



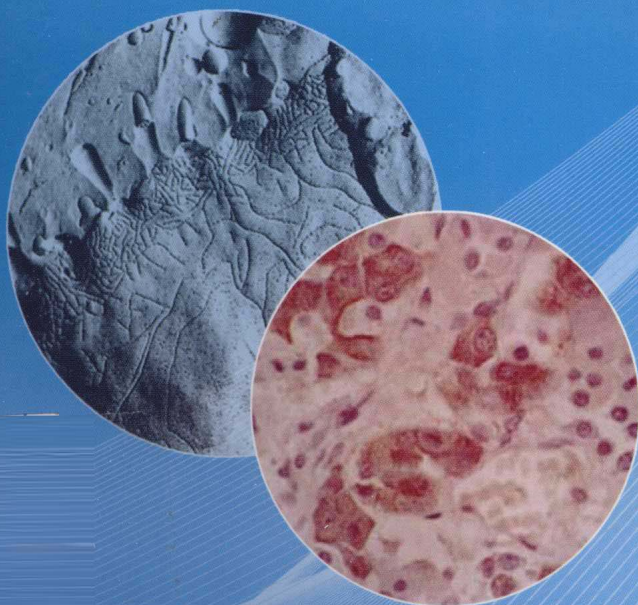
高等医学院校教材

供基础医学、临床医学、生物科学及相关其他专业使用

医学形态学 研究方法基础

YIXUEXINGTAIXUE YANJIUFANGFA JICHU

陈奕权 黄爱民\主编



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS



教育部普通高等教育

医学影像学、医学影像学、医学影像学、医学影像学、医学影像学

医学形态学 研究方法基础

中国医学科学院医学影像研究所 医学影像学研究所 医学影像学研究所

医学影像学 医学影像学 医学影像学



人民卫生出版社
人民卫生出版社

高等医学院校教材

供基础医学、临床医学、生物科学及相关其他专业使用

医学形态学研究方法基础

YIXUE XINGTAIXUE YANJIU FANGFA JICHU

主 编 陈奕权 黄爱民
副主编 王世鄂 张文敏 周琳瑛
编 者 (以姓氏笔画为序)
王世鄂 张文敏 张秋玉
陈奕权 林 静 周琳瑛
黄爱民



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

医学形态学研究方法基础/陈奕权, 黄爱民主编. -北京: 人民军医出版社, 2010.9
高等医学院校教材
ISBN 978-7-5091-3854-0

I. ① 医… II. ① 陈… ② 黄… III. ① 人体形态学-研究方法-医学院校-教材
IV. ① R32-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 184378 号

策划编辑: 徐卓立 池 静 文字编辑: 张朝阳 责任审读: 张之生
出 版 人: 石 虹

出版发行: 人民军医出版社 经 销: 新华书店

通信地址: 北京市 100036 信箱 188 分箱 邮 编: 100036

质量反馈电话: (010) 51927290; (010) 51927283

邮购电话: (010) 51927252

策划编辑电话: (010) 51927300-8203

网址: www.pmmp.com.cn

印刷: 北京天宇星印刷厂 装订: 京兰装订有限公司

开本: 787 mm × 1092 mm 1/16

印张: 16.75 彩页 8 面 字数: 359 千字

版、印次: 2010 年 9 月第 1 版第 1 次印刷

印数: 0001 ~ 3000

定价: 45.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

内容提要

本书是编者在长期教授医学形态学研究方法的实践中总结编写的。全书共分8章，除了介绍形态学中常用的组织学和组织化学、组织培养和细胞培养等研究技术外，还介绍了近代建立的免疫组织化学、原位杂交组织化学、细胞凋亡检测、定量细胞学和组织学技术等新技术以及电子显微镜技术和免疫组织化学技术在病理诊断及研究中的应用。全书循序渐进，文字简明，配有丰富清晰的彩图，直观易学。本书可作为基础医学、临床医学、生物科学及其他学科的研究生和七年制本科生的教材，也适合从事相关科研、教学的人员和医学生参考。

前 言

《医学形态学研究方法基础》一书可为基础医学、临床医学、生物科学以及相关专业的科研、教学人员和研究生提供组织学、病理学和细胞学研究方法的基本知识。本书包含医学形态学、组织化学、组织培养以及近代建立的超微结构、免疫组织化学、核酸原位杂交和定量组织化学等研究技术，其源于6年前为我校硕士研究生开设形态学研究技术课程准备的讲义，其中汇集了编者长期从事研究生教育的教学经验，以及研究生执行课题研究中所需的知识。本书尽量体现研究方法的内涵，内容安排循序渐进，突出重点，通俗易懂，且配以丰富的图表，典型的彩图。对于本书编写中的不足之处，敬请广大读者提出宝贵意见。

陈奕权 黄爱民

2010年9月

目 录

第 1 章	组织学和组织化学	1
第一节	常规组织学标本制作法	1
	一、显微玻片标本的种类	1
	二、组织学切片的制作程序	2
	三、生物染色剂和染色原理	2
	四、石蜡、冷冻切片及 HE 染色标本制作方法	5
	五、其他常用的特殊染色法	11
第二节	组织化学	15
	一、组织化学概论	15
	二、组织化学的组织处理和切片法	21
	三、组织化学成分定位分析	24
	四、缓冲液的配制	29
	五、组织化学方法	34
第 2 章	组织培养和细胞培养	84
第一节	细胞培养的基本概念	84
	一、体外培养、细胞系、细胞株和克隆的概念	84
	二、组织培养的应用范围和价值	85
	三、组织培养的发展史	85
	四、现代组织培养	85
第二节	细胞培养的基本条件	87
	一、细胞培养必备的设施	87
	二、细胞培养常用器材及处理方法	88
	三、常用溶液和培养液	88
	四、影响细胞生长的基本因素	88
第三节	基本的培养技术	89
	一、取材的基本要求	89

二、初代细胞的培养方法	89
第四节 培养细胞的生物学特性	92
一、体内外细胞差异和分化	92
二、培养细胞形态分类	92
三、培养细胞的形态结构	94
四、培养细胞的生长和增殖过程	95
五、培养细胞增殖动力学	98
六、组织培养细胞遗传学特征	98
七、细胞和细胞、细胞和基质的相互关系	99
第五节 培养细胞生物学性状的检测	99
一、培养细胞形态的观察	99
二、细胞生长状况的检测	99
第六节 正常组织细胞的培养方法	100
一、上皮细胞的培养	100
二、肌组织——心肌细胞的培养	102
三、神经组织和神经干细胞的培养	102
四、结缔组织成纤维细胞的培养	104
第 3 章 免疫组织化学	106
第一节 免疫组织化学的概念和分类	106
第二节 免疫组织化学特异性的分子生物学基础	107
一、抗原	107
二、抗体	107
第三节 免疫组织化学的基本方法	118
一、组织玻片标本的制备和抗原保存	118
二、常用免疫组织化学染色方法	120
第四节 免疫组织化学染色效果的监测	134
第 4 章 原位杂交组织化学	137
第一节 原位杂交组织化学概述	137
一、原位杂交组织化学技术发展简介	137
二、探针的种类	138
第二节 原位杂交组织化学技术的基本方法	138
一、防止 RNA 酶污染	138
二、玻片处理和组织固定	139

三、样品预处理	139
四、预杂交	140
五、杂交	140
六、杂交后处理	142
七、显示	142
八、对照实验和 ISHH 结果的判断	142
第三节 探针标记原理	144
第四节 几种常用检测 RNA 的原位杂交组织化学方法	146
一、地高辛标记的 DNA 探针进行原位杂交	146
二、cRNA 探针检测组织切片中的 RNA	147
三、地高辛标记寡核苷酸探针检测 RNA	150
第五节 原位杂交组织化学与免疫组织化学结合法	151
第六节 荧光原位杂交	152
一、荧光原位杂交原理	153
二、荧光原位杂交技术	153
三、荧光原位杂交和引物原位标记技术基本操作方法	155
第 5 章 细胞凋亡检测	157
第一节 细胞凋亡的一般概念	157
一、细胞凋亡与细胞程序性死亡	157
二、细胞凋亡与坏死的区别	158
第二节 细胞凋亡的生物学特征	158
一、形态学变化	158
二、生物化学变化	159
第三节 细胞凋亡的信号通路	159
第四节 细胞凋亡检测方法	160
一、细胞凋亡的形态学检测	161
二、DNA 片段化检测	162
三、膜联蛋白 V 法	163
四、线粒体跨膜电位的检测	164
五、Caspase-3 活性的检测	164
六、流式细胞术	164
七、其他检测方法	165

第6章	定量细胞学和组织学技术	167
第一节	图像分析技术	167
	一、图像分析仪的组成	168
	二、图像处理的基本方法	169
	三、图像分析仪的定量检测	170
	四、图像分析操作步骤及结果分析	172
	五、图像分析技术在生物医学中的应用	173
第二节	流式细胞术	175
	一、流式细胞仪工作原理	175
	二、流式细胞仪的测量和常见图形	176
	三、流式细胞术的样品制备	178
	四、流式细胞术的应用	182
第三节	显微分光光度术	185
	一、显微分光光度计的结构与工作原理	185
	二、显微吸收光度术	187
	三、显微荧光光度术	187
第7章	电子显微镜技术	189
第一节	透射电镜简介	189
	一、透射电镜的原理	189
	二、透射电镜的结构	190
第二节	常规超薄切片技术	192
	一、取材	193
	二、固定	194
	三、脱水	197
	四、包埋	197
	五、切片	198
	六、染色	198
	七、超薄切片技术在生物医学中的应用	199
第三节	负染色技术	200
	一、负染色主要试剂配制	200
	二、操作方法	200
	三、负染色技术在生物医学中的应用	201
第四节	冷冻复型技术	202

一、基本原理	202
二、所需的主要设备和材料	202
三、操作方法	203
四、冷冻复型标本中膜的命名	203
五、冷冻蚀刻技术在生物医学中的应用	204
第五节 电镜酶细胞化学技术	204
一、酶细胞化学技术的基本原理	205
二、电镜酶细胞化学技术的一般步骤	206
三、常见酶的电镜细胞化学	207
四、电镜酶细胞化学技术在生物医学中的应用	211
第六节 免疫电镜技术	211
一、酶免疫电镜技术	212
二、胶体金免疫电镜技术	212
三、免疫铁蛋白技术	216
第七节 电镜放射自显影技术	217
一、放射自显影术的原理及应用	217
二、电镜放射自显影术的操作	217
第八节 扫描电镜技术	218
一、扫描电镜原理和特点	219
二、扫描电镜样品制备的基本程序	219
三、几种特殊的扫描电镜样品制备技术	223
第 8 章 免疫组织化学技术在病理诊断及研究中的应用	226
第一节 免疫组织化学染色方法和检测系统	226
第二节 免疫组织化学染色的反应结果和质量控制	227
一、免疫组织化学染色的反应结果	227
二、免疫组织化学的标准化及质量控制	229
第三节 免疫组织化学染色技术在病理诊断中的意义和应用	232
一、病理诊断中常用抗体的选择	232
二、抗原在细胞中的定位	235
三、免疫组织化学阳性标记的组织学特征	240
四、免疫组织化学技术在临床病理诊断及研究中的应用和意义	242
常见缩略语英汉对照表	252

第 1 章

组织学和组织化学

第一节 常规组织学标本制作法

组织学 (histology) 是研究有机体微细结构及其相关功能的科学, 它是以显微镜观察玻片标本为基本方法的, 故又称显微解剖学。19 世纪中叶英国学者虎克 (Hooke, 1665) 用显微镜观察了植物并首先描述了细胞, 后来施来登 (Scheiden) 和施万 (Schwann) 综合有关研究成果, 于 1838—1839 年创立了细胞学说, 指出细胞是一切生物结构和功能的基本单位。19 世纪前半叶, 由于显微镜的改进, 其放大和分辨率得到明显提高, 机械制造和染料化学的发展促进了细胞和组织微细结构的研究, 为生物学和医学的发展做出有力贡献。随着生命科学的研究不断深入, 现代组织学内容得到不断充实、更新和扩展, 不仅形态观察更细微深入, 而且涉及的领域更为广阔, 从整体水平、细胞水平和分子水平探索许多复杂生命现象的物质基础, 环境与生物体的相互关系, 不仅与现代生物学和医学的许多重大理论进展相关, 而且与许多疾病的防治密切相关。组织学处于现代生命科学各学科相互交叉的网络中, 与分子生物学、细胞生物学、免疫学、病理学、肿瘤学、毒理学等学科理论上相互关联渗透, 技术上相互引用促进, 关系日益密切。

一、显微玻片标本的种类

活组织无色透明, 光通过时光波和振幅不发生改变, 不可能清晰地显示出组织细胞的微细结构, 即使把活组织切成薄片也无法达到清晰成像效果, 必须经过特定方法处理制作成显微玻片标本才能达到满意的效果。通常显微玻片标本制作的方法有如下几种。

1. 切片标本 组织经过固定、切片, 包括石蜡切片、冷冻切片及火棉胶切片、染色等处理。

2. 铺片标本 对一些柔韧的组织, 如疏松结缔组织、肠系膜薄片状的柔软组织, 可直接铺平摊展在载玻片上, 然后固定染色处理。

3. 涂片标本 用于液态或半液态组织标本制作,如血液、骨髓、精液、胸腔积液、腹水、阴道分泌物等。细胞标本的收集也可经过穿刺抽吸、离心沉淀后制成涂片。

4. 磨片标本 用于骨和牙标本的制作。

5. 分离标本 研究某些组织的细胞成分时,可以先用酶消化细胞外成分,获取分离出的细胞成分进行直接观察或进一步做固定染色。

6. 压片标本 直接把组织挤压成薄层制作成标本。临床上对某些器官组织可经穿刺抽吸后压涂成薄片。例如淋巴结、肝、肾和脾等。

7. 整装标本 例如早期的胚胎标本,肠系膜微血管系统的整装标本。

8. 血管注射标本 用无毒色素注入动物体内获取局部血管充盈标本,可用于研究微循环及器官的血液供应。

9. 组织细胞培养标本 观察培养瓶内组织细胞的生理活动及生命过程,如心肌搏动及分化分裂过程等,也可用培养细胞进行固定染色。

二、组织学切片的制作程序

应用光学显微镜观察组织切片标本是医学形态研究的最基本方法。通常光学显微镜的放大倍数可达1500倍,分辨率为 $0.2\mu\text{m}$ 。光镜观察用的组织切片制作程序,见图1-1。从人体或动物体取出新鲜组织,先以固定剂固定(fixation),使组织中的蛋白质迅速凝固,防止细胞自溶和组织腐败。固定组织经处理后用石蜡(火棉胶或树脂等)包埋(embedding)成硬块,用切片机(microtome)切成 $5\sim 10\mu\text{m}$ 厚的组织切片(tissue section),然后铺展黏贴在载玻片上,再经脱蜡和染色。经此制作的标本称石蜡切片。也可以把研究用的新鲜组织直接用快速低温冷冻,用恒冷切片机(cryostat)制成冷冻切片(frozen section),然后进行染色,这种方法常用于组织化学中酶类的显示。石蜡切片经苏木素(hematoxyline)-伊红(eosin)进行染色方法的建立已100多年,至今仍被广泛应用,是研究组织细胞形态结构的重要手段,也是组织化学技术的首要基础方法。

三、生物染色剂和染色原理

染色(staining)可使组织内的细胞结构着色,便于在光学显微镜下观察。生物学常用的染料很多,包括天然和人工合成的染料。染料和颜料不同,前者不但有色且对组织有亲和力,染料中的人工合成染料是有色的芳香族有机化合物,主要为碳氢化合物或苯的衍生物,如醌即是苯环中的2个氢原子被2个氧原子取代而形成的,常称苯胺染料。

生物个体的基本结构和功能单位是细胞,细胞的主要成分为细胞核和细胞质,要使生物切片标本内的组织细胞形态能特征性地显示出来,关键在细胞核和细胞质的显示,因此,选择与细胞核或细胞质亲和力强的不同颜色染料是切片标本染色的基本原则。

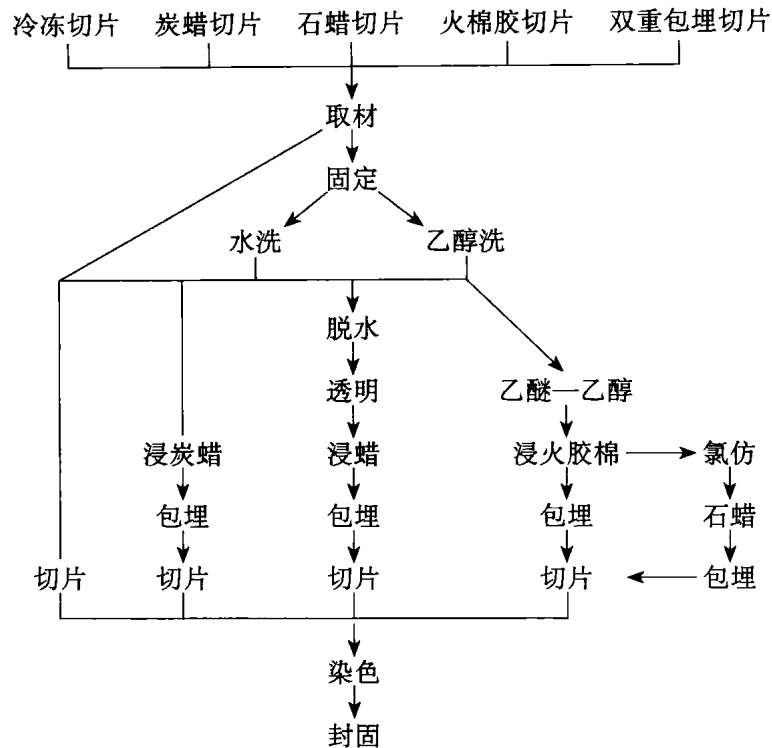


图 1-1 组织切片的制作程序

(一) 生物染料的分类

1. 细胞核染料 常用的天然染料有苏木素 (hematoxylin)、卡红 (carmine)、地衣红 (oresine)。碱性煤焦油染料有硫堇 (thionine)、甲苯胺蓝 (toluidine blue)、甲基绿 (methyline green)、天青-亚甲蓝 (azur-methylene blue)、碱性复红、沙黄、焦油紫等。

2. 胞质染料 一般为酸性染料, 如苦味酸 (picric acid)、亮绿 (light green)、伊红 (eosin)、焰红、橘黄 (orange yellow)、酸性复红 (acid fushin) 及刚果红等。

(二) 染料的分子结构及发色原理

染料是一种有机化合物, 它们含有不饱和的基团, 例如亚硝基 ($-N=O$), 偶氮基 ($-N=N-$) 等, 称发色团。各种染料由于它们的发色团不同, 显示的颜色就不同, 其发色原理, 见图 1-2。染料还含有助色团, 助色团是一些碱性基团如氨基 ($-NH_2$) 或酸性基团如羧基 ($-COOH$) 和磺基 ($-SO_3H$)。助色团决定染料的性质。含有氨基的染料是碱性染料 (basic dye), 在溶液内带正电荷, 称为阳离子染料, 它和组织内的酸性物质有亲和力。含有羧基和磺基的染料是酸性染料 (acid dye), 它在溶液内带有负电荷, 为阴离子染料, 它与组织内的碱性物质有亲和力。

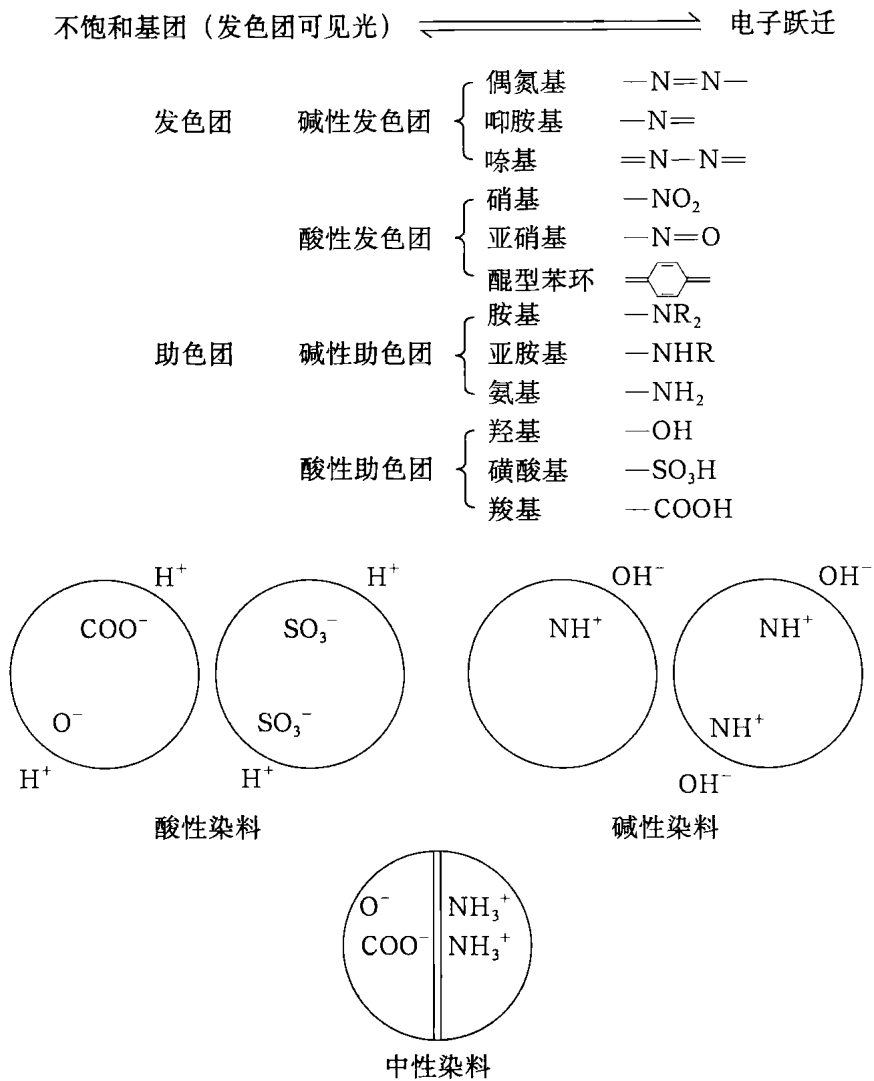


图 1-2 不同染料的分子结构及发色原理

（三）组织细胞化学组分与染色的关系

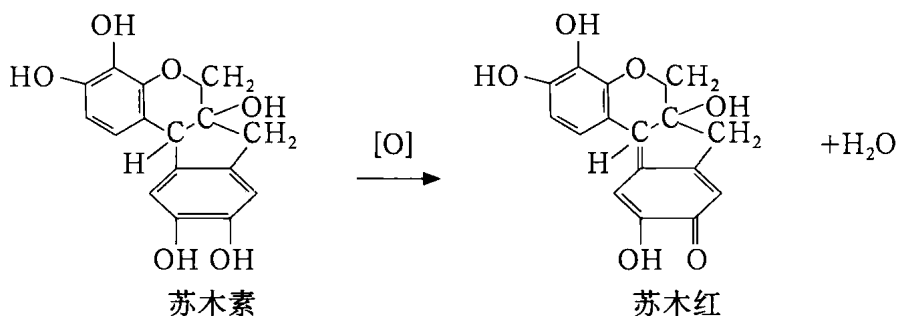
构成细胞和细胞间质的基本成分是蛋白质、糖蛋白或脂蛋白。前者是由若干酸性或碱性氨基酸所组成，所以蛋白质分子中既含有碱性的氨基，又含有酸性的羧基，是两性电解质。氨基和羧基在溶液内均可电离，如羧基的电离大于氨基时则蛋白质带负电荷，此时它与带阳离子的碱性染料亲和力大；如氨基的电离大于羧基时，蛋白质带正电荷，此时它与带阴离子的酸性染料亲和力大。

组织染色与染色液的 pH 相关，在普通染色方法中，染色液的 pH 为 6.0 左右。细胞内酸性物质，如细胞核的染色质、腺细胞和神经细胞的粗面内质网（RER）、透明软骨基质等均可被碱性染料染色，这些成分称嗜碱质。细胞质中的其他蛋白质，如肌细胞

中的肌原纤维、粒细胞的嗜酸性颗粒、胶原纤维等均可被酸性染料染色，这些物质称为嗜酸性，染色液中 pH 的改变，着色效果可发生变化。

(四) 苏木素 - 伊红染色原理

1. 苏木素 苏木素 (hematoxylin) 是从苏木树心提取来的变色物质。其分子未被氧化成苏木红之前不具有发色团和助色团, 因此染色性很弱, 甚至没有染色作用, 经过氧化才具有染色性; 氧化时在苏木素分子中 2 个环上失去了 2 个氢原子, 因此染色环的价键重新调整, 在分子结构中形成醌型苯环和羟基, 因此便具备了发色团和助色团, 形成染料。



羟基为碱性助色团，必须在苏木红中加入不同媒染剂，以形成不同颜色的色精。如用明矾，可以形成蓝色水溶液，带正电荷，可与细胞中带负电荷的磷酸残基结合，形成蓝色物质，所以苏木素是核染色最佳染料，经明矾苏木素染色的标本，在保存良好条件下，数十年不发生变化。

2. 伊红 伊红 (eosin) 是人工合成的酸性染料, 易溶于水或乙醇, 有伊红 Y 和伊红 B, 前者常用, 其酸性部分带阴离子, 对胞质、核仁、肌纤维及胶原纤维有染色作用, 因显红色, 故常用于与苏木素对比染色。

四、石蜡、冷冻切片及 HE 染色标本制作方法

(一) 取材

材料愈新鲜愈好，实验动物组织的取材应在处死后立即进行，组织块厚度不应超过 0.2 ~ 0.5 cm，面积 1 ~ 1.5 cm²。人体的材料如来自手术切除组织应立即送检，尸检材料亦应尽快处理，避免组织自溶腐败。取材时应按程序切开，暴露目的器官，切取时刀剪要锋利，尽量减少挤压及血污，必要时可用生理盐水轻洗，投入固定液固定或做冷冻切片，剩余组织块可用锡铂纸包好，用液氮速冻后置于 -70℃ 冰箱保存。

(二) 固定和常用固定液

固定的作用在于保持组织生活状态的形态结构，并保存组织细胞内的特殊成分以及化学组分，增强对染料的亲和力，以达到保存抗原及 DNA、RNA 等的目的，以便于免疫组织化学和原位杂交技术。组织块固定是否适宜，是决定组织切片质量的关键。固

定液包括单纯固定液和混合固定液,在选择固定剂时,应尽量避免含有抑制组织化学成分及其活性的试剂,例如重金属汞、铬和铁等。

1. 常用的单纯固定剂

(1) 甲醛溶液 (formaldehyde): 即福尔马林 (formalin), 一般用 10% 或 4% 甲醛溶液。它可把相邻的蛋白质以桥键连结起来, 成为不溶性聚合物。在中性或稍碱性溶液中 (pH 7.0 ~ 7.2) 容易解聚为单体, 为防止聚合成多聚甲醛或氧化成甲酸, 可加入适量甲醇及碳酸钙或硫酸镁使变为中性。甲醛的固定作用是可逆的, 因此能保存许多酶的活性。



(2) 戊二醛: 戊二醛 ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) 含有 2 个醛基, 商品戊二醛常含不纯物质, 如聚合物等, 最好用经过纯化萃取的成品。常用浓度为 1.5% ~ 3% 的水溶液或用磷酸缓冲液配制更佳, pH 为 7.2 ~ 7.4, 固定时间 15 ~ 240 min 为宜。其优点是对组织的微细结构保存好, 也不易使酶活性受损, 组织不易变脆, 但渗透力较慢。电镜组织切片标本常用戊二醛固定。

(3) 乙醇 (alcohol): 乙醇是蛋白质的凝固剂, 但穿透速度缓慢, 常和其他固定剂混合使用, 用 60% ~ 80% 乙醇, 在 -20°C 以下固定可保存某些蛋白质和酶, 使之不变性。但乙醇固定后核蛋白能溶于水, 不利于染色质的固定和核的染色。由于脂质可溶于乙醇, 故亦不利于脂质的保存。

(4) 丙酮: 丙酮 (acetone) 可把固定和脱水两步骤相结合, 快速制出标本, 又能较好地保存酶的活性。但渗透力强, 固定作用快, 组织易收缩, 微结构保存较差。固定常用 60% ~ 80% 的丙酮, 于 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 低温下固定 30 ~ 60 min。恒冷箱切片后, 把切片固定于 $-40 \sim -60^\circ\text{C}$ 丙酮内 1 min, 然后做组织化学反应染色。

2. 常用的混合固定液

(1) 饱和升汞-甲醛溶液:

10% 甲醛溶液	100 ml
升汞 (mercuric chlorioid)	6.0g

(2) Carnoy 液:

冰醋酸	10 ml
氯仿	30 ml
无水乙醇	60 ml

临用时配制, 组织固定时间在 3 ~ 4 h 为宜。

(3) Zenker 液:

重铬酸钾	2.5 g
------	-------