

小鼠的骨骼肌型態觀察

B101100025 何震邦

2014 年 5 月 27 日

1 目的

藉由觀察其他哺乳動物的組織型態，以最經濟的方式培養未來行醫判讀人體組織切片的能力。

2 簡介

本實驗取小鼠的組織做成石蠟切片，並取相近的兩片進行 H&E 與 Masson trichrome 染色。觀察的片子是其他同學製作的，所以我們必須在顯微鏡下判讀該片是什麼組織。

3 材料與方法

3.1 固定

固定指的是避免組織降解，並維持細胞與胞器的結構。因為我們要做石蠟切片，所以採取化學固定，也就是使用 10% 中性福馬林緩衝溶液 (neutral buffered formalin)，即在磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (phosphate buffered saline, PBS) 中溶有 4% 甲醛。

3.2 處理

處理組織的目的是以固態物質取代組織中的水，使得組織可以被切薄。生物組織需要在夠硬的基質中才能切成薄約 $5\ \mu\text{m}$ 的切片，以適於在光學顯微鏡下觀察。石蠟是最常用的基質。因為石蠟不溶於水，也就是組織的主要成份，我們首先要把組織脫水。樣本先透過幾個逐漸加濃的酒精浴脫水，接著再利用疏水溶劑，如二甲苯 (xylene)，移除酒精，最後再由熔融的石蠟取代二甲苯。

3.3 包埋

當組織的水份已充分被基質取代時，我們就用相同的物質包裹樣本。此時我們把樣本置入熔融的石蠟中，再放涼使其固化。

因為以福馬林固定、石蠟包埋 (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) 的組織可在室溫下無限期儲存，而且即使在固定的數十年後仍可取出核酸 (包括 DNA 與 RNA)，所以 FFPE 組織是重要的醫學歷史研究資源。

3.4 切片

切片的法子相當有限。一般我們採用垂直切片。

對光學顯微而言，切片機切出約 $5\ \mu\text{m}$ 厚的切片，再掛載於載玻片。

3.5 染色

生物組織在光學或電子顯微鏡下的對比都不明顯。染色使得不同的組織產生對比，並重點標示感興趣的特徵。

3.5.1 H&E 染色

H&E 染色是最常用於組織、病理的光學顯微染色。鹼性藍色的蘇木精 (hematoxylin) 趨向酸性的核酸；酸性的伊紅 (eosin) 則把細胞質染成粉紅。

3.5.2 Masson's trichrome 染色

顧名思義，這種染色方法會染出三種顏色，但其實用了四種染劑。

- Weigert's hematoxylin 是三種溶液的混合物：氯化鐵 (III) 溶於稀鹽酸、蘇木精溶於 95% 酒精，以及被硼砂鹼化的鐵氫化鉀。這個染劑會把核染黑。
- 溶液 A，也就是**細胞質染劑**，有 fushin, peacocke 2R、冰醋酸及水。
- 溶液 B 含有磷鉬酸水溶液，長得像維他露 P。不飽和的有機化合物會把它還原為鉬藍。
- 溶液 C，也就是**纖維染劑**。通常使用藍色或綠色染劑。我們採用藍色的甲基藍。

4 結果

量尺以 μm 為單位，倍率為紙上圖形與實物的比。

5 討論

5.1 為什麼判讀為骨骼肌

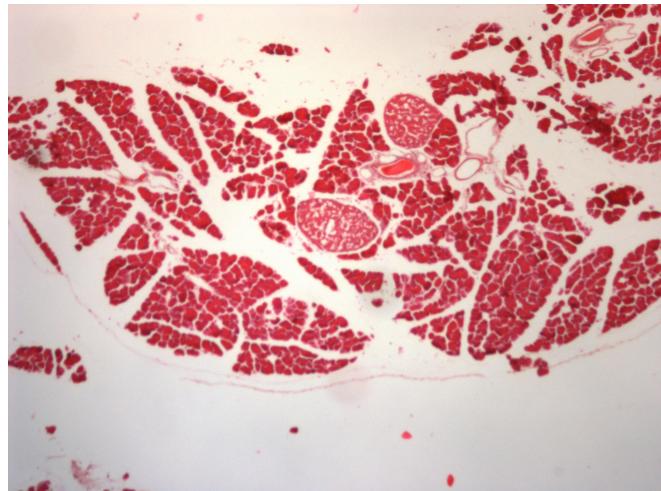
因為它看起來像好吃的牛排。

本片為縱切。肌纖維有一致的直徑，染成均勻的紅色，並可看出 epimysium, perimysium 與 endomysium 三層構造。較深染的細胞核靠近表面，且沒有肌間盤。

5.2 片中的其他結構

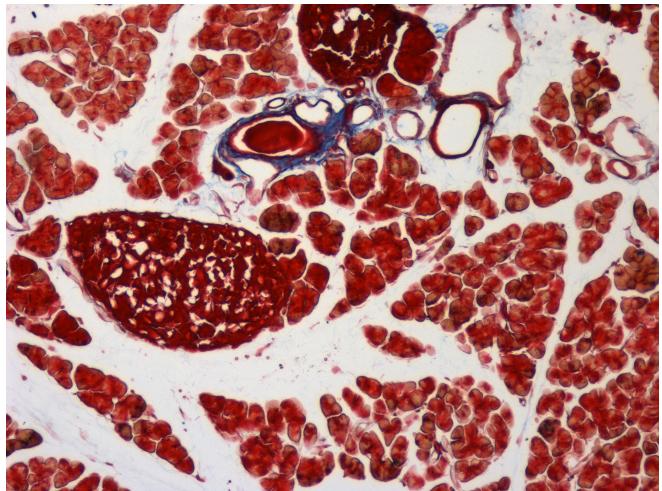
除了骨骼肌外，另有二種組織。一種是在 H&E 與 Masson's trichrome 均染為紅色，內有許多間隙的組織，見圖 5, 7 及 10；另一種管狀組織被 H&E 染成紅色，但被 Masson's trichrome 染成藍色，見圖 8 及 11。

前者我想不出來是什麼東西，但後者應該是小靜脈。血管這種結締組織容易被 Masson's trichrome 染藍，形狀又不圓，應該是小靜脈。



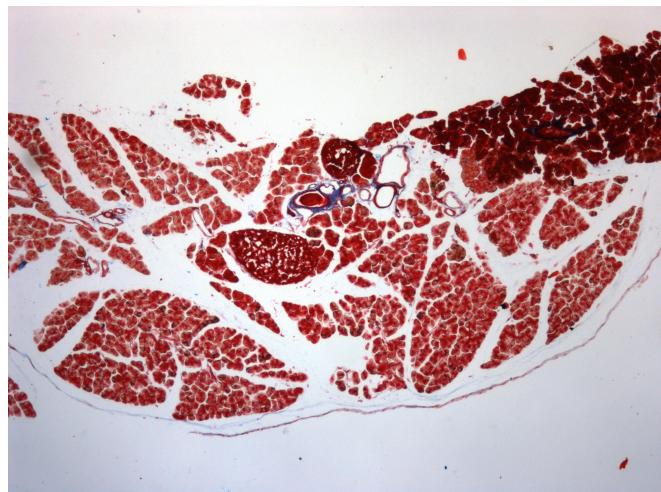
0 20 40 60 80 100

圖 1: H&E 40x



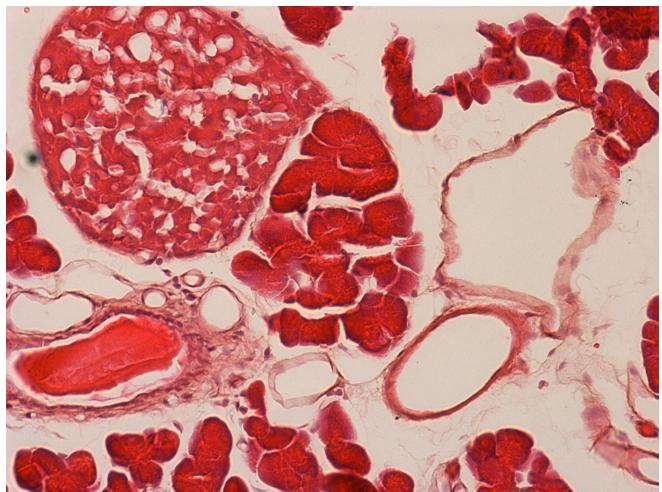
0 10 20 30 40

圖 4: Masson's trichrome 100x



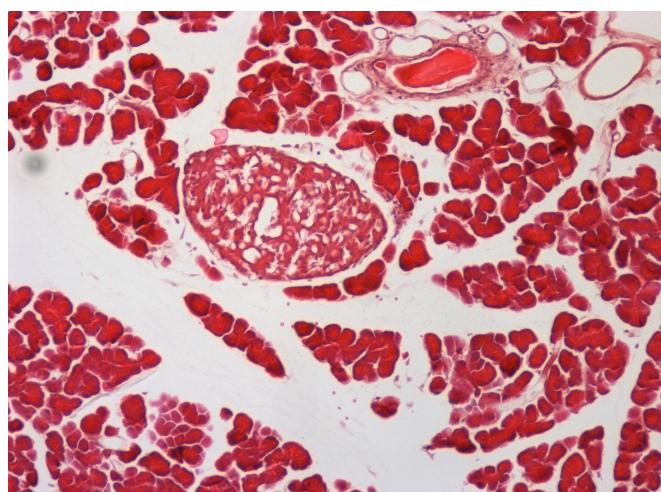
0 20 40 60 80 100

圖 2: Masson's trichrome 40x



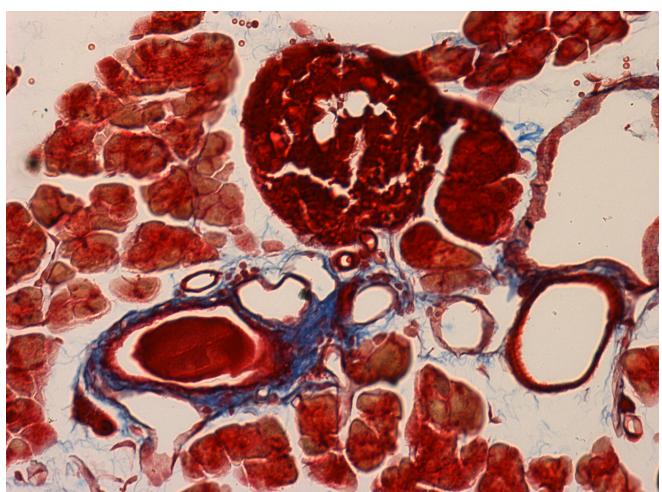
0 5 10 15 20

圖 5: H&E 200x



0 10 20 30 40

圖 3: H&E 100x



0 5 10 15 20

圖 6: Masson's trichrome 200x

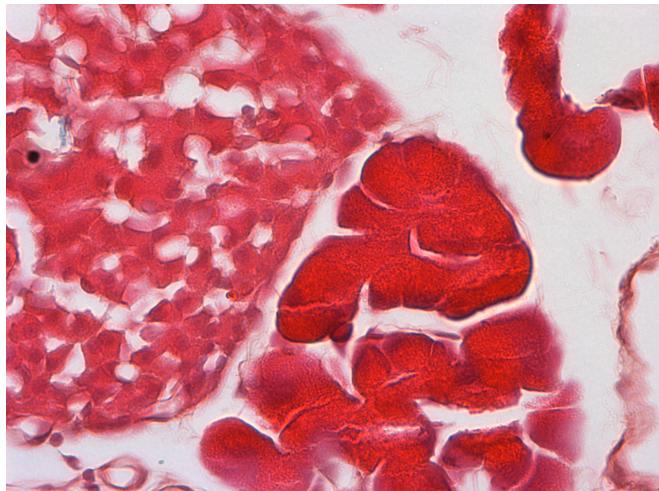


圖 7: H&E 400x 之一

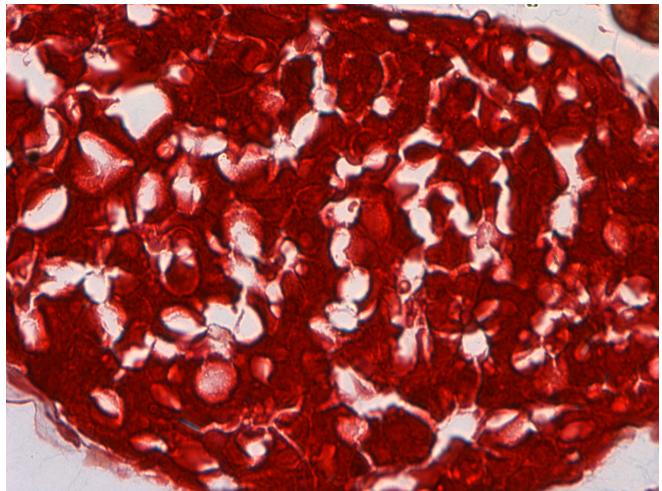


圖 10: Masson's trichrome 400x 之一

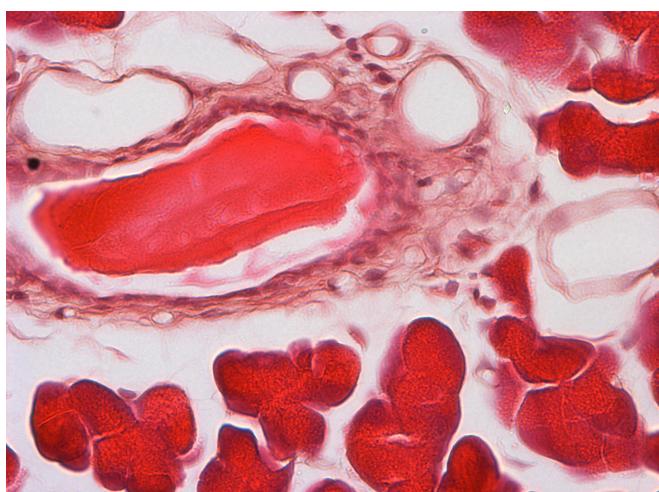


圖 8: H&E 400x 之二

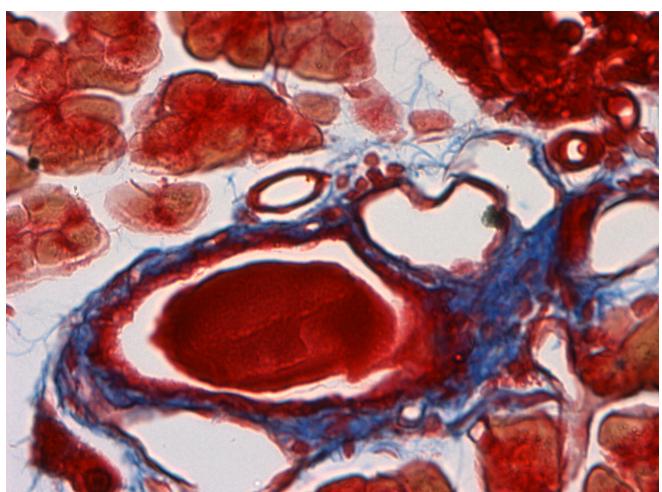


圖 11: Masson's trichrome 400x 之二

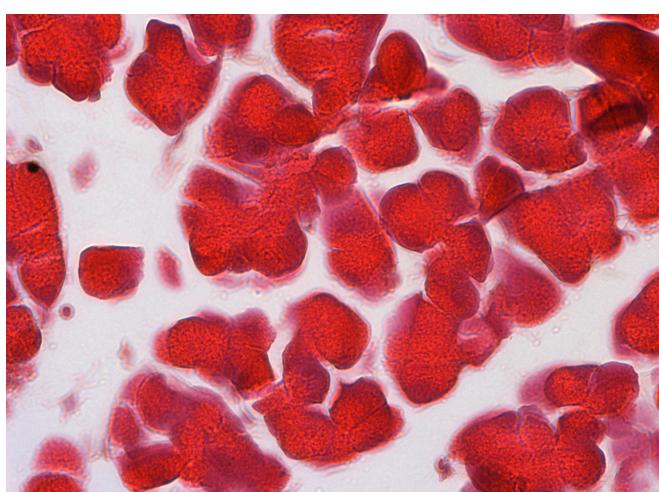


圖 9: H&E 400x 之三

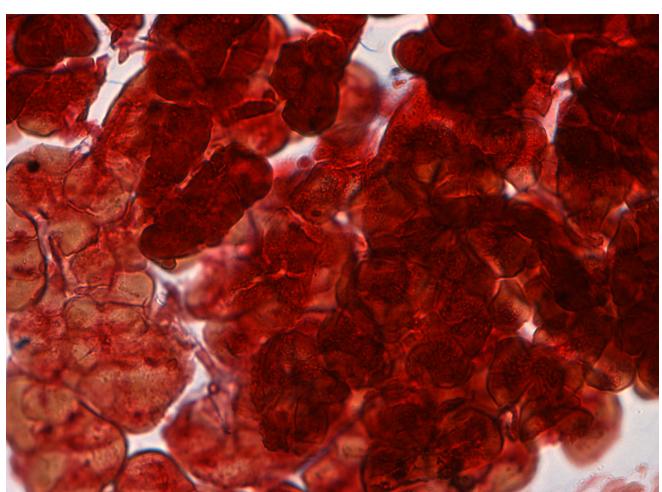


圖 12: Masson's trichrome 400x 之三