

全新无铀染色方法配合低真空扫描电镜将医学研究和临床诊断工作提升至新阶段 ～开发了一种新型电子染色剂，将光学显微镜研究的石蜡切片样品转化为可用于SEM观察的切片～



宫崎大学医学部解剖学讲座超微形态科学领域
教授
宫崎大学前沿科学实验综合中心
生物成像实验室
主任
泽口 朗 博士(医学)

1. 前言

维持生命的每个器官，包括心脏、肾脏和肝脏，都具有由发挥着特定生理功能的细胞和结缔组织编织而成的精密三维结构。如果这种结构被破坏，生理功能就会受损，正常的生态就会转变为异常的病理状态，从而出现各种症状。病理组织学诊断通过形态变化来寻找这些变化的原因，主要使用光学显微镜进行，而研究细微的形态变化则需要电子显微镜。但由于电镜样品的制备方法复杂耗时，以及需要受到严格管控的铀化合物进行电子染色，使得电子显微镜的应用受到了阻碍。此外，在再生器官的开发和研究中，三维结构的再现是一个迫切需要解决的课题，人们渴望开发一种简单快速的电子显微镜样品制备方法，能够以高分辨率捕捉培养细胞的微观结构和器官内部的三维结构，以及可用于再生器官质量评估和筛选的显微镜技术。

为了解决这些问题，我们一直致力于“无需铀化合物的新电子染色方法开发”这一长期课题，并最终成功建立了一种方案，可以在电子显微镜水平上以简单、快速的方式高分辨率捕捉构成器官的细胞和组织的微观形态。在本文中，我们将介绍台式低真空扫描电子显微镜新的应用方向，内容涵盖了病理组织诊断和再生器官形态质量评估等广泛的医学研究与临床应用等领域。

2. 使用便捷的载玻片专用holder和无荷电观察的低真空模式

台式扫描电子显微镜TM4000PlusII，顾名思义，是一款可放置于桌面的紧凑型扫描电镜，它配置了一个holder，可用于装载有石蜡切片的光学显微镜所用载玻片（图1）。该专用holder可实现载玻片的快速装卸，如果是厚度为5至30 μm 的石蜡切片，则无需繁琐的高度调节。此外，拍摄的图像文件中会附带位置信息，每次重新放入载玻片的样品后，holder联通样品都可以调用已保存的位置信息，并自动找到保存好的观察位置。

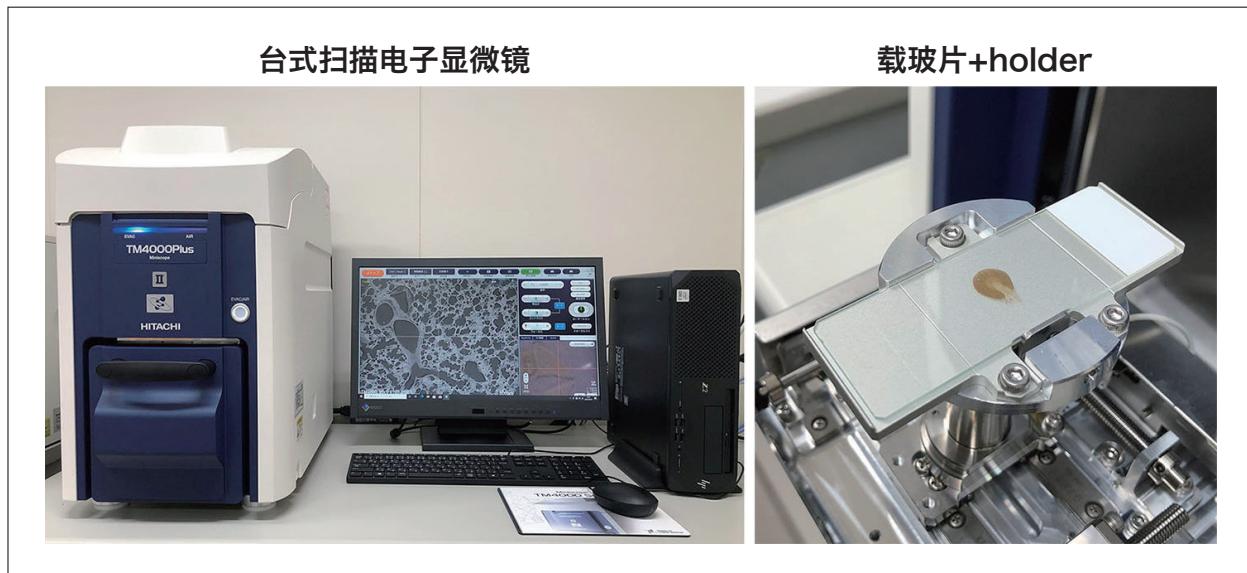


图1 (左图)台式扫描电子显微镜TM4000PlusII外观。(右图)专用的载玻片holder, 装卸方便, 无需进行高度调节。

低真空扫描电子显微镜可在30~50Pa的低真空度下工作, 非导电性的石蜡切片和载玻片因入射电子而积聚的负电荷会被残留气体在低真空环境下产生的正离子中和, 因此, 可以进行无荷电的观察(图2)。

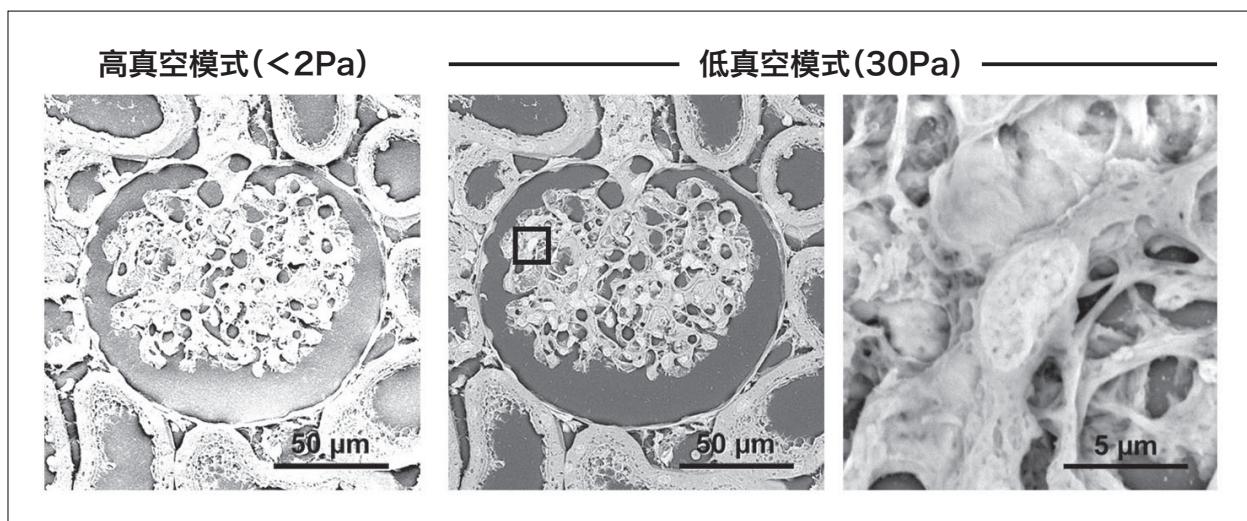


图2 高真空模式与低真空模式的图像对比。样品为大鼠的肾小球。(左图)高真空模式(<2Pa), 荷电明显, 无法进行正常的观察。(中图和右图)低真空模式(30Pa), 荷电大幅减少, 可以高倍率对中间照片中的方框内部分进行细节观察(右图)。

3. 将光学显微镜石蜡切片转化为电子显微镜可用样品的电子染色新方法开发

传统的电子染色方法是Watson于1958年开发的醋酸铀-铅染色法^{1,2)}, 但铀化合物管控严格, 从购买到储存、使用到废弃, 处理都极其困难。因此, 电子显微镜分析工作者们长期以来一直渴望一种不需要铀化合物的新型电子染色法。成功开发的“高锰酸钾-铅染色法”是一种简便而快速的方案³⁾, 它将光学显微镜用的石蜡切片用0.2%高锰酸钾水溶液处理5分钟, 并用水冲洗后, 再用Reynold柠檬酸铅溶液处理3分钟, 清洗干净后可进行观察(图3)。与传统方法的区别在于将2%醋酸铀替换为0.2%高锰酸钾, 电子染色所需时间保持不变, 约为10分钟。

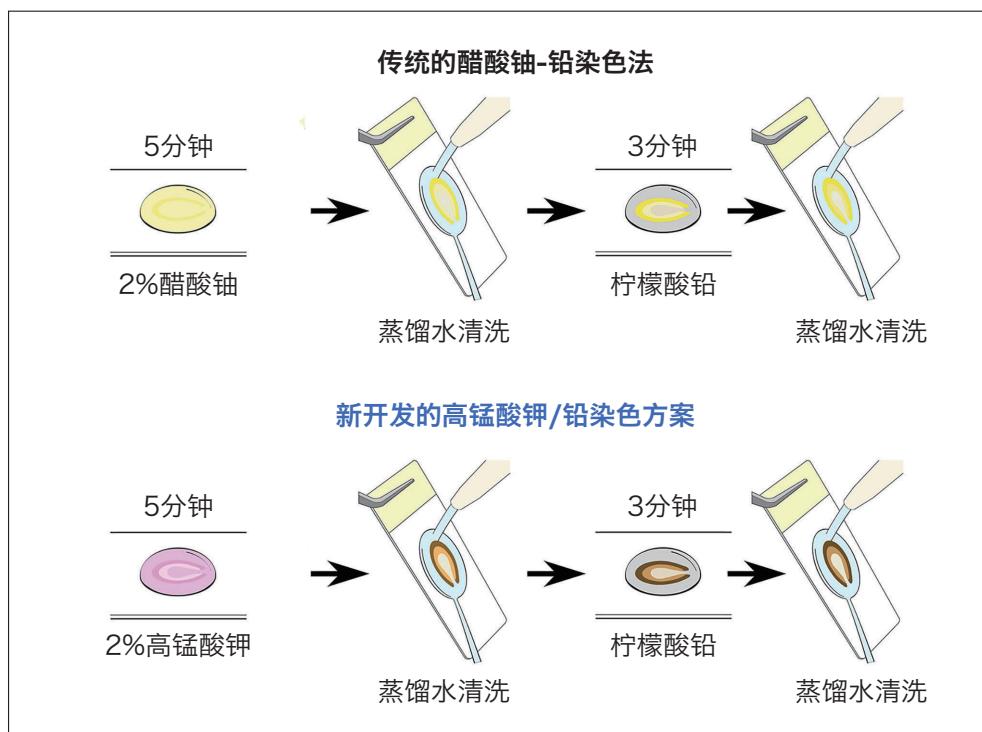


图3 传统的醋酸铀-铅染色法(上)和新开发的高锰酸钾-铅染色法(下)。

新的“高锰酸钾-铅染色法”可获得与传统的醋酸铀-铅染色法同等的高对比度染色结果，将光学显微镜制备的样品转化为电子显微镜样品的能力以及低真空扫描电子显微镜的强大功能是显而易见的。经过元素分析表明，高锰酸钾特有的氧化作用可提高铅的沉积，并且可以获得足够多的BSE电子，将细胞和组织的显微结构可视化表达³⁾。

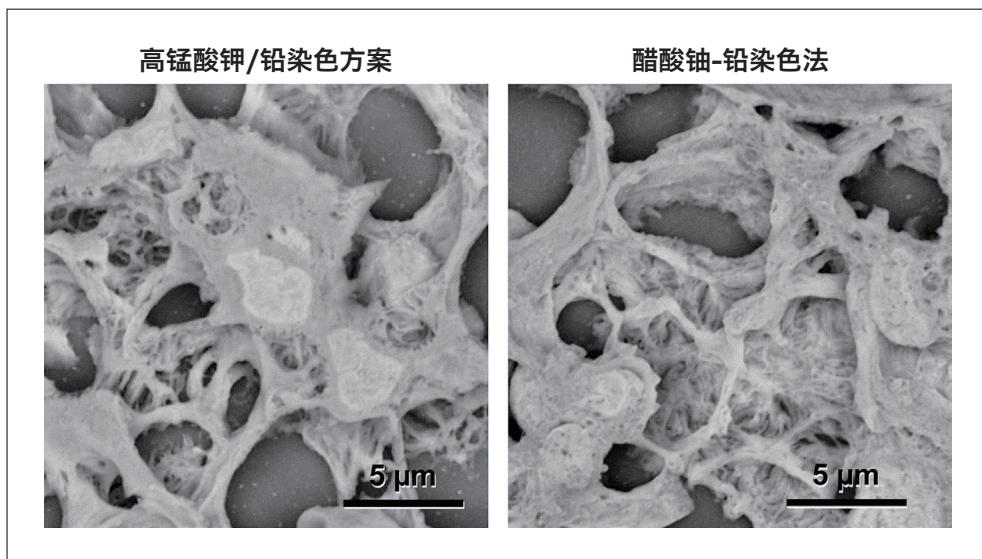


图4 大鼠肾小球。这种比较突出了将用于光学显微镜的样品转化为电子显微镜样品的能力的可靠性，以及低真空扫描电子显微镜的强大功能。固定剂=2%多聚甲醛 + 2.5%戊二醛混合液。切片厚度=5 μm。

石蜡切片观察通常在BSE背散射模式下进行，但由于不同的加速电压会导致获得的图像信息会有差异，因此需要根据观察目的使用不同的加速电压。使用5至20 kV范围内的4种加速电压分别拍摄的图像如图5所示，值得注意的是，在低加速电压下，对比度降低但细胞表面形态清晰，而在高加速电压下，对比度上升但细胞表面形态变得不清晰。根据过去的经验，我们建议在低于500倍的低倍率下使用15至20 kV，旨在清晰显示整体图像，在500倍或更高的高倍率下使用5至10 kV，旨在显示细胞表面的显微形态。

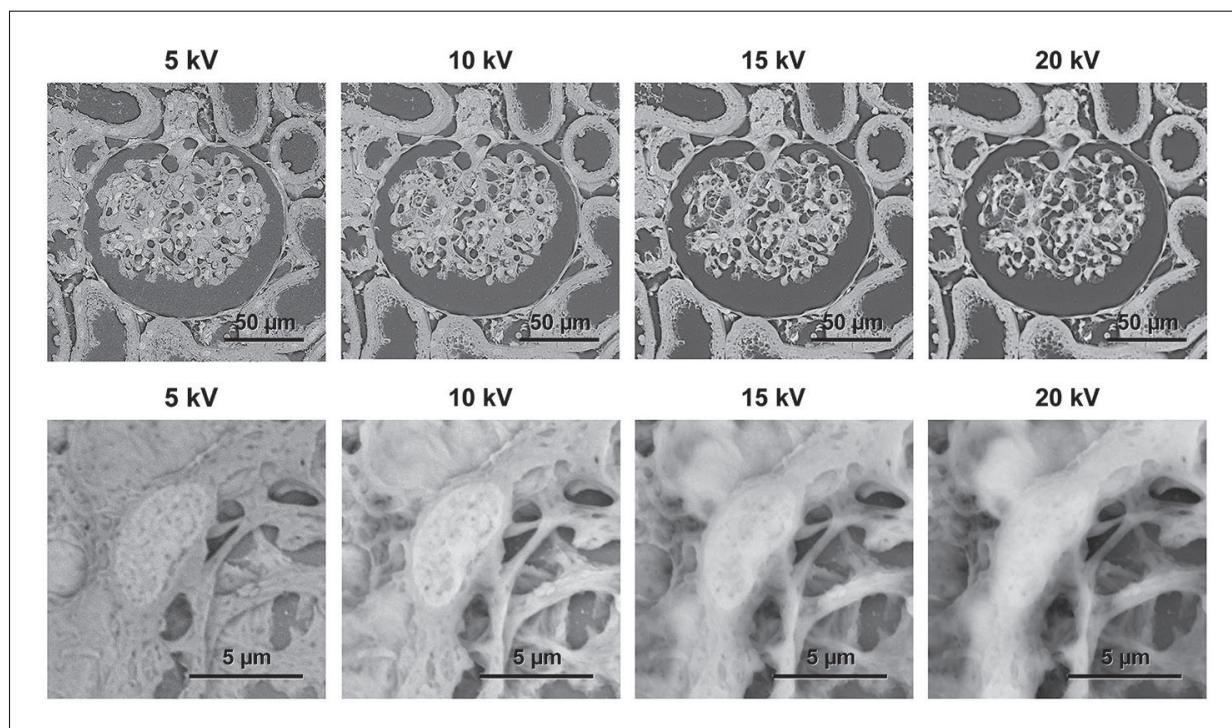


图5 比较不同加速电压下的图像信息。请注意，低加速电压会降低对比度，但细胞表面的形态清晰；高加速电压会提高对比度，但细胞表面形态不清晰。我们建议在低于500倍的低倍率下使用15-20 kV加速电压进行观察，在显示细胞表面的500倍或更高的高倍率下使用5-10 kV加速电压进行观察。

4. 使用厚石蜡切片观察法揭示细胞和组织形成的三维结构

通常，用于光学显微镜的石蜡切片被切成约5μm厚，以便于光线穿透，且细胞核在此厚度上不重叠。然而，我们之前报道了基于背散射电子检测的低真空扫描电子显微镜对厚石蜡切片(15至30 μm)²⁾ 的使用。更大的样品厚度允许对组织细胞的三维结构进行成像。图6显示了使用高锰酸钾-铅染色法观察到的大鼠肾小球、肾小管和纤毛细支气管表皮的实例。请注意，在所有情况下，在光学显微镜水平难以看到的微小纤毛等都可以通过台式扫描电子显微镜以三维方式捕捉到。

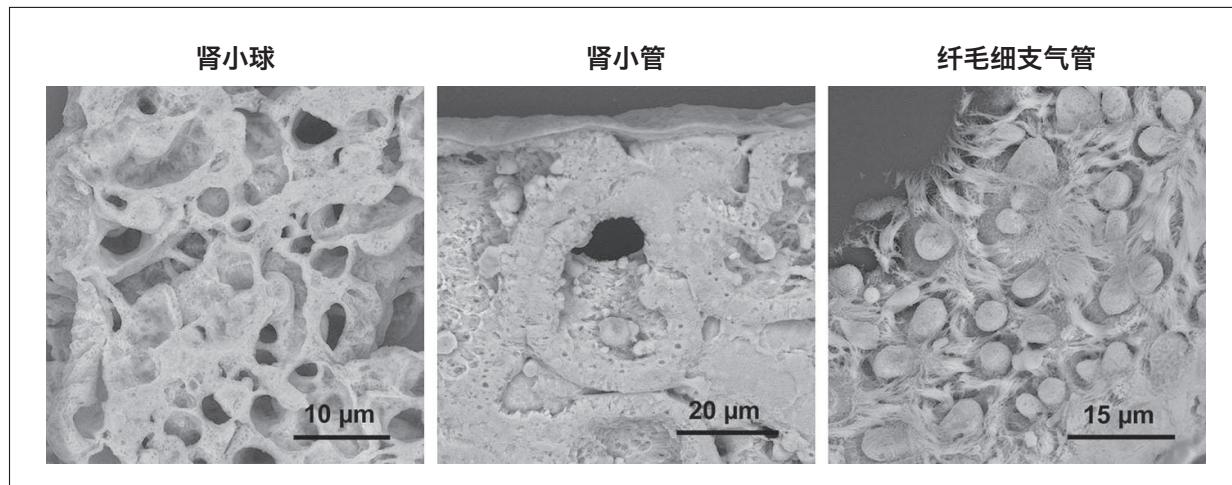


图6 厚石蜡切片观察法。将切片切成比通常的5 μm更厚的20 μm左右，深度更大，可清晰地看到由细胞编织而成的三维结构组织。大鼠器官。固定液=2%多聚甲醛+2.5%戊二醛混合液。切片厚度=20 μm。

5. 仅用福尔马林固定的组织病理学标本仍能以美丽、精致的细节成像

以上图像均为用制备电子显微镜样品的标准性半浓度Karnovsky固定液（= 2% 多聚甲醛和2.5% 戊二醛的混合溶液）固定的标本切片，但病理组织样品通常用10% 福尔马林溶液（仅4% 多聚甲醛）固定。图7显示了用10% 福尔马林溶液固定的大鼠细支气管的观察示例，从图中可以清晰地观察到纤毛表皮和呈现纵横层状结构的胶原纤维微细形态，表明本方法适合于观察病理组织标本。

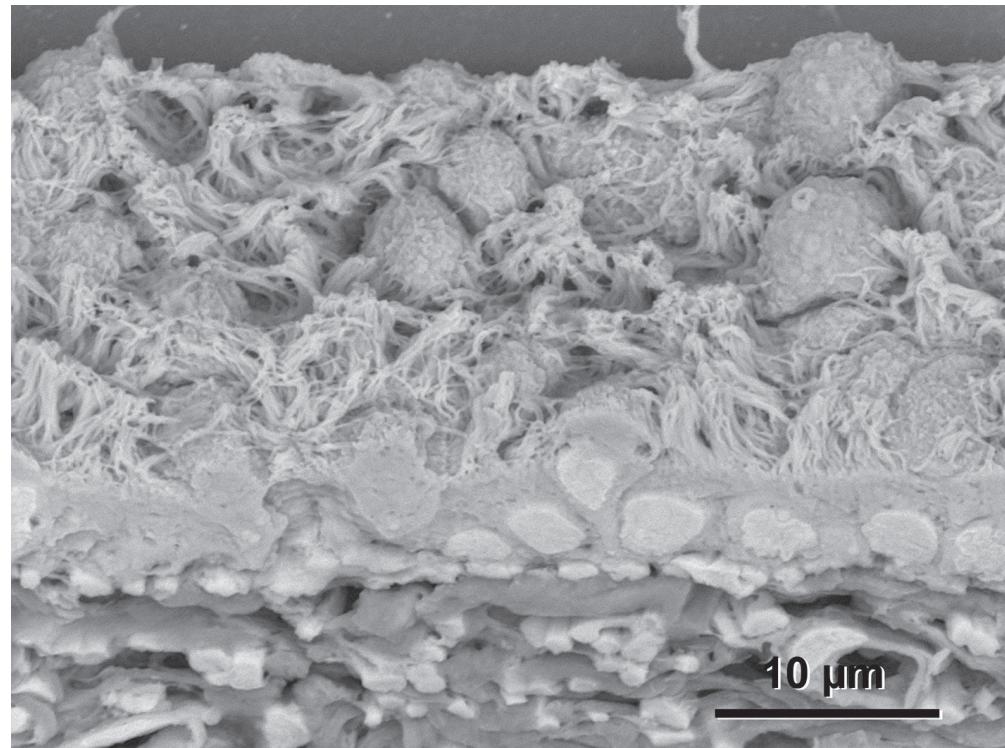


图7 经常用于光学显微镜病理组织标本的10%福尔马林溶液(仅含4%多聚甲醛)固定后的大鼠细支气管。纤毛表皮(上部)和呈现纵横层状结构的胶原纤维(下部)的微细形态清晰可见。切片厚度=20 μm 。

6. 关联技术的应用：光学显微镜/电子显微镜关联技术(CLEM)的应用提高了观察图像的准确性

提高电子显微镜图像准确性的方法之一是“光学显微镜/电子显微镜关联观察法”(CLEM : Correlative Light and Electron Microscopy)。这是一种将光学显微镜拍摄的同一样品的显微位置，以电子显微镜水平高分辨率来显示的方法，是一种将“只见树木不见森林”改为“看到森林后选树并观察树叶”的方法。图8显示了使用该方法观察大鼠肾小球的示例。在光学显微镜下，用常规的苏木精-伊红染色进行观察后，取下盖玻片，实施高锰酸钾-铅染色，并使用低真空扫描电子显微镜观察后发现，光学显微镜拍摄的同一部位的足细胞突起(箭头所示)清晰可见，甚至包括在光学显微镜水平无法确认的细微结构。

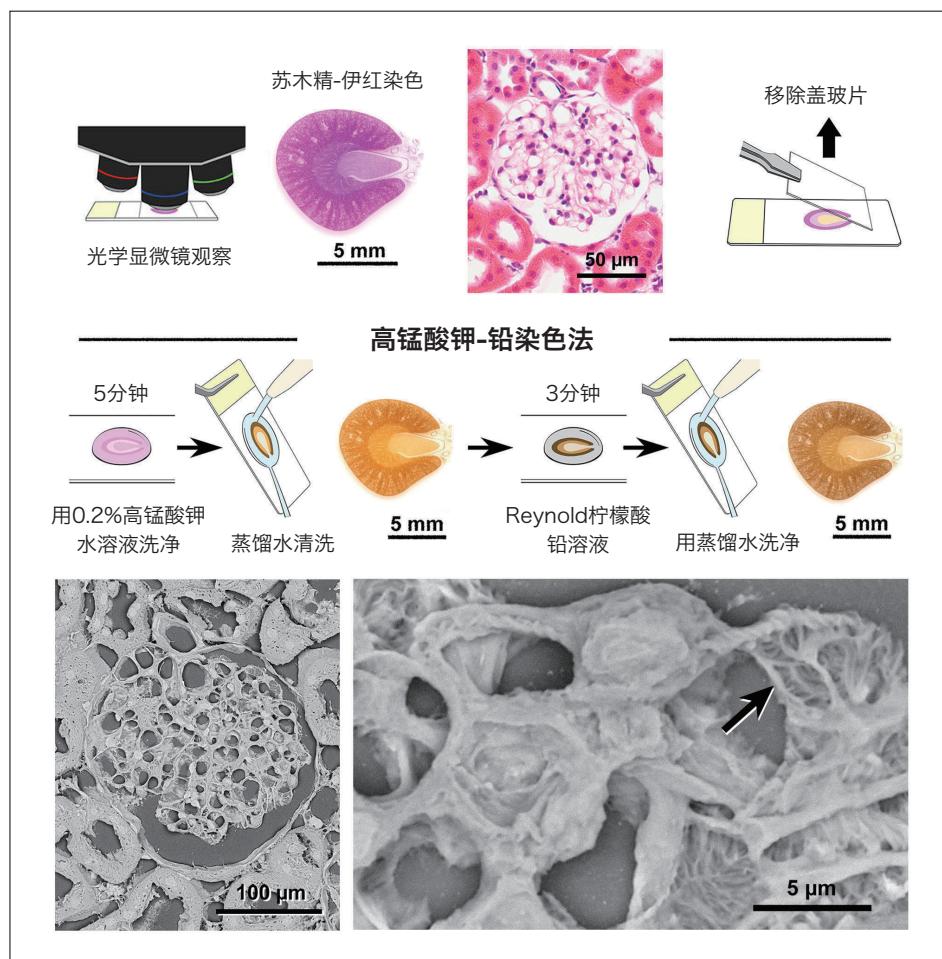


图8 使用光学显微镜-电子显微镜关联方法(CLEM)观察大鼠肾小球的示例。在采用常规的苏木精-伊红染色进行光学显微镜观察后，取下盖玻片，实施高锰酸钾-铅染色，然后在低真空扫描电子显微镜下进行观察。可以高分辨率观察用光学显微镜拍摄的同一部位，能观察到在光学显微镜水平无法确认的微细结构，并能识别足细胞的突起(箭头所示)。

如果使用TM4000PlusII，可以一边参考内置的CCD摄像头所显示的切片实时光学图像，一边在电子显微镜水平实时观察目标的显微位置，也就是说，其配备了一项便捷的功能，可大幅提高光学显微镜-电子显微镜关联工作的效率（图9）。正如“看到森林后选树并观察树叶”那样，它可以帮助用户“查看切片，选择组织，然后观察其细胞”。



图9 TM4000PlusII的操作画面。标配了可大大提高光学显微镜-电子显微镜关联工作效率的便捷功能，可以一边参照内置CCD摄像头显示的切片实时影像(画面右下角)，一边在电子显微镜水平(画面左侧)对目标的观察部位进行实时观察。

7. 可应用于再生医疗研究的培养细胞显微结构解析

通过应用本方法，可以在用于光学显微镜的载玻片表面培养具有粘附性的细胞，并在电子显微镜水平以高分辨率，将培养细胞的三维微观形态可视化。在图10所示的胰腺癌细胞株：SUIT-2的观察示例中，可以清晰地确认在光学显微镜水平无法捕捉到的细胞间微细粘附和联络形态。

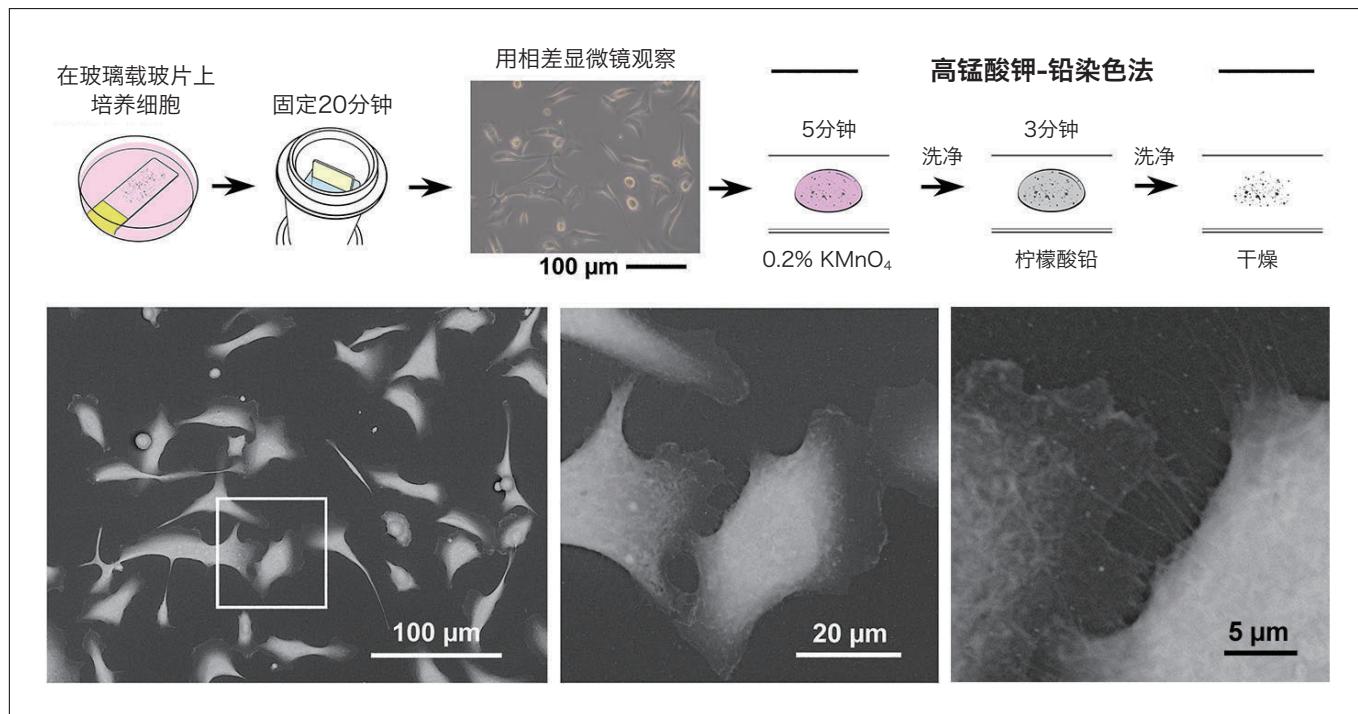


图10 培养细胞(胰腺癌细胞株：SUIT-2)的观察示例。使用相差显微镜选定最佳观察区域后，实施高锰酸钾-铅染色，并用低真空扫描电子显微镜进行观察。结果观察到了在光学显微镜水平无法捕捉到的细胞间微细粘附和联络形态。

8. 台式低真空扫描电子显微镜将医学研究和临床诊断提升到新阶段

本文介绍了文章开头提到的长期存在的问题，以及无需铀化合物的新型电子染色方法开发成功的概要。随着能够在电子显微镜水平以高分辨率方便而快速地捕捉构成生物器官的细胞和组织显微形态的方法确立，台式低真空扫描电子显微镜正在迈入一个新阶段，以期在病理组织诊断和再生器官的形态质量评估等广泛的医学研究和临床应用中取得成功。

参考文献

- 1) Watson, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 475-478 (1958).
- 2) Sawaguchi, A. et al. Informative three-dimensional survey of cell/tissue architectures in thick paraffin sections by simple low vacuum scanning electron microscopy. *Sci. Rep.* **8**, 7479, doi:10.1038/s41598-018-25840-8 (2018).
- 3) Sawaguchi, A., Kamimura, T., Kitagawa, K., Nagashima, Y., Takahashi, N. KMnO₄/Pb staining allows uranium free imaging of tissue architectures in low vacuum scanning electron microscopy. *npj Imaging* **2**, 40, doi: 10.1038/s44303-024-00045-z (2024).