

人类不脱钙骨组织的免疫组化与原位杂交

李朵 魏启幼 袁凌青 蒋谊 肖新华 戴如春 廖二元

摘要:目的 探讨在人类不脱钙骨组织切片上行免疫组化和原位杂交技术的可行性。方法 采用 Erben 报道的改进的甲基丙烯酸甲酯低温塑料包埋方法包埋人类髌骨活检组织,制备不脱钙骨组织切片。切片行 Goldner's 三色法及甲苯胺蓝染色观察骨组织的形态结构;采用免疫组化 S-P 法和原位杂交技术检测骨组织中碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)蛋白和 mRNA 的表达。结果 组织形态学上,两种染色法均示骨组织中成骨细胞、破骨细胞及骨细胞清晰可辨,钙化的骨基质与类骨质分界清楚。免疫组化和原位杂交示 FGF-2 蛋白和 mRNA 表达于骨髓腔中一些单个核细胞及少许成骨细胞的胞浆中。此外,骨髓基质亦可见 FGF-2 蛋白和 mRNA 的阳性表达。结论 低温塑料包埋方法制备的人类不脱钙骨组织切片可同时进行免疫组化和原位杂交的检测观察。

关键词: 甲基丙烯酸甲酯;不脱钙骨组织;免疫组织化学;原位杂交;人类

Immunohistochemistry and in situ hybridization technique for undecalcified bone sections of human LI Duo, WEI Qiyu, YUAN Lingqing, et al. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: **Objective** To explore the feasibility of applying immunohistochemistry(IH)and in situ hybridization (ISH)technique to the undecalcified bone sections of human. **Methods** Two iliac crest biopsies were embedded with the methylmethacrylate(MMA)low-temperature plastic embedding method reported by Erben and then made into undecalcified sections. These sections were observed in morphology by Goldner's Masson Trichrome staining and toluidine blue staining. FGF-2 protein and mRNA in the bone sections were detected by IH and ISH. **Results** Both Goldner's Masson Trichrome staining and toluidine blue staining showed the cells in bone tissue such as osteoblast, osteoclast and osteocyte were clearly seen, and osteoid were easily distinguished from mature bone tissue. The positive signals of FGF-2 protein and mRNA were found in the cytoplasm of some mononuclear cells in the bone marrow and osteoblast, the matrix in the bone marrow was positively stained, too. **Conclusions** The undecalcified bone sections of human made in the method can satisfy the need of IH and ISH.

Key words: Methylmethacrylate; Undecalcified bone tissue; Human; Immunohistochemistry; In situ hybridization

不脱钙骨组织能良好地保存骨小梁的结构,正确反映骨生长与矿化方面的信息而具有了脱钙骨组织无法比拟的优越性,但因其对抗原保存性差,所以用不脱钙骨组织切片行免疫组化与原位杂交有一定的难度。目前,用大鼠不脱钙骨组织行免疫组化与原位杂交已获得了成功,但国内,人类或大动物的不脱钙骨组织行免疫组化与原位杂交却仍是空白。本实验室对人类的髌骨进行了低温塑料包埋,制得不脱钙骨组织切片后行免疫组化与原位杂交取得了成

功。

1 材料和方法

1.1 实验标本

2 块松质骨组织:一块取自一 36 岁男性患者的髌骨(骨软化症患者,行髌骨活检);另一块取自一 48 岁男性患者的髌骨(第 7 颈椎骨折,需髌骨植骨)。以上均经患者本人同意。

1.2 试剂与器材

主要试剂包括甲基丙烯酸甲酯(methylmethacrylate),甲基丙烯酸丁酯(butylmethacrylate),苯甲酸甲酯(methylbenzoate),过氧化苯甲酰(均自天津博迪化工厂);甲苯胺蓝(中国医药厂);N,N-二甲基-对-苯

作者单位:410011 长沙,中南大学湘雅二医院病理科(李朵、魏启幼、蒋谊);内分泌研究所(袁凌青、肖新华、戴如春、廖二元)

通讯作者:廖二元,Email:lyliao2003@zlcu.com

甲胺 (*N,N*-dimethyl-*p*-toluidine), 聚乙二醇 400 (polyethylene glycol 400), 亮绿黄 SF, 丽春红反二甲代苯胺和橙黄 G (均自 sigma 公司); FGF-2 兔抗多克隆抗体 (Santa Cruz 产品, 北京中杉分装); S-P 即用型免疫组化试剂盒 (福建迈新); FGF-2 原位杂交试剂盒 (武汉博士德公司)。主要仪器有 HM 360 重型切片机 (Zeiss 公司德国) 和磁力搅拌器。

1.3 取材与包埋

取大小约 0.5cm × 0.5cm × 0.5cm 的新鲜骨组织, 迅速置于 4% 多聚甲醛溶液 (用 0.1 mol/L PBS 配制, pH 7.4, 含 0.1% DEPC) 中固定 24 h, 其后在 0.1 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4, 含 10% 蔗糖) 浸洗 12 h。脱水程序为 70% 乙醇 2 d, 95% 乙醇 2 d, 异丙醇 1 d × 2 次, 二甲苯 2 d × 2 次。接着, 标本依次在塑料聚合液 I 液、II 液、III 液中各浸润 3 d。其中 100 mL I 液: 60 mL 甲基丙稀酸甲酯 + 35 mL 甲基丙稀酸丁酯 + 5 mL 苯甲酸甲酯 + 1.2 mL 聚乙二醇 400; 100 mL II 液: 100 mL I 液 + 0.4 g 干燥过氧化苯甲酰; 100 mL III 液: 100 mL I 液 + 0.8g 干燥过氧化苯甲酰。以上固定、脱水和浸润过程均在 4℃ 进行。在此过程中, 还需准备瓶底, 将 600 μL *N,N*-二甲基-对-苯甲胺加入到 100 mL 预冷 (4℃) III 液中, 用磁力搅拌器搅拌数分钟后, 分别倒入 20 mL 玻璃包埋瓶中, 每瓶约 5 mL 左右, 用 CO₂ 排空包埋瓶中氧气, 盖紧瓶塞, 置 4℃ 聚合 1 d。最后, 将 400 μL *N,N*-二甲基-对-苯甲胺加入到 100 mL 预冷 (4℃) III 液中, 用磁力搅拌器搅拌数分钟后, 迅速倒入做好瓶底的玻璃包埋瓶中, 放入骨标本, 用 CO₂ 排空包埋瓶中氧气, 盖紧瓶塞后, 置于 -20℃ 中低温聚合 3 d。

1.4 切片与脱塑

用磨轮机将组织修块成 1.5 cm × 1.5 cm × 2.0 cm 大小, 暴露骨组织面。重型切片机沿骨组织面非连续切片, 普通切片厚 4 μm。切片贴附于明胶-铬矾处理过的载玻片, 上面再加置一玻片, 两玻片用塑料薄膜隔开。置 42℃ 烤片 48 h, 其后于乙二醇甲醚乙酸酯 (2-methoxyethylacetate) 中脱塑 20 min × 3 次, 丙酮 5 min × 2 次, 蒸馏水水化 5 min × 2 次。

1.5 形态学观察

1.5.1 Goldner's Masson Trichrome 染色 (以下简称 Goldner 三色法): 脱塑水化后的切片在 1:1 的苏木素与氯化铁混合染液中染色 7 min, 温自来水冲洗 2 次; 1% 丽春红-酸性品红染液中染色 5 min, 1% 乙酸冲洗; 1% 磷钼酸中分化 6 min, 1% 乙酸冲洗; 0.1% 亮绿黄 SF 染色 2 min, 1% 乙酸冲洗。室温干

燥后中性树胶封固^[1]。

1.5.2 甲苯胺蓝染色: 脱塑水化后的切片在 1% 的甲苯胺蓝中染色 20 min, 自来水冲洗 5 min, 96% 乙醇 5 ~ 10 s, 100% 乙醇 3 min × 2 次, 二甲苯中 30 min, 中性树胶封固^[2]。

1.6 免疫组化染色

切片脱塑水化, 用 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶活性后, 蒸馏水洗, 0.4% 胃蛋白酶 K 37℃ 消化 15 min, 0.1 mol/L PBS 洗; 非免疫山羊血清封闭 10 min, 其后滴加兔抗 FGF-2 稀释度 1:50 多克隆抗体 50 μL, 4℃ 孵育过夜。然后 PBS 洗, 滴加生物素化的山羊抗兔 IgG (二抗) 室温下孵育 10 min, PBS 洗; 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液室温下孵育 10 min, PBS 洗; AEC 显色 5 ~ 10 min, 苏木素轻度复染, 水溶性封片剂封片。用结肠癌组织作阳性对照, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.7 原位杂交

切片脱塑水化, 用 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶活性, 蒸馏水洗, 滴加 3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶 37℃ 消化 15 min, 原位杂交用 PBS 洗; 1% 多聚甲醛 (0.1 mol/L PBS 配制, pH 7.4, 含 0.1% DEPC) 室温固定 10 min, 蒸馏水洗; 加入 20 μL 的预杂交液于 38℃ 孵育 3 h, 吸取多余液体后, 再滴加 20 μL FGF-2 杂交探针液于 38℃ 杂交过夜, 其探针序列: 5' GGCTTCTTCC TGCGC ATCCA CCCC G ACGGC 3'; 5' AGCAG AAGAG AGAGG AGTTG TGTCT ATCAA 3'; 5' TCGAA TCTAA TAACT ACAAT ACTTA CCGGT 3'。其后依次经 2 × SSC, 0.5 × SSC, 0.2 × SSC 洗涤。滴加封闭液 37℃ 30 min, 采用试剂盒中地高辛显色系统进行信号检测。AEC 显色 5 ~ 10 min, 苏木素轻度复染, 水溶性封片剂封片。以结肠癌组织作阳性对照, 用预杂交液代替杂交液作阴性对照。

2 结果

2.1 形态学观察

2.1.1 Goldner 三色法染色: 三色法染色示骨组织结构清晰, 对比鲜明。其中, 骨小梁中成熟钙化的骨组织染为绿色, 类骨质染为鲜红色, 位于骨小梁的边缘。成骨细胞与破骨细胞胞浆呈橘黄色, 胞核染色棕褐, 骨细胞位于骨小梁中, 胞浆红染 (图 1)。

2.1.2 甲苯胺蓝染色: 甲苯胺蓝染色示成熟的骨小梁染为淡蓝色或不着色, 类骨质染为亮蓝色, 成骨细胞、破骨细胞与骨细胞呈蓝色 (图 2)。

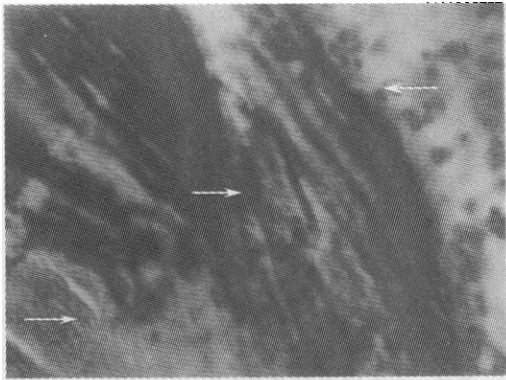


图1 三色法染色(x200)

(注: ↑代表钙化的骨组织; ↑代表类骨质; ↑代表成骨细胞; ↑代表骨细胞)

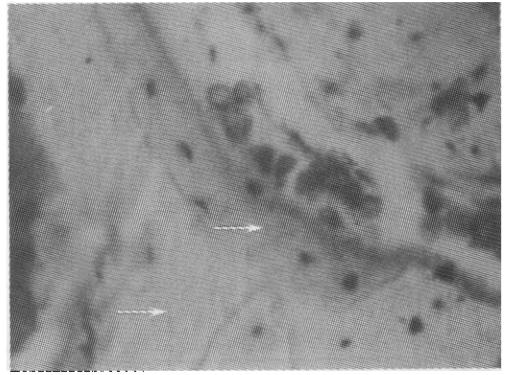


图2 甲苯胺蓝染色(x200)

2.2 免疫组化染色与原位杂交

FGF-2蛋白的阳性信号呈红色,表达于骨髓内部分单个核细胞及少许成骨细胞的胞浆,骨髓内基质也可见阳性表达(图3); FGF-2 mRNA和 FGF-2蛋白的阳性表达一致(图4)。

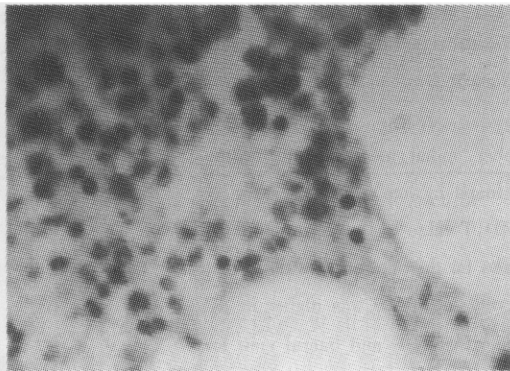


图3 FGF-2蛋白在部分骨髓细胞胞浆呈阳性表达(x400)

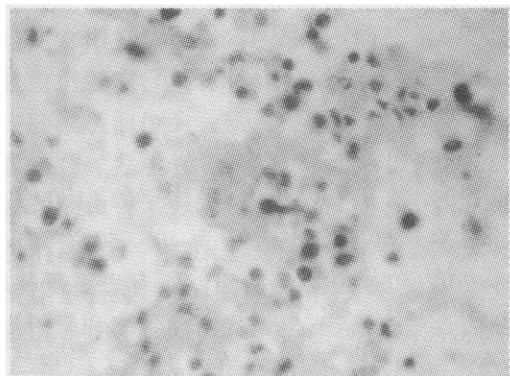


图4 FGF-2 mRNA在部分骨髓细胞胞浆呈阳性表达(x400)

3 讨论

制备不脱钙骨组织切片,关键在于对骨组织进行不脱钙包埋。不脱钙包埋最大的特点是用塑料包埋液代替石蜡做包埋介质。塑料包埋液的主要成分

为甲基丙烯酸甲酯,其聚合后硬度与骨组织相当,利于切片。但它在聚合过程中放出的大量热量,却常常破坏组织中的酶及抗原活性,所以免疫组化难以成功。1997年,Erben^[3]报道了一种改良的不脱钙骨组织包埋方法,该法的固定和脱水均在4℃环境中进行,聚合反应则置于-20℃,最大程度地抑制了聚合过程中的产热效应,避免了高温对抗原的破坏作用,提高了免疫组化的敏感性。2003年,蒋谊等^[4]用该法包埋大鼠骨组织,行免疫组化与原位杂交获得了成功。但至今为止,该法都还没有应用于人骨组织的报道。

在本实验中,我们用该法对人类的髌骨组织进行了低温塑料包埋,结果显示在形态学方面,无论是三色法还是甲苯胺蓝染色,骨组织各成分都清晰可辨,成熟矿化的骨基质与类骨质分界清楚,这不仅有助于形态学观察,更是正确的组织形态学计量的前提。

免疫组化与原位杂交也取得了很好的效果。本实验显示在少数成骨细胞及骨髓腔内一些单个核细胞的胞浆, FGF-2蛋白与 mRNA均有阳性表达,髓腔内部分基质亦呈阳性表达。FGF-2是体内最重要的调节骨代谢的生长因子之一,可由成骨细胞、骨髓基质细胞等分泌,储存于细胞外基质中,通过受体介导以自分泌/旁分泌方式起作用。

相对于大鼠等小动物组织,人类骨组织的骨小梁要粗,骨小梁间隙宽,钙化程度更重。这些特点使得骨组织在塑料介质中分布较散,一方面有利于切片,另一方面,却是脱塑后更易掉片。所以,在实验过程中,需要注意如下几点:①取材不宜太小,据作者经验,以0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm左右为宜。因在固定的过程中,组织难免会有点胀大变形,而且组

(下转第112页)

(上接第 161 页)

组织越小,这种影响就越大,年龄较大人群的骨组织,多半都有骨质疏松,再加上这种影响,就会使骨小梁分布更散,不仅易掉片,而且不利于结果的判断(边缘反应)。

②抗原修复首选酶消化。骨组织由于其本身的结构特点(骨基质多,骨细胞少)很容易掉片,人类骨组织更甚。如选择高温高压或微波等热修复,掉片现象就会更加严重,有时甚至全部掉光。而酶修复是静置的,它避免了热修复时沸水对组织的冲击力,所以掉片很少。故骨组织行免疫组化时,只要抗体允许,首推酶修复。

③人类骨组织更易掉片,所以建议在实验的整个过程中,动作都要轻柔,玻片要轻拿轻放,冲洗时更应注意。

④聚合后的塑料组织块一定要置于 -20°C 保存,只有这样,它原有的湿度与硬度才能得以保持。室温放置过久,组织块会变脆易碎,难以切片。

最后,值得一提的是,除了髂骨,我们用该方法包埋人类的股骨头与椎骨,也获得了免疫组化与原位杂交的成功。所以,无论是大鼠等小动物还是

人类,都能用低温塑料包埋方法制备的不脱钙骨组织切片行免疫组化和原位杂交,这将为代谢性骨病的临床病理学研究提供更好的技术支持。

【参 考 文 献】

- [1] Cnuber Helen E. Adaptation of Goldner's Masson Trichrome stain for the study of undecalcified plastic embedded bone. *Biotechnic Histochemistry*, 1992, 67: 30-34.
- [2] Yang R, Davies CM, Archer CW, et al. Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 New-embedded undecalcified bone sections. *Eur Cell Mater*. 2003, 6: 57-71.
- [3] Erben RG. Embedding of Bone Samples in Methylmethacrylate: An Improved Method Suitable for Bone Histomorphometry, Histochemistry, and Immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 1997, 45: 307-313.
- [4] JIANG Yi, LIAO Eryuan, DAI Ruchun, et al. Effect of 17- β estradiol on expression of interstitial collagenases and tissue inhibitor of metalloproteinase in osteoblasts of ovariectomized rat model. *Chin J Osteoporos*, 2004, 10: 129-134. (In Chinese).

(收稿日期: 2005-04-05)