

临床神经科学研究基本技术

主编 陈春富 殷红兵



科学出版社
www.sciencep.com

临床神经科学研究基本技术

陈 燕 陈永昌 陈永昌 编



人民卫生出版社
People's Health Press

临床神经科学研究基本技术

主编 陈春富 殷红兵

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书在内容上继承并吸收了传统技术中的精华,力求与国际上神经科学新技术接轨,反映学科交叉渗透。全书系统介绍了神经病理、神经电生理、神经生化、神经免疫、神经毒理、神经干细胞、突触体、血-脑屏障、细胞凋亡、细胞培养、组织片和立体定向等方面的有关技术和方法,同时介绍了与脑血管疾病密切相关的血液流变学、组织血流动力学、脑组织氧监测技术等检查方法和临床神经科学的前沿技术。书末附有神经科学动物实验常用数据,以备查阅。本书从基础理论知识和神经病学两个视角论述临床神经科学技术,将基础理论和临床实践完美结合。

本书内容翔实,配有大量的图表,形象、简洁,是一部内容新颖而丰富的医学专著,对神经病学的临床和科研工作都具有重要参考价值,适合从事神经病学临床和科研的专业人员、医学生以及对神经病学感兴趣的相关学科的科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

临床神经科学研究基本技术 / 陈春富,殷红兵主编. —北京:科学出版社,2008

ISBN 978-7-03-022284-8

I. 临… II. ①陈…②殷… III. 神经病学-研究方法 IV. R741

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 083874 号

策划编辑:黄 敏 / 责任编辑:郑 红 / 责任校对:李奕莹

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008 年 7 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2008 年 7 月第一次印刷 印张:54

印数:1—2 000

字数:1 299 000

定价:186.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

前 言

神经科学基础研究以实验研究为主体,而神经科学研究技术则是临床神经病学快速发展的重要支撑条件。近年来,神经科学技术特别是分子生物学技术、神经干细胞技术等迅速发展为神经病学实验提供了许多合理、有效的新方法和新技术。目前,我国虽在神经病学检查技术方面有了一些著作,但内容简单。虽然有较全面的神经科学研究方法专著,但临床上缺乏实用性。迄今尚无一本同时全面阐述神经病学、神经科学研究技术方面的专著或教材,而是散见于各种医学文献中的研究资料,不便于查寻。

本书基于全面、公认、新颖的原则,收集了神经病学、临床神经科学相关的研究技术。各章作者在编写过程中广泛涉猎国内外具有代表性的专业书籍,每种研究技术均包括了已经获得的研究成果,并尽量给出方法学评价。在编写过程中,力争详尽介绍各项技术,不乏经验的介绍、技巧的揭示等,图文并茂,具有良好的可操作性。同时,也注重先进性和实用性的结合,避免工作中的重复浪费。为了使读者更好地理解 and 运用各项技术,每章开始对经典的研究技术都做了回顾和简单介绍。

本书是一本集现代各种神经病学研究手段、实验技术的基本原理和操作方法的工具书,也是目前国内较为全面、系统的临床神经科学实验方法与技术的教材。在内容上重点突出当代神经病学、神经科学研究方法,注重技术的新颖性、先进性、可操作性及实用性。本书收载了一些常用的重要的方法,主要涉及神经病理、膜片钳、微透析、血管内皮前体细胞及循环血管内皮细胞、组织血流动力学、神经干细胞、突触体、神经行为学等方面的内容,书末附有神经科学动物实验常用数据。全书共分18章,涵盖现代神经病学、临床神经科学研究的主要技术和实验方法,对于从事神经病学、神经科学、认知科学、信息科学及其相关领域的科研、教学、医疗人员及相关专业的研究生等均具有重要的参考价值。

由于神经病学、神经科学的实验研究涉及多个学科,对新的资料很难做到收集齐全,加之我们的编写经验有限,在编写过程中难免有疏漏之处。为此,诚望广大读者对此书的应用提出坦诚的意见,并予批评指正。

编 者
2008年3月

· i ·

《临床神经科学研究基本技术》编写人员

主 编 陈春富 殷红兵

副主编 李春霞 冯玉明 史洪润 杜继臣
王培福

编 者 (以姓氏汉语拼音为序)

陈春富	程红霞	丁苏东	窦 伟
杜继臣	冯玉明	高 荔	贾海燕
李春霞	李金连	李英杰	孟宪志
史洪润	王爱武	王培福	王湘庆
吴中亮	夏 程	阎 婷	殷红兵
周涌涛			

目 录

第一章 神经病理学技术	(1)
第一节 概论	(1)
第二节 病理学组织固定与染料选择	(6)
第三节 尸体解剖和活体检查技术	(17)
第四节 免疫组织化学技术	(26)
第五节 神经病理染色技术	(28)
第六节 肌肉活检技术	(50)
第七节 神经系统疾病其他相关染色技术	(65)
第八节 组织特殊染色法	(71)
第二章 神经电生理学技术	(94)
第一节 电生理学实验基础	(94)
第二节 纳米线晶体管探测神经元信号	(106)
第三节 整体神经电生理实验动物麻醉方法	(107)
第四节 神经电生理测定	(107)
第五节 脑电图检查	(126)
第六节 肌电图检查	(129)
第七节 运动神经传导速度检查	(141)
第八节 长时程增强的诱导检查	(143)
第九节 中枢神经系统细胞外记录技术	(146)
第十节 神经细胞内微电极记录技术	(148)
第十一节 微电极导向技术	(150)
第十二节 自由活动动物神经电生理学技术	(154)
第十三节 膜片钳实验技术	(166)
第三章 神经生化方法	(253)
第一节 生物膜的研究方法	(253)
第二节 神经系统疾病蛋白质组学	(259)
第三节 离心技术	(312)
第四章 活体自动采样系统-微透析技术	(349)
第一节 概述	(350)
第二节 影响微透析技术质量的因素	(356)
第三节 设计微透析实验的注意事项	(358)
第四节 微透析技术的定量问题	(360)

第五节	微透析样品的分析方法	(362)
第六节	微透析技术与其他实验技术的结合	(364)
第七节	微透析技术的改进	(365)
第八节	脑和脊髓微透析采样技术	(367)
第九节	微透析技术的研究进展	(370)
第十节	微透析应用的局限性	(376)
第五章	神经递质检测方法	(378)
第一节	儿茶酚胺类神经递质检测技术	(378)
第二节	氨基酸类神经递质检测技术	(400)
第三节	一氧化氮检测技术	(413)
第四节	神经递质共存现象免疫荧光双标技术	(415)
第五节	针型组织传感器在体测定神经递质	(417)
第六节	神经元膜受体电生理学及神经递质免疫组织化学检测方法	(418)
第六章	受体学方法	(421)
第一节	基本概念和研究方法	(421)
第二节	放射性配基受体结合实验	(422)
第三节	配体印迹试验	(423)
第四节	受体放射自显影技术	(424)
第五节	核受体检测方法	(429)
第六节	受体学说与新药研究	(429)
第七节	组织切片放射配基结合分析法	(431)
第八节	受体检测实例	(436)
第九节	非洲爪蟾卵母细胞表达大鼠乙酰胆碱受体的方法	(438)
第七章	神经免疫方法	(441)
第一节	免疫酶细胞化学	(441)
第二节	免疫荧光细胞化学技术	(466)
第三节	免疫细胞化学图像分析	(484)
第四节	免疫胶体金技术	(495)
第五节	免疫磁性微球技术	(499)
第六节	免疫电镜技术	(504)
第七节	免疫细胞化学在神经科学中的应用	(507)
第八节	免疫细胞化学常用试剂介绍	(515)
第八章	血液流变学检查方法	(527)
第一节	临床常规血液流变学检查	(527)
第二节	血小板的检测方法	(533)
第三节	流式细胞术检测活化血小板方法学	(536)
第四节	反相高效液相色谱法测定人血中血小板活化因子	(542)
第五节	流式细胞术与三种检测血小板活化方法的比较	(546)

第六节 中性粒细胞 - 内皮细胞黏附率	(547)
第九章 组织血流动力学检查方法	(549)
第一节 脑血流监测方法概述	(549)
第二节 实时对比超声定量评价脑组织血流灌注	(552)
第三节 CT 灌注成像检查脑血流动力学	(554)
第四节 单光子发射计算机断层显像局部脑血流的定量	(561)
第五节 MRI 脑血流定量方法	(563)
第六节 基于小波包技术的脑血流导纳信号熵特征	(566)
第七节 放射性微球技术检测激素性肌组织血流量	(567)
第八节 脑血流图检查	(568)
第九节 脑血流负荷检查方法学	(569)
第十节 脑缺血耐受性的预测和价值	(573)
第十一节 颈动脉内异戊巴比妥试验	(577)
第十二节 评估脑循环的神经电生理检查	(578)
第十三节 脑血管疾病脑循环储备力临床评价	(582)
第十四节 清醒大鼠自由活动状态长时间直接测压方法	(585)
第十章 脑组织氧监测技术	(588)
第一节 脑氧监测的方法学概述	(588)
第二节 无创性红外光谱光电法测量血氧饱和度	(590)
第三节 脑组织氧分压微创监测技术	(595)
第十一章 细胞凋亡检测方法	(600)
第一节 细胞凋亡检测技术	(600)
第二节 细胞凋亡分期和检测方法的选择	(617)
第十二章 神经干细胞技术	(621)
第一节 干细胞的基本理论	(621)
第二节 神经干细胞概述	(634)
第三节 神经干细胞的基础研究	(636)
第四节 胚胎神经干细胞的分离培养	(638)
第五节 神经干细胞的应用范围	(642)
第六节 神经干细胞移植技术	(643)
第七节 干细胞生物工程	(655)
第八节 神经干细胞应用存在的问题	(658)
第十三章 血-脑屏障方法学	(661)
第一节 血-脑屏障通透性的测定方法	(661)
第二节 透血-脑屏障制剂	(673)
第三节 胼跨血-脑屏障转运动力学研究方法	(677)
第四节 促进药物跨血-脑屏障的转运载体	(678)
第五节 血-脑屏障功能与中医药研究	(681)

第六节	血-脑屏障体外模型方法	(684)
第十四章	神经病学研究组织片技术	(691)
第一节	脑片技术概述	(691)
第二节	脑片技术操作流程	(698)
第三节	神经病学研究中脑片技术的应用	(703)
第四节	新生大鼠海马脑片培养方法	(707)
第五节	新生大鼠大脑皮质、纹状体及中脑黑质器官脑片培养	(711)
第六节	海马脑片谷氨酸递质体外释放试验	(712)
第七节	图像分析定量测量脑片体积	(712)
第八节	大鼠脊髓片器官培养模型	(714)
第九节	大鼠周龄及切片厚度对脊髓片培养神经细胞活性的影响	(716)
第十五章	突触体技术	(718)
第一节	突触体简介	(718)
第二节	突触体分离制备方法	(720)
第三节	突触体功能的研究方法	(727)
第四节	突触体素	(736)
第十六章	芯片技术	(742)
第一节	生物芯片技术概述	(742)
第二节	基因芯片	(752)
第三节	神经损伤的基因芯片研究	(758)
第四节	组织芯片	(760)
第五节	神经芯片	(764)
第十七章	立体定向技术	(769)
第一节	立体定向技术原理	(769)
第二节	动物专用立体定向仪	(770)
第三节	临床脑立体定向技术概述	(776)
第四节	脑深部病变立体定向活检方法	(779)
第五节	立体定向脑内组织移植术	(784)
第六节	肌骨病变 CT 引导下经皮穿刺活检术	(785)
第七节	立体定向手术的常见并发症	(787)
第十八章	神经行为方法学	(788)
第一节	迷宫测试方法	(788)
第二节	动物神经功能缺损传统评分方法	(811)
第三节	动物神经行为功能测试现代方法	(828)
第四节	VideoMot2 小动物行为观察系统	(836)
主要参考文献		(838)
附录	神经病学动物实验常用数据	(842)

第一章 神经病理学技术

第一节 概 论

神经病理学是病理学的一个重要分支,通常分为组织病理学和细胞病理学两大部分。神经病理学诊断不仅可用于诊断、判断疾病预后,而且还能根据世界卫生组织制定的《国际组织学分类》中标准化指标进行分类,以寻求神经系统疾病诊断和命名的统一,从而有利于国际交流。

一、病理检验的一般程序

- (1) 标本的验收。
- (2) 肉眼观察。
- (3) 选取组织块。
- (4) 显微镜检查。
- (5) 病理诊断报告。

二、常见的病理检查方法

1. 常规石蜡切片 是病理学中最常用的制片方法,取材可以广泛而全面,制片质量比较稳定。
2. 快速石蜡切片 是将上述过程简化,可适用于各种标本的快速诊断,尤其是软组织肿瘤切除标本,但是有时制片质量不易掌握。
3. 冰冻切片 对手术治疗有极大的帮助和指导意义。
4. 印片和括片 此法一般属应急措施,可与其他方法联合使用。

三、常规石蜡切片组织脱水方法

组织经系列乙醇的脱水、透明剂的作用及熔化的石蜡的浸渍及包埋后所切成的切片称为石蜡切片,是适合于尸体解剖、临床活检和某些科研所用的切片。

把含于组织内或细胞内的水分用脱水剂将其置换出来的过程称组织脱水。不管是正常的组织,还是有病变的组织,都有不同程度的含水量。据测定,人体的物质组成约含水 55%~67%、蛋白质 15%~18%、脂类 10%~15%、无机盐 3%~4% 及糖类 1%~2%。如果不把这些水分脱去,石蜡切片将无法进行,因为石蜡和水不能混合在一起,所以除去组织中的水分成为制片中的关键。用什么物质才能除去组织中的水分呢? 至今为止,国内所用的都是乙醇。因乙醇不管在什么样比例的情况下都能和水混合,所以可以慢慢地将水从组织中置换出来。乙醇脱水力强,但对组织有硬化和使组织块变脆的不良影响,在使用时,通常是

从低浓度至高浓度,浓度系列通常是 70%、80%、90%、95% 和 100%,组织经过这一系列处理后,基本可达到脱水的目的。临床上如使用含乙醇的固定液(Carnoy 液、AAF 液)固定组织时,组织不需要经过低浓度的乙醇,可直接进入 95% 乙醇脱水。

组织脱水,目前常用的有下列两种方法:

1. 人工组织脱水法 该法经济实惠,灵活度高,可根据不同的组织及其大小来确定脱水时间,也可根据不同组织及大小分批进行脱水。其优点是:①可根据不同的组织及大小任意增减脱水时间,达到脱水目的;②可随时观察组织的变化,随时中断组织的脱水,不使组织过度硬、脆;③可以多层次地进行脱水。

乙醇脱水的缺点:①需耗费人力,每个步骤的递增都需要人工完成;②不能进行大批量脱水;③必须在班上完成脱水或者定点于某一浓度的乙醇中过夜,晚上无法进行梯度递增。

2. 自动组织脱水机脱水法 自动组织脱水机的机型品种繁多,大小不一,国内生产的有轨道式和圆盘式两种,国外生产的有圆盘式和柜式两种。

(1) 轨道式自动组织脱水机:这种设备容量小,脱水用的试剂不足 1L,组织块脱水用的提篮小,每次只能容纳 40 块左右的组织,它适合于较小的单位,不适合于大单位。另外,该机在运转时,装试剂的盖子被打开,试剂容易挥发,污染环境,对人体健康不利。

(2) 圆盘式自动组织脱水机:国内生产的这种机器容量也不够大,每天处理组织块 40 块左右,如果病理科每天需要处理 150 块左右组织块时,则需要这种机器 4 台左右。这种机器脱水时也属于揭盖式,因此,试剂容易挥发,特别在夏天,必须经常添加试剂,以补充挥发去的试剂。这种机器对环境同上述机器一样。国外也有同类产品。

(3) 全密闭柜式电脑控制自动组织脱水机:这种脱水机由电脑、反应缸和试剂储存缸三个部分组成,这三部分可以分开使用,也可以结合在一起,形成一个柜式机,一台电脑可控制 5 台脱水机。电脑的功能包括对时间、温度和真空负压等的调节,可在小荧屏上显示出来,同时可显示正在进行的脱水程序。根据需要,该机可编九套程序输入电脑,编程如下:第一套为正常室温下脱水程序,该程序在换新试剂的几天内使用;第二套程序在组织块脱水不充分时启动使用;第三套程序用于组织块脱水不好时,应更换新液;第四套为周末程序,该套程序根据两天的休假时间,安排好组织块的脱水时间;第五套为“八一”程序;第六套为“十一”程序;第七套为元旦程序;第八套为春节程序;第九套为节假日程序。后面几套为节假日程序,根据节假日的放假时间不同,编排不同的程序。在 15s 左右的时间里在反应缸内抽入反应所需的试剂,当按程序表的时间反应完毕后,在 15s 左右的时间将其送回储存缸,然后另换其他试剂,如此反复,直至整个程序完毕。试剂储存箱由 13 个缸组成,每个缸的容量为 2.25L。其中用于装固定液的缸 1 个,装乙醇脱水剂的缸 7 个,装透明剂的缸为 2 个,另有 3 个缸,一个装二甲苯,当石蜡切片在反应缸中完成浸蜡后,被送回蜡缸(在反应缸的右边),用以清除遗存的石蜡;另一个缸装无水乙醇,用以清除遗存的石蜡;还有一个缸也装有无水乙醇,用以清除二甲苯的残存液。

根据对各种不同的脱水机的应用比较,这种脱水机具有以下特点:①容量大,每次可处理组织块 250~300 块,对于大、中型医院的病理科较合适。②全部密闭,所有的试剂都由管道输送。这样,一是保证了试剂不挥发,尤其是夏季此点突出,室温较高,试剂挥发快;如为揭盖式的脱水机,则试剂挥发的速度很快,几乎每天都必须添加,增大了试剂用量。二是对

环境污染相对小,保证了舒适的工作环境。③带有定期的搅动装置,可使组织固定均匀、脱水彻底。④整个过程均置于真空负压的条件下进行,特别是浸蜡,可节省 1/3 以上的时间,且浸蜡充分彻底,特别是对多孔的组织如肺组织,效果明显。

四、冰冻切片

(一) 冷冻切片的种类

冷冻切片的制作主要有以下方法:

(1) 氯乙烷法:设备简单,适合于基层医院和术中会诊,但容易受到周围环境温度的影响。

(2) 二氧化碳(CO_2)法:此法已逐渐淘汰,目前已很少应用。

(3) 半导体法:具有取材较大、制片较快的特点,比 CO_2 法容易掌握,但易受到周围环境温度的影响,已逐渐被恒冷切片机代替。

(4) 恒冷切片机(cryostat)法:是目前最先进的冷冻切片机,但价格昂贵。

(二) 冷冻切片的目的

(1) 在手术进行中,突然发现病人的病变与原诊断、原定手术方案不相符合,或者有所怀疑时,需要进行病理确定。

(2) 了解淋巴结内是否有转移的肿瘤细胞或者转移的程度,以利于确定是否需要彻底扫除淋巴结或者应用其他的治疗措施。

(3) 对于已确定为恶性肿瘤的患者,则需要了解其手术范围是否足够,上下切缘是否存在残存的肿瘤组织。

(4) 确定剖腹探查所发现肿块或者异样组织的性质。

(5) 显示组织中的脂肪和脂类物质,常见于某些病例如脂肪瘤及肉瘤或进行某些科研时所采用的组织等。

(6) 某些酶的显示,如 ATP 酶、琥珀酸脱氢酶等。

(7) 神经病理学技术中的某些染色法,如 Eager 法、Marchi 法、Cajal 法、Hortega 法和 Holzer 法等。

(8) 对某些物质所进行的免疫荧光的研究。

(三) 冷冻切片的制作方法

1. 低温恒冷箱冷冻切片制作法 Shandon As 620 E 型恒温箱冷冻切片机的箱面上装有电子控制板,上有即时冷冻键和除霜键,启动即时冷冻键,机器马上进入工作状态,并可持续 10min。启动即时除霜键,可将工作间顶部后面的制冷栅上的霜除掉,并可持续 15min。另有一个照明键,启动该键可照明工作间,有利于工作及观察组织的冰冻状况。还配有一个消毒键,当一周的工作或者一天的工作完毕后,启动该键,可对工作间进行消毒。当每天工作完毕时,还可启动密锁键,锁住工作间。除此之外,箱面的左边有四个按键,两个为快速自动进退键,两个为微小进退键,还有一个手动旋钮,调节所修组织块的进退。

冷冻箱内左边的冷冻台,温度可达 -60°C 左右,冷冻箱的中间为一台切片机,工作间的

温度在 0 ~ 30℃ 间可任意调节,并在箱面上的荧屏显示出来。

2. 操作方法及步骤

(1) 取材:未经固定的组织取材,不能太大、太厚,厚者冰冻费时,大者难以切完整,最好为 24mm × 24mm × 2mm。

(2) 取出组织支承器,放平摆好组织,周边滴上包埋剂,速放于冷冻台上,冰冻。小组织块应先取一支承器,滴上包埋剂让其冷冻,形成一个小台后,再放上细小组织,滴上包埋剂后冷冻。

(3) 将冷冻好的组织块夹紧于切片机持承器上,启动粗进退键,转动旋钮,将组织修平。

(4) 调好欲切的厚度:根据不同的组织而定,原则上是细胞密集的组织薄切,纤维多、细胞稀的组织可稍微厚切,一般在 5 ~ 10μm 之间。

(5) 调好防卷板:制作冰冻切片,关键在于防卷板的调节上。要求操作者细心、准确地将其调校至适当的位置。做切片时,切出的切片应能在第一时间顺利地通过防卷板间的通道,平整地躺在持刀器的铁板上。这时便可掀起防卷板,取一载玻片,将其附贴上即可。

(6) 应视不同的组织选择不同的冷冻度:冷冻箱中冷冻度的高低主要根据不同的组织而定,不能一概而论。如切未经固定的脑组织、肝组织和淋巴结时,冷冻箱中的温度不能调得太低,在 -10 ~ -15℃ 之间;切甲状腺、脾、肾、肌肉等组织时,可调在 -15 ~ -20℃;切带脂肪的组织时,应调至 -25℃ 左右;切含大量脂肪的组织时,应调至 -30℃。

3. 冰冻切片的注意事项

(1) 防卷板及切片刀和持刀架上的板块应保持干净,需经常用毛笔挑除切片残余和用柔软的纸张擦拭。有时需要每切完一张切片就用纸擦一次。因为这个部位是切片通过和附贴的地方,如果有残余的包埋剂粘于刀或板上,将会破坏甚至撕裂切片,使切片不能完整切出。

(2) 多例多块组织同时需做冰冻切片时,可各自放于不同的支承器上,于冷冻台上冻起来,然后按不同的编号依序切片,这样做既不费时也不易出差错。

(3) 放置组织进行冰冻前,应视组织的形状及走势来放置,所谓“砍柴看柴势”,切片也是如此,如果胡乱放置,就不能收到很好的检查效果。

(4) 组织块不需经各种固定液固定,尤其是含水的固定液,在未完全固定前,更不能使用。临床快速冰冻切片,不需要预先固定,一是为了争取时间,二是固定后的组织反而增加了切片的难度。如果使用未完全固定的组织做冰冻切片,就会出现冰晶。这是因为含水的固定液在组织未经固定前,其中的水分也可渗入到组织中去,当冰冻发生时,这些水分就存留于组织中,形成冰晶。

(5) 当切片时,如果发现冰冻过度,可将冰冻的组织连同支承器取出来,在室温停留片刻,再行切片;或者用口对组织块哈气,或者用大拇指按压组织块,以此来软化组织,再行切片;另外,调高冰冻点。

(6) 用于附贴切片的载玻片不能存放于冷冻处,应于室温存放。因为当附贴切片时,从室温中取出的载玻片与冷冻箱中的切片有一种温度差,当温度较高的载玻片附贴上温度较低的切片时,由于两种物质间温度的差别,在它们碰撞在一起时,分子彼此间发生转移而产

生一种吸附力,使切片与载玻片牢固地附贴在一起。如果使用冷藏的载玻片来附贴切片,由于温度相同,不会发生上述现象。

4. 冰冻切片的快速染色法 冰冻切片附贴于载玻片后,立即放入恒冷箱的固定液中,固定 1min 后即可染色。以往为了防止切片脱落,当切片附贴于载玻片后,用电吹风吹干后再固定。根据实验对比认为,这种做法欠妥,未经固定的切片,经强热作用后,蛋白质发生变性,核内含有的物质由于热的作用融合在一起,染色后镜下核内的各种物质不易分辨。将冰冻切片附贴于载玻片后,立即放入恒冷箱固定液中固定,这样可以使切片中细胞内各种物质在没有任何变化的情况下被固定起来。方法如下:①切片固定 0.5 ~ 1min;②水洗;③染苏木素 3 ~ 5min;④分化;⑤碱水中返蓝 20s;⑥伊红染色 10 ~ 20s;⑦脱水,用透明、中性树胶封固。

冰冻组织 1 ~ 2min,切片 1min,固定 1min,染色共 5min。总共在 10min 内完成快速制片过程,效果与石蜡切片不相上下。

冰冻切片的方法还有很多种,如甲醇循环的半导体冰冻切片法、二氧化碳冰冻切片法、半导体冰冻切片法和氯乙烷冰冻切片法等,这些方法目前来说已很少使用,故不做阐述。

五、新技术与神经病理诊断学

(1) 电子显微镜对疑难病例的诊断、鉴别和探讨组织发生等有一定的帮助。

(2) 免疫组织化学主要应用于鉴别诊断、功能分类、病因和发病机制研究、组织起源和指导临床治疗等。

(3) 自动图像分析主要用于形态定量研究和细胞核 DNA 含量的测定。

(4) 流式细胞分析(FCM)常用于细胞核 DNA 含量的测定。

(5) 原位核酸分子杂交。

六、局限性

首先,无论是外科病理学还是神经内科病理学诊断,都是根据临床表现、手术所见、肉眼变化和光镜下特征综合做出的。有时尚需结合免疫组织化学、流式细胞分析、自动图像分析、超微结构,甚至随访结果才能确诊,所以,是一门依赖经验积累的诊断学科,随着不断的实践和总结经验才能逐步提高。

其次,活检标本、大体取材和切片检查均属抽样检查,最终在光镜下见到的仅是病变的极小部分,有时不能代表整个病变,病理医师在诊断时和临床医师在阅读病理报告时均应加以注意。对手术切除标本,经组织病理学检查可发现 5% 以上是原来未知的疾病,因而应将每例标本均送病理检查。

病理诊断必须密切结合临床所见和其他特殊检查。组织病理学诊断也有一定的局限性,有时可产生诊断不足或诊断过头,偶尔也可能发生判断失误,若病理学诊断与临床不符,应及时与病理诊断医师联系,以便复查。对于病情复杂的病例,可举办由临床、影像诊断和病理医师共同参加的临床病理讨论会,经商讨后妥善处理。

七、影响病理诊断的因素

正确和及时的病理诊断需要临床和病理工作者良好的合作。影响神经病理诊断正确

性的因素很多,如前所述,诊断质量明显地取决于取材部位及病变组织是否存活以及临床医师的取材技术;病理方面主要问题是制片质量欠佳或偶然发生的污染和细胞、组织形态学的局限性和相对性。病理诊断目前是部分神经系统疾病的最后诊断,主要依靠光镜下观察切片或涂片的组织结构、细胞形态和染色特点,并结合临床和其他检查结果进行确诊,有时需借助于电镜、免疫组织化学技术、自动图像分析和流式细胞分析等新技术。

第二节 病理学组织固定与染料选择

一、常规组织固定

在组织病理学中,不管是组织切片、电镜还是大体标本的保存,都必须及时进行适当和有效的固定。组织只有经过固定,才能完成随后的一系列的制作,直至切片的最后完成。每个医务工作者都能容易地把组织固定起来,但是,要清楚了解固定的过程及其定义是一件十分不易的事,下面将逐一解答。

(一) 固定的作用

组织经一系列的处理后,就必须进行固定,当然有的组织是先固定,再进行处理,然后再固定。从组织学的角度来讲,固定的简单定义是:尽量保持细胞、组织的固有形态和结构。而从免疫组化技术的角度,固定的作用不仅是使细胞内蛋白质凝固,尽量减少或终止外源性酶和内源性酶的反应,防止细胞的自溶,以免使抗原扩散至组织间质,保持组织的固有形态和结构;更重要的是保持组织或细胞的抗原性,不但不导致抗原失活,而且不使抗原发生弥散现象,才能在免疫组化染色时,不产生过深的背景,不影响对阳性物的判断。

(二) 固定的目的

1. 防止细菌的腐蚀和组织的自溶 细菌无处不在,它们随时都可污染、腐蚀未经处理的组织。固定液可以固定任何蛋白质,凡有生命的东西,都由蛋白质组成,蛋白质被固定,生命就停止,细菌也就失去了活力。另外,在日常生活中,人们常可碰到这样的问题,一块肉不经处理放了几天后就会变质,这是因为组织离体后,供应这些组织的血液随之消失,细胞缺氧,细胞内溶酶体膜的结构受到破坏,破坏后释放出溶酶体酶,日常生活中常碰到的肉变质,就是细菌污染加组织自溶的结果。

2. 保存细胞固有的物质 能凝固或沉淀细胞内或组织液中的糖原等,使细胞或组织基本上保持与生活时的物质一样。细胞的固有物质,即细胞核、内质网、线粒体、高尔基器、溶酶体、过氧体、细胞骨架、组织液、抗原、糖原等,如果不及时被固定是很容易丧失的,尤其是溶酶体很容易受到破坏,因此应特别小心。

3. 使组织硬化,便于取材 刚离体的组织,除了胃组织以外,都是柔软的组织,尤其是肠道的组织,如果在没有固定时就取材,效果就很差,不是取材不规整,就是厚薄不均,黏膜和肌层很容易分开。因此,要取得规整标致的材料,就必须将组织彻底固定,再行取材。

4. 对某些具有传染性的标本,能防止疾病的扩散 病理标本种类繁多、成分复杂,各种病例都有,具有传染性的病种也不少,如结核、肝炎、麻风、性病等。对于此类标本,应进行彻底的固定后,再行取材,如结核球,固定时间应在3~5天。

5. 保存好大体标本 对于有教学任务的神经内科,除搞好疾病的诊断外,还要收集有价值的大体标本。有些大体标本是很难得到的,因此,要求在平时就要留心观察,小心处理。遇到有教学价值的罕见的典型的标本,就必须及时固定,认真对待。

6. 可增强染色的作用 组织经过及时的固定,最终可见到切片有鲜艳的染色。如果组织未经及时固定,核染色就会不清楚,呈淡灰色,由此可看出固定可以增强染色的效果。

(三) 固定的注意事项

1. 组织固定越新鲜越好 组织一经离体,就应及时固定。根据实验,如果要获得某些酶的染色,固定最好在组织离体后30s至1min内。对于其他达不到这些要求的,则是越快越好。

2. 组织固定时,组织块不宜过大 凡是需要固定的组织,都不应该太大、太厚,这是因为所有的固定液穿透力不够强、浸透不够快的缘故。如果较大、较厚的组织不经处理就进行固定,那么待固定液进入至组织块中间时,可能这些组织早就发生自溶了。因此,对于较大的组织,必须先进行处理,切成制片材料再行固定,这是最佳的处理方法。如遇到胃肠的器官,则应将其剪开,放平后,再行固定;若非特急病例,最好在固定后取材,因这类组织、黏膜和肌层容易分开,没固定时,难以取得最佳制片材料;对于产酶类的器官,如肝、肾、脾等,更要处理好,否则更容易出现自溶现象。

3. 对不同类型的组织应选择适当固定液 有的固定液对于组织有膨胀作用。固定剂是一种化学试剂,有液体和固体之分,一般使用较多的是液体,而固体固定剂如多聚甲醛,则多用于实验研究的组织固定。固定剂种类繁多,成分复杂,对组织的作用不尽相同。著名的组织化学专家Pearse指出,对于每个既定的组织化学方法来说,选择最合适的方法是极为重要的;在组织化学研究准备阶段,不论采用什么固定剂,都必须尽可能确切地知道它们对于各种组织成分的反应基团的效用。Jones(1973)指出,理想的固定剂必须具备的条件是:防止渗透损伤和收缩,使各级可见度的水平皆无形态变化;要求组织所有的成分能保留于原位。他认为有三种试剂即甲醛、戊二醛和丙烯醛接近于达到上述要求。为了更好地把组织中各种成分尽量保存好,尽量好地显示出来,就绝不能千篇一律地使用一种固定液,而必须认真深入地研究各种固定液的性能和使用方法。例如丙酮,它对组织有明显的皱缩、硬化作用,平常它是决不会被用来作为固定液的,用它不但太浪费,造价太高,而且也使切片较为困难,但是,对于某些酶的研究、狂犬病脑组织的固定、某些细胞的培养等,最好的固定液还是丙酮。因为如果使用甲醛固定液,石蜡切片对酸碱磷酸酶就显示不好,狂犬病病毒的包涵体就会消失掉。又如醋酸,它对胶原纤维等有膨胀的作用。由于各种固定液对不同的组织有不同的作用,因此,许多专家根据各种固定液的优缺点,总结出许多混合液的配制方法,对组织的良好固定起到了非常积极的作用。但是,值得指出的是,并非所有的固定液都是十全十美的,例如乙醇、甲醛、醋酸固定液,对组织固定很好,组织中各种物质的染色也十分清晰,但固定脱水盒为铜质的材质时,效果就不好。原因是醋酸跟铜可发生反应,