

肿瘤细胞学相差 显微镜图谱

沈忠英 编著

科学出版社

肿瘤细胞学相差显微镜图谱

广东省汕头医专 沈忠英 编著
病理教研组

中国医学科学院 杨 简 审阅
基础医学研究所

科学出版社

1979

内 容 简 介

全书分两篇,第一篇介绍相差显微镜的原理、结构、操作和在医学各学科中的应用,重点描述肿瘤活细胞的形态特点和诊断要点,同时介绍活细胞的动态变化和有关技术操作;第二篇为图谱和说明,描述人体消化系、呼吸系……等十三个系统和器官的常见肿瘤活细胞形态和鉴别诊断要点。附有图 600 多幅。

可供肿瘤防治的科研人员、临床医生、化验室、细胞学、生物学工作者及大专、医学院校师生参考。

肿瘤细胞学相差显微镜图谱

沈忠英 编著

杨 简 审阅

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1979 年 10 月 第 一 版 开本: 787×1092 1/16
1979 年 10 月 第一次印刷 印张: 6 1/4 插页: 162
印数: 0001—13,780 字数: 132,000

统一书号: 13031·1042

本社书号: 1464·13—10

定价: 7.90 元

前 言

肿瘤细胞学检查是诊断肿瘤的重要方法之一，在肿瘤的防治和研究工作中占有重要地位。肿瘤细胞学和一般细胞学一样，需要不断地利用其它学科的成就，特别是新技术，新仪器和新方法来进行研究，使人们能更深入地认识它的形态和生物学特点，从而为肿瘤的诊断和防治研究提供更好的工具。

长期以来，科学家们对固定、染色的细胞是否正确反映细胞的真正形态存在着怀疑，认为在固定、脱水和染色的过程中，那些物理和化学的因素会改变细胞的细微结构。固定、染色的细胞和生活的细胞形态有何差别，一直是生物学家和细胞学家感兴趣的问题。直至相差显微镜问世以后，用它来观察生活细胞的形态，方解决了人们的积疑。相差显微镜活细胞的观察丰富了细胞学的研究内容，扩大了细胞学的观察领域。尤其是研究生活细胞的形态及其动态改变，弥补了单纯观察固定、染色的细胞的不足。

相差显微镜应用于研究肿瘤细胞虽然已有30年的历史，但过去主要用于观察肿瘤的组织培养和细胞培养，很少用于日常临床诊断工作。由于它是观察活的细胞，可以减少固定、脱水和染色等步骤，以达到快速诊断的要求。而且在相差显微镜下，细胞核的结构较为清楚，有利于对肿瘤细胞的观察和诊断。另外，设备简单，操作方便也是它的优点。

相差显微镜细胞学检查仅是利用物理光学方法来观察细胞，所见到的细胞形态的细节是很有限的，而一般染色方法和细胞化学方法所显示的细胞成分是比较丰富多采的。这两种方法是从不同的侧面来观察细胞。目前在细胞学的诊断和研究工作中，仍以固定、染色方法为主，相差显微镜检查可作为辅助工具，但它将有广阔的发展前途。

在我们日常病理检验工作中，对部分常见肿瘤病理标本进行相差显微镜细胞学观察，并积累了一些照片。现挑选部分常见肿瘤的相差显微镜相片编纂成《肿瘤细胞学相差显微镜图谱》。其内容分为两部分，第一篇为概论，主要介绍相差显微镜的原理、结构和应用，相差镜下正常细胞和肿瘤细胞形态等。第二篇为图谱和说明，描述各系统、器官和组织的常见肿瘤。其中附有相差显微镜相片600多幅。各章节皆描述有关正常细胞成分在相差镜下的形态结构，以作为和肿瘤细胞鉴别之参考。

由于作者是病理工作者，故编写时多少偏重于病理的概念和观点。另外由于对细胞学知识贫乏，无论在理论和实践方面皆嫌不足。因此错误在所难免，希同志们指正。

本图谱是在党中央发出向科学现代化进军的号召下，在校党委直接领导下完成的。编写中福建医科大学陈捷先教授和中山医学院肿瘤研究所陈剑经大夫提供宝贵意见；本书全部相片由沈健同志负责制作；编写期间，中国医学科学院图书馆，中山医学院图书馆和福建医科大学图书馆给予查阅文献的方便，特此致谢。

沈 忠 英

1978年8月于广东汕头医专

目 录

第一篇 概 论	1
第一章 相差显微镜	2
第一节 相差显微镜的原理和装置	2
第二节 相差显微镜检查标本的制作	4
第三节 相差显微摄影术	6
第四节 细胞活体染色法	7
第二章 细胞的正常结构,变性、死亡和固定后的形态	9
第一节 正常细胞相差显微镜形态	9
第二节 相差显微镜下细胞的退行性变,死亡和死后改变	10
第三节 固定液对细胞形态的影响	11
第三章 肿瘤细胞相差显微镜形态	13
第一节 肿瘤细胞的一般形态	13
第二节 几种恶性肿瘤细胞的形态	14
第三节 相差显微镜下各种恶性指征的评价	15
第四章 相差显微镜在医学上的应用	18
第一节 在细胞学、临床检验和病理学上的应用	18
第二节 相差显微镜在肿瘤细胞学诊断的应用	19
图 1-6 至 4-22	23
第二篇 图谱和说明	51
第一章 消化系肿瘤	52
第一节 食管癌	52
一、食管癌标本的来源和制片	52
二、食管正常细胞学	53
三、食管粘膜上皮增生	53
四、食管癌	54
第二节 胃肿瘤	55
一、胃正常细胞学	55
二、胃粘膜腺上皮增生、化生、不典型增生和癌变	56
三、胃癌	57
四、其它胃肿瘤	58
第三节 肠道肿瘤	58
一、肠道肿瘤标本来源和制片	58
二、结肠正常细胞学	58
三、直肠腺瘤样息肉	59

四、大肠癌	59
五、肠道及肠系膜的其它肿瘤	60
第四节 消化腺肿瘤	60
一、唾液腺肿瘤	60
二、肝癌	61
三、胰腺肿瘤	62
小 结	63
第二章 鼻咽和肺肿瘤	64
第一节 鼻咽部肿瘤	64
一、鼻咽部肿瘤标本的采集和制片	64
二、鼻咽粘膜正常细胞学	64
三、鼻咽癌	66
第二节 肺癌	67
一、肺癌标本的采集	67
二、肺部正常细胞学	67
三、肺癌	68
小 结	68
第三章 泌尿系和男性生殖系肿瘤	69
第一节 泌尿系肿瘤	69
一、泌尿系正常细胞学	69
二、尿液脱落细胞学	70
三、泌尿道常见肿瘤	70
第二节 男性生殖系肿瘤	71
一、阴茎乳头状瘤	71
二、阴茎鳞状细胞癌	71
三、前列腺正常细胞和癌细胞	71
小 结	72
第四章 女性生殖系肿瘤	73
第一节 宫颈癌	73
一、标本来源和制片方法	73
二、宫颈正常细胞学	74
三、宫颈鳞状上皮增生和化生	74
四、宫颈息肉	75
五、宫颈癌	75
第二节 子宫体肿瘤	76
一、子宫体肿瘤标本来源和制片方法	76
二、子宫体正常细胞学	76
三、子宫体癌	77
四、子宫平滑肌瘤	77

第三节	葡萄胎,恶性葡萄胎和滋养叶细胞癌	77
一、	正常胎盘绒毛	77
二、	葡萄胎	78
三、	恶性葡萄胎	78
四、	滋养叶细胞癌	78
五、	黄素化囊肿	78
第四节	卵巢肿瘤	78
一、	卵巢囊腺瘤	79
二、	卵巢畸胎瘤	79
三、	卵巢纤维瘤	80
四、	卵巢颗粒细胞瘤	80
五、	卵巢无性细胞瘤	80
六、	卵巢转移性癌	80
七、	其它非肿瘤性囊肿	80
小 结		80
第五章	口腔、鼻腔、鼻窦、喉、眼及耳肿瘤	82
第一节	口腔肿瘤	82
一、	舌癌	82
二、	舌癌转移至颌下淋巴结	82
三、	小唾液腺来源的肿瘤	82
四、	口腔纤维瘤	82
第二节	鼻腔、鼻窦和喉肿瘤	83
一、	标本采集方法	83
二、	鼻腔、上颌窦和喉正常脱落细胞	83
三、	鼻腔、上颌窦和喉常见的肿瘤	83
第三节	眼部肿瘤	84
一、	眼睑乳头状瘤和鳞状细胞癌	84
二、	睑板腺癌	84
三、	视网膜母细胞瘤	84
第四节	耳肿瘤	84
小 结		85
第六章	淋巴器官肿瘤	86
一、	淋巴组织肿瘤标本来源和制片方法	86
二、	正常淋巴结细胞学	86
三、	炎症增生的淋巴结	87
四、	恶性淋巴瘤	87
五、	淋巴结转移瘤	89
六、	胸腺瘤	89
小 结		89

第七章 皮肤肿瘤	91
一、标本来源和制片方法	91
二、皮肤正常细胞学	91
三、常见皮肤肿瘤	92
小 结	94
第八章 软组织肿瘤	95
第一节 纤维结缔组织肿瘤	95
一、纤维结缔组织的相差镜下形态	95
二、纤维瘤	96
三、纤维粘液瘤或纤维瘤粘液性变	96
四、纤维肉瘤	96
五、脂肪瘤	96
第二节 肌肉和血管的肿瘤	97
一、肌肉和血管常见的细胞成分	97
二、肌组织和血管肿瘤	97
第三节 滑膜组织肿瘤	98
一、滑膜细胞	98
二、绒毛结节状滑膜炎	98
三、良性滑膜瘤	98
四、滑膜肉瘤	98
第四节 其它软组织肿瘤	98
一、腺泡状软组织肉瘤	98
二、腹膜后畸胎瘤	99
小 结	99
第九章 乳腺肿瘤	100
一、标本来源和制片	100
二、乳腺正常细胞学	100
三、乳腺常见的良性病变	101
四、乳腺恶性肿瘤	101
五、乳头分泌物和肿瘤穿刺物涂片细胞学	102
小 结	103
第十章 甲状腺肿瘤	104
一、正常甲状腺细胞学	104
二、甲状腺良性肿瘤	104
三、甲状腺腺癌	105
小 结	106
第十一章 骨肿瘤	107
一、骨肿瘤标本的采集和制片	107
二、正常骨和软骨细胞学	107

三、常见的骨肿瘤	108
小 结	109
第十二章 神经系肿瘤	110
一、标本来源和制片	110
二、神经细胞和神经胶质的相差显微镜形态	111
三、神经系常见肿瘤	111
小 结	112
第十三章 胸、腹水肿瘤细胞学	113
一、胸、腹腔积液良性细胞形态	114
二、胸、腹水的癌细胞	115
小 结	116
参考文献	117
图 1-1 至 13-21	119

第一篇 概 论

本篇分为四章。第一章简要介绍相差显微镜的原理、结构、装置和操作,同时附述相差显微镜摄影和活细胞染色等技术。第二章介绍正常生活细胞在相差显微镜下的形态,包括一般细胞形态;细胞退化、死亡和死后变化;以及福尔马林、酒精等固定后细胞的形态改变。第三章描述良性肿瘤和恶性肿瘤细胞的相差显微镜形态,并列举鳞状细胞癌、腺癌、未分化癌和肉瘤的形态特点。第四章,相差显微镜在医学领域的应用,特别介绍对肿瘤细胞学诊断的应用。

第一章 相差显微镜

德国物理学家 Zernike, F. 于 1934 年根据 Abbe 显微镜的成象原理, 提出相差显微镜的原理和设计。但当时的生物学家并不表示欢迎和重视。1941 年 Köhler 和 Loos 发表他们在蔡司 (Zeiss) 实验室研究有关相差显微镜的实验结果, 引起了美国光学公司的注意。至第二次大战结束时, 由该公司和英国的一些单位开始制造此镜出售, 以后全世界各显微镜制造厂不断改进完善。因此相差显微镜的应用时间较短, 至今只有三十多年的历史。

第一节 相差显微镜的原理和装置

一、原理

光波好象水波一样, 有其一定的波长、振幅和相位, 可用曲线图表示之 (图 1-1)。波长代表颜色, 振幅代表明暗。当光波通过二种不同折射率的介质时 (如由空气入水, 或由水入玻璃), 其波长、振幅和相位皆有不同程度的变化。两种波长相同的光波相遇, 由于相位不同, 其振幅有加强或减弱的变化, 使光线变明亮或暗淡, 称为光的干涉现象。光波通过小颗粒后可产生直射光和衍射光 (图 1-2)。后者的振幅较小, 相位较慢, 如图 1-3。

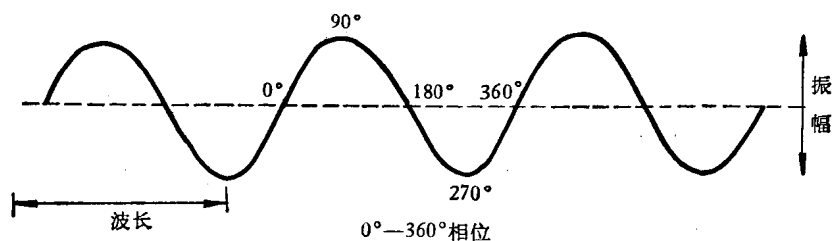


图 1-1 光波曲线图。

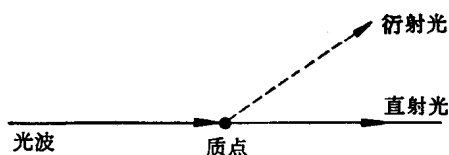


图 1-2 直射光和衍射光。

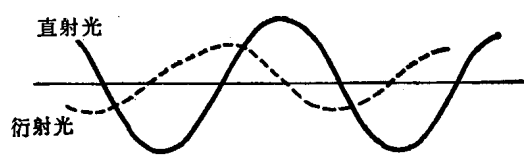


图 1-3 直射光和衍射光曲线图。

相差是指同一光线经过折射率不同的介质, 其相位发生变化的差别。介质厚, 折射率大, 减速也大。光线的相差一般肉眼看不到, 但利用衍射和干涉现象就把相差变为明暗之差, 肉眼才能看到。

相差显微镜是利用衍射和干涉现象, 把直射光推退 $1/4$ 波长, 使直射光和衍射光维持

同一相位,两者组成的光波,由于干涉现象,其振幅为两者之和(图 1-4)。因背景只有直射光,故被照射的小颗粒比背景亮,称明反差或负反差。如将衍射光推迟 $1/4$ 波长,直射光和衍射光的相位差变成 $1/2$ 波长,合成波振幅为两者振幅之差(图 1-5),故被照射颗粒比背景暗,称暗反差或正反差。

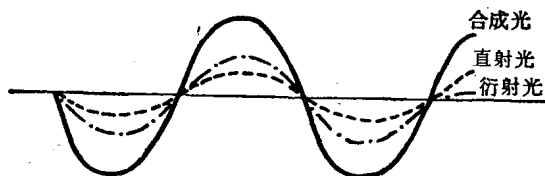


图 1-4 直射光推迟 $1/4$ 波长,和衍射光同一相位,合成光振幅为两者之和。

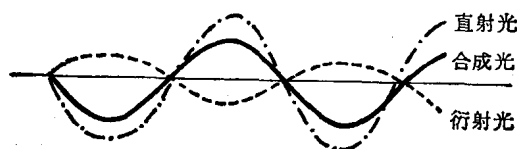


图 1-5 衍射光推迟 $1/4$ 波长,和直射光相位差 $1/2$ 波长,合成光振幅为两者之差。

当直射光和衍射光差别越少,其明暗相差越大,如直射光和衍射光两者光度相等时,反差最明显。同时改变透明标本直射光和衍射光的相位,并使相差变为振幅差(明暗差),就能用肉眼看到。

二、相差显微镜的装置

相差显微镜和普通生物显微镜所不同者是前者用的接物镜里装有相板,聚光镜下加环状光阑,另外有调轴望远镜和强光源等附件。各厂牌的相差显微镜其造型不同,但其主要结构都差不多。

1. 相差物镜: 为显微镜的物镜里安装有相板。相板有推迟直射光或衍射光的相位和吸收光量、调节直射光或衍射光的亮度的作用。

根据其相板吸收直射光的程度,可将相差物镜分为低、中、高三种不同吸收率的镜头。其记号为“ $0.20A + 0.25\lambda$ ”,代表吸收率较低(吸收 80% 的直射光),通过 20%,推迟相位 $1/4$ 波长。“ $0.07A + 0.25\lambda$ ”,代表吸收率较高(吸收 93% 的直射光),只通过 7% 的光线,推迟相位 $1/4$ 波长。

一般相差物镜有明反差(负反差)和暗反差(正反差)之别。被检物比视野背景明亮的叫明反差(图 1-6 右, 1-7 右),被检物比背景暗的称暗反差(图 1-6 左, 1-7 左)。

2. 环状光阑: 为环状透光的光阑,安装在聚光镜的下面。不同倍数的物镜要配合不同直径和光圈宽度的光阑。有的环状光阑置聚光器内,上下移动聚光器即可配合不同倍数物镜相板。有的把不同直径的环状光阑装配在一个旋转盘内,可以左右旋转,或者和聚光镜连成一组件,称转盘聚光镜,带有中心调节装置。

3. 调轴望远镜: 一般显微镜目镜看不清光阑亮圈和相板的环状圈。只有用低倍调轴

望远镜方能看清楚,以便转动中心调节装置,将两者相重叠对齐,方能呈现清楚图象。

4. 光源和滤光玻片: 要用强光的光源, 最好不产生高热, 高压汞灯是较理想的。其它强光源也可应用, 但应有隔热装置。

观察活细胞或照相, 最好用波长较短的单色滤光玻璃, 通常应用绿色玻片。

三、相差显微镜检查操作步骤

1. 换上带环状光阑的聚光镜和相差物镜, 插入滤光片。

2. 调节光源, 用平面反射镜, 使视野光度均匀。

3. 放上检查的玻片, 用相差物镜在亮视野对好焦点, 然后转上相应的环状光阑。

4. 取去目镜, 换上调轴望远镜。旋转望远镜外筒, 对好焦点, 就可清楚看到相板圆圈(黑圈)和环状光阑(亮圈)的影象。借转盘聚光镜的调节钮使两圈完全重叠。如亮圈大于或小于黑圈, 可升降聚光镜的高度, 至两者完全重合为止。用不同倍数物镜检查都应调轴一次。

5. 取下调轴望远镜, 换上目镜, 即可进行检查。

6. 如用油浸物镜, 应在聚光镜和载玻片之间也滴上镜油。

7. 相差物镜的选择: 选用暗反差或明反差物镜, 可以根据标本的性质、观察目的和个人习惯而定。如习惯于明视野染色标本检查者, 多采用暗反差, 其图象和染色标本黑白象片相似。如计算数量, 观察物体运动, 多采用明反差。物镜吸收率高, 中、低的选择: 如被检物折光率大或和所在介质反差大者, 采用低吸收率物镜。如两者反差小即用高吸收率的物镜; 用高倍镜观察微细结构时, 采用暗反差的低吸收率物镜。以上所提条件仅是作为参考, 最好经过试验, 选择能获得符合要求的清晰影象的物镜。

第二节 相差显微镜检查标本的制作

作好相差显微镜检查的玻片标本, 是获得正确诊断的首要条件。因此, 对取材和制片方法应熟练掌握。

1. 载玻片和盖玻片: 作相差显微镜检查用的载玻片和盖玻片的规格要求严格。玻片质地均匀, 表面光滑, 不能有破损和划痕。如果玻片厚薄不均, 凸凹不平, 光源亮圈畸变, 不能显示完整形象。如有划痕, 灰尘, 在相差镜下非常突出, 影响检查和摄影。

载玻片的标准厚度为 0.8—1.2 毫米, 最好用 1.0 毫米。玻片太厚, 调轴时, 视野亮环变大(把聚光镜提高仍无法弥补)。玻片太薄, 亮圈变小(可降低聚光镜弥补之)。但各厂牌的相差显微镜所要求的玻片厚度不一, 可根据具体显微镜定出玻片规格, 使用同一规格玻片, 以减少调轴麻烦。

盖玻片的标准厚度为 0.16—0.18 毫米。过薄或过厚时, 象差和色差都会增加。

新玻片在使用之前要泡浸在清洁液中 24 时以上, 然后用清水冲净、晾干, 再经 95% 酒精泡浸, 用清洁少毛棉布擦干备用。旧玻片再次使用应先洗净或先用肥皂水洗净, 然后泡清洁液及上述各步骤。有划痕的旧玻片最好不用。

2. 取材: 指肿瘤病理标本。制片前取材是正确诊断的关键步骤, 应细心挑选有代表性、可供诊断的部分制片。

- (1) 大体标本应切开,取瘤组织的实质部分,避免坏死,变性和出血部分。
- (2) 穿刺组织:挑出白色或半透明组织,避免血液,脂肪,肌肉和纤维组织。
- (3) 大量液体如胸、腹水,尿液,灌洗液,应离心吸取富有细胞部分。如含血液,离心后取红细胞层上面白色细胞层制片。

(4) 痰液或食管拉网等粘稠标本,应挑白色组织碎屑制片。

3. 玻片标本的制作:新鲜标本即时制片检查,制片方法常用者有三种:

(1) 印片:将小块组织在滤纸上吸去血液、粘液或渗出物,然后将组织轻印在干净薄载玻片上,使细胞按原来部位粘在玻片上,立即加一滴生理盐水,封上盖玻片,吸去过多生理盐水,边缘以凡士林封固,防止空气渗入。如果操作熟练,要留玻片,可免封固步骤。印片多用于恶性肿瘤及富有细胞成分的肿瘤标本的检查。

(2) 涂片:穿刺组织和肿物表面刮出物涂一薄层在载玻片上,依上法滴加生理盐水和盖玻片封固。检查大量液体应离心取富有细胞部分,滴一滴在载玻片上,加盖玻片封固待查。

(3) 刮片:待检肿瘤组织较致密,如纤维组织较多的硬性肿瘤和含骨、软骨的肿瘤,先用滤纸吸去渗出物,用小手术刀轻轻刮下标本切面上的细胞。然后涂片、滴加生理盐水,加盖片镜检。

如果在病人体表病灶取材,可用金属压舌板,刮下表面细胞制片检查。

制片过程中轻压盖玻片,标本薄一点,使细胞结构清晰,便于观察和照相。但过度重压,可将细胞压破变性造成假象。另外也要尽量避免封入气泡及液体流动。

相差显微镜检查后,可在盖玻片边缘滴入数滴 10% 福尔马林,使盖玻片漂浮,然后从玻片上小心取去盖片,可以制成染色标本对照。

4. 封埋剂:封埋剂是指滴加在载玻片和盖玻片之间的液体,即填充在待检细胞周围的介质。封埋剂一方面起着营养活细胞的作用,另一方面充当细胞周围的背景,所以选用合适的封埋剂对保存细胞生活状态及衬出细胞图象是很重要的。

相差显微镜所以能看出透明标本的原理,在于能把被检细胞与介质(封埋剂)折射率的微小差别变为明暗的差别,如果两者的折射率相同,没有反差就看不到被检细胞的结构。如果两者折射率相差过大,即被检细胞边缘形成亮晕,使被检细胞和周围细胞的轮廓及结构不清。一般选择被检物和介质折射率相差不很大的封埋剂,两者折射率的差异最好不超过 0.05。

各种封埋剂的折光率(20℃):

空气	1.000	四氯化碳	1.463	氯苯	1.523
甲醇	1.331	甘油	1.473	明胶(干)	1.520
蒸馏水	1.333	松节油	1.475		-1.540
乙醚	1.350	蓖麻油	1.477	丁香油	1.530
丙酮	1.359	亚拉伯胶	1.480	溴化乙烯	1.538
乙醇	1.362	四氯乙烯	1.492	二甲基阿尼林	1.559
庚烷	1.388	二甲苯	1.496	二硫一碳	1.630
石蜡	1.433	苯	1.501	二碘甲烷	1.738
氯仿	1.446	香柏油	1.516	玻璃	1.50—1.75

观察活细胞的生活状态时,所使用的封埋剂既要无害而且有营养。要注意渗透压和氢离子浓度。常用的有生理盐水、亨克氏液、培养液和含糖溶液……等。这些溶液的折射率与被检细胞的折射率差别较大。如用血浆、腹水、血浆代用品等,两者折射率差别较小。观察特殊项目,可根据需要采用不同的封埋剂,如观察精子运动可加入稀阿拉伯胶溶液,增加粘稠性,缓和其运动,便于观察。

第三节 相差显微摄影术

相差显微镜检查未固定和染色的标本时,由于生活细胞的功能活动,其形态是瞬息易变的;离体的细胞在不良环境下,不断地发生退行性变,最后死亡自溶,要长时间保存原来的形态较为困难,因此必须及时记录下所见到的形态结构。相差显微摄影就成为相差显微镜检查的重要组成部分。它和一般的显微摄影原理和操作相同,但有其特点。

一、相差显微镜摄影装置

1. 显微镜: 由于相差显微摄影是在检查标本过程中进行的,所以要选择能边检查边摄影的显微镜。三筒显微镜具备有此优点,两斜筒观察,一直筒可以摄影。装上相差聚光镜和相差物镜,就可以应用。

2. 摄影装置: 一般采用小型显微摄影机,可以套放在普通显微镜直筒上,具备调焦目镜和快门,使用甚为方便。有的用散页片装较大型的摄影装置,用磨砂玻璃对焦。后者对相差显微镜摄影更有利,因散页片装的感光胶片有各种型号可供选择,另也可照出较大张、较多内容的相片。

3. 物镜和目镜的选择: 相差显微摄影的效果,视照片是否清晰而定优劣,它是决定于镜头,光源和底片。其中最重要的是镜头,物镜和目镜。物镜和目镜两者中物镜更为重要,所以相差显微摄影要选择较好的相差物镜。在相差物镜中倍数越高镜口率越大,其分辨率也越强。在放大同一倍数时,尽量用高倍物镜和低倍目镜相配合。可以多采用油浸镜头。

二、照明用具

相差显微镜的照明要求强光源,用作摄影时,要比作观察用的光度更强。较精细的高级显微镜多自带光源。如无自带光源,可采用小型电影机放映灯泡(12V. 60W)或高压汞灯作为照明,但应有隔热装置。最简单的隔热方法是用装硫酸铜溶液的玻璃瓶放在光路上,一方面可以隔热,一方面又有滤光作用。显微摄影的光源多数需要加一滤光片,或用硫酸铜滤光隔热水槽也可,使光源成为一波长较短的单色光,最常采用绿色滤光玻璃。

三、感光材料

由于检查的标本不同,相差显微镜下的影相反差也不同。如红细胞、脂滴、颗粒反差较强,组织印片成片细胞反差较低。因此所采用的感光胶片也不同。前者多采用软性胶片,后者采用硬性胶片。硬性胶片曝光时间比软性者长几倍,因此选择胶片要根据标本镜下反差程度而定,也要参考光源强度和曝光时间,一般可以采用21定的散页全色胶片。

印相或放大相纸多采用硬性纸,薄光 III 号或 VI 号纸。配合以硬性显影液,以增加照片的反差。

四、曝光时间

曝光时间是根据光源强弱和视野明暗度而定,应根据具体条件进行摸索。为了避免活细胞的形态变化,通常采取提高光源亮度,缩短曝光时间的办法。在油镜下,曝光时间最好控制在 10 秒以内。

五、放大倍数的计算和细胞大小的测定

有的显微摄影装置上附有放大倍数的标记,但常不如实际测量为准确。

实际测量方法如下:将镜台测微尺分度依同倍数拍摄成相片,将相片每分度的长度和原来测微尺实际长度之比,即为放大倍数。如测微尺 10 微米照出相片长度 1 厘米,放大倍数为 1000 倍。

$10,000(\text{微米}):10(\text{微米}) = 1000 \text{ 倍}$ 。

要测量细胞及其成分的大小,除了用测微尺在显微镜下测定外,还可以将镜台测微尺,依同样放大倍数拍成照片,用此放大的尺直接测量相片的细胞,可以定出细胞大小。

六、相差显微摄影注意点

摄影的步骤和一般显微摄影相同,但要注意以下几点:

1. 标本薄一点,影象较清晰。
2. 避免封埋剂在片中流动,避免空气渗入。
3. 光源应加稳压器以维持光源亮度不变。
4. 显微镜及感光材料要防尘,镜台要防震。

第四节 细胞活体染色法

活体染色系指细胞在生活状态下进行染色。这种方法可以显示活细胞胞浆内的有关成分。活体染色法有两种,一是体内活体染色法,把染料注入体内,通过细胞吞噬作用把色素颗粒摄入细胞内,此法多用在测定网状内皮系统的功能。二是体外活体染色法,利用水溶性的染料通过扩散进入细胞内,然后和细胞内的成分,如线粒体相结合,使它呈现颜色。本节所介绍系体外法或玻片细胞活体染色法,常用的方法为 Whitby 和 Hynes 两氏的耶那氏绿 B (Janus green B) 和中性红染色法。具体操作稍加改动。

一、染色原理

本法是基于耶那氏绿 B 和细胞线粒体有亲和力,而中性红和细胞内嗜中性红的空泡相结合的原理而设计的。但这两种染料对细胞都有毒性作用,尤其是耶那氏绿毒性更大,故其浓度应尽量稀淡。中性红在 pH 6.8 其游离度最大,故染液控制在 pH 7.0 效果较佳。染料进入细胞的量,决定于作用时间的长短和染料的浓度,因此细胞离体后应有充足的时间和染料接触。

二、用具

玻片和盖片的规格和相差镜检者要求一样。另准备一玻璃皿，内置一湿滤纸，放在37℃温箱备用。

三、染色液配制

甲液：耶那氏绿 B 0.4 克 + 中性无水乙醇 100 毫升，配成 0.4% 溶液。

乙液：中性红 0.25 克 + 中性无水乙醇 100 毫升配成 0.25% 溶液。

用时 0.7 毫升的甲液 + 1.75 毫升的乙液，用中性无水乙醇稀释成 10 毫升作为应用液。

染料干片的制备：在纯净载玻片上滴加上述应用液 3—5 滴，均匀铺平在玻片中段待干(或点火烧干)。

四、染色方法

切一片新鲜组织在染料干片上轻印，然后滴加生理盐水一滴，加盖玻片，四周封以石蜡，置玻璃皿中，放入 37℃ 温箱 10—30 分钟，然后在相差镜下观察。涂片或刮片染色方法也相同。

五、结果

细胞胞浆内线粒体被染成淡绿色，有一些小空泡被染成红色或橙黄色(图 1-8)。

这种染色方法只能显示细胞的少数成分如线粒体，但细胞核未能染上颜色。

其它作活体染色用的染料种类较多，其显示的成分也不尽相同，但限于各种原因如溶解度，毒性等因素，未能应用于活细胞染色，有待今后的改进。