

实用肿瘤细胞学

上海市肿瘤医院病理科编著

上海人民出版社

实用肿瘤细胞学

上海市肿瘤医院病理科编著

上海人民出版社

实用肿瘤细胞学

上海市肿瘤医院病理科编著

上海人民出版社出版

(上海绍兴路5号)

新华书店上海发行所发行 上海新华印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 12.5 插页 66 字数 297,000
1975年10月第1版 1975年10月第1次印刷

统一书号: 14171·169 定价: 2.50元

毛主席语录

列宁为什么说对资产阶级专政，这个问题要搞清楚。这个问题不搞清楚，就会变修正主义。要使全国知道。

把医疗卫生工作的重点放到农村去。

应当积极地预防和医治人民的疾病，推广人民的医药卫生事业。

预防为主

FA28/29

前 言

为了贯彻落实毛主席关于“把医疗卫生工作的重点放到农村去”的光辉指示，开展肿瘤预防普查工作，保障人民健康，更好地为工农兵服务，我科在1972年编写的“实用肿瘤细胞学讲义”的基础上，根据本科几年来工作中的实践经验和教训，听取各兄弟医院病理和检验工作者的宝贵意见，并参考了国内外的有关资料编写了本书。内容共分九章，对食管、胃、阴道、肺、泌尿道、胸腹水和淋巴结等七种肿瘤细胞学作了比较详细的介绍，又对乳腺、鼻咽、耳道、口腔、肛管直肠、阴茎、外阴和前列腺等八种肿瘤细胞学作了一般性的介绍。本书力求从实用出发，供广大病理和检验人员，特别是工厂和农村医务人员作参考。由于我们学习马列主义、毛泽东思想还很不够，工作中实践经验不多，所以在内容方面还存在一些缺点和错误。我们决心遵循毛主席关于“一个正确的认识，往往需要经过由物质到精神，由精神到物质，即由实践到认识，由认识到实践这样多次的反复，才能够完成”的教导，在今后实践中不断改进和提高。我们恳切希望各兄弟医院的病理、检验工作者和工厂、农村广大医务人员对本书提出批评和改进的意见。

上海市肿瘤医院病理科

1974.9

目 录

第一章 肿瘤细胞学总论	1
第一节 肿瘤细胞学的应用价值及其局限性	1
第二节 脱落细胞的采集法	2
第三节 涂片的制作法	4
第四节 显微镜诊断的注意事项	11
第五节 正常细胞学	12
第六节 变性的上皮细胞	25
第七节 间变的上皮细胞	28
第八节 肿瘤细胞学	30
第九节 细胞学诊断的分级法和诊断中应注意的问题	38
第十节 肿瘤细胞学在防癌普查中的应用	40
第二章 食管肿瘤细胞学	43
第一节 食管肿瘤的症状、体征和诊断方法	43
第二节 食管脱落细胞的采集和制片	45
第三节 食管的解剖学、组织学和正常细胞学	51
第四节 食管的肿瘤细胞学	53
第五节 食管癌细胞学诊断存在的问题和提高确诊率的途径	62
第六节 食管细胞学诊断在普查中应用	64
第三章 胃肿瘤细胞学	67
第一节 胃癌的症状、体征和诊断方法	67
第二节 胃脱落细胞的采集和制片	68
第三节 胃的解剖学、组织学和正常细胞学	72
第四节 胃的良性疾病细胞学	74
第五节 胃的肿瘤细胞学	76
第六节 胃癌细胞学诊断存在的问题和在普查中的应用	79
第四章 阴道肿瘤细胞学	82
第一节 子宫颈癌的症状、体征和诊断方法	82
第二节 阴道脱落细胞学的临床应用	83
第三节 阴道脱落细胞的采集和制片	84
第四节 女生殖器官的解剖学、组织学和正常细胞学	86
第五节 女生殖器官炎症变性的上皮细胞	89
第六节 女生殖器官的肿瘤细胞学	94
第七节 子宫颈的间变和原位癌	104
第八节 阴道细胞学在诊断和普查中应注意的问题	105
第九节 阴道脱落细胞的激素水平测定法	106

第五章 肺肿瘤细胞学	111
第一节 肺癌的症状、体征和诊断方法	111
第二节 痰液标本的采集和制片	113
第三节 呼吸道的解剖学、组织学和正常细胞学	115
第四节 呼吸道炎症变性的上皮细胞	121
第五节 痰液涂片内的间变细胞	125
第六节 肺肿瘤细胞学	127
第七节 痰液细胞学诊断中的注意事项	140
第八节 其他采痰和制片方法介绍	142
第六章 泌尿道肿瘤细胞学	146
第一节 泌尿道肿瘤的症状、体征和诊断方法	146
第二节 尿液标本的采集和制片	147
第三节 泌尿道的解剖学、组织学和正常细胞学	149
第四节 泌尿道的炎症	153
第五节 泌尿道肿瘤细胞学	154
第七章 胸腹水肿瘤细胞学	160
第一节 胸腹水的采集和制片	160
第二节 间皮的分布、组织学和正常细胞学	161
第三节 胸腹水肿瘤细胞学	167
第八章 淋巴结肿瘤细胞学	174
第一节 淋巴结肿大的病因、症状、体征和诊断方法	174
第二节 淋巴结穿刺的操作步骤和制片法	175
第三节 淋巴结的解剖学、组织学和正常细胞学	177
第四节 淋巴结非肿瘤性疾病细胞学	178
第五节 淋巴结的肿瘤细胞学	181
第六节 淋巴结穿刺细胞学诊断存在的问题	185
第九章 其他肿瘤的细胞学诊断	186
第一节 乳腺肿瘤的细胞学诊断	186
第二节 鼻咽癌的细胞学诊断	188
第三节 耳道肿瘤的细胞学诊断	189
第四节 口腔肿瘤的细胞学诊断	190
第五节 肛管直肠肿瘤的细胞学诊断	191
第六节 阴茎癌的细胞学诊断	191
第七节 女性外阴癌的细胞学诊断	192
第八节 前列腺癌的细胞学诊断	193

第一章 肿瘤细胞学总论

癌肿是危害人民健康较严重的疾病之一。在毛主席革命卫生路线指引下,广大革命医务人员为根治恶性肿瘤,保障人民健康,正在党的一元化领导下,开展一场攻克肿瘤的人民战争。

目前,早期诊断是根治癌肿的关键。在各种诊断方法中,细胞学诊断是比较正确可靠的方法之一,具有简便、安全、正确、经济等特点,适合于各级医疗卫生单位和工厂保健站、公社卫生院、医疗队等基层单位使用。本方法也是大力开展常见恶性肿瘤如子宫颈癌、食管癌、胃癌、肺癌、肛管直肠癌、鼻咽癌等群众性预防普查的主要诊断方法,以发现大量没有症状或仅有轻微症状的早期患者,达到早期发现、早期诊断、早期治疗的目的。

第一节 肿瘤细胞学的应用价值及其局限性

随着肿瘤细胞学的迅速发展,它的重要性日益受到临床医师的重视。但是它和任何事物一样,也是一分为二的,只有正确掌握其特点,再结合其他诊断方法,如临床症状体征、X线检查、各种内腔镜检查、临床化验、病理检验等,才能作出比较正确的诊断。

一、应用价值

1. 阳性率高: 人体某些脏器的肿瘤,如子宫颈癌、食管癌等,细胞学诊断的阳性率高达90%以上,肺癌的阳性率约为70~80%,目前胃癌的阳性率虽然较低,但在采用胃冲洗法、纤维胃镜等新技术后,也可能提高至80%以上(表1-1)。

表 1-1 我科各种癌细胞检查阳性率

类 别	年 份	总 例 数	阳 性 率
子宫颈癌	1955~1956	760	97%
食管癌(包括贲门癌)	1968~1969	185	93%
肺 癌	1963~1964	259	78.4%
鼻咽癌	1955~1958	203	61%
胃癌(不包括贲门癌)	1972	160	50%

2. 对于肿瘤的诊断具有初筛或确诊作用: 人体浅表性肿瘤如子宫颈癌、皮肤癌、口腔癌等,细胞学诊断一般用于初筛,因上述部位的癌肿经细胞学诊断后,还需要根据活组织检查而最后确诊。深部肿瘤如食管癌、胃癌、肺癌等,细胞学诊断结合其他检查方法即可以作为确诊的依据。

3. 适用于防癌普查: 肿瘤细胞学的最大特点在于它可用于大规模的群众性普查,发现早期肿瘤患者,达到“早期诊断、早期治疗”的目的。是控制某些肿瘤,如宫颈癌、食管癌、鼻咽癌的有效方法。

4. 可以确定肿瘤的组织学类型: 在阳性涂片中,约有60~70%的病例可以确定癌肿

的组织学类型,不须再作活组织检查或手术探查,有利于治疗。

5. 设备简便,易于推广:细胞学诊断设备简便、掌握容易,取材、操作方便而安全,病员痛苦少,检查费用低,深受广大临床医师和病员的欢迎。不仅设备较全的医院可以开展此项工作,基层医疗机构,如工厂保健站、公社卫生院、里弄卫生室也可以广泛推广。

二、应用的局限性

1. 有一定的误诊率:任何一种诊断方法都不可能是绝对正确的,细胞学也不例外,如表1-1所示,子宫颈癌和食管癌的阳性率虽在90%以上,但仍有10%左右的假阴性,其他如痰液的假阴性约为30%,而胃癌则高达50%左右。而且可能发生假阳性诊断,根据国内外文献报告,细胞学诊断的假阳性率约在1~3%之间。

2. 某些深部脏器肿瘤不易采得细胞:如肝癌、肾癌、胰腺癌、小肠癌、结肠癌等无法采得较为新鲜的脱落细胞,上述脏器的癌肿虽然也可以作肿瘤穿刺术,但是很可能引起体腔(如胸腔、腹腔)的播散,影响治疗和预后。所以这些脏器肿瘤的细胞学诊断问题尚未完全解决。

3. 不能对肿瘤进行定位:早期的肺癌、食管癌等,虽然细胞学诊断为阳性,但如X线不能显示肿瘤位置,则单纯根据细胞学检查方法是很难定位的。目前虽然试用分段拉球法对食管癌进行定位和支气管引流法对肺癌进行定位,但仍不够简易有效。

4. 诊断耗时多:在细胞学诊断工作中,要求做到不漏诊和不误诊,每张涂片要求不漏过一个视野和一个可疑细胞,所以工作量大而且耗时较多。

尽管肿瘤细胞学还存在一些缺点,但是并不影响其临床实用价值,而且也只有不断的实践中才能逐渐克服其缺点。“中国人民有志气,有能力,一定要在不远的将来,赶上和超过世界先进水平。”我们当前的任务是在毛主席革命路线指引下,在党的一元化领导下,通过广大革命医务人员的努力,进一步普及细胞学诊断技术,提高诊断水平,探讨新的诊断方法,为癌肿的早期诊断作出新的贡献。

第二节 脱落细胞的采集法

采集脱落细胞是细胞学诊断的先决条件,也是提高确诊率的关键。但是有些细胞学工作者往往重视显微镜诊断而忽视标本的采集工作,结果是事倍功半,容易误诊。

创造更好和更有效的采集工具是提高深部癌肿确诊率的重要途径。近年来,我们改进了痰液和胸腹水的采集法,确诊率有了明显的提高。由于使用了食管和胃细胞采集器(即食管球和胃球),有可能大规模开展食管和胃的细胞学诊断。

不同部位的细胞采集方法是各异的,将在以下有关章节内详细介绍,本节仅作概念性说明如下:

一、脱落细胞采集原则

1. 尽可能自病变区直接采取细胞。
2. 采取的标本必须保持新鲜。
3. 采取方法应简便而且容易掌握。
4. 病人痛苦少,容易合作。
5. 不致引起严重的并发症或促使肿瘤扩散。

二、几种常用的细胞采集方法

1. 浅表癌肿：表面涂片或刮片法。

浅表癌肿由于肉眼容易看到,故比较容易早期发现,也最适合作癌肿表面涂片或刮片进行细胞学诊断。但是,由于这些部位也容易作活组织检查,因此临床上除子宫颈癌和鼻咽癌外,其他部位的癌肿只在活检条件比较困难的情况下才作涂片的细胞学检查。

较为常见的浅表部位癌肿的细胞采集方法如下:

- (1) 宫颈刮片: 用于诊断子宫颈癌。
- (2) 阴道和外阴刮片: 用于诊断阴道癌和外阴癌。
- (3) 阴道后穹窿液涂片: 用于诊断女性生殖系统癌肿。
- (4) 口腔涂片: 用于诊断唇癌、舌癌、牙龈癌、颊粘膜癌、扁桃体癌等。
- (5) 肛管直肠涂片: 用于诊断肛管直肠癌。
- (6) 鼻咽涂片: 用于诊断鼻咽癌。
- (7) 眼结膜、外耳道、鼻腔涂片: 用于诊断相应部位的癌肿。
- (8) 皮肤涂片或刮片: 用于诊断皮肤癌。

2. 深部癌肿: 自然分泌液或摩擦涂片法。

有自然腔道与外界相通的深部癌肿,肉眼不能见到,只能用内腔镜检查才能窥见,早期发现较为困难。由于内腔镜检查时技术要求高,病人痛苦较大,所以细胞学诊断配合临床及X线检查即可以确诊,并作为治疗的依据。所以深部癌肿的细胞学诊断必须慎重。

常见深部癌肿的细胞采集方法如下:

(1) 自然分泌液涂片:

- ① 痰液涂片: 用于诊断肺癌。
- ② 尿液涂片: 用于诊断膀胱癌和肾癌。
- ③ 前列腺液涂片: 用于诊断前列腺癌。
- ④ 乳头分泌液涂片: 用于诊断乳腺癌。

(2) 摩擦涂片:

- ① 食管球涂片: 用于诊断食管癌和胃贲门部癌。
- ② 胃球涂片: 用于诊断胃癌。
- ③ 子宫吸取液或刮取液涂片: 用于诊断子宫体癌。

3. 穿刺涂片: 某些位于人体深部,又无自然腔道与外界相通的恶性肿瘤,可用穿刺液涂片作细胞学诊断。但是某些深部恶性肿瘤,如肝癌、肾癌、胸腔和腹腔内癌肿等,穿刺可能导致瘤细胞的扩散,应用时必须十分慎重。

- (1) 胸腔、腹腔及心包腔穿刺涂片: 用于诊断上述体腔内有无癌细胞扩散。
- (2) 淋巴结穿刺涂片: 用于诊断恶性淋巴瘤、转移性肿瘤等。
- (3) 四肢及躯干皮下肿瘤穿刺涂片: 明确肿瘤的性质。
- (4) 脑脊液穿刺涂片: 用于发现脑和脊髓肿瘤在脑脊髓液中扩散的瘤细胞。

4. 其他: 近年来,采用纤维光束内窥镜和微型尼龙刷在病灶处直接刷取细胞,用于诊断食管癌、胃癌、直肠癌、结肠癌、肺癌等,确诊率较高。

第三节 涂片的制作法

涂片的制片过程包括涂制、固定、染色、封固等。涂片质量的好坏对于诊断有很大影响,不少涂片由于质量较差而不能确诊,所以必须根据不同的标本认真做好制片工作。

涂片的制片过程分述如下:

一、涂片的涂制

不同来源的标本,其涂制方法也是不同的。从病灶处直接采取的标本可以直接涂制成涂片,如子宫颈涂片、鼻咽涂片、食管球涂片、胃球涂片等。如标本为大量体液,如胸水、腹水、尿液等,因为所含细胞较少,须在离心沉淀后再涂制成涂片。至于痰液等标本则须选取有效部分制成涂片。关于各种标本的涂制方法将在各有关章节中介绍。

涂制涂片时必须注意以下事项:

1. 涂制涂片时操作须轻巧,以免损伤细胞。
2. 涂片时厚薄须适宜。太薄则细胞太少,影响确诊率。太厚则细胞重叠,影响诊断。
3. 涂片须厚薄均匀。
4. 细胞成分应涂在玻片的右侧三分之二,所余三分之一留作粘贴标签或编号用(图1-1)。

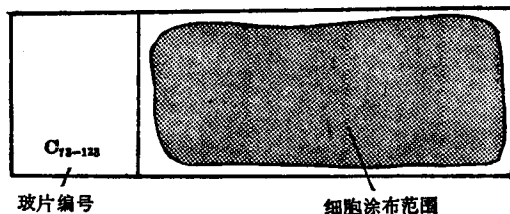


图 1-1 玻片的涂制范围

二、固定

将采得的标本涂制成涂片后,必须在干燥前立即固定。

1. 固定的目的:主要是保持细胞的形态与生活时相似。因为细胞内含有各种酵解酶,用以维持其正常的新陈代谢。当细胞脱落而死亡时,细胞内的酵解酶就破坏细胞,使之溶解消失,这种现象称之为“自溶”。除了细胞内的酵解酶外,各种细菌和白细胞也都有破坏细胞的作用。涂片及时固定后,不但可以防止细胞的自溶和细菌性腐败,而且能使细胞内的物质如蛋白质、脂肪、糖等保持不变。

2. 固定器具:五片直式染色缸。也可用普通大口药瓶代用。

3. 固定液:常用者有下列数种:

(1) 乙醚酒精固定液:配方(每 100 毫升)如下:

95%酒精	49.5 毫升
乙醚	49.5 毫升
冰醋酸	1 毫升

此固定液的渗透性较强,固定效果较好。因医用乙醚价格较贵,可用工业用乙醚或过期的麻醉乙醚代用。

(2) 氯仿酒精固定液(卡诺氏固定液): 配方(每 100 毫升)如下:

无水酒精	60 毫升
氯仿	30 毫升
冰醋酸	10 毫升

此固定液的固定效果与上液相似。其中无水酒精价格较贵,可用工业用无水酒精代用。

(3) 95%酒精固定液: 此液制备方便,适用于大规模防癌普查。缺点是渗透作用略差。

4. 固定方法: 有浸入法和滴加法两种。

(1) 浸入法: 将新鲜而湿润的涂片直接浸入固定液瓶内,如条件许可,每一病例单独放一瓶,以免交叉污染。如果一个病例有两张以上涂片,须用回纹针隔开,防止涂片上的细胞因摩擦而脱落。

(2) 滴加法: 将新鲜涂片平放在染色木架上,然后滴加固定液,待其自然挥发干燥后即可染色。

上述两种方法中,我们认为浸入法固定效果较好。但是固定液每次用后都应过滤,以免玻片上的细胞脱落在固定液中后又粘附在其他病员的涂片上,发生交叉污染。

5. 固定时间: 一般须在 15 分钟以上。胸腹水和尿液涂片中不含有粘液,固定时间可以短些。食管、胃、痰液、阴道涂片中含有较多粘液,固定时间应适当延长。

三、染色

1. 染色目的: 显示细胞的细微结构,以利在显微镜下辨识各种细胞。

2. 染色器具:

(1) 染色架: 用不锈钢或铜制成,每架可放玻片 30 张。

(2) 染色缸: 比染色架稍大的玻璃标本缸。亦可用搪瓷缸、大口凡士林瓶等代替。如涂片数量很少时,可用五片直式染色缸染色,不需染色架。

3. 染色方法: 常用的有苏木素伊红染色法、巴氏染色法、瑞氏染色法等。

(1) 苏木素伊红法: 也是病理切片常用的染色法,上海市各检验单位使用较多。主要的染液是苏木素和曙红。

染液的配制法

1. 苏木素染液:

(1) 试剂(配成 200 毫升):

甲、苏木素	1 克
无水酒精	10 毫升
乙、钾明矾(硫酸钾铝)	20 克
蒸馏水	200 毫升
丙、黄色氧化汞	0.5 克

(2) 配制方法:

1) 将苏木素溶于无水酒精内。如果苏木素不易溶解,可以隔水加热,并用玻璃棒搅拌,使完全溶解为止。

2) 将钾明矾加入蒸馏水中,倾入三角烧瓶内煮沸 2~3 分钟。

3) 将已溶解的苏木素酒精溶液缓缓倾入上述钾明矾溶液内。这时火要很小或三角烧瓶移开火源,以免染液沸出。待全部倒完后,再以强火迅速煮沸 2~3 分钟。

4) 将三角烧瓶立即移开火源,再将黄色氧化汞徐徐加入,同时用玻璃棒搅动,使完全溶解,混合均匀。

在加黄色氧化汞时,即使离开火源也会剧烈沸腾,必须防止沸出。

5) 黄色氧化汞全部加完后,再移至火上煮沸 2~3 分钟,也须防止溶液沸出。待溶液呈深紫色时,立即把三角烧瓶浸入冷水中,或用流水迅速冷却,然后储于棕色玻璃瓶中备用。此液放置时间越长染色效果越好。

6) 冷却后第二天即可使用。用前必须过滤,并且在每 100 毫升苏木素染液中加冰醋酸 5 毫升,则核的染色较佳。

(3) 注意事项:

1) 必须用优质三角烧瓶,并且容积要大,以免在加苏木素和氧化汞时染液沸出。

2) 三角烧瓶在放置火上以前,必须把烧瓶外的水分指干,以免遇火破裂。

2. 伊红染液:

(1) 试剂:

甲、国产曙红	1 克
蒸馏水	100 毫升
冰醋酸	0.5 毫升
乙、95%酒精	75 毫升

(2) 配制方法:

1) 将国产曙红 1 克加入 100 毫升蒸馏水中,再加冰醋酸 0.5 毫升,在玻璃容器内用木棒搅成泡沫,将泡沫取出放另一瓶内,继续搅拌,随时取出泡沫,直至全部成为泡沫为止。

2) 取曙红泡沫溶液 25 毫升,加 95% 酒精 75 毫升即可使用。

附: 有时可用简便配制法,即将国产曙红 0.5 克或 1 克溶于 5 毫升蒸馏水中,然后将 70% 酒精加至 100 毫升即可使用。用此法配制的伊红染液,细胞的着色不及前法鲜艳。

苏木素伊红染色法

1. 常用法:

(1) 涂片经固定后取出浸入水中,洗去固定液。如涂片中粘液较多,染色时染液不易透入,涂片从固定液中取出后可略为加温使干燥,则着色较好。

(2) 在蒸馏水中浸洗数秒钟,以减少涂片的碱性、延长苏木素染液的使用时间。因为苏木素染液内碱性较重时,核着色呈暗灰色,影响染色效果。

(3) 染核: 将涂片水分沥去后,浸入苏木素染液内 5~10 分钟,取出水洗,将涂片上多余染液洗去。

(4) 分化: 在 1% 盐酸酒精(70% 酒精 100 毫升加盐酸 1 毫升)内浸提 2~3 次,约需数秒钟。分化时间长短须灵活掌握,如苏木素染液着色太深,则分化时间应适当长些;如着色正常,则时间可以适当短些。

(5) 水洗数秒钟,洗去多余盐酸酒精。

(6) 蓝化: 将涂片浸在流水中 5~10 分钟,当涂片由原来的淡紫红色转变为蓝色时,表明蓝化已经完成。也可以浸在 35~40°C 的温水中以加速蓝化,或浸在稀氨水溶液(每 100 毫升蒸馏水内加浓氨水 1~2 滴)内,加速蓝化。

(7) 胞浆着色: 在伊红染液内浸染半分钟,沥干。

(8) 脱水①: 浸 80% 酒精内 3~5 分钟。

(9) 脱水②: 浸 95% 酒精(第一瓶)内 5 分钟。

(10) 脱水③: 浸 95% 酒精(第二瓶)内 5 分钟。

(11) 脱水④: 浸 100% 酒精(第一瓶)内 5 分钟。

(12) 脱水⑤: 浸 100% 酒精(第二瓶)内 5 分钟。

(13) 透明①: 浸二甲苯(第一瓶)内 5 分钟。

(14) 透明②: 浸二甲苯(第二瓶)内 5 分钟。

(15) 封固: 将树胶溶液滴在玻片上,再用盖玻片盖封(树胶的配制方法是用1克大马胶溶于10毫升二甲苯内,过滤后即可使用。其浓度可增减二甲苯来调节)。

2. 苏木素伊红快速染色法: 适用于防癌普查。

(1) 涂片经固定后,取出令自干,或加温使其干,再用水洗。

(2) 沥水后浸苏木素染液内5分钟。

(3) 水洗去多余苏木素染液。

(4) 在1%盐酸酒精内浸提1~3次(约数秒钟)。

(5) 水洗数秒钟。

(6) 浸入温水内或稀氨水内,待涂片转化成蓝色时即取出。

(7) 浸伊红染色液内数秒钟。

(8) 在95%酒精内浸数秒钟。

(9) 取出待自干或略微加温使干燥。

(10) 涂片表面涂一层树胶即可在显微镜下观察。

如门诊病员急等报告时,在苏木素染液内浸染后,用水洗去多余染液,即将湿片直接在显微镜下观察,可以在15分钟内作出诊断报告。

染色结果

1. 细胞核染紫色,细胞浆染红色。

2. 红细胞染成淡红色。

注意事项

1. 染苏木素液时: 细胞核的着色清晰程度对诊断影响很大,故染色时应注意下列问题:

(1) 苏木素液的浸染时间须随气温而改变,夏季只需4~5分钟,冬季需要10~15分钟。染色液的新鲜与否也影响染色时间,使用较久的陈旧苏木素液容易着色,染色时间要短些。新鲜的苏木素液不易着色,染色时间要延长5~10分钟。

(2) 苏木素液的染色时间主要应根据涂片是否着色而灵活掌握。涂片已着色的表现是,白色的涂片全部染成橘黄色、紫红色或蓝色。上述颜色因染液新鲜与否而不同。新配制的染成橘黄色或橘红色,使用较久的染成紫红色,至于陈旧的苏木素液则染成深蓝色。

(3) 若在苏木素液内浸染时间过久以致染色过深时,在盐酸酒精内的分化时间也应适当延长一些。

(4) 苏木素液在搁置一夜后,其表面常浮有一层紫灰色结晶,在染色前须用小纸片将漂浮物捞去,否则将粘附在涂片表面而影响诊断。

(5) 苏木素液的底部常有大量沉淀物,应定时过滤。平时染色操作须轻,以免沉淀物粘附在涂片上。

2. 分化时: 分化的目的是使核的着色更具特异性和选择性,使与红色细胞浆对比鲜明,所以分化过程也十分重要。

(1) 分化时间主要应根据分化后颜色改变情况决定(表1-2)。一旦分化完成,必须立即用水洗去多余盐酸酒精,否则核的着色将被褪去。

(2) 在新配制的盐酸酒精中分化时间要短些。如使用过久颜色已发黄,则分化时间要长些。

3. 蓝化时: 蓝化时间应根据涂片是否转变为蓝色而定。夏季水温较高,蓝化时间可以短些,约5分钟

表 1-2 涂片在分化后的颜色表现

苏 木 素 液 情 况	苏木素液染色后涂片的颜色	1% 盐酸酒精分化后涂片的颜色
新 鲜 的	橘 黄 色 或 橘 红 色	淡 黄 色 或 淡 橘 黄 色
略 为 陈 旧 的	紫 红 色	橘 红 色
陈 旧 的	蓝 紫 色	玫 瑰 红 色

左右。冬季水温低,蓝化时间须长些,约10~15分钟。如用温水蓝化,可以缩短时间。

4. 伊红染色时:伊红染液主要用以染细胞浆。它与苏木素液不同,伊红液的着色力很强,所以染色时间不必太长,否则涂片将染成深红色而影响诊断。

(1) 如伊红着色太深,可以延长在80%酒精中浸洗时间,以洗去多余的伊红染液。

(2) 有时新鲜配制的伊红染液不能着色(即染不上红色),可以在染液内加入1~2滴冰醋酸。

5. 脱水和封固时:涂片脱水的目的是将涂片和细胞内的水分除尽,涂上树胶后,细胞透明较好,结构清晰。如涂片上含有水分,涂上树胶后,涂片表面呈云雾状,显微镜下可见大量微小水滴,细胞结构就模糊不清了。当空气比较潮湿时,脱水或烘干的涂片在封固前必须保持干燥。

苏木素伊红染色法的优缺点

1. 染液的配制和染色方法较瑞氏法繁杂,但较巴氏法简便,且质量比较稳定。

2. 细胞的透明度好,核与浆的对比鲜明。染液的渗透性好,即使是粘液和白细胞较多的痰液涂片,其染色效果也较好。

3. 细胞的着色不及巴氏法鲜艳多彩,不易观察细胞的分化情况,故不宜用作测定女性激素水平。

(2) 巴氏染色法:是常用的染色法之一。其主要染料是苏木素、黄色伊红、淡绿、橘黄、俾士麦褐等。

染液的配制法

1. 苏木素染液:同前。

2. 橘黄 G⁻: 以橘黄 G 0.5 克溶解于 5 毫升蒸馏水中,将纯酒精加至 100 毫升,然后再加磷酸 15 毫克。

3. EA36: 由以下染料配制而成。

(1) 亮绿液: 亮绿 0.5 克溶于 5 毫升蒸馏水中,再加纯酒精至 100 毫升。

(2) 俾士麦褐液: 俾士麦褐 0.5 克,溶于 5 毫升蒸馏水中,再加纯酒精至 100 毫升。

(3) 黄色伊红液: 黄色伊红 0.5 克,溶于 5 毫升蒸馏水中,再加纯酒精至 100 毫升。

将上述亮绿液 45 毫升、俾士麦褐液 10 毫升、黄色伊红液 45 毫升混合后,再加磷酸 0.2 克和碳酸锂饱和液 1 滴。

染色方法

1. 将已固定的涂片依次浸入 80%、70%、50% 酒精内各半分钟左右,最后置于水中。

2. 在苏木素液内染 5~10 分钟,取出水洗。

3. 浸入 0.25% 的稀盐酸中数秒钟,以洗去细胞内多余的苏木素液。待涂片转为淡红色或橘红色时即取出。

4. 在流水中蓝化约 10~15 分钟,使涂片又转为蓝色。也可以在稀氨水(100 毫升蒸馏水中加浓氨水 1 滴),或稀碳酸锂(100 毫升蒸馏水中加饱和碳酸锂 1 滴)中蓝化。

5. 如在稀氨水或稀碳酸锂中蓝化时,取出后须流水洗 5 分钟。

6. 依次在 50%、70%、80% 酒精中脱水,最后在 95% 酒精中脱水二次。

7. 在橘黄 G⁻ 中染 2 分钟。

8. 在 95% 酒精中浸洗二次。

9. 在 EA36 染液中染 2~4 分钟,至胞浆着色鲜明。

10. 在 95% 酒精中浸洗二次,以洗去多余染剂,同时可以脱水。

11. 浸纯酒精中脱水。

12. 浸二甲苯中透明。

13. 用树胶封固。

染色结果

1. 上皮细胞: 核呈深蓝色或深紫色。核仁红色。胞浆粉红色或蓝绿色。

2. 红细胞: 鲜红色。
3. 白细胞: 细胞淡蓝色而核深蓝黑色。
4. 细菌: 灰色。
5. 滴虫: 淡蓝灰色。
6. 粘液: 淡蓝色或粉红色。

巴氏染色法的优缺点

1. 细胞透明度好, 细胞结构清晰。
2. 涂片色彩丰富而鲜艳。
3. 可以观察女性激素水平。
4. 试剂和操作比较繁杂, 费用贵, 染色质量不及苏木素伊红法稳定。在基层医疗单位推广有困难。
5. 新配制的染液, 淡绿最容易着色, 所有细胞和核都染成绿色, 染液使用久后, 细胞均染成棕灰色。
6. 涂片中粘液较多时或涂制较厚时, 染液的渗透性较差, 细胞不易着色。

(3) 瑞氏染色法: 是检验室最常用的染色法。一般用于染制血片, 现亦用于肿瘤细胞学中, 以胸腹水、尿液、淋巴结穿刺、肿瘤穿刺等涂片的染色质量较好。

染液的配制法

1. 瑞氏染液:

瑞氏染粉	0.1 克
甲醇	60.0 毫升

将瑞氏染粉 0.1 克置研钵内, 先加适量甲醇, 仔细研磨, 将已溶解的染液倒入清洁玻璃瓶内, 再加入甲醇, 继续研磨, 直至染粉全部溶解, 将剩余甲醇全部倒入瓶内, 过滤后保存于棕色玻璃瓶中备用。储放时间越久, 则染色效果越好。

2. 缓冲液的配制:

1% 磷酸氢二钠	30 毫升
1% 磷酸氢二钾	30 毫升
蒸馏水 加至	1000 毫升

缓冲液配成后须用石蕊试纸测定其酸碱度, 调整 pH 值在 6.5~7 之间。

缓冲液亦可用新鲜蒸馏水或煮沸后密闭保存的蒸馏水代用。蒸馏水搁置久后可吸收空气中的二氧化碳, 使 pH 值降低, 影响染色, 故不宜使用。

染色方法

1. 将涂片平放于染色木架上, 保持玻片在水平位置。
2. 在涂片上滴加瑞氏染液至盖满标本为度, 一般为 4~8 滴。染液不应太少, 否则容易挥发而在涂片上产生沉淀, 但也不宜太多, 否则染液溢出而流失。
3. 1~2 分钟后, 滴加等量缓冲液或蒸馏水。可以轻轻晃动玻片或用洗耳球在玻片上轻轻吹气, 使液体混合均匀。
4. 10~15 分钟后, 用流水缓缓冲洗, 使染液自玻片边缘溢出。冲洗前不应先将染液倒去, 否则沉淀将附在涂片上。冲洗时水力不宜过大, 以免涂片上的细胞被冲去。
5. 染后将湿片放显微镜下观察, 如细胞结构清晰, 说明染色质量较好, 待干后即可诊断。如着色太淡, 需要复染。如着色太深或有大量沉淀, 可用甲醇褪色后复染。

瑞氏染色法的优缺点

1. 染液的配制和染色过程较为简便, 一般检验人员都能熟练掌握, 容易推广普及。
2. 细胞核的收缩变形少, 细胞核的结构清晰。
3. 检验人员对瑞氏染色的细胞形态容易掌握。
4. 细胞膜及细胞浆不易着色, 显微镜下不容易掌握核浆比例的关系。核膜着色亦较差。

5. 对于粘液较多的标本,如痰液、食管、胃涂片等,着色较差。

6. 用于肿瘤细胞涂片时,染色质量不稳定,有时着色太深,有时则太淡,而复染往往费时。

(4) 湖蓝染色法: 根据上海市纺织工业局第二医院的经验介绍如下:

染液的配制法

第一液: 盐基性湖蓝 1 克, 过锰酸钾 1 克, 分别溶于 100 毫升蒸馏水的烧瓶内煮沸溶解。继将过锰酸钾溶液倒入盐基性湖蓝溶液中混合之。再煮沸 25 分钟, 趁热过滤即可。

第二液: 伊红 1 克(国产曙红)溶于 10 毫升水内, 再加入 95% 酒精 85 毫升。

[注] ① 配制第一液时所用之湖蓝, 市售者有深蓝、灰蓝、紫蓝三种, 而品种有粘稠状和粉末状两种, 在配制时须用紫蓝色粉末状之盐基性湖蓝(中国化工轻工公司上海市公司染料供应店出售型号“BB”100% 碱性湖蓝)。过锰酸钾有结晶状和粉末状两种, 配制时宜取粉末状。

② 第二液亦可用 5% 石炭酸代替 95% 酒精(即 1 克国产曙红加 5% 石炭酸液 100 毫升), 但染色偏红, 因此在用此液时, 染色时间应短, 玻片放入后立即取出(约 1 秒钟)水洗。

染色方法

将涂片先固定于 95% 酒精内 10 分钟, 取出后浸第一液内 4 秒钟后水洗, 浸入第二液内 4 秒钟后水洗, 再浸入第一液内复染 4 秒钟以上, 水洗待干, 即可镜检。

涂片最后复染时间的长短可随需要而增减, 水洗后涂片呈紫蓝色即可。如颜色过浅, 可再复染 1~2 秒钟。如过深, 可放酒精中 1~2 秒钟, 褪去部分染液。

湖蓝染色法的优缺点

1. 试剂的配制和染色方法都很简便, 特别是染色时间很短, 费用很省, 适用于大规模防癌普查。
2. 染色操作适当时, 细胞和核的结构都比较清晰。
3. 染色质量不够稳定, 往往着色过深或过淡。
4. 用于阴道涂片效果较好。痰液、食管、胃液涂片则效果较差。

(5) 抗酸杆菌染色法: 在痰液或淋巴结穿刺等涂片中有时可见成片凝固性坏死组织, 除癌肿外, 尚应考虑结核的可能, 必要时可将涂片作抗酸染色, 如找见抗酸杆菌, 可确诊为结核。但后者并不能排除同时有癌肿, 因为二者可同时存在。

染液的配制法

1. 石炭酸复红溶液:

碱性复红酒精饱和液	10 毫升
(配制法为碱性复红 3 克加 95% 酒精至 100 毫升, 溶解后过滤)	
5% 石炭酸水溶液	90 毫升

2. 3% 盐酸酒精:

浓盐酸	3 毫升
95% 酒精	97 毫升

3. 碱性美蓝溶液:

美蓝酒精饱和溶液	30 毫升
(配制法为美蓝 3 克加 95% 酒精至 100 毫升)	
0.01% 氢氧化钾溶液	100 毫升

4. 10% 硫酸:

硫酸(一级)	10 毫升
蒸馏水	90 毫升

染色方法

1. 将制成的新鲜涂片略为加温使干。