

·诊疗技术·

椎间盘组织冷冻切片制作技术的应用

吴 喆,王 栋,李 静,赵成相

(空军军医大学西京医院骨科研究所,陕西 西安 710032)

摘要:目的 探讨椎间盘组织冷冻切片在椎间盘退变相关研究中的优势。方法 选取12周龄大鼠尾椎作为椎间盘样本来源,通过48 h的4%多聚甲醛固定和4周10%EDTA脱钙液脱钙处理后,行蔗糖梯度脱水以及OCT包埋切片。对切片进行组织学染色和免疫荧光染色。结果 HE染色和番红O染色切片显示,椎间盘结构完整,整个髓核组织清晰可见,纤维环的结构相对完整,软骨终板的软骨样结构和椎体的骨性结构区分明显;HE染色和番红O染色切片显示,椎间盘结构完整,整个髓核组织清晰可见,纤维环的结构相对完整,软骨终板的软骨样结构和椎体的骨性结构区分明显。结论 不论是常见的化学染色还是免疫荧光染色,冷冻切片均显示出对椎间盘组织较好的染色效果,但冷冻切片在椎间盘退变的基础研究中具有显著的优势。

关键词:椎间盘组织;冷冻切片;染色**中图分类号:**Q2;R681.5+3**文献标识码:**A**DOI:**10.3969/j.issn.1006-1959.2021.14.049**文章编号:**1006-1959(2021)14-0172-03

Application of Frozen Section Technology of Intervertebral Disc Tissue

WU Jie,WANG Dong,LI Jing,ZHAO Cheng-xiang

(Institute of Orthopedics,Xijing Hospital,Air Force Military Medical University,Xi'an 710032, Shaanxi,China)

Abstract: Objective To explore the advantages of frozen section of intervertebral disc tissue in the research of intervertebral disc degeneration.

Methods The caudal vertebrae of 12-week-old rats were selected as the source of intervertebral disc samples. After 48 h of 4% paraformaldehyde fixation and 4 weeks of 10% EDTA decalcification treatment, sucrose gradient dehydration and OCT embedded sections were performed. Histological staining and immunofluorescence staining were performed on the sections. **Results** HE staining and safranin O staining showed that the structure of the intervertebral disc was complete, the whole nucleus pulposus tissue was clear, the structure of the annulus fibrosus was relatively complete, and the cartilage like structure of the cartilage endplate and the bone structure of the vertebral body were obviously distinguished; He staining and safranin O staining showed that the structure of intervertebral disc was complete, the whole nucleus pulposus tissue was clear, the structure of annulus fibrosus was relatively complete, and the cartilage like structure of cartilage endplate and bone structure of vertebral body were obviously distinguished. **Conclusion** No matter common chemical staining or immunofluorescence staining, frozen sections show good staining effect on intervertebral disc tissue, but frozen sections have significant advantages in basic research of intervertebral disc degeneration.

Key words: Intervertebral disc tissue; Frozen section; Staining

含有钙盐的组织是一种坚硬的结缔组织,如骨组织,其基质中含有大量固定的无机盐,必须脱钙除去骨盐才可进行冷冻切片和石蜡切片,因此在制作病理切片过程中,常常需要经过脱钙处理,才能进行切片染色^[1]。而选择合适的切片法至关重要,常规石蜡包埋切片,制作过程时间长,在制作过程中要经过酒精、二甲苯和包埋剂有机溶剂处理,对组织抗原有一定的损害及遮蔽,使组织内抗原活性发生改变。脱钙稍不彻底,部分标本切片出现“返砂”现象,易出现“刀痕”,水浴锅摊片过程易散烂。冷冻切片操作快捷,染色过程简便,还可以保存组织内可溶性物质,防止蛋白变性和酶的失活,从而减少了抗原的丢失。近年来的研究对椎间盘退变的机制研究更加深入,不仅要求有常规的组织结构化学染色,更要保留组织的免疫原性,因此冷冻切片的优势非常适合应用到研究椎间盘的过程。下面我们将

对椎间盘骨组织进行冷冻切片具体操作过程进行深入探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 标本来自空军军医大学西京医院骨科动物实验中心提供的大鼠。取大鼠尾椎标本,在4%多聚甲醛固定液(Beyotime, P0099)固定48 h,投入10%EDTA脱钙液(西安赫特生物科技公司)中,置于阴凉通风处中持续脱钙。仪器:恒温式冷冻切片机(德国Leica, M1850)。试剂:OCT冷冻切片包埋剂,蔗糖。

1.2 方法 脱钙及脱钙终点标本用脱钙液在常温通风下进行脱钙,每间隔3 d更换1次脱钙液,当用手术缝针轻松无阻力穿过组织或可用手术刀轻力切开即为脱钙完成。流水冲洗30 min后,投入30%蔗糖溶液中脱水,蔗糖会逐渐渗透入细胞间,并增加组织的比重,所以组织间隙被蔗糖填充后一定会沉底的,将其取出,并用滤纸吸去多余液体。利用高渗蔗糖溶液是减少组织含水量,降低冷冻切片时组织中冰晶的产生。

作者简介:吴喆(1975.5-),女,陕西西安人,专科,主管技师,主要从事骨科病理诊断研究

1.3 切片 ①先将冷冻切片机冷台启动预冷,切片时,冷冻室温度在 $-18^{\circ}\text{C}\sim-22^{\circ}\text{C}$;②将椎体组织切成大小适宜的组织块;③滴加少许 OCT 包埋液在组织托上,待冷冻后修平,将组织放置于修平的面上,用 OCT 液包埋,置于冷台上冷冻 $5\sim 10\text{ min}$;④冷冻切片厚度为 $6\sim 8\text{ }\mu\text{m}$,直接贴于挂胶载玻片上。

1.4 染色

1.4.1 HE 染色 使用苏木素伊红(HE)染色试剂盒染色。冷冻切片 PBS 润洗,入苏木精染液 3 min ,水洗 2 min ,用 1% 盐酸乙醇分化 15 s ,水洗 2 min ,稀氨水返蓝 1 min ,水洗 2 min , 80% 乙醇 1 min ,伊红 2 min ,水洗 1 min ,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树胶封片。

1.4.2 番红 O 染色(safranin o stain) 索莱宝公司改良番红 O-固绿软骨染色试剂盒染色。切片水洗,Weigert 染液染色 3 min ,流水冲洗 1 min 。酸性分化液分化 5 s ,水洗 10 min ,固绿染色 5 min ,弱酸洗涤 10 s ,滴加 Safranin O 染液内浸染 5 min 。 95% 酒精,无水酒精脱水,二甲苯透明,树胶封片。

1.4.3 免疫荧光染色 从冰箱取出切片,在室温下进行复温。使用 PBS 清洗 2 遍 ;用免疫染色强力通透液打孔 15 min ,PBS 清洗 3 次 ;封闭液封闭,室温孵育 30 min ,倾去勿洗,滴加适当比例稀释的一抗(Agreacan,髓核细胞细胞外基质的主要成分之一,Millipore 公司,AB1031,使用 $1:100$ 稀释), 4°C 过夜,PBS 清洗;滴加一定比例稀释的荧光标记的二抗(本例选取了 $1:200$ 的 FITC 标记的抗兔二抗), 37°C 避光孵育 1 h ,PBS 清洗 3 遍 ;用含 DAPI 封片剂封片,荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 HE 染色和番红 O 染色 HE 染色和番红 O 染色切片显示,椎间盘结构完整,整个髓核组织清晰可见,纤维环的结构相对完整,软骨终板的软骨样结构和椎体的骨性结构区分明显,见图 1、图 2。

2.2 免疫荧光染色 结果显示,椎间盘组织的免疫原性保存较好,抗体着色均匀,特异性较强,见图 3。不论是常见的化学染色还是免疫荧光染色,冷冻切片均显示出对椎间盘组织较好的染色效果。

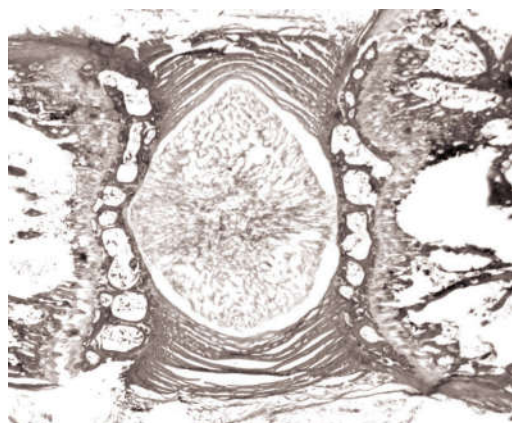


图 1 HE 染色

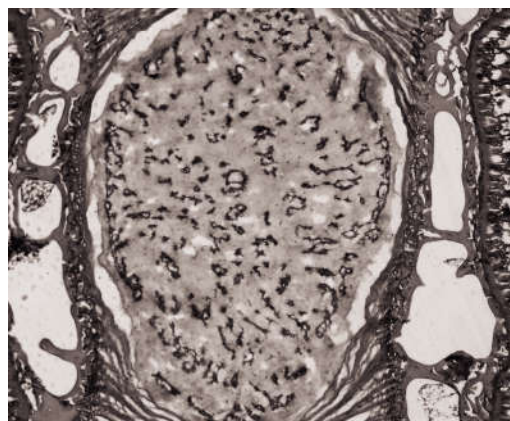
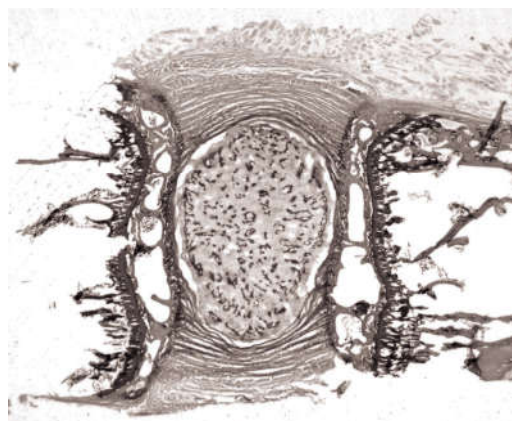


图 2 番红 O 染色

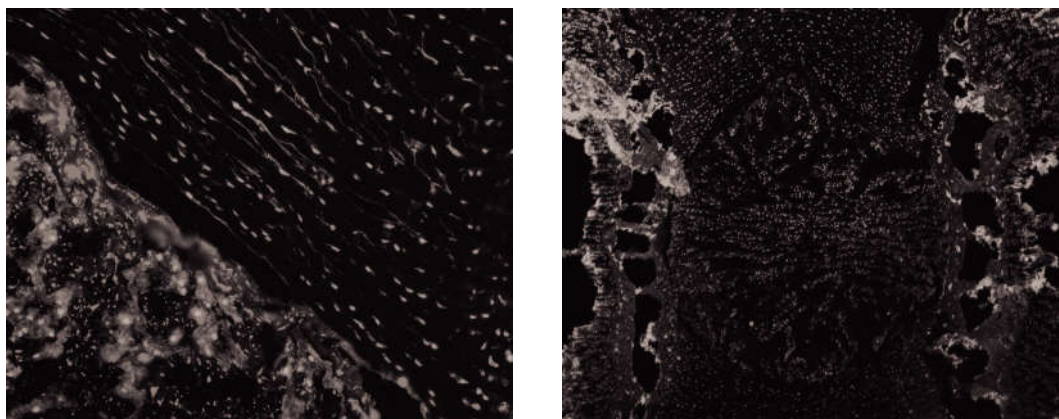


图3 免疫荧光

3 讨论

脱钙是利用化学或物理方法,将骨组织中的钙盐和胶原纤维进行分离“除去钙盐”,使骨组织软化,目的是获得完整的骨切片。选择脱钙液是制作骨切片的重要环节,即要切出完整的切片,又要能完整的保存骨组织内部成分的完整性。对组织内的酶、抗原都有一定保护作用。否则脱钙过度或不足会影响染色效果,严重影响结果的判读。固定和脱钙的时间不宜过长,且尽量保持在相对阴冷的环境中,避免组织免疫活性的丧失^[2,3]。脱钙时间过短,容易造成切片过程中椎间盘髓核和纤维环的组织结构分离和纤维环层状结构的破坏,在研究椎间盘退变过程中,容易和纤维环穿刺退变模型引起的纤维环结构破坏相混淆。冷冻切片是一种借助低温环境,使组织在短时间内达到一定硬度而进行切片的方法。由于冷冻切片比石蜡切片相对省时且能较好地保护抗原活性,在科学研究中,特别是在进行免疫组化和免疫荧光染色实验比较适用。

本实验中椎间盘骨组织通过冷冻切片法,制作能够较好地保存细胞抗原的活性,并最大程度的保留了椎间盘的组织结构。在操作的过程中减少了对组织脱水、包埋等中间环节,在科研实验的免疫组化染色中的应用中有着不可取代的地位,因此在科研以及临床工作中的应用较为广泛。同时,冷冻切片的容错率较高,可以对短时间内脱钙的样本进行试切,如脱钙不彻底,其余组样本可以从脱水状态再次进入脱钙液中,相较于石蜡切片方法更为简便。本例中外层的纤维环外围有轻微的损坏,而大部分外层纤维环内层纤维环和髓核结构保留非常完整,尤其是纤维环的板层结构和纤维走行非常清晰,判断主要原因是组织取材固定前,对周围软组织剥离过多造成的物理损伤,并非是切片过程中产生的误差。因此,在以后的大鼠椎间盘取材过程中,尽量保持组织结构的完整性,不能为达到快速脱钙的目的而过

度剥离外周组织^[4,5]。

在整个制作过程中应注意以下几点:①取材时刀片要锋利,组织块不易过长;②脱钙液要充足,一般为标本体积的20倍,3 d换1次脱钙液,脱钙时将瓶口不要盖严,在通风处放置,缩短脱钙时间;③切片时温度很重要,温度过低容易导致组织过硬,切片易碎,温度过高则由于组织硬度不够,切片不成形,产生搓板状或粉末状;④切片时刀要锋利,最好是一次性刀片,不要有划痕;⑤染色时特点注意水洗步骤,流水冲洗时不要对着组织冲洗,以免脱片^[6-8]。

综上所述,通过本实验说明冰冻切片在研究椎间盘相关课题的应用中有很好的应用前景,在最大保留抗原性的同时也极好的保护了组织结构的完整性,对未来椎间盘相关实验的组织切片选择提供了指导意义。

参考文献:

- [1]吴括,孙立国,赵成相,等.混合脱钙液与EDTA脱钙液对骨组织切片HE染色影响的分析[J].临床医学,2017,30(26):180-101.
- [2]杨洋,姚羽,沈孝天,等.退变腰椎间盘中白细胞介素21的表达及意义[J].中国组织工程研究,2021,25(5):690-694.
- [3]郭雪彬.影响腰椎间盘突出症经皮椎间孔镜治疗疗效的多因素Logistic分析[J].四川解剖学杂志,2020,28(4):80-81.
- [4]黄小雨,仲欢欢,付琳琳,等.固定组织的冰冻切片技术探讨[J].山西医科大学学报,2018,49(8):988-990.
- [5]林明华.富含脂肪的组织冰冻切片制作要点[J].临床合理用药,2019,12(12):184-188.
- [6]吴括,李宏国,孙立国,等.冷冻切片法在蚕丝材料组织学中的应用[J].临床与实验病理学杂志,2016,32(1):1321-1322.
- [7]王爽.快速冷冻切片法的改进[J].第四军医大学吉林军医学院学报,2002,24(1):30.
- [8]王秀萍.冰冻切片制作中时间和温度的控制[J].医学综述,2013,11(22):4213-4214.

收稿日期:2020-12-28;修回日期:2021-01-15

编辑/宋伟