

The background of the book cover is a detailed electron micrograph showing various cellular components. Large, clear, circular structures, likely mitochondria or lipid droplets, are scattered throughout. A complex network of dark, wavy lines represents the endoplasmic reticulum and other membrane structures. The overall texture is granular and highly detailed, typical of biological electron microscopy.

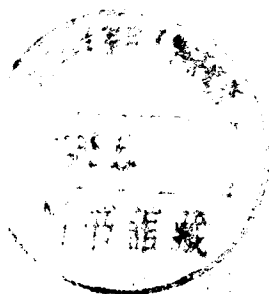
人
体
肿
瘤
超
微
结
构
图
谱

主 编 杭振鐔
上海科学技术出版社

85.10.20
520

人体肿瘤超微结构图谱

主 编 杭 振 鏊



上海科学技术出版社

8510311

主编：四川医学院 杭振德

编者：四川医学院 王远群

干德全

王伯钊

李光蓉

吴祖蓉

杨果

上海肿瘤研究所 马积庆

DT64/13

人体肿瘤超微结构图谱

杭振德 主编

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路 450 号)

新华书店上海发行所发行 吴江伟业印刷厂印刷

开本 787×1092 毫米 1/16 印张 2 插页 92 字数 35,000

1984 年 8 月第 1 版 1984 年 8 月第 1 次印刷

印数 1-5,900

统一书号：14119·1574 定价：5.80 元

前 言

自 50 年代开始,电子显微镜在医学及生物科学各个领域内应用逐渐增多,特别是在促进分子生物学、细胞生物学、组织学、微生物学及病理学的发展上起了重要的作用。肿瘤超微结构的研究就是其中一个方面。近十年来国内一些单位对不同类型肿瘤(如宫颈癌、食管癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、乳腺癌及白血病等)的超微结构进行了研究,取得了不少成绩。但到目前为止,国内尚缺这方面的专著和图谱。为此我们编写了“人体肿瘤超微结构图谱”,以供有关专业人员参考。

本图谱正文共分五章,简要地介绍了研究肿瘤超微结构的仪器与方法(电子显微镜及超薄切片技术),以便对希望开展电镜工作的同志,能对电镜样品及照片的制备过程有所了解。此外,还介绍了正常细胞超微结构的一般知识,肿瘤细胞及邻近间质超微结构的基本特点,以及电子显微镜在肿瘤病理诊断上的应用,为观察肿瘤超微结构或阅读肿瘤超微结构图片,提供一些基本知识。图片及说明共分十二部分。第一部分为正常细胞的超微结构;第二部分至第五部分为肿瘤超微结构的一般特点;第六部分至第十二部分,为全身各个系统的肿瘤。共有超微结构照片 364 幅,并附有光学显微镜照片近 100 幅,以便配合了解。希望通过对这些图片的阅读,使读者对常见肿瘤超微结构的特征及一些肿瘤的组织来源与鉴别诊断有所帮助。

在编制本图谱过程中,我们共取了人体肿瘤组织近千例,其中绝大部分从四川医学院附属医院及口腔医院取得,少数由上海瑞金医院病理科提供。全部电镜样品及照片由四川医学院电子显微镜室制备。全部光镜照片由四川医学院病理科制备的切片经摄影室摄制而成。此外,鼻咽癌类淋巴母细胞株(有病毒颗粒)的电镜照片由上海细胞生物研究所潘玉芝副研究员提供,多形性横纹肌肉瘤由中国医学科学院肿瘤研究所周传农同志提供,慢性淋巴细胞白血病系由中国医学科学院血液病研究所齐淑玲同志提供。

由于收集材料上的困难,本图谱中所列肿瘤类型尚不够完全。此外,肿瘤组织变异较大,某些肿瘤的电镜照片还不能完全显示该类肿瘤的全部特点。由于照顾版面,个别肿瘤没有按照组织发生的顺序排列。再者,因水平有限也难免有不当之处,请读者提出宝贵意见。

本书编写过程中受到许多兄弟单位和同道支持,我院杨光华、姚先莹、罗德元同志参加了审阅工作,特此致谢。

杭 振 镡

于成都四川医学院 1980.6

目 录

第一章 电子显微镜及超薄切片技术简介	1
一 透射电子显微镜的主要特点	1
二 超薄切片的制备方法	2
三 肿瘤组织电镜样品的制备及电镜观察中应注意的问题	5
第二章 正常细胞的超微结构的基本知识	6
一 细胞膜	6
二 细胞质	7
三 细胞核	9
第三章 肿瘤细胞及肿瘤相邻间质的超微结构	10
一 肿瘤细胞的超微结构	10
二 肿瘤相邻间质的超微结构	12
第四章 电子显微镜在肿瘤病理诊断上的应用	13
一 分泌颗粒	14
二 细胞器及细胞其他结构	15
三 细胞表面结构及细胞相邻关系	16
四 细胞核	17
第五章 肿瘤超微结构在肿瘤鉴别诊断上的应用举例	17
一 癌与肉瘤的区别	17
二 低分化鳞癌与低分化腺癌的区别	18
三 肠型胃癌与肠癌的区别	18
四 类癌与低分化腺癌的区别	19
五 无色素性黑色素瘤与低分化(或未分化)癌的区别	19
六 恶性胰岛细胞瘤及低分化胰腺癌的区别	19
七 恶性间皮瘤与低分化癌及肉瘤的区别	19
八 恶性纤维组织细胞瘤、多形性脂肪肉瘤及多形性横纹肌肉瘤的区别	20
九 室管膜下星形胶质细胞瘤与室管膜瘤的区别	20
附: 肿瘤细胞超微结构与肿瘤组织类型的关系	21

图 片 及 说 明

第一部分 正常细胞的超微结构

细胞一般结构·····	图 1-1
细胞核(核膜、核孔、核周隙、染色质及核仁)及粗面内质网·····	图 1-2~3
线粒体及粗面内质网·····	图 1-4
滑面内质网及糖元·····	图 1-5
滑面内质网及紧密连接·····	图 1-6
高尔基复合体·····	图 1-7~8
肌质网及肌微丝·····	图 1-9
微管及中心粒·····	图 1-10
张力微丝·····	图 1-11
细胞质膜·····	图 1-12
微绒毛·····	图 1-13
纤毛·····	图 1-14
桥粒·····	图 1-15~16
基板·····	图 1-17

第二部分 肿瘤细胞的超微结构——细胞质及细胞联接

癌细胞超微结构的一般特征·····	图 2-1
肿瘤细胞内线粒体·····	图 2-2A~2G
肿瘤细胞内粗面内质网·····	图 2-3A~3E
肿瘤细胞内高尔基复合体·····	图 2-4
肿瘤细胞内多聚核蛋白体·····	图 2-5
肿瘤细胞内张力原纤维·····	图 2-6
肿瘤细胞内溶酶体及糖元·····	图 2-7
肿瘤细胞内溶酶体及脂质·····	图 2-8
肿瘤细胞内脂质·····	图 2-9
肿瘤细胞间连接·····	图 2-10~16

第三部分 肿瘤细胞的超微结构——细胞核

癌细胞核内染色质·····	图 3-1~2
癌细胞畸形核·····	图 3-3~7
癌(或瘤)细胞核内假包涵体·····	图 3-8~9
癌细胞核核周隙扩张·····	图 3-10
癌细胞核核周隙囊状扩张·····	图 3-11

核表面分层状结构·····	图 3-12
癌细胞核核孔·····	图 3-13~15
癌(或瘤)细胞核核仁·····	图 3-16~21
癌(或瘤)细胞内核小体·····	图 3-22A~22D
核内包涵体·····	图 3-23~24

第四部分 肿瘤细胞的超微结构——有丝分裂

细胞分裂前期·····	图 4-1~4
细胞分裂中期·····	图 4-5~7
细胞分裂后期·····	图 4-8
细胞分裂末期·····	图 4-9~11

第五部分 肿瘤间质及淋巴细胞反应的超微结构

癌细胞早期浸润及基板的改变·····	图 5-1A~1B
癌细胞浸润及邻近间质的改变·····	图 5-2~5
癌细胞浸润纤维母细胞反应·····	图 5-6
癌细胞间增生活跃的纤维母细胞·····	图 5-7
癌细胞间纤维母细胞中的溶酶体·····	图 5-8
癌细胞早期浸润及淋巴细胞反应·····	图 5-9
淋巴管内的癌细胞·····	图 5-10
毛细血管内的癌细胞·····	图 5-11
癌间质中的毛细血管·····	图 5-12~13
癌间质中小血管出血·····	图 5-14
癌间质中的毛细血管中血小板聚集·····	图 5-15
癌细胞浸润及淋巴细胞反应·····	图 5-16~18
癌间质中浆细胞反应·····	图 5-19
癌细胞间的淋巴细胞·····	图 5-20
淋巴细胞溶癌现象·····	图 5-21~29
癌细胞间巨噬细胞·····	图 5-30A~30B
癌细胞间肥大细胞·····	图 5-31
颈淋巴结转移癌中淋巴细胞溶癌现象·····	图 5-32

第六部分 呼吸系统肿瘤

喉鳞状细胞癌·····	图6-1A~1B
鼻咽部高分化鳞状细胞癌·····	图 6-2
鼻咽部低分化鳞状细胞癌·····	图 6-3
鼻咽部低分化柱状细胞癌·····	图 6-4~5
鼻咽部大圆细胞癌·····	图 6-6A~6B
鼻咽部梭形细胞癌·····	图 6-7
鼻咽部多形性细胞癌·····	图 6-8
鼻咽部低分化腺癌·····	图 6-9A~9B
鼻咽部未分化癌·····	图 6-10

鼻咽癌癌细胞融合	图 6-11
鼻咽部“淋巴上皮癌”	图 6-12
鼻咽癌类淋巴瘤细胞株中 EB 病毒颗粒	图 6-13A~13B
肺鳞状细胞癌	图 6-14
肺腺癌	图 6-15
肺低分化柱状细胞癌	图 6-16
肺低分化腺癌	图 6-17
肺癌中双向性分化的癌细胞	图 6-18
肺低分化腺癌癌细胞中板层小体	图 6-19
肺类癌	图 6-20A~20B
肺未分化癌	图 6-21A~21C

第七部分 消化系统肿瘤

涎腺腺样囊腺癌	图 7-1
舌鳞状细胞癌	图 7-2
腮腺鳞状细胞癌	图 7-3
下颌造釉细胞瘤	图 7-4A~4C
食道高分化鳞状细胞癌	图 7-5
食道低分化鳞状细胞癌	图 7-6~7
食道腺癌	图 7-8A~8B
胃高分化腺癌(肠型)	图 7-9
胃低分化腺癌(肠型)	图 7-10A~10B
胃低分化腺癌(肠型)	图 7-11~12
胃低分化腺癌癌细胞内微囊(肠型)	图 7-13
胃弥漫性癌(肠型)	图 7-14~15
胃粘液性腺癌	图 7-16
胃印戒细胞癌(粘液癌)	图 7-17~18
胃低分化腺癌(胃型)	图 7-19~20
胃类癌	图 7-21~23
胃腺鳞癌	图 7-24A~24B
胃鳞状细胞癌	图 7-25
胃未分化癌	图 7-26~27
十二指肠腺癌	图 7-28~29
横结肠腺癌	图 7-30
直肠腺癌	图 7-31~33
直肠低分化腺癌	图 7-34~35
直肠粘液腺癌	图 7-36
直肠印戒细胞癌(粘液癌)	图 7-37~39
直肠类癌	图 7-40A~40B
直肠粘液类癌	图 7-41~42
肝细胞肝癌(例一)	图 7-43A~43C
肝细胞肝癌(例二)	图 7-44A~44E
肝细胞肝癌(例三)	图 7-45~46

胆管性肝癌·····	图 7-47A~47B
胆管腺癌·····	图 7-48~49

第八部分 神经系统肿瘤

神经鞘瘤(体神经)·····	图 8-1
神经鞘瘤(听神经)·····	图 8-2~4
脑膜瘤(纤维细胞型)·····	图 8-5
脑膜瘤(砂粒型)·····	图 8-6A~6C
脑膜瘤(脑膜上皮型)·····	图 8-7
星形胶质细胞瘤(I 级)·····	图 8-8A~8C
星形胶质细胞瘤(II 级)·····	图 8-9A~9B
星形胶质细胞瘤(III—IV 级)·····	图 8-10A~10C
室管膜细胞瘤·····	图 8-11A~11D
恶性室管膜细胞瘤·····	图 8-12A~12B
少突胶质细胞瘤·····	图 8-13A~13C
髓母细胞瘤·····	图 8-14A~14C
原始神经外胚层肿瘤·····	图 8-15A~15B
颅咽管瘤·····	图 8-16A~16B

第九部分 内分泌系统肿瘤

甲状旁腺瘤·····	图 9-1A~2B
甲状旁腺癌·····	图 9-3
甲状腺癌·····	图 9-4
甲状腺癌(滤泡型)·····	图 9-5~6
甲状腺乳头状癌·····	图 9-7A~7B
肾上腺皮质癌·····	图 9-8A~8E
肾上腺嗜铬细胞瘤·····	图 9-9A~9D
垂体嫌色细胞瘤·····	图 9-10A~10E

第十部分 泌尿生殖系统肿瘤

肾透明细胞癌·····	图 10-1A~1C
肾母细胞瘤·····	图 10-2A~2B
膀胱移行上皮癌(I 级)·····	图 10-3A~3B
膀胱移行上皮癌(II 级)·····	图 10-4A~4C
前列腺癌·····	图 10-5A~5B
睾丸精原细胞瘤·····	图 10-6A~6B
睾丸胚胎性癌·····	图 10-7A~7B
阴茎鳞状细胞癌·····	图 10-8
宫颈低分化鳞状细胞癌·····	图 10-9A~9B
子宫颈假肉瘤性鳞癌·····	图 10-10A~10B
卵巢粒层细胞瘤·····	图 10-11A~11B
绒毛膜上皮癌·····	图 10-12A~12B

乳腺癌	图 10-13
乳腺癌	图 10-14
乳腺癌(单纯型)	图 10-15
乳腺癌	图 10-16

第十一部分 恶性淋巴瘤及白血病

恶性淋巴瘤(弥散性分化不良性淋巴细胞型)	图 11-1A~3C
浆细胞瘤(髓外型)	图 11-4A~4B
浆细胞白血病(周围血)	图 11-5A~5B
何杰金氏病(淋巴结)	图 11-6A~6C
慢性粒细胞白血病	图 11-7A~7B
急性粒细胞白血病(周围血)	图 11-8A~8B
急性粒细胞白血病(骨髓)	图 11-9A~9F
慢性淋巴细胞白血病(骨髓)	图 11-10~11
急性淋巴细胞白血病	图 11-12A~12C
单核细胞白血病(骨髓)	图 11-13A~13B

第十二部分 其他肿瘤

背部皮肤色素沉着性基底细胞乳头状瘤	图 12-1A~1B
恶性黑色素瘤	图 12-2A~2C
面部皮肤基底细胞癌	图 12-3A~3B
皮内痣	图 12-4
纤维肉瘤(口腔)	图 12-5
低分化纤维肉瘤(腹膜后)	图 12-6A~6B
皮肤粗隆性纤维肉瘤	图 12-7
恶性纤维组织细胞瘤	图 12-8A~8C
脂肪肉瘤	图 12-9A~9B
多型性横纹肌肉瘤	图 12-10A~10B
滑膜肉瘤	图 12-11A~11C
脊索瘤	图 12-12A~12C
骨巨细胞瘤	图 12-13A~13C
骨肉瘤	图 12-14A~15B
软骨肉瘤	图 12-16A~16C
胫骨造釉细胞瘤	图 12-17A~17B
胸腺瘤	图 12-18A~18B
视网膜母细胞瘤	图 12-19A~19B

第一章

电子显微镜及超薄切片技术简介

早在本世纪 30 年代,电子显微镜(简称电镜 electron microscope)已研制成功,直到 50 年代初期才逐渐应用到生物及医学科学的各个领域。30 年来,电镜及电镜样品的制备技术有很大的发展,取得了显著的成绩,特别在促进分子生物学、细胞学、组织学、微生物学及病理学发展上起了很大的作用。肿瘤细胞的超微结构的研究也是其中的一个组成部分。研究肿瘤超微结构除需要有性能良好、分辨本领高的电子显微镜外,还必须要有适合于电镜观察、质量好的样品。为了使读者对电镜图片制备过程有所了解,在叙述肿瘤超微结构以前,先将透射电子显微镜(transmission electron microscope)的主要特点及超薄切片技术简要介绍如下:

一、透射电子显微镜的主要特点

电子显微镜有几种类型,如透射电镜、扫描电镜、超高压电镜及分析电镜。一般所称的电镜是指透射电镜,此型电镜有以下特点:

(一) 分辨本领高 分辨本领(resolving power)高是电镜最主要的特点,所谓分辨本领是指能分辨相邻二点的最小间距。人的眼睛分辨本领为 0.1mm ,光学显微镜为 0.2μ ,电子显微镜可达 $2\text{\AA}$ (angstrom)左右($1\text{微米}=10000\text{\AA}$)。

有人认为放大倍数是衡量电镜性能的主要指标,这是不够全面的。单纯的放大,并不能达到观察物体的微细结构的目的。放大只是将仪器能够达到的分辨本领放大到人的眼睛能够观察到的范围,例如被观察的样品内某一结构大小为 $10\text{\AA}$,要达到眼睛能看清,必须将此结构放大,其放大倍数为 $0.1\text{mm}/10\text{\AA}=10^5$,也就是说 $10\text{\AA}$ 的结构,放大 10 万倍,眼睛才能看清。因此,电镜首先必须具备足够高的分辨本领,再加上放大能力,才能观察到物质的微细构造。

由于电镜具有高分辨本领,因此可以看到光学显微镜下所不能看到的微细结构,例如细胞内的各种细胞器、大分子结构及病毒颗粒。在肿瘤细胞内可以看到细胞器数量、分布及结构的异常改变,细胞相邻关系的变化,借此来判断肿瘤的组织来源、类型及分化程度,以及了解肿瘤的生物学特征。

(二) 用电子束为光源 为了使观察的样品成像,必须有一个光源。光学显微镜是用可见光为光源,此种光源的波长为 $5000\text{\AA}$ 左右。分辨本领的大小与波长有关,根据阿贝(Abbbe)公式 $D=0.61\lambda/n\sin\alpha$ (D 为分辨本领, λ 为波长, n 为透镜和物体间的折射系数, α 为孔径角),可计算出光学显微镜分辨本领的极限值。电镜用电子束为光源,在一定的加速电压(5、8 或 10 万伏)作用下,电子运动的波长分别为 0.05355 、 0.04177 及 $0.03702\text{\AA}$,因此从理论上,电镜可以达到很高的分辨本领。但由于电镜制造过程中的困难,实际能达到

的分辨本领较此为低。

用电子束为光源,虽然分辨本领有很大的提高,但在一般的加速电压下(5~10 万伏),电子束的穿透能力是非常有限的,因此要求样品必须很薄。光学显微镜可以观察用玻璃作载片的石蜡切片、冰冻切片、血液涂片、脱落细胞涂片,以及培养瓶内的组织与细胞。这些样品的厚度一般在 5~10 μ ,有的超过 20 μ 。这样厚的样品电子束是不能透过的。因此电镜样品必须限制在一定的厚度,其中最常用的样品是超薄切片,其厚度为 500 Å (0.05 μ)左右,相当于石蜡切片厚度(5 μ)的百分之一。

此外,组成电子束的电子是由灯丝加热后产生的,灯丝必须在无氧条件下加热,否则会氧化烧毁,同时在电子束的行程中要避免与任何气体分子相碰撞,否则会发生放电与折射。因此,电镜镜筒内必须处于高真空状态。这种环境,对带有水分和需氧的活细胞来说是无法观察的。一般的透射电镜只能观察经过固定、脱水的细胞。

(三) 用电磁场作为透镜 要使光源会聚以产生聚焦的目的,必须在光源穿过的途中设置透镜。光学显微镜是用玻璃为透镜,利用玻璃透镜的曲面使穿过的光线会聚和发散。玻璃透镜不能被电子束穿过发挥其透镜的作用,只有用电场或磁场才能影响电子的运动轨迹。目前电镜都采用电磁透镜,即线圈通电后形成的电磁场。当电子束穿过对称的磁场时,电子束可发生折射,从而达到聚焦与放大的目的。电磁透镜可以通过改变电流强度来调整电镜的亮度、焦距及放大倍数。

(四) 在荧光屏上成像 光学显微镜可以通过目镜直接观察。电镜中电子束形成的像,不能用肉眼直接看到,必须由电子激发荧光屏产生不同的亮度形成图像,才能进行观察。并且可以用电子感光板摄像,作为记录。

电镜虽有分辨本领大、放大倍数高的特点,但是观察面积是比较局限的。因此,在生物学及医学上应用时,最好同时配合光学显微镜的观察。

二、超薄切片的制备方法

电镜在医学及生物学上的应用,多数是用以观察正常或病理状态的细胞或组织。这些细胞或组织必须制成适合于电镜观察的样品,其中最常用的是超薄切片。为了能保持细胞微细结构的生前状态,在制备样品的各个环节中应尽可能避免人为的改变,保证观察效果。超薄切片在制备方法上与石蜡切片有类似之处,也经过取材、固定、脱水、浸泡、包埋、切片及染色等过程。但超薄切片在制备上也有其特点,现根据制备过程分别叙述如下:

(一) 取材 为了保持细胞结构的生前状态,组织从活体取下后应在最短时间内投入固定液,以免在缺氧状态下,细胞发生改变。一般争取在 1 分钟内投入固定液。所取组织应小,如用戊二醛固定液预固定,组织体积可略大(厚度为 3mm,长宽为 1cm 左右)。用饿酸固定液固定,组织体积宜小(1mm³)。取组织时刀剪必须锋利,操作宜轻,避免挤压。

(二) 固定 一般用 pH 值为 7.4,2% 或 3% 的戊二醛固定液作预固定。固定液先置于冰壶或冰箱内,用时再取出。预先配制好的固定液,时间稍长后 pH 值可能发生改变,必须重测,并加以调整。在戊二醛固定液固定的组织,如不立即包埋,可置于冰箱内(4°C)保存,但时间不宜太长,否则会影响样品的反差。在临包埋前一日,将组织从戊二醛固定液中取出,用生理盐水冲洗数次后,放在生理盐水中过夜,次日用 1% 的饿酸固定液(pH7.4)再固定 1~

2小时,时间不宜再长,否则会使组织变脆、变硬,不易切片。

(三) 脱水 在锇酸固定液中固定的组织,先经生理盐水冲洗二、三次,然后再用由低浓度到高浓度的丙酮或酒精脱水。如用丙酮脱水,循序由 30、50、70、90%到纯丙酮。如用酒精脱水,依次用 30、50、70、90%的酒精,然后换成 90%丙酮,再进入纯丙酮。

(四) 浸泡及包埋 超薄切片样品一般最常用的包埋剂是环氧树脂。如环氧树脂 618 (国产)或环氧树脂 812 (Epon 812)等。如用 Epon 812 作包埋剂时,在脱水后包埋前需先经过浸泡。由纯丙酮转到丙酮与环氧树脂包埋液的混合液,再转到包埋液里浸泡。如用环氧树脂 618 作包埋剂(顺丁烯二酸酐作固化剂)进行包埋时,组织脱水后依次用丙酮与环氧树脂混合液、纯环氧树脂及包埋液浸泡。经上述浸泡后再放入胶囊的包埋液中。配制环氧树脂包埋液是在树脂中加入适量的固化剂、增塑剂及加速剂。配制中必须注意药品的纯度。受潮变质的试剂常常使包埋失败,如聚合不好、组织过软、不均匀和难于切片等。组织进入胶囊后,在 80°C 烤箱中放置 24 小时或更长,使树脂完全聚合、变硬。

(五) 修组织块、光学定位及切片 经聚合后的组织块,脱去胶囊,在有组织的一端削成锥形小塔,顶面约 1mm 见方。用光学或超薄切片机切成厚度为 1 μ 的半薄切片,放在载玻片上,用美蓝或苏木素-伊红染色。在光学显微镜下观察,确定需要电镜观察的位置后,将组织进一步削小,用超薄切片机切成超薄切片,捞在有膜的铜网上。如切片较大或连续切片,也可用无膜铜网。

(六) 染色 超薄切片的染色是用重金属盐(枸橼酸铅、醋酸铀等)与细胞内结构结合,加强对电子的散射,提高图象的反差,不是用染料进行染色。染色有单染与复染两种,单染只用枸橼酸铅,复染是用醋酸铀与枸橼酸铅。也可在组织脱水过程中进行铀盐染色,其方法是在 70%丙酮中加入饱和量的醋酸铀,组织在此液中停留 4 小时左右再继续脱水。

超微结构的研究是否收到良好成效,样品制备是一个很重要的环节。样品质量的好坏与很多因素有关,包括设备、试剂、样品制备方法,以及操作者个人的技巧等。根据我们近十年来的工作,初步认识到以下环节应予以重视:

(1) 注意化学试剂的质量,其中涉及产地及出厂批号。也要注意试剂的保存方式,其中最重要是防潮。受潮的化学试剂常降低性能,影响效果。整瓶的试剂开封用后,一定要封好,置于干冷处。如系用量少又是经常要用的试剂,最好用小瓶分装。这样用一瓶开一瓶,可避免试剂因受潮变质而浪费。(2) 在包埋组织时要注意空气湿度。在潮湿的地区与季节,最好用除湿机先将操作室内湿度降低。如无除湿机,可用置有干燥剂的操作箱,使湿度降低。(3) 所用试剂的量必须准确无误,二种以上的试剂放在一起,必须搅拌均匀。(4) 注意器皿及水的清洁,特别在染色过程中,从蜡盘或用口腔蜡片、滴管、滤纸、镊子、蒸馏水以及操作者的手指都要求十分清洁。

只有严格注意了样品制备中的每一细小环节,才可能制备出较理想的超薄切片样品。

附: 溶液配制法

(一) 戊二醛(glutaraldehyde)固定液

配方 1: 0.2M 磷酸盐缓冲液	50 ml
25% 戊二醛	14 ml
加蒸馏水至	100 ml

配方 2: 0.1 M 二甲胍酸钠溶液(sodium cacodylate)	88 ml
25%戊二醛	12 ml

用 1 N 盐酸或 1 N 氢氧化钠调节 pH 至 7.4, 戊二醛含量为 3%。

(二) 锇酸(osmium tetroxide)固定液

缓冲液 A: 醋酸钠(sodium acetate)	1.943 g
巴比妥钠(barbitone sodium)	2.943 g
加双蒸水至 100 ml	
缓冲液 B: 氯化钠(sodium chloride)	8.06 g
氯化钾(potassium chloride)	0.42 g
氯化钙(calcium chloride)	0.18 g
加双蒸水至 100 ml	
固定液: 取 A 液	2.5 ml
B 液	0.85 ml
0.1N 盐酸	2.5 ml
2% 锇酸	6.25 ml

用 0.1N 盐酸调节 pH 至 7.4, 锇酸浓度为 1%。

(三) 环氧树脂 618 包埋剂

配方 1: 环氧树脂 618	1 克(环氧值 0.43~0.59(当量/100g))
顺丁烯二酸酐(失水苹果酸酐)	400~425 mg(固化剂)
(maleic anhydride)	
邻苯二甲酸二丁脂	0.15 ml(增塑剂)
(Di-butyl phthalate)	
二乙基苯胺(Diethyl-aniline)	0.08 ml(加速剂)

配方 2: 环氧树脂 618	5 ml
DDSA	2 ml
MNA	2.5 ml
邻苯二甲酸二丁脂(DBP)	1.5 ml
DMP-30 按总量的 1~1.5% 计算	

(四) Epon 812 包埋液

A 液: DDSA(Dodecenyl succinic anyhydride)	100ml
Epon 812	62 ml
B 液: MNA (Methyl nadic anhydride)	80 ml
Epon 812	100 ml

包埋液 A 液与 B 液按 2:8 的比例混合(盛夏按 1:9 混合), DMP-30 的用量为总液量的 2%。

(五) 枸橼酸铅(lead citrate)染色液

枸橼酸铅由黄色氧化铅与枸橼酸反应所得(很细的白色沉淀)

染色液: 0.125 N 氢氧化钠溶液 (500 mg 氢氧化钠加水溶化后

加双蒸水至 100 ml)

枸橼酸铅	500 mg
------	--------

待溶化后过滤即可。

(六) 光学定位切片染色法

1. 美蓝染色法

染色液:	美蓝 0.25 g
------	-----------

硼砂 0.5 g

加蒸馏水至 100 ml

光学定位切片滴上几滴染色液,在酒精灯上加温数秒有蒸气产生,用水冲洗后即成。

2. HE 染色法

- (1) 不脱树脂法 ① 用 5%高碘酸处理 5 分钟(在 60°C 状况下进行)。② 水洗后用哈氏苏木素染色(在 60°C 状况下进行)20 分钟,再经分化及中和处理。③ 0.25%伊红 Y 溶液(在 60°C 状况下进行。伊红 Y 0.25 克溶于 25 毫升酒精里,再加蒸馏水 75 ml,用醋酸调节 pH 至 5.4)染色数秒钟。④ 用 90%丙酮分色,然后脱水、透明、封固。
- (2) 脱树脂法 用氢氧化钾纯酒精饱和溶液处理切片,使树脂脱去,切片经酒精和水洗后进行染色。
- ① 哈氏苏木素染 20 分钟,然后经 1%盐酸酒精分色,1/500 氨水中和。② 1%乙醇溶液伊红 Y 染色 2 分钟。③ 经酒精脱水、透明、封固。

三、肿瘤组织电镜样品的制备及电镜观察中应注意的问题

肿瘤组织的超薄切片样品与一般组织的超薄切片样品的制备方法基本是一样的,但必须注意以下问题:①取材时要重视肉眼观察,明确肿瘤组织的位置,以便准确的取到瘤组织。此外,还需注意瘤组织有无变性、坏死、感染及出血等改变,以便取材时避开这些区域,取到结构完整的瘤组织。②为了使电镜观察的范围较宽,使取材有较多的把握,取材时可以多取几处,如瘤的中心区、边缘区、与间质交界区以及间质区。③取材时除了取制电镜样品的组织外,另取一部分用福尔马林液固定,用作光学显微镜检查。④用树脂包埋的组织块,在作超薄切片前,每例照例切 1 μ 厚的半薄切片,在光学显微镜下作定位观察,确定是否有瘤组织,以及了解瘤组织的结构及细胞形态,以便进一步选择所需的区域,制备超薄切片。

对肿瘤组织样品进行电镜观察时应注意以下问题:①观察者应对正常细胞及组织以及增生组织的超微结构特点有所了解,以便与瘤组织超微结构进行对比和鉴别,了解瘤组织的组织来源、分化程度与异型性程度。②在同一例内不同组织块,或同一组织块内不同区域的瘤细胞,其分化程度、异型性和组织来源基本上倾向一致,或略有差异,有时也可以有明显差异,因此需要仔细全面的观察。每一个病例需要观察数个组织块,每个组织块需要观察多张超薄切片,这样才能判明瘤组织总的结构特点。③要注意切片的方位。例如柱状细胞,如系纵切面,则细胞为长形,可见上端细胞质较多,细胞器也较丰富,近基底部有核,呈椭圆形,胞质较少。如系细胞下端的横切面,核多呈圆形,胞质少,相应核浆比例大。此外,由于细胞为椭圆形或圆形,通过细胞的不同切面,其面积有一定差异,此种差异远较石蜡切片明显。以上这些因切片方位不同而出现的不同改变现象,要注意与癌细胞区别。④如象光学显微镜观察生物样品一样,电镜观察也必须由低倍到高倍,对整个铜网上的切片,对每一张切片的全部内容应先有所了解,然后再集中观察某一细胞或细胞的某一部分。⑤在观察中应注意区分那些是属于样品制备过程中的人为改变(artifact)。在取材、配制固定液、包埋、聚合、切片及染色等环节中都可以引起一些人为的改变。如因固定液不合适引起细胞皱缩或肿胀,再如因包埋或切片过程中的不当,在切片中可以出现空泡、细胞聚合损伤、刀痕、颤痕、过厚、过薄及厚薄不均;染色过程中出现的沉淀、污染和反差过弱;铜网支持膜有孔、污染及破裂等。排除了这些人为的改变,才能正确判断组织本身的结构。

虽然肿瘤的电镜观察在肿瘤鉴别诊断上有一定意义,如 Gyorkey 等人统计在日常肿瘤

病理诊断中,有5%的病例经电镜观察后可以进一步肯定光学显微镜的诊断,有3%的病例必须通过电镜观察后才能明确诊断。但由于电镜设备的昂贵及制备样品过程的复杂,不仅在国内,即使在工业发达的国家,也尚未普遍用电镜作为诊断肿瘤的常规手段。有些肿瘤,临床医生送病理活检时未考虑到要用电镜观察,因此只用一般病理常规固定液固定标本,待病理医生诊断时才发现需要进一步作电镜观察,只有用经福尔马林液固定的组织来制电镜样品。经我们实验室及国内外其他单位试验结果,此种组织在作电镜样品后大部分还有价值,细胞中基本微细结构尚可辨认。其结果的好坏与下列因素有关:①固定是否及时,如活检组织或手术切除标本,离体时间越短,进入固定液时间越早,则效果越好。②组织块要小,才能固定充分。③福尔马林液最好是接近中性、等渗和避免过酸,以免细胞渗透性改变,破坏细胞器。

此外,一般常规电镜样品制备方法,约需2~3天才能制成样品,这对等待病理诊断以便进一步处理病人的临床医生来说,时间是长了一些。因此,电镜观察用在肿瘤病理诊断上,要求一种快速制备样品的方法,参照国外的资料及我们实验室自己试验结果,缩短固定、脱水、浸泡及聚合的时间,快速制备电镜样品完全是可能的。

第二章

正常细胞的超微结构的基本知识

一、细胞膜(cell membrane)

细胞膜称质膜(plasmic membrane),膜厚 $100\text{\AA}$ 左右,由脂蛋白组成。如切片与膜正切时,可见细胞膜由三层结构组成,即所谓单位膜(unit membrane)(图1-12)。膜的内外二层电子密度大,每层厚度 $25\text{\AA}$ 左右,中间一层电子密度小,厚 $30\text{\AA}$ 左右。不仅细胞表面有膜结构,细胞内亦有膜结构,如核膜及由膜组成的细胞器,统称为膜相结构。细胞膜表面常有一层糖蛋白,呈细分枝状分布在细胞表面,称细胞外衣(cell coat)。细胞膜一般是平直的。但根据细胞类型的不同,表面有一些衍变。如有的细胞表面有微绒毛(microvilli)(图1-13),是由质膜向外褶皱而成的指状突起。微绒毛长 1μ ,粗 0.1μ ,成排排列,即光镜下所见的刷状缘或纹状缘。有的细胞表面有纤毛(cilia)(图1-14),纤毛外周是一层质膜,内有基质及轴丝,轴丝由9组外周微管及2根中央微管组成,即所谓的9+2结构。有的细胞表面有伪足突起,具有运动或摄取外物的作用。有的细胞膜局部有微小凹陷,将细胞表面的异物或病菌包裹在内,形成吞噬泡或吞噬体(phagosome),如吞饮的是小滴液态物质则称吞饮体或吞饮泡(pinoctytic vesicle)。

在上皮细胞间可见连接,即紧密连接、裂隙连接、中间连接及桥粒。紧密连接(tight junction)(图1-6,13)系二个相邻细胞的单位膜外层,彼此融合成一层。此种连接在柱状上皮细胞及腺上皮细胞间近游离缘处可见到。裂隙连接(gap junction)位于上皮细胞深部的侧表面,在相邻细胞间有 $20\text{\AA}$ 的裂隙,并由若干亚单位联结而成。由于裂隙很狭,易被误认为

是紧密连接。中间连接(intermediate junction)系二个相邻细胞间有 $240\text{\AA}$ 的间隙,其内有中等电子密度的物质,两侧的质膜增厚,电子密度增大。此种连接亦在柱状上皮细胞及腺上皮细胞间可见到。桥粒(desmosome)(图 1-15, 16)为二个相邻细胞间有 $200\text{\AA}$ 的间隙,在此间隙中央有一条电子密度大的中间线,两侧质膜增厚,电子密度增大,即致密板,可见有张力原纤维依附在膜的内侧。桥粒在鳞状上皮细胞间最多,而且显著。在柱状上皮细胞及腺上皮细胞间亦可见到,一般数量少而不显著。若上皮细胞间同时见到以上三种连接(紧密连接,中间连接及桥粒),称连接复合体(junctional complex)。

细胞膜有复杂的功能,在膜上有特定的载体(carrier),对相应物质的出入细胞有一定的控制与调节作用。在细胞膜上还有特定的受体(receptor),可受相应配体的作用,如激素、神经递质、抗原及药物等。此外,细胞膜上还有特定的抗原,如血型抗原及组织相容抗原。因此,细胞膜不仅与细胞内外物质交换有密切的关系,而且在细胞代谢、细胞分化及细胞免疫等方面都有重要意义。

二、细胞质(cytoplasm)

细胞质包括细胞基质(matrix)、各种细胞器(cell organelles)及包涵物(inclusion body),其数量与分布因细胞类型不同而异。

(一) 线粒体(mitochondria)(图 1-1, 4, 9) 为椭圆形或长条形小体。直径为 $0.5\sim 1\mu$, 长度 $2\sim 3\mu$, 少数可达 $7\sim 10\mu$ 。线粒体是由二层膜构成的囊状结构,外层称外膜(outer limiting membrane),内层称内膜(inner limiting membrane),每层厚 $60\sim 70\text{\AA}$ 。内外层间的间隙称外腔(outer chamber),内膜向内褶皱突起称嵴(crestae),内膜内侧的腔称内腔(inner chamber),腔内有基质及基质颗粒(matrix granule),颗粒直径为 $300\sim 500\text{\AA}$,含 Ca^{++} 及 Fe^{++} 等二价离子。线粒体与细胞内氧化磷酸化有密切关系,供应细胞所需的能量。因此一般耗能多的细胞,线粒体数量也多,线粒体内嵴也较密,如代谢活跃的心肌细胞内线粒体数量就较多,约占细胞面积的 $1/3$ 。线粒体在细胞内的分布与细胞的功能也有密切关系。如纤毛柱状上皮细胞和肠吸收细胞,线粒体多分布在细胞的近表面处,以供纤毛摆动及细胞吸收的能量;肾小管上皮细胞的线粒体多分布在近基底部,这与肾小管上皮细胞的重吸收功能有关。线粒体亦常见于粗面内质网之间,以便供应蛋白质合成所需要的能量。

(二) 粗面内质网(rough-surfaced endoplasmic reticulum)(图 1-2, 3, 4) 是由膜组成的扁平的囊,囊的间隙很小,约 $200\text{\AA}$ 左右。多个囊之间彼此有通道相联,形成网状结构。在膜的外侧面有核蛋白体(ribosome)附着,故称粗面内质网或颗粒内质网。每个细胞内粗面内质网长短及多少不一,有的呈单个的条状,有的呈分枝状,有的多个呈层状排列。粗面内质网与蛋白质合成功能有密切关系,分泌性蛋白质合成机能旺盛的细胞,粗面内质网丰富。光学显微镜下,此种细胞的细胞质呈强嗜碱性。

(三) 滑面内质网(smooth-surfaced endoplasmic reticulum)(图 1-5, 6, 9) 是由膜形成的不规则的管状或囊状结构,与粗面内质网主要区别在于膜的表面无核蛋白体,故称滑面内质网。此种结构与细胞内甾醇类、脂类和糖元的代谢有关,在肝细胞内滑面内质网还与药物的解毒有关。心肌细胞内肌质网也属于这种结构,与心肌内兴奋传递有关。