第二版

现代组织化学原理及应用

张锦生　主编

上海科学技术文献出版社

现代组织化学原理及应用

（第二版）

主　　编　张锦生

副 主 编　许祖德　朱虹光

编写人员　（按姓氏笔画排序）

许祖德　朱虹光　张月娥

张　农　张秀荣　张锦生

施达仁　郭慕依

上海科学技术文献出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代组织化学原理及应用/张锦生主编. —上海：上海科学技术文献出版社，2003.4
ISBN 7-5439-2114-6

Ⅰ.现… Ⅱ.张… Ⅲ.组织化学 Ⅳ.Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 015891 号

责任编辑：项暑烽
封面设计：何永平

现代组织化学原理及应用
(第二版)
主编 张锦生
*
上海科学技术文献出版社出版发行
(上海市武康路 2 号 邮政编码 200031)
全国新华书店经销
昆山市亭林印刷有限责任公司印刷
*
开本 787×1092 1/16 印张 10 字数 255 000
2003 年 4 月第 1 版 2003 年 4 月第 1 次印刷
印数：1—3 100
ISBN 7-5439-2114-6/R·556
定价：20.00 元

内 容 提 要

本书简要叙述现代组织化学(酶、免疫、杂交组织化学)的基本原理，结合编写者多年实践，详细介绍目前常用的和最新的方法，后者包括 Envision 法、原位 RT-PCR、原位端粒重复序列扩增法(ISTRAP)、组织芯片、冷冻细胞芯片、显微切割技术、活细胞原位荧光杂交(FIVH)等，并介绍酶及热修复抗原的原理、方法和经验。在应用方面，涉及肿瘤诊断、病原生物体检测、细胞外基质研究、免疫损伤和细胞增殖及凋亡等领域，并对后基因组时期，现代组织化学的应用前景也作了初步探究。书后附有常用技术实验指导、有参考价值的技术资料和相关的重要网址。本书适合研究生、临床病理工作者及其他有关科研人员使用。

前　言

常规组织化学技术通过以化学反应为主的染色方法区分胞质、胞核和细胞外基质，从而清晰地显示了正常或病理状态下的组织和细胞形态，并借此作出诊断。随着生物科学研究技术的发展，在组织、细胞标本上引入某些新技术，主要有生物化学的酶-底物反应、免疫化学的抗原-抗体反应以及分子生物学的 DNA 或 RNA 基因片段杂交反应。它们与组织形态学技术相结合分别形成酶组织化学、免疫组织化学和杂交组织化学，统称之为现代组织化学，通过光学或电子显微镜的观察，人们能够在组织、细胞以及核酸水平对细胞的蛋白合成、免疫反应作出定性、定位和定量的判断，使细胞的形态与功能有机地结合。因而现代组织化学技术已成为生物学、组织解剖学、病理学等研究中不可缺少的手段。

为了让研究生在短时间内能掌握常用的形态学研究新技术，我们从 1986 年起开设了免疫组化技术课程，1994 年又发展成现代组织化学课程，自编了相应教材，后者虽然比较粗糙，但因内容新颖、实用，受到研究生和其他实验室工作人员的欢迎。如今在试用四年的基础上，结合近几年的新发展，我们将原有教材改编、扩充，正式出版，奉献给读者，希望她在教学、科研以及临床病理检验中起到有益的作用。

本书作为医科研究生教材，编写中特别注意三条原则：①在顾及内容系统性、完整性的同时，更突出其先进性，尽可能包括近年来发展的、行之有效的新技术，如免疫组化、杂交组化技术的新进展，形态定量技术，细胞凋亡的检测等等；②对各种技术的介绍，既有精辟的原理讲解，又有最常用的实验操作步骤，使读者不仅能照着做，还能根据其原理作某些调整或创新；③在应用方面，注意到专业覆盖面，使各个专业的读者都能从中找到对应点，从而引起学习兴趣，并应用于自己的工作中。由于本书涉及的原理和方法有一定普遍性，故适用范围并不局限于医科，同样也适用于生物学乃至其他生命学科；读者也不仅是研究生，实验室各级工作人员也能从本书获益。

本书的顺利出版首先要感谢我校研究生院领导的大力支持。参加编写的人员除我校病理教研室的老师外，还特邀肿瘤医院病理科施达仁教授共同撰写。为了保证编写质量，各章节除执笔者外，还有专人审校。各位专家教授都为之付出了辛勤的劳动。左理华、刘琛等同志协助完成电脑输入。我们要特别感谢承接本书出版事务的上海科学技术文献出版社。最后，我们衷心地感谢读者的关注和厚爱，并热诚欢迎对本书的不足之处提出批评指正。

翟为溶　张锦生

试读结束：需要全本请在线购买：　www.ertongbook.com

再版前言

本书首版问世以来，已历时5年，期间生命科学和医学均有突飞猛进的发展。尤其是人类基因组DNA序列草图的完成，人类已进入后基因组和蛋白组学时代。作为生命科学和医学常用的必不可少的研究手段或方法，现代组织化学也有了长足进展。常规免疫组织化学的PAP或ABC法已大有逐步被更为敏感、更为便捷的EnVison二步法取代的趋势。由于高科技显微切割仪的问世，免疫组织化学和杂交组织化学所显示的表型一致的纯细胞群有可能被精确而便捷地从组织切片中分离出来，进行分子水平的研究。在DNA芯片的启发下，近年又发明了组织芯片和冷冻细胞芯片技术，应该说这是现代组织化学史上的一次飞跃。绿色荧光蛋白(GFP)在组织化学中的价值重新被认识，基于GFP的组织荧光方法已在基因功能研究、基因治疗、发育生物学等方面得到广泛应用。活细胞荧光杂交(fluorescence in vivo hybridization, FIVH)是在FISH的基础上发展起来的，虽然目前技术还不完全成熟，但在细胞分子生物学的研究中已经显示其不可取代的作用。为了使研究生和读者能获取更新的知识，有必要对第一版的内容进行修改和补充，更新和补充的内容约占1/3。在复旦大学研究生院的关心和大力支持下，本书第二版得以顺利出版。在此特向研究生院的领导表示诚挚的感谢。本书是各位编者在繁忙的教学、科研和临床病理服务中抽暇编撰而成，错误和不足难免，衷心希望读者指正、批评，不胜感激。

张锦生　许祖德　朱虹光

目　录

1. 酶组织化学 …… 1
1.1 酶组织化学的原理及一般原则 …… 1
1.1.1 酶组织化学的基本原理 …… 1
1.1.2 酶组织化学的一般原则 …… 1
1.2 酶组织化学对组织处理的要求 …… 1
1.3 酶显示方法 …… 2
1.3.1 金属离子沉淀反应 …… 2
1.3.2 偶氮盐偶联反应 …… 2
1.3.3 靛蓝反应 …… 3
1.3.4 四唑反应 …… 3
1.4 酶组织化学的应用 …… 3
1.4.1 了解组织细胞的代谢活动 …… 3
1.4.2 细胞类型的判定 …… 3
1.4.3 细胞定位 …… 3
1.4.4 癌变过程的研究 …… 3
1.4.5 免疫组化和杂交组化的显示手段 …… 4
2. 免疫组织化学 …… 5
2.1 免疫组织化学中的免疫化学 …… 5
2.1.1 抗原的提取和纯化 …… 5
2.1.2 合成肽的选择及半抗原的处理 …… 8
2.1.3 细菌超表达克隆化基因作为抗原的常用方法及原则 …… 9
2.1.4 抗体的制备 …… 9
2.1.5 抗体的标记 …… 12
2.2 组织细胞的处理 …… 13
2.2.1 组织细胞处理的重要性 …… 13
2.2.2 取材 …… 14
2.2.3 固定 …… 14
2.2.4 脱水 …… 16
2.2.5 包埋 …… 17
2.2.6 切片 …… 17
2.2.7 染色 …… 18
2.2.8 切片封固和保存 …… 18
2.3 石蜡组织切片中抗原性的修复 …… 18
2.3.1 蛋白酶消化修复 …… 18

2.3.2 热修复 …… 19
2.3.3 微波照射与蛋白酶消化联合应用 …… 20
2.4 免疫组织化学染色原理和方法 …… 21
2.4.1 免疫荧光法 …… 22
2.4.2 免疫酶法 …… 23
2.4.3 亲合免疫组化 …… 24
2.4.4 其他方法 …… 26
2.4.5 免疫组化染色阳性信号的原位放大 …… 27
2.5 非特异着色及对照的设置 …… 27
2.5.1 非特异着色及其消除方法 …… 27
2.5.2 对照设置 …… 29
2.5.3 增强对比度,提高染色效果 …… 30
2.6 双重或多重免疫组化 …… 30
2.6.1 常用的双标或多标记法 …… 30
2.6.2 消除双重染色间交叉反应的方法 …… 32
2.6.3 双标或多标记染色的注意事项 …… 32
2.7 免疫电子显微镜技术 …… 33
2.7.1 标记物 …… 33
2.7.2 包埋前法 …… 34
2.7.3 包埋后法 …… 36
2.7.4 不包埋法 …… 37
2.7.5 双标记或多标记法 …… 37
3. 杂交组织化学 …… 39
3.1 杂交组织化学的原理 …… 39
3.2 探针类型、制备及标记 …… 40
3.2.1 探针的类型和制备 …… 40
3.2.2 探针的标记 …… 41
3.3 组织和细胞标本的准备 …… 46
3.4 原位杂交技术 …… 47
3.4.1 杂交前处理 …… 47
3.4.2 杂交 …… 48
3.4.3 杂交后处理 …… 49
3.4.4 对照 …… 49
3.5 原位 PCR 技术 …… 50
3.5.1 直接原位 PCR …… 50
3.5.2 间接原位 PCR …… 50
3.5.3 原位反转录 PCR …… 51
3.5.4 原位端粒重复序列扩增法 …… 51
3.6 杂交组织化学的进展 …… 51

3.6.1 双重或多重杂交组化技术…… 51
3.6.2 杂交-免疫组化联合检测 …… 52
3.6.3 电镜下的杂交组化…… 52
3.6.4 原位标记杂交…… 52
4. 现代组织化学定量技术 …… 54
4.1 图像分析技术概述…… 54
4.2 图像处理和分析的基本原理…… 54
4.3 图像分析的基本方法…… 55
4.3.1 二维几何参数的测量…… 55
4.3.2 灰度参数和光密度测量(图像细胞光度技术)…… 56
4.3.3 其他…… 56
4.3.4 激光扫描共聚焦显微镜…… 56
4.4 图像分析和形态定量技术的应用前景…… 57
5. 现代组织化学的应用 …… 59
5.1 肿瘤诊断与鉴别诊断…… 59
5.1.1 上皮性肿瘤…… 59
5.1.2 淋巴瘤…… 61
5.1.3 软组织肿瘤…… 67
5.1.4 神经内分泌肿瘤…… 69
5.1.5 肿瘤中雌、孕、雄激素受体…… 70
5.1.6 肿瘤中癌基因和抗癌基因…… 72
5.1.7 肿瘤细胞增殖活性…… 75
5.2 免疫性疾病的诊断与研究…… 76
5.2.1 常用免疫组化试剂…… 77
5.2.2 免疫性损伤…… 78
5.2.3 变态反应性疾病…… 79
5.2.4 移植物排异反应…… 81
5.3 细胞外基质的研究…… 81
5.3.1 细胞外基质的成分…… 81
5.3.2 细胞外基质的生成和降解…… 84
5.3.3 细胞外基质的原位检测方法…… 86
5.3.4 细胞外基质原位检测的应用…… 88
5.4 病原生物体的检测…… 90
5.4.1 病毒核酸及表达产物的定位…… 90
5.4.2 细菌…… 99
5.4.3 寄生虫和真菌 …… 100
5.5 细胞增殖、凋亡及其检测…… 101
5.5.1 细胞增殖的检测 …… 101
5.5.2 细胞凋亡的表现及其调控 …… 101

5.5.3 细胞凋亡的诱导和抑制 …… 103
5.5.4 凋亡的检测 …… 103
5.5.5 细胞凋亡的医学意义 …… 106
6. 现代组织化学的进展 …… 110
6.1 现代组织化学与显微切割技术 …… 110
6.1.1 显微切割技术的原理 …… 110
6.1.2 显微切割的方法 …… 110
6.1.3 显微切割后的细胞处理 …… 112
6.1.4 显微切割的应用 …… 112
6.2 组织芯片 …… 115
6.3 冷冻细胞阵列 …… 115
6.4 荧光及杂交组织化学新进展 …… 115
6.4.1 绿色荧光蛋白及其突变体 …… 116
6.4.2 荧光组织化学在探索新基因功能方面的应用 …… 116
6.4.3 绿色荧光蛋白与转基因及基因敲除动物 …… 117
6.4.4 绿色荧光蛋白与基因治疗 …… 119
6.4.5 活细胞荧光杂交 …… 120
7. 常用现代组织化学实验指导 …… 123
7.1 酶组织化学实验 …… 123
7.1.1 葡糖-6-磷酸酶(G-6-P):Wachstein-Meisel 法 …… 123
7.1.2 γ-谷氨酰转肽酶(GGT):改良 Albert 法 …… 123
7.1.3 碱性磷酸酶(AP):偶氮染料偶联法 …… 123
7.2 免疫组织化学实验 …… 124
7.2.1 免疫荧光法实验 …… 124
7.2.2 免疫酶法实验 …… 125
7.2.3 亲合免疫组化实验 …… 125
7.2.4 免疫电镜实验示教(包埋前-酶标直接法) …… 126
7.2.5 ELPS 法(二步法)检测乳腺癌雌激素受体(ER) …… 127
7.3 杂交组织化学实验 …… 127
7.3.1 探针标记实验 …… 127
7.3.2 原位杂交 …… 130
7.4 形态定量实验(示教) …… 132
7.4.1 细胞核二维几何参数的测量 …… 132
7.4.2 胶原免疫组化染色的定量 …… 133
附录Ⅰ …… 134
一、标本的采集和处理 …… 134
1. 活检组织 …… 134
2. 手术切除和尸检标本 …… 134
3. 细胞标本 …… 134

4. 体外培养细胞 …… 134
5. 实验动物组织标本 …… 134
二、石蜡切片制作流程 …… 134
三、冷冻切片制作流程 …… 135
1. 组织冷冻 …… 135
2. 冷冻切片机及切片 …… 135
四、HE染色及常用的衬染方法 …… 136
1. 石蜡切片苏木精-伊红染色(HE染色) …… 136
2. 常用的衬染方法 …… 136
五、常用特殊染色方法简介 …… 136
1. 胶原纤维染色法——van Gieson苦味酸和酸性品红法 …… 137
2. Masson结缔组织三色染色法 …… 137
3. Weigert弹力纤维染色法 …… 138
4. Gordon-Sweet网状纤维染色方法 …… 138
5. 糖原染色——periodic acid schiff染色法(PAS法) …… 138
6. 基膜染色——六胺银法(periodic acid-silver methenamine，PASM法) …… 139
7. AgNOR的石蜡切片染色法 …… 139
8. 核酸染色——酸水解-无色品红法(Feulgen and Rossenbekk) …… 140
六、常用固定液的配制 …… 140
1. 4%甲醛溶液 …… 140
2. 乙醇-醋酸-甲醛混合液 …… 140
3. 中性缓冲甲醛固定液 …… 140
4. B-5固定液 …… 140
5. 4%多聚甲醛固定液 …… 141
6. 多聚甲醛-戊二醛(PG)固定液 …… 141
7. 多聚甲醛-赖氨酸-过碘酸钠(PLP)固定液 …… 141
8. Carnoy固定液 …… 141
9. Bouin固定液 …… 141
10. Zenker固定液 …… 141
11. 2.5%戊二醛固定液 …… 141
12. 1%锇酸固定液 …… 141
13. 其他固定液 …… 141
七、常用缓冲液的配制 …… 142
1. 甘氨酸-HCl缓冲液(0.05 mol/L) …… 142
2. 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol/L) …… 142
3. Na_2HPO_4 柠檬酸缓冲液 …… 142
4. 磷酸缓冲液(PB，0.2 mol/L) …… 143
5. 醋酸缓冲液(0.2 mol/L) …… 143
6. KH_2PO_4-NaOH缓冲液(0.05 mol/L) …… 143

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

7. 巴比妥缓冲液 …… 143
8. Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L) …… 144
9. 甘氨酸-NaOH 缓冲液(0.05 mol/L) …… 144
10. 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(0.1 mol/L) …… 144
11. 二甲砷酸-HCl 缓冲液(0.05 mol/L) …… 145
12. Tris-马来酸缓冲液(0.1 mol/L) …… 145
八、常用酶消化液配制 …… 145
1. 0.1%胰蛋白酶(trypsin)消化液 …… 145
2. 0.2%胃蛋白酶(pepsin)消化液 …… 145
3. 0.05%链霉蛋白酶(pronase)消化液 …… 145
4. 蛋白酶 K(proteinase K)消化液 …… 145
九、免疫组化染色常用显色液 …… 145
1. 3, 3′-二氨基联苯胺(3, 3′-diamino-benzidine, DAB)显色液 …… 145
2. 4-氯-1-萘酚(4-chloro-1-naphthol, CN)显色液 …… 146
3. 3-氨基-9-乙基咔唑(3-amino-9-ethylcarbazole, AEC)显色液 …… 146
4. NBT(nitro blue tetrazolium)和 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)显色液 …… 146
十、常用组织切片粘附剂及使用方法 …… 146
1. 白胶液 …… 146
2. 多聚赖氨酸(poly-L-lysin, Sigma) …… 146
3. 3-氨丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyltriethoxysilane, APES) …… 146
4. 铬明矾明胶液 …… 146
5. 甲醛-明胶液 …… 146
十一、水溶性封固剂——缓冲甘油明胶液 …… 147
附录Ⅱ …… 148
重要相关网址 …… 148

1 酶组织化学

酶组织化学是通过细胞内的酶催化底物的作用并借助显色反应在切片或涂片上显示组织或细胞中内源性酶的活性及定位的方法。自 Klebs 于 1868 年首次采用这一方法显示组织中的过氧化物酶以来，已近 130 年的历史，但直至 20 世纪，酶组织化学才得到长足发展并成为组织化学中一门独立的分支。目前用这一技术显示的酶已逾一百种。20 世纪 70 年代后，随着免疫组织化学技术的不断开拓，酶组织化学的发展趋缓，免疫组化与酶组织化学相比虽有许多优点，但在某些方面前者并不能完全代替后者，故酶组织化学仍有应用价值。

1.1 酶组织化学的原理及一般原则

1.1.1 酶组织化学的基本原理

酶组织化学就是利用细胞内的酶催化分解合适的底物，生成中间产物，即初反应产物(primary reaction product，简称 PRP)。然后其中之一再与辅助物经一或二步反应生成有色不溶的终反应产物(final reaction product，FRP)，沉积在原位以显示酶的存在。在此过程中可能会出现 PRP 的弥散而造成定位不准确。弥散受三个因素左右，一是底物在酶催化下水解的速度；二是 PRP 在缓冲液中的弥散系数；三是 PRP 与辅助物反应的速度。选择合适的底物和辅助物可以使水解反应和 PRP 与辅助物的反应迅速进行以减少弥散，有时辅助物的浓度过高不但会抑制酶的活性，而且还会影响 FRP 的形成，一般以不超过 1 mg/ml 为宜。

1.1.2 酶组织化学的一般原则

酶组织化学欲取得满意的结果，必须遵循一些基本的原则，它们是：

(1) 对标本的处理和制片过程不能影响酶的活性及分布；

(2) 所选择的底物和辅助物必须能迅速和同步地渗透到组织和细胞中去；

(3) 所选择的底物最好只能被一种酶催化分解；

(4) 所选择的辅助物不能影响酶的活性和其他反应剂穿透进入细胞；

(5) PRP 必须能迅速与辅助物进行反应，且 FRP 是水不溶性的有色而稳定的物质；

(6) 所有参加反应的试剂都不能与组织细胞内除了所检测的酶以外的任何成分自行吸附或结合。

1.2 酶组织化学对组织处理的要求

组织经一般固定剂固定、常规石蜡包埋的方法处理后酶的活性几乎都会丧失，仅极少数情况例外(如氯乙酸酯酶)，除非针对具体的酶使用特殊的固定剂和特殊的包埋方法，才可以部分保持酶的活性，如用丙酮固定，低温乙醇脱水，低温石蜡包埋，可部分保持大鼠肝脏内的γ-谷氨酰转肽酶的活性。所以酶组织化学一般都使用冷冻切片。新鲜组织立刻用液氮速冻，为了使组织结构保持得更好，也可使用经液氮冷却的异戊烷(isopentane)。速冻时最好

使组织包埋于 OCT 以便容易切片。速冻的组织在－20 ℃酶的活性仍易丢失，故只能短期暂存，如要长期保存组织块，应置于－70 ℃。在冷冻保存时，还要防止水分蒸发使组织变干。冷冻切片在染色前可以预固定也可以不固定，为了使组织形态结构保持良好，常用低浓度(1%～4%)的多聚甲醛、甲醛或戊二醛进行预固定。其中甲醛能较好地保持酶的活性。

细胞涂片和培养细胞在制备后应迅速使其干燥，以保持酶的活性，在干燥的情况下，室温可保存数周，相反，放在 4 ℃冰箱或无包装放在－20 ℃常使酶失活。如想保存较长时间，则应密封放在－20～－70 ℃。

1.3 酶显示方法

酶组织化学中酶的显示方法众多，归纳起来，有以下几类：

(1) 同步显示法　细胞中的酶催化底物水解生成的 PRP 立即与辅助物如偶氮盐或金属离子等反应成为有色不溶的 FRP，沉积在原位以显示酶的存在。

(2) 二步显示法　也称孵育后偶联法，此法中，酶促底物的水解反应和 PRP 与辅助物的显色反应是前后分开进行的，其优点是可以充分满足这两种反应的最适 pH，尤其当它们各自要求的 pH 相差较大时。另外，有时酶促底物的水解反应要求较长的孵育时间，而有些辅助物在这段时间中已开始分解，用二步显示法可避免此不足。此法的局限性是要求 PRP 停留原位不发生弥散。

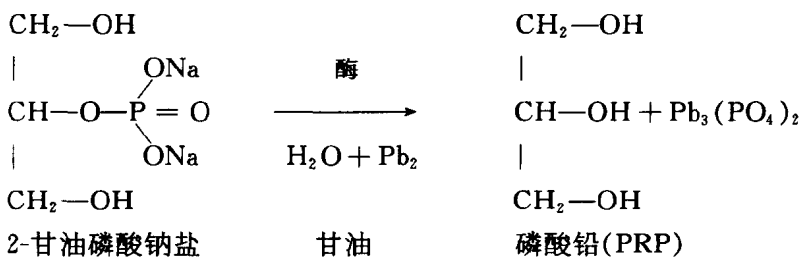
(3) 底物自身显示法　酶促底物水解反应后，有色底物的溶解基团被去除而生成不溶的有色物质，或者底物分子内部重组生成有色的不溶物质沉积原位以显示酶的存在。

现就常用的几种方法简述之。

1.3.1 金属离子沉淀反应

酸性磷酸酶的 Gomori 反应是典型的例子，其原理如下：

1. 酶促反应



2. 显色反应

$$Pb_3(PO_4)_2 + 3S^{2-} \longrightarrow 3PbS(\text{棕黑色沉淀})(FRP)$$

用此法显示的酶还有 ATP 酶和 5'-核苷酸酶等。

1.3.2 偶氮盐偶联反应

在这类反应中，PRP 与偶氮盐结合，生成不溶的偶氮染料，以碱性磷酸酶为例说明之。

$$\alpha\text{-萘基磷酸钠} \xrightarrow{\text{酶}+\text{水}} \text{磷酸氢二钠} + \alpha\text{-萘酚}$$

$$\alpha\text{-萘酚} + \text{FAST BLUE} \longrightarrow \text{偶氮染料} \downarrow$$

用此法显示的酶还有酯酶、转肽酶、肽酶等。

1.3.3 靛蓝反应

在这类反应中，底物被酶分解为两个 PRP，其中之一可在一定的条件下形成不溶的靛蓝。以酯酶反应为例：

$$\text{吲哚酚酯} \xrightarrow{\text{酶}+\text{水}} \text{吲哚酚} + \text{RCOOH}$$

$$2\ \text{吲哚酚} \xrightarrow{\text{氧化作用}} \text{靛蓝} \downarrow$$

靛蓝反应还可用来显示胆碱酯酶、磷酸酶、糖苷酶和非特异性酯酶等。

1.3.4 四唑反应

底物被某些氧化酶或脱氢酶氧化脱氢后，产生的氢离子传递给四唑盐，四唑盐在这里作为一种受氢体，还原后形成有色的沉淀物。常用的四唑盐有两种，一种是双四唑盐，如氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium 即 NBT)，还原后产生的深色沉淀不溶于脂肪；另一种是单四唑盐，如 MTT[3(4, 5-dimethyl thiazolyl-2YL)2, 5-diphenyltetrazolium bromide]还原后生成有色的细颗粒，能溶解于脂肪。

单胺氧化酶和几乎所有的脱氢酶都可以用此法显示。

1.4 酶组织化学的应用

酶组织化学用来确定组织细胞有无某种酶的活性，故至少在以下五个方面有其应用价值。

1.4.1 了解组织细胞的代谢活动

酶组织化学既可以在原位观察生理情况下组织中不同部位的细胞代谢的差异，还可以研究病理状态下细胞代谢活动的改变。如心肌梗死发生的 4～6 小时内，HE 切片上是不会发现明显变化的，而用酶组织化学可显示心肌在梗死早期(2 小时左右)即出现能量代谢变化，梗死心肌细胞内的琥珀酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、细胞色素氧化酶和磷酸化酶的活性均明显下降；又如 Reye 病时，酶组织化学可显示肝细胞缺乏琥珀酸脱氢酶。这些酶活性变化的检测有助于病理诊断。

1.4.2 细胞类型的判定

在细胞培养和临床细胞学检查时，有些细胞可以通过酶组织化学而确定其类型。如在血液细胞范围内，非特异性酯酶被认为是单核细胞和巨噬细胞的特异性标记，据此可与其他血细胞区别，但这种特异性是有一定范围的，因为上皮细胞和脂肪细胞此酶的活性也很高；另外，氯乙酸酯酶可以作为中性粒细胞的特异性标志。由于很多酶都有广泛的细胞分布，因此单依靠酶组织化学有时很难对细胞进行分类。目前，细胞类型的判定大部分已被免疫组化所替代。

1.4.3 细胞定位

在组织中有些特殊细胞的定位可以依靠酶组织化学，如在小肠中用乙酰胆碱酯酶(ACE)进行神经节细胞和神经纤维的定位；在皮肤中用 ATP 酶进行朗汉斯(朗罕氏)细胞的定位；在各种组织中用非特异性酯酶进行巨噬细胞的定位等。

1.4.4 癌变过程的研究

应用酶组织化学研究癌变过程主要在肝脏中进行，用化学致癌剂诱发大鼠肝癌的最早期，肝脏的 HE 切片未显示明显变化，但用组织化学和酶组织化学能观察到肝内一些肝细胞灶已发生糖代谢紊乱。具体讲，用过碘酸雪夫反应显示这些肝细胞有糖原沉积的增加，铅盐

法酶组织化学可发现糖原过度沉积的肝细胞葡糖-6-磷酸酶(G-6-P)的活性明显下降,同时糖原磷酸化酶的活性也下降,但用四唑盐法却可见 6-磷酸葡糖脱氢酶活性增高,这些酶活性的改变与肝细胞糖原的过度沉积有关。随诱癌过程的进展,沉积的糖原可逐步减少,出现嗜碱性肝细胞灶,此时,γ-谷氨酰转肽酶活性(GGT)可显示阳性。同样的现象在长期服用避孕药的妇女的肝脏中也可出现。也有报道,在人肝再生结节性增生灶中有与动物肝相似的糖原过度沉积及其有关酶活性的改变。但这种糖代谢的改变究竟与肝细胞的癌变有何关系尚有待进一步深入研究。笔者曾用酶组织化学对大鼠肝癌的癌变过程的 GGT 活性进行过研究。在非致癌剂 D-半乳糖胺与致癌剂 3'Me-DAB 所致肝组织损害的材料中,肝细胞 GGT 酶组织化学的反应不同,前者为阴性而后者为阳性。酶组织化学结合^{3}H-dT 放射自显影的结果显示,GGT 阳性肝细胞结节中肝细胞的增殖远较 GGT 阴性结节中的活跃,而这种增生迅速的肝细胞被认为是一种癌前的病变,因此 GGT 可作为肝癌的癌前病变的标记。用 GGT 的酶组织化学结合甲胎蛋白(AFP)免疫组织化学的双染色,观察了 3'-Me-DAB 诱发大鼠肝癌的癌变过程,发现由卵圆细胞演变而来的过渡细胞和小肝细胞及其增生结节 AFP 和 GGT 均可显示阳性,另外去分化肝细胞及其嗜酸性增生结节中的肝细胞当出现异形时,AFP 和 GGT 也阳性,从而提出肝癌的发生可归纳为二大来源,其一来自肝内干细胞或卵圆细胞的增生,由卵圆细胞演变而成的,一般为小细胞性嗜碱性增生结节,癌变后形成的肝细胞癌分化程度也较低。肝癌的另一种来源可能通过原有肝细胞受致癌剂的引发或始动作用而成的所谓的抵抗细胞,增生后主要形成嗜酸性肝细胞增生结节,形成的肝细胞癌分化程度相对较高。这些结果对研究人肝癌的组织发生和分型可能有着重要的参考价值。如上所述,GGT 和 G-6-P 可分别作为肝癌的癌前病灶的阳性和阴性标记来显示肝癌的癌前病灶,故借助定量立体学的方法还可对其进行定量分析。

1.4.5 免疫组化和杂交组化的显示手段

酶组织化学又是免疫组织化学和杂交组织化学常用的一种显示方法。无论是免疫酶组化还是标有生物素或 digoxigenin 探针的杂交组化,其最后一步,常要依靠标记酶催化底物形成不溶的有色物质沉淀于原位以显示被检物质的存在。常用的标记酶是辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。

(张锦生)

参 考 文 献

[1] 张锦生,应越英,徐元鼎.以 γ-谷氨酰转肽酶为标记对实验性肝癌癌变过程的研究.上海第一医学院学报,1983 10(4):263

[2] 徐元鼎,张昭成,张锦生等.3'-Me-DAB 诱发大鼠肝癌的实验病理研究.中华病理学杂志,1988 17(2):87

[3] Bannasch P. Pathobiology of chemical hepato-carcinogenesis: Recent progress and perspectives. Part Ⅱ, Metabolic and Molecular changes. J. Gastroenterol and Hepatol, 1990, 5: 310

[4] Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. Edinburgh, London, New York. Churchill Livingstone, 1981

[5] van Basten CDH, Broekuizen R, van Houte AJ et al. Laboratory Course on Modern Histochemistry. A Syllabus by Department of Pathology, University Hospital, Utrecht, The Netherlands. 1989

[6] Mehta R. The potential for the use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis. Cancer Letters 1995, 93: 85

2 免疫组织化学

2.1 免疫组织化学中的免疫化学

免疫组织化学中常用的免疫化学方法有抗原的提取和纯化，抗体的制备及免疫球蛋白的提取、抗体的标记。近年来，免疫化学方法已经进入分子生物学阶段，对极微量而难以提取的抗原，可根据 cDNA 的顺序来合成多肽而获得，而单克隆抗体则已用基因工程方法来大量制备。尽管如此，一般实验室仍使用常规方法，分述于后。

2.1.1 抗原的提取和纯化

提纯抗原的目的是制备特异性抗体，抗原越纯制备的多克隆抗体特异性越高。从理论上讲，单克隆抗体对抗原的纯度要求不高，但实际上不纯的抗原会给克隆筛选带来一定的困难，故如果可能，仍应尽量应用高纯度的抗原，特别是在制备抗原目标明确时。

1. 抗原的概念

凡能在机体内引起体液免疫和(或)细胞免疫反应的物质，称为抗原。抗原具有两方面的特性，抗原能使机体产生抗体和(或)致敏淋巴细胞，称之为免疫原性；抗原还能与相应的抗体及致敏淋巴细胞发生特异性的结合或反应，称为免疫反应性。有免疫反应性而缺乏免疫原性的抗原称为半抗原。半抗原与载体(通常是大分子物质)结合，可变为全抗原。载体不仅增加了半抗原的大小，可在体内激发免疫反应，而且还直接与免疫记忆有关。

2. 抗原的分类

抗原有可溶和不溶性两类，后者主要包括一些颗粒性抗原，如细胞、细胞器、某些病原体等。根据性质，抗原又可分为：①结构抗原，为组成细胞结构的成分，如细胞骨架蛋白；②分泌抗原，为细胞所产生和分泌的酶、激素、粘液蛋白等；③沉积抗原，如肾小球肾炎时沉积在肾小球基膜的免疫球蛋白、补体和免疫复合物等；④入侵抗原，主要指病原微生物。

3. 抗原提纯的一般原则

免疫组化方法检测的抗原中，蛋白质占了大多数，故此处叙述的一般原则以蛋白抗原为主要对象。

(1) 抗原检测方法的选择及建立　为确保抗原提取纯化的成功，在正式开始前，就先建成合适的定性或定量的检测方法，以跟踪检测一系列提纯过程中抗原是否存在，其含量和活性如何。这些方法大致可分为特异和非特异性两种。特异的方法是利用抗原的特异性反应，包括抗原(酶)与底物、抗原与受体、抗原与已知抗体之间的反应以及抗原的生物效应来判定抗原的存在和活性。此方法可靠，但必须具备一定的条件，如少量的标准抗体、特异的酶活性测定方法、受体测定方法和生物效应测定方法等。非特异性的方法是利用抗原已知的理化性质，如溶解度、沉降系数、凝胶层析行为、电泳行为、等电点(pI)等来估计抗原的存在、活性和含量。如用制备电泳纯化大鼠甲胎蛋白(AFP)，当聚丙烯酰胺凝胶浓度 T =

试读结束：需要全本请在线购买：　www.ertongbook.com