

Sihler's 溶液的配制改良

金 东 卫 兵 王文艳

摘要 利用不同浓度的 Sihler's 溶液对人类死胎的膈肌进行 Sihler's 染色,比较膈肌的染色效果、皱缩程度及染色时间。按照 1:1:9(1 体积冰醋酸或 Ehrlich's 苏木精,1 体积甘油,9 体积 1% 水合氯醛) 比例配制的 Sihler's 溶液染色效果最好,且染色所用时间少。

关键词 Sihler's 染色; 膈肌; 溶液配制

中图分类号 R 322-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1808-03

Sihler^[1]于 1895 年首次介绍了 Sihler's 神经染色法,并阐述了蛇的神经支配,使与肌肉神经相关的研究得到飞速发展。后经研究者^[2-5]不断改进,使该染色方法不仅适用于动物肌,且适用于经过甲醛溶液固定的人骨骼肌标本。随着此项技术越来越成熟,染色效果较原始的方法有了极大的提高,但是在染色过程中标本皱缩、染色过深以及染色周期过长等问题仍未能得到有效解决。该课题组利用 Sihler's 染色法对标本染色时,显示不同浓度的 Sihler's 溶液染色效果差别较明显,故设计以下实验。

1 材料与方法

1.1 实验标本 72 具标本均来源于安徽医科大学第二附属医院 2010 年 5 月~2013 年 2 月产科因非胎儿畸形因素引产所获死胎,孕周为 23~32(25.6±2.31)周,实验通过伦理委员会批准及产妇知情同意。死胎引产后立即解剖获得膈肌并固定。采用 SAS 软件^[6]随机将固定好的标本分成 6 组,每组 12 具标本。

1.2 染色方法

1.2.1 取材 解剖大体标本获得完整膈肌。将死胎自第 4 腰椎水平离断,自主动脉裂孔、腔静脉裂孔和食管裂孔下方分别剪断主动脉、下腔静脉和食管。剔除黏附在膈肌下面的肝脏和肾脏及其表面包膜。

自右侧胸骨旁线进入胸腔。剪断主动脉、下腔静脉和食管,并分离附着在膈肌表面的心包膜。在膈上 1 cm 处切开两侧壁层胸膜,并逐渐向下分离,至膈后紧贴胸壁及腹壁继续向下分离 1 cm,两侧膈脚分离至第 3 腰椎水平。

1.2.2 固定 将新鲜的标本立即予以 10% 甲醛固定 4 周以上。

1.2.3 除色素 组织用流水缓慢冲洗 1 h,后浸入 3% 的氢氧化钾溶液中,每 100 ml 氢氧化钾中加入 3% 过氧化氢 0.2 ml,置于 37℃ 恒温摇床中,每 3 d 更换一次溶液,此过程约需要 2 周。

1.2.4 脱钙 组织流水缓慢冲洗 1 h,浸入 Sihler's I 溶液中进行脱钙(每 1 个膈肌标本配 500 ml Sihler's I 溶液),置于 37℃ 恒温摇床中 2 d 换液 1 次。

1.2.5 染色 组织流水缓慢冲洗 1 h,置于新配制的 Sihler's II 溶液中进行染色(每 1 个膈肌标本配 500 ml Sihler's II 溶液) 3 d 换液 1 次。

1.2.6 脱色 组织流水缓慢冲洗 1 h,肌肉重新浸入 Sihler's I 溶液中,使肌纤维脱色,肌肉神经显示为紫黑色。

1.2.7 中和 组织流水缓慢冲洗 1 h,于 0.05% 碳酸锂溶液中浸泡 2 h。

1.2.8 透明 必要时剔除表面筋膜及脂肪组织,将标本依次放入 50%、100% 梯度的甘油中透明,每种浓度 3 d。

1.2.9 保存 将组织置于加入了少量麝香草酚晶体的纯甘油中于低温中保存。

1.3 溶液配制 Sihler's I 溶液中有效成分为冰醋酸, Sihler's II 溶液中有效成分为 Ehrlich's 苏木精液,各组试剂中有效成分浓度不同,见表 1。

1.4 图像分析 面积比:染色后标本面积与染色前面积的比值。面积变化与皱缩程度呈正比,即染色后标本面积占原面积比例越小则皱缩越明显。面积计算采用 PHMIAS 2008 Cs Ver 2.2 软件中自带面积计算功能实现。神经分支的显现效果:染色的效果主要体现在肌肉神经分支的显现效果上。本实验通过比较各个组标本观察到的各级神经分支来评判染色效果。

2014-03-03 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81100412)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院妇产科,合肥 230601

作者简介:金 东,男,硕士研究生;

卫 兵,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-

mail: weibing1965@hotmail.com

表1 实验溶液中的各成分体积的比例

组别	Sihler's I 溶液				Sihler's II 溶液			
	冰醋酸	甘油	1%水合氯醛	醋酸浓度(%)	苏木精液	甘油	1%水合氯醛	苏木精浓度(%)
1	1	1	6	12.5	1	1	6	12.5
2	1	1	7	11.1	1	1	7	11.1
3	1	1	8	10.0	1	1	8	10.0
4	1	1	9	9.1	1	1	9	9.1
5	1	1	10	8.3	1	1	10	8.3
6	1	2	12	6.7	1	2	12	6.7

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 法。

2 结果

经过统计学分析, 6 个组的面积比差异有统计学意义 ($F = 30.3, P < 0.01$)。组 1 ~ 组 4 面积比逐渐增大, 组 4 ~ 组 6 变化不明显, 见表 2。染色情况与皱缩情况一致, 组 1 ~ 组 4 染色效果逐渐变佳, 组 4 ~ 组 6 染色效果相同, 见图 1、2 及表 3。各组总染色时间逐渐增加, 组 1 ~ 组 4 相关步骤所用时间增加缓慢, 组 5 和组 6 所用时间增加幅度则较大, 6 个组的脱钙时间和染色时间差异有统计学意义 ($F_{脱钙} = 85.0, P < 0.05; F_{染色} = 79.3, P < 0.05$), 而除色素时间差异无统计学意义 ($F_{除色素} = 1.2, P > 0.05$)。

表2 染色后各组标本的染色前后面积比($\bar{x} \pm s$)

项目	面积比(%)
1	84.3 ± 3.2
2	85.6 ± 4.4
3	87.6 ± 2.0 * Δ
4	91.0 ± 2.0 * Δ #
5	91.8 ± 1.9 * Δ #
6	91.5 ± 2.1 * Δ #

与组 1 比较: * $P < 0.05$; 与组 2 比较: Δ $P < 0.05$; 与组 3 比较: # $P < 0.05$

3 讨论

本实验按照 Liem et al^[7] 于 1988 年提出的 Sihler's 染色法染色, 在除色素和脱钙步骤中标本置于恒温摇床中, 有效缩短了时间, 同时用自来水代替去离子水, 简化了实验步骤。组 1 中 Sihler's 溶液为 1 体积冰醋酸或 Ehrlich's 苏木精液、1 体积甘油和 6 体积 1% 水合氯醛混合而成, 该试剂配比由 Liem et al^[7] 在 1988 年通过研究鼠硬腭神经的分布情况时

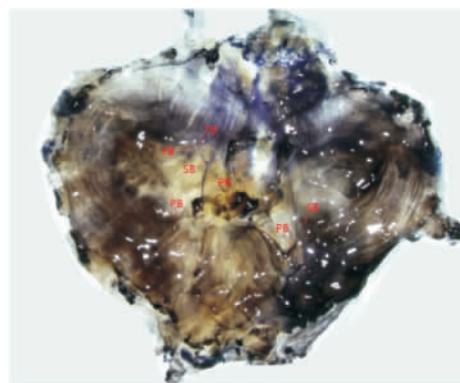


图1 染色效果差的膈肌标本

标本明显皱缩, 形态欠正常, 染色后肌内可见 4 级神经分支。PB: 1 级神经分支; SB: 2 级神经分支; TB: 3 级神经分支; FB: 4 级神经分支

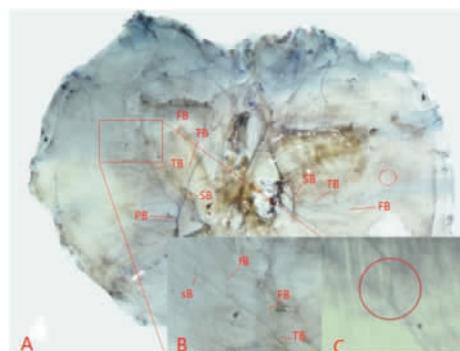


图2 染色效果好的膈肌标本

该标本形态正常, 标本基本无皱缩, 染色效果好 (A) 6 级神经分支清晰可见 (B)。在解剖显微镜下观察 (×20), 可见神经间的交通支 (C)。PB: 1 级神经分支; SB: 2 级神经分支; TB: 3 级神经分支; FB: 4 级神经分支; fB: 5 级神经分支; sB: 6 级神经分支

表3 染色后各组中能显示出各级神经的标本个数

组别	1 级神经	2 级神经	3 级神经	4 级神经	5 级神经	≥6 级神经
1	12	11	11	5	1	0
2	12	11	11	5	1	1
3	12	12	12	8	3	2
4	12	12	12	10	7	4
5	12	12	12	11	8	3
6	12	12	12	11	7	3

提出, 该研究同时阐述了 Sihler's 染色的原理, 认为是肌内神经组织的髓磷脂吸收了 Sihler's II 溶液中的苏木精, 进而使神经着色。组 6 中的溶液配比由李平等^[4] 在改进 Sihler's 染色法时提出。在其实验中并未将其染色效果与 Liem 法的染色效果进行对比, 亦未说明该溶液配制方法的优点, 本实验恰好填补此处的空白。组 5 和组 6 的溶液配比虽然染色效果同组 4 一致, 但染色时间明显长于组 4 是其缺点。

表 4 在实验中相关步骤所用时间($\bar{x} \pm s$)

项目	1	2	3	4	5	6
除色素	13.4 ± 0.9	13.8 ± 0.9	13.3 ± 1.0	13.7 ± 0.8	14.1 ± 1.2	13.8 ± 0.8
脱钙	7.8 ± 0.7	8.3 ± 0.9	9.4 ± 0.5* [△]	10.6 ± 0.8* ^{△#}	12.2 ± 0.7* ^{△#▲}	13.4 ± 1.2* ^{△#▲}
染色	5.7 ± 0.7	6.7 ± 0.7*	7.1 ± 0.7*	7.9 ± 1.1* ^{△#}	9.3 ± 1.1* ^{△#▲}	12.8 ± 0.9* ^{△#▲}
总时间	59.9 ± 1.1	61.8 ± 1.3*	63.0 ± 1.3*	65.1 ± 2.1* ^{△#}	68.7 ± 1.6* ^{△#▲}	73.0 ± 1.6* ^{△#▲}

与组 1 比较: * $P < 0.05$; 与组 2 比较: [△] $P < 0.05$; 与组 3 比较: [#] $P < 0.05$; 与组 4 比较: [▲] $P < 0.05$; 与组 5 比较: $P < 0.05$

本实验中各个组除了 Sihler's I 溶液, Sihler's II 溶液中各成分的配制比例不同之外无任何差异。在染色过程中固定、脱色、中和、透明所用时间均一致。除色素、脱钙和染色步骤所用时间根据标本变化及时调整,这 3 个步骤所用时间受标本部位、形态、大小的影响^[8],因此染色时间与既往学者在其他标本上染色时间对比无意义。由于本实验所选用标本为经过筛选的孕 23 ~ 32 周死胎膈肌,所获得膈肌标本重量、形态均无明显差别,故组间比较有意义。皱缩是影响染色结果的常见原因,皱缩的判断在本实验中根据标本染色之后与染色之前的面积比来判断。固定后的膈肌标本厚度约 1 mm,标本之间厚度差别不大,利用面积比代替了体积比。在高浓度的 Sihler's I 溶液 (> 11.1%) 中,标本在浸入液体 3 ~ 4 d 开始出现皱缩现象,7 d 皱缩达到高峰,之后随着时间的推移,皱缩程度增加不明显。在低浓度 (< 9.1%) 的 Sihler's I 溶液中,长时间的浸泡 (> 2 周) 可使标本发生轻微的皱缩。在表 2 和表 4 中可以看出高浓度醋酸可有效缩短脱钙时间,但皱缩程度较严重。

在既往的研究中,染色效果的好坏主要根据实验者肉眼观察,没有一个确切的指标来衡量染色效果。由于所染标本大小、形态不同,染色的效果差别较大^[8-9],染色对象的不同给定量判断染色效果增加了难度。本研究通过观察肌内神经分支的显现效果来评判染色效果,染色较差的标本一般可观察到 3 级或者 4 级神经分支。而染色效果好的标本可

观察到 6 级甚至 7 级的神经分支,在解剖显微镜下可观察到交通支。本研究显示组 4 ~ 组 6 染色效果无明显增加,即组 4 中溶液染出的标本染色效果已是最好,即使随着时间的延长也无法增加染色效果。

参考文献

- [1] Sihler C. Ueber Muskelspindeln und intramuskuläre ervenendigungen bei schlangen and froschen [J]. *Arch Mikros Anat Entwickl*, 1895 46: 709 - 23.
- [2] Wharton L R. A technique for studying the innervation of organs [J]. *Anat Rec*, 1937 67(2): 469 - 75.
- [3] Freihofer W C. The Sihler. Technique of staining nerves for systematic study especially of fishes [J]. *Copeia*, 1966 3(4): 470 - 5.
- [4] 李平,薛黔. Sihler 肌内神经染色方法的探讨 [J]. *遵义医学院学报*, 2001 24(4): 317 - 9.
- [5] 王启明,薛黔,杨胜波. Sihler's 肌内神经染色法的再改良 [J]. *遵义医学院学报*, 2003 26(4): 322 - 4.
- [6] 胡良平,王琪. 随机化分组的方法 [J]. *中西医结合学报*, 2011 9(7): 714 - 6.
- [7] Liem R S, Douwe van, Willigen J. In toto staining and preservation of peripheral nervous tissue [J]. *Stain Technol*, 1988 63(2): 113 - 20.
- [8] Doty R L, Cummins D M, Shibanova A, et al. Lingual distribution of the human glossopharyngeal nerve [J]. *Acta Oto-Laryngol*, 2009 129(1): 52 - 6.
- [9] Mu L, Sanders I. The human cricothyroid muscle: three muscle bellies and their innervation patterns [J]. *J Voice*, 2009 23(1): 21 - 8.

The modified Sihler's solution

Jin Dong, Wei Bing, Wang Wenyan

(Dept of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Staining the diaphragm which came from the stillbirth by Sihler's solutions of different ranges of solubility, then contrasting the staining effect, shrinkage degree and the staining time. Through the observation of the experiment, we can learn that the staining of solution 4 (1 part glacial acetic acid or hematoxylin, 1 part pure glycerin and 9 parts 1% chloral hydrate) acts best in the shortest time range.

Key words Sihler's stain; diaphragm; solution preparation