8. 100%酒精（II）2 小时。

9. 二甲苯（I）0.5—1 小时。

10. 二甲苯（II）0.5 小时。

11. 浸蜡（I）2 小时。

12. 浸蜡（II）2 小时。

13. 组织包埋。

在实际操作中，各级酒精脱水的时间可以因组织的大小，多少而减少或延长，如要在酒精中过夜最好是在低浓度酒精中浸泡，透明过程一定适当掌握，不要时间过长。更换脱水酒精，如从节约的角度考虑，可将各级酒精逐级下降使用，如无水酒精可降为 95%酒精在继续使用。应考虑到组织在酒精中脱水过程里，除去组织中的水分混入酒精，使其浓度降低外，组织中的一些可溶物质，如脂类也可被酒精溶解，酒精中含有一定这样的物质时，将会降低脱水功效，因此，最好是更换酒精。

组织脱水，透明彻底后，浸蜡过程在必要时可以延长，例如，在石蜡中过夜，但温箱一定要恒温，以免组织块受高温影响，造成组织过度硬化。

四.快速石蜡包埋法

快速切片诊断是在数十分中或半小时左右制成切片并作出诊断的一种手段，主要用于手术中决定手术的范围和手术方式。快速切片的方法包括冰冻切片和快速石蜡切片。

制作快速石蜡切片时，切取组织应该薄小，从固定、脱水到浸蜡的全过程都要加温，一般是先将各种试剂在超声波快速石蜡脱水仪中预热，恒温下操作，整个过程大约在 10—15 分钟即可完成。

操作过程：

（1）先取病变组织于 AAF 中固定 3—5 分钟。

- (2) 95%酒精 1 分钟。
- (3) 无水酒精 1 分钟
- (4) 正丁醇 1/3 丙酮 2/3 混合液 1 分钟
- (5) 二甲苯 1 分钟
- (6) 浸蜡 1—2 分钟
- (7) 包埋，将组织置于预先备置的蜡块中（固体石蜡包埋法）；预备一硬蜡块，用热镊子于蜡块中间熔蜡一小部分，在以热镊子从蜡杯内取出已与石蜡饱和之组织块投入融蜡中，冷固后，立即进行石蜡切片。石蜡切片贴后，在火上稍加烘烤使组织切片上石蜡全部熔化，水分也被烘干，然后投入二甲苯，100%酒精，95%酒精各 30 秒脱蜡，入水冲洗，常规苏木素，伊红染色。

第三章 切片技术

优良的切片技术取决于所有器械的透彻了解和丰富的实践经验。实验工作的每一方面都需熟练的技巧，这只有靠实践才能获得。早期练习如草率和不当，多年后还会反映出来；但要是达到了训练的高标准，以后就会一直保持下去。经良好训练和实践的技术工作者能在很短时间内制出第一流的切片。

第一节 切片刀

切片刀或许是切制良好切片的最主要因素，因为它较之切片机而言造成切片不良的机会最多。只有刀口无损，才能切制完整切片，如切片刀不够锋利、切片时会自行卷起或皱起，更不能顺利地将切片切成连续地长条带状，破碎、不完整。所以，锋利和调节良好的切片刀使切片易于操作。如可能，每人应有自己的刀，并自己保管，不仅能精心保护且因每个人操作习惯不同而利于使用。

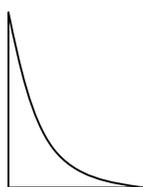
一、切片刀的种类

根据切片刀的结构式样区分的主要有以下几种：



(a)

a 平凹形



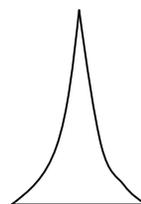
(b)

b 深平凹形；



(c)

c 平楔形；



(d)

d 双凹形

二、切片刀的选择

平凹形：用于滑动式切片机或某些轮转式切片机。

深平凹形：仅用于火棉胶切片，因为刀口较薄，用其切制硬固材料时刀叶会颤动。

平楔形：用于普通石蜡切片和巨检标本切片。

双凹形：用于摇动式切片机和滑动式切片机切割石蜡切片。

三、磨刀

理想的切片刀的刀刃应在两个平坦切割面间形成笔直细线。一把锋利的切片刀能将石蜡切片切到 2 微米并连续成条而无压缩。如果刀刃比细胞还厚，则它对细胞的破坏要比切割的大。因此，磨刀是从事切片技术的一项基本技能，必须锻炼和掌握。

磨石种类很多；有天然、人工或平板玻璃。天然磨石：宜仔细选用质地纯净无杂质并较硬的砚石，稍软而涩的用作“粗磨”；硬而细滑的用作“细磨”。

工业用金钢砂磨石；有多种规格和级度，细度均匀，一般多将最细的金钢砂磨在组织学上做“粗磨”，用以磨去损伤较重的切片刀刃上的较大缺口。

平板玻璃：裁取适当大小作磨石用，须在磨石面上加氧化铅等磨料，如普通磨石同样方法使用，优点是变换不同细度的磨粉或磨浆，可在一块玻板上作“粗磨”，“中磨”或“细磨”用。

磨刀石的大小可根据切片刀大小种类而异，磨刀时需加稀润滑油，肥皂水或水，用油较好，磨石用过后续拭掉磨料和小金属屑。最好是磨石固定装在一盒内，磨石周围有刻槽便于排流多余的油和水。使用完毕立刻盖上盒盖以防落上污物或灰尘。如未除去这种灰尘会损伤石面并在砥磨时使刀刃发生缺损。

四、磨刀方法

磨刀的手法各人有所不同，但有一个原则，必须将刀口全部磨到，使其平衡一致。同时还要保持磨刀的平度。切片的中部使用较多，耗损也较大，磨刀时应照顾到它的平衡，以免使用日久后刀口形成月牙状，影响切片质量。

磨石的方法包括手工磨刀和磨刀机自动磨刀，本节着重介绍手工磨刀的具体方法，机器自动磨刀应在仔细阅读使用说明后按操作程序执行。

磨刀的步骤：

- 1、将磨刀放在一条粗面（或铺一层湿布）实验台上使在砥磨时不会活动。
- 2、在磨石面中央滴入少量的稀润滑油或液体石蜡并均匀抹开，以便增加磨擦密度。
- 3、将刀柄和刀夹装在切片刀上使刀刃向前，平放在磨石面上，刀跟大致位于磨石的中央。

4、砥磨时手指应保持正确位置以使用力均匀易于滑动，以右手握住刀柄，左手握住刀壳，刀刃朝向磨刀者前方，将切片刀从磨石的右下角刀端向磨石的左上角向前斜推进至刀跟，将刀刃从上面翻转；翻转时刀夹不能离石，此时刀刃向着磨刀者。将刀横向移动使刀跟的刀刃处于磨石前端的中心，再斜着拉回。此时再将刀刃从上面翻且将刀横向移动使切片刀在磨面上处于原来的位置。（见图解）这样每完成一次要有八个动作，切片刀应与磨石全部接触到，反复进行。砥磨时左右手均匀压迫整个刀刃，避免倾斜，并要防止油腻的手指从刀面滑开。

由于手法的习惯不同，也可以从磨石的左上角向右下角推进，翻转后再从左下角向右上角拉回，只要将刀与磨石全部磨到，这是没有什么区别的，简便快捷的方法也同样有效。熟练后可使动作速度加快和将刀刃磨利，但在练习中过早地追求速度会将刀刃磨钝或割破手指。

5、上述过程持续到磨掉缺口，对损伤较大的切片刀须用粗细两种磨石，在粗磨石上磨掉大缺口，再在细磨石上磨锋利。

向前推进式磨刀法，磨擦较快，效率较高，大约一把迟钝的切片刀只需要 20 分钟左右就磨锋利。然后即可准备磨刀。

五、磨刀

磨刀是将已磨快的刀刃磨使锋利更加致密。最好的磨刀皮是用马臀部皮肤制成的，叫“马革磨刀皮”。分两种类型（1）能弯曲的（手持的）。（2）绷紧的。所有磨刀皮的类型依个人爱好而定。像磨刀石一样，磨刀皮面须无污物和灰尘。

磨刀的方法：

手握刀柄，不用刀壳，以刀背在磨刀带上后退式的向上移动（就是说与磨刀的方向相反），反转后再以刀背后退式向下拉回。反复这个动作进行磨磨，一般 3—5 分钟即可。其磨刀技术动作完全与磨刀相反，练习使用磨刀皮的全部长度均匀地磨完整个刀叶。在每次磨到头时须练习如何翻刀以免切到磨刀皮上。

检查切片刀是否锋利，通常以手指轻轻试摸刀口的锋刃，如果感到好像一排极其细密针刺的触觉，说明刀口已锋利。如用放大 100 倍显微镜下观察，可见刀口表现一种非常细的断续线，如一排极其细密而又均匀的锯齿，即所谓锋芒。如果没有出现，仍须再磨。

磨刀和磨刀的方法图解（略）

切片刀磨好后应细心爱护。切片刀平时放在刀盒内，不要任意放在实验台上，不要用它切制明显钙化的组织，这样，切片刀锋利的刀刃就不会轻易的被损坏了。

第二节 切片机

切片机是切制薄而均匀组织片的机械，组织用坚硬的石蜡或其他物质支持，每切一次借切片厚度器自动向前（向刀的方向）推进所需距离，厚度器的梯度通常为 1 微米。切制石蜡包埋的组织时，由于与前一张切片的蜡边粘着，而制成多张切片的切片条。

切片机的基本类型的五种，按其结构叫做（1）摇动式切片机，（2）轮转式切片机，（3）滑动式切片机，（4）推动式（雪橇式）切片机，（5）冰冻切片机。普通最常用的是轮转式切片机。

轮转式切片机：

系借转动手摇轮进行切片动作。蜡块台镶装于可在沟槽内上下运动的金属夹座中，借微动螺旋向前推进切断平整的切片。有的转轮式切片机的机头上装有三只旋钮和一个紧固旋钮能使其向各个方向偏转并紧固，便于调整蜡块的切面。切片刀的切制角度可以调整（切片刀倾斜）。由于这种切片机上使用的是一种重而大的切片刀，故除切制硬组织时一般不发生颤动。切片厚度借旋钮可以 1—30 微米之间调至任何厚度，每一梯度为 1 或 2 微米。

轮转式切片机的优点是机体较重，故此摇动式切片机稳定，非常适于切制石蜡切片，可以理想的切制连续切片，亦用以切制大组织块。

第三节 石蜡切片的制作

以石蜡制作的切片，可以制成极薄的切片。一般的切片厚度要求在 4—6 微米。而石蜡切片不但可以达到这个要求，甚至可以切得更薄到 2 微米以至 1 微米。这一点是冰冻切片和火棉胶切片难以获得的结果。另外，石蜡切片还便于制作大批的或是连续的切片。而且以石蜡包埋的组织块便于长期保存。所以石蜡切片是目前各种切片制作方法中最普通常用的一种方法。

一、切片前的准备：

1、恒温水浴锅首先预热至 35℃—40℃。

2、蜡块整修，将蜡块组织面的石蜡用刀修去，使组织全部暴露出切面并修平，以减少切片刀的磨损。将组织块左右两侧的石蜡在不损伤组织及影响诊断的原则上，全部切除；否则切片容易皱褶。组织块上下边缘的石蜡视组织情况修齐修平；石蜡不须留得过多，应尽量少留，以保持组织间距的最小限度。这样切下的切片既呈带状，也不弯曲。片距小，在贴片时就可相应多贴片，有利于检查诊断。修切蜡块时只能一点一点地切掉蜡边，要是大片修切易使蜡块断裂露出组织；遇此情况应返入新蜡再次包埋。

3、载玻片应事先洗涤干净，无油腻和不透明现象，应将载玻片浸入酸缸内 12 小时后流水冲洗，再烤干备用。根据切片需要张数，每片涂上一层极薄的蛋白甘油，插于载片板（或载片架）上备用。

蛋白甘油的配制：取新鲜鸡蛋 1 份加甘油 1 份再加适量麝香草酚搅匀。此法主要是防止脱片，实际上一张很清洁的载玻片不涂蛋白甘油也不会脱片。

4、将锋利的刀片装入切片刀夹钳内，调整角度和位置后随即紧固，检查切片刀的倾斜度是否正确，倾角过大、则切片上卷；倾角过小则切片皱起，以 20° -30° 为佳。

5、备用小型毛笔、小型无钩镊子、铅笔。

二、切片的步骤：

1、将蜡块固定于切片机头上的夹座内，调整到稍离开切片能够切到的位置上，注意蜡块组织切面与切片刀口要垂直平行。

2、再调整蜡块组织切面恰好与刀口接触，旋紧刀架，固定好机头。

3、根据需要调整切片厚度。

4、摇动切片机手轮先进行修整切片，直到切出完整的最大组织切面后，再进行切制。

5、实践中可用右手转动切片机手轮，左手用毛笔托起蜡片，协调地进行切片操作。

6、切下的切片带，一端用镊子轻轻拉起，应尽可能将切片带拉直展开，用毛笔将切片带从刀口向上挑起，拉下切片带，然后轻拖铺于恒温水面上。

三、切片的注意事项

1、切片质量的好坏，除与技术熟练程度和切片机的好坏有关外，切片刀是决定的因素，所以刀一定要磨得十分锋利。否则在切片时会自行卷起或皱起，或将组织划伤出现刀痕，更不能顺利地将切片切成连续地长条带状。切片刀如有缺口存在，将使制成的切片断裂、破碎，不完整，切片时应时时擦净刀口。

2、切片机的各个零件和螺丝应旋紧，否则将会产生震动。在每次更换蜡块时，应习惯地检查一下组织块是否夹紧，切片刀是否稳固，稍有疏忽就会影响切片质量，甚至将蜡块全部切坏，造成不可弥补的后果。在切制切片的开头阶段如出现切制不良与其他故障，最常见的原因是蜡块或切片刀的松动所致。

3、在摇动切片机时，用力要求均匀一致，不宜过重过猛，否则可因用力过重而使机身震动，造成切片厚薄不均。遇有硬化过度的脑、肝、脾等组织时，更应该轻轻切削，以防组织由于震动形成空洞现象。

4、在夏秋季节进行切片时，应使用冰块加强冷却，这样不仅可保持石蜡的硬度，同时也减少了切片的褶皱，给切片制作带来方便。

四、贴片：

1、将单张或数张切片，用镊子夹住蜡片的一边并提起，铺于恒温水中，（光亮的一面朝下）立即用毛笔轻轻拉展以切片无皱褶为最好。如有皱褶时用镊子细心地逐个轻轻拨开，注意不可拨破组织。然后分开每张切片，选取其中最完整的，没有皱褶的切片。

2、待切片在恒温水内充分摊开展平后，将载玻片垂直插入水中以涂有蛋白甘油面轻靠切片，并用毛笔将切片一边拨于玻片上，随即将玻片直立提起，趁玻片上仍有少量水份时用毛笔，拨正切片位置。如组织较小，可在玻片上多贴几片或几排，但排列应密集、整齐。

3、用铅笔在玻片一端的毛玻璃上写上标本编号，字要写得小而清楚、端正。

4、将附贴好的切片置于 60℃ 恒温箱内干燥 2 小时，蛋白质凝固后即可进行染色。

第四节 特殊组织石蜡切片制作

在这一点上须明确：组织只要是经过适当的固定、脱钙（如果需要），完全脱水，透明和浸蜡等程序，切制时切片刀锋利以及切片机调整合适，有 99.9% 的组织都切割制出相当好的切片。只有在极罕见情况下组织虽经上述正确处理仍难切制。当遇到此种情况时，可采用下述方法弥补。

切制困难主要有两种情况：（1）组织太硬；（2）切制时组织易碎。（如皮肤、骨骼或血凝块）

无论是组织切制遇到困难还是组织未做先期的防护处理，均可将组织浸入香柏油中软化，然后再以二甲苯洗去香柏油，重新浸蜡包埋，再以常规方法切片。

切片时组织易碎：

不管蜡块的切面是否用冰块冷却，（组织含多量血液时最易碎）可在每次切片时在蜡块面上用火棉胶覆被；将蜡块切面擦干，用毛笔蘸取 1% 火棉胶液涂在切面上，稍停数秒钟待火棉胶干燥，再按常规切片。每切一张蜡块须涂一次火棉胶膜。须注意的是当附贴这种切片除去皱褶时，蜡片的胶面应向上，而水温要比通常略高以抵消胶膜的作用。切片干燥后在二甲苯脱蜡之前还要用等量酒精和乙醚除去火棉胶膜。

第五节 石蜡切片的异常及处理

一张理想优良的切片，除组织固定适当和染色清晰之外，还应具备：薄、平整，无皱褶压缩，无裂损痕迹及擦痕，同时贴片排列密集，整齐位置适当，透明度好，封片用胶适量，盖玻片端正，无气泡等。

一、影响切片质量的因素（表一）

制片程序	影响因素
取材	组织形态不规则，过大，厚薄不均
组	固定
	不及时：固定液选择不当

织 的 处 理	脱水 透明 浸蜡 包埋	脱水不良；或时间过长 透明过长；或透明不足 时间不当；石蜡质量不纯，熔度选择不当 石蜡的硬度组织位置安排不当，包埋不平、碎组织散乱
切片	切片刀不够锋利，刀身角度固定不当	
	切片机性能掌握不够，保养不当	
	技术熟练程度不够	

二、石蜡切片中的异常及原因和解决方法（表二）

异常表现	原因和解决方法
切片纵裂 或纵断	1、刀刃损，须磨、鑿。 2、刀口粘附细纤维，须擦净刀口。 3、组织内有细小过硬异物或骨质等。剔除异物，骨质脱钙。
切片弯曲 或滚卷	1、刀钝须磨或鑿。 2、刀的倾角过大，调整。
切片厚薄 不均，宽窄 相间，或在 每张切片 上有厚薄 区带	1、切片机调整螺旋须紧固。 2、组织过硬，需用软化剂处理，湿润组织切面，稍冰冻，均匀而慢切。 3、刀的倾角过大，须调整。
切制时组 织破碎	1、刀钝，须磨。 2、蜡太软，须用冰块处理蜡块切面。 3、蜡内形成冰晶，凝固时冷却得慢或含水及透明剂，须重新脱水。 4、温度过高使组织变硬变脆，先用温水浸润而后切。若有过多的胶质，则可浸入 70%酒精甘油软化后切片。
切片带呈 弧形弯曲	1、组织形状不规则，蜡边缘区不平行并与刀刃不平行。 2、由于阻力不同，切片带组织内成分复杂，向阻力小的方向弯曲，修蜡块应视组织情况将蜡块切修成倒梯形，阻力大的一侧窄些，小的一侧宽些。 3、切片过厚，刀角偏大，刀钝须磨或鑿调整厚度及刀角，选择锋利处切片。
组织压缩， 切片变窄， 切片周围 蜡边粘连 使皱褶不 易展开。	1、蜡块被压缩，系由于刀刃斜面不平，须研磨、鑿刀。 2、组织内纤维成分过多，细心处理组织。 3、组织浸蜡不足，石蜡硬度不够，室温过高，冰蜡块增强蜡块硬度或选换硬蜡。 4、组织块不必要的过大。
切片出现 抓痕和擦 迹	1、刀口不清洁，时时擦净刀口。 2、刀钝+组织内结缔纤维较多，其中还有钙化灶，异物、毛、发、线。剔除异物，选择刀口锋利处切片。 3、刀刃有细缺口，须磨刀。
间歇出片	刀、刀座、蜡块固定过松，须旋紧螺旋。

切片带中组织皱褶（呈泡样皱褶）	1、蜡块组织双侧留有蜡边，切片前组织两侧石蜡全部切除。 2、组织厚薄不均脱水变形，包埋不平，取材时注意厚薄均匀，注意组织脱水处理，包埋要平整。 3、碎组织包埋时排列不整齐，密集、组织成分较复杂。包埋应将碎组织排列密集整齐，切片水温不宜过高，摊片后尽量缓缓拉展。	
切片不成带	切片贴在蜡块上	1、刀钝，擦净刀口，选锋利处切。 2、组织内纤维成分过于集中（如皮肤）消化道组织切片时将皮下组织或浆沫置于下面。
	切片贴于刀口	1 卷刀、磨刀。 2 刀口粘附石蜡过多，擦净刀口。

（注）：切制石蜡切片遇到障碍大多数是：（1）刀钝或刀刃受损。（2）蜡块或切片刀的调整螺旋或是紧固螺旋拧不紧。因此，有经验的切片者在开始切制切片之前应习惯地反复核查（1）（2）这两点。

第四章 染色与染色剂

未加染色的切片在显微镜下除了能够辨认细胞和包核的轮廓以外，看不清楚其他任何结构。即使由于组织内部各种物质的折射指数不同，从光线的明暗上能使我们看到一些组织结构，但也是极其简单而有限的。远远不能满足观察和诊断的要求。我们不仅要通过显微镜视野来看到组织和细胞的形态结构，而且还要通过组织和细胞的形态变化来研究它的发生和发展。因此染色的技术才逐渐发展成为制片过程中的一个重要环节。它较固定、脱水、包埋、切片等步骤远为复杂，理论性强，技术要求严格，已经成为一门独立的科学，它在组织学，病理学等学科中已占有相当的地位。

第一节 染色的基本原理

染色就是利用染料在组织切片上给与颜色，使其与组织或细胞内的某种成分发生作用，经过透明后通过光谱吸收和折射，使其各种微细结构能显现不同颜色，这样在显微镜下就可显示出组织细胞的各种成分。染色剂与组织细胞相结合而使组织细胞着色的过程与物理和化学作用两者都有关系。

一.染色的物理现象

1.溶解性：

这种染色最典型的例子就是脂肪染色，苏丹类染色剂为脂溶性染料，它可以被脂质溶解，使脂质着色，就是利用染色剂在脂质中的溶解度大于在酒精等溶剂中的溶解度这一特性。因此，当苏丹类的酒精溶液与组织细胞中的脂质接触时，染色剂就从溶液中“转移”到脂质中去，而使脂质着色。

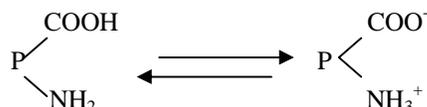
2.吸附作用：

较大物体有从周围介质吸附小颗粒到自身的特性。有些染色则是染色剂分子通过渗透和毛细管作用而被吸收或沉淀到组织，细胞的小孔中去而着色的。例如活性炭吸附各种分子，甚至胶质和微生物等较大的颗粒一样。

二.染色的化学反应

酸性染料和碱性染料的染色作用常是对立的，而不是一致的。任何染料均可电离，离解出阳离子或阴离子。酸性染料中的酸性部分有染色作用的是阴离子；碱性染料中的碱性部分有染色作用的是阳离子，细胞内同时含有酸性和碱性物质，酸性物质与碱性染料中的阳离子相结合，如细胞核（含有核酸）黏液和软骨基质呈酸性部分被盐基性染料苏木素所染、反之碱性物质与酸性染料的阴离子相结合，如细胞浆及其内部的某些颗粒物质被酸性染料伊红所染。染料的颜色基不是在阳离子，就是在阴离子上，这些离子将因组织反应不同而发生化学结合，如显示含铁血黄素的普鲁士兰反应是最典型的例子。但是，大量染色的化学反应并不象铁

反应那样明确，实际情况远为复杂。这是因为蛋白质分子是个分子量自几万至几百万的大分子，每个分子中含有许多阳离子和阴离子基因，在等电点时能形成游离的两性离子，如：



P 为蛋白质，是具有两性的胶体物质。它呈酸性或碱性与环境的 PH 值有关，如溶液的 PH 值小于该蛋白质的等电点则此溶液对该种蛋白质即为酸性，蛋白质就带正电，将被酸性染色剂所着色。反之，溶液的 PH 值大于蛋白质的等电点，则此溶液对该蛋白质来说即为碱性，蛋白质带负电，将被带有阳离子的染色剂所浸染。

在日常工作中，长久固定于甲醛的组织切片，往往染色不良，尤其是核的着色欠佳。这是因为固定液甲醛氧化生成甲酸，组织亦随之变为酸性，所以不易被苏木素所着色，补救的办法是，先用流水冲洗组织块，然后用碱性溶液如稀氨酒精等处理使之中和，恢复正常 PH 值后再进行染色。

大多数染色的原理至今仍未搞清楚。有些可能是物理的，有些可能是化学的，有些则可能两种机制都起作用，正因为人们对染色的原理还没有完全掌握，所以目前还不能很好地运用原理来控制它。在相当程度上要凭借工作经验。因此“染色”成为技术性很强的一项工作。在进行每一种染色方法时，必须注意不断地有意识地去积累经验，从成功与失败中去真正掌握该染色技术。

三. 进行性染色和退行性染色

组织成分着色由浅至深，当达到所需要的强度时，终止染色。这种方法称为进行性染色。一般所采用的染液浓度较低，染色过程中应该不时在镜下观察以进行控制，这样才能得到染色强度适中的效果。此种方法无需“分化”，例如，卡红染色。

退行性染色，则是先把组织浓度过度，超过所需的程度，然后再用某些溶液脱去多余的染色剂，以达到适当的深度，并使不应着色的组织细胞脱色，这个步骤称为“分化”。在分化中进行镜下观察，当然也是必不可少的。H.E 染色中用苏木素染核就是退行性染色。

四. 直接染色，间接染色和媒染剂

有些染色无需第三种物质参加，染色剂和组织即可直接结合着色，是为直接染色。直接染色最后达到的深度与染液的浓度和组织细胞对染色剂的亲和力相关。还有一些染色，单独染料本身的水溶液或酒精溶液，几乎不能与组织细胞结合或结合的能力很弱，必须有第三种成分——媒染剂参与，才能使染色剂与组织细胞有效地结合起来，这种染色方法称为间接染色。

媒染剂通常是双价或三价金属如铝，铁的硫酸盐或氧化物。媒染剂有的加在染液中，媒染作用在染色的同时进行（如 Ehrlich 氏苏木素染色）；有的则用于染色前，媒染剂单独配成溶液，固定液本身就起着媒染的作用（如 Wallory 氏磷酸苏木素染色用 Zenker 或 Helly 氏固定）；有时则用于染色后。媒染剂在染色中起着架桥作用，既能与染料结合又能与组织相结合，达到了促进染色的效果。例如苏木素就需要明矾作媒染剂，才能使组织着色。媒染剂往往在一些间接染色反应中几乎是必不可少的。

五. 促染剂

用以加强染料和组织细胞结合能力的物质称为促染剂。如染胞浆时伊红液中滴加的冰醋酸，有加强其染色作用，增加了有色酸对蛋白质碱基的结合力。促染剂与媒染剂不同，有时为了加快染色过程，可在染液中加入接触剂促进染料与组织细胞着色，但其本身并不参与染色反应。

促染剂有如化学反应中的催化剂，少量存在就有明显的促染作用。它们的作用机制也许是降低表面张力或是改变了染液的 PH 值。

六. 分化剂

在退行性染色中，附在组织细胞上多余的染色剂需用某些特定的溶液把目的物以外的部分脱去，从而使目的物与周围组织形成鲜明的对比，同时使目的物本身的色泽也深浅适当。这种选择性地除去多余染色剂的过程称为“分化”，所使用的溶液即是“分化剂”。

分化剂大致可归纳为三大类：

（一）酸性分化剂：如冰醋酸和盐酸。它们能与媒染剂（金属）相结合形成可溶性盐类，从而打开了媒染剂和组织细胞的结合，使组织细胞脱色，另外，它能分解和防止形成染料的沉淀色素。如 Ehrlich 氏苏木素液

当酸性时，溶液为褐红色，正是由于色素根来与铝化合成兰色的“沉淀色素”，之故，一旦将切片投入碱性溶液，则组织立刻呈现蓝色，说明沉淀色素已经形成，但若以 1% 盐酸酒精分化，则又恢复了红色，此即表示沉淀色素又被溶解。

(二) 氧化分化剂：其作用实际上是种简单的漂白，如苦味酸，铬酸，重铬酸钾，高铁氰化钾和过锰酸钾等，这些都是些氧化剂，可将组织上所有的染色剂无选择地氧化而呈无色，犹如漂白作用。但由于这种氧化作用的速度较慢，首先脱去的必是染色较浅的，染色较深的组织细胞还可保留部分染色剂，这样就达到了分化的效果。

(三) 媒染分化剂：媒染剂能促使组织细胞和染色剂相结合。如果将已染色的切片再放到媒染剂的溶液中，则可使已经和组织相结合的染色剂脱去，这是媒染剂的另一种功能。从这个角度看，又可称之为“媒染分化剂”。它对组织既能使染料附着，又能脱去染料，二者初看似乎矛盾，其实不然，这是因为染色剂和媒染剂的比例关系不同，当溶液中媒染剂的量超过了染色剂的量时，占有压倒优势的媒染剂就把已经和组织细胞相结合的染色剂夺取过来，使组织细胞脱色，即为分化现象。当然，含染料较少的组织必然先被脱色，而着色较浓的组织随着分化时间的控制，即可保留必要的颜色，从而达到分化的目的。

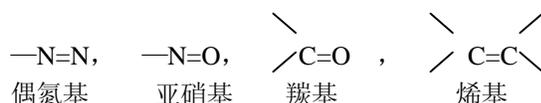
既然分化剂有脱色的作用，因此分化剂本身也是脱色剂。一张褪色的切片，需要再染时，第一步就是用脱色剂加以处理。在常规染色中，分化剂必须严格掌握，再根据经验进行镜下观察，控制染色效果。

七. 变色反应和正色反应

大多数染料可将组织染成同一颜色的不同深度；例如：酸性品红总是将组织染成不同色调的红色。淡绿染成不同色调的绿色。这些染色反应最后目的所呈现的颜色和染色剂的颜色相同，称为正色反应。然而有些组织成份可被煤焦类，某些碱性染料染成与染料不同的另一种颜色；如黏液用甲苯胺蓝可染成红色，而其余组织则染成不同色调的蓝色。此种染色反应最后目的物所呈现的颜色和染色剂当初的颜色不同，则称为变色反应。也叫做异染现象。这种组织称为显示异染性，这种染料叫做异染染料。显示异染现象的主要组织成分有黏液，软骨和肥大细胞颗粒。

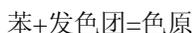
第二节 染色剂染色的化学基础

作为一种生物染色剂，必须同时满足两个要求：具有鲜艳透明的颜色，而且能与组织细胞相结合。染色剂分子能够显示颜色的基因，称为发色团。主要的发色团有：

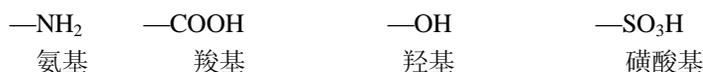


亚硝基和偶氮基显示的颜色较强，在染色剂中有一个这样的发色团，就可染出颜色。其他的发色团则不是这样，必须有几个发色团，有醌的分子中就有四个发色团，(2 个羰基 2 个烯基)。

大量的合成染料都是由煤焦油蒸馏得到的，它们都是苯的衍生物，所以苯环是合成染料的基础。苯本身是无色的，但其氢原子为某发色团取代后就带有了颜色。含有发色团的苯环化合物，称为色原。



色原还不能很好地与组织细胞相结合，即使着了色也很容易脱去。因此仅仅具有色原还不能成为染色剂，染色剂分子中还需具备促使染色剂与组织细胞相结合的基因，这样基因在称为助色团。如



氨基在溶液中形成阳离子 (+)，为碱性；其它羟基，羧基和磺酸基皆带阴离子 (-) 故为酸性。如三硝基甲苯是个色原，它虽有发色团—硝基，但因缺乏助色团，所以没有染色作用，不能称为染料。假如三硝基苯分子中的一个氢原子被羟基置换，则所生成的化合物既具有发色团而又得到了助色团—羟基，这就成了常用的酸性染料苦味酸。

这就可以看出，助色团的作用在于使色原形成盐类，可以在溶液中电离成为带电的离子，这样才能与相应的组织细胞的成份相结合。

第三节 染色剂的分类

一、按来源可以分为

- 1.天然染色剂：主要是苏木素，胭脂红，地衣红，番红花。
- 2.合成染色剂：是从煤焦油中提取的苯生物。在生物染色中还使用一些无机化合物，如硝酸银，氯化金，磺，钼酸，高锰酸钾等。

二、按主要用途分为

- 1.胞核染色剂：苏木素，胭脂红，甲苯胺蓝，美蓝，孔雀绿等。
- 2.胞浆染色剂：伊红，淡绿，橘黄 G,酸性品红,苦味酸等。
- 3.脂质染色剂：苏丹III，苏丹IV，苏丹黑，硫酸尼罗蓝及油红等。

三、按染色剂分子中的发色团可分为九类

- 1.亚硝基类：发色团为亚硝基（-NO）如萘酚缘-B。
- 2.硝基染料：发色团是硝基（-NO₂）如苦味酸。
- 3.偶氮类：发色团为偶氮基（-N=N-）属于这一类的染色剂的橘黄 G,刚果红,俾士麦棕和许多苏丹类的脂质染色剂。
- 4.醌亚胺类：这类染料含有两个发色团，一个是印胺基（-N=），一个是醌型苯环，如硫堇，美蓝，甲苯胺蓝 O,硫酸尼罗蓝,中性红,碱性藏红花 O，焦油紫等。
- 5.苯甲烷染料：发色团是醌型苯环，如孔雀绿，浅绿，碱性品红，酸性品红，结晶紫，甲基缘等。
- 6.山叮染料：发色团是醌型苯环，如派罗宁，伊红 Y 等。
- 7.蒽醌染料：此类染色剂含有色原蒽醌，如茜素和胭脂虫酸。
- 8.噻唑类。
- 9.喹啉类。

8, 9 类染色剂使用极少。

四、按染色剂的化学性质分类

染色剂的干粉是稳定的盐类，它们在溶液中则电离成酸性或碱性染色剂。如酸性染色剂，能够产生氢离子（H⁺）或其它阳离子（Na⁺），而其本身成为带负电荷的阴离子者。这类染色剂一般用于染细胞浆，如伊红 Y，苦味酸，橘黄 G 等。碱性染色剂，能产生氢氧根离子（OH⁻）或其它负离子（如 Cl⁻），而本身成为带正电荷的阳离子者。这类染色剂常用于染细胞核，如碱性品红等。

1.酸性染色剂：色原——助色团——Na⁺→[色原-助色团]⁻Na⁺。常用的如伊红，酸性品红，苦味酸，橘黄 G，刚果红，水溶性苯胺蓝，淡绿等酸性染料常用以染细胞浆等碱性成份。

2.碱性染色剂：色原——助色团——Cl⁻→[色原-助色团]⁺Cl⁻。常用的如苏木素,卡红,次甲基蓝,甲苯胺蓝,硫堇,美蓝等碱性染料常用以染细胞核等酸性成份。

严格地说，酸性染色剂的溶液并不一定呈酸性。同样，碱性染色剂的溶液也未必呈碱性。所谓酸性和碱性染色剂仅指它们电离后其分子的主要染色部分是阳离子还是阴离子。因此称为阳离子型染色剂或阴离子型染色剂更为适当。

常规 H.E 染色中苏木素染液的 PH 值约为 7，此时胞核的化学成份电离产生 H⁺，而其本身成为带电荷的阴离子，所以被阳离子型的碱性染料剂所着色。伊红染液为弱酸性。细胞的化学成份从溶液中获取 H⁺而成为带正电荷的阳离子，因此与阴离子型的酸性染色剂（伊红）相结合，染作红色，这就是 H.E 染色分别显示核和胞浆的机制。

3.中性染色剂：这是酸性染色剂和碱性染色剂的复合物，又可称为复合染料。是由碱性染料（色碱的盐）和酸性染料（色酸的盐）配制而成。其中染色剂的分子很大，所以往往水中溶解度较低，需用酒精做溶剂。

血液学中的血液涂片经常使用的瑞氏染色剂及姬姆萨染色剂就是这种混合染色剂。其中的各种不同成分可分别使核、胞浆和颗粒着色。

第四节 常用染色剂及配制

供组织学诊断用的优秀常规染色剂，不仅须使细胞核和细胞浆有选择性着色，也要使结缔组织着色。苏木素-伊红染色的切片适当分色，可使这些结构得以区分，胞核表现为蓝色，胞浆和结缔组织纤维呈各种色调的粉红，因此这是一种最常用的常规染色剂。

一、苏木素-伊红染色的基本原理

苏木素是最早用于生物学上的天然染色剂之一，百余年来，一直是生物学实验室最常用的组织学中细胞核的染料，它是从苏木树的树心中提炼出来的，为浅褐色结晶或淡黄褐色的粉末状物。易溶于乙醇、甘油，也可溶于热水。苏木素本身没有染色能力，它经过氧化后，能产生具有染色能力的苏木红，苏木红又称为氧化苏木素或苏木因。

苏木素变成苏木红的过程叫作“成熟”。成熟的方法一般有两种：一种是把配制好的苏木素液在开口瓶中放置两个月以上，让其在日光和空气中的氧的作用下使之氧化。故一般地盛苏木素的瓶子放在向阳处，时间愈长，染色的效果愈好。常配制一大瓶，备长期使用。另一种方法是在苏木素液中加入氧化剂，如碘酸钠，过锰酸钾，氧化汞，双氧水等。用这种方法成熟与用第一种方法者不同的是，它放置时间愈长，染色的效果愈低。这是因为苏木红被继续氧化可生成无色的化合物，故一次不宜配制过多，还应放置 4⁰C 冰箱内避光保存以延长使用时间。它的优点是配制后即可使用。

成熟的苏木素对组织并无亲和力，须加入含金属离子的媒染剂，才能达到染色的目的。一般用于明矾苏木素的媒染剂为钾明矾或氨明矾。主要是利用明矾中的铝离子和苏木红结合形成的铝沉淀色素为紫蓝色，对染色质有很大的亲和力，水和酒精都不能使其褪色。用于铁苏木素的媒染剂是三价铁离子，苏木红的铁沉淀色素为黑蓝色，不溶于水，因此，故不能配制大量含媒染剂的混合液，一般用时现配，或在染色过程中，先用铁明矾媒染，然后再染苏木素，如磷酸钨酸苏木素染色即是。

常规苏木素染色的对比染色是用伊红，也有采用焰红，因为焰红比伊红色泽更鲜明，此外还有采用橘黄 G，比布里希猩红，波尔多红等作为对比染色。

苏木素-伊红染色，在组织病理学中，是一种日常使用最为广泛的常规染色方法。一张优质的染色切片，可以清晰地观察到各种不同的组织结构以此作为病理诊断的确切依据。再根据此染色切片所见，分别进行不同的特殊染色。

二、染液的配制

在实验室内常用的苏木素染液有以下几种，不同的仅是染色时间以及比较每种染色方法彼此的优缺点，不过各有优劣。

(一) 苏木素染液的配制方法如下

1. Harris 氏苏木素液

甲液：苏木素	1g
无水酒精	10ml
乙液：硫酸铝钾	20g
蒸馏水	200ml
丙液：一氧化汞	0.5g

经典的配制方法是，先将甲液加热溶解后，密封待用，再将乙液加热溶解至沸，去火，待溶液仍处于小沸腾状态时再将甲液徐徐倾入其中，全部混合后，再使溶液在短时间内加热至沸腾，去火，最后，将氧化汞缓慢倾入溶液中（氧化汞一定要慢慢少量分次加入，切忌急躁。因氧化汞倒入后，溶液会迅速膨胀易沸出容器外而发生危险。）此时液体变为深紫色，待氧化汞全部放入后，再将溶液加温至沸腾片刻，立即将溶液放入流动的冷水中，并缓缓地连续摇晃至溶液完全冷却为止。隔夜后过滤，加入冰醋酸（按 5% 比例）混匀，再过滤后保存于冰箱内备用。

我们在实验工作中摸索了一种 Harris 氏苏木素的配制方法，染色效果很好，特介绍如下。

配方：（配制 2000ml）

苏木素	9g
硫酸铝铵（铵明矾）	200g
氧化汞	7g（5—10g）
冰醋酸	100ml
蒸馏水	2000ml

器具：

3000 毫升三角烧瓶	1 个
200 毫升量筒	1 个
1000 毫升量筒	1 个
漏斗	1 个（大）
滤纸	1 大张

另备脱脂棉、电炉、湿抹布、大称量纸、流水槽等。

（器具要求达到化学洁净）

配法：

1. 将苏木素溶于 100 毫升无水乙醇中，密封备用。
2. 将 200 克铵明矾溶于 2000 毫升蒸馏水中，加热至沸。
3. 去火。加入苏木素酒精搅拌，加热至沸。
4. 去火。缓缓加入氧化汞。
5. 微火煮至有金属膜产生。
6. 去火。以湿抹布包住三角烧瓶的颈部。迅速放置于冷水浴中冷却，缓缓摇动烧瓶至液体完全冷却为止。
7. 静置避光过夜。棉花过滤。滤液中加入冰醋酸（按 5% 的比例加入），混匀，滤纸过滤，备用。

注意事项：

1. 配制好的苏木素液，未经使用的可长期置冰箱（冷藏）内保存。
2. 盛液体的烧瓶要质优并且容积要大，防止急速冷却对破裂和煮沸时液体溢出。

2.Hansen 氏苏木素液

甲液：苏木素	1g
无水酒精	10ml
乙液：硫酸铝钾（钾明矾）	20g
蒸馏水	200ml
丙液：高锰酸钾	1g
蒸馏水	16ml

先将甲液加热溶解，然后将乙液加热溶解，将甲、乙两液混合。再将丙液溶解后缓缓滴入，待全部混合后，再次煮沸一分钟，冷却后过滤，即可使用。

3.Heidenhain 氏铁苏木素液

甲液：硫酸铁铵（紫色结晶）	5g
蒸馏水	100ml
乙液：苏木素	0.5g
无水酒精	10ml
蒸馏水	90ml

此液要求硫酸铁铵只有紫色的透明结晶才能使用；苏木素是溶于酒精中然后加水。苏木素液需放置 4-5 周才能成熟。临用时将甲、乙两液等量混合后使用。（也可先将苏木素用无水酒精配成 5% 的贮备成熟，用时取 10 毫升加蒸馏水至 100 毫升使成乙液）

此苏木素液能染许多结构，但只能用于退行性染色法，需要熟练的分化，初学者宜用减半浓度的铁明矾分色，熟悉后再用原浓度分色。

此液与其它的苏木素染色技术有两个不同 a.媒染剂与苏木素分开使用。b.所用的媒染剂亦用作为分色剂。

4. Ehrlich 氏酸性苏木素液

主要应用一般染色和粘液，骨组织的染色

配方：	苏木素	2g
	纯酒精	100ml
	甘油	100ml
	蒸馏水	100ml
	冰醋酸	10ml
	钾明矾	15g

将苏木素溶于纯酒精，再将钾明矾溶于蒸馏水中，溶解后将甘油倾入混合，然后加入苏木素酒精混合，最后加入冰醋酸，溶液全部混合后，应暴露在日光下使其自然成熟，时间约要三个月。（若加入 300 毫克碘酸钠，使苏木素迅速氧化则可立即使用。）此液贮存愈久染色力愈强。（可保持数年之久）染色时间 5—20 分钟，结果甚佳。

5. Delafreld 氏苏木素液

主要应用于一般染色，弹力纤维的染色。

甲液：	苏木素	4g
	纯酒精	25ml
乙液：	饱和铵明矾水溶液（约 10%）	40 毫升
丙液：	甘油	100ml
	甲醇	100ml

先将苏木素溶于酒精，再将甲液混合在乙液中，置于白色瓶中并暴露在阳光下约一周，然后过滤，将丙液加入滤液中，待溶液呈暗灰色时再过滤，滤液密封保存。

6. Mayer 氏明矾苏木素液

主要应用于一般染色，骨组织染色，及免疫组化染色。

配方：	苏木素	0.1g
	钾明矾	5g
	碘酸钠	0.02g
	枸橼酸	0.1g
	水合氯醛	5g
	蒸馏水	100ml

先将苏木素及水煮沸溶解，加入钾明矾与碘酸钠，搅动直到全部溶解为止。再加入水合氯醛和枸橼酸，完全溶解后染液呈蓝紫色。加热煮沸五分钟，冷却后过滤即成。

此染液染切片 5—15 分钟，不需分化，充分水洗后，可使细胞核显蓝色并且非常细致清晰，通常用于对比染色。

7. Weigert 氏铁苏木素液

甲液	苏木素	1g
	无水酒精（或 95%酒精）	100ml
乙液	29%三氯化铁水溶液	4ml
	蒸馏水	95ml
	盐酸	1ml

临用时，取甲、乙液等量混合即可应用。混合时应将乙液加入甲液内，染液呈紫黑色。铁苏木素不能象明矾苏木素一样配制后可放置贮存备用，因铁与染色剂的色素根会化合生成不溶性沉淀，所以铁作媒染液时，必须与染液分别配制和分别保存，染片时临时混合应用。

由于这是一种铁苏木素，它将胞核染成黑色。能抵抗在对比染色液中所含分色剂的脱色作用，且不会被光线退色，因此比钾明矾苏木素染色较为持久。

8. Mallory 氏磷钨酸苏木素液（PTAH）

配方：	苏木素	0.1g
	磷钨酸	2.0g
	蒸馏水	100ml

将苏木素于 20 毫升蒸馏水中加热溶解，再将磷钨酸溶于 80 毫升蒸馏水。苏木素液冷却后加入磷钨酸溶液中混合，置放人有阳光处数星期至数月才成熟。此液可久放，若急用时可加入 0.177 克高锰酸钾促其成熟。

该染色剂对神经组织及纤维素是一种较为卓越的染色剂。

9. Mallory 氏磷钨酸苏木素液

苏木素	1g
10%磷钨酸水溶液	10ml
水合三氯乙醛	6—10g
蒸馏水	100ml

暴露于阳光下氧化一周，用时过滤。此染色剂主用于中枢神经系统的染色。

10. Bohmer 氏苏木素液

苏木素	1g
纯酒精	10ml
钾明矾	20g
蒸馏水	200ml

将苏木素溶于酒精稍加温。钾明矾溶于蒸馏水，两液混合置烧杯或广口瓶中，以纱布或棉花封盖，在阳光下约 1—2 个月自然成熟的苏木素液面可见一层金属膜样物。组织切片染色用 5—10 分钟，以盐酸酒精分化。

(二) 分化液

1%盐酸酒精，是最常用的分化液。

配方：	70%酒精	99ml
	浓盐酸	1ml

(三) 还原液

1. 氢氧化氨液：

配方：	浓氨水	1ml
	蒸馏水	99ml

2. 饱和碳酸锂液：

配制：	碳酸锂	1g
	蒸馏水（冷）	78ml

3. 流水冲洗还原。

(四) 伊红染液

伊红为砖红色粉末状或酱红色结晶，是最常用的胞浆染料。又称为曙红，它是荧光黄的四溴衍生物。曙红本身溶于醇而不溶于水，也称为醇溶性伊红，它的钠盐，钾盐或铵盐可溶于水，因此称为水溶性伊红。

配方：	伊红 Y（水溶）	0.5—1g
	蒸馏水	99ml

若取用伊红 Y（醇溶性）应溶于 99ml75% 或 95% 的乙醇中。若在伊红液中加入 0.5 毫升冰醋酸，可加速其染色过程，并使胞浆的色泽更为艳丽。

第五节 苏木素—伊红染色法

苏木素、伊红染色，简称 HE 染色，是组织学技术的常规染色方法。恒定优质 HE 切片应该是红蓝相映，层次浓淡均为分明。

一、石蜡切片苏木素—伊红染色法的基本步骤:

脱蜡

- (1) 二甲苯 I 15 分钟
- (2) 二甲苯 II (应完全透明) 10 分钟

逐级降浓度酒精水化

- (3) 无水酒精 I (变为不透明) 1—2 分钟
- (4) 无水酒精 II 1—2 分钟
- (5) 95% 酒精 1—2 分钟
- (6) 80% 酒精 1—2 分钟
- (7) 自来水洗 片刻

染色

- (8) 蒸馏水 片刻
- (9) 苏木素液染核 10—15 分钟
- (10) 自来水洗 片刻
- (11) 1% 盐酸酒精分化 0.5—1 分钟
- (12) 流水冲洗 片刻至数小时
- (13) 碳酸锂饱和水溶液反蓝 1 分钟
- (14) 流水冲洗 15 分钟至数小时
- (15) 复染 0.5% 伊红水溶液 (对比染色) 2—5 分钟

逐级升浓度酒精脱水 (若为醇溶伊红可直接入 90% 酒精)

- (16) 自来水洗 (分化伊红) 片刻
- (17) 95% 酒精 I 1—2 分钟
- (18) 95% 酒精 II 1—2 分钟
- (19) 无水酒精 I 1—2 分钟
- (20) 无水酒精 II 1—2 分钟

透明

- (21) 二甲苯 I 5—10 分钟
- (22) 二甲苯 II 5—10 分钟

可作透明度试验: 在黑色背景下以光线照于切片如果见有乳白色斑片系脱水不足, 需再行脱水。

封固

- (23) 盖玻片下封固

结果: 胞核呈蓝色, 胞浆呈红色, 红细胞呈桔红色, 其它成分呈深浅不同红色。

二、染色过程中的加热

为了缩短某些程度的染色时间, 通常可用加热的方法来实现。一般是将切片或涂片浸在染色液内, 连同染色皿置于 37℃ 或 56℃ 温箱内至所需时间。

有的染色需用煮沸或近于煮沸的技术, 可将染色液在试管内煮沸后倾在载玻片上; 或在注满染液的载玻片下面直接加热, 直接加热会因溶剂蒸发而使染色剂发生沉淀。这可在倾入染色剂以前在切片上覆盖一块方形滤纸束加以防止。染色完成后冲洗切片时可以很容易地除掉滤纸而又不会损伤切片。

三、染色时应注意事项

一张优质的 HE 染色切片, 绝非仅指染色而言, 它包括很多方面, 首先应重视“固定”环节, 其次注意脱水、透明、组织浸蜡, 包埋和切片等各个步骤。一张因固定、脱水等步骤有所缺陷的切片, 染色是不可能鲜艳、透明、层次分明的。解决上述各细节问题的方法已在前面各章节中均提到过。但在进行 HE 染色时还应注意以下问题:

1. 组织切片的脱蜡步骤应彻底, 否则无论进行那种染色都会发生困难。脱蜡时间要充分, 若溶蜡剂使用过久应及时更换以免效率降低, 若室温过低, 可将溶蜡剂置于温箱中进行脱蜡。

2. 苏木素染液使用一段时间后表面易出现亮晶状飘浮物，这可能是液体表面的过氧化物，必须过滤除去，以防沉渣污染组织切片。苏木素液一般染过三、四百张切片后，着色力会减弱，着色不鲜艳，呈灰蓝色时应及时更换新液。

3. 染色的时间长短需依据：染剂对组织的染色作用，室温条件，切片厚薄，固定液的类别，染液的新旧而进行调节。所以在染色时必须使用显微镜观察染色程度以利掌握时间。

4. 分化十分重要。分化步骤的准确也是染色成败的关键，若分化失当则必然引起染色不匀或过淡，过深等现象，因此分化后一定要镜检，观察胞核是否清晰，胞浆呈淡白色。否则需再次分化，不然一旦复染后，组织会呈紫蓝色即“蓝盖红”现象。

5. 还原液不宜过浓，若碱性太强易使组织脱落故以淡为宜。

6. 伊红宜淡染，复染过深胞核会不清晰，影响镜检。

7. 若脱水，透明等步骤不够彻底，则组织表面会有一层雾状膜。若有这一现象，应立即更换纯酒精脱水，再次透明。在潮湿的季节里应注意酒精的浓度、若降低要及时更换。

8. 染色后的组织切片、要将组织四周的污染物痕迹擦掉，以免影响美观。

9. 封固剂要适量，滴加时应小心倾滴，盖玻片要轻轻放置，以免气泡产生影响镜检。盖玻片大小选择要合适，一般要大于组织块，以防封盖不全，盖玻片要放正，标签贴牢，编号清楚。从而保证切片的封藏和美观。

10. 染好的切片应妥为保存，更应避免日光照射，否则切片容易褪色。

第六节 封固剂

由于组织学制片需随时检查或保存，故要在盖玻片下封固。封固剂又称媒，顾名思义，它既能使染色后的组织封固于载玻片和盖玻片之间，不使直接与空气接触，避免氧化褪色。另一方面使组织切片在封固剂的充实下，其折光率能和玻片的折光率相近，从而获得清晰的镜检效果。（玻片折光率为 1.518）

封固切片的介质需根据多种因素而定。常用的有两类：

1. 含水封固剂：如甘油，甘油明胶和 Apath 糖浆等，用于未染色的材料，脂肪染色，异染染色等。

如：甘油明胶常用于脂肪染色的冰冻切片

Apath 糖浆则用于证明淀粉样变的结晶染色法中。

此类封固剂使用方便，组织切片不必经过脱水、透明等步骤即可封固。但切片仍可以久存。

2. 无水封固剂：如中性树胶，大马树脂及人工树脂等。用于石蜡，冰冻和火棉胶切片的封固，使用时组织切片必须脱水，透明彻底，不然片中会出现云雾状混浊，妨碍镜检。

通常这些封固剂系将一种树脂（天然或合成的）溶于其天然溶剂或二甲苯内直至呈适当的易干易凝的流体状以便封固。其粘稠度以便易排除气泡且在盖玻片与切片之间能自由流动为好，稍稍一点则可避免干燥后在盖玻片下形成空气间隙。

选择一种封固剂，应以对所用的各种染色剂不褪色为原则。

如：用碱性苯胺染料染色需封固于不含酸的封固剂内。象普鲁士蓝反应的切片应封固于非还原性封固剂内。

封固剂还应具有准确的折光率：

未染色组织最好用有很高或很低折光率的封固剂封固。而染色的切片则以折光率在 1.52 至 1.54 之间的封固剂封固则透明度最佳。

我们常用的无水封固剂为市售的中性二甲苯树胶液，亦称中性树胶；为无色或淡黄色的透明液体，因酸或碱性封固剂均可引起组织切片的褪色，故宜用中性封固剂。封固剂应保存于有色瓶中避免日光照射，并存放于暗处以防酸变。

中性树胶是很好的封固剂，不仅折光率（1.52）及色散作用都近似于玻璃，而且在很薄一层时几乎是完全无色透明。用以封存 HE 染色的切片则色彩非常鲜艳。干固后即变硬，能把盖玻片和载玻片紧紧地粘在一

起。仅有的缺点是随着保存时间的延长，树胶逐渐使二甲苯氧化，产生甲苯酸及邻苯二甲酸能使碱性染料褪色。

(王翠兰、高友晶)

第五章 特殊染色技术

通常将切片的染色方法分为两大类，一种是普通染色法（见前），一种是特殊染色法。

普通染色即是经常应用的苏木素——伊红染色法。还有一种常规的染色方法。组织经过这一染色法，其形态结构可以全部显示。一般的组织变化和组织产物都可以通过这一染色法显示出来，所以称之为普通染色法。

特殊染色法是为了达到某些特殊的要求，或是为了观察特殊的组织结构，例如：观察间质的结构变化，需要作胶原纤维染色，弹力纤维染色或网状纤维染色。又如，要观察组织内某些物质的状况，例如糖，脂肪和粘液、纤维素等时，均需特殊显示的染色方法。

特殊染色的方法繁多，显示不同的物质需要不同的方法，显示相同的物质也有不同的方法。我们选择性地介绍常用的一些方法。操作时，应根据需要，结合手边的试剂及条件，选择合适的方法，并应不断地总结，摸索以提高特殊染色的水平。

第一节 结缔组织染色法

一般而言，疏松结缔组织、致密结缔组织、脂肪组织、网状纤维组织、软骨组织、骨组织和血液均属结缔组织。

结缔组织由细胞和大量的细胞间质构成。间质包括基质和纤维两种成分。疏松结缔组织和致密结缔组织的纤维有胶原纤维，弹力纤维和网状纤维。

光学技术切片的结缔组织染色是指胶原纤维，弹力纤维和网状纤维染色，而通常所说的结缔组织染色多指胶原纤维染色。

一、胶原纤维染色法：

胶原纤维由纤维母细胞分泌产生。纤维母细胞，纤维粗细不等直径在 1—2 微米之间，呈分枝状，相互交织，少量常呈明显的纤维状；成熟的和大量存在于组织时，则显均质性，具有较强的嗜酸性，在苏木素—伊红染色（简称 HE 染色）的切片上易于识别。但在某些情况下，它与肌纤维的鉴别是有困难的。例如纤维瘤或纤维肉瘤与平滑肌瘤或平滑肌肉瘤及横纹肌瘤及横纹肌肉瘤的鉴别。为此，适宜的采用某些特殊染色就十分必要了。如 Ven Gieson 氏染色法（胶原纤维呈红色，肌纤维呈黄色）；Masson 氏三色染色法（胶原纤维呈绿色或兰色，肌纤维呈红色）。

1. Ven Gieson 氏苦味酸复红法（1889）

此法是用来区分胶原纤维和肌纤维的经典染色方法，习惯称之为 V—G 染色法。染液是苦味酸和酸性复红的混合液，胶原纤维被酸性复红染成淡红或红色，肌纤维被苦味酸染成黄色。

操作方法：

- (1)切片脱蜡常规至水，蒸馏水洗。
- (2)Weigent 氏铁苏木素液染核。
- (3)水洗（用自来水充分冲洗）。
- (4)1% 盐酸酒精分化
- (5)流水冲洗。
- (6)Ven Gieson 氏苦味酸复红染色 1—5 分钟。
- (7)滤纸稍印干或用 95% 酒精迅速脱色与脱水。
- (8)无水酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封盖。

结果：胶原纤维红色，肌纤维黄色，核褐色。

试剂配制：

Ven Gieson 氏苦味酸复红液：

1%酸性复红	10ml
苦味酸饱和水溶液	90ml

两液混合后加适量蒸馏水稀释备用。

注意事项：

1. 苦味酸复红两液应分别保存，染色前取均量（等量）混合使用。
2. 酸性复红易被水洗掉，而苦味酸易被酒精洗脱，故在分色脱水时都应快速。由于 V-G 为较强的酸性染液，切片放置过长易褪色。

2. Masson 三色染色法

Masson 三色染色法是由 Mallory 氏苯胺蓝菊黄 G 发展改良而来，但对于固定液有一定的选择性，虽然任何固定液固定后的组织可进行染色，但最好是用 Zenker 氏固定液或 Bouin 氏固定液固定组织。福尔马林固定的标本切片在染色前以 3% 升汞作第二次固定一小时以上，则可增强着色效果。

操作方法：

- (1) 切片常规脱蜡至水，蒸馏水洗；
- (2) Weigent 氏苏木素液染核 30 分钟；
- (3) 自来水洗；
- (4) 1% 盐酸分化（在显微镜下控制染色，除核为黑色，片中其他均混为白色）；
- (5) 自来水洗；
- (6) 丽春红一品红溶液洗；
- (7) 1% 醋酸水溶液洗；
- (8) 1% 磷钼酸分化直到各种成分被染清晰（胶原纤维呈淡红色，肌纤维、纤维素呈鲜红色）；
- (9) 1% 醋酸水溶液洗
- (10) 2% 淡绿液染 2—5 分钟（或用 2% 苯胺蓝水溶液替代）
- (11) 水洗
- (12) 常规脱水、透明、封片。

结果：胶原纤维绿色（或蓝色），肌肉、纤维素红色，红细胞橘黄色，核蓝黑色。

试剂配制：

1. 丽春红一品红溶液

丽春红	0.7g
酸性品红	0.3—0.5g
冰醋酸	1ml
蒸馏水	100ml

2. 1% 冰醋酸水溶液

冰醋酸	1ml
蒸馏水	99ml

3. 淡绿

淡绿	2.0g
冰醋酸	2ml
蒸馏水	98ml

注意事项：

1. 用 Weigent 氏染色铁苏木素为 A，B 两液等量混合液（在临用前混合）。
2. 如丽春红一品红溶液及淡绿染色较深时，可加一定蒸馏水稀释染液。

二、网状纤维染色法:

网状纤维是非常细而短的纤维，大量堆集时则形成致密的网状，故有网状纤维之称。又因这种纤维只有以银盐镀染才能看见，所以又称嗜银纤维。它主要分布于肝、脾、骨髓、淋巴组织等造血器官，在病理情况下，常出现于炎症增生和肿瘤性增生组织中。

网状纤维染色，常作用于某些肿瘤的鉴别诊断，如癌与肉瘤的鉴别。还可作为恶性肿瘤的发生以及预后的观察。

网状纤维的染色方法很多，但都是嗜银浸染法，虽然各法操作步骤及染液的配制有所不同，其基本原理还是相同的。由于组织内的蛋白质与银化合物的结合，再经过还原而成为金属银，沉积于组织内及其表面，因此得以着色。

操作方法：（Gomri 氏染色法）

- (1)切片常规脱蜡至水，蒸馏水洗。
- (2)0.25%过锰酸钾 5—10 分钟。
- (3)5%草酸漂白 1—2 分钟，以切片呈白色为度。
- (4)流水洗，经蒸馏水洗。
- (5)2%铁明矾媒染 5—10 分钟。
- (6)蒸馏水速洗。
- (7)双氨氢氧化银溶液（Gomori 氨银溶液）3—5 分钟。
- (8)10%福尔马林还原 0.5—1 分钟。
- (9)蒸馏水洗。
- (10)以 0.2%氯化金调色 3-5 分钟。
- (11)蒸馏水洗。
- (12)于 5%硫代硫酸钠中固定 1-2 分钟。
- (13)自来水洗数分钟。
- (14)常规脱水，透明，封固。

结果：网状纤维黑色，胶原纤维黄色—桔黄色，细胞核呈灰黑色。

试剂配制：

双氨氢氧化银（Gomori 氏氨银）溶液配制：

取 10%硝酸银溶液 5ml 于量杯中，缓慢地逐步滴加入 28%氨水，开始产生褐色沉淀，继之淀渐渐溶解，恰好溶解完为止，然后加入 3%氢氧化钠 5ml，再产生黑色沉淀，再滴加 28%氨水，直到仅有微量沉淀为止，加蒸馏水至 50ml 过滤使用。此液配制后，可放入冰箱内保存 1-2 周，用时升至室温即可，应贮存于棕色瓶内。

三、弹力纤维染色法

弹力纤维较细，直径 0.2-1 微米，且坚固，弹性大，容易伸展，纤维分枝连接成网，没有原纤维，量少时不易与胶原纤维区分，量多时才可识别。HE 染色与胶原纤维着色相似，若用弹力纤维染色法，则可分辨的很清楚。例如，观察血管弹力层的异常。

弹力纤维具强嗜酸性，用升汞，酒精固定染色较佳，适于福尔马林固定。

操作方法：

1. Weigert 氏弹力纤维染色法：

- (1) 标本用 Zenker 氏液，酒精或 10%甲醛固定均可。
- (2) 石蜡或冰冻切片。
- (3) 染色前的程序，按照常规进行。
- (4) 水洗后，入 Weigert 氏染色液 2-6 小时或更长的时间，一般依染色液的新旧而定。
- (5) 切片从染液中取出，直接浸入 1%盐酸酒精或酒精中进行分化。
- (6) 如需复染细胞核，可染于明矾苏木素溶液中 10 分钟。
- (7) 冲洗后，可再以 Ven Gieson 氏染液作对比染色 1-2 分钟。
- (8) 95%酒精分化、脱水、透明、封固。

结果：弹力纤维呈暗蓝色，细胞核呈蓝色，胶原纤维呈红色，肌纤维呈黄色。

注意事项：

Weigert 氏弹力纤维染色的配制已有许多改变，盐基性复红（碱性品红）可由其它盐基性染料取代，如甲紫、焦油紫（结晶紫）、维多利亚兰等。配制时如将结晶紫 1 克加盐基性复红 1 克，则弹力纤维染成兰绿色；全用甲紫或结晶紫，弹力纤维则呈暗绿色。亦有将染液以酒精加倍稀释，并相应增加盐酸量，之后延长染色时间，染色时间可达数小时甚至过夜，对纤细的弹力纤维显示更好。

试剂配制：

盐基性复红（碱性品红）	1g
间苯二酚（雷锁辛）	4-5g
蒸馏水	200ml
29%三氯化铁水溶液	25ml
95%酒精	200ml
浓盐酸	4ml

先将盐基性复红（碱性品红）溶于 200ml 的蒸馏水中，加入 4-5g 间苯二酚，加温煮沸（不停搅拌），然后加入 25ml 的 29%三氯化铁水溶液，继续搅拌煮沸 2-5 分钟，冷却后过滤倾去滤液，将滤纸及沉淀物置于温箱中烘干。而后将滤纸和干燥的沉淀物一并投入烧杯，加 200ml 95%酒精，小心隔水加热，徐徐搅拌使沉淀溶解，然后弃去滤纸冷却后，补足因加热蒸发的酒精。最后加入 4ml 的盐酸即可应用。（对苯二酚可代替间苯二酚）。

2. Verhoeff 氏弹力纤维染色法：

操作方法：

- (1) 切片常规脱蜡。
- (2) Verhoeff 染液 15-60 分钟。
- (3) 以 2%三氯化铁分化（镜下控制）。
- (4) 水洗再以 95%酒精洗去碘。
- (5) 流水洗。
- (6) 以苏木素-伊红或 Ven Geison 氏染液复染。
- (7) 脱水、透明、封固。

结果：弹力纤维蓝黑色，其它组织视复染而定。

注意事项：这种染色法染液配制简单，但对微细弹力纤维不如 Weigert 氏效果好。

试剂配制：

将 1 克苏木素加热溶于 20ml 的无水酒精，冷却后，加 1%三氯化铁水溶液 8ml 搅拌；再加入 8ml 的 Lugol 碘液（碘 1 克，碘化钾 2 克，蒸馏水 100ml）搅拌混合而成。染液仅可存放 2-3 周。

第二节 脂类染色法

脂肪和类脂（磷脂、糖脂、固醇脂等）统称为脂类。它是构成人体组织的正常成分，不溶于水而易溶于酒精、乙醚、氯仿等脂溶剂中。在化学组成上，脂类属于脂肪酸的酯或与这些酯有关的物质。脂类的主要功能是氧化供能。

脂肪主要存积于脂肪组织中，并以油滴状的微粒存在脂肪细胞浆内。

在病理检验中，脂类染色法最常用以证明脂肪变性，脂肪栓子以及肿瘤的鉴别。脂类染色使用最广泛的染料是苏丹染料，最常用的有苏丹III，苏丹IV，苏丹黑及油红O等。脂肪被染色，实际上是苏丹染料被脂肪溶解吸附而呈现染料的颜色。经研究认为组织中脂质在液态或半液态时，对苏丹染料着色效果最好。根据这一原理，适当提高温度（37℃-60℃）对组织切片染色效果是有好处的。

脂类染色，用冰冻或石蜡切片，以水溶性封固剂封固，如甘油明胶和阿拉伯糖胶等。

一、 苏丹III(Sudan III)染色法：

操作方法：

- (1) 固定于 10%甲醛的组织。
- (2) 水洗后采用冰冻或石蜡切片。
- (3) 经蒸馏水后，浸染于 Harris 苏木素 或明矾苏木素中淡染 1-2 分钟。
- (4) 自来水冲洗。
- (5) 水洗后，移入 70%酒精 5 秒钟。
- (6) 投入苏丹III染液里约 30 分钟或更长时间，置于 56℃温箱中。
- (7) 在 70%酒精中洗涤 5-10 秒钟。
- (8) 洗于蒸馏水中，然后将切片移于载玻片上。
- (9) 切片移于玻片上，将切片周围的水分小心擦掉。
- (10) 甘油明胶封固。

结果：脂肪呈橙红色或鲜红色或黑色，胆脂素呈淡红色，脂肪酸不着色，细胞核呈蓝色。

试剂配制:

1. 苏丹III染液配法: 将 0.15 克苏丹III溶解于 100ml 70%酒精或纯丙酮和 70%酒精混合液中 (各 50ml), 临用时过滤, 所得滤液即为饱和浓度。

注: 浸染时, 容器必须盖好, 否则酒精或丙酮挥发, 染料沉淀。

2. 甘油明胶配制:

明胶	40g
蒸馏水	210ml
甘油	250ml
石碳酸结晶	5ml

先将明胶浸入蒸馏水中 2 小时或更长时间, 然后加甘油和石碳酸, 加热 15 分钟, 摇搅直至混合液均匀为止。

二、苏丹IV (Sudan IV) 染色法:

苏丹IV又名猩红, 是苏丹III的衍生物, 作为脂肪染剂, 经各地实验证明, 其结果优于苏丹III。

其染色步骤与苏丹III染法完全相同, 从略。

试剂配制:

将 1-2 克猩红染剂加纯酒精 70ml, 10%氢氧化钠 20ml, 蒸馏水 10ml, 制成混合液, 以微火加热, 置 37℃温箱中 1 小时, 取出冷却后过滤, 12 小时后即可使用。

注: 此液 5 天内失效, 如此看来, 浪费较大, 建议配制 70%酒精饱和液, 或纯丙酮和 70%酒精饱和液, 它们使用方便, 且不易失效。

结果: 脂肪呈猩红色, 比苏丹III更为清晰。

三、油红染色法:

油红作为脂肪染色剂，其染色步骤简便，染色结果肯定，并且优于苏丹IV。

试剂配制：

油红 O	0.5g
异丙醇（含量 98%）	100ml

此为油红饱和液，可长期保存备用。

染色步骤：

- (1) 冻切片
- (2) 蒸馏水充分洗涤。
- (3) 油红稀释液染 10-15 分钟，避光、密封。油红稀释液的配制：
- (4) 取油红饱和液 6 毫升，加蒸馏水 4 毫升，静置 5-10 分钟后过滤后使用。
- (5) 60%乙醇镜下分化至间质清晰。
- (6) 水洗。
- (7) Marry 氏苏木素复染核。
- (8) 水洗。
- (9) 甘油或甘油明胶封片。

结果：脂肪呈鲜红色，细胞核呈蓝色，间质无色。

注意事项：

1. 油红染色时应避免试剂挥发过多，否则易形成背景沉淀。
2. 60%乙醇分化，应于镜下控制至脂肪组织呈鲜红色，间质无色时为度。

第三节 糖原及粘液染色法

糖原又名肝糖，它贮藏于肝细胞及肌细胞浆中，其形状为大小不等的颗粒，遇碘则变褐色，易溶于水，

机体坏死后，糖原即受到破坏，因此须采取新鲜标本，并及时固定。糖原不等于糖类，只是糖类的一种。

糖类从组织化学技术的角度分类与生物化学的分类并非一致。从组织化学的角度，糖类可略分为多糖、中性糖液物质和酸性粘液物质及粘蛋白和粘脂质。

多糖主指糖原，是由许多葡萄糖分子以糖苷键组成的聚合物。当机体死亡，即很快分解为葡萄糖。

一、过碘酸—Schiff 氏法（简称 P.A.S）

操作方法：

- (1) 石蜡切片脱蜡至水。
- (2) 0.5%过碘酸水溶液 5 分钟。或 1%过碘酸 95%酒精溶液（过碘酸再结晶应重新配制使用）。
- (3) 蒸馏水洗，70%酒精洗。
- (4) Schiff 氏液 15-30 分钟。（Schiff 氏液从冰箱取出升至室温使用）
- (5) 流水冲洗 10 分钟。
- (6) 苏木素浸染细胞核 2-3 分钟。
- (7) 脱水、透明、封盖。

结果：糖原呈红色，细胞核呈蓝色。

试剂配制：

- (1) 0.5%过碘酸（ HIO_4 ）水溶液或 70%酒精溶液。
- (2) Schiff 氏试剂。

碱性品红	1g
蒸馏水	200ml
1N 盐酸（98.3ml 比重 1.16 盐酸，加入蒸馏水成 1000ml）	20ml
偏重亚硫酸钠或钾	1g

碱性品红 1g 加入 200ml 蒸馏水，搅拌加热沸腾，待冷却至 50℃过滤，加入当量盐酸至 25℃时加入偏重亚硫酸钠。置于暗处，两天后溶液变桔黄色或草黄色，然后加入少量活性炭并震荡、过滤，此时溶液应无色。保存冰箱备用。溶液如显浅红色或草黄色，染色效果较差。

注意事项：

1、糖原的固定要及时，而且标本要新鲜。

2、如用无水酒精作糖原的固定剂，有它的弊病，因无水酒精渗透较慢，而且容易产生极化，（极化是糖原颗粒趋向于细胞的一端）。故用 Gendre 氏固定液效果较佳，其配法如下：

苦味酸饱和于 95%酒精	85ml
40% 甲醛	10ml
冰醋酸	5ml

3、各种试剂必须化学纯，亚硫酸钠须有浓厚气味，器皿必须洁净而干燥，染色缸亦是。

4、如果 Schiff 氏试剂，在经过活性炭吸附漂白后不显无色，首先应考虑试剂中的偏重亚硫酸钠是否失效。如果偏重亚硫酸钠气味不浓，使用时可考虑适当的增加用量。其次考虑碱性品红本身，常常虽属同一生产厂家，但不同批号，其效果就可能不同，应特别引起注意。

二、粘液染色法：

粘液一般有以下几点特性：

- (1) 对盐基性染料有亲合力，因此在 HE 染色中、切片上的粘液呈污秽蓝色。
- (2) 对某种盐基性人工合成染料如硫堇或甲苯胺蓝有异染性。
- (3) 遇醋酸发生沉淀，胃粘蛋白则除外。
- (4) 溶于弱碱溶液。

常用的粘液染色有以下几种：

1、P. A. S 染色法：

操作方法同前，结果；中性粘液性物质，某些酸性粘液物质呈红色，核呈蓝色。

2、AB/P.A.S 染色法：

该方法的特点是能同时显示出酸性和中性粘液物质。

操作方法：

- (1) 切片常规脱蜡入水。
- (2) 3%醋酸液洗2分钟，入1%阿利新兰醋酸液（PH2.5）10-20分钟。
- (3) 蒸馏水洗。
- (4) 按P.A.S染色程序。
- (5) 苏木素淡染2-3分钟，水洗。
- (6) 常规脱水、封片。

结果：酸性粘液呈蓝色，中性粘液呈红色，混合性粘液呈紫色，细胞核呈淡蓝色。

3、高铁二胺（HID）/AB染色法：

该方法的特点是能同时显示酸性粘液和硫酸粘液物质。

操作方法：

- (1) 切片常规脱蜡入水。
- (2) 入高铁二胺溶液反应18-24小时（或37℃过夜）。
- (3) 蒸馏水洗。
- (4) 接AB（PH2.5）染色程序。
- (5) 常规脱水封片。

结果：酸性粘液物质呈蓝色，硫酸粘液呈棕黑色。

试剂配制：

(1) 1%阿利新兰醋酸液（PH2.5）

阿利新兰	1g
冰醋酸	3ml
蒸馏水	97ml

(2) 高铁二胺（HID）液

二甲基间苯二胺二盐酸盐	1.2g
二甲基对苯二胺二盐酸盐	0.2g
40%氯化铁	1.4ml
蒸馏水	50ml

临用时新配。溶液PH值1.5-1.6

第四节 色素染色法

色素分为人为色素和自生性色素。人为色素是由于固定剂与组织中某些成分相作用而产生。例如福尔马林色素，这种色素在切片染色前可以酒精苦味酸或氢氧化钠水溶液处理除去；而含有升汞固定液所产生的汞色素则可用碘处理除去，含铬酸盐固定而产生的黄色沉着物则可用酸酒精处理除去。

在某些病理情况下，细胞代谢所产生和沉着的色素，如脂褐素、黑色素、含铁血黄素、嗜铬、嗜银颗粒及组织内的微量金属离子等，则需要一些特殊染色加以证明。

一、含铁血黄素染色法：

在慢性淤血的脏器组织内常有含铁血黄素沉着，一般易于同其它色素鉴别，但在不易区分的情况下可作铁反应加以证明。

Perls氏普鲁氏兰反应：

- (1) 石蜡切片脱蜡至水。
- (2) 蒸馏水洗。
- (3) 2%亚铁氰化钾（或钠）、2%盐酸等量混合液（用前混合）处理15-20分钟。

- (4) 蒸馏水洗。
- (5) 脱水、透明、封固。

结果：含铁血黄素呈蓝色（蓝黑色）。

二、黑色素染色法：

黑色素是深褐至黑色的颗粒状色素，常见于皮肤色素细胞，恶性黑色素瘤。组织内大量存在时呈棕黑色，易于鉴别。但量少时则需用特殊染色来显示鉴别。

黑色素不能为有机溶剂溶解，但易于用强氧化剂漂白而脱色。另外，黑色素本身具有还原银液的能力。因此，用氨银可以将组织中的黑色素显示黑色。通过铁反应也可将其呈暗蓝色而显示出来。

Fontana 氏染色法：

操作方法：

- (1) 固定于 10% 甲醛的组织还能用含铬盐的固定液。
- (2) 石蜡切片。
- (3) 染色前一般步骤，按照常规进行。
- (4) 置切片于蒸馏水中充分洗涤。
- (5) 投入下列溶液中，并置于暗处 12-18 小时。

在 5% 硝酸银水溶液中滴加氨水，至其沉淀被溶解，然后再加 5% 硝酸银水溶液数滴，至溶液呈混浊为度。此液最好临用新鲜配制。

- (6) 用蒸馏水洗 2 分钟。
- (7) 以 0.2% 氯化金水溶液增色 5-10 分钟。
- (8) 用蒸馏水洗。
- (9) 投入 5% 硫代硫酸钠 2 分钟。
- (10) 自来水洗。
- (11) 如需复杂，可用苏木素—伊红染色法。
- (12) 酒精脱水、二甲苯透明、树胶封固。

结果：黑色素呈黑色。

注意事项：

- (1) Perls 氏溶液临用前新鲜配制，不宜久存再用。
- (2) Perls 染色过程中，应避免用生锈及其它可能造成铁质的普通水洗，而应用蒸馏水洗。
- (3) Fontana 氏染色法，切片在氨银溶液中浸染时，需在镜下来鉴别褐控制染色时间，以黑色素呈黑色为度，时间过长，会将脂褐素，橙色血质均染成黑色。
- (4) 一般应另用一张切片进行脱黑色素对照。

附：脱黑色素方法：

- (1) 切片常规脱蜡入水。
- (2) 入 0.1%-0.25% 高锰酸钾水溶液内 2-4 小时，水洗再用 1% 草酸水溶液漂白水洗。或用氯化钾 1 克，70% 酒精 50 毫升，浓盐酸 1 毫升，混合脱色液处理 2-3 小时。镜下控制以细胞内外黑色素完全消失为度。
- (3) 充分脱水。
- (5) 常规脱水封片。

第五节 神经组织染色

神经组织主要由神经元（神经细胞）和神经胶质细胞以及神经胶质纤维组成。

神经元是由细胞体和胞突（树突和轴突）构成。细胞浆内除含有一般细胞器——线粒体、高尔基体、溶酶体以及类脂质、色素外，更主要特征是神经原纤维和尼氏小体。

神经胶质分神经胶质细胞和神经胶质纤维。神经胶质细胞广泛分布于中枢及周围神经系统，由星形胶质

细胞，少突胶质细胞和小胶质细胞几种，它们分别担负着支持作用，并参与代谢活动与修复功能。

神经组织用常规 HE 染色，对细微结构不易显示，对神经纤维，髓鞘则无法区别。常用的特殊显示神经组织的染色有：Roger 氏神经原纤维法：

操作方法：

- (1) 石蜡切片脱蜡至水。
- (2) 将切片投入 2% 氨酒精（2 毫升氨水溶于 100 毫升 95% 酒精）中 12 小时或更长时间，后入 80% 酒精快洗一下。
- (3) 直接由蒸馏水入 40% 硝酸银溶液，在 56°C 温箱内放置 15-20 分钟（此液可以重复用，染色时间与温度有关）。
- (4) 在蒸馏水中洗一下。
- (5) 入 20% 中性甲醛 5 分钟，后入 5% 甲醛。
- (6) 以吸纸吸干，后滴入重氮银溶液 1 分钟。
- (7) 吸干，后放 20% 甲醛 5 分钟，或至切片呈锈橘黄色。
- (8) 用蒸馏水洗，再放入 0.2% 氯化金中 15 分钟，或至切片呈灰色。
- (9) 用蒸馏水洗，后固定于 5% 硫代硫酸钠中 1/2 分钟。
- (10) 常规脱水、封固。

结果：神经原纤维呈黑色。

2、重氮银溶液配法：

在 20ml 120% 硝酸银中滴入氨水，待至所产生的沉淀溶解为止，后加入 10 滴氨水和 20ml 蒸馏水。

第六节 核酸及核蛋白染色体

一、Feulgen 氏染色法：

该方法是显示 DNA 的一种常用方法。其基本原理是在酸水解下，去 DNA 中的嘌呤，使脱氧核酸的醛基暴露出来，然后再与 Schiff 氏试剂反应，生成紫红色产物，用于显微分光光度计和流式细胞测量计对细胞进行静态 DNA 测量和流式细胞测量。

操作方式：

- (1) 切片常规脱蜡至水。
- (2) 蒸馏水洗，1NHCl 水溶液稍洗。
- (3) 浸入 1NHCl 水溶液 60°C，8-10 分钟。
- (4) 取出后，1NHCl 水溶液稍洗，蒸馏水洗数次。
- (5) 入 Schiff 氏液中室温下，暗环境 30-90 分钟。
- (6) 流水冲洗数分钟。
- (7) 常规脱水、封片。

结果：DNA 呈紫红色。

注意事项：

- 1、1NHCL、Schiff 液的配制方法见前。
- 2、该染色的优劣很关键。在于组织的固定。用甲醇 85ml，福尔马林 10ml，冰醋酸 5ml 配制的固定液效果很好。此外 1NHCL 液中酸化时间需严格控制。
- 3、5% 亮绿淡复染，使胞浆及其它组织呈绿色。

二、核仁组成区蛋白显示法 (PLOTON 改良法)

核仁组成区 (Nucleolar Organier regions, NORS) 是转录核糖体 RNA (rRNA) 的染色体片断并与嗜银酸性非组蛋白有关。核糖体 RNA 基因直接控制着核糖体和蛋白质的合成，因此，计数细胞内的 AgNORS 的数量可反映细胞增殖的情况。经典的方法是经 Plotor 改进的银染法。

操作方法：

- (1) 切片脱蜡入水。
- (2) 蒸馏水洗。
- (3) 去离子水洗。
- (4) 切片至 ploton 氏银液中室温下，暗环境 60-90 分钟。
- (5) 去离子水洗。
- (6) 蒸馏水洗。

(7) 常规脱水封片。

结果：AgNORS 位于细胞核内呈黑色的颗粒状。

试剂的配制：

1、1%甲酸、2%明胶溶液(甲液)

甲酸 1ml

明胶 2g

去离子水 100ml

2、50%硝酸银(乙液)

硝酸银 50g

去离子水 100ml

3、ploton 氏银溶液

将甲液与乙液按 1:2 的比例于临用前混为 ploton 氏银溶液。

注意事项：

1、所用器皿需经酸缸清洗。

2、甲液配制时，应先按 1% 的浓度配制好甲酸液，再以此作为溶液溶解明胶。

3、有人用双蒸水替代去离子水也可达到上述效果。

4、银染后，用 0.1% 氯化金调色 1-3 秒，可使背景变清，效果更佳。

第七节 肌肉组织染色法

Mallory 氏磷钨酸苏木素染法(简称 P、T、A)

操作方法：

(1) 固定于 Zenker 氏固定液的组织，如系 10% 甲醛固定的组织切片，可再经 Zenker 氏液处理，如不处理亦可染色，但其结果欠佳

(2) 石蜡切片 如系 Zenker 氏液固定的组织，或曾经 Zenker 氏液处理过的切片，在染色之前需经 0.5% 碘酒精脱汞，水洗后再经 0.5% 硫代硫酸钠的脱碘。

(3) 经蒸馏水洗后，将切片置于 0.25% 高锰酸钾溶液中 5 分钟。

(4) 经蒸馏水洗后，再将切片置于 5% 草酸溶液中漂白 2 分钟。

(5) 经蒸馏水充分洗涤后，投入 Mallory 氏磷钨酸苏木素染液中 2-4 小时，甚至延长到 18 小时以上。

(6) 直接以 95% 酒精分化。

(7) 纯酒精脱水。

(8) 二甲苯透明，树胶封固。

结果：神经胶质和肌胶质均染蓝色，纤维蛋白亦染蓝色，而细胞间结缔组织纤维则染浅红色或不染色；胶原多呈粉红色，粗弹力纤维有时呈紫蓝色。

配制方法：

Mallory 氏磷钨酸苏木素

磷钨酸 2g

苏木素 0.1g

蒸馏水 100ml

先以 50ml 蒸馏水加热溶解苏木素，再以 50ml 蒸馏水溶解磷钨酸，待苏木素水溶液冷却后混合即可，于 6-12 个月后任其自然成熟，能得最佳的结果。如急用时，可加过氧化氢液 0.2ml，以促其成熟。

Zenker 氏固定液见前固定剂的配法。

第八节 病原微生物染色法

在组织切片上，显示细菌最常用的染色法是 Gram 氏染色法，依据染色性状不同，把细菌分为两大类，Gram 氏阳性细菌和 Gram 氏阴性细菌。

分枝杆菌有脂性被膜，用 Gram 氏染色法染色一般不易着色。为了显示这类杆菌，齐一尼氏石碳酸复红是

最常用的经典染色方法。杆菌着色后，具有抗盐酸酒精的脱色作用，故又称抗酸性杆菌，这类细菌在病理学检验中最多见的是结核杆菌和麻疯杆菌。

结核杆菌呈单个或平行聚合排列。

麻疯杆菌与结核杆菌相似，但较短粗。

螺旋体染色目前仍使用经典的 Levaditi 氏组织块银染法染色。石蜡切片染色则采用 Warthin Starry 氏法。

大部分霉菌虽可在 HE 染色切片中显示出来，但有些则需特殊染色法。如用 P.A.S 显示白色念珠菌，新型隐球菌用 Crocott-Gomori 氏六胺银法。

一、Gram 氏染色法

操作方法：

- (1) 切片常规脱蜡至水。
- (2) 结晶紫液中染 45 秒。
- (3) 自来水洗。
- (4) Gram 氏碘 1 分钟。
- (5) 在碘丙酮中分化(直到切片无色为止)。
- (6) 水冲洗。
- (7) 1%中性红染核 1 分钟。
- (8) 自来水速洗。

常规脱水、透明、封固。

结果：Gram 氏阳性菌呈蓝黑色，Gram 氏阴性菌呈红色。

Gram 氏试剂配制。

1. 结晶紫染液(Lillie 氏)

95%酒精	20ml
结晶紫	2g
草酸铵	1g
蒸馏水	80ml

2. Gram 氏碘液

碘结晶	1g
碘化钾	2g
蒸馏水	300ml

3. 碘丙酮溶液

Lugol 氏碘	2ml
丙酮	98ml

Gram 氏切片染色(改良法)

操作方法：

- (1) 石蜡切片脱蜡常规至水。
- (2) HE 水溶液染色，伊红较正常深。
- (3) 1%结晶紫滴于切片染 5-10 分钟。
- (4) 倾去染液加 Lugol 氏碘液 5-10 分钟。
- (5) 倾去碘液，滤纸稍印干。
- (6) 苯胺二甲苯(1:1)分化至无色。
- (7) 二甲苯洗 2 次。
- (8) 二甲苯透明、树胶封固。

结果：Gram 阳性细菌及纤维素亮蓝色，核兰色，背景淡红色。

试剂配制：

1. 1%龙胆紫或甲紫、结晶紫水溶液。
2. Lugol 氏碘液。

二、齐一尼氏抗酸杆菌染色法(Zienl-Neelson)

齐一尼氏抗酸杆菌染色法是一种传统的经典抗酸染色法，常用来显示结核杆菌、麻疯杆菌。由于染液的加温，可使石碳酸复红进入分枝杆菌内。再用稀酸脱去背景上的多余红色，如用苏木素来染核，杆菌鲜红色对此清晰。

操作方法：

(1) 切片常规脱蜡。
(2) 石碳酸复红染液滴于切片上，置酒精灯上，徐徐加温，使出现蒸气约 5 分钟(或在 60℃下染 30 分钟)冷却 2 分钟。

(3) 水洗。

(4) 1%盐酸酒精分化，切片呈淡桃红色为止(在显微镜下控制)。

(5) 流水洗。

(6) 苏木素或 0.5%次甲蓝水溶液染核。

(7) 常规脱水、透明、封固。

结果：抗酸菌红色，核蓝色。

试剂配制：

Ziehl-Neelsony 氏石碳酸复染液。

碱性品红酒精饱和液(约 5.95%) 10ml

5%石碳酸水溶液 90ml

三、抗酸杆菌的荧光法

在组织切片中大量的抗酸杆菌易于见到，少量时则难于寻找，用荧光法则比齐一尼氏染色易于找到。

操作方法：

(1)切片置入二甲苯，(1 份花生油+2 份二甲苯更好)脱蜡至水。

(2)在金胺，若丹明溶液中 10 分钟(60℃)。

(3)自来水洗。

(4)盐酸酒精分化 2 分钟。

(5)自来水洗。

(6)0.5%高锰酸钾液中 2 分钟。

(7)自来水速洗。

(8)吸水纸吸干。

(9)急速入 80%酒精洗。

(10)吸水纸吸干。

(11)纯酒精。

(12)二甲苯透明，用荧光封固剂或 DPX 及中性树胶封固。

结果：抗酸杆菌一明亮的黄色荧光，背景不染色。

试剂配制：

金胺 O(Auramino O) 1.5g

若丹明 B(Rhodamine B) 0.75g

甘油 75ml

酚结晶(50℃液化) 10ml

蒸馏水 50ml

四、梅毒螺旋体染色法

Levediti 氏组织块整体染色法

(1) 切取 2-4mm 厚的组织块在 10%福尔马林中固定 24 小时。

(2) 流水冲洗。

(3) 95%酒精 24 小时。

(4) 蒸馏水洗至组织下沉为止。

(5) 2%硝酸银溶液(暗处)每日换一次，3-4 天。

(6) 置于焦性没食子酸—福尔马林还原剂 1-2 天(焦性没食子酸 4 克，福尔马林 5ml 加水至 100ml)。

(7) 洗于蒸馏水。

(8) 石蜡切片 5 微米，脱蜡、封固。

结果：螺旋体黑色，背景褐色。

五、铬酸 P、A、S(真菌类染色)

(1)石蜡切片 2-3 微米，脱蜡常规至水。

(2)4%铬酸氧化 1 小时。

(3)流水冲洗 5 分钟，蒸馏水洗 2 分钟。

- (4)冷雪夫氏(Cold Schiff)液, 15-20 分钟。
- (5)0.5%偏重亚硫酸钠水溶液 5 分钟(更换 2 次)。
- (6)水洗 5 分钟。
- (7)蒸馏水洗, 至 70%酒精洗 2 分钟。
- (8)醛复红染液 30 分钟。
- (9)95%酒精洗(洗去多余染料)。
- (10)蒸馏水洗, 入淡绿染液 30 秒钟。
- (11)蒸馏水速洗(镜下观察)。
- (12)曲霉菌、念球菌属、细胞浆菌属、隐球菌属为红紫色。曲霉菌丝周边紫红色, 弹力纤维紫色, 背景绿色。

六、病毒包涵体染色法

1、Mann 氏甲基蓝伊红染色法

Mann 氏甲基蓝伊红染色法, 是一种病毒包涵体的染色法, 在 HE 染色切片上包涵体就能显示出来, 用这一染色法则更清楚。

操作方法:

- (1)切片脱蜡至水。
- (2)用 Mann 氏染液染色 8-24 小时(染液要新配制)。
- (3)蒸馏水洗。
- (4)用碱性酒精分化(40%氢氧化钠 2-3 滴, 无水酒精 100ml)约 30 秒钟。
- (5)两酮速脱水。
- (6)二甲苯透明、封固。

结果: Negri 氏小体红色。

试剂配制:

Mann 氏染液。

1%甲基兰水溶液	6ml
1%伊红水溶液	6ml
蒸馏水	28ml

2、Nacchiavello 氏染色

- (1)切片脱蜡至水。
- (2)以 0.25%碱性品红水溶液染色 30 分钟。
- (3)用 0.5%柠檬酸分化约 3 秒钟。
- (4)自来水洗。
- (5)用 1%亚甲兰作对比染色 15-30 分钟。
- (6)水洗。
- (7)脱水、透明、封固。

结果: 包涵体、立克次氏体均染红色, 其余组织呈蓝色。

(成启明、高友晶、刘丽江)

第九节 特殊染色技术的应用

现代病理学中免疫组织化学技术、电子显微镜技术以及其它细胞及分子生物学技术应用日益广泛, 但由于这些技术要求一定的实验条件以及所需的试剂价格较为昂贵, 对于一部分病人以及某一些基层医院是比较难以接受的。而组织化学技术则具有无需复杂的实验条件以及较为昂贵的试剂操作又比较简单的优势, 在临床病理学诊断中具有重要的应用价值。比如, 当细胞中出现色素, 是黑色素还是含铁血黄素以及当组织中出现均一化学物质是否为淀粉类物质等, 用组织化学技术区别起来很简单, 所以组织化学技术, 虽然已有几十年到几百年的历史, 仍是一个很有实用价值的技术。

组织化学染色的方法很多, 我们仅介绍几种常用的组织化学染色在病理诊断中的应用。

一、胶原纤维的染色

凡是间叶组织细胞都可产生网织纤维，也可产生胶原纤维，纤维母细胞是产生胶原纤维的主要细胞。胶原纤维是结缔组织中的主要纤维，是结缔组织中起支持作用的重要部分，具有一定的韧性和坚固性，能抵抗一定的牵引力而不致撕裂。胶原纤维是原胶原互相错开 1/4 平行排列交联成胶原原纤维，胶原原纤维再聚合成较宽的结构。按胶原的化学成分可分为 15 种，间质中的胶原纤维主要由 I、II、III 型胶原组成，新鲜时呈白色，故又称为白纤维。在 HE 染色中呈均一的粉红色，与周围间质区分不是很清楚。染色后，便可明显区别开来，易于观察病变时胶原纤维的变化。

应用：

- (1) 器官硬化性疾病的观察：如肝硬变、心肌瘢痕的观察，胶原染色更易于观察诊断。
- (2) 瘢痕与淀粉样物质鉴别：前者胶原纤维染色为阳性，后者为阴性。
- (3) 骨纤维异常增殖病与骨纤维化的鉴别：利用胶原纤维染色可较易观察前者胶原纤维紊乱，纵横交错，后者较规则。

二、网状纤维染色

网状纤维是非常细而短的纤维，大量堆积时则形成致密的网状，故有网状纤维之称。疏松组织中网状纤维比较少，它多分布在结缔组织与其它组织交界处，如在上皮组织与结缔组织交界处的基膜内，毛细血管周围以及造血器官，内分泌腺的腺细胞团索和外分泌腺的腺末房周围等处均有丰富的网状纤维。

网状纤维的变化，反映了疾病的发生和发展的不同过程，对疾病的诊断有极大意义。网状纤维的多少、粗细紧密、疏松或断裂，都是病理检验的重要指标，尤其是在临床病理诊断中，可根据其存在和分布来鉴别癌与肉瘤。而在 HE 染色标本上，网状纤维不易显色。所以网状纤维的组织化学染色，在临床病理诊断上占着相当重要的位置。

应用：

(1) 癌与肉瘤的鉴别：在网状纤维染色下可清楚显示出肉瘤每一个细胞周围有网状纤维围绕，或似为团状或巢状的瘤组织，但团巢内仍有破碎的网状纤维，癌显示为明显巢或索状，巢内无网状纤维。

(2) 骨基质与浓缩的分泌物、血浆或水肿液的鉴别：骨基质内有网状纤维，而后者无。

(3) 炎症细胞与癌细胞的鉴别：在支气管活检中有时挤压较重，一些深染的细胞挤压成团，难以判断是受挤压的炎症细胞。这种病例染网状纤维有利于鉴别，炎症细胞不成巢，小细胞癌可有巢状或索状结构。

(4) 坏死与死后自溶的鉴别：在胰腺是生前坏死还是死后自溶有时很难鉴别，染网状纤维，前者网状纤维支架破坏较严重，结构塌陷，而后者虽然死后自溶严重，但网状纤维支架结构常可保存。

(5) 血管性肿瘤的鉴别：有时血管内皮细胞瘤与血管周围细胞瘤常规染色较难鉴别，网状纤维染色，可显示清楚的血管结构，看清肿瘤细胞与血管关系有利于鉴别。内皮细胞性肿瘤，肿瘤位于血管壁的网状支架内，而外周细胞则围绕着血管壁或与之呈放射状排列。

(6) 肝硬化及慢性肝炎肝细胞碎片状坏死或纤维化的鉴别：

a. 慢性活动性肝炎坏死灶有时较难辨认，染网状纤维显示局部有网状支架的破坏与崩解，结合 HE 切片较易判断小灶状坏死。

b. 慢性活动性肝炎轻度纤维化，在网状纤维染色下较易判断。

c. 慢性淤血性肝硬变有时较难判断，网状纤维较易观察中央静脉及小叶下静脉通道上的网状纤维增生。增生较明显，有反包围现象，形成假小叶结构，就可诊断淤血性肝硬变。

(7) 萎缩性胃炎的诊断：在 HE 染色胃粘膜有无萎缩较难判断，网状纤维染色可较清楚显示胃粘膜正常结构破坏，间质纤维增生，有助于胃粘膜萎缩的诊断。

(8) 有助于癌浸润的诊断，有些上皮性肿瘤是否早期突破基底膜形成浸润，HE 染色难以确诊，而网状纤维染色可较清楚显示基底膜，较易确定基底膜有无早期浸润破坏现象。

(9) 脑内原发瘤与转移瘤的鉴别：脑内绝大多数肿瘤网状纤维很少，只有血管周围有少量网状纤维，而转移瘤及肉瘤都有明显的网状纤维，故有利于鉴别。

(10) 非干酪性结核与结节病的鉴别：后者结节内及结节周围较早出现明显的网状纤维，观察此有利于二者鉴别。

(11) 淋巴结病变的判断：

a. 良性滤泡性反应性增生与滤泡性淋巴瘤鉴别，染网状纤维后显示：后者滤泡间网状纤维减少且有受挤压现象，前者网状纤维增加且较紊乱。

b. 判断淋巴结的正常结构：有时 HE 切片较难判断正常结构是否完整，染网状纤维。皮髓质及窦的结构较清楚，若为炎症或肿瘤性破坏则较难辨认。

三、弹力纤维染色

弹力纤维是结缔组织发生形成较晚的一种纤维，在创伤修复中一般在4—5周才有较明显的弹力纤维形成。弹力纤维艰固、较小而弹性较大，容易伸展，在结缔组织起弹性作用。弹力纤维由弹性蛋白组成，新鲜时呈黄色又称黄纤维。弹力纤维纤维分枝连成网，折光性强，含量多时在HE染片上呈折光性强的粉红色，量少的不显色。故量多时与胶原纤维不易区别，量少则不能观察。弹力纤维染色主要用于观察弹力纤维有无增生、肿胀、断裂、破碎及萎缩或缺如等病变。

应用：

(1) 动静脉的辨认：在血管病变时是动脉还是静脉以及是否为血管壁难辨认时，弹力纤维染色有助于辨认。有弹力板者为动脉，有弹力纤维构成血管轮廓者为血管。弹力纤维抗损伤能力较强，故弹力性纤维构成血管轮廓不易损坏。

(2) 弹力纤维瘤的诊断：弹力纤维染色可见瘤样病变内有大量弹力纤维增生，非真性肿瘤。

(3) 心血管先天性弹力组织增生，这组疾病有先天性内膜炎及冠状动脉的弹力纤维组织增生。弹力纤维染色有助于诊断。

(4) 弹力纤维损伤性疾病：这组疾病有肺气肿、动脉粥样硬化、大动脉中层炎症等，弹力纤维染色有助于这些疾病的观察诊断。

(5) 一些与弹力纤维变化有关的皮肤疾病的诊断与鉴别诊断：这组疾病有皮肤松弛症，萎缩性硬化性苔藓等，其诊断与鉴别诊断常依赖于弹力纤维染色，以观察弹力纤维变化。

四、脂质染色

脂肪和类脂统称为脂类，它是构成机体的正常成份，脂肪主要积于脂肪组织中，并以油滴状的微粒存在于脂肪细胞胞浆内。因脂肪溶于酒精，故在HE染色中则被溶解掉，因此对某些疾病不能判断，所以必须进行脂肪染色。

应用：

(1) 心、脑、肾等组织器官的脂肪栓塞，脂肪染色即可判定栓子是否为脂肪滴。

(2) 心脏、肝脏等脂肪变性：脂肪染色可显示变性细胞内的脂滴。

(3) 脂肪肉瘤与其它间叶组织的恶性肿瘤的鉴别：脂肪染色即可显示脂肪肉瘤瘤细胞内产生的脂滴。

五、糖类染色

糖类从组织化学技术角度来分，可分为多糖、中性粘液物质、酸性粘液物质、粘蛋白及粘脂质。多糖主要指糖原，它是一种胶样液态存在于肝细胞、骨骼肌、心肌等处。因糖原在肝脏及心肌疾患及某些肿瘤的病变中分布和量都有一定改变，故糖原的染色在临床病理诊断上具有重要意义。

(1) 肝及心肌糖原沉着症的诊断：糖原染色显示在肝或心肌细胞内有大量糖原存在即可确诊。

(2) 糖尿病性肾小球硬化症或血管病的诊断。

(3) 高雪氏病与尼曼——匹克氏病的鉴别：前者为阳性、后者为阴性，做此染色较易鉴别。

(4) 骨肉瘤或尤文氏肉瘤的诊断：此瘤80%细胞内有较多糖原，糖原染色为阳性，所以糖原染色为阳性（大多数细胞）可以协助诊断。

(5) 腺泡状软组织肉瘤与化感瘤：前者棒状小体糖原染色为阳性。

(6) 间皮瘤或滑膜肉瘤与其它癌的鉴别：前者分泌含透明质酸的粘液，糖原染色为阳性，但透明质酸酶消化后即呈阴性反应，如有此染色特点，即可有助于诊断滑膜肉瘤或间皮瘤而不是癌。

六、粘液染色

粘液从组织源上分上皮细胞分泌性及结缔组织粘液性两种。粘液染色能有助于某些疾病的诊断。

应用：

(1) 水肿与粘液变性：皮肤真皮水肿与粘液变性有时较难以从组织学上区别，染粘液有助于鉴别。

(2) 硬皮病与硬肿病的鉴别：后者胶原纤维增生，纤维之间粘液阳性物质增多，有助于这两者之间的鉴别。

别。

(3) 粘液细胞癌的诊断与鉴别：胃活检时，印戒细胞与黄瘤细胞或泡沫细胞不易鉴别，染粘液即可确定是否为印戒细胞。

(4) 胃癌分型：有人将胃癌分为肠型及胃型，这种分型与流行病、年龄及预后有一定关系，利用 AB/PBS 染色，胃癌细胞分泌中性粘液为胃型，分泌酸性粘液为肠型。

七、色素染色（含铁血黄素及黑色素）

含铁血黄素是由漏出于血管外的红细胞，被巨噬细胞吞噬后，分解血红蛋白产生的颗粒，HE 染色为棕黄色，故称为含铁血黄素。因有时与福尔马林沉渣及黑色素等难相区别，故做含铁血黄素染色。

应用：

主要用于同其它色素鉴别，若为阳性，显示陈旧性出血。

黑色素常见于皮肤色素细胞，恶性黑色素瘤常可产生黑色素。组织内大量存在时呈棕黑色，易于鉴别。但少量存在时便难与其它色素相鉴别，须作黑色素染色。

应用：

(1) 黑色素瘤的诊断与鉴别诊断：肿瘤细胞内色素是否为黑色素，染黑色素有助于确定黑色素性质及肿瘤的定性诊断。

(2) 血色病与黑便病：真皮内有色素沉着，黑色素阴性而含铁血黄素阳性者可能为前者。

八、神经原纤维染色

神经原纤维呈细线状，存在于神经细胞体及树突中，它们形成一个稠密的网状，轴突中的原纤维也互相交织在一起，且伸延至轴突全长。在 HE 染色中呈粉红色，难与胶原纤维相区别，故须作神经纤维染色。

应用：

(1) 有利于观察神经原纤维的损伤。

(2) 神经系统肿瘤的诊断与鉴别诊断：如神经母细胞瘤与未分化癌的区别等。

九、病原微生物染色

真菌和霉菌

真菌引起的病变虽然多种多样，但都不具有特异性，且真菌在 HE 染色中均显蓝色，故须作真菌染色。

应用：

在化脓性炎、坏死性化脓性炎及肉芽组织性化脓性炎或化脓性炎伴有巨细胞反应疑为霉菌感染时，找到霉菌的菌丝、孢子及菌体即诊断为霉菌性炎。

细菌

细菌在 HE 染色上不能分类，故须作细菌染色。

应用：

(1) 一些疑为细菌感染性炎症，可用细菌染色进一步确定病原诊断。如伤寒肉芽肿性炎或葡萄球菌性炎等化脓性炎症的诊断中细菌染色有很重要的诊断价值。

(2) 风病与结核病：均由菌体表面含蜡质膜的抗酸杆菌所感染形成，故须经抗酸染色才能着色，从而与其它疾病相鉴别。

第二篇 免疫组织化学技术 及亲和免疫组织化学技术

第一章 免疫组织化学技术

第一节 基本原理

免疫组织化学技术是应用免疫学基本原理——抗原抗体反应，对组织或细胞内抗原或抗体物质定性和定位的组织化学技术。

免疫组织化学技术按照标记物的种类可分为免疫荧光法、免疫酶法，免疫铁蛋白法。

免疫金法及放射免疫自影法等。用于病理诊断的主要有免疫荧光法和免疫酶法。免疫荧光法是现代生物学和医学中广泛应用的方法之一，包括荧光抗体和荧光抗原技术，具有抗原抗体反应的特异性，染色技术的快速性，在细胞或组织上定位的准确性，以及荧光效应的灵敏性等优势。但是，由于免疫荧光法必须具有荧光显微镜，荧光强度随时间的延长而逐渐消退，结果不易长期保存等缺点，在普及应用上受到一定限制，而逐渐被免疫酶法所取代。

一、免疫荧光法

免疫荧光法的基本原理是将已知的抗体或抗原分子标记上荧光素，当与其相对应的抗原或抗体起反应时，在形成的复合物上就带有一定量的荧光素，在荧光显微镜下就可以看见发出荧光的抗原抗体结合部位，检测出抗原或抗体。常用的荧光素有①异硫氰酸荧光素（fluorecein isothiocyante, FITC），为黄色、橙黄色或褐色结晶粉末，有两种异构体，易溶于水和酒精等溶剂。分子量为 389，最大吸收光谱为 490~495，最大发射光谱为 520~530nm，呈现明亮的黄绿色荧光，是最常用的标记抗体的荧光素。②四甲基异氰酸罗达明（tetramethylrhodamine isothiocyante, TRITC）是一种紫红色粉末，较稳定，是罗达明（rhodamine）的衍生物。最大吸收光谱 550nm，最大发射光谱 620nm 呈橙红色荧光，与 FITC 发射的黄绿色荧光对比鲜明，常用于双标记染色。

按照抗原抗体反应的结合步骤，免疫荧光法可分为以下三种。

1. 直接法

用荧光素标记的特异性抗体直接与相应的抗原结合，以检查出相应的抗原成分。

2. 间接法

先用特异性抗体与相应的抗原结合，洗去未结合的抗体，再用荧光素标记的抗特异性抗体（间接荧光抗体）与特异性抗体相结合，形成抗原—特异性抗体—间接荧光抗体的复合物。在此复合物上带有比直接法更多的荧光抗体，所以，此法较直接法灵敏。

3. 补体法

用特异性的抗体和补体的混合液与标本上的抗原反应，补体就结合在抗原抗体复合物上，再用抗补体的荧光抗体与之相结合，就形成了抗原—抗体—补体—抗补体荧光抗体的复合物。荧光显微镜下所见到的发出荧光的部分即是抗原所在的部位。补体法具有敏感性强的优势，同时适用于各种不同种属来源的特异性抗体的标记显示，在各种不同种属动物抗体的检测上为最常用的技术方法。

4. 双重免疫荧光法

在对同一组织细胞标本上需要检测两种抗原时，可进行双重荧光染色，即将两种特异性抗体（例如抗 A 和抗 B）分别以发出不同颜色的荧光素进行标记，抗 A 抗体用异硫氰酸荧光素标记发出黄绿色荧光，抗 B 抗体用四甲基异硫氰酸罗达明标记发出橙红色荧光，将两将荧光抗体按适当比例混合后，加在标本上（直接法）就分别形成抗原抗体复合物，发出黄绿色荧光的即抗 A 抗体结合部位，发出橙红色荧光的即抗 B 抗体结合的部位，这样就明确显示两种抗原的定位。

二、免疫酶法

免疫酶法是借助酶细胞化学等手段显示组织抗原（或抗体）的新技术，是在免疫荧光法的基础上发展起来的。已如前述，免疫荧光法具有操作简便、灵敏、特异性高、省时的优势，但同时也具有令人遗憾的不足，特别是荧光标本不能长期保存以及需要价格昂贵的荧光显微镜才能观察的问题。为此，Nakane 等人（1966）尝试了用酶代替荧光素来标记抗体的方法，从而成功地开创了酶标记抗体的新技术（酶标抗体法）。Sternberger 等人又将非标记抗体过氧化物酶法成功地引入，使免疫酶法有了很大的进步，成为当今使用最为广泛的免疫

组织化学技术。

免疫酶法与免疫荧光法相比较，具有以下优点：酶反应产物呈现的颜色不仅能在一般的普通生物显微镜下观察，而且其产物因具有一定的电子密度也可在电镜下观察（免疫电镜技术），光镜与电镜的结合，使灵敏度进一步提高，标本又能长期保存，并能加设 HE 染色等其他复染，有利于将被检测物质与病变的形态学改变联系起来（定性及定位），弥补了免疫荧光法的不足。

免疫酶法的基本原理与免疫荧光法有所相似，免疫酶法是将酶以共价键的形式结合在抗体上，制成酶标抗体，再借助酶对底物的特异催化作用，生成有色的不溶性产物或具有一定电子密度的颗粒，于光镜或电镜下进行细胞表面或细胞内部各种抗原成分的定位。

从理论上讲，用细胞化学方法能显示的酶，均可用于标记抗体进行免疫酶法染色，但实际上能用于免疫组织化学技术的酶并不多。sternbenger 等人指出：用于标记的酶应具备以下六点：

1. 酶催化的底物必需是特异的，而且容易被显示，即催化反应所形成的产物易于在光镜和电镜下观察。
2. 酶反应的终产物所形成的沉淀必须稳定，即终产物不能从酶活性部位向周围组织弥散，而影响组织学定位。
3. 较易获得纯的酶分子。
4. 中性 PH 值时，酶分子应稳定。
5. 在酶标过程中，酶连接在抗体上，不能影响二者的活性。
6. 被检组织中，不应存在与标记酶相同的内源性酶或类似的物质，否则结果将难以判定。

上述六点中以 1、2 两点最为重要，因为并非所有的容易显示的酶均能形成不溶性的复合物。符合上述要求的，最为常用的酶是辣根过氧化物酶（Horseradish Peroxidase, HRP）。其次是碱性磷酸酶（Alkaline phosphatase, AKP），除此两种外，还有葡萄糖氧化酶（Glucose oxidase, GOD）等，但因其形成的不溶性色素扩散作用较大，在应用上受到很大限制。

HRP 广泛分布于植物界，因其辣根含量最高而得名。它是由无色酶蛋白和深棕色的铁叶结合组成的一种糖蛋白（糖占 18%左右），分子量为 40,000 道尔顿，等电点 3~9，最适 PH 为 5.0 左右。HRP 易溶于水和 58%以下的饱和硫酸铵溶液，其活性部分为铁叶琳，称辅基。酶的蛋白部分无活性。酶蛋白和铁叶琳辅基的最大吸收光谱分别为 275nm 和 403nm；HRP 的纯度用两者的光密度比值（M03 人工卫 75）来衡量，以 RZ（Reinheitzahl）来表示。一般认为，标记酶的 RZ 值为 3.0 左右，不应 < 2.8，RZ 值越小，酶的纯度越差，对于纯度低，质量差的酶，需经纯化后才能使用。

AKP 是一种磷酸酶的水解酶，磷酸单酯酶对于连接于作用物磷酸基上的醇基没有特异性，因它可以水解多种有机磷酸酯，生成醇和磷酸盐离子。该酶在许多人体组织或动物组织中有分布，如肝、胎盘、白细胞、肾、小肠等。AKP 的分子量为 80KD，最适 PH 为 9.8，其活性受底物及浓度、缓冲液及其离子浓度等因素影响，如用二乙醇胺缓冲液（1mol/L, pH 8）对 AICI³⁺ 具有活化作用，酶的活性高，而用甘氨酸—NaOH 缓冲液则对 AKP 有抑制作用。AKP 的活化剂有镁和锰离子，Mg⁺⁺ 的适应浓度为 10mol/L。甘氨酸、柠檬酸盐，EDTA 等对 AKP 有抑制作用。AKP 对温度具有较高的敏感性，从 25℃增加到 35℃，其催化反应速度增加 1.5 倍。当选用不同的底物时，AKP 可催化形成不同颜色的终产物。例如，萘酚—AS—MX 和快蓝（Fast blue, Fb）为底物时生成蓝色产物，可与 HRP 催化的产物形成鲜明的对比，用快红（Fast red）代替快蓝则生成红色不溶性产物，而且内源性 AKP 较易清除，可以较好地避免内源性酶的干扰，使其具备了某些独特的优点而日益备受重视。

GOD 所催化的底物为葡萄糖，电子供体为对硝基蓝四唑（Paranitroblue Tetrazolium），终产物比较稳定，为不溶性的蓝色沉淀。从理论上讲，GOD 较 AKP 和 HRP 为佳，因为哺乳动物组织内不存在内源性葡萄糖氧化酶，这样可以很好地避免内源性酶的干扰。但是，GOD 的分子较 HRP 大三倍，具有较多的氨基，在标记时易形成广泛的聚合，而影响酶的活性。

免疫酶法与免疫荧光法大致相同，也可以分为以下几种。

1. 直接法

用酶标记的特异性抗体直接与标本中的相应抗原反应结合，再与酶的底物作用产生有色的产物，沉积在抗原抗体反应的部位，即可对抗原进行定性、定位以至定量研究。

直接法的第一步是特异的——即酶催化底物的反应，其余步骤则是非特异的，可用各种电子供体介导。

以 HRP 为例, HRP 的底物是巴 H_2O_2 , 在分解已过程中, 与 H_2O_2 形成初级复合物, 无电子供体存在时, 反应不再继续进行, 当电子供体存在时, 反应以一定的速度形成第二种复合物, 继之 HRP 催化 H_2O_2 所形成的中间型产物, 迅速生成水, 酶被还原, 电子供氢体被氧化, 聚合, 再经氧化环化, 最后形成引哚胺多聚体, 于酶反应部位, 形成不溶性棕褐色沉淀, 与组织对比清晰, 达到定位、定性、定量的目的。

直接法简便、快速、特异性强, 非特异性背景反应低。其缺点是, 每种抗原必须分别用其抗体的酶标记物, 且敏感性较间接法低。

2. 间接法

间接法是用未标记的特异性抗体(一抗)与标本中相应抗原反应, 再用抗特异性抗的酶标记抗体与结合在抗原上的一抗(即特异性抗体)反应。例如, 第一次使用的特异性抗体(一抗)是由家兔产生的, 则第二次使用的抗体(二抗)必须是酶标记的抗兔的免疫球蛋白, 常用的羊抗兔 IgG 的酶标记物(即酶标羊抗兔 IgG)。然后与直接法相同, 与底物反应、显色、将抗原的性质, 部位和含量检测出来。

间接法的优点是用一种酶标抗体就可与多种特异性一抗配合而检查多种抗原, 而且敏感性也优于直接法。

3. 酶桥法

酶桥法的建立是免疫酶法重大改进的标志。将用化学交联法将酶与抗体分子结合的技术改进为用酶和酶抗体免疫反应而结合的方法, 避免了由于化学反应过程中对酶活性和抗体效价的不良影响。其基本原理是用酶免疫动物, 制备高效价、特异性强的抗酶抗体, 然后用第二抗体作桥, 将抗酶抗体和特异性的第一抗体(即连结在组织抗原上的抗体)连接起来, 再将酶结合在抗酶抗体上, 经过酶催化底物的显色反应后, 显示出抗原所在的部位及含量。作为桥的第二抗体(即桥抗)必须对特异性抗体(一抗)和酶抗体都具有特异性, 这样才能将二者相连起来, 因此, 一抗和酶抗体应由同一种属动物产生。例如, 特异性抗体和酶抗体都是兔产生的, 再用羊抗兔 IgG 作为桥抗体就能将两者连接起来。在此过程中, 由于任何抗体均未被酶标记, 酶是通过免疫学原理与抗酶抗体结合的, 避免了共价连接对酶活性的影响, 提高了方法的敏感性, 同时也节省了特异性抗体(即一抗)的用量。

酶桥法虽然克服酶标记抗体法的缺点, 较好地保护了抗体和酶的活性, 但是仍存在不足, 其主要表现为①在抗酶抗体的抗血清中, 含有低亲和力和高亲和力两类抗体, 它们作为抗原与抗体结合, 主要依赖于桥抗体对它的亲和力, 而与其本身对酶的亲和力无关, 故两者均可被连接在桥抗体上, 由于低亲和力的抗酶抗体与酶结合较弱, 漂洗时易解离, 使部分酶丢失, 从而降低了方法的敏感性。②抗酶抗体血清中, 亦含有非特异性抗体, 其抗原性与抗酶抗体相同, 所以能与桥抗体结合, 但却不能与酶结合, 这样影响了组织抗原的显示。为解决这些不足, 70 年代初, Sternberg 在各种标记抗体法和酶桥法的基础上, 建立了 PAP 法, 并加以改良, 成为应用最为广泛的免疫组织化学技术之一。

4. PAP 法

PAP 法是酶桥法等基础之上建立的, 其基本原理与酶桥法相似, 都是利用桥抗体将酶连接在第一抗体结合的部位, 所不同的是, 将酶和抗酶抗体制成复合物(PAP)以代替酶桥法中的抗酶抗体和随后结合的酶, 将两个步骤合并为一个步骤, 这一重要的改进, 不仅仅是简化步骤, 而具有更大的优势, 因为 PAP 是由 3 个过氧化物酶分子和 2 个抗酶抗体分子结合形成的一个环形分子, 排列呈五角形结构, 3 个角辣根过氧化物酶(HRP), 另 2 个角为抗 HRP 抗体, 其分子量为 400, 000~430, 000 道尔顿, 直径约为 20.5nm, 这种结构异常稳定, 冲洗时酶分子不会脱落, 从而大大提高了敏感性, Petrali 等报告, PAP 法比酶桥法灵敏度高 20 倍。有人认为是免疫荧光法的 100~1000 倍。

PAP 法应用广泛, 其主要优点为:

①最大限度地保存了抗体活性。因为在所有的反应过程中, 任何抗体均未被酶标记, 避免了标记过程中对抗体活性的损害。

②灵敏度高。由于是多层抗原抗体反应, 由于免疫放大作用, 使得结合在抗原抗体复合物上的酶分子增多, 并且 PAP 法复合物性质结构稳定, 这样与酶底物反应后的呈色反应增强, 使微量的或抗原性弱的抗原显示出来, 提高了灵敏度。

③背景淡。酶桥法中, 酶标记的非特异性抗体可与组织抗原结合, 引起背景染色, 给结果判断带来了很大的困难。PAP 法中, 连接抗体中即使存在着非特异性抗体, 因其不是抗 IgG 的特异性抗体, 故不能与抗 HRP 抗体相结合, 也就不能把 PAP 复合物连接在非特异性抗体上。当然 PAP 复合物内也可存在一些非 HRP 特异

性抗体，假如这部分抗体能够与桥抗体及组织成分相结合，但因其不是抗 HRP 抗体，所以不能与 HRP 结合，也就无酶活性及背景染色。背景越淡，当然越有利于结果的判断。

PAP 法的不足之处是 PAP 的制备较为复杂。

双 PAP 法又称双桥法 (double bridged technique)，是 PAP 法的重要改进，通过两次连接桥抗体和 PAP，在抗原抗体复合物上结合了比 PAP 法更多的酶分子，可提高敏感性达 20~50 倍。一般认为，双 PAP 法通过下述途径来提高敏感性，①重复的桥抗体与 PAP 中的抗 HRP 抗体的抗原未饱和位置结合，再连接 PAP 复合物，即在抗原之处，抗体间形成更大的抗原抗体复合物，具有多个酶分子，使免疫染色增强。②重复的桥抗体，与特异性的第一抗体未饱和抗原相结合，使第一抗体上结合较多的桥抗体和 PAP 复合物，起到放大作用。双 PAP 法的不足之处是步骤多，需时长，在实际操作中，可能会带来非特异性放大的问题而影响结果的判断。

5. APAAP 法

APAAP——碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase antialkaline phosphatase, APAAP) 法是 Mason 和 Moir(1983)等在 PAP 法的基础上，用 AKP 替代 HRP 而建立的一种方法，都属于未标记抗体桥联法。APAAP 法与 PAP 一样，利用桥抗体将 AKP 连接在第一抗体的结合部位，而 AKP 和抗 AKP 抗体被制成复合物 (APAAP)，通过 APAAP 复合物中的 AKP 催化底物显色以显示抗原物质。

APAAP 法的主要优点：

- (1) 在内源性的过氧化物酶较高的组织中进行免疫组织化学染色时，APAAP 法较 PAP 法具有更多的优势，仅需稍加处理就能消除内源性酶的干扰，而 PAP 法则困难较大。
- (2) 敏感性与 PAP 法大致相似。
- (3) 在血、骨髓、脱落细胞涂片的免疫细胞化学染色上具有 PAP 法不能替代的优势。
- (4) 反应稳定，着色清楚，背景淡。

三、免疫金银法

免疫金银法 (Immurogold-silver method, IGSM) 或称免疫金银染色 (Immurogold-silver staining, IGSS) 是一种新的免疫组织化学技术，近年来又不断改进，已成为最为灵敏而又经济的方法之一。免疫金银法实际上是在免疫金法的基础之上发展形成。

免疫金和免疫金银法都是利用胶体金作为标记物。胶体金系指金的水溶胶，溶胶是一种物质以大或小的微小粒子分散在另一种物质中所形成的体系，被分散的物质叫分散相，容纳分散相的物质叫分散介质。按分散相离子的大小可将分散体系分为三种，相分散体系 (分散相粒子直径大于 10nm)；胶体分散体系 (分散相粒子直径在 1~100 nm 之间)；低分子一离子分散体系 (分散相粒子直径 < 1 nm)。胶体金属于胶体分散体系，是指金以微小的粒子分散在水中所形成的金溶胶。溶胶的颜色取决于分散相物质的颜色，对同一种物质的溶胶而言，粒子大小不同，颜色也不同。若粒子为 20-40nm 的金溶胶因主要吸收波长为 530nm 的绿光而呈深红色，60nm 的金溶胶因主要吸收波长为 600nm 的橙黄色光而呈紫蓝色。在光镜水平应用的胶体金粒直径不能小于 10nm，否则无可见的红色。

1. 免疫金法是将用胶体金 (直径 > 20 nm) 标记的间接抗体或 A 蛋白再与特异性抗体结合，在光镜下就可可见红色的反应物出现，不需进行呈色反应。但该方法要求金标抗体浓度高，因此，价格昂贵，既不经济同时也不够敏感。

2. 免疫金银染色 (IGSS) 是在免疫金染色的基础上，在对苯二酚存在的情况下，通过含银离子的显影液中的还原反应，使在抗原抗体反应部位的金粒子周围形成很多沉淀层，光镜下就可看到阳性反应部位呈清晰的棕黑色，从而显示不易被光镜定位的金粒，显示出组织中抗原的部位。这种方法不仅提高灵敏度，同时金标记抗体可以稀释 10 倍以上后应用，此外还可避免使用具有致癌危险的有机色素。

IGSS 法的主要优点是：

- (1) 敏感性高。与其他的免疫组织化学技术相比，IGSS 法被认为是最敏感的方法，尤其适合于只含微量抗原的组织标本。
- (2) 应用范围广。IGSS 法不仅可以在冰冻切片，细胞涂片以及培养细胞、石蜡切片上进行光镜观察，而且还能应用于树脂包埋的切片的电镜观察，并且能准确定位抗原。

- (3) 定位准确。IGSS 法的银颗粒沉积在搞原体反应部位，一般无扩散，定位较为准确。
- (4) 方法简便、安全、成本低、经济、同时标本也可以长期保存。
- (5) 用醋酸银代替硝酸银和乳酸银，不仅保持了原有方法的敏感性、特异性、低背景、对比度好的特点，而且整个显影过程可以在常光下进行，从而弥补了在暗室显色的不足。

IGSS 法的主要问题是非特异性背景，由于其非特异性背景染色影响了 IGSS 法在常规免疫组织化学鉴别诊断上的应用。但若能较好地控制染色的各关键环节，如特异性抗体的纯度，特异性；切片的消化以及显影液的配制和显影时间的控制等，能较好地解决这一问题。

第二节 染色步骤

一、免疫荧光法

1. 直接法

- (1) 冰冻切片、涂片、印片或单层细胞培养物按要求进行固定，石蜡切片常规脱蜡后用酶消化处理，然后水化，用 0.01mol/L PH7.2---7.4PBS 洗 5 分钟，冷风吹干，放入湿盒中。
- (2) 滴加经稀释的荧光抗体，37℃ 30-60 分钟或 4℃ 过夜
- (3) PBS 洗 2 次，蒸馏水洗 1 次
- (4) 50%甘油缓冲液封片
- (5) 荧光显微镜下检查
- (6) 对照染色

①阳性对照，用已经证实的含有靶抗原的组织切片与待检标本同样处理，结果应为阳性。②阴性对照，用确知不存在靶抗原的组织切片与待检标本同样处理，结果应为阴性。③空白对照，用免去特异性抗体或用 PBS 替代特异性抗体，结果应为阴性。④抑制试验，将标记抗体(例荧光抗体)和未标记的抗体或血清等量混合后，按上述步骤处理切片，结果应为阴性（一步法）。或将待检切片两张，一张加未标记特异性血清，另一张加未标记同种正常血清，孵育后冲洗，再加入标记的特异性血清（例如特异性荧光标记抗体），加了未标记特异性血清的切片因抗原抗体已结合，故染色被抑制，呈阴性结果，而加同种正常血清的切片则呈阳性反应（二步法）。

对照染色非常重要，开始试验时应做全面对照，每次试验时应做阳性和阴性对照。

2. 间接法

- (1) 标本处理同直接法。
- (2) 滴加适当稀释的特异性抗体于标本上，置湿盒中，37℃ 30~60 分钟或 4℃ 过夜。
- (3) 滴加适当稀释的间接荧光抗体，置湿盒中，37℃ 30~60 分钟。
- (5) PBS 洗 2 次，双蒸水洗 1 次。
- (6) 甘油缓冲液封片，荧光显微镜下观察。
- (7) 对照染色：可用空白对照和阴性对照等。

3. 补体法

- (1) 标本处理同直接法。
- (2) 滴加适当稀释的特异性抗体及补体的等量混合液，置湿盒中，37℃ 30 分钟，PBS 洗 3 次。
- (3) 滴加适当稀释的抗补体荧光抗体，置理盒中，37℃ 30 分钟。PBS 洗 2 次，蒸馏水洗 1 次。
- (4) 甘油缓冲液封片。
- (5) 对照染色，可作正常血清替代，灭活补体对照即经 56℃ 30 分钟灭活处理后，将灭活的补体与特异性抗体等量混合，进行染色，结果均应为阴性。

4. 双重免疫荧光法

在同一标本上有两种抗原需要直接显示时，可用不同的荧光素分别标记抗体进行染色。

一步法双染色：先将两种标记抗体按适当比例混合，按直接法步骤进行。

二步法双染色：先用一个标记抗体孵育，不必洗，再用另一个标记抗体孵育，按间接法步骤进行。

5. 注意事项

(1) 免疫荧光法最适宜进行冰冻切片的染色, 因为此种切片一般抗原保存得较好。若是石蜡切片则应首先选用免疫酶法等染色技术。

(2) 使用商品的荧光标记抗体, 在进行染色前应作抗体效价的测定, 找出合适的稀释度后再进行成批染色。一般而言, 在阳性物质发出明亮荧光而背景又较暗时的稀释度是较为合适的。高稀释度的荧光抗体可以减少非特异性着色使染色结果更具特异性, 但稀释度过高会导致假阴性的出现。低稀释度的荧光抗体使结果较易观察, 但会带来非特异性的着色, 甚至出现假阳性的结果。

(3) 非特异荧光的消除。非特异性荧光的消除方法较多。一般而言, 冰冻切片的非特异性荧光较强, 石蜡切片的非特异性荧光较弱。常用的方法有①先用非免疫血清如 10% 牛血清等处理切片, 然后再行荧光染色。②用小鼠相应组织的干粉吸收荧光抗体中的非特异性成分。③选择合适的稀释度和切片。④选用高特异性和高效价的荧光抗体。

(4) 洗涤要彻底。每道程序都有用蒸馏水或缓冲液洗涤以清除残留在切片中的试剂, 以达到特异着色的目的。洗涤时不论是冲洗还是振荡洗涤, 其基本原则是要达到洗涤干净的目的, 或者说充分稀释上一道程序中的试剂, 使其含量降至最低。一般只要有足够的时间, 以静置延长每次洗涤时间为宜, 这是防止脱片的较好办法。洗涤液的 PH 值应为 7.2~7.4 之间, 过高过低的不利于染色过程, 尤其是在偏碱的 PH 值条件下。

(5) 孵育时间与温度。免疫荧光法一般孵育温度在 37℃, 时间为 20—30 分钟时是最佳时间与温度。当然, 也与抗体的效价, 组织抗原的含量与部位, 切片的厚度等有关。

二、免疫酶法

免疫酶法的最大优势是特别适用于石蜡切片的染色, 并且用一般光学显微镜就能观察, 定位也较荧光显微镜下精确。

1. 直接法

- (1) 组织切片常规脱蜡入水。
- (2) 胰酶或胃蛋白酶消化, 37℃ 0.5—2 小时。水洗。
- (3) 0.3% H₂O₂ 甲醇液 (封闭内源性酶) 10—15 分钟。冰冻切片、细胞涂片从此步骤开始。
- (4) 水洗后经 PBS 洗 1—2 次。
- (5) 正常血清或牛血清白蛋白孵育 15 分钟。室温。
- (6) 甩掉覆盖在切片上的上述 (5) 血清, 加酶标记抗体, 37℃ 30 分钟。置湿盒内。
- (7) PBS 洗 3 次。
- (8) 显色。在酶的底物溶液中於显微镜下观察控制呈色反应, 以结果清晰, 背景无非特异性染色为度。
- (9) 自来水充分冲洗。
- (10) 需要时用 Mayer' s 苏木素复染胞核。
- (11) 封片。若用 DAB 等呈色, 可经酒精脱水, 二甲苯透明, 树脂封片。若用 AEC 等则不能用酒精脱水, 用吸水纸去周围组织多余的水份, 直接将水溶性封片剂 (例如明胶甘油) 封片。
- (12) 对照染色。直接法应有严格的对照染色。可设空白对照、阳性对照及抑制试验。(方法见前)。

2. 间接法

- (1) ~ (5) 同直接法。
- (6) 甩掉正常血清滴加适当稀释度的特异性抗体, 37℃, 30—60 分钟 4℃ 过夜, 置湿盒中。
- (7) PBS 洗 3 次。
- (8) 滴加适当稀释的酶标抗体 (例如羊抗兔 GHRP 标记抗体, 此时特异性抗体应为兔源性的抗体) 于标本上, 室温或 37℃ 30 分钟。
- (9) PBS 洗 3 次。
- (10) 以后步骤同直接法。

3. 酶桥法

- (1) ~ (5) 同直接法。

- (6) 滴加适当稀释的特异性抗体（如兔抗人 IgG）4℃16—24 小时。置湿盒中。
- (7) PBS 洗 3 次。
- (8) 加桥抗体（如羊抗兔 IgG），用 5% 正常人血清稀释可消除交叉染色，室温或 37℃30 分钟。
- (9) PBS 洗 3 次。
- (10) 加兔抗酶抗体（如兔抗 HRP 抗体）37℃30 分钟置湿盒中。
- (11) PBS 洗 3 次。
- (12) 加酶溶液（如 HRP50—100ug/ml），室温 30 分钟置湿盒中。
- (13) PBS 洗 3 次，双蒸水洗 1 次。
- (14) 用酶底物显色（如 DAB+过氧化氢），在显微镜下控制显色过程。余同直接法。

4. PAP 法

- (1) —— (5) 同直接法
- (6) 滴加适当稀释的特异性抗体（小鼠抗人 IgG，即鼠单抗）37℃30——60 分钟或 4℃过夜，置湿盒中。
- (7) PBS 洗。
- (8) 加兔抗小鼠 IgG 抗体，37℃30 分钟。
- (9) PBS 洗 3 次。
- (10) 加 PAP 抗体（鼠 PAP 抗体）37℃30——40 分钟。
- (11) PBS 洗 3 次。
- (12) 同直接法。

5. 双 PAP 法

- (1) 同 PAP 法 (1) — (11)。
- (2) 重复第二抗体即兔抗小鼠 IgG 抗体，但稀释度是前次的一倍，37℃ 30 分钟置湿盒中。
- (3) PBS 洗 3 次。
- (4) 重复 PAP 抗体即鼠 PAP 抗体，同样，稀释度也应比前次大一倍，37℃ 30 分钟置湿盒中。
- (5) PBS 充分洗 3 次。
- (6) 同直接法。

6. APAAP 法

- (1) 冰冻切片或细胞涂片用 PBS 浸泡 3 分钟，石蜡切片常规脱蜡后胰酶消化，PBS 洗 3 次。
- (2) 正常羊血清（1: 10——50）室温 20 分钟。
- (3) 适当稀释的特异性抗体，37℃60 分钟，或 4℃过夜。
- (4) PBS 洗 3 次。
- (5) 桥抗体（如羊抗鼠或羊抗兔 IgG1: 100——200），37℃40 分钟或室温 1 小时。
- (6) PBS 洗 3 次。
- (7) 滴加适当稀释的 APAAP 复合物，37℃30 分钟。
- (8) PBS 洗 3 次。
- (9) 滴加（或浸入）AKP 底物溶液，37℃15——30 分钟，阳性结果显现清晰后流水冲洗。
- (10) 复染（核固红或苏木素或甲基绿）1——2 分钟，常规冲洗后，甘油明胶封片。

7. 注意事项

(1) 免疫酶最适宜进行石蜡切片的染色，为回顾性研究创造了条件。对保存时间较长的石蜡标本或在制作石蜡块的过程中抗原成分丢失或被封闭的组织，酶的消化是非常重要的。应根据组织及抗原的情况选择适当的胰酶浓度进行消化。最常用的为 0.1~0.5% 胰蛋白酶和 0.4% 的胃蛋白酶。

(2) 除直接法，特别是酶桥法和双 PAP 法，由于步骤较多，每步骤间的冲洗就显得非常重要，常常是导致染色失败或结果不理想的主要原因。

(3) 各级抗体的稀释度是染色成败的关键。一般而言，特异性一抗的稀释度应尽可能高，桥抗体的浓度要足够，酶标抗体或抗酶抗体的稀释度要适中。

(4) 用 HRP 作为标记酶，要注意封闭内源性的 HRP 的干扰，若封闭效果不理想，也可以将 H₂O₂ 甲醇作用于切片的步骤移至特异性的抗体孵育之后进行，或两次封闭，即切片消化之后和加桥抗体之前。

三、免疫金银法

1. 免疫金法 (IGS)

- (1) 切片常规脱蜡入水。
- (2) 0.05M TBS PH7.4 洗 10 分钟。
- (3) 1%卵蛋白作用切片 15 分钟。
- (4) 滴加特异性一抗, 室温 2 小时后 4℃过夜。
- (5) 0.5M TBS PH7.4 洗 3 次。
- (6) 0.02M TBS PH7.4(内含 0.1%牛血清白蛋白)5 分钟。
- (7) 1% 孵蛋白作用切片 15 分钟。
- (8) 胶体金标记 SPA (葡萄球菌 A 蛋白, 详见亲和免疫细胞化学技术一章) 室温孵育 1~2 小时。
- (9) 0.02M TBS PH7.4 洗 3 次。
- (10) 双蒸水洗 2 次。
- (11) 1%戊二醛 10 分钟。
- (12) 双蒸水洗 3 次。
- (13) 复染、封片、观察。

结果: 胶体金结合部位呈鲜樱红色。

2. 免疫金银法

- (1) 切片常规脱蜡入水。
- (2) 经含汞固定液固定的组织切片需经 0.5%碘酒精脱汞, 然后入 0.5%硫代硫酸钠水溶液脱碘, 再用流水冲洗 10 分钟, 蒸馏水洗后入 0.05M TBS PH7.4 液冲洗。
- (3) 抗原性较弱的组织切片, 需经 0.1%胰蛋白酶液消化, 37℃ 30 分钟, 抗原性较强的组织可免去此步骤。
- (4) 正常羊血清 (1: 5 或 1: 10) 作用 10 分钟, 吸去, 不洗涤。
- (5) 滴加适当稀释的特异性抗体 37℃ 30—60 分钟或 4℃过夜, 室温复温 2 小时。
- (6) 0.05M TBS PH7.4 液洗 3 次。
- (7) 0.02M TBS PH7.2 液洗 3 次。
- (8) 正常羊血清 (1: 5) 10 分钟, 吸去, 不洗涤。
- (9) 滴加适当稀释的金标记抗体 (如金标记羊抗兔 IgG 抗体, 此时特异性抗体为兔源性) 室温下 1 小时后 4℃过夜。
- (10) 0.02M TBS PH8.2 液洗 3 次。
- (11) 0.05M TBS PH7.2 液洗 3 次。
- (12) 蒸馏水洗 2 次, 双蒸水洗 2 次。
- (13) 入银显影液中 3—5 分钟或阿拉伯胶银液中 20—40 分钟, 反应过程需避光。
- (14) 蒸馏水洗。
- (15) 自来水冲洗, 苏木素淡复染。
- (16) 脱水、透明、封片、观察。

结果: 特异性抗体结合部位呈灰黑色颗粒, 背景呈清灰色, 核呈淡蓝色。

3. 注意事项

- (1) 染色过程中若用标记葡萄球菌 A 蛋白代替金标记间接抗体, 需用 1%卵蛋白处理切片。0.02M TBS 均为 PH7.4。若用金标记间接抗体, 则用正常羊血清处理切片, 0.02MTBS 应为 PH8.2, 要注意 PH 值变化时的良好过渡, 不可直接由蒸馏水入 PH8.2 的 TBS, 应经 PH7.4 过渡。
- (2) 对不经含汞液固定的组织, 若也经碘液的处理, 有作者认为染色结果更为满意。
- (3) 切片入银显影液应避光, 最好是在暗室内用红色安全灯监测染色反应强度。显影液用重蒸水配制反应速度很快, 用阿拉伯胶配制则反应速度较慢, 容易掌握。

第三节 常用试剂的配制

一、缓冲液

1. 0.01MPBS(PH7.2)液

NaCl	8g
Na ₂ HPO ₄	1.15g
KH ₂ PO ₄	0.2g (NaH ₂ PO ₄)
加双蒸水至	1000ml

2. 0.05MTBS(PH7.4)液

Tris(三羟甲基氨基甲烷)	12.1g
Nacl	17.5g
加双蒸水至	1500ml

在搅拌下加浓 HCL 至 PH7.4, 再加双蒸水至 2000ml。

3. 0.02MTBS (PH8.2) 液

Tris	4.84g
Nacl	17.5g
BSA	2.0g
NaN ₃	1.0g
加双蒸水至	1500ml

在搅拌下加浓 HCL 至 PH8.2, 再加双蒸水至 2000ml。

(BSA—牛血清白蛋白; NaN₃—叠氮钠, 为防腐剂)。

4. 0.05MTB 液 (PH7.6)

先配制 0.05MTB 液:

Tris	60.75g
1N HCL	约 420ml
双蒸水	至 1000ml

配制方法: 先以少量双蒸水 (300ml) 溶解 Tris, 加入 HCL 后, 再用 1N HCL 或 1N NaOH 将 PH 值调至 7.6, 再加双蒸水至 1000ml。

用时将 0.5MTB 稀释 10 倍, 即为 0.05MTB 液 (PH7.6) 液。

5. 0.05M 醋酸缓冲液 (PH3.5)

先配制 0.1M 的醋酸和醋酸钠溶液

0.1M 醋酸液:

冰醋酸	5.75ml
双蒸水	加至 1000ml

0.1M 醋酸钠液:

醋酸钠	13.61g
双蒸水	1000ml

再配制 0.1M 醋酸缓冲液:

0.1M 醋酸	210ml	} 混合即可
0.1M 醋酸钠	790ml	

用时将 0.1M 的醋酸缓冲液稀释 5 倍, 即为 0.05M 醋酸缓冲液 (PH5.2)。

6. 枸橼酸缓冲液

(1) PH3.5

枸橼酸	2.55g
枸橼酸钠	2.35g
双蒸水	加至 100ml

(2) PH6.0

21.01g 枸橼酸加入蒸馏水 1000ml 0.1M 枸橼酸

29.41g 枸橼酸钠加入蒸馏水 1000ml 0.1M 枸橼酸钠

使用时取 0.1M 枸橼酸 9ml 和 0.1M 枸橼酸钠 41ml, 再加入蒸馏水 450ml, 即配成 0.01M 的枸橼酸缓冲液 (PH6.0±0.1)。用于微波修复抗原时。

二、显色液

1. DAB (Diaminobenzidine) 显色液

DAB (3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐)	50mg
0.05MTB(或 0.01MPBS)	100ml
30% H ₂ O ₂	30~40 μ l

配制方法: 先以少量 0.05MTB (或 0.01MPBS) 溶解 DAB, 充分溶解后加入剩余的 TB 或 PBS, 摇匀后 (避光) 过滤, 显色前加入 30% H₂O₂, 宁少勿多, 便于掌握反应过程。阳性为棕黄色颗粒。

DAB 有致癌作用, 操作时应格外小心, 避免直接与皮肤接触, 用后的器皿应充分冲洗, 用后的 DAB 液不应冲入下水道, 应集中深埋或清洁液处理后弃之。

2. AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) 显色液

AEC (3-氨基-9-乙基卡巴唑)	20 mg
二甲酰胺 (DMF)	2.5 ml
0.05M 醋酸缓冲液 (PH5.5)	50 ml
30% H ₂ O ₂	25 μ l

配制方法: 先将 AEC 溶于 DMF 中, 再加入醋酸缓冲液充分混匀。临显色前加入 30% H₂O₂ 液。镜下控制显色时间。阳性为深红色颗粒。

3. 4-氯-1 萘酚 (4-CL-1-NapHthol) 显色液

4-氯-1 萘酚	100 mg
无水乙醇	10 ml
0.05MTB (PH7.6)	190ml
30% H ₂ O ₂	10 μ l

配制方法: 先将 4-氯-1 萘酚溶于无水乙醇中, 然后再加入 TB190ml, 用前加入 30%H₂O₂, 显色时间 5~20 分钟。阳性结果为蓝或深蓝色。

4. α-萘酚显色液 (1)

α-萘酚 AS-BI 磷酸盐	1 mg
坚固红 TR 盐	2mg
底物缓冲液	2ml
二甲基甲酰胺 (DMF)	40 μ l

配制方法: 先将 α-萘酚 AS-BI 磷酸盐溶于 40 μ l DMF 中, 再加入底物缓冲液 2l, 临用前 10 分钟加坚固红 TR 盐。

底物缓冲液 (PH8.2~8.3)

0.2M Tris	50ml
0.1M HCL	40ml
Mg ₂ CL-6 H ₂ O	20.3mg
左旋咪唑	20.4mg
双蒸水 加至	100ml

结果为玫瑰红色, 若在底物显色液中用坚固兰 BB 盐代替坚固红 TR 盐, 终产物为深蓝色。

5. α-萘酚显色液 (2)

α-萘酚 AS-BI 磷酸盐	5mg
DMF	0.05ml
丙二醇缓冲液 (0.05M, PH9.8)	5ml

坚牢蓝 BB 2mg

配制方法：先将 α -萘酚溶于 DMF 中，然后加入丙二醇缓冲液，临用前加入坚牢蓝 BB，溶解过滤后使用。
丙二醇缓冲液（储备液）

2mol/L:

2-氨基-2-甲基-1,3 丙二醇 35.64g

6mol/L HCL 32ml

0.005M MgCl₂ 4ml

左旋咪唑 480mg

双蒸水 加至 200ml

用 HCL 或 NaOH 调 PH 至 9.8。

取上述储备液 1ml 用双蒸水稀释至 40ml 备用。

阳性结果为蓝色颗粒。

6. α -萘酚显色液（3）

α -萘酚 15mg

DMF 0.5ml

坚固蓝 BB 盐 30mg

0.05M Tris-HCL(PH9.1) 50ml

左旋咪唑 12mg

配制方法：先将 α -萘酚溶于 DMF 中，加入坚固蓝，再加入 Tris-HCL 缓冲液，最后加入左旋咪唑，完全溶解过滤后立即使用。显色为 37°C，15~30 分钟，用 0.1% 中性红复染 30 秒~1 分钟自来水冲洗，丙酮分化 5 秒钟，流水冲洗。

阳性结果为蓝色，细胞核为红色或紫色。

银显色液

(1) 硝酸银显色液

① 2% 明胶（或 25% 阿拉伯胶水溶液） 60ml

② 枸橼酸缓冲液（PH3.5） 10ml

③ 对苯二酚 1.7g 加双蒸水至 10ml

④ 硝酸银 50mg 加双蒸水至 2ml

①~③液用前依次混合，最后加入④液，注意避光。

(2) 乳酸银显色液

① 20% 阿拉伯胶 60ml

② 枸橼酸缓冲液（PH3.5） 10ml

③ 对苯二酚 0.85g/15ml

④ 乳酸银 110mg/15ml

以上①~③液用前依次混合，最后加入④液，注意避光。

上述两种显色液的 25% 阿拉伯胶可用双蒸水代替，但此时反应明显加快，要在镜下密切观察。

(3) 醋酸银显色液

① 硝酸银 100mg/50ml 双蒸水

② 10% 明胶 10ml

③ 枸橼酸缓冲液（PH3.5） 1.7g 加双蒸水至 10ml

④ 对苯二酚 600mg

配制方法：将对苯二酚溶于③液，然后将②③液混合过滤，再加入①液。

三、酶消化液

1. 0.1% 胰蛋白酶

胰蛋白酶 100mg

0.1% 氯化钙（PH7.8） 100ml

配制方法：先配制 0.1%氯化钙，用 0.1M 的 NaOH 将其 PH 值调至 7.8，然后加入胰蛋白酶充分溶解。用前将胰蛋白酶消化液在水溶中预热至 37°C，消化时间 10~30 分钟。

2. 0.4%胃蛋白酶

胃蛋白酶	400mg
0.1N HCL	100ml

配制方法：先配制 0.1N HCL，然后将胃蛋白酶充分溶解，预热至 37°C 后使用，消化时间 30 分钟左右。

四、粘合剂

1. 铬矾明胶液

铬矾（或甲铬矾）	0.5g
明矾（Gelatine）	5g
蒸馏水	1000ml

配制方法：先将少许蒸馏水溶解铬矾（硫酸铬钾）后，再加入明胶及蒸馏水，于 70°C 水溶液中胶溶化后置电动磁力搅拌器上，持续搅拌均匀，如有沉渣可过滤后使用。

将清洁的载玻片置上述液体中浸泡数分钟后，烤干备用，可防止脱片。

2. 甲醛明胶液

40%甲醛	2.5ml
明胶	0.5g
蒸馏水	至 100ml

配制方法：将少许蒸馏水（约 80ml）将明胶加热溶解，待完全溶解后，加入甲醛，最后补充蒸馏水至 100ml 备用。用法同铬矾明胶液。

3. APES 液

APES	1ml
丙酮	50ml

配制方法：取 APES 1ml，加丙酮 50ml，充分搅拌均匀备用。将清洁的载玻片放入 APES 液中 20~30 秒后，取出，用丙酮液洗去多余的 APES 液，注意不要留有气泡，晾干备用。经该方法处理的玻片具有良好的防脱片能力。

4. 多聚赖氨酸液

多聚赖氨酸（Poly-L-Lysine）	1ml
蒸馏水	10ml

配制方法：取市售 Poly-L-Lysine 1ml，加入蒸馏水 10ml，置塑料容器中，将清洁的玻片放入该液中 5 分钟，取出放置无尘干燥箱中晾干备用或 60°C 干燥箱烤干备用。所需容器不能用玻璃制品。经该方法处理的玻片具有很强的粘合能力。但价格较 APES 贵得多。

五、封固剂

1. 缓冲甘油

纯甘油（分析纯）	20ml
0.5M 碳酸缓冲液（PH9.5）	20ml

配制方法：取纯甘油 20ml，加入碳酸缓冲液 20ml，充分混合，待气泡完全消失后，即可使用。

2. 甘油-TBS（PBS）

纯甘油	90ml
0.01MTBS	10ml
纯甘油	75ml
0.01MPBS	25ml

配制方法：按上述比例将甘油和 TBS（PBS）充分混合后，置 4°C 静置，待气泡完全消失后，即可使用。

3. 甘油明胶

明胶	10g
甘油	10ml

蒸馏水	100ml
麝香草酚	少许

配制方法：称取 10g 明胶于温热（40℃）的蒸馏水中，充分溶解后过滤，再加入 12ml 甘油混合均匀。少许麝香草酚是为了防腐。

4. 液体石蜡

液体石蜡因含杂质少，很少引起非特异性荧光，故常用于免疫荧光时标本的封固。

5. DPX

Distrene	10g
酞酸二丁酯	5ml
二甲苯	35ml

DPX 为中性封固剂，用于多种染色方法均不易褪色，但使组织收缩较明显，故应尽量使其为均匀的一薄层。

六、复染剂

1. Mayer 氏苏木素

配制方法详见第一篇第四章第四节。

2. 甲基绿

甲基绿	2g
蒸馏水	100ml

复染后水洗数次，常规脱水封片。

3. 核固红

核固红	0.1g
硫酸铝	15g
蒸馏水	100ml

配制方法：将核固红溶于 15%硫酸铝水溶液中，加热溶解，冷却过滤后备用。复染后用流水冲洗数分钟后，常规脱水封片。

（刘丽江）

第二章 亲和免疫组织化学技术

亲和免疫组织化学技术（affinity immunohistochemistry）是一种将亲和细胞化学和免疫细胞化学结合起来的技术。亲和细胞化学（affinity cytochemistry）是一种利用两种物质之间高度亲和能力而相互结合的化学反应。亲和物质往往是一些有双价或多价结合能力的物质，可与多种物质结合而形成复合物，不但亲和物质之间有高度亲和力，而且与可作为标记物的荧光素、酶、同位素以及铁蛋白、胶体金等结合，从而可利用显微镜来进行观察，这种亲和反应一方面不同于组织化学反应中的分解、置换、氧化与还原，另一方面也不是抗原抗体的棉衣反应。因此，Bayer（1976）首次将之称为亲和组织化学。免疫组织化学是利用抗原抗体反应的免疫学方法，再结合组织化学的呈色反应的技术，从广义的角度看，抗原抗体反应也是一种物质间的相互亲和，免疫组织化学是一种特殊的亲和组织化学。将一些亲和物质引入免疫细胞化学，提高了细胞化学的定位专一性，并且使敏感性也进一步提高，同时也能降低非特异性反应。因此，更有利于微量抗原（或抗体）在细胞或亚细胞水平上的定位。

第一节 亲和免疫组织化学技术的基本原理

一、卵蛋白和生物素免疫染色

很早以前，人们就注意到给动物喂饲大量鸡蛋蛋白时，可引起明显的“维生素 H 缺乏症”。经研究发现，在鸡蛋蛋白中含有一种碱性蛋白质，分子量约为 68,000，属于糖蛋白一类。当时命名为卵白素（Avidin）。卵白素具有 4 个由 128 个氨基酸组成的相同亚基，与生物素（又称维生素 H）以及其他物质（例如荧光素和酶）具有很高的亲和力。当动物被饲以大量鸡蛋蛋白时，由于卵白素将大量的维生素 H 结合所致动物出现维生素缺乏。卵白素在一般条件下性质稳定，可耐受 80℃ 两分钟而仍保持其活性，当与生物素结合形成复合物后，性

质就更稳定，可在很大的 PH 范围内以及对许多蛋白酶都有耐受能力。

生物素（维生素 H，Biotin）是 Kögl 等（1936）首先从鸡蛋黄中分离出来的。它还广泛地分布于动、植物组织中，并以辅酶的形式参与各种羟化酶反应。生物素为一种较小分子量的维生素，其分子量约为 244，它与卵白素之间具有高度极强的亲和力，较之抗原与抗体的亲和力高出 100 万倍，能够彼此牢固地结合而不影响彼此的生物学活性。

由于卵白素和亲和素之间具有高度的亲和性，生物素可与抗体偶联，不论生物素还是卵白素均能与酶（过氧化物）结合并不影响酶的活性，这样就将亲和化学和免疫细胞化学结合起来而形成卵白素-生物素免疫染色技术。

卵白素和生物素用语免疫细胞化学标记技术只要有以下几种形式。

1. 标记卵白素-生物素（Labeled avidinbiotin, LAB）技术，是将活化的生物素（即利用生物素的羧基加以化学修饰后的可制成各种基团的衍生物）和免疫球蛋白等共价偶联后，加入与荧光或过氧化物酶结合的卵白素，利用生物素和卵白素的亲和结合，显示生物素偶联的物质（即抗原）。

2. 桥式卵白素---生物素（bridged avidin biotin BRAB）技术，是利用卵白素作为桥梁，连接生物素偶联物质和生物素化的过氧化物酶，而显示于生物素偶联的物质。

上述两种方法均须以生物素标记第一抗体（即特异性抗体），应用有一定的困难和局限。

3. 卵白素—生物素---过氧化物酶复合物（Avidin-biotin peroxidase complex, ABC）技术，该技术是由 1981 年 Hsu 等在 LAB 和 BRAB 的基础上，改良进行建立的。现将卵白素和生物素偶联的过氧化物酶按一定的比例组合成卵白素—生物素---过氧化物酶复合物，从而保证卵白素有一定的游离结合点让生物素偶联物质结合。由于一个卵白素分子具有可与生物素结合的 4 各位点，其中一部分可与生物素标记的过氧化物酶结合，另一部分具有可与生物素标记的免疫球蛋白反应，生物素通过氨基与抗体或过氧化物酶分子相结合，一个过氧化物酶或免疫球蛋白可以结合多个生物素分子，从而增强了免疫球蛋白或过氧化物酶结合卵白素的能力，这样卵白素就可作为桥梁，把生物素抗体结合物及生物素酶结合物连接起来就有可能偶合更多的酶分子，并且这种相互作用的连接能形成一种较大的类似晶体的复合物，从而大大提高了酶染色的灵敏度。

因此，ABC 技术具有以下优势：

- （1） 敏感性高。Hsu 等应用 ABC 法与 PAP 法相比发现其敏感性较 PAP 法高 20—40 倍，能显示 PAP 法所不能显示的抗原。
- （2） 特异性高。由于敏感性提高，第一抗体和第二抗体都可被稀释至尽可能高的浓度，减少了非特异性染色，背景淡。
- （3） 方法简便。由于卵白素和生物素间的极高亲和能力，使得结合时间可明显缩短，符合物的制备是操作简便。
- （4） 由于生物素和卵白素具有和多种示踪物高度亲和的能力，可用于双重或多重免疫染色。

二、葡萄球菌 A 蛋白免疫染色

葡萄球菌 A 蛋白（staphylococcal protein A, SPA）是一种从金黄色葡萄球菌壁上分离的蛋白质。早在 1940 年，Verwey 发现在某些金黄色葡萄球菌中，含有一种物质，在双向扩散实验中能与正常人血清形成沉淀。Jensen（1952）也发现了类似现象，并将其命名为 A 抗原。其后分离并证明了这种物质是一种蛋白质，为了与 A 多糖相区别，Crov（1960）将其命名为葡萄球菌 A 蛋白，简称 SPA 或蛋白 A。由于 SPA 的一些免疫特性，引起了很多免疫学家的兴趣，并迅速发展为免疫学上一种极为有用的工具。

SPA 存在于大多数（90%）金黄色葡萄球菌中，而不存在于表皮葡萄球菌中，SPA 为蛋白质成分，仅含少量或不含碳水化合物，其分子是一个单链多肽，由亮、缬、脯、丙、苏、甘、丝、谷、赖和门冬氨酸等 10 种氨基酸组成，整个分子不含胱氨酸合半胱氨酸，故部含二硫键。分子量因提取方法不同而异，用脱氧核糖核酸消化细胞壁后超速离心或用加热抽提法，所测分子量为 12,000—15,000。用沉淀平衡分析和在 6M 鸟嘌呤盐酸盐重凝胶过滤，测出分子量为 42,000。SPA 的粘度高于球蛋白，等电点为 PH5.1，其天然结构十分文，即使用尿素、硫氰酸盐和酸等处理也不影响其活性。

SPA 的单链多肽分子上，含 3 个高度相似的 Fc 段结合量区，每区由 50 个以上氨基酸组成。能与任何多种哺乳动物血清 IgG 分子中的 Fc 段结合，能起反应的哺乳动物包括豚鼠、小鼠（纯种）、狗、猪、猴和经免疫的家兔。一般而言，SPA 只与人的 IgG₁、IgG₂ 和 IgG₄ 结合，结合部位经证实为 CH₂ 和 CH₃ 交界处。人血

清中少数 IgA 和 IgM 也可与 SPA 反应。

SPA 与 IgG 结合的部位是 Fc 段而不是 Fab 段，这样就不会影响抗体的活性。同时，SPA 的结合力是双价的，每个 SPA 分子可以同时结合两个 IgG 分子，也可一方面与 IgG 相结合，一方面与标记物如荧光素、过氧化物酶、胶体金和铁蛋白等相结合。而且结合后并不影响上述物质的活性。SPA 的这一特性，使其成为抗体和标记物之间的纽带，充当了亲和细胞化学与免疫细胞化学相结合的又一重要角色。

SPA 在免疫组织化学重的主要作用有：

1. 标记 SPA 定位组织内的 IgG 由于 SPA 能与 IgG Fc 段结合，因此就成为天然的抗 IgG。用荧光素或酶标记的 SPA 可代替荧光素或酶标记的 IgG 抗血清，直接检测定位组织的内 IgG 和免疫物。
2. 标记 SPA 替代第二抗体 利用 SPA 与多种 IgG 分子 Fc 段的高度亲和结合的能力，可用标记的 SPA 替代的二抗体。由于器具由于多种动物抗血清反应的能力，则不需因不同种属动物而制备相应的第二抗体（即桥抗体）。同时由于 SPA 与 Fc 段的高度亲和力，可高度稀释 SPA，减少非特异性背景着色。
3. 作为桥抗体用于 PAP 法 SPA 作为桥抗体的最大优点是不受种属特异性的限制，SPA 不仅能与多种动物的第一抗体反应，也能与不同的 PAP 复合物反应，这样，当特异性一抗为鼠源性，利用 SPA 的特点，可连接上兔源性的 PAP 复合物，而不必只能连接鼠源性 PAP 复合物，是应用的范围明显拓宽了。此外，由于 SPA 与 Fc 段的结合是亲和反应，而不是抗原抗体的免疫反应，因而反应的速度极为迅速，大大减少了实验时间，降低了实验的难度。
4. 用于双标记技术 SPA 可与其他免疫组织化学技术相结合而用于双标记技术，从而同时检测组织中的两种抗原。
5. 用于免疫电镜 应用 SPA 与胶体金和铁蛋白相结合，可在电镜水平检查抗原抗体反应的定位。

三、凝集素免疫染色

凝集素（Lectins）是指一种从各种植物、无脊柱动物和角高等动物中提纯的糖蛋白或结合糖的蛋白。因其能凝集红血球（含血型物质），故名凝集素。常用的为植物凝集素，通常一起被提取的植物命名，如刀豆素 A (concanvalina, conA), 麦芽素 (wheat germ agglutinin, WGA), 植物凝集素 (phytohemagglutinin, PHA), 花生凝集素 (peanut agglutinin, PNA), 黄豆素 (soybean agglutinin, SBA), 荆豆素 (Ulex europeaus agglutinin, UEA) 等，凝集素是他们的总称。凝集素不是来源或参与免疫反应的产物，但却具有某些亲和特性，能被免疫细胞化学技术所应用。

大多数植物凝集素是多聚体，由非共价键缔结的亚单位所组成，能识别糖蛋白和糖肽中特别是细胞膜中复杂的碳水化合物结构，即席薄膜表面的碳水化合物决定簇。一种凝集素具有只队某一种特异性糖基专一性结合的能力，它于是别的糖以非共价键结合，在细胞表面与糖分子连接，因而在细胞间形成“桥”而使细胞凝聚。因此，凝集素可作为一种探针来研究细胞膜上特定的糖基。此外，凝集素也具有多家结合的能力，能与荧光素、生物素、酶、胶体金和铁蛋白等示踪物结合，在光镜或电镜下显示免疫反应的部位。

凝集素的应用：

凝集素的生物学作用涉及多种生理功能。作为一种研究工具应用于多个领域，如刺激细胞分裂、细胞分离，生物膜结构和功能等。作为一种分子探针，对细胞的分化，细胞间的连接，肿瘤细胞的生物学行为等具有重要的标记意义。

第二节 染色步骤

一. 卵白素和生物素免疫组织化学染色

1. 标记卵白素—生物素（LAB）技术

- (1) 石蜡切片常规脱腊入水。
- (2) 0.3% H₂O₂—甲醇 10 分钟，水洗。
- (3) PBS 洗 3 次。
- (4) 加生物素(Biotin)标记的特异性一抗，37℃ 30 分钟，置湿盒内。
- (5) PBS 洗 3 次。
- (6) 加酶标记的卵白素（Avidin），37℃ 30 分钟。
- (7) PBS 洗 3 次。

- (8) DAB 显色。
- (9) 流水冲洗, 复染、脱水、封片。

2. 桥式卵白素-生物素 (BRAB) 技术

- (1) 同 LAB 技术 (1) -- (5)
- (2) 加卵白素 (Acidin) 37° C30 分钟。
- (3) PBS 洗 3 次。
- (4) 加酶标记的生物素(Biotin), 37° C30 分钟。
- (5) 同 LAB 技术 (7) -- (9)

3. 卵白素—生物素---过氧化物酶复合物 (ABC) 技术 (三步法)

- (1) 同 LAB 技术 (1) -- (2)
- (2) 必要时胰酶消化, 37° C30 分钟。
- (3) 蒸馏水洗, PBS 洗 2 次。
- (4) 正常羊血清 (1: 5-10) 室温, 10-20 分钟。
- (5) 特异性抗体适当稀释, 置湿盒中 37° C60 分钟或 4° C 过夜。
- (6) PBS 洗 3 次。
- (7) 生物素化 (Biotin) 第二抗体, 37° C20 分钟。
- (8) PBS 洗 3 次。
- (9) ABC 试剂, 37° C30 分钟, 置湿盒中。

临用前将试剂 A 与试剂 B 等量混合, 稀释为 1: 100 的浓度, 滴加于切片上。

- (10) PBS 洗 3 次。
- (11) 同 LAB 技术 (7) -- (9)

4. ABC 快速法

在大量标本染色或快速切片的免疫组化染色时, 可采用 ABC 快速染色法。

- (1) 同 LAB 技术 (1) -- (3)
- (2) PBS 洗 3 次。
- (3) 用含 4%BSA 和 1%正常血清的 PBS 作用 2 分钟。
- (4) 特异性抗体—生物素化 IgG—ABC 混合液孵育 15 分钟。
- (5) PBS 洗 3 次。
- (6) 同 LAB 技术 (8) -- (9)

特异性抗体—生物素化 IgG—ABC 混合液的配制: 于染色前 30 分钟用等体积的生物素化 IgG—ABC 混合, 然后加入经适当稀释的特异性抗体。

5. PAP—ABC(ABPAP)技术

将 PAP 技术和 ABC 技术两者结合起来, 连续应用, 可提高敏感性。染色程序:

- (1) 切片脱腊入水。
- (2) 0.3% H_2O_2 —甲醇 10 分钟, 水洗。
- (3) 0.1% 胰酶消化 37° C10--20 分钟。
- (4) PBS 洗 3 次。
- (5) 与二抗相同的正常血清 1: 10, 室温 10 分钟。
- (6) 滴加适当稀释的特异性抗体, 4° C 过夜, 37° C 复温 30 分钟。
- (7) PBS 洗 3 次。
- (8) 滴加桥抗体 (如马抗鼠或氧抗兔 IgG, 1: 200—400), 37° C30 分钟。
- (9) PBS 洗 3 次。
- (10) 滴加鼠 PAP 或兔 PAP, 1: 200—500, 37° C40 分钟。
- (11) PBS 洗 3 次。
- (12) 生物素化 IgG (如马抗鼠或氧抗兔) 37° C20 分钟。
- (13) PBS 洗 3 次。

- (14) ABC 复合物 37° C40 分钟。
- (15) PBS 洗 3 次。
- (16) DAB 显色, 冲洗, 复染、脱水、封片, 观察。

二. 葡萄球菌 A 蛋白免疫染色

1. SPA—HRP 间接法

- (1) 同 LAB 技术 (1) -- (3)
- (2) 用 TBS (PH7.6) 洗 3 次。
- (3) 滴加特异性抗体 37° C60 分钟, 或 4° C 过夜。
- (4) TBS 洗 3 次。
- (5) 滴加 SPA—HRP (1: 100—400) 37° C30 分钟。
- (6) TBS 洗 3 次。
- (7) DAB 显色。
- (8) 流水冲洗, 复染、脱水、封片。

1. SPA—HRP 用于 PAP 法

- (1) 切片脱腊至水洗
- (2) 80% 甲醇—0.6% H₂O₂ 封闭内源性酶 5 分钟。
- (3) 10% 卵白素 Tris 缓冲液洗, 20 分钟。
- (4) 特异性抗体 37° C30--60 分钟, 或 4° C 过夜。
- (5) TBS (PH7.6) 洗 3 次。
- (6) SPA(1ug/ml)5 分钟。
- (7) TBS 洗 3 次。
- (8) PAP 复合物 (无种属限制) 5 分钟。
- (9) TBS 洗 3 次。
- (10) DAB--H₂O₂ 显色。Mayer's 苏木素淡染。脱水、透明、封片、镜检。

三. 凝集素受体的检测步骤:

- (1) 石蜡切片脱腊入水
- (2) PBS 洗 3 次
- (3) 0.05% 胰蛋白酶消化 37° C, 20 分钟
- (4) PBS 洗 3 次
- (5) 小鼠肝粉溶液 (100ug/ml) 或用 1% BSA30 分钟
- (6) 生物素化凝集素 37° C, 60 分钟
- (7) PBS 洗 3 次
- (8) ABC 试剂 37° C40 分钟
- (9) PBS 洗 3 次
- (10) DAB 显色, 复染、常规封片

注意事项:

(1) 市售凝集试剂, 均为生物素标记, 美国 Vector 公司生产的生物素植物凝集素有 10 种以上, 在检测凝集素受体时, 生物素化凝集素要进行适当稀释, 以获得较好的显色效果。

(2) 生物素化的凝集素需要用 ABC 或 Avidin 金标记抗体显示, 才能检测出相应的受体, 故 ABC 或 Avidin 金标记抗体也应有生物素化的凝集素相适应的稀释度, 这也是保证显色效果的关键。

(刘丽江)

第三篇 分子生物学技术

当今, 几乎所有的涉及生命的分支学科均已被分子生物学渗透, 在分子生物学研究的领域中, 随着各种技术的改进和发展, 有些已被设备精良的实验室到临床工作的普通实验室安家, 使得近 10 年来, 在生命学科的研究中取得了令人瞩目的丰硕成果, 特别是在肿瘤、艾滋病、心血管系统疾病, 遗传性疾病等方面, 均取

得了一些突破性进展。将分子生物学技术引入病理学研究领域，无疑为病理学的发展期到了巨大的推动作用，特别是病理学家一旦轻车熟路地在形态学上展示分子水平的各种变化，将组织和细胞的形态学改变和基因、蛋白质的无穷变化有机地联系起来，必将开创病理学研究的新天地，对疾病的病因学、发病学以及形态学等诸方面做出更大的应有的贡献。目前，分子生物学技术在形态学研究中应用最为广泛和最为成功的是核酸的原位杂交技术和原位 PCR 技术。

第一章 核酸原位杂交技术

分子生物学技术的突飞猛进发展，也推动了病理学的进展。原位杂交技术是分子生物学领域中最常用的基本技术方法之一，是核酸分子杂交技术中的一种。

核酸原位杂交技术最早应用于 60 年代末期，但当时仅限于对体外条件下核酸分子片段的初步工作，直到 1975 年才见到较为系统地介绍在细胞内进行原位杂交的技术。而在常规福尔马林固定，石蜡包埋的组织切片中进行简便易行的原位杂交则是在 80 年代中后期。近年来，随着方法更为完善，应用也更加广泛，使原来用电镜和免疫组织方法达到的亚细胞和抗原决定簇水平的分辨能力提高到了核酸分子的水平，将病理组织学观察到的细胞面貌更真实更微细更精确地展示出来。

第一节 核酸原位杂交的基本原理

核酸分子杂交是只具有一定同源性的两条核酸单链在一定的条件下（适宜的温度和离子强度等）可按碱基互补原则退火（annealing）形成双链的过程。这一杂交过程具有高度的特异性。

杂交的双方是待测核酸序列及探针。待测的核酸序列可以是克隆的基因片段，也可以是未克隆化的基因组 DNA 核细胞总 RNA。将核酸从细胞中分离纯化后可以在体外与探针杂交（膜上印迹杂交），也可以直接在细胞内进行（原位杂交）。

用于检测的已知核酸片段称之为探针（probe）。为了便于示踪，探针必须用一定的手段加以标记，以利于以后的检测。常用的标记物包括放射性核素和非放射性标记物两大类。检测这些标记物的方法都是极其灵敏的。

由于 DNA 分子双股螺旋在一定条件下可以解开（退火），而解开的双螺旋经重新配对后又能形成新的螺旋（复性），针对这一生物学特性，就可以用已知的核酸片段去检测未知的核酸分子，并能确定其所在的部位，达到定位和定量的目的。例如，用特异性的细菌、病毒的核酸作为探针组织、细胞进行杂交，以便有该病原体的感染。

原位杂交能在成分复杂的组织中进行单一细胞的研究而不受统一组织中其他成分的影响，因此，对那些细胞数量少而散在分布于其他组织中的细胞内 DNA 或 RNA 的研究更为方便。

原位杂交不需要从组织中提取核酸，对于组织中含量极低的靶序列有极高的敏感性，并可完整地保护组织和细胞的形态，更能准确地反映出组织细胞的相互关系及功能状态。

第二节 核酸原位杂交的主要过程

核酸原位杂交按检测物的不同，分为细胞内原位杂交和组织切片内原位杂交。根据所用探针及所要检测核酸的不同又可分为 DNA-DNA, RNA-DNA, RNA-RNA 杂交。但不论哪一种形式的杂交，都必须经过五大过程，即组织细胞的固定，预杂交、杂交、冲洗和显示。

一、组织细胞的固定

进行核酸原位杂交的组织或细胞必须经过固定处理。适宜核酸杂交的理想固定液应具备下列特点：1. 能很好地保护组织细胞的形态。2. 对核酸无抽提、修饰与降解作用。3. 不改变核酸在细胞内的定位。4. 对核酸与探针的杂交过程无阻碍作用。5. 对杂交信号无遮蔽作用。6. 理化性质稳定、价格低廉。

病理组织学常用的固定液均可用于核酸原位杂交是组织和细胞的固定，但各具优缺点。一般而言，4% 多聚甲醛应用最为广泛的固定液之一，它能很好地保持组织或细胞内的 RNA，一般固定 10-15 分钟 RNA 的含量比较恒定。10% 的甲醛液虽然可促进 DNA 双链分子的交联进而变性，但用含 50% 的甲酰胺杂交液进行杂交可解决。乙醇：冰醋酸（3：1）虽然广泛用于核酸原位杂交时的组织细胞固定，不过固定后组织细胞内 RNA

明显减少，但同时本底也很低。由于固定的时间是一个影响原位杂交的重要因素，因此还必须根据具体实验摸索出适合自己要求的固定液与固定时间。

二、预杂交

核酸原位杂交时，由于组织细胞中的核酸都与细胞内蛋白质结合，以核酸蛋白质复合体的形式存在与细胞浆或细胞核中，固定过程中固定液的交联作用时胞浆或胞核内的各种生物大分子形成网络，影响探针的穿透力，阻碍杂交体的形成。因此，需进行预杂交的过程，其目的是去除核酸表面的蛋白质，屹立与核酸探针对靶核酸进行杂交。常用去垢剂（detergeat）和/或蛋白酶对组织细胞进行部分的消化酶解以去除核酸表面的蛋白质。常用的去垢剂由 Triton-X100 和十二烷基硫酸钠（SDS），常用的蛋白酶有蛋白酶 K 等。蛋白酶 K 的纯度、浓度、消化的时间在不同的组织细胞中相差极大，因此，必须进行一系列的预试验，找到适当的浓度及消化时间。

三、杂交

杂交过程是核酸原位杂交技术的主要环节，包括以下重要内容。

1、探针的选择 核酸原位杂交中所用的探针可以是双链的 DNA(dsDNA)也可以是单链的 DNA(ssDNA)，或为 RNA。近年来人工合成的寡核苷酸也得到了广泛应用。一般而言，标记的 DNA 或 RNA 探针都可用于 DNA 或 RNA 的定位，其长度为 50-300bp（碱基）最好，这个长度范围的探针在组织细胞中的穿透力好，杂交效率高。常用的探针有：

(1) 双链 DNA 探针。常用于杂交的探针之一，可通过切口平移标记或随机引物标记法标记。后者与前者相比，能产生高比活的探针，但标记探针的产量较低，不适合大量切片的原位杂交。

(2) 人工合成脱氧寡核苷酸。可由 DNA 合成仪合成，与克隆的 DNA 相比，人工合成脱氧寡核苷酸有下列优点：特异性较高，当 DNA 顺序未知时可按氨基酸顺序进行合成，可用于相似基因顺序差异研究；可用合成的不同顺序探针针对特定基因进行最佳杂交条件的筛选；由于分子量小，与相同量的 dsDNA 探针相对而言，具有高得多的摩尔浓度。

(3) 单链 cDNA 探针。单链 cDNA 探针常通过克隆载体 M13 获得。ssDNA 探针与 dsDNA 探针相对比，其最大优点在于，ssDNA 探针不会像 dsDNA 探针那样与自身互补的第二条链复性杂交，增加了探针的有效浓度。

（注：M13 是大肠杆菌丝状噬菌体系列中的一个。含有 6400 个左右的核苷酸单链闭环 DNA 分子。在用作克隆载体时，可以产生大量含有外源性 DNA 某一条链的 DNA 分子。）

(4) 单链反义 RNA 探针。可由构建的 RNA 表达载体而获得。在 RNA 聚合酶的作用下，以 DNA 为模板合成反义 RNA 探针。这种探针与切口平移标记的 DNA 探针相比，特异性高，RNA/RNA 形成的杂交分子具有热稳定性，而且探针的大小也比较恒定，因而增加了杂交的敏感性及均一性。此反义 RNA 探针不含有载体顺序，减少了非特异性杂交，还能防止 dsDNA 中第二条链的竞争性杂交。杂交后用 RNA 酶消化单链未杂交的探针，可明显减少本底。因此，RNA 探针在核酸原位杂交中的应用也越来越广泛。

(5) 反义寡核苷酸探针。见合成的 20-70 个寡核苷酸克隆到 RNA 表达载体上而获得。这种探针既有寡核苷酸探针的优点，又有 cDNA 探针的优点。

2、探针的标记 主要可分为放射性标记与非放射性标记两种方法。

(1) 放射性标记。常用标记探针的放射性核素有 ^{32}P ， ^{35}S ， ^{14}C ， ^3H ， ^{125}I 。放射性核素的敏感性高，方法简便，操作稳定，可应用核乳胶或 X 光片通过放射自显影的方法检测。 ^3H 标记探针的放射性自显影分辨率高，但其曝光时间长； ^{32}P 与 ^{35}S ，是原位杂交应用多而广的放射性核素，由于其能量高，常在几天内可得到结果， ^{35}S 优于 ^{32}P 。 ^{14}C 和 ^{125}I 的分辨率差。很少用于原位杂交。

(2) 非放射性标记。与放射性核素标记探针相比，非放射性标记具有安全、无放射性污染，稳定性好，显色快而易于观察等特点。其中生物素（Biotin）标记应用最多、最广。还有应用地高辛标记，荧光素标记，碱性磷酸酶标记，溴脱氧嘧啶标记等。

3、杂交的条件 原位杂交的一个主要优点是，其杂交反应的特异性可通过调节反应条件而进行精确的控制。杂交的特异性依赖于探针的结构、杂交温度，PH 值及杂交液中甲酰胺和盐离子的浓度。碱基的错配可经过控制严格的杂交条件而排除。

DNA 分子杂交实质上是双链 DNA 的变性和具有同源序列的两条单链的复性过程。

维持 DNA 螺旋的力主要是氢键的疏水性相互作用。氢键是一种次级键，能量较低。因此，加热、有机溶剂及高盐浓度等均可导致 DNA 二级结构发生破坏，DNA 二级双螺旋解旋，两条链完全分离，但未破坏其一级结构。此过程称为 DNA 的变性（denaturation）。

变性的 DNA 两条互补单链，在适当条件下重新缔合形成双链的过程称为复性（renaturation）或退火（annealing）。

复性并不是变性反应的一个简单逆反应过程。复性的过程是相当复杂的，变性过程可以在一个极短的时间内迅速完成，而复性则需要相对较长的时间才能完成。如果使热变性的 DNA 溶液迅速冷却，则只能形成一些不规则的碱基对，而不会完全恢复 DNA 双链结构。

因此，建立合适的杂交条件是保证核酸原位杂交成败的关键。

(1) 温度与 DNA 的碱基组成，一般变性的温度为 85-90℃左右，但这并不是一个常数，若 DNA 中 (G+C) 的百分比愈高，变性温度也愈高，一般而言，(G+C) 的百分比含量每增加 1%，变性温度上升 0.41℃左右。

一般情况下，在不含甲酰胺时，大多数杂交反应在 68℃进行，当含 50%甲酰胺时，在 42℃进行。

(2) PH 值。溶液的 PH 值对变性也有一定的影响。PH 值在 5-9 范围内，变性温度值变化不明显。在高 PH 值下，可使碱基失去形成氢键的能力。当 PH 值大于 11.3 时，所有氢键均被破坏，DNA 完全变性。

(3) 离子强度。离子强度过低，不利于复性，常采用 0.15-1.0mol/L 溶液进行复性研究。正离子可以封闭磷酸基团的负电荷，使 DNA 双链的稳定性增加，不利于变性。

四、冲洗

杂交后冲洗是减低非特异性杂交的关键步骤，其 SSC 的浓度可低至 0.1×SSC。

应用放射性核素探针时，冲洗可达几小时，而用生物素及地高辛等标记的探针冲洗时间则可缩短为 15 分钟。

冲洗时温度不能高于 50℃，否则将导致组织细胞结构的破坏及组织或细胞从切片上脱落，使实验失败。

五、显示

核酸原位杂交结果的显示应体现特异性和敏感性。当 DNA 探针长度超过 0.5Kb 时非特异性杂交增多，本底增高。此外，探针与无关基因中部分同源顺序的非特异性结合亦是非特异性杂交的原因之一。除探针的非特异性结合外，检测系统亦是导致非特异性结果的原因之一。生物素标记的探针，常用免疫组织化学技术检测，在许多组织中因含有内源性生物素（维生素 H）而出现假阳性结果。地高辛标记就不存在这种问题。

高度敏感是原位杂交的优点之一，用放射性标记的 DNA 探针可检测到细胞内 20 个拷贝的 mRNA。组织的固定与杂交条件对敏感性也会产生影响。组织切除后若不及时固定，可能会由于 mRNA 的降解而影响结果导致假阴性的出现。探针的长短、浓度、在组织中的穿透力、杂交及杂交后的冲洗严格性、检测系统的灵敏性等都可产生假阳性或假阴性结果。

核酸原位杂交的高度敏感性和特异性，如果没有确切的阳性或阴性对照则很难加以评定，因此，除探针的选择应通过鉴定外，必须在每一次试验中选择阳性或阴性对照。阳性对照可选择①Northern 或 Southern 印记杂交，②将原位杂交与免疫组织化学联合应用。③用不同互补探针与靶核酸杂交。阴性对照可选择①用非标记 cDNA 预杂交，②用无关的非特异顺序（如载体）等作探针，③杂交前用 RNA 酶或 DNA 酶消化处理切片。

第三节 核酸原位杂交的基本操作步骤

一、组织切片预处理

- 1、石蜡切片，捞片于涂有 1mg/ml 多聚赖氨酸或 1: 50 的 APES 的玻璃片上，60℃烤箱过夜。
- 2、常规脱蜡入水。
- 3、0.01MPBS 洗 5 分钟×3 次。
- 4、0.02NHCL10 分钟。
- 5、0.01MPBS 洗 5 分钟。
- 6、25ug/ml 蛋白酶 K 消化 37℃30 分钟。
- 7、0.01MPBS 洗 5 分钟×3 次。
- 8、85%、95%乙醇，无水乙醇依次脱水。

9、室温干燥。

二、杂交

1、变性：滴加杂交液（25ul/张，地高辛标记的探针）放入 50% 甲酸胺湿盒内，上加硅化盖玻片；96-98 °C，10 分钟，原有的 DNA 双股螺旋结构被解开。

2、约 15°C 水温中 10 分钟。

3、置 42°C 温箱中杂交过夜。

三、洗涤及显色

1、50% 甲酸胺中轻轻揭去盖玻片。

2、2×SSC 5 分钟。

3、2×SSC 30 分钟。

4、1×SSC 15 分钟，37°C。

5、1×SSC 15 分钟，室温。

6、buffer I 5 分钟。

7、buffer II 15 分钟。

8、封闭：buffer I 500ul + TironX-100 1.5ul+NSS(双蒸水)10ul，室温 30 分钟。

9、滴加抗体复合物：

buffer I 500ul + TironX-100 1.5ul+NSS 5ul+dig-AP1ul(碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体)，37°C 2 小时。

10、buffer I 5 分钟×2 次。

11、buffer III 3 分钟。

12、显色：buffer III 1000ul+左旋咪唑 0.24mg+NBT 4.5ul+BCIP 3.5ul，1~72 小时。

13、buffer VII 5 分钟。

14、双蒸水 5 分钟。

15、淡复染胞核或胞浆。

16、常规脱水、透明、中性树脂封片、镜检。

结果：阳性部位呈蓝色颗粒沉淀。

第四节 常用试剂的配制

一、储备液：

1、20×SSC

NaCl 175.3g

枸橼酸钠 88.2g

双蒸水 加至 1000ml

配制方法：先将 NaCl 和枸橼酸钠溶至 800ml 左右双蒸水中，用浓 HCl 调 PH 至 7.0 补水至 1000ml，高压灭菌备用。

2、IMMgCl₂

MgCl₂·6H₂O 203g

双蒸水 至 1000ml

高压灭菌后备用。

3、5M NaCl

NaCl 292.2g

双蒸水至 1000ml

高压灭菌后备用

4、IMTrisHCl(PH8.0)

Tris 60.55g

浓 HCl (约) 21ml

双蒸水 至 500ml

配制方法：先将 Tris 溶解于 400ml 左右双蒸水中，缓慢加入浓 HCl 约 21ml 至 PH8.0，待溶液冷至室温，补水至 500ml，高压灭菌备用。

5、0.5MEDTA (PH8.0)

EDTA 93.05g
双蒸水 至 500ml

配制方法：先将 EDTA 溶解于约 400ml 双蒸水中，加 10g 左右 NaOH 调 PH 至 8.0，(调 PH 至 8.0 前 EDTA 不溶解)，补水至 500ml，高压灭菌备用。

6、去离子甲酰胺

离子交换树脂 11g
甲酰胺 110ml

配制方法：将离子交换树脂与甲酰胺混合，室温下搅拌 30 分钟，分装小管，-20℃ 保存。

7、Denhardt 液 (50X)

聚蔗糖 (Ficoll400 型) 5g
聚乙烯吡咯烷酮 5g
牛血清白蛋白 5g
双蒸水 加至 500ml

二、工作液

1、Buffer I (PH7.5)

1M Tris HCl	50ml	}	100mMTris-HCl 150mMNaCl
5M NaCl	15ml		
加双蒸水	至 500ml		

2、Buffer III (PH9.5)

1M Tris HCl	25ml	}	100mM Tris HCl 100mM NaCl 50mM MgCl ₂
5M NaCl	5ml		
1M MgCl ₂	12.5ml		
双蒸水	至 250ml		

3、Buffer IV (PH8.0)

1M Tris HCl	2.5ml	}	100mMTris-HCl 1mM EDTA
0.5M EDTA	0.5ml		
双蒸水加至	250ml		

三、消化液

1、蛋白酶 K

A 液 —200mM CaCl₂:

CaCl₂ 0.22g
双蒸水 至 10ml

B 液 —10mM Tris HCl (PH7.4) 2mM CaCl₂:

Tris 2.12g
A 液 1ml
双蒸水 至 100ml

配制方法：将 Tris 溶解于约 80ml 双蒸水中，加入 A 液 (200mM CaCl₂) 1ml 后，用 HCl 调 PH 值至 7.4，双蒸水补液至 100ml，高压灭菌。

C 液:

称取蛋白酶 K 1ml，加 B 液 20ml，溶解后置 37℃ 60 分钟，分装小管，-20℃ 保存。

2、链酶蛋白酶 (20mg/ml)

取 1M Tris HCl 1.5ml
取 0.5M EDTA 10 ml

取 5M NaCl	3 ml
链酶蛋白酶	0.3mg
双蒸水加至	150ml

配制方法：将该酶的粉末溶于上述溶液中，于 37℃ 孵育 1 小时，分装小管，-20℃ 保存。

四、杂交液

4×SSC	取 20×SSC	50ul
50% 去离子甲酰胺	取 100% 去离子甲酰胺	125ul
1×Denhard 液	取 50×Denhard 液	5ul
0.5mg/ml ssDNA	取 10mg/ml ssDNA	12.6ul
双蒸水		57.5ul
探针		0.21ng/ml

五、显色液：

1、NBT/BCIP 液

(1) 将 10mg NBT 溶于 200ml 二甲基甲酰胺中。

(2) 于 37℃ 加入 1ml 底物缓冲液 (50mmol/L Tris HCl PH=9.5, 100mmol/L NaCl 1mmol/L MgCl₂ 后，滴入)。

(3) 将 5mg BCIP 溶于 200ml 二甲基甲酰胺中，然后慢慢加入上述溶液中，置 -20℃ 保存。

(NBT: 氯化氮四唑蓝, BCIP: 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸二钠盐)

第五节 核酸原位杂交的应用

近十年来，分子生物学技术越来越广泛地用于人类疾病的研究，医院病理科档案中保存有大量的石蜡包埋组织，成为分子生物学研究材料的重要来源，在石蜡切片上进行原位杂交或原位 PCR (详见原位 PCR 技术) 是对免疫组织化学技术的重要补充和延伸。Goelz(1985)和 Dubeau(1986)等成功地从石蜡包埋的组织块中提取了高质量的 DNA，从而结束了 DNA 研究依赖于新鲜或冰冻组织和细胞的历史，并且可以广泛地应用大宗病例的回顾性研究，对病理诊断和鉴别诊断以及评估患者预后等方面均有重要价值。

石蜡包埋组织 DNA 提取的基本方法

脱蜡—将组织切取成 10-20um 的厚切片，用二甲苯脱蜡。

提取 DNA—提取液中主含 SDS 和蛋白酶 K，两者均需一定的浓度和作用时间，SDS: 1-2%，蛋白酶 K: 200-500ug/ml, 其主要作用是分离 DNA 与蛋白质。

在病理诊断中的应用

1、基因重排分析与淋巴瘤的诊断，淋巴瘤具有特异性抗原受体基因重排的单一性细胞增殖的特征，克隆性的免疫球蛋白 (Ig) 和 T 细胞受体 (TCR) 基因重排的检出工作为淋巴瘤诊断的重要指标。基因重排分析在以下诊断与鉴别诊断中特别有意义：①恶性淋巴瘤与淋巴结反应性增生的鉴别。前者克隆性基因重排，后者多克隆性增生。②T 细胞性淋巴瘤的诊断。③T 细胞和 B 细胞性肿瘤的区别。④残留病变的监测和复发的早期诊断。

2、癌基因和抑癌基因的研究，癌基因的过度表达，抗癌基因的突变与丢失，均可导致肿瘤的发生与发展，并且与肿瘤的生物行为有关，越来越多地用于肿瘤的诊断和鉴别诊断，预后的评价以及指导治疗等。例如 c-erbB-2 与乳腺癌，rasP21 与乳腺癌和胰腺癌，P53 基因的突变与多种肿瘤。

3、遗传性疾病的诊断 特别是遗传性疾病的家庭回顾性调查，遗传性疾病的基因诊断都具有重要的价值。

4、病原微生物的检验 特别是对少量病原菌及特殊病原菌 (例如病毒) 的检测具有重要的意义，并能将定位与定性结合起来，这也是其他方法所不能实现的。

5、组织来源的鉴定 一旦遇到标本的标记错误，通过分析 DNA 中的 HLA-DQa 位点就能很好地解决这一问题。

(刘丽江)

第二章 原位 PCR 技术

在科学研究中，每一项新技术的创立都会带来一系列新的研究成果问世，从而推动着各学科的发展。纵观形态学研究领域，50年代电子显微镜引入形态学观察领域，带来了从细胞水平到亚细胞水平的深入研究；60-70年代，免疫组织化学与免疫细胞化学技术的广泛应用，又将观察的水平由亚细胞结构推向了蛋白质分子水平，使细胞内众多的活性物质得以进行细胞或亚细胞水平的定位，对医学生物学的发展无疑产生了深刻的影响。70年代，分子生物学技术在形态学中的广泛应用，随着原位杂交技术的出现，使组织细胞内特定的 DNA 或 RNA 序列能够被定位，将蛋白质水平又提高到基因水平即核酸分子的观察和定位，从而使人类对许多生命现象在基因水平上的认识得以深化；80年代，分子生物学领域中一项具有强大生命力的技术 PCR——多聚酶链反应技术问世了，很快地就被引入形态学观察的领域，使细胞内低拷贝或单拷贝的特定 DNA 或 RNA 得以进行定位及观察。这一技术的问世，必将带来更多的研究成果，使形态学的研究又向前迈出一大步。

第一节 基本原理

原位 PCR 技术的基本原理，就是将 PCR 技术的高效扩增与原位杂交的细胞定位结合起来，从而在组织细胞原位检测单拷贝或低拷贝的特定的 DNA 或 RNA 序列。

PCR 技术是在 DNA 聚合酶的作用下，经过模板的变性、退火和引物延伸三种循环，将引物引导下的特异性靶序列迅速地进行扩增，经过扩增的靶序列（一般能扩增 10^6 倍），很容易在凝胶电泳或 Southern 印记杂交中显示出来，因此，PCR 技术具有灵敏度高，特异性强的优势，随着热循环自动化的提高与稳定也使得 PCR 技术的操作简便易行。但是，PCR 技术是在液相中进行的，在扩增前，需将细胞破坏，从中提取核酸作为模板，因此很难将 PCR 的结果与组织细胞的形态结构联系起来，同时，也很难判断含特异性靶序列的细胞类型。

原位杂交技术是将分子杂交与组织化学技术结合起来，用标记的 DNA 或 RNA 为探针，在原位检测组织细胞内的特定 DNA 或 RNA 序列，因此，在显示阳性杂交信号（即特定的 DNA 或 RNA）时，不仅能判别含有靶序列的细胞类型，还能显示组织细胞的形态结构特征与病理变化。但是，原位杂交对拷贝数较少的序列检出有一定的困难，而单拷贝序列或低拷贝序列（10-20 拷贝的 RNA 或单拷贝 DNA），则不能被检出，所以原位杂交的敏感性不够。

原位 PCR 技术成功地将 PCR 技术和原位杂交技术结合起来，保持了两项技术的优势又弥补了各自的不足。原位 PCR 技术的待检标本一般先经化学固定，以保持组织细胞的良好形态结构。细胞膜和核膜均具有一定的通透性，当进行 PCR 扩增时，各种成分，如引物，DNA 聚合酶，核苷酸等均可进入细胞内或细胞核内，以固定在细胞内或细胞核内的 RNA 或 DNA 为模板，于原位进行扩增。扩增的产物一般分子较大，或互相交织，不易穿过细胞膜或在膜内外弥散，从而被保留在原位。这样原有的细胞内单拷贝或低拷贝的特定 DNA 或 RNA 序列在原位以呈指数极扩增，扩增的产物就很容易被原位杂交技术检查。

第二节 基本类型

根据在扩增反应中所用的三磷酸核苷原料或引物是否标记，原位 PCR 技术可分为直接法和间接法两大类，此外，还有反转录原位 PCR 技术等。

直接法原位 PCR 技术

直接法原位 PCR 技术是将扩增的产物直接携带标记分子，即使用标记的三磷酸腺苷或引物片断。当标本进行 PCR 扩增时，标记的分子就掺入到扩增的产物中，显示标记物，就能将特定的 DNA 或 RNA 在标本（原位）中显现出来。

常用的标记物有放射性同位素 ^{35}S ，生物素和地高辛，用放射性自显影的方法或用亲和组织化学及免疫组织化学的方法去显示标记物所在位置。

直接法原位 PCR 技术的优点是操作简便，流程短，省时。缺点是特异性较差，易出现假阳性，扩增效率也较低，特别是在石蜡切片上，上述缺点更为突出。因为在制片过程中，无论是固定，脱水还是包埋，都会导致 DNA 的损害，而受损的 DNA 可利用反应体系中的标记三磷酸核苷进行修复，这样标记物就会掺入到 DNA 的非靶序列中，造成假阳性。若用标记引物的方法进行直接法原位 PCR，其扩增的效率比不标记更低。

间接法原位 PCR 技术

间接法原位 PCR 技术是在细胞内进行特定 DNA 或 RNA 扩增,再用标记的探针进行原位杂交,明显提高了特异性,是目前应用最为广泛的原位 PCR 技术。

间接法原位 PCR 与直接法不同的是,反应体系与常规 PCR 相同,所用的引物或三磷酸腺苷均不带任何标记物。即实现先扩增的目的,然后用原位杂交技术去检测细胞内已扩增的特定的 DNA 产物,因此,实际上是将 PCR 技术和原位杂交技术结合起来的一种新技术,故又称之为 PCR 原位杂交(PCR in situ hybridization, PISH)。

间接法 PCR 技术的优点是特异性较高,扩增效率也较高。缺点是操作步骤较直接法繁琐。

原位反转录 PCR 技术。

原位反转录 PCR(in situ reverse transcription PCR, In Situ RT-PCR)是将液相的 RT-PCR 技术应用到组织细胞标本中的一种新技术,与 RT-PCR (液相)不同点在于,进行原位反转录 PCR 反应之前,组织标本要先用 DNA 酶处理,以破坏组织中的 DNA 酶,这样才能保证扩增的模板是从 mRNA 反转录合成的 cDNA,而不是细胞中原有的 DNA。其它基本步骤与液相的 RT-PCR 相似。

第三节 基本步骤

原位 PCR 技术的基本步骤包括标本的制备。原位扩增 (PCR) 及原位检测等基本环节,现分述如下 (重点以石蜡切片为例)。

标本的制备

原位 PCR 技术可应用于细胞悬液、细胞涂片、冰冻切片以及石蜡切片。相比较而言,以悬浮的完整细胞做原位 PCR 效果最好,石蜡切片效果最差。随着技术方面的一些问题被解决,近年也有从石蜡切片中得到满意的 PCR 效率的报道。效果不好的原因是多方面的,如:玻片上做 PCR,热传导较差,热对流不均匀,TaqDNA 酶被玻璃片吸附等,更为主要的原因,可能是标本经制片后,细胞缺乏完整的胞浆或核膜,扩增产物易发生弥漫而导致扩增的产物在原位不易保留。绝大多数的病理标本都是以福尔马林固定,石蜡包埋的形式保存的,若能很好地解决石蜡切片原位 PCR 的有关技术问题,意义显然是十分重大的。

组织细胞的固定 一般认为组织细胞以 10%的缓冲福尔马林或 4%的多聚甲醛固定后进行原位 PCR 效果较好。固定的时间一般不宜过长,视组织的大小,一般以 4℃4-6 小时为宜。

切片的厚度 一般而言,切片若厚一些,原位 PCR 的效果也较好一些,因为切片越厚,靶 DNA 的含量也就越多,同时膜结构也较多,防止扩增产物弥散的作用也越明显。但厚切片细胞重叠多,形态学观察的效果就差了,分辨率也将下降。

玻片的处理 为防止石蜡切片在 PCR 和原位杂交过程中脱落,在玻片应作防脱片处理,常用的方法是涂以多聚赖氨酸或用硅烷化处理,一般能防止组织脱落。

蛋白酶的消化作用 在进行原位扩增之前,组织标本需经蛋白酶处理。经蛋白酶消化的组织细胞,可增加其通透性,充分允许反应体系中的各成分进入细胞内,并能很好的暴露靶序列,以利于扩增。常用的蛋白酶有蛋白酶 K,胰蛋白酶或胃蛋白酶。蛋白酶消化的程度就要根据组织固定的程度进行调整。蛋白酶消化后,要注意加热以灭活酶的活性或通过充分的洗涤将酶完全去除,因为只要有少量的残留酶存在,都将对随后进行的 PCR 反应体系的数量 TaqDNA 酶产生毁灭性的影响。

蛋白酶消化处理组织细胞可提高通透性,有利于后续进行的各反应成分进入细胞内或核内,但同时也使得扩增产物的弥散机会增多,有可能带来假阳性或假阴性的结果。

原位扩增 (PCR)

原位扩增即在组织细胞标本上进行 PCR 反应,其基本原理与液相 PCR 完全相同。

引物 PCR 所用的引物一般为 15-30bp 为宜,扩增的片断为 100-1000bp 左右。原位 PCR 宜用较短的引物。从石蜡切片中提取的 DNA 很少超过 400bp, RNA 很少超过 200bp,较长序列的扩增易引起引物与模板的错配而导致非特异性反应的出现。

反应体系 原位 PCR 的反应体系与常规的液相 PCR 基本相同,由于是在经过固定的组织切片上进行,为获得较好的扩增效果,有人主张反应体系中的引物, TaqDNA 聚合酶以及 Mg²⁺的浓度均应高于液相的 PCR 反应体系。在反应体系中要加入牛血清白蛋白 (BSA),以防止 TaqDNA 聚合酶与玻片的结合而降低了扩增效率。

热循环 原位 PCR 的热循环可在专门的热循环仪上进行，操作简便。也可在一般的 PCR 热循环仪上进行，通常在样品台上覆盖一层铝箔，制成平台，样品台上的空间用矿物油或水充填，将载玻片至于平台上，即可进行热循环的步骤。

为了保证进行充分的扩增，原位 PCR 热循环中每一步骤的时间可比常规 PCR 略长些，另外，也可采用热启动 (hot start) 的方法，即玻片加热到 80-94℃ 时，再立即加入 TaqDNA 聚合酶。

为了保证反应体系在热循环过程不过多丢失，可用清亮的指甲油，矿物油或 PAP 笔把盖片四周封闭起来。

洗涤 原位扩增结束后，标本应清洗，以除去弥散到细胞外的扩增产物。洗涤不充分，会导致扩增产物在检测时显现，造成背景过深或假阳性结果的出现。但是，洗涤过度，也会造成细胞内扩增的产物被洗脱，是阳性信号减弱或丢失。

有作者在扩增后用 4% 多聚甲醛 2 小时或 2% 戊二醛 5 分钟进行后固定，以使扩增的产物在检测时能很好地保留在细胞内，提高检测的敏感性和特异性。

原位检测

原位 PCR 的扩增产物检测方法，取决于原位 PCR 的设计方案，直接法则根据标记分子的性质对扩增产物直接进行原位检测。间接法则需用原位杂交的方法进行检测。

荧光素、生物素、碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记的检测，与免疫组织化学技术和亲和组织化学技术相同，详见前述。

原位杂交的基本步骤详见核酸杂交一章。

第四节 原位 PCR 技术的应用

原位 PCR 技术的突出优势，就是能在组织细胞原位检测出拷贝数较低的特异性基因序列。按照待测基因的性质，可将原位 PCR 的应用分为检测外源性基因和内源性基因两方面。

1、用于外源性基因的检测

(1) 病毒基因的检测

感染病毒的细胞常无较好的检测手段，但当原位 PCR 技术应用后，使这一极为困难的问题有望解决。

对 HIV、HPV、HSV、HBV、HCV 等多种病毒的检测，使我们能够成功观察到这些病毒在艾滋病、生殖系统肿瘤、肝炎及肝癌中的作用，能够及时发现受感染的人群。

(2) 细菌基因的检测

最突出的应用是在结核杆菌的检测上，当结核病变不够典型时，经过特殊染色的方法（详见第一篇第五章）很难在镜下找到结核杆菌，而应用原位 PCR 技术可帮助明确诊断，当结核杆菌很少时仍能在镜下被很容易地找出来。

(3) 导入基因的检测

在转基因动物的研究中，是否导入了基因，在接受基因治疗的患者体内，是否接受了导入的基因，均可用原位 PCR 技术来证实。因此，原位 PCR 技术成为重要的检测手段。

2、用于内源性基因的检测

(1) 异常基因的检测

机体内基因的突变、重排、也可用原位 PCR 技术进行检测，原癌基因，抑癌基因的突变，恶性淋巴瘤免疫球蛋白重链基因的重排，对肿瘤的研究和诊断无一均提供了广阔的应用前景。

(2) 固有基因的检测

对于机体细胞内只有单个或几个拷贝的低表达固有基因，原位杂交技术因基因拷贝数太少而无能为力，液相 PCR 虽可进行扩增检测出来，但不能确定含有该基因的细胞类型，原位 PCR 技术则弥补了上述两种技术的不足，使得我们能够对人类各种基因进行检测，而完成人类基因图的绘制。

(刘丽江)