

# 一种制作大鼠膝关节和椎间盘石蜡组织切片的方法

李会贤<sup>1</sup> 朱顺英<sup>2</sup> 戚亦萍<sup>1</sup> 张忠辉<sup>2</sup> 韩伟<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

<sup>2</sup>上海交通大学药学院再生组学实验室, 上海 200240)

**摘要** 改良一种制作大鼠完整膝关节和椎间盘的石蜡切片的方法, 为观察骨关节透明软骨和椎间盘纤维软骨的结构提供实验基础。取正常大鼠完整膝关节和胸椎(T3-T4), 10%中性福尔马林溶液固定 24 h, 流水冲洗后分别采用 3% 硝酸脱钙液、混合脱钙液及 EDTA 脱钙液 3 种不同的脱钙液配合不同脱钙条件进行脱钙, 制作石蜡切片, 苏木精-伊红和番红 O/固绿染色方法染色, 显微镜下观察并评价其效果。结果表明, 采用混合脱钙液 4 °C 搅拌脱钙条件下制作的切片颜色鲜艳, 细胞和细胞核清晰, 组织破坏程度小, 且耗时短, 全部过程仅需一周即可完成。采用混合脱钙液方法制作的大鼠膝关节和椎间盘石蜡组织切片, 骨和软骨组织结构完整, 细胞形态清晰, 能够满足组织学评价骨关节和椎间盘的要求。

**关键词** 大鼠; 膝关节; 椎间盘; 混合脱钙液; 石蜡切片

含有钙盐的组织如骨组织, 是一种坚硬的结缔组织, 基质中含有大量固定的无机盐, 直接切片非常困难<sup>[1]</sup>, 必须脱钙除去骨盐, 使其软化后才能正常切片, 而在实际操作中往往又需要制作较大的标本如一个完整的膝关节、一段脊椎等, 且时间有限, 因此要在尽可能短的时间内制作出一张高质量的切片, 脱钙液和脱钙条件的选择及脱钙时间的把握就显得尤为重要, 而在以往文献资料中未见到相关的报道。本文对几种制作方法进行了比较, 以期找到一种较好的制作完整膝关节和椎间盘的石蜡切片的方法, 为关节炎等疾病的相关实验提供一项观察透明软骨、纤维软骨和骨的结构实验参考技术。

## 1 材料与方方法

### 1.1 材料

雄性清洁级 SD 大鼠 12 只(平均体重约 250 g)购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。甲醛溶液、88% 甲酸、氯化铝( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、乙二胺四乙酸二钠( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、硝酸、石蜡、蜂蜡购自国药集团化学试剂有限公司。盐酸购自上海振兴化工二厂有限公司。85-2 数显恒温磁力搅拌器购自江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司。电热恒温电烤箱购自上海福玛实验设备有限公司。Leica RM2235 型切片机购自德国 Leica 公司。光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 取材** 大鼠处死后, 取完整的膝关节和第 2、3 节胸椎及其间的椎间盘, 修剪去除相连的软组织。

**1.2.2 固定** 将所取标本迅速放入约 10 倍体积的 10% 中性福尔马林溶液固定 2~3 天后, 流水冲洗 30~60 min, 再置于至少 5 倍体积的 70% 乙醇(可长期保存)。

**1.2.3 脱钙液的配制** 3% 硝酸脱钙液的配制: 取 65%~68% 的硝酸溶液约 22 ml, 用 70% 乙醇定容至 500 ml, 充分混匀后, 4 °C 保存。

15% EDTA 脱钙液的配制: 称取 186.1 g  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 置于 1 L 烧杯中, 加入 800 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  充分搅拌, 用约 20 g NaOH 调节 pH 值至 8.0, 再加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 1 L, 即为 0.5 mol/L EDTA 脱钙液, 室温保存, 用时稀释成 0.4 mol/L 即为 15% EDTA 脱钙液。

混合脱钙液<sup>[2]</sup>的配制:  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  约 70 mg 溶解于 50 ml 88% 甲酸、85 ml 盐酸中, 加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 1 L, 4 °C 保存。

**1.2.4 脱钙** 实验标本分为四组, 每组 6 个标本。3% 硝酸脱钙液组: 将固定后的组织于 5~10 倍体积脱钙液室温下脱钙 9~10 天, 流水冲洗 24 h, 重新加入 70% 乙醇室温保存; 混合脱钙液组: 室温脱钙 3~4 天,

收稿日期: 2008-11-05 接受日期: 2008-12-24

上海市科委基金资助项目(No.06d14001, No.075407071)

\* 通讯作者。Tel: 021-34204750, E-mail: weihan@sjtu.edu.cn

流水冲洗 1~2 h, 室温保存; 混合脱钙液组: 4 °C 搅拌脱钙 3~4 天, 流水冲洗 1~2 h, 4 °C 保存; 15% EDTA 脱钙液组: 脱钙 3~4 周, 也可每天更换脱钙液加速脱钙进程, 流水冲洗 30 min, 室温保存。脱钙过程中可在组织变软后用锋利的刀片沿切面切成两半, 以利于脱钙液浸入组织内部, 脱钙更彻底。若组织可弯曲如橡皮筋或针头极易刺入即可判断为脱钙完全。由于标本缺失, 椎间盘仅有两组即混合脱钙液 4 °C 脱钙组和硝酸脱钙组。

**1.2.5 脱水、浸蜡** 将组织在脱水前修剪成需要的大小, 系列乙醇梯度脱水: 80% 乙醇过夜; 95% 乙醇 2 次各 1.5~2 h; 100% 乙醇 2 次各 2 h; 二甲苯透明 2 次各 45 min; 石蜡 I (56~58 °C)、石蜡 II (58~60 °C) 各 2 h。透明过程中应用肉眼观察判断组织是否已透明, 呈琥珀色, 若仍未透明应适当延长时间直到透明为止。脱水、透明过程均在室温下搅拌进行。

常规制作厚 5~7 μm 的石蜡组织切片。

**1.2.6 染色** 苏木精-伊红(HE)染色: 二甲苯脱蜡 2 次各 5 min; 100% 乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇每次各 2~3 min; 清水浸泡 3 min; 蒸馏水冲洗 2~3 次; 苏木精染色 15 min, 水洗掉多余染液; 1% 盐酸-乙醇分色 15~20 s; 流水冲洗 15~20 min; 伊红染色 10 min; 70% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇、100% 乙醇各 2~3 min; 二甲苯透明 2 次各 5 min, 最后用中性树胶封固。

番红 O/ 固绿染色方法按照文献<sup>[3]</sup>进行并作以下修改: 切片脱蜡至脱水过程采用 HE 染色方法, 苏木精染色 15 min, 1% 盐酸酒精分色 15 s, ddH<sub>2</sub>O 洗涤, 0.02% 固绿溶液(95% 乙醇配制)染色 3 min, 1% 冰醋酸洗涤去除残余固绿染液, 0.1% 番红 O 染色 3 min, 95% 乙醇 2 次各 2~3 min, 100% 乙醇 2 次各 2~3 min, 二甲苯 2 次各 5 min, 中性树胶封固。

显微镜下观察细胞及细胞外基质的染色情况和结构的完整性。

## 2 结果

### 2.1 膝关节的制片和染色结果

传统的硝酸脱钙法(图 1A)制作的切片, 色泽灰暗, 红绿对比不鲜明, 骺生长板处番红着色较浅, 而关节表面软骨层几乎未染上红色; 软骨下骨及骨小梁结构完整, 骨髓部分被破坏。从细胞形态看, 软骨细胞可分辨, 表面细胞呈梭形, 深部细胞为椭圆形或圆形, 呈栅栏状排列, 软骨基质和细胞核绿染严重(图

1E)。

EDTA 脱钙组(图 1D)情况类似, 骨髓破坏较严重, 可能为脱钙不彻底造成。细胞形态及细胞核较清晰, 软骨基质未着色(图 1H)。

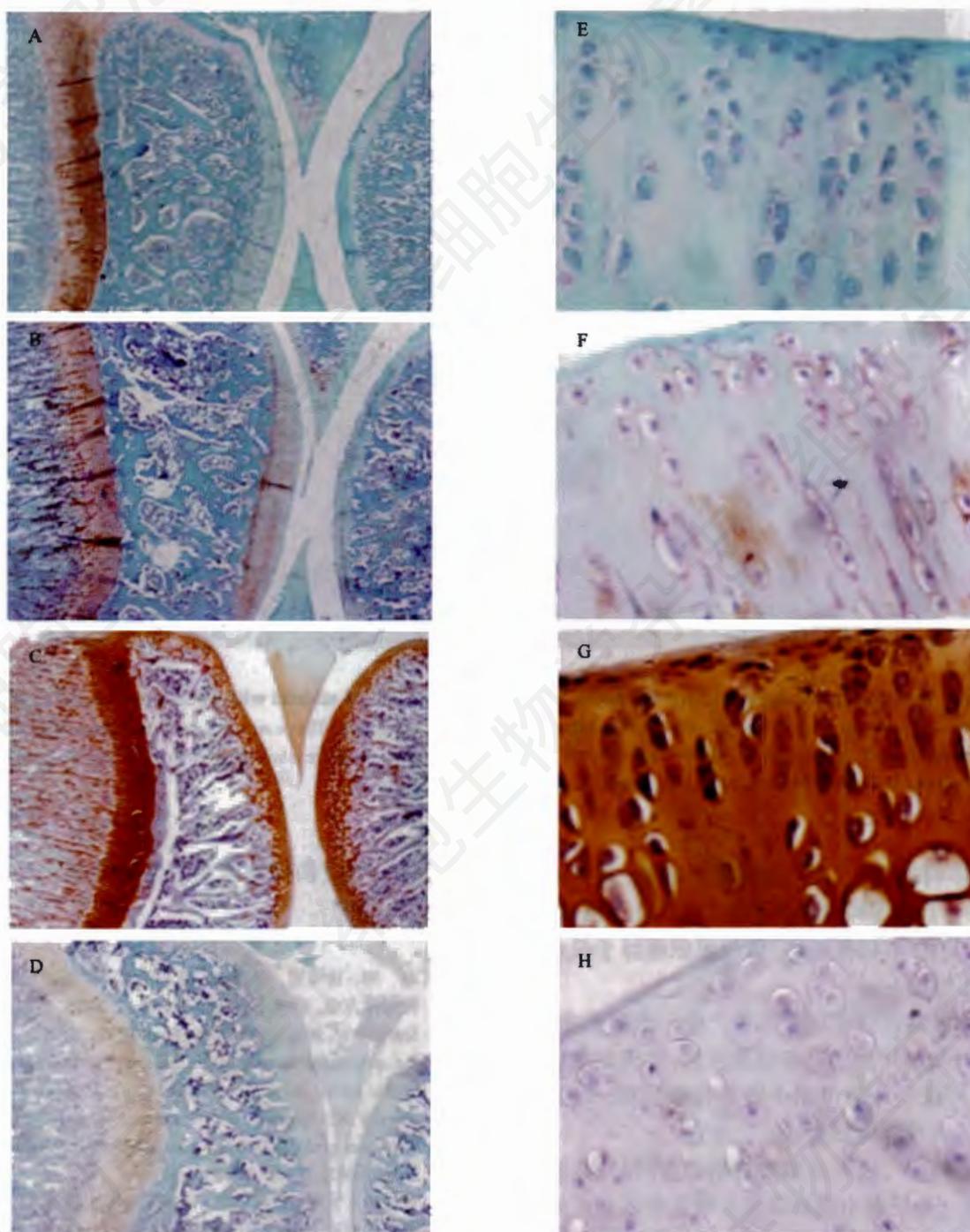
混合脱钙液脱钙组(图 1B、图 1C)较前两者而言, 细胞核清晰, 软骨基质红染较好(图 1F、图 1G)。4 °C 条件下脱钙组染色效果最好(图 1C), 番红染色非常鲜艳, 红绿对比非常鲜明, 骨小梁则部分受损, 可能脱钙时间不足。软骨基质番红着色最深, 细胞形态及细胞核非常清晰(图 1G), 表明此条件下脱钙液对软骨基质的损伤最小。室温条件下脱钙组(图 1B)相对 4 °C 条件下脱钙组而言, 骺生长板及关节表面软骨层番红着色较浅, 细胞核则有轻微绿染(图 1F)。

### 2.2 椎间盘组织的制片和染色结果

传统的硝酸脱钙液组(图 2A、图 2B), 椎间盘部分破损, 髓核残缺, 骨小梁和骨髓均被染成红色, 对比不明显, 且骨髓遭破坏。椎间盘纤维软骨束部分断裂, 但红染较好, 软骨细胞核清晰。混合脱钙液 4 °C 脱钙组(图 2C、图 2D), 椎间盘完整, 整个髓核清晰可见, 骨组织及骨髓未受到破坏, 纤维软骨细胞较小, 成行分布于纤维束之间。胶原纤维平行排列, 但伊红着色较浅。

## 3 讨论

传统的脱钙液一般采用硝酸溶液, 但脱钙时间较长, 一般需要 3~5 天, 较大的组织如膝关节则需要 9~10 天, 且脱钙时间不易掌握, 时间短脱钙不充分, 时间过长又容易破坏组织结构, 若要缩短时间可增大硝酸的浓度, 但同时高浓度的硝酸也会破坏组织细胞的细微结构, 且对组织酸化造成细胞核着色欠佳<sup>[5]</sup>, 还会生成亚硝酸而使组织变黄, 影响随后的染色。EDTA 是一种良好的脱钙液螯合剂, 不损伤组织和细胞的形态结构及抗原等物质的性质, 做免疫组化较好, 但脱钙时间较长, 有的甚至数月<sup>[6]</sup>, 不适合常规标本制作, 另外脱钙后组织会变硬, 影响切片。混合脱钙液含有甲酸、盐酸、氯化铝, 其中甲酸对组织的破坏程度较小, 盐酸可以提高脱钙速度, 但会影响细胞核的着色, 而适量的氯化铝有助于游离钙离子沉淀, 防止液体中钙离子过多, 影响脱钙效果, 且对细胞核着色影响甚微<sup>[4]</sup>, 而且混合脱钙液大大缩短了脱钙时间, 大鼠膝关节在 4 °C 搅拌条件下 3~4 天即可脱钙完全。制作的切片组织结构完整, 染色鲜艳, 关节软骨基质番红着色效果好, 细胞和细胞核清晰, 能够满足组织



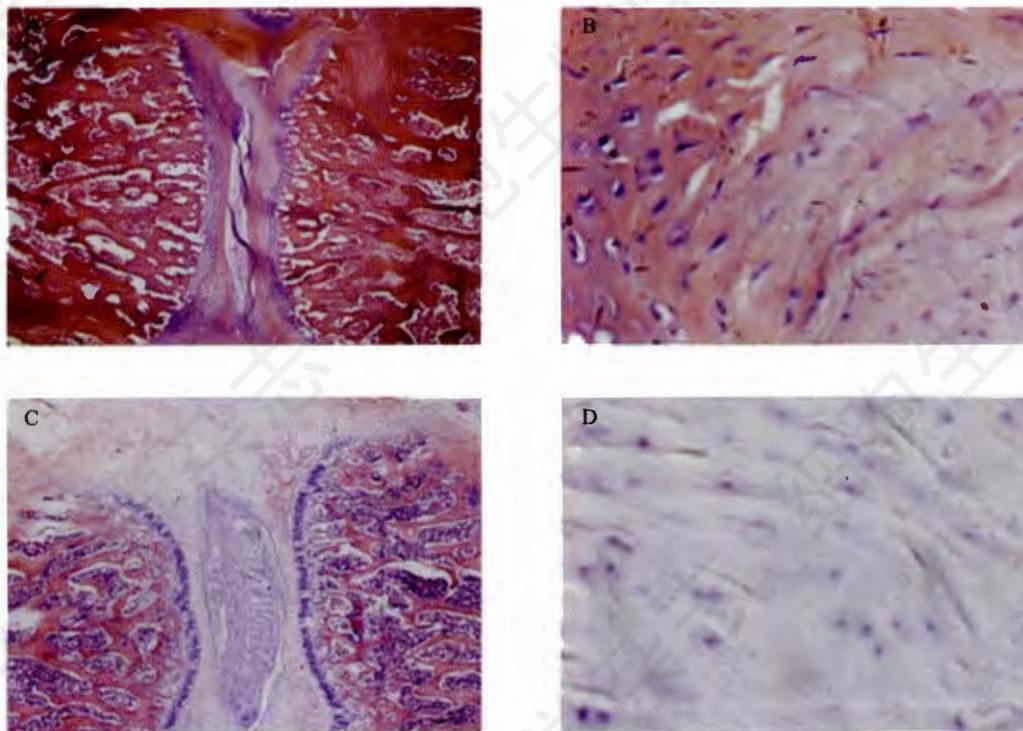
**Fig.1 Histological evaluation of femoral condyle of rat knee joints stained with safranin-O and fast green**

The rat femoral condyle was decalcified with 4 solutions and conditions. The tissue section was stained with safranin-O and fast green, and examined under microscope for comparance of chondrocyte morphology and cartilage matrix staining. A (40 $\times$ ) and E (200 $\times$ ): decalcified with 3% nitric acid at room temperature, showing the joint cartilage was not stained properly with safranin-O; B (40 $\times$ ) and F (200 $\times$ ): decalcified with mixed decalcified solution at room temperature, showing joint cartilage was slightly stained with safranin-O; C (40 $\times$ ) and G (200 $\times$ ): decalcified with mixed decalcified solution at 4  $^{\circ}$ C, showing proper staining of the chondrocytes and cartilage matrix; D (40 $\times$ ) and H (200 $\times$ ): decalcified with 15% EDTA at room temperature, showing the cartilage was poorly stained with safranin-O.

学评分的要求。椎间盘结构清晰,髓核保存完整,因此,混合脱钙液是一种快速有效的脱钙液。

另外,应注意的是,一般的组织固定 24 h 为宜,

由于膝关节及脊椎体积较大,固定及脱水时间应当延长,固定 2~3 天,否则固定液难以渗透入组织内部。固定好的标本流水冲洗 24 h,除去甲醛,以免形成甲



**Fig.2 Histological evaluation of rat intervertebral disc between T3-T4 stained with haematoxylin-eosin (HE)**

Rat intervertebral disc between T3-T4 was decalcified with different solutions and conditions. Tissue sections were stained with HE and evaluated under microscope. A (40 $\times$ ) and B (200 $\times$ ): decalcified with 3% nitric acid at room temperature, showing shrunken disc; C (40 $\times$ ) and D (200 $\times$ ): decalcified with mixed decalcified solution at 4  $^{\circ}$ C, showing well preserved disc structure.

醛颗粒而影响染色<sup>[4]</sup>。为了加速脱水进程,最好搅拌进行,可在一次性塑料薄膜手套的手指上扎上网眼,将组织放入其中,末端打成结,以便组织漂浮于脱水剂中,增加接触面。

最后,气温也会对切片效果产生一定的影响,夏天气温高可用冰块适当冷却蜡块表面,冬天则应适当加温。切片在展片前可用小镊子轻微拉伸,以防止切片折叠,展片温度保持 40  $^{\circ}$ C 为宜。

总之,制作一张高质量的石蜡切片,每一步都很关键,任何一个环节出现差错都有可能影响切片的效果,其中脱钙、脱水、透明是核心步骤。对于骨组织,选择合适的脱钙液是制作高质量切片的前提,和传统脱钙液相比,混合脱钙液具有脱钙时间短、对组织特别是软骨基质损伤小、切片着色效果好、软骨细胞核及细胞形态清晰的特点,能很好地满足组织

学评价关节炎损伤及修复程度的要求。

#### 参考文献(References)

- [1] 赵刚, 杨海贤, 白景文, 等。不脱钙骨组织标本超薄切片的制作方法, *临床与实验病理学杂志*, 2005, 21(3): 360-361
- [2] Schwab W, Bilgicyildirim A, Funk RHW. Microtopography of the autonomic nerves in the rat knee: a fluorescence microscopic study, *Anat Rec*, 1997, 247(1): 109-118
- [3] Tuncay IC, Ozdemir BH, Demirörs H, et al. Pedunculated synovium grafts in articular cartilage defects in rabbits, *J Invest Surg*, 2005, 18(3): 115-122
- [4] 吕俊耀, 于晓军, 刘卯阳。常规组织切片染色制作中常见问题及其解决方法, *法医学杂志*, 2008, 24(1): 51-53
- [5] 谢玲, 邹丽宜, 张志平, 等。改良脱钙液制作脱钙骨石蜡切片与传统方法的比较, *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(11): 2125-2128
- [6] Cunningham CD 3rd, Schulte BA, Bianchi LM, et al. Microwave decalcification of human temporal bones, *Laryngoscope*, 2001, 111(2): 278-282

## A Method of Preparation of Articular Joint and Intervertebral Disc Tissue Section of Normal Rat

Hui-Xian Li<sup>1</sup>, Shun-Ying Zhu<sup>2</sup>, Yi-Ping Qi<sup>1</sup>, Zhong-Hui Zhang<sup>2</sup>, Wei Han<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang University of Technology and Sciences, Hangzhou 310018, China; <sup>2</sup>Laboratory of Regenromics, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract** To aid at the histological evaluation of hyaline cartilage and fibrocartilage, we improved a rapid paraffin tissue section method for preparation of rat articular joint and intervertebral disc. After the fixation of the whole rat knee joints and intervertebral disc between T3-T4 of normal rats for 24 h in 10% neutral formalin, the tissues were washed with running water for 30 min, and decalcified with 3 different decalcifying solutions (3% HNO<sub>3</sub> decalcifying solutions, 15% EDTA decalcifying solutions and mixed decalcifying solutions). The tissue sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) and safranin-O, and observed under a microscope to evaluate the morphology of chondrocytes and the cartilage matrix. The tissues prepared with mixed decalcified solution with stirring at 4 °C was superior to the other decalcify solutions. The structure integrity of bone and cartilage of the knee joint and intervertebral disc were maintained. Clear chondrocytes morphologies of articular cartilage and fibrocartilage were revealed by HE, and cartilage matrix was stained with safranin-O. A modified paraffin tissue section method was developed to meet the requirement of histological evaluation of hyaline cartilage of articular joint and fibrocartilage of intervertebral disc of rat.

**Key words** rat; knee joint; intervertebral disc; paraffin tissue section

Received: November 5, 2008 Accepted: December 24, 2008

This work was supported by the Science & Technology Commission of Shanghai Municipality (No.06d14001, No.075407071)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-34204750, E-mail: weihan@sjtu.edu.cn