

# 氰酸銀鍍銀染色法之觀察

郭倍榮 吳鳳光

## 摘要

石蠟切片之鍍銀染色法，因複雜與費時而曾經過多次的修改。本文對 Ungi-witters, Rowles, Linder 等人提出之氰酸銀對組織切片之鍍銀法加以討論，並考慮其可能之反應機構。而染色液之組成，酸鹼值、溫度，和步驟皆對組織染色之結果有所影響，本文並討論其對組織切片之影響與變化。

## 前言

鍍銀染色，是常被用於石蠟切片之染色技巧，其染色步驟繁多，但常可表現出組織構造與形態上之特徵，故常被用來當做組織切片之染色技術。鍍銀染色法，常須考慮多種因素，包括：固定方法、脫鈣方式，以及工作條件，包括工作液之組成和濃度，以及銀化合物的種類，酸鹼度，緩衝液之種類，工作溫度和顯相液的效能；其中，每一項因素都會影響染色的結果。由於影響結果之因素多，所以有許多染色修正法。Samuel<sup>(1)</sup>認為，鍍銀染色法技巧的繁多，乃是由於對鍍銀過程和顯相過程的不了解所致。本文採用 Ungi-witters (1950)<sup>(2)</sup>，Rowles 和 Brain (1959)<sup>(3)</sup>，和 Linder (1978)<sup>(4)</sup>所提出之氰酸銀鍍銀染色法，並比較其特性和討論可能之機轉。

## 材料與方法

本文所採用標本，軟組織皆經 10% 福馬林溶液固定，硬組織經固定後，再經 10% EDTA 脫鈣，做成 10 微米之石蠟切片。染色溶液包括：

### (一) 緩衝儲存液：

使用 0.1 摩爾的 2.4.6-collidine 蒸餾水溶液。過濾後以 10% 硝酸滴定至酸鹼度為 7.2。將其儲存於攝氏 4 度下。

### (二) 稀釋緩衝液：

8 毫升的緩衝儲存液加入 92 毫升的蒸餾水，並加熱至攝氏 60 度。

### (三) 鍍銀溶液：

將 84 毫升的蒸餾水加熱至攝氏 60 度，然後加入 4 毫升 1% 硝酸銀溶液和 4 毫升 0.38% 氰化鈉溶液。最後，加入 8 毫升的緩衝儲存液。

### (四) 顯相儲存液：

將 20 公克亞硫酸鈉和 4.75 公克的四硼酸鈉，溶解於加熱至攝氏 50 度後的 400 毫升的蒸餾水。然後將 10 公克的明膠片加入此溶液，並搖動使其溶解。溶解後，加入蒸餾水至 500 毫升。

### (五) 顯相工作液：

將 5 毫升的 2% Quinol 加入 95 毫升的顯相儲存液。同時將 2 毫升的 1% 硝酸銀加入後，持續搖動之。同時，因為具有明膠的緣故，必須將工作液保持在攝氏 25 度。

方法：

- (一)將石蠟切片放入絕對酒精中脫蠟。
- (二)將百分之0.2的火棉膠( Celloidin )酒精乙醚(各佔一半)溶液貼附在切片上。
- (三)待火棉膠溶液部份乾硬後，放入百分之七十的酒精中。
- (四)用室溫水沖洗30分鐘後，再用蒸餾水洗濯三次。
- (五)將切片放入攝氏60度的工作緩衝液30分鐘。
- (六)再將切片放入攝氏60度的鍍銀溶液30分鐘。
- (七)將切片用蒸餾水清洗3分鐘。
- (八)再將切片放入攝氏25度的顯相工作液1分鐘。
- (九)脫水，澄清再加以固封。

## 結果

組織切片染色的結果，神經纖維為強度而且邊界清楚之黑色(圖1)，而周圍結締組織為金黃色。類癌(Carcinoid)顆粒(圖2)，以及黑色素(Melanin)為黑色點狀(圖3)之嗜銀顆粒。牙齒包括牙本質及牙骨質染成黑色之規則線條。橫紋肌可見黑色之橫紋(圖4)。細胞核尤其是核仁可染成棕色到黑色。其他組織則染成金黃色到紅棕色。

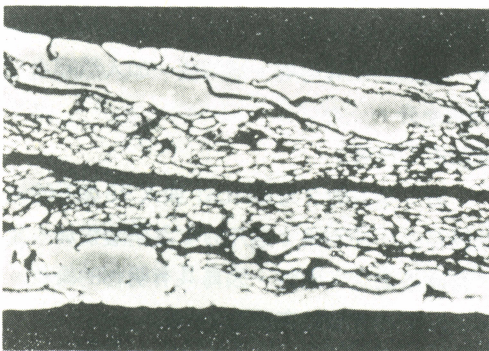


圖1 牙齒經EDTA脫鈣後染色，神經纖維可染成邊界清楚之黑色。(×100)

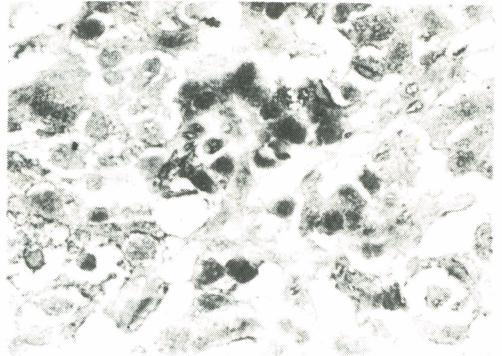


圖2 在細胞漿中可見類癌顆粒。(×400)

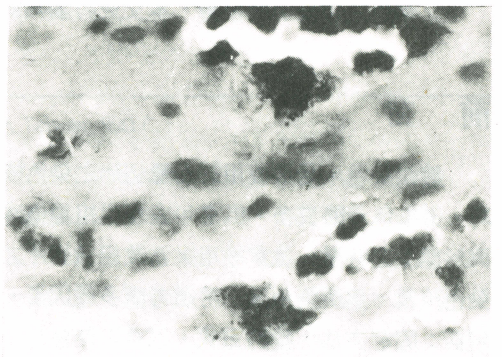


圖3 嬰兒黑色素神經外胚層瘤，在細胞漿中可見黑色素顆粒。(×400)

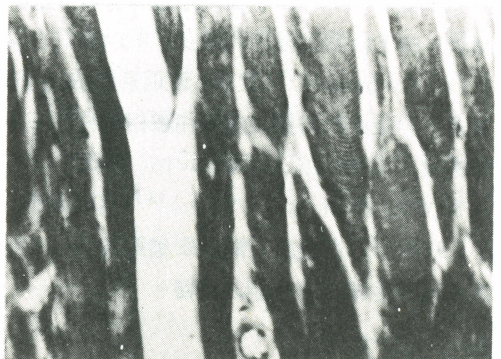


圖4 橫紋肌，可見橫向之條紋。(×200)

## 討論

### 固定液：

使用10%福馬林水溶液固定最好，如果使用Bouin氏溶液，則較細的神經纖維，在鍍銀染色後，會變得較不清楚。同時，必須注意



的是，固定必須完全，而且標本在新鮮時，不要暴露太久，否則，會使大的神經纖維區域發生氣泡，或是減少對銀粒子的親和性，這些，可能和組織變性有關。至於，使用70%酒精固定法，則不妥。如果，標本放置在福馬林溶液中過久，亦會對染色結果發生影響。如果是將牙齒固定時，必須將牙根尖孔磨大，以使固定液滲入，否則，觀察牙髓腔變化時，可能有組織發生網狀變性情形。

脫鈣液：

10% EDTA 水溶液較為適合，Kristensen 氏蟻酸溶液亦可。Linder<sup>(4)</sup> 認為，經過酸性溶液處理過的標本，在鍍銀染色時，組織對銀粒子的親和性會減弱。因此，硝酸、鹽酸、三氯乙酸，或 D-calcifier<sup>®</sup> 脫鈣液皆不適合。由於 EDTA 對硬組織脫鈣時，須花費較久時間，因此，可在標本固定後，使用硬組織切薄機如：Isomet<sup>®</sup> 將標本切成1厘米厚度，再使用10% EDTA 脫鈣，可縮短時間，亦可減少組織變性。

切片染色方式：

本法將石蠟切片，先脫蠟再染色。Bielschovsky<sup>(5)</sup> 曾利用冷凍切片法來鍍銀染色。貼附法 (Pap 法)，其染色步驟，類似 Bielschovsky 鍍銀染色法，但在切片後，不先脫蠟，待染色完成後，再行脫蠟，其步驟頗費時間，而且銀粒子沈積常常不甚規則。是故，先行脫蠟似乎有利於銀粒子的還原作用。

鍍銀技巧：

鍍銀技巧的目的，是爲了要增加對所須要組織染色的敏感度，並減少不須要組織染色的敏感度。Fontana Masson 鍍銀染色法是不須加入還原劑<sup>(5)</sup>，即可利用細胞本身酵素的還原作用，將氯化銀溶液，還原成金屬銀，而這些具有還原作用的細胞（如消化道的親絡細胞、腎上腺，以及黑色素。）稱爲親銀性 (Argyrophinity)。這和一般必須加入還原劑的鍍銀法（如 Grimelius 氏，Gomori 氏，Bielschovsky 氏法）<sup>(6)</sup>，利用加入的還原劑，來

使組織和銀粒子結合，這種組織，是爲嗜銀性 (Argyrophilia) 組織；對嗜銀性組織的染色法，可使親銀性組織著色，而使用親銀性組織染色法，却往往不能使各種嗜銀組織染色。因此，在染色步驟時，還原劑的使用與否，對染色的結果就有差別。本法應是對嗜銀組織之染色法。而鍍銀技巧，須考慮下列幾種因素：

(一) 工作緩衝液。緩衝液的選擇是重要的，因爲能增加組織對銀粒子的親合性。Fearnhead 和 Linder (1956)<sup>(7)</sup> 使用 Palitzsch 氏硼砂和硼酸緩衝液，另一種則是 Rowles 和 Brain (1959)<sup>(3,8)</sup> 的 Collidine 硝酸緩衝液。由於 Palitzsch 氏緩衝液祇能對硝酸銀有所幫忙，而 Collidine 硝酸緩衝液則對硝酸銀和氰酸銀皆有作用。

關於使用火棉膠 (Celloidin) 貼附組織切片方面，Linder<sup>(4)</sup> (1978) 認爲火棉膠的作用，是類似 Bielschovsky (1950) 冷凍切片鍍銀法中的吡啶 (Pyridine)，因其爲弱鹼性，且能與硝酸銀作用，所以能夠減少結締組織和細胞核的嗜銀性。因此，如果貼附火棉膠愈多，則結締組織與細胞核染色愈淡。

(二) 銀化合物。Pearson 和 O'Neill (1946)<sup>(9)</sup> 首先用酸和鹼性銀鹽溶液作用後，產生的銀化合物來做鍍銀染色。Ungewitters<sup>(2)</sup> 實驗時，利用尿素和硝酸銀混合作用後，可降低銀離子一半濃度，即可達到相同的效果；一般相信，這可能是產生可溶性的氰酸銀的緣故。Rowles (1960)<sup>(10)</sup> 在尿素硝酸銀中，直接加入了氰酸銀，結果使對神經纖維染色時間縮短，而且染色效果明顯。所以氰酸銀粒子的特點，在於能在較短時間，即能使神經纖維著色。本法的另一個特點就是不須採用氯化金的調合 (Toning) 就能使顏色產生層次感，這點和 Grimelius 法相似。

酸鹼值，操作時間和溫度：

Foot (1929) Holmes (1943)<sup>(11)</sup> 即強調：鍍銀溶液中的酸鹼度的重要性。Samuel (1953)<sup>(1)</sup>，Peter (1955)<sup>(12)</sup> 亦認

爲當酸鹼度小於8時，對銀粒子附著於神經纖維有利。但當酸鹼值過低時，其銀粒子附著力反而降低。而本法將緩衝液的酸鹼值調整至7.2時，再以8毫升的容量加入於鍍銀溶液，此時，鍍銀溶液的酸鹼值約等於7.0。這個現象與Samuel<sup>(13)</sup>等人的觀念相爲吻合。而Gomori, Bodian<sup>(14)</sup>，Bielschowsky<sup>(5)</sup>法中的鍍銀溶液之酸鹼值約在7.8至8之間，與本法相較則爲高，其原因不外是，酸鹼值高時，對銀粒子附著於神經纖維有利。如果酸鹼值降低，則所須時間相對須要增加。本法將切片置於加熱至攝氏60度的稀釋緩衝液中，並放置10至30分，再將其放置於攝氏60度之鍍銀溶液中10至30分；但感覺上，以放置30分鐘，其顏色的表現最爲清楚。Linder<sup>(4)</sup>認爲，如果是脫鈣的組織，則應放置在攝氏40度的鍍銀溶液中16小時，而軟組織則置於40度或60度的溶液皆可。但操作時，曾將脫鈣組織分別置於攝氏40度和60度溶液中，但染色結果並無明顯差異。Peter(1955)<sup>(12)</sup>認爲對還原銀粒子的附著，以在攝氏37度時爲最好，如果高於此溫度時，對神經纖維染色的特異性會降低，而如果低於此溫度，則銀粒子會附著不良而形成染色不足的現象；但氰酸銀附著時的溶液溫度，似乎不盡相同。此外，時間的控制，亦是相當重要的，如果染色發生強著色的現象，則必須縮短染色的時間。

顯相液：

Silver<sup>(15,16)</sup>等人曾認爲顯相液中酸鹼值與鍍銀染色的結果有著相當密切的關係。但是，Danenport, Bruesch並不認爲如此。而現在，一般鍍銀法亦很少強調顯相液中酸鹼值的重要。或許，在高活性顯相劑中，酸鹼值的影響就相對的降低了。一般來說，顯相液中酸鹼值太低，對鍍銀染色中銀粒子的附著是不利的。本法的顯相工作液中，因具有Quinol, 亞硫酸鈉，四硼酸鈉(Sodium Tetraborate)，所以酸鹼值應在8.5左右，如果放置時間

過久，可能會升至9.0，並會發生溶液混濁的現象，此時，切片所須放置時間必須延長。而將顯相儲存液轉變成顯相工作液時，須維持在攝氏25度，其主要的目的是在使明膠溶解，顯相工作液的溫度控制，除此之外，並不是很重要的。

## 參考文獻

1. SAMUEL EP: Impregnation and development in silver staining, *J. Anat.* 87; 268-277, 1953a.
2. UNGEWITTERS LH: A urea silver nitrate method for nerve fibres and nerve ending. *Stain Tech.* 26; 73-78, 1951.
3. ROWLES SL, BRAIN EB: An improved silver method for staining nerve fibres in decalcified sections of teeth. *Archives of Oral Biology* 2; 64-68, 1959.
4. LINDER JE: A simple and reliable method for the silver impregnation of nerves in paraffin sections of soft and mineralized tissue. *J. Anat.* 127; 543-551, 1978.
5. MALLORY FB: *Pathological Technique.* New York Hafner Publishing Co., 158-160, 1961.
6. RUTH MCCLUNG JONES: *McClungs Handbook of microscopical Technique.* 3/e, Hafner Publishing Co., New York, 389-399, 1961.
7. FEARNHEAD RW, LINDER JE: Observations on silver impregnation of nerve fibres in teeth. *J. Anat.* 90; 228-235, 1956.
8. ROWLES SL, BRAIN EB: Silver staining of nerves in urea solutions. *J. Dent. Res.* 35; 958, 1956.
9. PEARSON AA, O'NEILL SL: A silver-



- gelatin method for staining nerve fibres. Anat. Rec. 95; 297-301, 1946.
10. ROWLES SL: Some observations on Ungewitter's method for staining nerve fibres and nerve ending in tissue sections. Archives of Oral Biology 2; 89-95, 1960.
11. HOLMES W: Silver staining of nerve axons in paraffin sections. Anat. Rec. 86; 157-185, 1943.
12. PETERS A: Experiments on the mechanism of silver staining Part I Impregnation. Quarterly J. of Microscopical Science 96; 84-102, 1955a.
13. SAMUEL EP: The mechanism of silver staining. J. Anat. 87; 278-287, 1953b.
14. BODIAN D: A new method for staining nerve fibres and nerve endings in mounted paraffin sections. Anat. Rec. 65; 89-97, 1936.
15. SILVER ML: Colloidal factors controlling silver staining. Anat. Rec. 82; 507-529, 1942.
16. ROMANES GJ: The staining of nerve fibres in paraffin sections with silver. J. Anat. 84; 105-115, 1950.

## Observations for Silver Impregnation of Silver Cyanate Technique

BEY-RONG GUO AND FUNG-GUANG WU

### SUMMARY

*The technique of silver impregnation for paraffin sections had been improved for many times. The method of Ungiwitters, Rowles, Linder etc, for paraffin section in regard to silver cyanate technique has been investigated. The variable results which have been obtained with the composition of working, silver, developing solution and temperature, pH value, procedure. Guided by the results, the explains for technique has been evolved.*

---

School of Dentistry, Taipei Medical College.

Received for Publication: September 26, 1984.