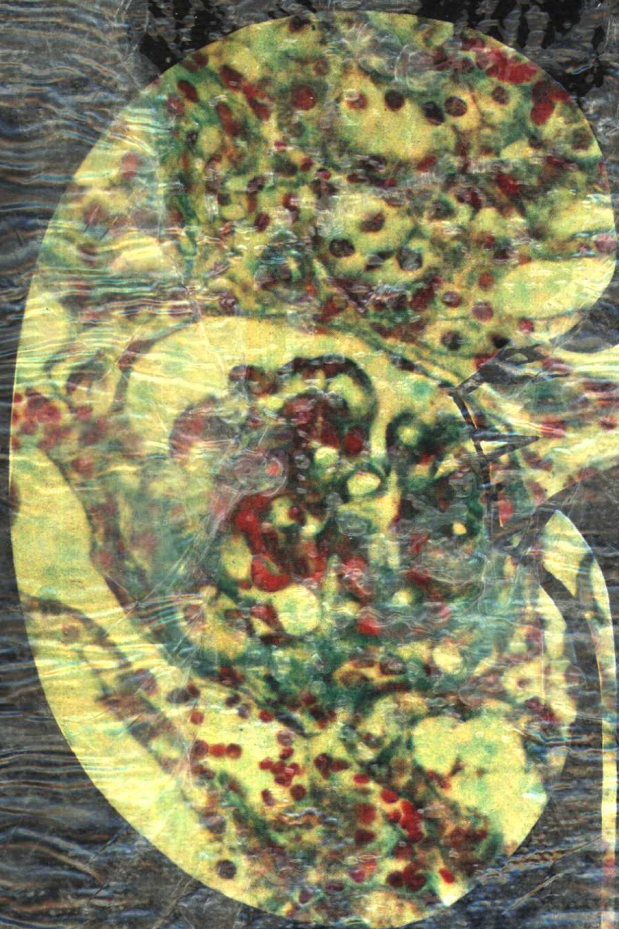


RENAL PATHOLOGY AND
RENAL DISEASES

肾脏病理与临床

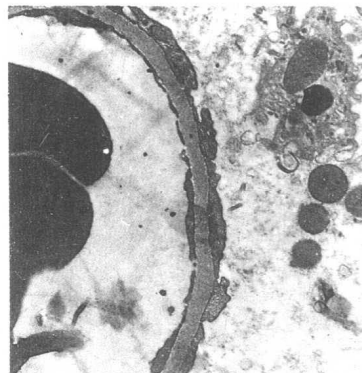
● 邹万忠编著



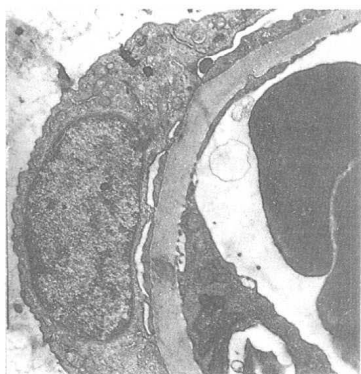
Renal Pathology and Renal diseases

RENAL PATHOLOGY
AND RENAL DISEASES

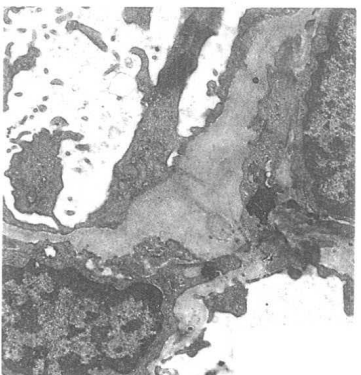
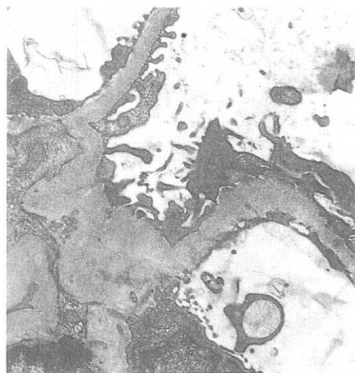
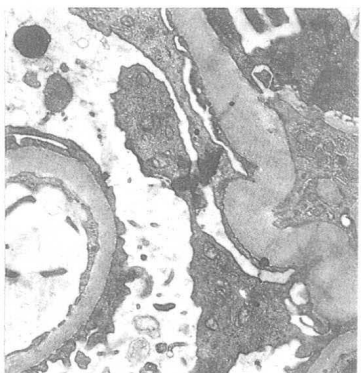
● 湖南科学技术出版社



肾脏病理与临床



- 主 编: 邹万忠
- 编 写: 邹万忠 谌贻璞
刘瑞洪
- 评 阅: 王海燕
- 湖南科学技术出版社



湘新登字004号

肾 脏 病 理 与 临 床

邹万忠 编著

责任编辑：周海燕 汪 华

米

湖南科学技术出版社出版发行

(长沙市展览馆路3号)

湖南省新华书店经销

湖南省新华印刷三厂印刷

(印装质量问题请直接与本厂联系)

米

1993年7月第1版第1次印刷

开本:787×1092毫米 1/16 印张:7.25 插页:59 字数:176,000

印数: 1—2,600

ISBN 7—5357—1110—3

R·236 定价:28.00元

地科 123—60

前 言

肾脏疾病的病理学诊断是病理学的一个重要分支，也是肾脏病学不可分割的部分。

肾脏疾病的病因发病机制很复杂，免疫反应占有很大比重，要求病理医生进行肾脏疾病的病理诊断时，不但要通晓常规病理学知识，尚须对免疫病理学和超微病理学有深入了解，而且也要求有一定的肾脏病学的基础。另一方面，肾脏疾病的病理学分类已直接应用到了临床，与临床诊断、治疗和判断预后有密切关系，因此也要求临床肾脏病医生对肾脏病理具备一定的基础。

近年来，肾脏病学在我国迅速发展，肾脏活体穿刺检查方法在逐渐推广，因而对肾脏疾病的病理学诊断的要求也逐渐迫切。为了适应新情况和广大病理医生、临床医生的迫切需要，作者根据多年来在实际工作中积累的大量资料和经验，参阅了国内外有关文献，编写了此书。

本书内容从我国实际情况出发，以肾脏病理形态为基础，着重介绍肾脏病理在光学显微镜、免疫荧光和电子显微镜的形态表现，适当吸收了免疫组织化学和免疫电子显微镜的方法及材料。为使读者循序渐进地领会肾脏病理知识，本书先简介了正常肾脏的形态特点，继而分析了肾脏病理基本规律，最后阐述了各种肾脏疾病的病理特征。对于理论问题，采用简明实用的观点，不作过细的叙述和探讨，尽量用形态学的材料来阐述问题。为了便于开展具体工作，本书还对肾脏病理的病理技术和经验作了介绍。

在本书编写过程中，三位作者从各自的肾脏病理和肾脏病临床的专长出发，反复磋商，最后成书，但限于我们的经验，仍不能避免差错，衷心希望同道们指出。在编写中，得到了北京医科大学第一医院肾病科王海燕教授的支持和指导，并在百忙中给予评阅。得到了北京医科大学病理教研室吴秉铨教授的大力支持。得到了病理学界和肾脏病学界的前辈和同道们的支持与鼓励。北京医科大学病理教研室技术室的张瓦利、张梅、陶继荣、韩志慧，电镜室的王盛兰、刘艳玲等同志在病理标本制作方面，邵宏权、衡万杰等同志在照片制作方面，均付出了很多劳动，在此一并致谢。

邹万忠

于北京医科大学病理教研室

1991年3月

目 录

第一章 肾脏疾病的病理取材	(1)
第二章 肾脏疾病的病理研究方法及标本制作要点	(4)
第三章 肾脏的正常结构	(14)
第四章 肾脏疾病中常出现的基本病变	(23)
第一节 肾小球病变	(23)
第二节 肾小管病变	(29)
第三节 肾血管病变	(30)
第四节 肾间质病变	(30)
第五章 肾脏疾病的形态学分类原则	(32)
第六章 肾小球疾病	(33)
第一节 肾小球病变的病因发病机制	(33)
第二节 肾小球疾病的形态学分类	(38)
第七章 原发性肾小球疾病	(41)
第一节 轻微肾小球病变	(41)
第二节 局灶性肾小球病	(42)
第三节 膜性肾病	(44)
第四节 系膜增生性肾小球肾炎	(46)
(附) IgM 及 C _{1q} 肾病	(47)
第五节 毛细血管内增生性肾小球肾炎	(47)
第六节 膜增生性肾小球肾炎	(49)
第七节 新月体肾小球肾炎	(51)
第八节 增生硬化性和硬化性肾小球肾炎	(53)
第九节 不能分类的肾小球病	(53)
第八章 继发性肾小球肾炎	(55)
第一节 狼疮性肾炎	(55)
第二节 过敏性紫癜性肾炎	(57)
第三节 IgA 肾病	(58)
第四节 抗基膜性肾炎	(59)
第五节 细菌性心内膜炎及分流性肾炎	(61)
第六节 梅毒及麻风肾小球病	(61)
第七节 疟疾和血吸虫性肾小球病	(62)
第九章 结缔组织疾病的肾脏损伤	(64)

第一节	风湿热的肾损伤	(64)	第五节	硬皮病的肾损伤	(66)
第二节	类风湿性关节炎的肾损伤	(64)	第六节	干燥综合征的肾损伤	(67)
第三节	结节性多动脉炎的肾损伤	(64)	第七节	混合性结缔组织病和重叠综合征	(67)
第四节	韦格内肉芽肿的肾损伤	(65)			
第十章	血管疾病导致的肾损伤	(69)			
第一节	动脉粥样硬化症的肾损伤	(69)	第六节	弥漫性血管内凝血	(71)
第二节	良性高血压病的肾损伤	(69)	第七节	肾皮质坏死	(71)
第三节	恶性高血压病的肾损伤	(70)	第八节	肾静脉血栓形成	(71)
第四节	溶血性尿毒症综合征的肾病变	(70)	第九节	镰状细胞贫血的肾损伤	(72)
第五节	血栓性血小板减少性紫癜	(71)			
第十一章	糖尿病肾病	(73)			
第十二章	淀粉样变性肾病	(75)			
第十三章	异常球蛋白血症	(77)			
第一节	多发性骨髓瘤	(77)	第三节	冷球蛋白血症	(78)
第二节	华氏巨球蛋白血症	(78)			
第十四章	肝病性肾病	(80)			
第一节	肝炎肾炎	(80)	第三节	肝肾综合征	(81)
第二节	肝病性肾小球硬化症	(80)			
第十五章	遗传性和先天性肾小球病	(83)			
第一节	遗传性进行性肾炎	(83)	第四节	先天性肾病综合征	(84)
第二节	良性家族性血尿	(83)	第五节	Fabry 病	(84)
第三节	甲髌综合征	(84)			
第十六章	妊娠期肾脏疾病	(86)			
第十七章	肾小管疾病	(88)			
第一节	急性肾小管坏死	(88)	第四节	管型肾病	(90)
第二节	渗透性肾病	(90)	第五节	Bartter 综合征	(91)
第三节	低钾性肾病	(90)			
第十八章	肾间质疾病	(92)			
第一节	感染性间质肾炎	(92)	第四节	血管病导致的间质性肾炎	(93)
第二节	过敏性间质性肾炎	(92)	第五节	巴尔干肾病	(94)
第三节	代谢异常引起的间质性肾炎	(93)	第六节	反流性肾病	(94)

第十九章 肾乳头坏死	(96)
第二十章 肾移植病理学	(97)
第一节 排斥反应	(97)
第二节 灌注性肾病	(99)
第三节 移植肾的肾小球肾炎	(99)
第四节 移植肾的肾小管坏死	(100)
第五节 移植肾的感染	(100)
第六节 环孢霉素肾病	(100)
第二十一章 肾脏肿瘤	(102)
第一节 良性肿瘤	(102)
第二节 恶性肿瘤	(103)
第二十二章 肾脏先天性发育异常	(107)

第一章 肾脏疾病的病理取材

肾脏疾病的病理检查和研究的材料主要来源于肾脏活体组织穿刺(肾活检)、外科手术及尸体解剖标本,部分动物实验标本对于疾病的认识也很重要。外科手术、尸体解剖及动物实验标本可以获得较大范围和较全面的肾脏标本,作病理检查和研究时,要对皮质、髓质及肾盂粘膜等部位分别检查。肾活检标本虽然体积较少,也要尽可能全面地进行检查和研究,由于取得的标本新鲜,可以反映患者当时的肾脏病理状态,并可重复穿刺检查,所以在肾脏疾病的病理检查和研究中,占有最重要位置,本章重点叙述肾活检的取材方法和注意要点。

早在1923年Gwyn氏即给一名肾病综合征患者作了第一例开放肾活检。1944年Alwall氏又首先为一名淀粉样变性病患者作了经皮肾穿刺活检。但是,经皮肾穿刺活检在临床上广泛应用,还是在1950年Perez-Ara氏及1951年Iverson氏和Brun氏进行了大系列肾穿刺活检和病例报告之后开始的。国内1958年也有了肾穿刺活检的报告。最近,Mal氏等(1990)又介绍了一种新的经肾静脉肾活检的技术,使肾活体检查有了更多的选择余地。肾活检现在已是肾脏疾病诊断中一个必不可少的手段。

一、肾活检的种类:

肾活检有多种方法,归纳起来有三类:

1. 开放肾活检: 进行外科手术。暴露肾下极,然后直视下采取肾组织。根据取材方法的不同,又可分为三种:(1)刀切取材:常需全麻,手术切口大,用手术刀切取楔形的肾组织。一般只取肾皮质,缝合止血。(2)穿刺针取材:也需全麻下外科手术暴露肾下极,用肾

穿刺针取材,可同时获得肾皮质、肾髓质,压迫止血。(3)活体钳取材:可用局麻,手术切口小,用杯口活体钳钳取肾组织,电灼止血,一般也只取肾皮质,钳取法对病人创伤最小,操作简单,1973年以来,被Gill氏及Cole氏介绍并逐渐推广。

开放肾活检虽然创伤较大,但成功率高(可达100%),并可多部位取材,获取肾组织充分,而且较安全。可用于有经皮肾穿刺禁忌症或经皮肾穿刺取材失败的患者。

2. 经静脉肾活检:在电视荧光屏监视下,将导管自右颈静脉送入右肾静脉,并插入右肾下极,推注少许造影剂肯定导管位置正确后,从导管内放入肾穿针,针尖刺入肾组织后,肾穿针另一端在体外加抽吸负压,从而可得肾组织。此法最大优点是有创伤出血时,血液仍可流入血循环。经皮肾穿刺有禁忌症的病例,必须进行肾组织检查时,可以考虑用这一方法。

3. 经皮肾穿刺活检:这是目前应用最广泛的肾活检方法。最大优点是创伤小,但与前两种方法相比,从体表对肾脏进行穿刺取材,有一定的盲目性,所以应掌握该法的适应症和禁忌症。

经皮肾活检需要特制的穿刺针,目前已有负压吸引针、切割针、负压吸引切割针及穿刺枪等。

在作穿刺前,首先要进行精确的体表定位。以肾脏下极外侧缘进针为宜,此处已避开大血管,有较多的肾皮质,而且不易穿入肾盏和肾盂。为使穿刺针准确进入这一位点,有多种定位方法,包括经验定位、X光片定位(腹部平片、静脉肾盂造影、腹膜后充气造影

等)、静脉肾盂造影电视屏幕定位、A型超声波定位、B型超声波定位、核素定位及电子计算机体层扫描(CT)定位等。目前国内多采用B型超声波定位。

经皮肾活检的适应症和禁忌症(见表1—1、2):

表 1—1 经皮肾穿刺的适应症

临床诊断	穿刺适应症
原发性肾脏病	
急性肾炎综合征	(1) 肾功能急剧坏转, 可疑急进性肾炎时, 应尽早穿刺 (2) 按急性肾炎治疗2—3个月, 病情不见好转
原发性肾病综合征	
I 型	(1) 激素规则治疗8周无效
II 型	(1) 先穿刺, 以便根据病理类型有区别地进行治疗
孤立性血尿	(1) 变形红细胞性血尿, 但临床诊断不清
无症状性蛋白尿	(1) 肾小球性或/和肾小管性蛋白尿, 但临床诊断不清
继发性和遗传性肾脏病	(1) 临床怀疑但无法确诊 (2) 临床虽已确诊, 但肾病理资料对指导治疗及判断预后有重要意义
急性肾功能衰竭	(1) 临床及化验无法确定病因时, 应及时穿刺
移植肾病变	(1) 肾功能明显减退而病因不清 (2) 移植肾可疑有复发性肾脏疾病

表 1—2 经皮肾穿刺的禁忌症

绝对禁忌症	(1) 明显的出血倾向*
	(2) 中度或重度高血压*
	(3) 精神病或不配合操作者
	(4) 孤立肾
	(5) 固缩肾或小肾
相对禁忌症	(1) 活动期肾盂肾炎*, 肾结核、肾盂积水或积脓、肾脓肿或肾周围脓肿。
	(2) 肾肿瘤或肾脏动脉瘤
	(3) 多囊肾或肾脏大囊肿
	(4) 肾脏位置过高或游走肾
	(5) 慢性肾功能衰竭
	(6) 过度肥胖
	(7) 高度腹水*
	(8) 其他: 心功能衰竭*, 严重贫血*, 低血容量*, 妊娠或年迈。

* 这些异常被纠正后仍可穿刺

4. 细针肾穿刺: 细针穿刺是近年来发展的获取深部组织的活检方法, 定位及穿刺方法与负压抽吸肾穿刺法相同, 因其损伤很轻, 故可用于有经皮肾穿刺禁忌症的患者。不过, 因其所得组织很少, 不利于形态学观察, 为避免这一缺点, 可作如下处理: 将穿刺组织用 5ml 的 RPMI 培养液自针孔中冲入离心管 (管壁先用明胶涂抹, 以防肾小球贴壁丢失), 离心 (1000 转/分, 5~10 分钟), 将沉渣加 3 滴血浆并移入凝血酶内混匀, 数分钟后可形成纤维蛋白凝块, 再以戊二醛固定, 一小时后即可制作病理切片。可以观察肾小球或肿瘤等病变。

经皮肾穿刺活检是一种有创伤性的检查方法, 可有多种并发症 (如: 血尿、肾周血肿、动静脉瘘、感染、误穿其他脏器等), 因此, 肾穿刺手术应住院进行, 切忌双肾同时穿刺, 而且一侧肾脏也不宜进针过多。

二、肾活检的意义

肾活检在肾脏病学的发展中, 起了重大作用。肾活检不仅提供了各种类型肾脏疾病以及不同病程的肾组织, 以进行诊断和研究, 而且因肾活检可以获得新鲜肾组织, 使肾脏疾病的免疫病理学研究, 超微病理学研究以及其他现代先进研究手段的应用成为可能, 从而使肾脏病学在深度和广度上得以迅猛发展。

肾活检对肾脏疾病的诊断、治疗和判断预后方面, 也有重要意义。国内外许多报告作了肾活检前后的对比分析, 证实活检后的诊断修正率为 39~63%, 治疗方案修正率达 11~36%, 预后估计修正率达 17~36%。这些修

正在肾病综合征和急性肾功能衰竭病例尤为突出。说明病理与临床相结合的诊断与治疗正确率, 远远高于单纯的临床诊断和治疗。

参考文献

- (1) 赵魁丹及周惠英: 肾脏穿刺活体组织检查初步报告。中华内科杂志 1958; 6: 694。
- (2) 刘平, 等: 应用 Tru-Cut 针进行肾穿刺活体组织检查。中华内科杂志 1979; 18: 345。
- (3) 郭应录, 等: 肾穿刺活检在肾移植术后的应用。中华外科杂志, 1980, 18: 464。
- (4) 淇贻璞, 等: 肾功能衰竭时肾活检的初步体会。临床内科杂志 1984; 1: 39。
- (5) 编委会: 肾小球疾病肾穿刺活检的诊断问题。中华内科杂志 1984; 23: 131。
- (6) 程蕙芳, 等: 肾活检的临床意义——100例肾脏病活检前后分析对比。中华肾脏病杂志 1985; 1 (3): 15。
- (7) Almkuist RD.: Techniques of renal biopsy. Urol Clin N Am 1979; 6: 503.
- (8) Gault MH and Muehrcke RC.: Renal biopsy: current views and controversies. Nephron 1983; 34: 1.
- (9) Madaio MP.: Renal biopsy. Kidney Int 1990; 38: 529.
- (10) Yussim A, et al.: Use of modified fine needle aspiration for study of glomerular pathology in human kidneys. Kidney Int 1990; 37: 812.

第二章 肾脏疾病的病理研究方法及标本制作要点

一、肾脏疾病的病理研究方法

肾脏疾病的病理研究，在一般病理学方法的基础上，逐渐吸收了多种新技术，不但保证了对各种肾脏疾病精确的病理形态学观察和分类，而且对其病因发病机制的研究，也提供了必要的病理学方法。

光学显微镜（光镜）观察是最基本的方法。也是肾脏疾病病理学分类的基础。与其他组织病理学相比，肾脏病理检查需要较薄的切片，以2~3微米较好，若切片太厚，因细胞和组织的重叠，影响对病变的观察（图2—1，2）。另一方面，为了观察和分析肾小球和肾小管基底膜的病变，观察各种细胞成分，特殊蛋白（包括免疫球蛋白）的沉积以及血液循环障碍，需要多种特殊染色方法，如能显示基底膜和系膜基质的PAS染色法、PASM染色法，能显示免疫复合物的Masson氏染色法，能显示血栓和纤维素样坏死的纤维素染色法等。

免疫反应在肾脏疾病的发生发展中占有重要位置，所以免疫病理的研究方法已广泛应用于肾脏疾病的病理工作中。目前常用的有免疫荧光法、酶标记法以及免疫电镜法。

电子显微镜（电镜）观察在肾脏病理中，也很重要。与光镜相比，该法可显示到超微结构水平。以透射电镜为主，扫描电镜观察虽然也引入了肾脏疾病的病理诊断，但尚不普遍，而且诊断意义也不太大。

二、肾活检标本的初步处理

如前章所述，肾活检材料在肾脏疾病病理学中，占主要位置。通过肾穿刺取得的病理材

料与外科手术和尸体解剖标本不同，其特点是材料少，但组织新鲜，适于进行各种免疫病理学检查和超微结构检查。对所得材料的初步处理和保存，关系着以后标本制作的成功与否。

1. 肾组织的判断：开放肾活检可以准确地取到肾组织，而经皮肾活检则带有一定的盲目性，有时可将肾脏周围的肌肉、结缔组织或脂肪穿出。而不带任何肾组织。脂肪组织呈黄白色，比重较小，漂浮于固定液表面。结缔组织呈灰白色，质地柔韧，不易切割。肌肉的颜色与肾组织相似，比重也较大，和肾组织一样沉于固定液的底部，但在放大镜下看不到肾组织的特点。真正的肾组织颜色暗红，比重较大，在固定液内沉于瓶底，而且在放大镜下。可见暗红色的髓质及稍浅淡的皮质，在皮质部分可见肾小球呈模糊的小红点状结构。根据上述原则判定，穿出的材料若不是肾组织或组织太少，可建议术者重新穿刺。

2. 肾活检标本的分割原则：肾活检标本应分作三部分，进行三种检查，因此，要求穿出的组织要有足够的体积。一般而言，活检标本应超过12mm，以锐利的剃须刀片在蜡板或软木板上分割。有三种分割方法：（1）自皮质端取2mm作电镜检查标本，4mm作免疫病理学检查标本，其余用作光镜检查标本（图2—3A）。所得标本若不足8mm，只作光镜检查，不足10mm者，只作光镜和免疫病理学检查，因为光镜检查是肾脏疾病病理诊断的基础。（2）自皮质端依次切割为1mm、2mm及4mm的数段，然后依次隔段分作三堆，进行电镜、免疫病理学及光镜检查（图2—3B），这种分割法可以保证各种检查的标本中，均可能包含肾小球。上述两种分割法适用于口径较

小的穿刺针（如 Menghini 型负压吸引针）所得直径较细的穿刺标本。（3）先自皮质端取 1mm 供电镜检查，剩余者纵行劈作两半，一半供光镜检查，一半供免疫病理检查（图 2—3C）这种分割法适用于直径较粗的穿刺标本（如 Tru—Cut 型切割针所得标本）。

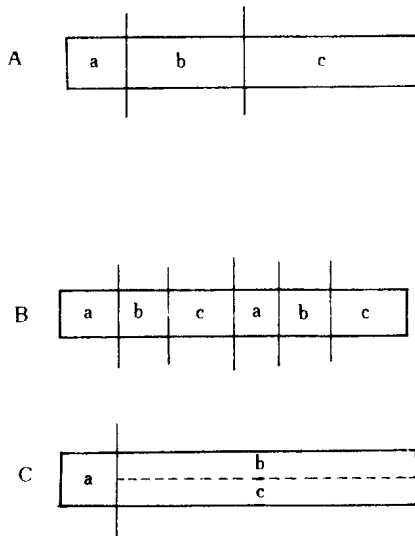


图 2—3 肾活检标本分切法

左为皮质端，右为髓质端 a. 电镜 b. 免疫荧光
c. 光镜

满意的供光镜检查的肾活检标本，要有足够数量的肾小球，据统计，用包含 5 个肾小球标本来判断全部肾小球的状态，准确率仅为 65%，包含 15 个肾小球的标本，则准确率达 95%，所以光镜检查的肾标本应超过 10 个肾小球为好。

三、光镜标本的制作

1. 石蜡包埋的光镜标本：

（1）肾组织的固定技术：将受检组织尽快地浸入固定液内，使组织和细胞的固有成分迅速凝固，防止自溶和腐败，使其保持与生活状态有相似的结构，以利于切片和观察，这是组织固定的目的。

用作光镜检查的标本，常用的固定液有甲醛（又称福尔马林 Formalin）和乙醇（酒精），甲醛具有穿透力强、固定均匀、很少使

组织收缩并能增加组织韧性的优点，而且可以保存组织内的脂类物质，可单独使用，常用其 10% 的溶液。乙醇除有固定组织的作用外，尚有脱水作用，可以保存组织内的糖类物质及尿酸结晶，不过，用酒精固定常使组织明显收缩，且使脂类物质溶解，可单独使用，常用其 95% 的溶液。在实际工作中，为保留各固定液的优点并去除其缺点，常用复合固定液，如 FAA 固定液：

40% 甲醛	10ml
冰醋酸	5ml
95% 乙醇	85ml

FAA 固定液中冰醋酸的作用是利用其渗透性强而且能使组织膨胀的作用，藉以消除乙醇等固定液使组织收缩的缺点。

在固定液内供光镜检查的标本，可置于室温或 4℃ 冰箱内保存，不可冷冻结冰而破坏光镜下的组织形像。

（2）肾组织的脱水、包埋及切片：为使肾组织能在光镜下充分观察以及保存完整的资料，必须制成满意的切片并进行染色。为此，固定后的肾组织还要经过脱水、透明、浸蜡及包埋等一系列程序，这种程序与一般的病理切片技术相同，可参阅一般的病理技术专著，在此仅介绍一般原理和注意要点。脱水的目的是将固定了的组织内水分除去，以便使切片时的支撑物（石蜡）充分进入组织内，最常用的脱水剂是酒精，为避免脱水过程中的组织收缩现象，必须用逐渐升高浓度的酒精依次浸泡脱水（70%→80%→90%→95%→无水酒精）。脱水后进行透明，透明的目的是使能与石蜡结合溶解的媒介剂进入组织，进而将不能与石蜡结合的脱水剂置换出来，并使组织透明，为包埋作准备，常用的透明剂是二甲苯，组织在二甲苯中的时间不宜过长，否则易使组织收缩和松脆。氯仿透明组织的能力较弱，但不致使组织松脆，是仅次于二甲苯的透明剂。透明后，进行浸蜡和包埋，这样可使组织具有一定的硬度和韧度，便于切出菲薄满意的切片，常用熔点为 60~62℃ 的石蜡，有时为保存更多的抗原

成分。可采用低熔点石蜡 (48~50℃)。

(3) 组织切片的染色: 经过上述各种步骤处理后, 便可制成 2~3 μ m 的石蜡切片。为了区分和清楚地观察各种组织成分和病变, 必须经过染色。

染色前, 应将石蜡切片中的石蜡溶解去除, 否则水溶性的染料不能与组织结合, 这一过程称为脱蜡。脱蜡的程序与脱水包埋的程序相反, 先将石蜡切片浸入二甲苯中使之溶解, 继而浸入由高至低浓度的酒精 (无水酒精→95%→90%→80%→70%), 用自来水和蒸馏水冲洗后, 便可染色。每种液体中, 浸泡 5~10 分钟即可。

染色后, 为使切片清晰易见, 并便于保存, 应再进行脱水、透明及封片。首先将染色完毕的切片用低至高浓度的酒精 (70%→80%→90%→95%→无水酒精, 各 1~5 分钟) 脱水, 再置入二甲苯中透明, 最后滴加树胶 (封固剂) 封片。

肾组织的光镜检查需要多种染色方法, 必须具备的是苏木素伊红或 HE 染色 (Hematoxylin Eosin)、过碘酸雪夫氏反应或 PAS 染色 (Periodic Acid Schiff)、六胺银或 PASM 染色 (Periodic Acid—Silver Methenamine)、马松氏染色 (Masson's Trichrom Stain) 及 Lendrum 氏纤维素染色。有时为证实组织内其他特殊蛋白的存在, 还可选用某些特殊染色法, 如能辨别淀粉样蛋白的刚果红染色法等 (图 2—4)。兹将本实验室常用的染色液配方及染色步骤彙集于下:

【HE 染色法】

- (1) Harris 苏木素染色 7 分钟;
- (2) 自来水冲洗多余的染液;
- (3) 1% 盐酸酒精分化数秒钟, 使细胞核呈紫蓝色;
- (4) 自来水中充分洗涤;
- (5) 1% 氨水中数秒, 至返蓝;
- (6) 自来水至蒸馏水冲洗;
- (7) 1% 伊红染色, 3 分钟左右。

结果: 细胞核呈紫蓝色, 细胞浆呈粉红

色, 基底膜、胶原纤维及肌纤维呈粉红色。(图 2—5)。

Harris 苏木素染液配方:

苏木素	1g
纯酒精	10ml
钾明矾	20g
蒸馏水	200ml
氯化汞	0.5g

水溶性伊红染液配方:

伊红	0.5~1g
蒸馏水	99ml

【PAS 染色法】

- (1) 1% 过碘酸水溶液染 10 分钟, 使含有乙二醇的化合物氧化形成醛基;
- (2) 蒸馏水洗去过碘酸;
- (3) Schiff 氏试剂反应 15 分钟, 使醛基和 Schiff 氏试剂结合, 形成紫红色产物;
- (4) 0.5% 亚硫酸氢钠 (NaHSO_3) 处理三次, 每次 2 分钟;
- (5) 流水冲洗 5~10 分钟;
- (6) 用苏木素染色液复染细胞核;
- (7) 水洗或 1% 盐酸酒精分化。

结果: 细胞核呈蓝色, 基底膜呈红色, 肾小球系膜基质呈红色, 胶原纤维、肌纤维及细胞浆呈红色, (图 2—6)。

Schiff 氏试剂配方: 将 200ml 蒸馏水煮沸; 冷却至 90℃ 时, 慢慢加入碱性复红 1g; 搅拌并煮沸 5 分钟使其全溶; 冷却至 50℃ 时过滤, 并加入 1N 盐酸 20ml; 冷却至 25℃ 时, 再加入无水亚硫酸钠 (NaHSO_4) 1g 并搅匀。置入遮光瓶内并放在 4℃ 冰箱内保存备用。

【PASM 染色法】

- (1) 1% 过碘酸水溶液内染 10 分钟;
- (2) 自来水洗, 蒸馏水洗;
- (3) 入 5% 铬酸 (三氧化铬) 水溶液 40 分钟, 出此溶液后可用 1% 亚硫酸钠除掉铬酸, 也可免用;
- (4) 自来水洗数次, 蒸馏水洗 3~4 次;

(5) 入六胺银染液 (55~60℃) 40 分钟, 20 分钟后, 每 5 分钟镜下观察一次, 观察前需经蒸馏水洗, 如基底膜染色过浅, 可重染, 切勿接触金属器械;

(6) 蒸馏水洗四次;

(7) 入 0.2% 氯化金水溶液 1~2 分钟;

(8) 蒸馏水洗三次;

(9) 入 5% 硫代硫酸钠水溶液 1~2 分钟;

(10) 自来水和蒸馏水各洗数次;

(11) 复染 HE, 脱水、透明、封片。

结果: 基底膜呈黑色, 网状纤维呈黑色, 细胞核呈蓝色, 背景呈粉红色 (图 2—7)。

六胺银染液配方:

2% 硝酸银水溶液 3ml

3% 六次甲基四胺液 (乌洛托品) 25ml

5% 硼砂 (四硼酸钠) 2ml

【注】①氧化步骤: 有的用过碘酸或铬酸作氧化剂, 经六胺银染色后, 上皮细胞及单核细胞皆呈黑色, 影响 HE 复染。若先用过碘酸, 后用铬酸作双重氧化, 经六胺银染色后, 各种细胞不着色, 只有基底膜着黑色, 复染 HE 结果清晰。氧化时, 过碘酸及铬酸均不加热。

②经典六胺银染色法用 5% 硝酸银并加热至 80℃, 45~90 分钟, 温度高, 时间长, 各种组织均呈黑色, 肾小球基底膜不易分辨。本室用 2% 硝酸银配制银液, 染色时间 40 分钟, 温度 55~60℃, 随时镜下观察便于控制。

③六胺银染液需临时配制, 只用一次。

【Masson 氏染色法】 此法集中了 Masson 氏和 Mallory 氏两种染法的优点, 又加固深红 (Fast Crimson) 染料而成。

(1) 入 Bouin 氏液 10 分钟;

(2) 流水冲洗 5 分钟, 蒸馏水洗;

(3) 天青石蓝染色 5 分钟;

(4) 自来水洗三次, 蒸馏水洗;

(5) Mayer 氏苏木素染色, 5 分钟;

(6) 盐酸酒精稍分化, 自来水洗 5 分钟, 蒸馏水洗;

(7) 入染液 I (丽春红—酸性复红—固深

红) 5~10 分钟;

(8) 入 1% 醋酸溶液洗一次, 蒸馏水洗三次;

(9) 入染液 II (5% 磷钨酸) 30 秒—1 分钟;

(10) 入染液 III (苯胺蓝) 2 分钟;

(11) 脱水、透明、封片。

结果: 细胞核呈红色, 基底膜、胶原纤维呈蓝绿色, 免疫复合物呈红色 (图 2—8)。

天青石蓝染液配方:

硫酸铁胺 10g

蒸馏水 100ml

天青石蓝 1g

加热煮沸 3 分钟, 冷却过滤, 加甘油 28ml。

Mayer 氏苏木素染液配方:

苏木素 (结晶) 4g

蒸馏水 1000ml

碘化钾 0.3g

胺明矾或钾明矾 50g

枸橼酸 (柠檬酸) 1g

水合氯醛 75g

加热溶解明矾, 加入苏木素, 溶解后再加枸橼酸、碘化钾及水合氯醛, 摇荡使之全部溶解, 最后染液呈紫红色, 可保存数月, 用前过滤。

染液 I (丽春红—酸性复红—固深红) 配方:

丽春红 3.5g

酸性复红 1.5g

固深红 1g

桔黄 G 1.65g

蒸馏水 500ml

醋酸 5ml

染液 II: 5% 磷钨酸水溶液

染液 III 配方:

苯胺蓝 2.5g

蒸馏水 100ml

冰醋酸 2ml

【注】 第一染液应深染肾小球内阳性物质, 使

之显示清楚,最后酒精脱水要快,酒精对红蓝两种染料有脱色作用。

【Lendrum 纤维素染色法】

- (1) 入 Bouin 氏液 10 分钟;
- (2) 自来水洗 2 分钟,蒸馏水洗;
- (3) 天青石蓝染色 5 分钟;
- (4) 自来水洗三次,蒸馏水洗;
- (5) 入 Mayer 氏苏木素染色 5~10 分钟;
- (6) 流水洗 5 分钟,蒸馏水洗;
- (7) 入分化液 2 分钟;
- (8) 流水洗 1 分钟,蒸馏水洗;
- (9) 入酸性复红染液 5 分钟;
- (10) 蒸馏水洗二次;
- (11) 入分化液 1 分钟,蒸馏水洗二次;
- (12) 入 MacFarland 氏液 1 分钟,蒸馏水洗三次;
- (13) 入苯胺蓝染液 1 分钟;
- (14) 蒸馏水洗三次
- (15) 脱水、透明、封片。

结果:细胞核:黑蓝色;纤维素:红色;基底膜:蓝色;免疫复合物:粉红色。(图 2—9)。

酸性复红染液配方:

酸性复红	1g
蒸馏水	99ml
冰醋酸	1ml

橘黄 G—苦味酸原液配方:

橘黄 G	0.4g
苦味酸饱和酒精	100ml

分化液配方:

橘黄 G—苦味酸原液	10ml
95%酒精	90ml

MacFarland 氏液配方:

磷钨酸	5g
苦味酸	2.5g
95%酒精	100ml

【注】 可用马休氏黄 (Martius Yellow) 代替橘黄 G—酒精苦味酸溶液。

2. 环氧树脂包埋的光镜标本: 环氧树脂

(Epoxy) 是一种具有粘滞性的液体塑胶,经过适当的结合剂 (氧化丙烯等) 可以浸透组织,在适当的温度下 (60℃) 可以聚合为硬块。环氧树脂是透射电镜标本常用的包埋剂,以 Epon812 较为理想,国产环氧树脂 600 和 618 混合液效果也佳。

用环氧树脂包埋的肾组织块,较石蜡包埋块硬韧,因之可以制成半薄切片 (0.5μm),用光镜观察组织形态更为清晰易见。

3. 塑料包埋的光镜标本: 常规固定脱水的肾组织置于亲水的甲基丙烯酸—2—羟基乙基酯 (2—Hydroxyethyl methacrylate, HEMA) 浸透 24~48 小时 (常用 HEMA 混合液,即 HEMA48ml,聚乙二醇又称 PEG—400,6g,过氧化苯甲酰,0.6g,混合而成),之后再置于 HEMA 混合液和 PEG—400 混合液配置的包埋剂中 (即 100 份 HEMA 混合液与 1 份 PEG—400 混合液配制而成,PEG—400 混合液配方: 15 份 PEG—400 与 1 份 N—N—二甲基苯胺混合),在室温中数小时后即可聚合成型。塑料包埋块硬度较大,必须用钢锉修块,将组织块四周多余的塑料磨除,并使包埋块内的组织暴露。可用普通切片刀切制薄片,在水浴中展开,捞置于玻片上,可不用粘合剂,用热风机吹干,可进行多种染色和免疫组织化学观察。

塑料包埋块可以切出薄片,组织形态较石蜡切片清晰 (图 7—20a),而且在标本制作过程中,免去了高温、脱水、透明等程序,可较好地保存组织内抗原成分,有利于进行免疫病理学研究。

四、免疫病理标本的制作

1. 免疫荧光检查: 免疫荧光检查是肾脏疾病免疫病理学中一个重要手段。多数用恒温冷冻切片,少数也可用石蜡包埋切片。冰冻切片标本的抗原保存满意,为最常用的免疫病理检查方法。作冰冻切片的肾标本为未经任何处理的新鲜组织,应以浸透生理盐水的纱布包裹,以免组织干涸,若暂时不能切片或移送别

处的标本，可短时间置于 4℃ 低温环境，若需等待时间较长，应在 -70℃ 的冰室中或液氮罐内保存，也可用干冻—丙酮法、干冻—酒精法、干冻—异戊烷法保存（用丙酮、酒精、异戊烷加干冰致冷）。

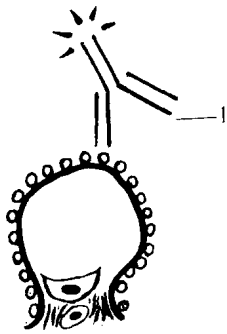


图 2-10 免疫荧光直接法
1. 兔抗人 IgG
○ 免疫复合物荧光素
基罗达明 (Rondamine B isothiocyanate) (显橙红色荧光) 作为标记荧光素。如果肾组织中有相应的抗原，则与荧光抗体相结合，在荧光显微镜下显示荧光 (图 2—10)。其优点是特异性高，染色步骤简单，需时短，其缺点是需要质量较高的冷冻切片机和荧光显微镜，而且不能长期保存。直接免疫荧光法，每种荧光抗体只能检测一种相应的抗原，因此需要多种荧光抗体。

具体步骤如下：

- ①将肾组织制成冰冻切片，略风干；
- ②将相应的工作浓度的荧光抗体滴加在待检切片上；
- ③将切片水平置于湿盒内，在 37℃ 温箱内孵育 30~45 分钟；
- ④将切片取出后，用 PBS 液洗去未结合的荧光抗体；
- ⑤先后依次置于 3 个盛有 0.15M，PH7.6 的 PBS 缓冲液的染色缸内，震荡漂洗三次，每次 3 分钟；
- ⑥0.01M，PH7.5 的 PBS 缓冲液内震荡漂洗 1 分钟；
- ⑦取出切片，室温下风干；
- ⑧滴加缓冲甘油封片，在荧光显微镜下观

察。

(2) 间接法：用未标记的多种抗体（第一抗体）与肾组织的抗原相结合，形成不发荧光的抗原抗体复合物。第二步以标有荧光素的与第一抗体有特异作用的抗抗体（第二抗体）相结合，形成可发荧光的抗原—抗体—抗抗体—荧光素的复合物。因此，较直接法敏感（约 5~10 倍），而且只需一种荧光抗体。

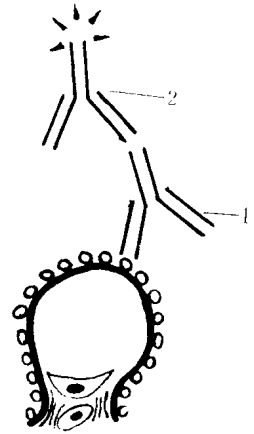


图 2-11 免疫荧光间接法
1. 兔抗人 IgG
2. 羊抗兔 IgG
○ 免疫复合物荧光素

具体步骤如下：

- ①肾组织冰冻切片，略风干；
- ②滴加未标记的第一抗体；
- ③温盒中 37℃ 孵育 30~45 分钟；
- ④取出后，PBS 液洗去多余的抗血清；
- ⑤0.15M，PH7.6 的 PBS 液洗三次，每次 3 分钟，0.01M，PH7.6 的 PBS 液再冲洗一次，1 分钟；
- ⑥滴加荧光素标记的第二抗体；
- ⑦37℃ 湿盒内孵育 30~45 分钟；
- ⑧同步骤④；
- ⑨同步骤⑤；
- ⑩室温风干，缓冲甘油封片，荧光显微镜下观察。

应用石蜡切片进行免疫荧光检查的原理与上述相似，但在滴加抗体前，需经过脱蜡和消化等步骤（详见免疫酶标记法）。

(3) 免疫荧光检查的阅片标准：在荧光显微镜下观察肾组织的免疫荧光表现时，应当记录：①显示抗体的种类，直接法即荧光抗体的种类，间接法即第一抗体的种类。②荧光显示的部位，即肾小球的毛细血管壁、系膜区、肾小囊基底膜、肾小管基底膜、间质血管壁及间质细胞等。③荧光显示的强度：分为：—，±

(低倍镜下不显现, 高倍镜下似乎可见), + (低倍镜下似乎可见, 高倍镜下可见) ++ (低倍镜下可见, 高倍镜下清晰可见), +++ (低倍镜下清晰可见, 高倍镜下耀眼), +++++ (低倍镜下耀眼, 高倍镜下刺眼)。(图 2—12)。

2. 免疫酶标记法: 免疫酶标记法是免疫学和组织化学技术相结合的方法, 所以又称免疫组织化学方法。先用结合剂(戊二醛、过碘酸钠等)将酶结合在免疫球蛋白分子的氨基或羟基上, 制成酶标记抗体, 当其与特异性抗原形成免疫复合物时, 因其带有标记酶, 可藉酶对底物的特异催化作用, 使底物氧化并出现不溶性的有色产物, 虽然操作步骤较复杂, 但可在普通光学显微镜下进行观察, 而且可以长期保存, 并可用石蜡切片进行回顾性研究。

用作标记抗体的酶种类很多。以辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 最常用, 其优点是有稳定的酶活性, 基本不受固定剂、缓冲剂及温度等条件的影响, 在动物组织内不含此酶, 从而, 很少有假阳性, 而且价格便宜。常用的底物是 3, 3'-二氨基联苯胺 (3,3 diaminobenzidine, DAB)。

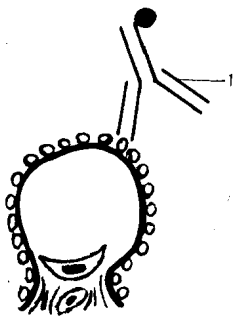


图 2-13 免疫酶标直接法

1. 兔抗人 IgG 及结合的过氧化物酶 ●辣根过氧化物酶
○免疫复合物
(Avidin Biotin Peroxidase Complex Method, ABC)

(1) 直接法: 将酶标记抗体与相应抗原直

根据酶标记抗体与相应的抗原连接方式的不同, 可分为直接法、间接法、酶桥法 (Immunoenzyme bridge method)、过氧化物酶—抗过氧化物酶复合物法 (Peroxidase—anti—peroxidase complex method, PAP) 及卵白素—生物素—辣根过氧化物酶复合物法

接作用, 再经组织化学呈色反应, 于组织内抗原所在位置, 呈现棕黄色的产物 (图 2—13)。其优点是方法简便, 省时, 特异性高, 但敏感性较差, 而且一种标记抗体只能检测一种抗原。

具体步骤如下:

- ①肾组织石蜡切片、脱蜡;
- ②PBS 液洗两次, 每次 3 分钟;
- ③滴加 0.3% H_2O_2 甲醇液, 室温下 20 分钟, PBS 液洗三次, 每次 3 分钟。目的是消除内源性过氧化物酶活性。对冰冻切片的免疫酶染色尤为重要。
- ④0.1%胰蛋白酶消化 20 分钟, 37℃温箱内进行。PBS 液洗三次, 每次 3 分钟;
- ⑤滴加 1:10 的正常羊血清或牛血清, 室温或 37℃条件下 20 分钟;
- ⑥滴加工作浓度的酶标记抗体, 室温或 37℃条件下孵育 60 分钟;
- ⑦PBS 液洗三次, 每次 3 分钟;
- ⑧DAB 显色, 显微镜下监视, 显示棕褐色为止;
- ⑨用自来水充分洗涤, 复染苏木素;
- ⑩脱水, 透明、封片。

(2) 间接法:

第一抗体为非标记抗体, 酶标记在第二抗体 IgG 上, 第二抗体与第一抗体相作用, 呈色反应与直接法相同 (图 2—14)。本法较直接法敏感性高。

具体步骤如下:

- ①~⑤同直接法。
- ⑥滴加工作浓度的第一抗体, 37℃条件下孵育 60 分钟;

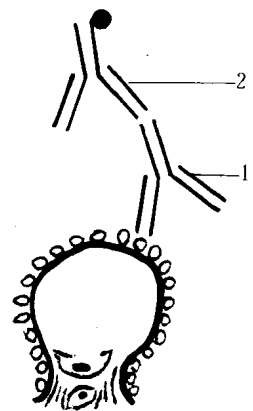


图 2-14 免疫酶标间接法

1. 兔抗人 IgG 2. 羊抗兔 IgG 及结合的过氧化物酶 ●辣根过氧化物酶 ○免疫复合物