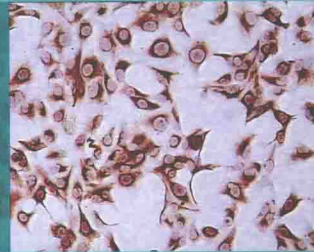
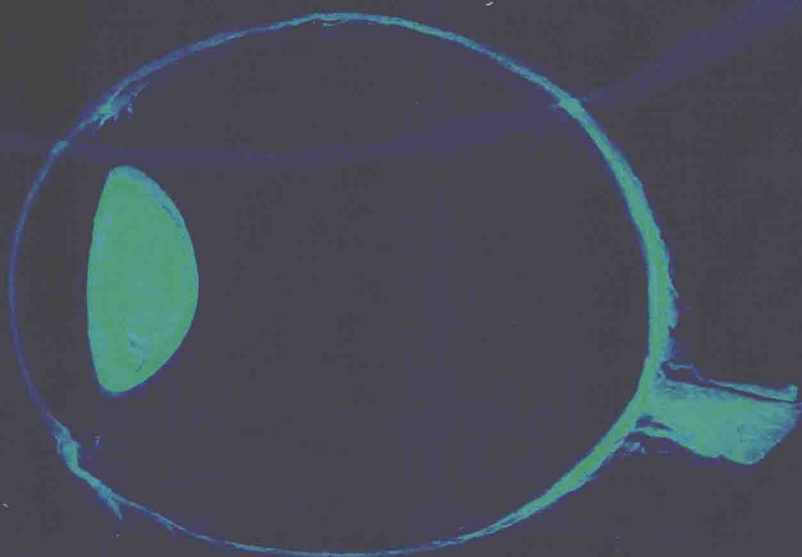


眼科病理制片与 细胞培养技术

Yanke Bingli Zhipian yu Xibao Peiyang Jishu

主编 郑健樑 卓业鸿



广东省出版集团
广东科技出版社
全国优秀出版社

眼科病理制片与细胞培养技术

主 编 郑健樑 卓业鸿

广东省出版集团

广东科技出版社

· 广 州 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

眼科病理制片与细胞培养技术/郑健樑, 卓业鸿主编. —广州: 广东科技出版社, 2014. 4

ISBN 978-7-5359-6346-8

I. ①眼… II. ①郑…②卓… III. ①眼科学—病理组织学—切片 (生物学)—制作②眼科学—病理组织学—细胞培养 IV. ①R770.2

中国版本图书馆CIP数据核字 (2013) 第296721号

责任编辑: 丁嘉凌

封面设计: 李康道

责任校对: 黄慧怡

责任印制: 任建强

出版发行: 广东科技出版社

(广州市环市东路水荫路11号 邮政编码: 510075)

<http://www.gdstp.com.cn>

E-mail: gdkjyxb@gdstp.com.cn (营销中心)

E-mail: gdkjzbb@gdstp.com.cn (总编办)

经 销: 广东新华发行集团股份有限公司

排 版: 广东科电有限公司

印 刷: 广东信源彩色印务有限公司

(广州市番禺区南村镇南村村东兴工业园 邮政编码: 528451)

规 格: 787mm × 1 092mm 1/16 印张16.75 字数330千

版 次: 2014年4月第1版

2014年4月第1次印刷

定 价: 88.00元

如发现因印装质量问题影响阅读, 请与承印厂联系调换。

《眼科病理制片与细胞培养技术》编写人员名单

主 编：郑健樑 卓业鸿

编写人员：（按汉语拼音为序）

李淑华	中山大学附属第一医院
梁英杰	中山大学附属第一医院
林少芬	中山大学中山眼科中心
刘泳冬	中山大学附属第一医院
毛羽翔	中山大学中山眼科中心
郑健樑	中山大学中山眼科中心
卓业鸿	中山大学中山眼科中心

前 言

眼科病理技术，是病理诊断学的重要组成部分，病理学的迅速发展，推动着病理技术的提高与进步。200多年来的病理技术历程，从经典的HE制片到特殊染色、组织化学、免疫组化、细胞培养、电镜、免疫荧光、原位杂交瘤技术和分子病理学技术等，为病理学科的发展发挥了至关重要的作用。

本书共5章：病理常规制片技术包括人与几种动物眼球的制片要点，以及用火棉胶制作眼球标本的方法和注意事项；特殊染色与组织化学染色，主要介绍眼科病理十多种常用的染色方法；免疫组织化学技术主要阐述了概论与基本的技术方法；分子生物学技术作为生命科学领域最具活力的前沿学科，介绍了在诊断学中的应用；人眼部组织细胞培养则从准备工作开始，详细介绍了眼部14种正常细胞，以及2种最常见的眼内恶性肿瘤细胞的体外培养。作者用近40年的工作经验积累，以纯技术参考、工具书的形式，内容由浅至深，注重实用，全书附有大量彩色图片和说明，力求让读者易读、易懂和易操作。

本书可为刚入门的眼科病理技术员、技师、在读的硕士、博士研究生、广大的相关学科科研技术人员，以及大病理技术员对眼科标本的制作提供帮助，同时对病理医生的临床诊断也提供很好的参考价值。

本书所述细胞培养部分的工作，是作者20世纪80年代在已故的国内知名病理学家易玉珍教授的亲自授意、指导和20世纪90年代在冯官光教授的悉心关怀、领导下进行，于此谨致以最衷心感谢。

本书在编写过程中得到中山眼科中心各级领导的大力支持和病理科张平副教授、张文忻技师等同事的热情帮助，该书的出版还得到中华医学会眼科分会副主任委员葛坚教授、中山眼科中心青光眼病区的大力支持。在此也谨向一直关心、支持我的各位师长、同道致以由衷谢意。

由于作者水平所限，内容及编写中错、漏定然不少，恳请同道、专家们斧正，不胜感谢！

郑健樑 卓业鸿谨识

2013年5月1日

序 1

21世纪的第一个10年被称为“生命科学年代”。生命科学、临床医学、社会科学、经济学的“四驱”进程令传统的医学模式发展为“生物—社会—医学—心理”综合模式，同时又被人们称为纳米—生物化学—信息学—认识（NBIC）年代和精密制造业的年代。2013年4月，美国政府又宣布启动重大科研项目“脑计划”（Brain Research through Advancing Innovative Neurotechnologies，全称“推进创新神经技术脑研究计划”）。借此进展，人们的生存质量将会明显改善，对视觉质量的要求也会日益提高，社会对作为承载“使人们生活得更美好”的光明事业重任的眼科医生之需求日益增长。基础研究和临床医学的结合或转化医学的兴盛是当下医学发展的重要途径之一，眼科学成为发展最快的临床专业之一。病理制片与细胞培养技术不仅是医学也是眼科学研究的基石，同时也是循证医学的基础，它们对疾病研究的重要性怎么估计都不为过。

中山大学中山眼科中心郑健樑主任技师和卓业鸿教授主编的《眼科病理制片与细胞培养技术》一书，历经3代人的努力，是中山大学中山眼科中心病理教研室多年工作的结晶和瑰宝。本书共分5章，内容从最基本的病理常规制片技术到当下先进的免疫荧光、原位杂交瘤技术和分子病理学技术。尤其值得一提的是编者根据自己的经验精心选择和详细介绍了人眼部14种正常细胞，以及2种眼内最常见的恶性肿瘤视网膜母细胞瘤和葡萄膜黑色素瘤细胞性肿瘤细胞的体外培养技术，供读者参考应用。全书遵循病理专著的要求，从读者需求出发，图文并茂，按图索骥，力求让读者易学、易读、易懂，学以致用。

中华医学会眼科分会副主任委员
前中山大学中山眼科中心主任
前眼科学国家重点实验室主任
“973”重大项目首席科学家
葛坚

2014年3月

序

2

病理学是基础医学与临床医学联系的纽带。病理学的建立及发展与病理技术应用密切相关，病理技术的提高和创新也会显著提高病理诊断的质量及临床治疗的效果。

眼科病理技术不是单纯外科病理技术在眼科病理中的应用，而是有其独特之处，例如眼球取材及包埋切片有其特别要求，尤其是眼球各种组织细胞取材培养更有其特殊性。《眼科病理制片与细胞培养技术》一书，是中山大学中山眼科中心病理科郑健樑主任技师参阅各种有关文献资料，认真总结自己30多年眼科临床病理技术丰富的工作经验编写而成。本书内容丰富新颖，图文并茂，特别着重突出眼科病理操作规程及发展的新方向，对每一种病理技术的叙述深入浅出，初学者易于掌握，尤其适合眼科病理技术人员、眼科专业的各类研究生及病理和药理的动物实验研究人员学习应用，同时对眼科病理医师及相关专业的临床医师也有一定的参考价值。

展望科学技术的发展与创新日新月异，分子生物学的理论与技术更是突飞猛进，大大促进医学技术的新发展。分子病理学的建立与发展，只是人类在传统细胞病理学对各种疾病认识的深化，而不是取代；超微病理、免疫组化及原位杂交等技术的应用也并未改变这一基本事实。但分子病理学的快速发展，会使病理诊断的模式发生革新性变化，不仅要诊断现有疾病，也要在诊断中反映出组织细胞的基因型及其表达模式。这样，以后对疾病的预防和治疗更具个性化，治疗效果更确实，预后更好。

原中山医科大学中山眼科中心眼科研究所病理室主任

原卫生部、教育部眼科实验室病理室主任

原中华医学会眼科分会眼病理学组副组长

冯官光教授

2014年3月

目 录	
第一章 病理常规制片技术	1
第一节 苏木素-伊红 (HE) 制片技术	1
一、固定、取材	1
二、脱水、透明	6
三、渗蜡、包埋	10
四、切片、裱片	12
五、染色	14
六、HE 染色、封片	15
七、HE 制片的质量控制	22
八、细胞学涂片制片技术	24
九、眼部肿物临床快速控制切除法	26
十、组织脱钙	29
十一、HE 教学片褪色重染方法	30
十二、附录	31
第二节 冷冻切片技术	34
一、基本概念	34
二、仪器设备的配置	34
三、试剂配制	35
四、冷冻切片操作	36
五、染色结果观察	37
六、质量控制	37
七、注意事项	38
八、冷冻切片技术的优点和局限性	39
九、冷冻切片技术的应用	39
第三节 人眼球的固定与制片技术	39
一、固定	40
二、取材	40
三、脱水	43
四、包埋、切片	44
五、染色、封片	45
六、结果	46
第四节 几种动物眼球的固定与制片技术	47

一、兔子眼球标本的制作	48
二、大白鼠眼球标本的制作	50
三、小白鼠眼球标本的制作	52
第五节 火棉胶制片技术	55
一、概述	55
二、方法	55
三、火棉胶制片的优缺点	58
四、注意事项	59
第二章 特殊染色与组织化学染色	61
第一节 概述	61
一、特殊染色和组织化学的概念与机制	61
二、应用范围	62
三、试剂配制	62
四、实验对照	62
第二节 网状纤维染色	62
一、概述	62
二、染色方法	63
三、染色原理	64
四、注意事项	64
五、应用	65
第三节 胶原纤维染色	65
一、概述	65
二、染色方法	66
三、染色原理	68
四、注意事项	68
五、应用	68
第四节 弹力纤维染色	69
一、概述	69
二、染色方法	69
三、染色原理	71
四、注意事项	71
五、应用	71
第五节 肌纤维染色	71
一、概述	71
二、染色方法	72
三、染色原理	73
四、注意事项	73

五、应用	73
第六节 纤维素染色	74
一、概述	74
二、染色方法	74
三、染色原理	76
四、注意事项	76
五、应用	77
第七节 细菌染色	77
一、概述	77
二、染色方法	77
三、染色原理	79
四、注意事项	79
五、应用	79
第八节 抗酸菌染色	80
一、概述	80
二、染色方法	80
三、染色原理	82
四、注意事项	82
五、应用	82
第九节 霉菌染色	83
一、概述	83
二、染色方法	83
三、染色原理	85
四、注意事项	85
五、应用	85
第十节 脂类染色	86
一、概述	86
二、染色方法	86
三、染色原理	87
四、注意事项	88
五、应用	89
第十一节 淀粉样变染色	89
一、概述	89
二、性质	89
三、染色方法	90
四、染色原理	92
五、分类	92
六、注意事项	92

七、应用..... 92

第十二节 糖类染色..... 93

一、概述..... 93

二、染色方法..... 94

三、染色原理..... 95

四、注意事项..... 95

五、应用..... 96

第十三节 黏液物质染色..... 96

一、概述..... 96

二、染色方法..... 97

三、染色原理..... 99

四、注意事项..... 100

五、应用..... 100

第十四节 黑色素染色..... 100

一、概述..... 100

二、染色方法..... 101

三、染色原理..... 102

四、注意事项..... 102

五、应用..... 103

第十五节 含铁血黄素染色..... 103

一、概述..... 103

二、染色方法..... 104

三、染色原理..... 105

四、注意事项..... 105

五、应用..... 105

第十六节 钙盐染色..... 106

一、概述..... 106

二、染色方法..... 106

三、染色原理..... 107

四、注意事项..... 107

五、应用..... 107

第十七节 核酸染色..... 108

一、概述..... 108

二、染色方法..... 108

三、染色原理..... 110

四、注意事项..... 110

五、应用..... 111

第十八节 酶组织化学染色..... 111

一、概述·····	111
二、染色方法·····	111
三、染色原理·····	114
四、注意事项·····	114
五、应用·····	115
第十九节 玻璃器皿的洗涤·····	115
一、新玻璃器皿的洗涤·····	115
二、使用后玻璃器皿的洗涤·····	115
三、重铬酸钾-硫酸清洁液的配制·····	116
第三章 免疫组织化学技术·····	118
第一节 免疫组织化学概论·····	118
一、抗原·····	118
二、抗体·····	119
三、常用免疫组织化学技术及其机制·····	119
四、免疫组织化学技术的特点与局限·····	119
第二节 免疫组织化学的基本技术方法·····	120
一、抗体的制备与使用·····	120
二、组织材料的处理·····	122
三、免疫染色·····	122
四、对照的设定·····	124
五、免疫组织化学染色结果的判断·····	125
第三节 免疫酶组织化学技术·····	126
一、标记抗体所用的酶及其性质·····	126
二、标记常用的酶·····	126
三、提高免疫酶组织化学技术敏感性的方法·····	126
四、提高免疫酶组织化学方法敏感性的技术手段·····	128
五、免疫酶组织化学染色干扰因素的消除·····	129
六、免疫组织化学检测试剂盒的合理选用·····	130
第四节 免疫荧光技术·····	130
一、免疫荧光染色的原理·····	131
二、免疫荧光技术染色操作准备·····	132
第四章 分子生物学技术·····	134
第一节 原位杂交技术·····	134
一、原位杂交的基本原理·····	134
二、原位杂交的探针·····	134
三、原位杂交技术的操作·····	136

四、荧光原位杂交技术·····	138
第二节 PCR技术·····	141
一、PCR的概念及基本原理·····	141
二、PCR的基本反应步骤·····	141
三、PCR反应的各种组分·····	142
四、PCR反应条件的控制·····	143
五、PCR技术的基本步骤·····	144
六、PCR的主要类型·····	145
七、PCR操作中的污染及对策·····	147
八、PCR在病理诊断中的应用·····	149
第五章 人眼部组织细胞培养技术·····	152
第一节 细胞体外培养的环境与准备工作·····	152
一、培养实验室的设计和守则·····	152
二、体外细胞培养的设备与器械·····	154
三、培养用品的洗涤与消毒灭菌·····	156
四、组织细胞培养的污染及排除·····	160
五、培养基及常用的消化液和抗生素·····	161
第二节 正常人眼组织细胞的体外培养·····	163
一、角膜上皮细胞的体外培养·····	164
二、角膜内皮细胞的体外培养·····	168
三、小梁细胞的体外培养·····	171
四、虹膜色素上皮细胞的体外培养·····	177
五、晶状体囊膜上皮细胞的体外培养·····	180
六、人睫状突无色素上皮细胞培养·····	184
七、人视网膜胶质细胞的体外培养·····	187
八、人视网膜血管内皮细胞的体外培养·····	191
九、视网膜色素上皮细胞的体外培养·····	196
十、结膜上皮细胞的体外培养·····	202
十一、人泪腺上皮细胞的体外培养·····	205
十二、Tenon囊成纤维细胞的体外培养·····	210
十三、视网膜Müller细胞的体外培养·····	213
十四、视神经星形胶质细胞的体外培养·····	217
第三节 人眼内常见恶性肿瘤细胞的体外培养·····	220
一、视网膜母细胞瘤细胞的体外培养·····	220
二、人葡萄膜黑色素瘤细胞的体外培养·····	228
第四节 Rb细胞克隆及人脐静脉内皮细胞培养·····	235
一、Rb细胞克隆·····	235

二、人脐静脉内皮细胞的培养.....	239
第五节 细胞的冻存与复苏.....	244
第六节 细胞培养的小常识.....	246

5. 保持组织一定的硬度，使之不易变形，利于切片。
6. 使细胞或细胞内的物质产生不同的折光率，以利于染色后识别各类细胞的结构，同时也促使组织进行各种正常的染色反应。

(三) 原理

利用某些化学试剂的特性，使组织内蛋白质凝固或沉淀。

1. 福尔马林通过与蛋白质分子之间的交联作用产生亚甲基键（ $-\text{CH}_2-$ ），第一步是亚甲基二醇弥散入组织中；第二步是让组织中的亚甲基二醇脱水形成甲醛；第三步是通过交联作用使甲醛与蛋白质结合，把许多蛋白质分子串联起来，使蛋白质变性，破坏了蛋白质的立体结构，改变了蛋白质的生物活性，从而达到固定的目的。

2. 乙醇与丙酮对组织的固定作用，是通过破坏蛋白质表面的电荷和颗粒上的水膜，使蛋白质发生沉淀而达到固定的目的。

(四) 过程

菲克（Fick）关于液体扩散的第二定律指出：液体扩散所需的时间是随着其扩散媒介厚度增加的平方数而增加。假如10%中性福尔马林溶液的渗透速度是2 mm/h，那么当厚度为3 mm时，渗透的时间将是原来的9倍，4 mm将会是16倍，以此类推，这定律亦适用于所有溶剂。因此，取材的组织块厚度应掌握为0.3 mm，面积一般以1.5 cm × 1.5 cm为宜。

1. 蛋白质凝固、沉淀的速度与福尔马林固定液浓度有密切关系，之间呈正比关系。而乙醇则相反：采用高浓度的乙醇尤其是无水乙醇固定组织，其结果却使组织周围由于收缩而形成硬膜，影响了固定剂对组织的渗透，速度反而更慢。

2. 固定液的作用时间与温度有密切关系，之间也呈正比关系。

(五) 常用的固定液

甲醛液（又称福尔马林），早在1893年就被用于组织细胞的固定，它是甲醛的气体溶于水的饱和液，最大饱和度为36%~40%，临床常用的10%福尔马林固定液，实际只含4%甲醛。纯的甲醛在常温20℃以上是无色气体，具有很强的刺激味，其沸点为-19.5℃，冰点是-118℃。甲醛液在低温处放置时间长容易发生聚合作用，从而产生白色混浊沉淀称三聚甲醛。其氧化时还会产生少量甲酸而使溶液呈酸性，导致产生福尔马林色素，所以应把福尔马林配成pH中性为宜。

1. 10%中性福尔马林溶液。

甲醛 10 mL

蒸馏水 90 mL

将两种液体混合摇匀后，加入无水碳酸钙至饱和即可。

2. FAA液。

甲醛 10 mL

冰醋酸 10 mL

80%乙醇 80 mL

3. AF液。

甲醛 10 mL

95%乙醇 90 mL

(六) 固定注意事项

1. 离体的组织如果固定及时、充分,能对染料产生不同程度的亲和力从而使着色清晰,便于显微镜下观察,尤其是眼科的小标本,例如眼角膜、结膜、眼部小肿物、豆腐渣样的霰粒肿,甚至为视网膜脱离的病人取下的有如针尖大小的视网膜前膜等。因为组织固定不及时,很容易干涸,固定不好,会影响脱水剂、透明剂的交换以及石蜡的渗透,还会引起溶酶体酶释放,导致组织自溶,直接影响细胞核的染色效果,所以,对于未能及时充分固定的干涸或腐败的标本,肯定不能再进行固定和用于制作切片。

2. 通常用10%~15%中性福尔马林溶液固定小标本时间为4~6 h,而大标本则需18~24 h。组织标本固定的持续时间不宜过长,否则会引起组织形态的改变、色素沉着以及导致抗原决定簇的过分遮蔽。而在固定期间,采取间断地轻摇固定液则有利于固定液的渗透。组织与固定液的容积比例不要少于1:10,如果发现送检标本的固定液不足,应该及时补加。固定液浓度不能太高,否则,会使组织的脂质变硬,同时减弱固定液对组织的渗透能力,从而造成组织中间部分固定不好。但是,眼眶肿物,如淋巴瘤、淋巴组织增生、炎性假瘤的组织,因为细胞比较致密,固定液难以渗透,所以改用20%中性福尔马林溶液来固定,效果较佳,可避免切片染色出现发白现象。

3. 如果福尔马林溶液的浓度太低,在正常的固定时间内,由于蛋白质的沉淀和凝固不够充分,使细胞成分产生的光学差异不够显著,这样会影响染色效果,导致切片染色后组织出现发灰现象。

4. 10%福尔马林溶液的pH对组织的影响。在酸性环境下,福尔马林溶液对组织的影响非常明显,当pH低于5.7时组织会形成色素,而pH为3.0~5.0时组织便会不断出现色素。

5. 福尔马林是一种还原剂,一般不能与氧化剂,如重铬酸钾等配成混合液,因为混合液配成后1天即失效,所以,在配制这类混合固定液时,必须在应用前才加入福尔马林。

6. 固定的组织要尽可能切成小块或薄片,同时在固定期间,最好做到间断地摇动固定液,这样有利于固定液的渗透,使固定的效果更好。

7. 盛标本的容器要大,最好用宽口瓶,以尽量保持组织的原状,不要使其收缩或卷曲,并且要注意组织避免受挤压或人为的镊伤。

8. 对于浮起的组织,例如脂肪,在固定时要注意在组织上面盖着棉花,以保证得到充分固定。

(七) 组织固定后的改变

1. 颜色变淡。这是由于组织中的血色素在固定过程中被破坏,所以整体呈灰白色。

2. 组织变硬。由于化学反应，组织由柔软变为比较硬实，眼球以及淋巴病变的组织尤为明显。
3. 组织缩小。尤其是选用乙醇固定的标本，其组织缩小可达20%。
4. 组织膨胀。如果选用含有冰醋酸的固定液，当其含量高时，可导致组织膨胀，尤其是胶原纤维更为明显。
5. 沉淀。使蛋白质、糖原、尿酸结晶等变成不溶性的产物。
6. 色素。尤其多见于含血液多的组织，这是由于福尔马林氧化为甲酸后，与细胞内血红蛋白结合形成的酸性甲醛正铁血红素复合物，呈棕褐色，亦称“福尔马林色素”。
7. 溶解。乙醇能溶解脂质；福尔马林能溶解糖原、色素、尿酸结晶。
8. 某些固定液会使酶的活性受抑制，也可引起细胞内的抗原决定簇被遮蔽。

(八) 如何选用固定液

应该根据不同的研究目的，选用不同的固定液。

1. 一般活检的标本首选10%~15%中性福尔马林溶液。因为它具有沉淀蛋白质、杀菌、防腐、灭菌的功效。其渗透速度一般是2 mm/h，随着时间延长速度会逐渐降低，但是如果浓度太高则反而减慢渗透的速度。其渗透力强，固定均匀，收缩较少且价格便宜，固定后的标本比较柔软且有弹性。如果是人眼球或是动物眼球的标本，则建议以FAA液为首选。
2. 乙醇有固定兼脱水的作用，渗透力强，速度快，能沉淀白蛋白、球蛋白和核蛋白，可固定糖原和尿酸，会溶解脂肪、类脂质和红细胞，组织固定后收缩明显、变硬且有形态学的改变。用蒸馏水稀释乙醇时如果出现乳白色混浊，则表明乙醇中含有杂质，必须通过过滤清除。
3. 甲醇又名木醇，是一种无色、无味、透明、有毒的液体，多用于眼睛的房水、玻璃体液以及血涂片的固定。
4. 丙酮又名醋酮，为无色透明且具有芳香味的液体，渗透力强，能固定蛋白质，但是对组织的收缩、致硬明显，一般仅用于组织化学对某些酶以及培养活细胞爬片的固定。
5. 结缔组织的特殊染色宜选用Bouin液、Zenker液等。
6. 证明糖原时用Carnoy液或无水乙醇。
7. 证明色素最好用乙醇。
8. 证明核酸应用Carnoy液。
9. 证明酶宜用冷丙酮或乙醇。
10. 证明髓鞘或线粒体采用Helly液。
11. 证明尿酸盐用黄醇醋酸液。
12. 做电镜标本或免疫荧光染色则用锇酸、多聚甲醛或戊二醛固定。

(九) 固定液分类

即单纯固定液与混合固定液。