

技术与方法

淡水鱼类神经纤维制片的几种简易法*

陈 进 生

(中国科学院动物研究所)

研究神经组织切片方法,已有多种,各有其独到之处,但均非一朝一夕所能奏效的。在神经组织学的参考资料中,大多以人、家兔、白鼠等以及其他哺乳动物作主要材料,取材于鱼类者则甚少。作者曾以淡水鱼类作材料,运用各种研究神经组织学方法,进行鱼类神经组织学工作。在实践过程中,力求得到既经济又简易的方法,不但能节省时间,又能得到完美的效果。试验方法虽然用了很多,但容易掌握,又能得到完美效果者,只有如下几种。这几种方法,皆不用鞣酸(osmic acid),因它不仅价格很贵的药品,而且一般初学神经组织切片的同志,很难掌握,对切片标本的保存也不能过久。在本文所介绍的几种方法皆易于掌握,只要操作纯熟,一定可以得到满意的结果。在党的总路线号召下,多快好省地向科学进军,不仅要求在质上达到一定水平,而且在时间上尽量缩短,亦有其重大的意义。因而,此点滴经验可供进行研究鱼类神经组织学工作者的参考。

做神经组织首要注意的,是各种器皿要洁净,化学药品以国产 A. R. 或 C. P. 为佳。材料必须新鲜,试剂要宽裕,最少为材料体积的 4 倍,时间要严格遵守。

I. Cajal 氏法 先用刀切断活鱼的咽喉,将鱼杀死。取出内脏,避免血液凝结在脑上,影响染色。用骨剪破开颅骨各部,取出全部鱼脑,勿损及脑体。随即放入 0.6—0.7%生理盐水中,将脑上血液洗净后,放入重蒸馏之 95%酒精中固定 12—24 小时(看标本大小而定)。后将脑块移入无水酒精中 24 小时,再用蒸馏水洗 1、2 次约 1 分钟。放入 1.5%硝酸银液(1.5 克硝酸银加入 100 毫升重蒸馏水中),放置在 35°C 温箱内 3—4 星期,隔 24 小时换一次新液。预备下液:

对苯二酚	1 克
蒸馏水	100 毫升
40%福尔马林	5 毫升
95%酒精	10 毫升

上液配好后,待对苯二酚全部溶解即可应用。此

液随配随用,久置失效,用 95%酒精较用亚硫酸钠之渗透力为强。

鱼脑在硝酸银液内浸镀一定时间后,即用蒸馏水洗 1、2 次,约 1 分钟。先倒入上液少许,即起混浊现象(因硝酸银液遇对苯二酚即起还原作用成灰白色沉淀),倒去混浊液,再换入 4 倍于材料的新液。在室温内 3 天,忌光线,应放在暗处。

脱水:用蒸馏水洗 1—2 次约 2 分钟,直入 95%酒精中 1 小时(每半小时换 1 次),随后无水酒精 2 小时,等量二甲苯与无水酒精 2 小时,纯二甲苯 2—3 小时换 1、2 次。等量二甲苯与石蜡 6—12 小时,或过夜。在纯石蜡内 6—8 小时换 2、3 次。用 52—54°C 石蜡包埋。切片厚 10—15 微米。黏片,待干后用二甲苯 2 次脱蜡。用加拿大树胶封装,加盖玻片。

结果:神经纤维呈黑色,在小脑边缘上树状突及细胞纤维呈黄褐色,背底呈淡黄色(图 1)。

II. Ranson 氏法 杀死方法操作同前。用固定液(无水酒精 100 毫升,氢氧化氨 1 毫升)固定 48 小时。水洗 1、2 次约 1 分钟。放入吡啶中 24 小时,用自来水冲洗 24 小时,直至吡啶无气味为最好。冲洗后用蒸馏水洗 1、2 次 5 分钟。换入 2%硝酸银液内 7 天,放在 35—40°C 温箱中。再用蒸馏水洗 1、2 次,入另液(5%福尔马林 100 毫升,焦性没食子酸 4 克)内还原。在室温内 2 天,然后用蒸馏水冲洗 2 次约 2 分钟。直接将脑块放入 95%酒精中脱水,经无水酒精,至等量二甲苯与无水酒精各 2 小时,再经纯二甲苯至石蜡包埋等与上法同。

切片厚 8—10 微米。黏片,待干后用二甲苯二次脱蜡。用加拿大树胶封装,加盖玻片。

结果:很细神经纤维都能显示,呈紫黑色,背底淡黄色。

III. Weigert 氏法 固定鱼脑在 10%福尔马林溶

* 本文插图见封三。

液內 7 天。蒸餾水洗 1 次，在下液內預染。

重鉻酸銅	1.5 克
氟化鉍	1 克
蒸餾水	50 毫升

先將氟化鉍放入蒸餾水中加熱，俟冒出蒸氣時再加入重鉻酸銅，用棒攪拌，溫度不要太高，俟藥品全部溶解後過濾。趁熱投入腦塊，在室溫下置於暗處。24 小時後再換新液 1 次。此液隨配隨用，預染 14 天後，即進行脫水。在蒸餾水中洗 1 次，即換入 70%、80%、90%、95% 酒精各 1 小時，無水酒精 2 小時，等量二甲苯與無水酒精 2 小時，二甲苯透明，石蠟包埋如上法。

切片厚 10—15 微米。黏片，待干後進行脫蠟與染色。切片經二甲苯脫蠟及各級酒精到蒸餾水後，在蘇木精液內染色 24 小時。其配制法如下。

10% 蘇木精液	10 毫升
冰醋酸	2 毫升
蒸餾水	100 毫升

在蘇木精液內染色後用自來水洗 5 分鐘，在下液內分色，其步驟如下。

0.25% 高錳酸鉀溶液內 3—5 分鐘，至切片顏色略變淡色時用蒸餾水洗去高錳酸鉀余液，再入下液內退色約 10—15 分鐘。

1% 草酸水溶液	1 份
1% 無水亞硫酸鈉水溶液	1 份

同時將兩液合併，可在顯微鏡下調節退色，倘染色太重，可再在高錳酸鉀及草酸等混合液內反復操作。直到纖維呈藍色為止，退色恰好後，用自來水沖洗 10—15 分鐘。纖維染色可以變深，或加 1、2 滴氫氧化氨在自來水中，切片即變成翠藍色，再移入蒸餾水中洗 5 分鐘，即進行脫水。切片經過各級酒精，在 90% 酒精時用 1% 伊紅（酒精溶液）復染 1 分鐘（不復染亦可）。隨即入 95% 酒精及純酒精脫水，二甲苯透明。用加拿大樹膠封裝加蓋玻片。火棉膠切片結果與石蠟切片相同。

結果：神經纖維為藍黑色，復染伊紅後細胞呈淡紅色。

IV. CoX 氏法 火棉膠切片。 固定整個魚腦在下液中。標本放入固定液後，不要搖動標本瓶。在配制固定液時，要分別把配好的各預備液順序倒進固定瓶中，否則就要發生沉淀作用，以至失敗。配制次序先將 5% 重鉻酸鉀 20 毫升放入瓶內，再將 5% 鉻酸鉀 16 毫升；以後依次放入 5% 升汞 20 毫升，最後加蒸餾水 40 毫升。用量多少可按標本大小而定，一般固定液與標本的比例酌量增減（1:20），但在各預備液的濃度比例不變。

標本放入固定液時，先用黑布包瓶在室溫內 2 個月，放於不見光地方。不要更換新液及抖搖玻璃瓶。到一定時候要了解浸染情況時，可在腦塊邊緣上切一薄片，放在玻片上加一滴甘油，在顯微鏡下觀察。倘薄片上神經細胞不多，可適當延長時間，如有血管顯現，此表明固定時間太久，可將時間縮短。但一般在 2 個月已經夠了。組織固定時間已經適當後，即進行脫水。用蒸餾水洗 1、2 次，組織直入 95% 酒精及純酒精各 2 小時，等量乙醚與無水酒精 2—4 小時，2—4% 火棉膠 5 天，6—8% 火棉膠 6—8 天，用小紙盒（同包埋石蠟時所用的紙盒相同）倒入 6—8% 火棉膠，把組織按切片需要位置按放適當，放在盛有氣仿之培養皿中。俟火棉膠凝結後，保存在 80% 酒精中使其硬化約 1、2 日，除去紙盒和修正包埋標本塊，用 6—8% 火棉膠把標本塊黏牢在小木塊上。待牢固後用毛筆蘸 80% 酒精進行切片。每片厚 80—100 微米。按次放入 80% 酒精內。切片經過 70、50、30% 及蒸餾水各 1、2 分鐘，然後移入 5% 碳酸鈉水溶液內 20—30 分鐘。此時黃色的切片上漸漸有黑點顯現，即為神經細胞。可用顯微鏡觀察控制着色的深淺，勿使過度。然後按一般石蠟切片的各級酒精脫水（每級 1 分鐘即可），到 95% 酒精時，用下液透明封裝劑封裝：

山達立膠 (Gum Sandarac)	75 克
樟腦精	15 克
松節油	30 毫升
薰衣草油 (lavender oil)	22.5 毫升
95% 酒精	75 毫升
蓖麻油	5—10 滴

此透明封裝劑須預先配制，因各藥品溶解很慢，約需 1、2 月。必待不潔之物全部沉淀後，取用上層清液，分裝在另一玻璃瓶內。切片不需經過純酒精及二甲苯，入 95% 酒精後即將切片鋪在載玻片上，隨即滴上此透明液，不必多加（倘露出切片面時可再加一次），以蓋住切片為止，愈薄愈好。在封裝時容易出現白色，可放入 35% 濕度的溫箱內烘乾，切片即能全部透明（如不放在溫箱，放在避塵之處陰乾亦可）。制好切片，在夏季宜放在陰涼處防膠融解。冬季因膠易於裂開宜加保護，用此膠封裝不用蓋玻片。

結果：神經細胞及纖維呈黑色，背底為淡黃色（圖 2、3）。

V. Golgi 氏法 取新鮮魚腦固定在 10% 中性福爾馬林液中 4—7 日，用自來水沖洗 24 小時。再入蒸餾水中 12 小時後，將腦塊浸入 3% 重鉻酸鉀內用黑布包瓶。放入 40℃ 溫箱內 2—3 日。

鍍銀：次入 1.5% 的硝酸銀溶液中，先將組織投入

少量硝酸銀液內，立刻发生沉淀，再將組織移入适量（至少1:4）硝酸銀溶液中。仍用黑布包瓶，放在40°C温箱內3日后，即可进行脫水。脑块在蒸餾水中洗1次，很快的放入95%酒精中1小时，再入无水酒精1小时，脫水当然不足，但忌在酒精中時間太长，影响切片寿命。在等量乙醚与无水酒精中1小时，2—4%火棉胶2小时，6—8%火棉胶8至12小时，包埋后放入氯仿中凝固。随即置于切片小木块上黏牢。滴上以下的复合油液，如此脑片可先透明，避免经过酒精影响組織。复合油透明液配制如下。以下为一剂，可按比例配之。

石炭酸	50 克
麝香草油(thyme oil)	50 克
香櫟油(bergamat oie)	25 毫升

用毛笔蘸上述油液，涂滴切片刀面和脑块上，随滴随切。切80—100微米，切下切片也存放在油液中。切片经过二甲苯2次，化去多余油液，組織即可完全透明。由中性液树脂胶封装，先涂一薄层，若切片表面露出时，再加涂一层。此种切片不加盖玻片。切片可保存很久不坏。此法在夏秋两季最为适宜。

結果：在白的背底上神經細胞呈棕黑色(图4,5)。

VI. Golgi 氏法 固定魚脑在下液內40天。

3%重鉻酸鉀	50 毫升
40%福尔馬林	1 毫升

隔日換一次新液，固定完后用蒸餾水冲洗2次約1分鐘。即將脑块放入0.75%硝酸銀液內，立即換1次新液，隔24小时再換新液1次，放在暗处。在此液內50—60天后，用蒸餾水洗2分鐘，直接將脑块放入95%酒精及无水酒精中脫水各1小时。在酒精中不宜过长，等量乙醚及无水酒精2小时，2—4%火棉胶7天，6%火棉胶14天。在6—8%火棉胶包埋，在氯仿气中凝固后，用80%酒精滴在刀面和脑块上，切片厚200—250微米。切下切片存放在80%酒精中，切片经过90、95%酒精脫水。在95%酒精后可直入下液透明。

木鱧油(Crcosote)	1 份
石炭酸	1 份
二甲苯	8 份

上液可避免经过无水酒精时火棉胶易于融解，及经过二甲苯时組織变硬，而不易平伏。在透明液內5—10分鐘，用稠树脂胶封装，不加盖玻片。

結果：背底微黃色，神經細胞为深黃色。

总 結

以上数种方法，各有其优缺点。欲观察神經原纖維、髓鞘神經及感觉神經細胞等，以Cajal氏及Weiger^t氏法为最好，如仅观察髓鞘神經，則以Weigert氏法为最清晰，而Cajal氏法对神經原纖維、感觉細胞及小脑边沿上的树状突等，均可兼看。此为Weigert氏法所不及。用Cox氏法神經細胞在整个脑組織中均可显示，尤其对于神經細胞之間的关系及其构造，可得滿意的結果。在操作过程中也易于掌握，容易得到效果。此为其他方法所不能比。但Galgi氏法在每一神經細胞的树状突及軸索之显露，又有其独特之处，而对時間的节约，在整个操作过程中，仅需2星期，更是其他方法所不及。

以一般而論，魚类的神經制片步驟，与文献所載大同小异。而固定与鍍銀的时间，則較哺乳动物为长(經多次試驗，依照文献方法的做法，纖維的呈現不够清楚也不全面，后来逐渐改变時間，方能得到清晰而全面的結果)。

温度的高低对制片过程也有影响，在夏季气温高，固定与鍍銀時間宜較短，冬季气温低宜較长，在不同温度下，最适宜的鍍銀時間为多久，尚須繼續深入試驗，才能得到更有把握的結果。(本文图均見封三)

参 考 文 献

- [1] Bohm, A. A., and Davidoff, M. V.: 1924. A Text-Book of Histology.
- [2] Gatenby & Beams, H. W.: 1950. The Microtome's Vade-Mecum.
- [3] Guyer, M. F.: 1934. Animal Micrology.
- [4] Hardesty: 1920. Neurological Technique.
- [5] Lillie, R. D.: 1948. Histopathologic Technic.
- [6] Schafer, E. S.: 1920. The Essentials of Histology.