DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.031
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)01-0077-02

技术方法

EDTA微波脱钙骨的免疫组化染色

Immunohistochemical staining of EDTA microwave decalcification bone

刘大维[1],初同伟[2],张 良[1],邱 俊[1] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042;[2]附属新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要:目的 改进传统骨组织的脱钙方法,改善免疫组化效果。方法 采用20%EDTA微波脱钙法对兔骨组织进行脱钙。结果 EDTA微波脱钙法能够更好的保持骨组织结构和组织中的抗原物质,得到更好的免疫组化切片。结论 EDTA微波脱钙法优于传统脱钙法,更适合于骨组织脱钙和免疫组化制片。

在病理技术中,骨组织的脱钙处理是一大技术难点,因而要顺利制出一张质量较佳的骨组织切片,特别是做出一张质量上乘的免疫组化的骨组织切片,并非易事。传统的脱钙方法,多采用酸性溶液,极易使组织酸化,影响细胞核着色,且时间较长,对组织有一定的破坏性,从而影响病理学的诊断和研究。作者查阅了有关中外文献,结合自己的实际工作情况,不断摸索,积累了一定的经验,现就骨组织脱钙与免疫组化方法简述如下。

1 材料与方法

1.1 材料

健康大耳白兔42只,体重2.5~30 kg(附属大坪医院野战外科研究所动物中心提供)。3%的戊巴比妥钠耳静脉麻醉(30 mg/kg),无菌条件下,环形切断桡骨中断骨膜,用牙科磨钻于局部横行离断桡骨。确定应用血管内皮生长因子(VEGF)对骨折愈合的作用;了解VEGF及其受体在骨折愈合过程中的表达及规律。伤后3周,将动物按各时相点断颈处死,迅速取下兔左上肢置于冰盒上,以桡骨骨折端为中心切取骨折端标本全长约1.5 cm。将冷冻切片标本置于4%多聚甲醛中固定4~6 h,取出后在20%EDTA溶液中微波下脱钙[1~3],完成后标本置于-70℃保存备用;制作石蜡切片标本放入12%甲醛中固定24 h后移入20%EDTA溶液中微波下脱钙。EDTA由成都化学试剂厂生产。

1.2 脱钙液的配制

EDTA(乙二胺四乙酸二钠)20 g,双蒸水100 ml,加NaOH充分搅拌溶解后,用1 mol/L HCl调pH至7.3~7.5(pH 7.5时EDTA较易溶解)。

1.3 脱钙方法

将1.5 cm×1 cm×0.5 cm的骨组织放入微波炉专用盒,根据组织的多少放入适量的脱钙液,在微波下50℃间歇脱钙,以每次辐射2 min为一脱钙循环,经过反复筛选以30个脱钙循环为最佳脱钙终点。在2个循环之间将标本盒取出微波炉外,室温冷却5 min,以保证每次辐射中脱钙液温度不高于70℃[4]。常规骨组织脱钙多采用酸性溶液,对组织细胞有一定的破坏性,细胞核不易着色,也容易破坏抗原物质;而用EDTA脱钙液加微波辐射进行脱钙,不仅能完好保持组织的完整结构也能很好保存组织中的抗原物质。

1.4 免疫组织化学方法

骨组织固定、脱钙后,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、用美国产AO切片机将骨组织切成5 μm厚的连续切片,裱片后入常规烤片、脱蜡至水,一部分作HE染色,一部分按S-P(链霉菌抗生素蛋白过氧化物酶)法进行检测。步骤如下:(1)30%过氧化氢孵育15 min,清除内源性过氧化物酶的活性。(2)蒸馏水冲洗,0.01 mol/L PBS浸泡5 min×3次。(3)滴加1%胃蛋白酶孵育10 min。(4)0.01 mol/L PBS浸泡5 min×3次。(5)5%正常山羊血清(PBS稀释)室温10 min。(6)倾去血清,滴加30 μl按一定倍数稀释的一抗(1∶200),4℃过液。(7)0.01 mol/L PBS浸泡5 min×3次。(8)滴加生物素标记的二抗(1∶150)30 μl,37℃孵育30 min。(9)0.01 mol/L PBS浸泡5 min×3次。(10)辣根酶标记的链霉卵白素(1∶150)30 μl,37℃孵育30 min。(11)0.01 mol/L PBS浸泡5 min×3次。(12)DAB显色5 min。(13)自来水充分水洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,DPX封片。

2 结果

脱钙时间:EDTA脱钙液中的骨组织在微波炉辐射下需要约30个脱钙循环(每个脱钙循环2 min),即每天微波下脱钙总计约1 h,5 d后骨组织脱钙完毕,以针灸用体针能顺利刺入骨组织为脱钙终点。制片质量:脱钙后的骨组织均能切出较好的连续切片。骨折端切片连接很好,无裂开、破碎现象。镜下观察:HE骨细胞,软骨细胞、特别是骨折断端形成的骨痂以及骨

作者简介:刘大维(1957-),男,四川省安岳县人,高级实验师,主要从事野战外科病理方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68757434

收稿日期:2001-12-25;修回日期:2002-07-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

折后破骨细胞在髓腔侧的聚集与骨的重建等组织细胞的形态结构染色很清晰，见图 1。细胞核和细胞质色彩鲜艳，对比度强，核染色质显示清楚。免疫组织化学染色能理想的显示抗原物质，VGEF 免疫组化阳性反应物为棕黄色，见图 2，定位明确，组织切片背景干净。而采用酸性溶液脱钙，极易使组织酸化，影响细胞核着色，且时间较长，对组织有一定的破坏性，见图 3。

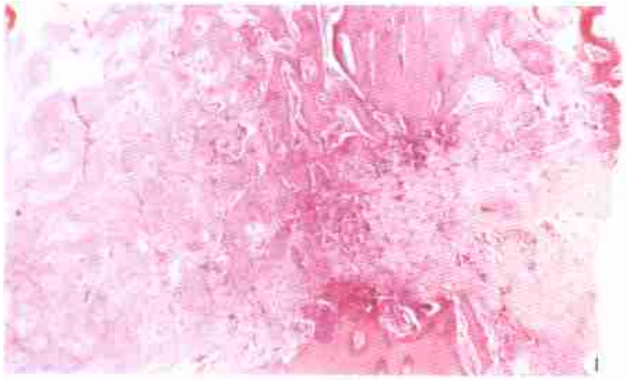




图 1 伤后 3 周应用 **VEGF** 组动物骨折端以幼稚的编制骨痂为主，夹杂少量的软骨骨痂 （HE× 100）

图 2 伤后 3 周在骨折端软骨内成骨区发生 **VEGFR-2/KDR/FLK1** 免疫组化染色呈阳性反应的软骨细胞 （DAB× 400）



图 3 正常骨组织采用酸性溶液脱钙后，组织被酸化，胞浆着色浓，胞核着色淡，对比度差，且对组织细胞有一定的损害 （HE× 200）

3 讨论

实验骨组织骨折端的切片制作，制片要求骨组织折断处修复后的连接面切面要完整，组织结构要清晰，能看清破骨细胞在髓腔侧参与骨重建和髓腔的再通。为此，我们查阅了大量中、外有关方面的文献，采用 EDTA 脱钙液加微波辐射进行脱钙，其脱钙效果及免疫组化染色观察蛋白抗原的保存，蛋白的提取，RNA 的提取效果均好，不但能够完好保持组织的完整结构，而且很好的保存组织中的抗原物质。常规骨组织脱钙技术多采用酸性溶液（硝酸、盐酸、甲酸等）极易使组织酸化，组织细胞的形态结构很难保持完整清晰，细胞核不易着色，对比度差。另外，强酸在溶解骨组织钙盐的同时，也容易破坏抗原物质，使骨组织中的蛋白质抗原不能很好的得到保存。EDTA 是一种优良的脱钙螯合剂，它的脱钙作用优于酸性溶液，对组织破坏极小，能保持组织细胞的完整结构，尤其细胞显微化学改变甚微，能保存组织中的抗原物质和某些酶类的活性。不硬化组织，易切片，染色效果好，从而更进一步地保证了实验结果的精确性。

在微波脱钙过程中，应注意以下几点：①组织先固定或脱钙与固定同时进行的原则，这样可加快脱钙的速度，良好地保存骨组织中的蛋白抗原。②保持足量的脱钙液，一般不少于标本体积的 20 倍，并根据组织脱钙程度，随时更换新液。③严格控制微波辐射的时间和温度，我们经多次实验探索认为脱钙温度，应保持在 55～65 ℃，每次脱钙时间 2～5 min 为宜。

关键词：EDTA；骨；免疫组化

中图法分类号：R446.61 文献标识码：B

参考文献：

[1] Kaneko M, Tomita T, Nakase T, *et al*. Rapid decalcification using microwaves for in situ hybridization in skeletal tissues[J]. Biotech Histochem, 1999, 74(1): 49－54

[2] 邓永江，丁华野，田玉旺，等. 脱钙液在微波辐射下对骨组织作用效果及免疫组织化学染色的影响[J]. 中华病理学杂志，1999，28(2)：136－137.

[3] 申姜颖，李 伟，黄庆玉，等. 微波辐射下螯合剂脱钙技术在骨大切片制作中的应用[J]. 中华病理学杂志，2000，29(6)：466－467.

[3] 张绍渤，钱均琪，黄受方. 微波技术在病理学中的应用[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册，1992，12(1)：15－17.

（编辑 郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net