



软骨细胞特殊染色技术的比较与应用

于斐¹, 曾晖¹, 于红燕², 雷鸣¹, 袁昊¹, 肖德明¹

(1. 北京大学深圳医院, 深圳 广东 518036; 2. 滨州市滨城区市立医院, 滨州 山东 256600)

【摘要】 目的 探讨多种特殊染色技术在软骨细胞中的染色规律及其应用价值。方法 选取出生7 d内的C57BL/6J小鼠12只, 处死后取双侧膝关节软骨行软骨细胞原代培养, 并行II型胶原免疫荧光鉴定, 取5代以内的原代细胞制作细胞爬片, 细胞爬片制备完成后行HE染色、番红O-固绿双染色、SA-β半染糖苷酶半乳糖苷酶衰老染色及II型胶原免疫组化染色, 观察软骨细胞组织形态变化, 并对几种染色方式进行比较。结果 HE染色中细胞核呈紫蓝色, 细胞质呈粉红色, 细胞形态结构清楚; 番红O-固绿双染色中细胞核呈粉红色, 细胞质呈蓝绿色, 细胞形态结果较清晰; SA-β半染糖苷酶半乳糖苷酶衰老染色时, 衰老软骨细胞呈绿色, 未衰老细胞无着色; II型胶原免疫组化染色时, II型胶原呈棕黄色, 细胞核呈紫蓝色。结论 HE染色和番红O-固绿双染色可以清晰分辨细胞核和细胞质等细胞结构, 对单个细胞形态的显示比较清楚; SA-β半染糖苷酶半乳糖苷酶衰老染色可以显示出衰老细胞的数量及衰老的程度; II型胶原免疫组化染色可以对II型胶原进行定位与定量。

【关键词】 软骨细胞, 特殊染色, 细胞爬片, 原代细胞, 膝关节

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 08-0058-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.008.012

Comparison of different special staining techniques of chondrocytes and their application values

YU Fei¹, ZENG Hui¹, YU Hong-yan², LEI Ming¹, YUAN Hao¹, XIAO De-ming¹

(1. Peking University Shenzhen Hospital, Guangdong Shenzhen 518036, China;

2. Municipal Hospital of Binzhou, Shandong Binzhou 256600)

【Abstract】 Objective To compare the advantages and values of several special staining methods of chondrocytes. **Methods** Twelve 7-day old healthy C57BL/6J mice were killed to obtain the cartilage tissue of the knee joint in order to isolate the chondrocytes. Type II collagen was used to assess the chondrocytes. Then the chondrocyte climbing slices were prepared. The materials were fixed, and HE staining, Safranin O-fast green staining, SA-β-gal staining and immunohistochemical staining of Type II collagen were performed and compared. **Results** HE staining showed clear morphology of the chondrocytes. The cell nuclei were stained blue and the cytoplasm was pink. Safranin O-fast green staining showed that the nuclei were pink and the cytoplasm green. SA-β-gal staining showed that the aging cells were green while the young cells were colorless. Immunohistochemical staining of type II collagen showed the distribution of type II collagen and they were stained brown while the cell nuclei were blue. **Conclusions** HE staining and safranin O-fast green staining can provide more information than the other staining techniques. SA-β-gal staining is useful in the analysis of aging

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(项目编号:81272032);深圳市科工贸与信息委员会重点项目(项目编号:201101001);深圳市科创委资助项目(项目编号:JCY20130402114702130)。

【作者简介】 于斐(1989-),男,硕士研究生。研究方向:骨关节炎、骨科生物材料。E-mail: ocarfyu@163.com。

【通讯作者】 肖德明(1956-),男,博士生导师、教授、主任医师。研究方向:骨关节炎、骨科生物材料。E-mail: xiaodm_1@163.com。

chondrocytes. Immunohistochemical of type II collagen can be used to study type II collagen.

【Key words】 Chondrocytes, special staining; Cell climbing slices; Primary cells; Knee joint, mice

骨关节炎发病机制及治疗措施的研究中经常用到细胞学水平的研究,观察软骨细胞的形态结构成为实验中的一种重要的方法。在过去的研究中^[1-3],人们对软骨大体标本的特殊染色技术已经进行了大量的改良,并应用于骨关节炎的研究中,取得了良好的效果,但是对于软骨细胞水平的染色技术发展缓慢,以至于无法用简便的方法对细胞形态进行观察,对研究造成了不便。本研究利用 C57BL/6J 小鼠进行软骨细胞的原代培养,对软骨细胞爬片进行 HE 染色、番红 O-固绿双染色、SA- β 半乳糖苷酶衰老染色及 II 型胶原免疫组化染色,探讨这几种染色技术在软骨细胞爬片中的染色规律及应用价值,为骨关节炎细胞水平研究提供便利的条件。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及实验环境: 出生 7 d 内的健康 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 12 只【动物合格证号: No: 44007200018611】,雌雄不限,体重(4 \pm 1) g,实验用小鼠购自广东省医学实验动物中心【生产许可证号: SCXK(粤)2013-0002; 使用许可证号: zSYXX(粤)2013-0002】,饲养于北京大学/香港科技大学医学中心深圳医院实验动物中心【使用许可证号: SYXK(粤)2010-0106】SPF 级屏障区域的 PVC 鼠笼内,持续过滤通气,自由饮食,清洁饮水,每日保持 12 h 光照/黑暗循环。实验流程和小鼠处理均遵循实验动物管理规范条例。

1.1.2 实验仪器: 高压灭菌器(日本 Hirayama 公司),用于实验材料的灭菌;电热鼓风干燥箱(中国精宏公司),用于灭菌材料的干燥;纯水机(美国 Millipore 公司),用于试剂配制;恒温水浴锅(上海百典仪器设备有限公司),用于试剂复温;生物洁净工作台(中国苏净公司),用于实验操作;微量移液枪(Thermo fisher),用于试剂配制及细胞培养;高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),用于细胞离心;培养箱(德国 Thermo 公司),用于细胞培养;光学显微镜(德国 Leica 公司),用于细胞观察及拍照。

1.1.3 实验试剂: II 型胶原一抗、goat anti-rabbit IgG H&L (Cy3[®]) preadsorbed 9 购自 Abcam 公司,生物素化兔抗山羊 IgG、SABC-POD、DAB 显色试剂

盒购自武汉博士德生物工程有限公司,fast green solution、safranin O solution 购自 Scytek 公司,细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒购自碧云天公司,Collagenase、胰酶购自 Worthington 公司,改良型 RPMI-1640 培养基购自 HyClone 公司,青/链霉素溶液购自伊科赛公司,胎牛血清购自 Life 公司,0.4% 台盼蓝溶液购自广州晶欣公司,二甲苯、无水乙醇、30% H₂O₂ 购自广州化学试剂厂,苏木素购自广州速聚生物有限公司,中性树胶购自国药集团化学试剂有限公司,伊红 Y 购自行知生物科技有限公司。

1.1.4 试剂配制: 软骨细胞培养液: 改良型 RPMI-1640 培养基 90 mL,胎牛血清 10 mL;4% II 型胶原酶消化液: collagenase 粉末 4 g, PBS 96 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠膝关节软骨细胞的分离培养: 取出生 7 d 以内的 C57BL/6J 小鼠 12 只,全部实验动物气管窒息法处死,置于 75% 酒精中浸泡 5 min,取出小鼠用碘伏消毒膝关节处;PBS 漂洗 3 遍各 3 min;将组织块剪切成 1 mm³;加入含有双抗的 4% II 型胶原酶中于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中消化 4 h;充分吹打细胞消化液,200 目过滤收集滤液;1 500 r/min 离心 5 min,无菌 PBS 清洗并离心 2 次;弃上清液加入 6 mL 完全培养基重悬细胞沉淀,接种至培养瓶中;于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养观察,1:3 比例传代,取 3 代以内的细胞进行实验。

1.2.2 软骨细胞爬片的制作: 准备多聚赖氨酸溶液浸泡后的 24 孔板大小的盖玻片于超净台中晾干;5 代以内的软骨原代细胞消化后台盼蓝计数,配制成 1 \times 10⁵/mL 细胞悬液;24 孔板中加入少许培养基,将细胞悬液均匀滴到玻片上;常规培养 6 h 等到细胞贴壁后,再滴加培养基布满整个板底,继续培养至 24 h。

1.2.3 软骨细胞的鉴定: 将分离取得的细胞 1 \times 10⁵ 接种到细胞爬片,静止贴壁;吸去上清培养基;孵育一抗,anti-collagen II antibody,37 $^{\circ}$ C,1 h;PBS 轻微洗涤 3 次;孵育 goat anti-rabbit-Cy3,37 $^{\circ}$ C 1 h;PBS 轻微洗涤 3 次;孵育 Hoechst 33258,室温 15 min。

1.2.4 细胞爬片的 HE 染色: 4% 多聚甲醛固定细胞爬片 20 min,流水冲洗 3 次各 2 min,苏木素滴染 2 min,自来水返蓝 2 min,80% 酒精急洗,伊红滴染 30 s。

1.2.5 细胞爬片的番红 O-固绿双染色: 4% 多聚甲醛固定细胞爬片 20 min, 流水冲洗 2 min × 3, 苏木素染核 2 min, 自来水返蓝 2 min, 番红 O 染液滴染 30 min, 95% 乙醇分化 10 s, 自来水洗 10 s, 60℃ 预热固绿滴染 1 min, 蒸馏水急洗一次, 番红 O 染液复染 30 min, 95% 乙醇分化 5 s, 自来水冲洗 10 s。

1.2.6 细胞爬片的 SA-β-gal 半乳糖苷酶衰老染色: ①染色工作液根据碧云天细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色试剂盒说明书配制: β-半乳糖苷酶染色液 A 10 μL, β-半乳糖苷酶染色液 B 10 μL, β-半乳糖苷酶染色液 C 930 μL, X-Gal 溶液 50 μL, 混合均匀。②β-半乳糖苷酶染色固定液固定 30 min, PBS 洗 5 min × 3, 染色工作液覆盖爬片 37℃ 过夜。

1.2.7 细胞爬片的 II 型胶原免疫组化染色: 4% 多聚甲醛固定细胞爬片 20 min, 流水冲洗 2 min × 3; 烤片 3 min; 蒸馏水冲洗 2 次; 抗原修复; PBS 冲洗 3 次; 滴加过氧化物酶阻断剂; PBS 液冲洗 3 次; 滴加非免疫性动物血清; 滴加 II 型胶原一抗; PBS 液冲洗 3 次; 滴加生物素标记的二抗; 滴加 SP 溶液; 滴加 2 滴新鲜配制的 DAB 溶液。

2 结果

几种特殊染色方法观察软骨细胞形态结构比较见表 1。

2.1 倒置显微镜下软骨细胞形态

常规消化细胞, 并用含 10% FBS 的 1640 培养基培养关节软骨细胞, 分别与 0、3、7 d 于显微镜下观察细胞形态(图 1 见彩插 6)。0 d 软骨细胞均匀分布在培养瓶底, 处于待贴壁状态; 3 d 软骨细胞完

全贴壁, 呈梭形、三角形或多角形; 7 d 软骨细胞融合, 铺满培养瓶瓶底。

2.2 II 型胶原免疫荧光鉴定软骨细胞

II 型胶原是软骨细胞分泌的特异性胶原, 可利用 II 型胶原的免疫荧光对软骨细胞进行鉴定。荧光标记后, 软骨细胞细胞核呈圆形紫蓝色荧光, II 型胶原呈条带状红色荧光(图 2 见彩插 6)。

2.3 HE 染色观察软骨细胞

苏木素可与核酸等酸性物质结合显示蓝色, 而伊红可与碱性蛋白质物质结合显示出红色, 进而将细胞的形态结构区分开来。染色后我们可以看到软骨细胞的细胞核呈蓝色, 为圆形或者卵圆形, 细胞质呈粉红色, 三角形或梭形(图 3 见彩插 6)。

2.4 番红 O-固绿双染色观察软骨细胞

番红 O 是碱性染料可与核酸结合显示红色, 固绿是酸性染料可与蛋白结合将显示蓝色或者绿色。染色后我们可以看到细胞核呈粉红色, 但部分颜色被细胞质染色所覆盖, 细胞质呈蓝绿色(图 4 见彩插 6)。

2.5 SA-β-gal 半乳糖苷酶衰老染色观察软骨细胞

细胞衰老后, 溶酶体中 β 半乳糖苷酶的表达升高, 表达量越高, 细胞所染颜色越重, 衰老程度也越严重。染色后我们能够清楚的看到细胞质绿染且颜色深浅不一, 细胞核无法辨别(图 5 见彩插 6)。

2.6 II 型胶原免疫组化染色观察软骨细胞

II 型胶原免疫组化染色可以特异性的定位 II 型胶原的位置, 苏木素复染后可以显示细胞核的位置。染色后我们可以看到 II 胶原表达出呈现棕黄色, 而细胞核呈现紫色(图 6 见彩插 6)。

表 1 几种特殊染色方法观察软骨细胞形态结构比较

Tab. 1 Comparison of the four special staining methods of chondrocytes morphology

结构 Cell structures	染色方法 Staining methods	HE 染色 HE Staining	番红 O-固绿双染色 Safranin O-fast green staining	SA-β-gal 半乳糖苷 酶衰老染色 SA-β-gal staining	II 型胶原免疫组化染色 Immunohistochemical staining of Type II collagen
细胞核形态 Morphology of nuclei	++++	+++	-	++++	
细胞质形态 Morphology of cytoplasm	++++	++++	++	++	
细胞整体形态 Morphology of cells	++++	++++	++++	++	
II 型胶原纤维 Type II collagen	-	-	-	++++	
细胞衰老情况 Cell aging	-	-	++++	-	

注:“-”为阴性,“+”为阳性且“+”至“++++”阳性程度越高,分辨越明显。

Note. “-” is negative, “+” is positive, “+” to “++++” represent the increasing levels of positive staining and better resolution

3 讨论

软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞,被包埋在软骨基质中,它可以感受机体周围的变化,维持细胞外基质的平衡,其分泌的细胞外基质主要是糖蛋白和 II 型胶原^[4]。软骨细胞的细胞核较小,呈圆形或卵圆形,有一到数个核仁,细胞可呈三角形、梭形或多角形。在软骨组织中,越靠近周边的软骨细胞越幼稚,常单个分布;越靠近中央的软骨细胞越成熟,常多个聚集在一起^[5]。骨关节炎(OA)与关节软骨细胞的衰老和凋亡密切相关,主要表现为进行性的软骨关节破坏,本质上是一种生物学重建过程^[6]。随着我国老龄化进程的加剧,该病已经成为影响老年人健康的主要慢性退行性病变之一,但是对其发病机制仍然知之甚少,因此对该病的研究成为近年来的热点。

目前对于动物标本的特殊染色技术发展较快,在骨关节炎领域的研究中应用广泛。细胞学水平的研究与动物水平的研究同等重要,但是细胞染色技术发展较慢,在骨关节炎研究领域应用较少,这一方面是因为细胞染色与组织标本相比染色困难,另一方面是由于电镜等技术的发展代替了染色对细胞结构的观察。但是,对于软骨细胞的特殊染色仍有其优点,比如操作简便、价格低廉、不需要特殊的仪器设备等,这对于没有电镜等特殊设备的实验室仍然是一个好的选择。

本课题组在进行骨关节炎的研究过程中,根据研究的需要对软骨细胞的 HE 染色、番红 O-固绿双染色、SA- β -半乳糖苷酶衰老染色和 II 型胶原免疫组化染色条件进行了探究,取得了良好的效果。

苏木素-伊红染色技术是病理技术中最经典的染色方法,是由 Waldeyer 于 1863 年首先提出来的,一直沿用至今。常规的 HE 染色是根据苏木素和伊红两种染料对酸碱性物质的亲和性不同而着色,苏木素可与核酸等酸性物质结合,从而使细胞核呈现蓝色,而伊红可以与细胞质中的碱性蛋白物质结合,显示出红色,进而将细胞的形态结构区分开来^[7]。我们可以看到,在软骨细胞爬片的 HE 染色中,细胞核与细胞质结构清楚,单个细胞的轮廓也清晰可辨,是一种观察细胞形态较好的染色方式。

番红 O-固绿双染色中,番红 O 是碱性染料可与核酸结合将细胞核红染,固绿是酸性染料可与蛋白结合将细胞核染成蓝色或者绿色^[8]。在软骨细胞

爬片中,可以分辨出细胞核与细胞质的结构,但分辨率不如 HE 染色清楚,这种分辨情况与软骨组织中两种染色的分辨情况正好相反,这可能是由于固绿与番红 O 相比更容易着色,而绿色可以覆盖部分红色使得结构相对不太清晰。但是,该染色在软骨细胞或软骨组织中是一种特异性的染色,其使用率较高,通过我们在软骨细胞爬片上的实验也得到了预期的效果,可以在软骨细胞中加以应用。

β -半乳糖苷酶是检验细胞衰老的一种特异性的标志酶,由 Dimri 等^[9]在 1995 年首次提出,衰老软骨细胞在 pH 6.0 时会表现出溶酶体 β -半乳糖苷酶活性的升高,衰老的软骨细胞可以表达此酶,通过对不同阶段的软骨细胞的衰老染色情况进行分析,可以得到软骨细胞的衰老情况,从而确定不同状态下软骨细胞老化的速度及程度^[10]。通过实验结果我们可以看到,由于 β -半乳糖苷酶表达量的升高,细胞质被染成绿色,并且当细胞衰老程度越严重时,绿色越明显,而未衰老的细胞则无此染色。该染色在反应细胞的形态结构方面不清楚,无法分辨细胞核与细胞质。

II 型胶原是软骨细胞分泌的特异性物质,通过 II 型胶原免疫组化染色可以对软骨细胞进行特异性的定位,对 II 型胶原的分布及定量作用明显,通过苏木素的复染,可以分辨其余细胞,作用很大。我们通过染色发现,II 型胶原表达处呈现棕黄色,而通过苏木素的复染,细胞核呈紫色,从而清晰的分辨出细胞核与细胞质。由于 II 胶原只是细胞分泌的细胞外基质中的部分成份,该染色无法显示细胞质中的其他成份,所以单个细胞的形态不是很清楚。该染色在 II 型胶原特异性的定位及定量作用比较明显。

综上所述,各种染色方法各有优缺点,但在软骨细胞形态观察方面,HE 染色和番红 O-固绿双染色分辨细胞比较清楚,可以获得更加全面的信息,尤其以 HE 染色最佳;SA- β -gal 半乳糖苷酶衰老染色对于衰老软骨细胞的数量及软骨细胞衰老程度的检测用处较大;II 型胶原免疫组化染色则可以用于 II 型胶原的定位与定量。我们在使用软骨细胞进行研究时,可以综合采用多种染色方法。

参考文献:

- [1] 黄云梅,陈文列,黄美雅,等.多种特殊染色法在骨关节炎组织形态学研究中的应用比较[J].中国比较医学杂志,2011,21(5):45-49. (下转第 75 页)

参考文献:

- [1] 许钟麟. 洁净室及其受控环境设计[M]. 北京, 化学工业出版社, 2008. 03.
- [2] 中华人民共和国住房和城乡建设部, 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物 环境及设施(GB14925-2010)[S]. 北京, 中国标准出版社, 2011. 02.
- [3] 中华人民共和国住房和城乡建设部, 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物设施建筑技术规范(GB50447-2008)[S]. 北京, 中国建筑工业出版社, 2008. 08.

- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物机构 质量和能力的通用要求(GB50447-2014)[S]. 北京, 中国建筑工业出版社, 2014. 09.
- [5] 丁士昭, 逢宗展. 机电工程管理与实务[M]. 北京, 中国建筑工业出版社, 2014. 04.

[修回日期]2015-07-10

(上接第 61 页)

- [2] 高改霞, 卫小春, 李凯, 等. 大鼠膝关节软骨不同染色方法的差异[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 24(14): 4385-4389.
- [3] 简月奎, 吴雪晖, 田晓滨, 等. 不同方法显像骨组织微血管的对比研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2008, 16(7): 535-536.
- [4] 李坚, 娄玉铃, 李满意, 等. 健膝丸对大鼠膝关节炎组织形态学的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2013, 2(1): 13-17.
- [5] 席越, 孟淑琴, 宫丽华, 等. 骨组织病理解剖学技术(第 2 版)[M]. 北京:人民卫生出版社. 2009: 1.
- [6] 袁雪凌, 汪爱媛, 孟昊业, 等. 兔膝关节炎进程中软骨下骨血管生成的实验研究[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2013, 7(6): 810-814.
- [7] Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, et al. Basic methods in histopathology of joint tissues[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010,

- 18(Suppl 3): 113-116.
- [8] Király K, Lapveteläinen T, Arokoski J, et al. Application of selected cationic dyes for the semiquantitative estimation of glycosaminoglycans in histological sections of articular cartilage by microspectrophotometry[J]. Histochem J, 1996, 28(8): 577-590.
- [9] Dimri GP, Lee XH, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo[J]. Proc Natl Sci U S A, 1995, 92(20): 9363-9367.
- [10] Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay[J]. Methods Mol Biol, 2007, 371: 21-31.

[修回日期]2015-07-12

(上接第 71 页)

- [38] Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, et al. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2005, 64(2): 113-122.
- [39] Fimia GM, Bartolomeo SD, Piacentini M, et al. Unleashing the Ambra1-Beclin 1 complex from dynein chains: Ulk1 sets Ambra1 free to induce autophagy[J]. Autophagy, 2011, 7(1): 115

- 117.
- [40] 刘敏, 马建芳, 汤荟冬. 自噬在阿尔茨海默病中的作用机制及治疗前景[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2014(05): 441-445.

[修回日期]2015-07-10