

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

黄云梅, 陈文列, 黄美雅, 林如辉, 吴广文, 李钻芳

(福建中西医结合研究院(福建中医药大学), 国家中药管理局三级科研实验室
—中药物理(细胞结构与功能)实验室, 福州 350108)

【摘要】 目的 探讨多种特殊染色法在骨关节组织中的染色规律及其在骨关节炎形态学研究中的应用价值。
方法 6月龄健康新西兰大白兔20只, 随机分为正常组和造模组各10只, 根据改良Hulth法造模, 6周后膝关节取材。对标本固定、脱钙后进行石蜡包埋和切片。分别采用HE、番红-固绿、AB-PAS、甲苯胺蓝、Van Gieson染色和Mallory染色, 观察骨关节组织的形态学变化, 并对几种染色方法进行比较。结果 HE染色显示关节一般组织形态结构, 可见模型组关节软骨和软骨下骨发生骨性关节炎病理变化; 番红-固绿染色法中软骨和软骨下骨的界限(黏合线)以及潮线显示清晰, 软骨基质中糖胺聚糖含量减少, 纤维成分增多; AB-PAS染色显示骨关节炎软骨基质糖胺聚糖尤其是酸性糖胺聚糖含量减少; 甲苯胺蓝染色显示骨关节炎软骨的酸性糖胺聚糖减少; Van Gieson染色和Mallory染色可显示骨关节组织中的胶原纤维, 但组织结构界限不够清晰。结论 在骨性关节炎的组织形态学研究中, 通过常规HE染色, 结合番红-固绿染色法和AB-PAS染色法, 能较客观全面地获得关节组织形态学相关信息。

【关键词】 骨关节炎; 特殊染色法; 兔

【中图分类号】 R684 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)05-0045-04
doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2011.05.011

Comparison of Several Special Stainings on Osteoarthritis Morphology

HUANG Yun-mei, CHEN Wen-lie, HUANG Mei-ya, LIN Ru-hui, WU Guang-wen, LI Zuan-fang

(Fujian Academy of Integrative Medicine (Fujian University of Traditional Chinese Medicine), Fuzhou 350108; China)

【Abstract】 Objective To investigate the staining rule of several special staining methods on bone and joint staining and their value in morphological research of osteoarthritis. **Methods** 20 6-month old healthy New Zealand rabbits were randomly divided into normal group and osteoarthritis model group, 10 in each group. The model rabbits were replicated into knee osteoarthritis model by modified Hulth method. The materials were drawn out 6 weeks after operation. The samples were fixed, decalcified, paraffin embedded and made into paraffin sections, then HE staining, Safranin-Fast Green staining, AB-PAS staining, toluidine blue staining, Van Gieson staining and Mallory staining were applied to observe the morphology of the tissue, and all of the staining methods were compared. **Results** HE staining showed normal tissue morphology of joints, pathological changes of osteoarthritis can be seen in articular cartilage and subchondral bone of model group; Safranin-Fast Green staining showed clear boundary of cartilage and subchondral bone (cement line), and a clear tide line, the glycosaminoglycan in Cartilage matrix decreased and the fiber Increased; AB-PAS staining showed that

[基金项目]福建省自然科学基金项目(NO. C0710030);陈可冀中西医结合发展基金项目(CKJ2008008, ZXY2008004);福建省重点实验室开放课题基金、陈可冀中西医结合发展基金项目(2008J1004-29, CKJ2008066)。

[作者简介]黄云梅(1979-),女,医学硕士,助理研究员。

[通讯作者]陈文列(1959-),男,硕士生导师,研究员。E-mail: chen.wl@163.com。

glycosaminoglycan, especially the acid glycosaminoglycan reduced in osteoarthritis; toluidine blue staining showed the acid glycosaminoglycan reduced in the tissues of osteoarthritis; Van Gieson staining and Mallory staining showed collagen fibers of bone and joint tissues, but the boundaries of various tissues were not clear. **Conclusion** Application of HE staining in combination with safranin-fast green staining and AB-PAS staining in osteoarthritis study may acquire more objective and comprehensive information on joint morphology.

【Key words】 Osteoarthritis; Special staining; Rabbit

骨性关节炎的发病机制和治疗在骨性关节炎的发病机制和治疗的实验研究中,关节组织形态结构的变化是重要的观察指标之一,除了常规病理切片,国内外学者还对骨性关节炎实验动物关节标本进行了大量的特殊染色方法观察和研究,包括番红-固绿染色、AB-PAS 染色、甲苯胺蓝染色、V. G 染色、Mallory 染色等,但多单独采用上述方法中的一种,本研究将以上各种特殊染色方法加以比较,探讨不同方法的染色规律,及其在骨关节组织形态学研究中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 动物实验和取材

6 月龄健康新西兰大白兔 20 只,体重 2100 ± 100 g,随机分为正常组和造模组各 10 只,根据改良 Hulth 法^[1]造模,6 周后膝关节取材。

1.2 对标本固定、EDTA 脱钙后进行常规石蜡包埋和切片。

1.3 切片脱蜡至水后分别进行:

(1) 常规 HE 染色:苏木精染液 20 min;自来水洗 1 min;入 1% 盐酸酒精分色数秒;自来水洗,返蓝;伊红染液 1 min;95% 酒精 1 min \times 3;

(2) 番红-固绿染色:1% 番红染液中浸染 3 min;1% 固绿复染 3 min;95% 酒精分化数秒;复加番红染色 2 min;镜下 95% 酒精分化数秒;

(3) AB-PAS 染色:阿尔新兰液 (pH = 2.5) 中 30 min;3% 醋酸液 3 min;蒸馏水冲洗多次;过碘酸氧化 10 min;蒸馏水浸洗 2 次;在 Schiff 试剂中染色 10 ~ 20 min(据室温);流水冲洗 2 ~ 5 min,蒸馏水洗片刻;苏木精液淡染核;

(4) 甲苯胺蓝染色:甲苯胺蓝溶液 30 min;水洗 1 min;冰醋酸溶液中于显微镜下分色数秒;蒸馏水洗 2 次,各 2 min;

(5) V. G 染色法染色:Weigert 氏铁苏木素溶液 5 ~ 10 min;自来水充分冲洗;V. G 氏液染 30 s ~ 1 min;95% 酒精分化数秒;

(6) Mallory 一步三色法染色:重铬酸钾液 10

min;流水冲洗 2 min;蒸馏水两次;酸性复红液 2 min;蒸馏水稍洗;苯胺蓝液 20 min;95% 乙醇快速分化;

以上染色后分别进行梯度酒精脱水;二甲苯透明;中性树脂封片。

1.4 在显微镜下观察经上述染色后的切片,并进行图像采集,比较上述特殊染色方法在正常和骨性关节炎大白兔膝关节组织切片中的染色规律。

2 结果

2.1 HE 染色

正常组关节软骨表面光滑,四层结构清晰可辨,各层次排列规律;软骨细胞周围基质染成蓝色,以放射层为中心往上、下层染色渐淡,潮线较完整;软骨下骨致密层厚度适中,骨松质层骨小梁宽度和密度适中,骨细胞呈梭形,分布均匀,骨基质均匀红染(见封 3 图 1)。

模型组出现关节软骨层表面粗糙,完整性破坏,可见纤维肉芽组织填充;部分区域软骨较正常组局部增厚,软骨细胞明显增值,呈簇状,层次结构紊乱;局部软骨细胞凋亡,基质纤维化;潮线多不完整,扭曲,部分区域出现多条潮线;软骨下骨部分致密层变薄,骨松质层疏松,部分则有硬化趋向(见封 3 图 2)。

2.2 番红-固绿染色

正常组软骨基质大部分染成红色,颜色鲜艳,软骨表面胶原纤维层染成绿色,软骨下骨皮质和骨小梁呈绿色,软骨与软骨下骨界限清楚,潮线清晰(见封 3 图 3)。模型组软骨番红染色较正常组淡,阳性范围小,而固绿的染色范围增大,由表层和放射层向中间延伸,软骨表面的模样结构被破坏(见封 3 图 4),可见软骨基质中糖胺聚糖含量减少,纤维成分增多。

2.3 AB-PAS 染色

AB(阿尔新蓝)将软骨中的酸性糖胺聚糖如硫酸软骨素等染成蓝色,主要分布于软骨细胞周围,其中表面纤维层和钙化层染色阳性范围较小,辐射

层染色阳性范围最大。PAS 染色则将中性多糖染成紫红色,主要分布于软骨基质,在软骨各层次的染色规律正好与阿尔新蓝相反,骨基质呈淡红色。模型组与正常组相比,阿尔新蓝染色阳性的范围明显缩小(见封 3 图 5、6)。

2.4 甲苯胺蓝染色

甲苯胺蓝将软骨基质中的糖胺聚糖异染呈紫色,细胞核呈蓝色。正常组软骨基质染色深且阳性面积范围大,软骨下骨基质染色很淡(见封 3 图 7)。模型组软骨基质染色的深度和面积都明显下降,一些部位甚至大面积失染(见封 3 图 8)。

2.5 V.G 染色

软骨组织呈淡红色,骨皮质和骨小梁呈红色,

细胞核黑褐色,细胞浆黄色。正常组软骨胶原纤维含量较少,围绕软骨囊周围纵向(深层)或横向(表层)交织排列,软骨表面胶原纤维密集排列,形成完整的膜样结构;软骨下骨以哈弗式系统为主要结构,胶原纤维构成骨小板支架,排列规律紧密(见封 3 图 9)。模型组软骨局部胶原纤维含量增加,纤维化明显,软骨表面的膜样结构消失(见封 3 图 10)。

2.6 Mallory 三色染色

软骨基质和胶原纤维呈蓝色,细胞核被染成红色,骨小梁间红细胞呈橘黄色,软骨和软骨下骨界限不清晰(见封 3 图 11)。模型组软骨表面粗糙,有裂隙,纤维化明显(见封 3 图 12)。

2.7 几种特殊染色法观察结果比较(表 1)

表 1 几种特殊染色法观察结果比较
Tab. 1 Comparison of several of Special Stainings

观察指标 (Outcome measures)	染色方法 (Staining method)	HE 染色 (HE staining)	番红-固绿染色 (Safranin - Fast green staining)	AB-PAS 染色 (AB-PAS staining)	甲苯胺蓝染色 (Toluidine blue staining)	V.G 染色 (V.G staining)	Mallory 染色 (Mallory staining)
细胞基本形态结构 (Basic cell morphology)		++++	++	++	++	++	++
糖胺聚糖 (Glycosaminoglycan)		-	+++	++++	++++	-	-
酸性和中性糖胺聚糖的区分 (Distinction between acidic and neutral glycosaminoglycan)		-	-	++++	-	-	-
潮线 (Tide mark)		++	++++	+	+++	++	++
黏合线 (Cement line)		++	++++	++++	++++	+++	++
软骨下骨形态 (Subchondral bone morphology)		++++	+++	++	++	+++	+++

注“-”表示相应组织结构显示阴性,阳性组织结构的相对清晰程度按“+”~“++++”分级
Note:“-”Indicates absence of the appropriate structure, the relative clarity of the structure ranked from “+”~“++++”

3 讨论

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种严重危害病人生活质量的慢性、退行性关节疾病,目前尚无根治方法,其发病机制和防治研究是近年医学临床和基础研究的热点。OA 动物模型的制作是研究 OA 发病机制及寻找合理有效的防治手段的常用方法,而通过关节组织制片、染色和形态学观察的结果是判断造模成功与否,以及防治效果的一项重要指标。常规组织 HE 染色法是根据苏木素的嗜酸性和伊红的嗜碱性特点,使组织中的酸性成分如核酸等被苏木素染成蓝色,而碱性成分如蛋白质等被伊红染成红色,从而显示组织的基本形态结构。HE 染色法可观察到骨关节炎模型组的关节软骨层破坏,层次结构紊乱,软骨细胞凋亡,潮线曲折,不完整,甚至显示多条潮线;软骨下骨局部骨质疏松或

骨质硬化等 OA 常见的病理现象^[2]。但经本法染色的骨关节组织,软骨和软骨下骨的界限,即黏合线不清晰,也难以特异地显示其细胞外基质的情况,选择合适的特殊染色法能够弥补常规染色观察的不足。

软骨和骨的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 中含有丰富的糖胺聚糖和胶原纤维,在骨性关节炎的病理发展过程中,软骨的 ECM 破坏和丢失是病变的关键环节之一,因此可采用糖胺聚糖和胶原纤维相应的特殊染色法进行显色和观察。

番红-固绿染色法是国外研究骨性关节炎组织形态最常用的一种特殊染色法。番红 O 是一种碱性染料,即阳离子染料,能将酸性糖胺多糖(含阴离子)染成红色,有实验证明,番红 O 的染色强度曲线与软骨基质中固定电荷的密度曲线呈线性关系,因此认为番红 O 是对软骨基质中酸性糖胺多糖进行

组织化学定量的很好的阳离子染料^[4],可以通过图像分析系统对组织中的糖胺多糖进行半定量分析^[5]。而固绿是酸性染料,将富含碱性氨基酸的胶原染成绿色,起到衬染作用。这两种染料结合能将软骨和软骨下骨明显的区分开来,可以用于软骨厚度的形态计量学。此外该染色法对潮线的显示特别清晰,潮线是软骨组织放射层和钙化层的界限,因此本法对于观察软骨组织的层次结构很有帮助^[6]。

AB-PAS 染色法是研究蛋白多糖和糖蛋白等常用的染色法,其原理是:阿尔辛蓝是一种水溶性氰化亚钛铜盐,在适当的 pH (pH = 2.5) 条件下,它能与软骨组织中含有羧基和硫酸根等阴离子基团的糖胺聚糖形成不溶性复合物,呈蓝色;PAS 染色法的反应基为多糖中的乙二醇基或氨基,染色过程中用过碘酸将乙二醇基或氨基氧化成醛基,醛基与 Schiff 试剂反应生成不溶性复合物,呈紫红色^[3]。本法先用阿尔新蓝与软骨中所有酸性糖胺聚糖反应呈蓝色,然后用 PAS 染色使中性多糖和胶原呈不同程度的紫红色。因此软骨与骨组织分别呈红蓝相间和淡红色,二者的反差明显,亦可用于软骨厚度的形态计量学;关节软骨在镜下可分为表层、移行层、放射层和钙化层,AB-PAS 染色使软骨层内部各层次的特点更加鲜明,因此可帮助区分软骨各层此结构^[7]。缺点是潮线显示不够清楚。

甲苯胺蓝染色法可将软骨基质中的酸性糖胺聚糖异染呈紫蓝色,其原理是糖蛋白上的酸性基团与甲苯胺蓝的阳离子结合时,染料分子发生聚合,导致吸收光谱发生改变。染色后的关节软骨与软骨下骨界限清晰,潮线的显示亦可,但不能显示软骨中的中性多糖和软骨下骨的结构。本法也是骨关节染色研究中的常用方法,且常用于培养软骨细胞的鉴定,也有学者用于软骨蛋白多糖的半定量分析^[8]。

V. G 染色和 Mallory 三色染色法均为胶原纤维组织的常用染色法,尤其在 HE 染色中胶原纤维组织和肌组织的区分有困难时,可通过该法进行辅助诊断,也常用于骨和软骨组织染色。二者的染色原理主要是根据各种染料对不同组织的渗透和吸附作用的强弱不同,而将各种组织染成相应的颜色。由于软骨和骨的细胞外基质中胶原纤维成分普遍分布,因此基质呈大面积红色 (V. G 染色) 或蓝色

(Mallory 三色染色),V. G 染色后软骨和软骨下骨的界限尚清晰,而 Mallory 三色染色法则不清晰。此外,胶原纤维分为多种类型,软骨中主要为 II 型胶原,骨组织中则主要为 I 型胶原,而 V. G 染色和 Mallory 三色染色法使所有的胶原纤维着同一种颜色。骨关节炎在软骨的损伤和修复过程中,细胞的表型和胶原纤维的类型可能发生转化^[9],而这两种染色法均不能反映这些改变。因此要更好地观察关节软骨和软骨下骨胶原成分的变化可能要通过其它方法,如 I 型、II 型胶原免疫组织化学法等。

综上所述,几种染色法各有优缺点,而在骨性关节炎的组织形态学研究中,除了常规 HE 染色外,结合番红-固绿染色法和 AB-PAS 染色法,有利于更全面地获得关节组织形态学相关信息。

参考文献:

- [1] 刘献祥,李西海,周江涛.改良 Hult 造模法复制膝骨性关节炎的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2005,25(12):1104.
- [2] 王学谦,娄思权,侯筱魁等译.骨关节炎诊断与治疗(第四版)[M].天津科技翻译出版公司,2008.3:59-77.
- [3] 蔡文琴,李和,王廷华等.组织化学与细胞化学(第一版)[M].人民卫生出版社,2009.12:18.
- [4] Kiraly K, Lapvetelainen 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;28:577-590.
- [5] Ivan M, Bojana O, Lisa E. Method for Quantitative Analysis of Glycosaminoglycan Distribution in Cultured Natural and Engineered Cartilage[J]. Annals of Biomedical Engineering. 1999 27(5):656-662.
- [6] 王富友,杨柳,段小军等.正常膝关节软骨钙化层形态结构研究[J].中国修复重建外科杂志,2008,22(5):524-527.
- [7] Hui Xiong, A. Bakr. M. Rabie, Urban Hagg. Mechanical Strain Leads to Condylar Growth in Adult Rats. Frontiers in Bioscience, 2005,10:65-73.
- [8] Cake MA, Read RA, Guillou B, et al. Modification of articular cartilage and subchondral bone pathology in an ovine meniscectomy model of osteoarthritis by avocado and soya unsaponifiables (ASU) [J]. Osteoarthritis Cartilage. 2000,8(6):404-411.
- [9] 姚力,周乙雄,赵丹惠等.骨关节炎软骨中 I 型和 II 型胶原的分布[J].中国矫形外科杂志,2002,9(2):167-169.

(修回日期)2010-09-26

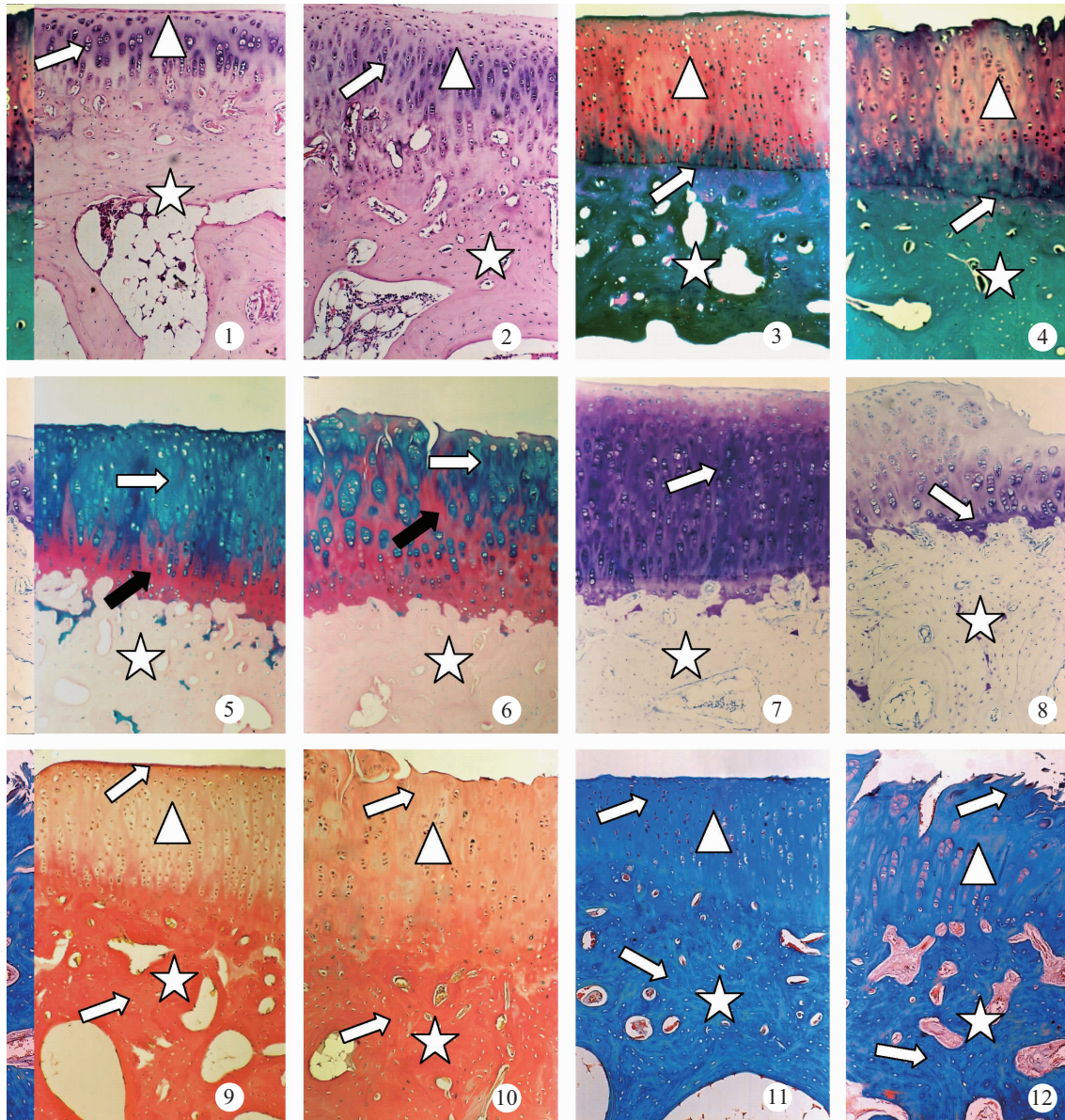


图 1-2 HE 染色。图 1 为正常组,图 2 为模型组,△示关节软骨,☆示软骨下骨,⇨示软骨细胞;
 图 3-4 番红-固绿染色。图 3 为正常组,图 4 为模型组,△示关节软骨,☆示软骨下骨,⇨示潮线;
 图 5-6 AB-PAS 染色。图 5 为正常组,图 6 为模型组,⇨示酸性糖胺聚糖,⇨示中性糖胺聚糖,☆示软骨下骨;
 图 7-8 甲苯胺蓝染色。图 7 为正常组,图 8 为模型组,⇨示酸性糖胺聚糖,☆示软骨下骨;
 图 9-10 VG 染色。图 9 为正常组,图 10 为模型组,△示关节软骨,☆示软骨下骨,⇨示胶原纤维;
 图 11-12 Mallory 三色染色。图 11 为正常组,图 12 为模型组,△示关节软骨,☆示软骨下骨,⇨示胶原纤维
Fig. 1-2 HE staining. Fig.1 control group, Fig.2 model group, △ cartilage, ☆ subchondral, ⇨ Chondrocytes;
Fig. 3-4 Safranin-fast green staining. Fig.3 control group, Fig.4 model group, △ cartilage, ☆ subchondral, ⇨ tideline;
Fig. 5-6 AB-PAS staining. Fig.5 control group, Fig.6 model group, ⇨ acidic glycosaminoglycan, ⇨ neutral glycosaminoglycan, ☆ subchondral;
Fig. 7-8 toluidine blue staining. Fig. 7 control group, Fig.8 model group, ⇨ acidic glycosaminoglycan, ☆ subchondral;
Fig. 9-10 VG staining. Fig.9 control group, Fig.10 model group, △ cartilage, ☆ subchondral, ⇨ Collagen fibers;
Fig. 11-12 Mallory staining. Fig.11 control group Fig.12 model group, △ cartilage, ☆ subchondral, ⇨ Collagen fibers