

犬下颌牵张成骨不同时期六种染色方法的应用效果比较

赵真辰, 蒋伟东, 石恒蕾, 黄旋平, 周 诺

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号:82071098,81870748); 南宁市青秀区科技计划项目(编号:2021004)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学口腔医学院, 广西口腔颌面修复与重建研究自治区级重点实验室, 广西颅颌面畸形临床医学研究中心, 广西医科大学颌面外科疾病诊治研究重点实验室(广西高校重点实验室), 广西壮族自治区健康委员会口腔感染性疾病防治重点实验室

作者简介: 赵真辰, 在读硕士研究生, 研究方向: 牵张成骨及正颌外科治疗。E-mail: 18652127997@163.com

通信作者: 周 诺, 医学博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 牵张成骨及正颌外科治疗。E-mail: gxzhouuo@sina.com

[摘要] **目的** 比较六种染色方法在犬下颌牵张成骨早期、中期、后期的染色效果, 为研究者选择合适的染色方法提供参考。**方法** 选用1岁雄性比格犬, 经麻醉后手术造模, 分别在牵张成骨早期、中期、后期行安乐死后取牵张成骨区组织, 脱钙切片后分别采用HE染色、Masson染色、亚甲基蓝-酸性品红染色、Von Kossa染色、改良茜素红S染色、改良番红O-固绿染色对切片进行染色, 分析比较染色效果。**结果** HE染色可观察牵张成骨区基础结构。Masson染色颜色对比鲜明, 结构清晰, 可以清晰地区分胶原纤维与肌纤维, 以及成熟骨质与新生骨质。改良番红O-固绿染色与亚甲基蓝-酸性品红染色在牵张成骨早期、中期的区分度不佳, 但在牵张成骨后期可清晰区分新生骨组织与成熟骨组织。Von Kossa染色和改良茜素红S染色因标本已脱钙而效果不佳。**结论** 对于牵张成骨区域的染色研究, Masson染色法在牵张成骨早期、中期、后期均有较好的染色效果。改良番红O-固绿染色和亚甲基蓝-酸性品红染色仅适用于牵张成骨后期。Von Kossa染色法和改良茜素红S染色法不适用于脱钙后的组织切片染色。

[关键词] 牵张成骨; 组织学染色; Masson染色

[中图分类号] R 331 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2022)04-0320-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2022.04.08

Comparison of application effects of six staining methods at different stages of mandibular distraction osteogenesis in beagles ZHAO Zhen-chen, JIANG Wei-dong, SHI Heng-lei, et al. Guangxi Medical University College of Stomatology, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To compare the staining effects of six staining methods at the early, middle and late stages of mandibular distraction osteogenesis in beagles, so as to provide reference for researchers to select the appropriate staining methods. **Methods** One-year-old male beagles were selected for surgical modeling after anesthesia. The tissues of the distraction osteogenesis area were taken respectively at the early, middle and late stages of distraction osteogenesis in beagles after euthanasia. After decalcification, the sections were stained by hematoxylin and eosin(HE) staining, Masson staining, methylene blue-acidic magenta staining, Von Kossa staining and modified alizarin red S staining, and modified safranin-O fast green staining, respectively, and the effects of staining were compared. **Results** HE staining could be used to observe the basic structure of the distraction osteogenesis area. The Masson staining showed sharp color contrast and clear structure, which could clearly distinguish collagen fibers from muscle fibers and mature bones from new bones. The modified safranin-O fast green staining and the methylene blue-acidic magenta staining were poorly differentiated at the early and middle stages of the distraction osteogenesis, but the two staining methods could clearly distinguished mature bones from new bones at the late stage of distraction osteogenesis. The Von Kossa staining and the modified alizarin red S staining were not very effective because the samples had been decalcified. **Conclusion** For the staining study of the distraction osteogenesis area, Masson staining has better staining effects at the early, middle

and late stages of distraction osteogenesis. The modified safranin-O fast green staining and the methylene blue-acidic magenta staining are only suitable for the late stage of distraction osteogenesis. The Von Kossa staining method and the modified alizarin red S staining method are not suitable for the staining of tissue sections after decalcification.

[Key words] Distraction osteogenesis; Histological stain; Masson staining

牵张成骨是一种截骨后通过机械应力缓慢牵开断端,从而在截断处两侧形成新骨的过程^[1]。牵张成骨在颅颌面畸形整复和骨缺损治疗等方面的作用非传统手术方法所能比拟。与自体骨移植、异体骨移植以及同种异体骨移植相比,牵张成骨无需植骨,神经血管并发症少,骨质增长较大,患者可以较早负重^[2-3]。然而,牵张成骨的作用机制尚未清楚。在该领域的研究中,研究人员试图通过不同的染色方法来阐明下颌牵张成骨的发育和再生生物学机制^[4-5]。牵张成骨是一个动态变化的过程,但在许多研究中,学者多只使用常规的 HE 染色和免疫组化染色方法来观察组织学变化,而并未对牵张成骨不同时期的组织变化特点进行观察。鉴此,本研究通过构建不同时期的牵张成骨动物模型,对骨组织染色中常使用的 6 种染色方法进行比较,旨在探讨不同牵张成骨时期中最适宜使用的染色方法,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用 1 岁雄性比格犬 6 只,购买并饲养于广西医科大学实验动物中心。本研究经广西医科大学动物保护与使用委员会批准(编号:202111004)。

1.2 实验试剂与仪器 HE 染色试剂盒(G1120,索莱宝),Masson 三色染色液(G1340,索莱宝),亚甲基蓝-酸性品红(DB0088,雷根生物),钙盐染色试剂盒(Von Kossa 法,G3282,索莱宝),钙盐染色液(改良茜素红 S 法,G3280,索莱宝),改良番红 O-固绿软骨染色液(G1371,索莱宝),旋转切片机(RM2255,德国徕卡),牙科高速涡轮机(日本 NSK 公司),中性树脂(G8590,索莱宝),倒置显微镜(Nikon,日本)。

1.3 下颌骨牵张成骨模型构建^[6] 通过肌肉注射盐酸赛拉嗪和腹腔注射戊巴比妥钠麻醉实验犬,然后在右侧下颌做切口,剥离皮下和肌肉层以及骨膜以暴露下颌骨体的侧面。在下颌第一、第二磨牙之间垂直于牙槽骨截骨,使用牵张器固定远端和近端。最后缝合下颌骨皮肤。于术后 7 d 开始,以 1 mm/d 的速度牵张,持续 7 d。在术后 14 d(牵张成骨早期)、28 d(牵张成骨中期)和 42 d(牵张成骨后期)^[7],分别对 6 只实验犬施行安乐死(静脉注射过量的戊巴

比妥钠),每期处死 2 只。应用牙科高速涡轮机对牵张成骨区组织进行切割取材,用 10% 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)脱钙 4 ~ 8 周,石蜡包埋,用旋转切片机切成 4 μm 切片。

1.4 染色方法

1.4.1 常规 HE 染色 石蜡切片经 3 次二甲苯脱蜡 10 min,梯度乙醇溶液脱水,苏木素染色 4 min,分化液分化 2 s,伊红染色 2 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明后用中性树脂封片。

1.4.2 Masson 染色 石蜡切片常规脱蜡至水,加入配制好的 Weigert 铁苏木素染色液染色 10 min,酸性乙醇分化液分化 5 s。切片用 Masson 蓝化液返蓝 5 min,水洗后用丽春红品红染色液染色 5 min。使用按试剂盒说明书配制的弱酸工作液洗 1 min 后以磷钼酸洗 1 min,再用弱酸工作液洗 1 min,直接放入苯胺蓝染色液染色 2 min,封片。

1.4.3 亚甲基蓝-酸性品红染色 切片脱蜡至水后,用 65 $^{\circ}\text{C}$ 亚甲基蓝染色 60 min,水洗后酸性品红染色液染色 20 min,封片。

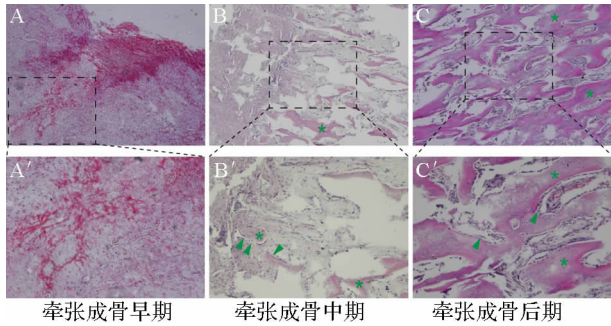
1.4.4 Von Kossa 染色 切片脱蜡脱水,滴加 Von Kossa 硝酸银溶液,在紫外灯下照射 10 min 后在海波溶液中浸泡 2 min,再用苏木素复染 4 min,封片。

1.4.5 改良茜素红 S 染色 切片脱蜡脱水,茜素红 S 染色液滴染 5 min,McGee-Russell 分化液分化 1 s, Mayer 苏木素复染 2 min,流水冲洗 10 min,封片。

1.4.6 改良番红 O-固绿染色 切片脱蜡至水后,用新鲜配制的 Weigert 铁苏木素染色液浸泡 5 min,水洗,用酸性分化液分化 15 s,蒸馏水洗 10 min 后用固绿染色液浸染 5 min,快速用弱酸溶液洗涤 10 s,用番红染色液浸染 5 min,封片。

2 结果

2.1 HE 染色结果 在牵张成骨早期,可见红色的细胞分泌的细胞外基质及结缔组织,蓝紫色的细胞核,未见明显骨小梁结构。在牵张成骨中期,可见幼稚骨小梁结构,周围有一圈成骨细胞包绕。在牵张成骨后期,可见更加成熟粗壮的骨小梁以及周围排列成行的成骨细胞。见图 1。



A、B、C 为 40 倍镜观察所见；A'、B'、C' 为 100 倍镜观察所见。▲ 为成骨细胞，★ 为骨小梁。图 2~6 说明均与图 1 同。

图 1 HE 染色所见

2.2 Masson 染色结果 颜色对比鲜明,可见明显的胶原纤维网,能较好地反映纤维组织的形态。在牵张成骨早期,可观察到牵张中心呈较红的颜色,两侧颜色偏紫。随着牵张间隙的增大,初始矿化前缘邻近两侧纤维间带,纤维间带内有高密度的增殖成骨细胞。这些成骨细胞在新形成的毛细血管和血管窦区域进行初级矿化。蓝色胶原纤维沿牵张方向排列,红色炎症细胞、单核细胞等弥散其中。在牵张成骨中期,新生组织包含丰富的排列整齐的胶原,基质已经开始矿化,可观察到在幼稚骨小梁附近有大量血管,红细胞丰富。在牵张成骨后期,可见较成熟的骨小梁结构,基质中可见胶原纤维网及丰富的血管,管腔内有大量红细胞。部分骨小梁为红色或深紫色,提示此处为成熟骨质。见图 2。

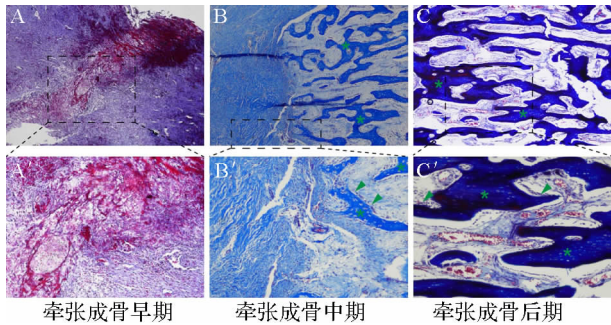


图 2 Masson 染色所见

2.3 亚甲基蓝-酸性品红染色结果 在牵张成骨早期,可见浅紫色的细胞分泌的细胞外基质,深紫色的细胞核,未见明显骨小梁结构。在牵张成骨中期,可见骨小梁较细小,骨小梁区比结缔组织区颜色更紫。在牵张成骨后期,见骨小梁较粗壮,周围一圈可见深蓝色成骨细胞,骨小梁边缘处为紫灰色新生骨组织,中心为深紫色的较成熟骨组织。见图 3。

2.4 Von Kossa 染色结果 在牵张成骨早期,可见浅紫灰色结缔组织与深紫色的细胞核,未见明显骨

小梁结构。在牵张成骨中期,可见紫色幼稚骨小梁被深紫色成骨细胞包绕,骨小梁结构之间可见浅紫色结缔组织。在牵张成骨后期,可见更粗壮骨小梁,周围紧密排列深紫色成骨细胞。见图 4。

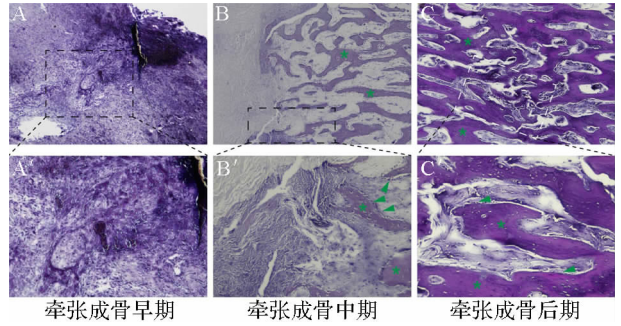


图 3 亚甲基蓝-酸性品红染色所见

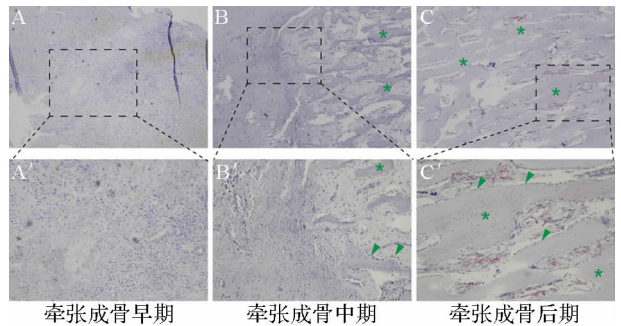


图 4 Von Kossa 染色所见

2.5 改良茜素红 S 染色结果 在牵张成骨早期,可见未脱钙完全部分钙盐沉积呈红色。在牵张成骨中期,可见细小骨小梁结构,未见红色钙盐沉积部分。在牵张成骨后期,可见更粗壮骨小梁,周围紧密排列深紫色成骨细胞,未见红色钙盐沉积部分。见图 5。

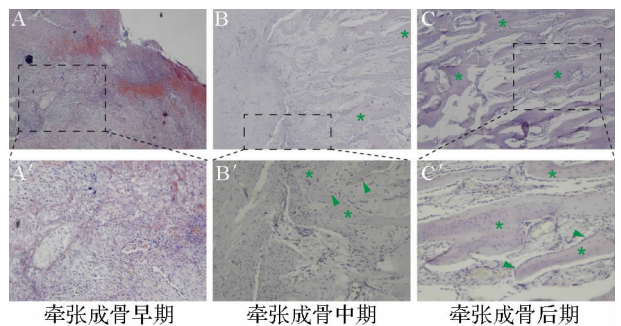


图 5 改良茜素红 S 染色所见

2.6 改良番红 O-固绿染色结果 在牵张成骨早期,仅可见深浅不一的红染结缔组织及蓝紫色细胞核,牵张中心细胞数较近骨段较少。在牵张成骨中期,可见红色幼稚骨小梁,骨小梁之间可见丰富的深红色血管截面。在牵张成骨后期可见骨小梁边缘呈蓝色,中心呈红色,对比明显,分界线大致清晰,能较好地

呈现骨小梁的正常形态。见图 6。

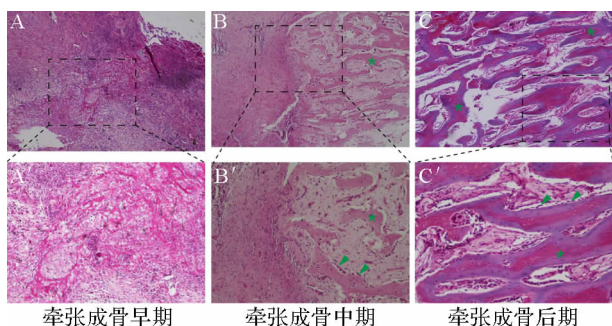


图 6 改良番红 O-固绿染色所见

3 讨论

3.1 在牵张成骨的过程中,牵张成骨区域组织中骨、血管、纤维以及成熟和不成熟胶原等成分,会使分析染色结果复杂化^[8]。随着现代病理技术的发展,免疫组化和原位杂交技术虽得到广泛应用,但其他特殊的染色方法仍是实验研究中不可缺少的方法^[9]。

3.2 HE 染色是最常用的染色方法^[10]。其以苏木素作为碱性染料,主要使嗜碱性细胞和细胞核呈紫蓝色。而伊红是一种酸性染料,主要使嗜酸性细胞质和细胞外基质成分呈红色。HE 染色能揭示牵张成骨过程中骨的基本结构,如骨小梁、成骨细胞等,还可观察牵张成骨过程中,牵张成骨区由无明显骨小梁结构到幼稚骨小梁,再到更成熟骨小梁的动态变化。此技术发展成熟,操作简单,成本低廉,但对于胶原纤维和肌纤维区的区分度较差。

3.3 Masson 染色是结缔组织染色的最经典方法,可以选择性地显示胶原纤维和肌纤维^[11]。其染色原理与负离子染料分子的大小及对组织的渗透性有关,分子的大小反映分子量,分子量小则容易穿透组织致密结构,而分子量则只能进入松散性组织结构^[12]。因此,Masson 染色后,细胞质、肌纤维和红细胞为红色,细胞核、胶原纤维和蛋白质为蓝色^[13]。在其他染色中,肌纤维和胶原纤维均为同一颜色,难以区分,但在 Masson 染色中可以清晰分辨。在牵张成骨的动态过程中,成熟骨质呈现红色,新生骨质呈现蓝色^[14],区分成熟骨质与新生骨质可以更加明确骨质矿化中心,这使得 Masson 染色在评估牵张成骨的成骨效率时具有一定的优势。

3.4 改良番红 O-固绿染色常用于区分软骨组织和骨组织区。番红 O 是一种结合阴离子的阳离子染料,与多糖中阴离子集团结合,嗜碱性的软骨与碱性染料番红 O 结合而呈紫红色。改良番红 O-固绿染色在牵张成骨早中期区分度较差。在牵张成骨后期可见骨小梁边缘蓝色类骨质与中心较成熟骨质,对比明

显,分界线大致清晰,能较好地呈现骨小梁的正常形态。但因牵张成骨主要成骨方式是膜内成骨^[15],而骨折愈合的主要成骨方式为软骨成骨^[16],故改良番红 O-固绿染色在研究牵张成骨时未见明显优势。若要研究牵张成骨与骨折或骨缺损的成骨方式,则可以考虑选择改良番红 O-固绿染色法。

3.5 Von Kossa 染色法中银溶液作用于含有不溶性钙盐的切片时,钙被银所置换,银盐在光的作用下被还原为黑色金属银,适用于大量样本的钙盐组织染色。改良茜素红 S 染色使用的是茜素红 S 和 Mayer 苏木素,钙盐结合形成蓝紫色沉淀,适用于少量钙盐组织的染色^[17]。Von Kossa 染色法和改良茜素红 S 染色法与其他染色相比未见明显区别,可能因为组织在脱钙后才进行脱水包埋切片,钙盐流失,钙盐染色在此次实验中效果较差,这两种染色方法可能更适用于硬组织切片染色。

3.6 亚甲基蓝-酸性品红染色主要用于区分原矿化骨、类骨质、新生骨质,多用于评估种植体骨界面成骨效果以及血管化程度^[18-19]。在牵张成骨组织染色可区分新生骨质与较成熟骨组织,有助于了解牵张成骨过程中骨组织的发育过程。

3.7 许多研究者在选择染色方法上耗费了大量的时间与精力^[20-21]。本研究通过对牵张成骨早期、中期、后期的牵张区域行 6 种染色,结果显示在牵张成骨的整个过程中,Masson 染色对比最鲜明,虽然操作相对繁琐费时,但能够根据组织的疏密程度不同将新生骨质、成熟骨质、胶原纤维、肌纤维等组织的形态进行鲜明的对比,各部分结构更为清晰,且蓝色胶原纤维、红色结缔组织以及蓝褐色细胞核等可使图片更加鲜艳美观。改良番红 O-固绿和亚甲基蓝-酸性品红染色不太适宜用于牵张成骨早中期的染色。若要对比处理因素对于牵张成骨后期成骨的影响,可以根据处理因素作用的不同,选择 Masson 染色、改良番红 O-固绿和亚甲基蓝-酸性品红染色。钙盐染色在此次实验中效果较差,若需评估牵张成骨区组织的矿化程度,建议选择硬组织切片法切片。

本研究比较了 6 种染色方法在牵张成骨早期、中期、后期的应用效果,为牵张成骨领域以及成骨相关领域研究者选择合适的染色方法提供了理论依据及实验经验。

参考文献

- [1] Zhu P, Jiang W, He S, et al. Panax notoginseng saponins promote endothelial progenitor cell angiogenesis via the Wnt/ β -catenin pathway [J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21(1):53.

- [2] 陈雄,尹东. 自体骨联合同种异体骨骨移植的研究进展[J]. 中国临床新医学,2018,11(3):307-310.
- [3] Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, et al. The biology of bone grafting[J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2005,13(1):77-86.
- [4] Liu X, Sun Y, Shen J, et al. Strontium doped mesoporous silica nanoparticles accelerate osteogenesis and angiogenesis in distraction osteogenesis by activation of Wnt pathway[J]. *Nanomedicine*, 2021,41:102496.
- [5] Kumabe Y, Fukui T, Takahara S, et al. Percutaneous CO₂ treatment accelerates bone generation during distraction osteogenesis in rabbits[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2020,478(8):1922-1935.
- [6] Jiang W, Zhu P, Zhang T, et al. MicroRNA-205 mediates endothelial progenitor functions in distraction osteogenesis by targeting the transcription regulator NOTCH2[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021,12(1):101.
- [7] Ji H, Li J, Shao J, et al. Histopathologic comparison of condylar hyperplasia and condylar osteochondroma by using different staining methods[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2017,123(3):320-329.
- [8] Yang S, Wang N, Ma Y, et al. Immunomodulatory effects and mechanisms of distraction osteogenesis[J]. *Int J Oral Sci*, 2022,14(1):4.
- [9] 赵宇朋,周平辉,官建中. 大鼠尾椎间盘不同切片方式及染色方法的组织学观察比较[J]. 实验动物与比较医学,2021,41(2):100-107.
- [10] Chlipala E, Bendzinski CM, Chu K, et al. Optical density-based image analysis method for the evaluation of hematoxylin and eosin staining precision[J]. *J Histotechnol*, 2020,43(1):29-37.
- [11] Zhou T, Li X, Li G, et al. Injectable and thermosensitive TGF- β 1-loaded PCEC hydrogel system for in vivo cartilage repair[J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):10553.
- [12] Narahari AK, Kreutzberger AJ, Gaete PS, et al. ATP and large signaling metabolites flux through caspase-activated Pannexin 1 channels[J]. *Elife*, 2021,10:e64787.
- [13] Zhao Y, Tang Y, Liu S, et al. Foodborne TiO₂ nanoparticles induced more severe hepatotoxicity in fructose-induced metabolic syndrome mice via exacerbating oxidative stress-mediated intestinal barrier damage[J]. *Foods*, 2021,10(5):986.
- [14] 何璋海,李宝璇,郭江,等. 不同关节软骨特殊染色方法的对比研究[J]. 中国药物与临床,2021,21(23):3822-3825,前插2.
- [15] Iliopoulos Ch, Zouloumis L, Lazaridou M. Physiology of bone turnover and its application in contemporary maxillofacial surgery. A review[J]. *Hippokratia*, 2010,14(4):244-248.
- [16] Takebe H, Shalehin N, Hosoya A, et al. Sonic hedgehog regulates bone fracture healing[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(2):677.
- [17] Sim AM, Rashdan NA, Cui L, et al. A novel fluorescein-bisphosphonate based diagnostic tool for the detection of hydroxyapatite in both cell and tissue models[J]. *Sci Rep*, 2018,8(1):17360.
- [18] Pizzicannella J, Diomedede F, Gugliandolo A, et al. 3D printing PLA/gingival stem cells/ EVs upregulate miR-2861 and -210 during osteo-angiogenesis commitment[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(13):3256.
- [19] Alshehri F, Alshehri M, Sumague T, et al. Evaluation of peri-implant bone grafting around surface-porous dental implants: an in vivo study in a goat model[J]. *Materials(Basel)*, 2019,12(21):3606.
- [20] Vale F, Francisco I, Cavaleiro J, et al. Distraction osteogenesis in dog with a tooth-borne device: histological and histomorphometric analysis[J]. *J Clin Exp Dent*, 2020,12(1):e52-e58.
- [21] Tonogai I, Hayashi F, Iwame T, et al. Platelet-rich plasma does not reduce skeletal muscle fibrosis after distraction osteogenesis[J]. *J Exp Orthop*, 2018,5(1):26.

[收稿日期 2022-01-04][本文编辑 余军 吕文娟]

本文引用格式

赵真辰,蒋伟东,石恒蕾,等. 犬下颌牵张成骨不同时期六种染色方法的应用效果比较[J]. 中国临床新医学,2022,15(4):320-324.