



冬青油透明蚕体的技术研究

黄志君, 陈榕榕, 薛剑波, 马维苑, 易辉玉

(华南农业大学 动物科学学院, 广州 510642)

摘要: 利用生物组织透明技术进行家蚕全形组织展示, 对蚕学教学与科研都有特别的意义。该文介绍了一种冬青油(水杨酸甲酯)快速透明蚕体的方法。实验结果表明: 冬青油透明蚕体的效果良好, 气管丛与神经节显示明显; 4 种染色方法都能提高蚕体透明的反差, 总体效果为次甲基蓝>苏木精>中性红>伊红。其中, 中性红和伊红的染色深浅不一、反差相对较差; 苏木精染色明显、着色均匀, 轮廓显示清晰, 但总体反差不明显; 次甲基蓝对蚕体不同组织的着色差异较大且容易辨别。

关键词: 蚕体; 冬青油; 透明; 染色

中图分类号: S88; Q96

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20200361

Technical Study on Silkworm Clearing Using Methyl Salicylate

HUANG Zhijun, CHEN Rongrong, XUE Jianbo, MA Weiyuan, YI Huiyu

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The tissue display of silkworm using tissue clearing technique is of special significance to sericulture teaching and relevant scientific research. This paper introduces a technique on silkworm clearing using methyl salicylate. The results have shown that the effect of methyl salicylate on silkworm clearing is good; the four kinds of dyeing could improve the contrast of silkworm tissues, and overall effect follows the order of methylene blue>hematoxylin>toluylene red>eosin. The dyeing of toluylene red and eosin on silkworm tissues are uneven, providing little contrast; the dyeing of hematoxylin is obvious with even coloring, clear display, yet unobvious overall contrast. The dyeing of methylene blue on different tissues of silkworm is heterogeneous and easy to detect.

Key words: silkworm; methyl salicylate; clearing; dyeing

组织透明技术(tissue clearing technique)又称组织光学透明技术(tissue optical clearing technique), 是指通过一种试剂或多种试剂混合液将生物体的完整组织或器官呈现视觉下透明或光学仪器下可见的技术^[1]。动物组织透明可以展现出动物整体或内部组织器官的形态特点及其之间的联系和演化过程, 为动物解剖学及生理病理学的研究带来便利^[2]。

生物组织光学透明技术的基本原理是通过物理或化学方法减少或降低生物组织内部不同物质的折射率差异和内源性色素对光的吸收, 提高光的通透性而使组织透明, 一般分为固定、透化、脱色和折射率匹配 4 个步骤^[3-4]。依据使用试剂和设备的不同, 生物组织光学透明技术可分为被动型和主动型两大类, 两者的区别在于透明过程中

是否加入外力。被动型光学透明技术主要利用透明剂进行处理, 根据透明剂的性质, 可分为有机溶剂透明法和亲水试剂透明法两种。有机溶剂透明法是利用高折射率的有机试剂脱去生物组织的水和脂, 从而减少折射差异而实现光学透明; 亲水试剂透明法是直接将组织浸入尿素、果糖、甘油、蔗糖等高折射率介质的水溶液中, 通过介质渗透逐渐使组织透明。主动型光学透明技术的本质是高水化脱脂透明, 即在透明过程中通过灌注、引入电场力、热能等外力以去除折射率高的脂类物质^[5-6]。目前, 被动型光学透明技术因操作简单和成本低廉等优点而应用广泛; 主动型光学透明技术对设备的要求高, 操作难度较大, 当前被使用的主要为丙烯酸胺交联替换脂质透明硬化成像/免疫染色/原位杂交兼容组织水凝胶(clear

收稿日期: 2020-07-28; 修回日期: 2021-03-20

基金项目: 华南农业大学精品实践课程建设(zlgc17048)。

作者简介: 黄志君(1971-), 男, 博士, 高级实验师, 主要从事家蚕生理生化方面的研究。

通信作者: 易辉玉(1981-), 女, 博士, 讲师, 主要从事昆虫生理生化方面的研究。E-mail: yihy@scau.edu.cn

lipid-exchanged acrylamide-hybridized rigid imaging/immunostaining/in situ hybridization-compatible tissue-hydrogel, CLARITY)组织透明技术,其利用电泳技术对生物组织进行脱脂透明,在小鼠大脑和昆虫蜜蜂的肠道等器官和组织成功使用,结合组织透明和免疫标记等,可直观展示器官和组织内部的真实状态^[7-8]。

相较于其他的生物组织透明技术,有机溶剂型透明技术的透明度最高,透明速率最快,能适应于多种组织和器官^[5]。用于组织透明的有机溶剂有冬青油(邻羟基苯甲酸甲酯,也称水杨酸甲酯)^[9]、苯甲醇-苯甲酸苄酯^[10-11]、二苄醚^[12]和二苯醚^[13]等,冬青油是使用最早和最多的透明剂。1914年,Spalteholz首次利用透明剂苯甲醇和冬青油成功制作了透明标本用于解剖学和生物学相关研究^[9]。1958年,文献[14]利用丙酮、氯仿、乙醚和冰醋酸混合液加速脱水制作了冬青油透明标本。1988年,文献[15]将冬青油取代无水乙醇渗透进入组织细胞间,改善组织折光性,使整个组织透明^[15]。2018年,文献[16]采用改良后的冬青油透明方法成功制作出能清晰观察到肾血管走行及肾段之间界限的肾透明标本。

随着技术的发展,结合显微成像技术,现代生物组织透明技术已进入全形组织/器官透明成像时代^[17]。目前,生物全形组织透明常被用于难以解剖的胚胎和幼小动物或某些离体器官管道。家蚕是重要的经济昆虫和鳞翅目模式昆虫,也是理想的生物学研究和科普教育模型,但对于家蚕全形组织透明至今都鲜有研究。本论文根据家蚕的特点,通过优化现有的组织透明技术,对经不同方法染色后蚕体的组织透明效果进行了比较和分析。

1 材料和方法

1.1 材料

试验家蚕:品种为大造,室内 25~28℃,桑叶

常规饲养。

试剂:卡诺氏固定液、双氧水(过氧化氢)、氢氧化钠,乙醇、冬青油、乙醚、苏木精、伊红、中性红、次甲基蓝等。

1.2 方法

实验设不透明组、不染色组和 4 个染色组(苏木精染色组、伊红染色组、次甲基蓝染色组、中性红染色组)。

1) 固定:取四龄一天蚕,使用卡诺氏固定液进行固定 20 h;

2) 染色:向蚕体内分别注射 Harris 苏木精溶液、1% 伊红、0.5% 次甲基蓝和 1% 中性红进行着色,每蚕 50 μL , 80 r/min 振荡 10 min;

3) 腐蚀与脱水:将蚕体置入水浴加热至 56℃ 的 1% 双氧水和氢氧化钠混合液(pH11)中反应 60 min,蒸馏水清洗 3 次后用梯度乙醇(75%、95% 和 100%)分别在 56℃ 水浴中脱水 30 min;

4) 乙醚抽脂去污:用水浴加热至 56℃ 的无水乙醚对蚕体进行抽脂去污处理 30 min;

5) 冬青油透明:用水浴加热至 56℃ 无水乙醇与冬青油的混合液(1:1)对蚕体透明 30 min,重复两次后,再用水浴加热至 56℃ 的 100% 冬青油对蚕体透明 3 h。

2 结果与分析

2.1 未经染色和透明处理的蚕体形态

固定后未经染色和透明处理的蚕体表面形态清晰,但不能透视体壁,如图 1 所示,从口器(图 1(b))和气门部位(图 1(c))均不能观察到蚕体的内部结构。

2.2 未染色经冬青油透明的蚕体形态

未染色的蚕体经冬青油透明处理后基本透明,体壁轮廓明显,如图 2 所示,可观察到内部的组织器官,其中气管和神经节显示清楚(图 2(b)、图 2(c)),但消化道和马氏管等器官因反差较小,不能清晰显示细节。

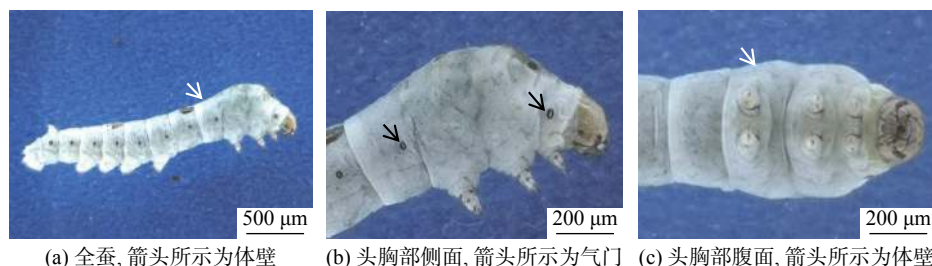
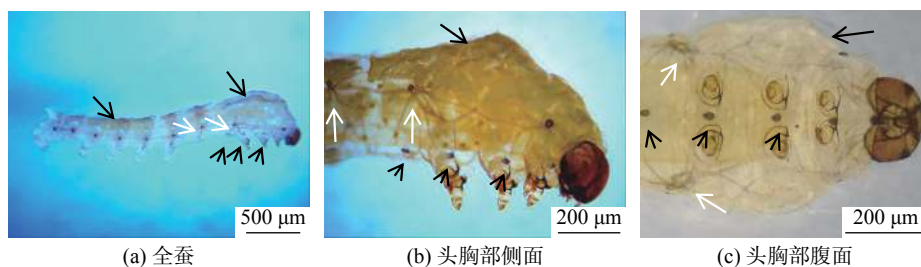


图1 不透明处理的蚕体形态



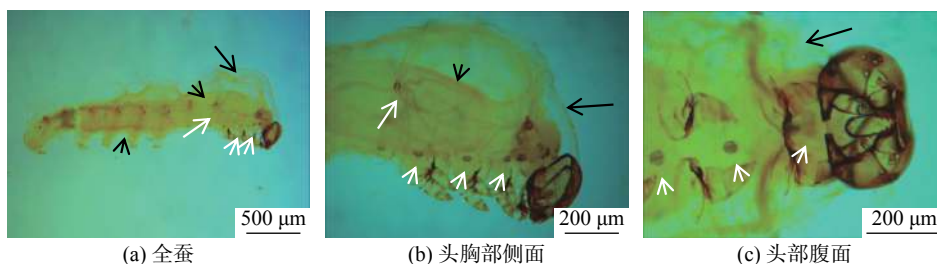
黑色长箭头示体壁；黑色短箭头示神经节；白色箭头示气管丛。

图 2 未染色冬青油透明处理的蚕体形态

2.3 苏木精染色后冬青油透明的蚕体形态

固定的蚕体经苏木精染色，再经冬青油透明处理后透明明显，内部着色不明显，大部分器官清

晰可见，如图 3 所示，消化道轮廓清晰如图 3(a)、图 3(b)所示；由蚕体腹面和侧面可清晰透视神经节如图 3(b)，图 3(c)所示。



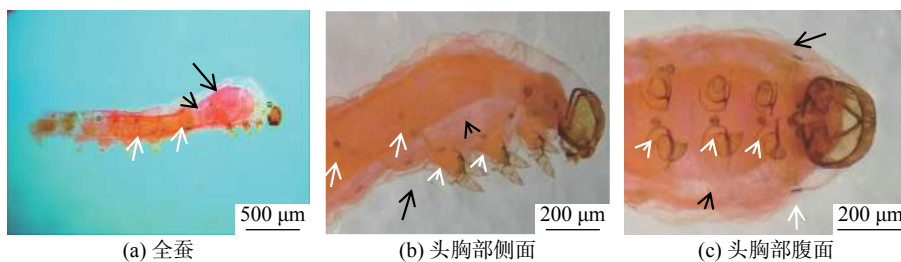
黑色长箭头示体壁；黑色短箭头示消化道；白色长箭头示气门(气管丛)；白色短箭头示神经节。

图 3 苏木精染色冬青油透明的蚕体形态

2.4 伊红染色后冬青油透明的蚕体形态

伊红染色后再经冬青油处理的蚕体透明，体壁着色较浅，如图 4 黑色长箭头所示，中肠着色较深但呈涂抹状，图 4 中黑色短箭头所

示；神经节透视可见图 4(b)、图 4(c)白色短箭头所示，但气管反差较小，不能清晰透视，图 4(a)、图 4(c)白色长箭头所示。



黑色长箭头表示体壁；黑色短箭头表示消化道；白色长箭头表示气门；白色短箭头表示神经节。

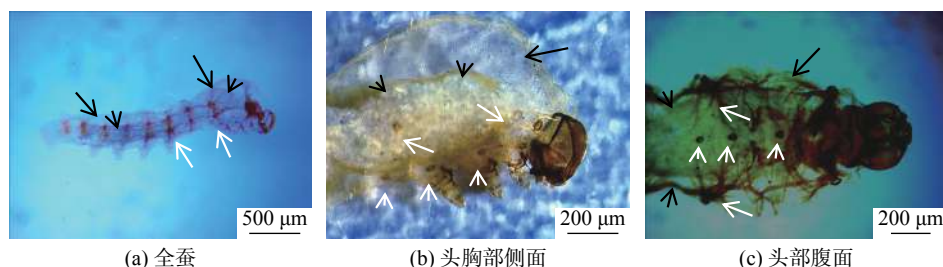
图 4 伊红染色冬青油透明的蚕体形态

2.5 次甲基蓝染色后冬青油透明的蚕体形态

次甲基蓝染色后经冬青油透明处理的蚕体透明，体壁和体腔内组织器官染色清晰，反差明显，气管、气管丛红褐色，如图 5(a)白色箭头所示；从侧面放大观察，神经节清晰，消化道轮廓明显，如图 5(b)箭头所示；从腹面观察可清晰显现气管丛细节，神经节与消化道清晰，如图 5(c)箭头所示。

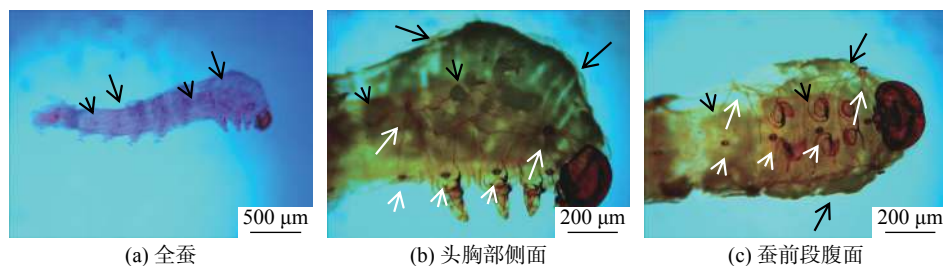
2.6 中性红染色后冬青油透明蚕体形态

中性红染色后冬青油透明的蚕体背部表皮未完全透明，各部分着色深浅不一，但反差较好，各种器官依稀可辨，蚕尾部器官着色明显如图 6(a)所示。从胸部侧面可清晰观察到神经节、消化道及气管等组织器官，如图 6(b)所示；从腹面可透视神经节、消化道及气管，如图 6(c)所示。



黑色长箭头示体壁; 黑色短箭头示消化道; 白色长箭头示气门(气管丛); 白色短箭头示神经节。

图5 次甲基蓝染色冬青油透明的蚕体形态



黑色长箭头示体壁; 黑色短箭头示消化道; 白长箭头示气管丛; 白短箭头示神经节。

图6 中性红染色冬青油透明的蚕体形态

对比发现, 染色或未染色的蚕体经冬青油处理后都能进行透明观察, 未染色的蚕体可通过各组织的折射率差异进行观察, 其中气管丛与神经节显示明显, 而消化管等组织显示度较差。苏木精、伊红、次甲基蓝和中性红 4 种染色处理均能提高内部组织的反差, 不同程度地透视内部组织, 总体效果为次甲基蓝>苏木精>中性红>伊红。其中, 中性红和伊红对蚕体组织的染色深浅不一、反差相对较差; 苏木精染色明显、着色均匀, 轮廓显示清晰, 但总体反差不明显; 次甲基蓝染色效果较好, 且对蚕体不同组织的着色差异较大而容易辨别。

3 讨论

生物组织及器官的不透明的原因为其内部色素对光的吸收以及水、脂肪等不同物质折射率的不均一, 因此组织透明技术的关键是平衡折射率, 最简单直接的方法就是利用具有高折射率的试剂对生物组织及器官进行脱水脱脂和折射匹配^[3,6]。常见的有机溶剂, 如苯甲醇、苯甲酸卞酯、二甲苯和冬青油等, 均具有高折射率(大于等于 1.54), 可与生物组织进行折射匹配, 因而常被作为组织透明剂使用。冬青油的功效多、用途广, 可用来制作香精、化妆品、润滑剂, 可用于疾病治疗和农业上的抗菌杀虫, 可作为促透剂增加亲脂、亲水物质的透皮吸收^[18], 还可替代二甲

苯进行惠特利三色染色^[19]。因为冬青油用途广泛, 其生产和合成工艺成熟, 成本低廉。而且, 与其他透明剂相比, 冬青油的组织透明效果相对稳定, 在较高温度下(50~60℃)反应数小时后便可完成透明, 且对人体基本无害。本试验同时利用二甲苯进行了蚕体组织透明, 但效果不如冬青油。

家蚕具有含几丁质的体壁, 体壁下存在大量脂肪体组织, 体壁细胞含有尿酸与各种色素, 它们对光产生强吸收从而会影响组织透明效果。因此, 在进行组织透明前必须对体壁组织及脂肪进行处理。本试验在透明操纵前对蚕体进行了 NaOH 腐蚀体壁、双氧水漂白去除体壁杂色、醚类溶解和抽提脂类等去污、去色素和去脂的处理, 为组织透明提供了基础和保证。另外, 在腐蚀、脱水、抽脂、透明的过程中, 我们使用了水浴加热的方法, 该方法不但能加快实验进度, 而且还提高了实验的效果。为更好地呈现蚕体内的各组织, 我们使用不同染色剂对蚕体进行染色, 以通过颜色反差呈现不同组织。次甲基蓝、苏木精、中性红和伊红是常用的组织染色剂, 其中次甲基蓝和苏木精可与组织细胞内的 DNA 结合而使细胞核被染为蓝色, 中性红可将细胞核染成红色, 伊红能将细胞质等酸性部分染为红色。4 种染色剂对蚕体的染色效果各有不同, 次甲基蓝和苏木精的染色效果均一但不明显; 伊红和中性红对蚕体的染色不均一, 二者分别对消化道、蚕体尾部染色

重。这可能与染色剂渗入组织细胞的量和质有关,可能在蚕体透明后进行染色的效果更好。

近年来,结合免疫荧光染色等技术,生物组织光学透明技术已发展到生物体三维光学成像^[20-21]。多使用亲水型透明剂来透明化表达荧光蛋白(或带有示踪剂)的组织样本,常用方法有 Scale 和 ScaleS 等^[22]。本实验也尝试了利用 Scale 透明剂进行蚕体组织透明,但其效果不太理想,还需要进一步的摸索和实践。

4 结束语

组织透明技术可以使组织完整,避免结构信息丢失,使组织或整个生命个体光学透明,提高成像焦深和对比度,从而实现生物体全身细胞分析进程,为在生命科学中应用先进的光学技术提供新的策略。

本研究结合染色反差,利用有机透明试剂冬青油成功对蚕体进行了透明处理。结果表明,蚕体组织气管丛与神经节显示明显;次甲基蓝、苏木精、中性红和伊红 4 种染色剂对蚕体染色和提高透明反差的总体效果依次为次甲基蓝>苏木精>中性红>伊红。实验结果为今后蚕体等动物或较大器官的全形组织透明工作积累了经验,提供了技术参考,但如何使各组织同时达到精细着色与透明等则还需进一步地探索。

参考文献

- [1] 王培新,张丹,尚爱加,等.组织透明技术[J].神经解剖学杂志,2016,32(1):124-128.
- [2] 侯鹏高.人体透明标本制作技术及研究进展[J].齐齐哈尔医学院学报,2012,33(23):3264-3266.
- [3] YU T T, ZHU J T, LI D Y, et al. Physical and chemical mechanisms of tissue optical clearing[J]. iScience, 2021(24): 102178.
- [4] RICHARDSON D S, LICHTMAN J W. SnapShot: Tissue clearing[J]. Cell, 2017, 171(2): 496.
- [5] 李亚敏,薛成志,李贵叶,等.生物组织光学透明技术研究进展[J].生物学杂志,2017,34(6):83-88.
- [6] 田婷,杨朝阳,李晓光.组织透明化技术的研究与应用[J].中国组织工程研究,2020,24(21):3363-3371.
- [7] CHUNG K H, WALLACE J, KIM S Y, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems[J]. Nature, 2013, 497(7449): 332-337.
- [8] 张洋逸,黄伟峰,何楠,等. CLARITY 组织透明化技术在蜜蜂肠道组织上的运用[J].昆虫学报,2019,62(6):703-709.
- [9] SPALTEHOLZ W. Über das durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen präparaten und seine theoretischen bedingungen[EB/OL]. [2020-04-28]. <https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=87b3495f1a423640bd15ccd970aacbb9>.
- [10] SCHWARZ M K, SCHERBARTH A, SPRENGEL R, et al. Fluorescent-protein stabilization and high-resolution imaging of cleared, intact mouse brains[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0124650.
- [11] CAI R, PAN C, GHASEMIGHARAGOZ A, et al. Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skullmeninges connections[J]. Nat Neurosci, 2019, 22(2): 317-327.
- [12] ERTURK A, BECKER K, JAHRLING N, et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO[J]. Nat Protoc, 2012(7): 1983-1995.
- [13] YI Y, MEN Y, JING D, et al. 3-dimensional visualization of implant-tissue interface with the polyethylene glycol associated solvent system tissue clearing method[J]. Cell Prolif, 2019, 52: e12578.
- [14] 刘正津,钟世镇,何光麓.解剖学技术[J].广东解剖通报,1979(1):78-81.
- [15] 杨弘远.用荧光染色与冬青油透明技术显示花粉细胞核[J].植物学报,1988,30(3):242-247.
- [16] 李兵,姚伟,孙建永,等.人体肾透明标本的设计与制作[J].局解手术学杂志,2018,27(2):141-143.
- [17] 李瑛泽,邵志华,李思光.组织器官透明化技术在三维成像研究中的应用[J].解剖学报,2018,49(3):400-405.
- [18] 高学成,全燕.冬青油促进蛇床子素和桅子苷透皮吸收的研究[J].中国中药杂志,2017(7):1338-1343.
- [19] SALLEH F M, ANUAR T S, YASIN A M, et al. Wintergreen oil: A novel method in Wheatley's trichrome staining technique[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012(91): 174-178.
- [20] 段红梅,尚俊奎,郝鹏,等.两种组织透明技术在免疫荧光染色观察脊髓3D结构中的应用[J].中国康复理论与实践,2016,22(4):417-421.
- [21] 王培新,王乐凯,李士强,等.两种荧光示踪剂Fluoro-Gold和Fluoro-Ruby与组织透明技术兼容性研究[J].解放军医学院学报,2019,40(1):72-75.
- [22] HAMA H, KUROKAWA H, KAWANO H, et al. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain[J]. Nature Neuroscience, 2011(14): 1481-1488.

编辑 张俊