

# 一种基于 EDTA 脱钙法的改良骨组织脱钙方法

赵雨坤<sup>1,2</sup>, 郑康<sup>2,3</sup>, 郭晴晴<sup>2,3</sup>, 樊丹平<sup>2</sup>, 何小鹏<sup>2,4</sup>, 吕爱平<sup>1,2,4\*</sup>

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700;  
3. 西南交通大学 生命科学与工程学院, 成都 610031; 4. 香港浸会大学 中医药学院, 香港 999077)

**[摘要]** 目的:探索操作方法简便、脱钙时间更短且对骨组织伤害较小的脱钙方法。方法:DBA/1 小鼠 40 只,随机分组为胶原诱导关节炎模型组和正常组,并对模型组小鼠建立胶原诱导关节炎模型。分别取模型组和正常组踝关节,使用改良前后的脱钙方法进行脱钙,从关节病理及其评分、免疫组织化学方面进行比较脱钙效果。结果:经改良后,在脱钙温度 4 ℃ 和脱钙液更换周期 24 h 条件下,脱钙速度较高(7 d),且此时对骨组织结构和骨组织内蛋白表达无明显影响。结论:优化的螯合剂脱钙法可以有效提高脱钙速度,可为快速制备病理诊断用骨切片提供了参考。

**[关键词]** 骨组织切片; 乙二胺四乙酸二钠脱钙; 胶原诱导关节炎; 免疫组织化学; 脱钙温度

**[中图分类号]** R945;R283.6;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0017-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110017

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160415.1006.012.html>

**[网络出版时间]** 2016-04-15 10:06

## An Improved Method of Bone Decalcification Based on EDTA Decalcification Method

ZHAO Yu-kun<sup>1,2</sup>, ZHENG Kang<sup>2,3</sup>, GUO Qing-qing<sup>2,3</sup>, FAN Dan-ping<sup>2</sup>, HE Xiao-juan<sup>2,4</sup>, LYU Ai-ping<sup>1,2,4\*</sup>

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;

4. School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Hong Kong 999077, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore a decalcification method with easier operation and shorter time. **Method:** Forty DBA/1 mice were randomly divided into normal group and model group. Mice in model group were induced with type II collagen. Ankles were achieved from both model group and normal group, and each of groups were demineralized by improved method and conventional method, respectively. Effect of these two decalcification methods was compared from three aspects, including joint pathology, pathological scores and immunohistochemistry. **Result:** When the temperature was 4 ℃ and the replacement cycle of decalcification fluid was 24 h, the improved decalcification speed was 7 d, and this operation did not have an obvious effect on the structure and the protein expression of bone tissue. **Conclusion:** This optimized decalcification method can effectively improve the decalcification speed, which can get pathological diagnosis rapidly.

**[Key words]** bone tissue sections; EDTA decalcification; collagen-induced arthritis; immunohistochemistry; decalcific temperature

**[收稿日期]** 20150713(003)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09301307);国家自然科学基金项目(81470072);中国中医科学院自主选题项目(Z0252,Z0293,Z0412)

**[第一作者]** 赵雨坤,博士,从事中医药防治自身免疫疾病机制研究,Tel:010-64014411-3401,E-mail:zhyk\_87@163.com

**[通讯作者]** \*吕爱平,博士,研究员,从事中医药防治自身免疫系统疾病机制研究,Tel:010-64014411,E-mail:lap64067611@126.com

骨组织的病理诊断需要对骨切片进行脱钙处理进而制片,在制备过程中,容易出现骨组织脱钙过度影响染色效果、脱钙周期过长影响检测进度的现象<sup>[1]</sup>。现行脱钙技术多采用单纯酸类脱钙剂,虽然脱钙速度快,但是骨组织破坏明显<sup>[2-3]</sup>;因此,螯合剂脱钙技术获得了一定的发展。螯合剂脱钙技术中乙二胺四乙酸二钠(EDTA)是一种优良的脱钙螯合剂,对组织破坏小,且能保存组织中的抗原物质和某些酶类的活性。但 EDTA 脱钙液脱钙作用较缓慢,一般要 4~6 周<sup>[4]</sup>,从而延长了骨组织相关研究的实验周期。本实验拟通过改良脱钙温度及脱钙液更换周期的考察,探索一种高效、方便且对骨组织伤害较小的脱钙方法。

## 1 材料

Leica DM6000 B 型显微镜(莱卡公司)。乙二胺四乙酸二钠(EDTA,国药集团化学试剂有限公司,批号 10009718),骨钙素(兔源,圣克鲁斯生物技术公司,批号 Sc-30045),超敏二步法免疫组化检测试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 PV-9001),鸡 II 型胶原(美国 Chondrex 公司,批号 20012)。

雄性 10 周龄 DBA/1 小鼠,体重 22~26 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(京)2014-0004。

## 2 方法与结果

**2.1 小鼠骨标本的制备** 取小鼠 40 只,适应性喂养 1 周后分为正常组和造模组。其中正常组又分为正常常规组和正常改良组,造模组又分为造模常规组和造模改良组,每组 10 只。造模组采用尾根部注射 II 型胶原方法造成胶原诱导关节炎(CIA)小鼠模型。取适量  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  鸡 II 型胶原,与等量不完全弗氏佐剂混合,充分乳化后滴加于水中以不扩散为度,取乳化后的混合物以乳剂 500  $\mu\text{L}$  于尾根部皮下免疫,21 d 后以乳剂 50  $\mu\text{L}$  于尾根部皮下加强免疫 1 次。模型评价依据为关节炎指数,评分依据为无红肿计 0 分,足趾红肿计 1 分,足掌红肿计 2 分,踝以下部位红肿计 3 分,踝及踝以下红肿计 4 分<sup>[5]</sup>,以出现 1 分为造模成功。造模成功后关节炎小鼠踝关节切成小段,以 10% 中性甲醛溶液固定 40 h。取正常组小鼠踝关节切成小段,以 10% 中性甲醛溶液固定 40 h。

**2.2 脱钙液的配制** 称取 EDTA 50 g 溶于 500 mL 的 10% 中性甲醛溶液中,调节 pH7.2~7.6,得 10% 中性甲醛 EDTA 饱和溶液<sup>[6]</sup>。

### 2.3 脱钙及切片

**2.3.1 常规处理** 将固定后的骨组织放入 10% 中

性甲醛 EDTA 饱和溶液中,脱钙液更换周期为 1 周,室温下保存。定期用注射器针头刺骨组织,以无阻力感为脱钙终点。

**2.3.2 改良处理** 将固定的骨组织放入 10% 中性甲醛 EDTA 饱和溶液中,4  $^{\circ}\text{C}$  条件保存并脱钙,选择不同换液周期(7,5,3,1 d 和 12 h)脱钙处理。定期用注射器针头刺骨组织,以无阻力感为脱钙终点。

**2.3.3 病理检测** 脱钙后标本进行常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片等处理。水洗完成后放入苏木素 10 min 染核,迅速用流动自来水冲洗 2 min;水洗完成后,放入 1% 盐酸酒精分化 5~10 s;分化完成后,迅速放入自来水中蓝化 30 min;蓝化完成后,放入 0.5% 伊红乙醇溶液复染 2 min;逐级脱水,二甲苯透明;用中性树脂封片。

**2.4 不同方法脱钙时间分析** 采用 SPSS 18.0 软件完成统计处理,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有显著性意义。不同方法脱钙时间见表 1。结果显示在改良方法 5 条件下,脱钙时间最短,但与改良方法 4 相差较小,考虑到操作方法的简便性、实用性和结果的稳定性,选择改良方法 4 进行脱钙处理。

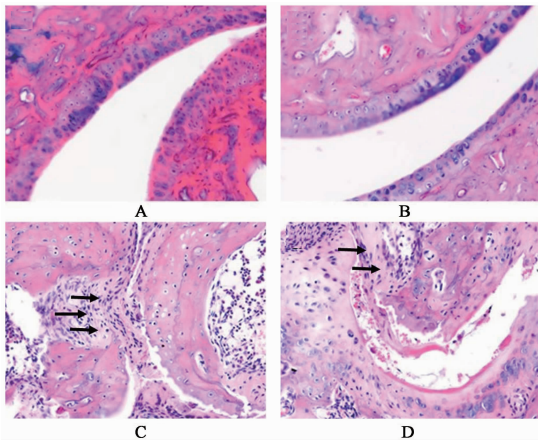
表 1 脱钙方法与脱钙时间 ( $n = 10$ )

Table 1 Decalcification method and decalcification time ( $n = 10$ )

脱钙方法	温度/ $^{\circ}\text{C}$	换液周期/d	脱钙时间( $\bar{x} \pm s$ )/d
常规	25	7.0	42.0 $\pm$ 3.0
改良 1	4	7.0	35.0 $\pm$ 2.0 <sup>1)</sup>
改良 2	4	5.0	21.0 $\pm$ 2.0 <sup>1)</sup>
改良 3	4	3.0	14.0 $\pm$ 1.0 <sup>1)</sup>
改良 4	4	1.0	7.0 $\pm$ 0.5 <sup>2)</sup>
改良 5	4	0.5	6.0 $\pm$ 0.5 <sup>2)</sup>

注:与常规方法比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

**2.5 病理观察及评分** 苏木精-伊红染色(HE 染色)切片在显微镜下观察评分。病理评分依据为关节结构正常,关节间隙均匀,软骨、骨无损伤,滑膜组织无炎症、增生等(0 分);关节结构基本正常,有滑膜增生,血管数量增加,可见少量炎细胞浸润,软骨表层轻度破坏(1 分);关节软骨有明显的侵蚀破坏,血管翳形成,炎细胞浸润明显,无骨破坏,关节间隙基本正常(2 分);有大量的血管翳形成,可见广泛的软骨的侵蚀破坏,可见骨破坏,关节结构遭破坏<sup>[7]</sup>(3 分)。见图 1。结果显示改良后的脱钙方法未对正常小鼠骨关节的组织形态学造成影响,细胞核与细胞质层次分明,对比清晰,容易判断组织病理变化。同时,改良后的脱钙方法也未对小鼠骨关节的组织形态学造成



→. 骨关节病理变化区域; A. 正常常规组; B. 正常改良组; C. 造模常规组; D. 造模改良组(图 2 同)

图 1 各组小鼠踝关节病理分析(HE, ×200)

Fig. 1 Pathological analysis of ankle joint of mice in each group (HE, ×200)

影响。常规组和改良组的病理评分分别为(2.8 ± 0.45), (2.6 ± 0.55)分,无统计学差异。

**2.6 免疫组织化学实验 骨钙素蛋白检测<sup>[8]</sup>**,选择正常常规组和造模组进行免疫组化实验比较,将病理切片脱蜡 2 次,每次 20 min,后转移至体积分数为 100% (2 次),95%,80%,70% 的乙醇中逐级浸泡,各放置 5 min。使用 3% 过氧化氢溶液浸泡 15 min,室温放置。使用胃蛋白酶浸泡 15 min,室温放置。滴加一抗(骨钙素)(1:100 倍稀释),置于 4 °C 环境中过夜。滴加超敏二步法免疫组化检测试剂系统的试剂 1 和试剂 2,使用二氨基联苯胺(DAB)显色 80 s 后,转移至苏木素中浸泡 90 s。使用盐酸酒精清洗 2 次,每次 30 s 后封片。结果见图 2。在正常组小鼠和模型组小鼠中,改良后的方法对骨钙素表达未造成影响。其表达清晰可见于软骨细胞、骨细胞的胞核与胞浆。

### 3 讨论

本文选取了 CIA 小鼠与正常小鼠为研究对象,以 10% 中性甲醛 EDTA 饱和溶液为脱钙液,脱钙温度 4 °C,在不改变其他条件的情况下,发现脱钙液的更换周期与脱钙时间具有明显正相关,通过缩短换液周期和降低脱钙温度可以有效加快脱钙速度,比常规方法缩短将近 1 个月的时间,而且对后续的制片、染色无不良影响。通过反复实验验证,证明该方法可靠,对骨组织病理研究有一定的参考意义。本文在不增加实验条件和成本的前提下,对整合剂脱钙技术进行了优化,不仅有效缩短了脱钙时间,且结果显示改良后的脱钙方法对小鼠病理及蛋白表达无影响<sup>[9-10]</sup>。

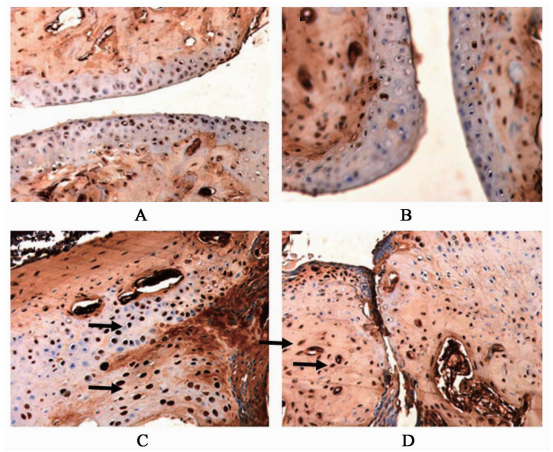


图 2 各组小鼠骨钙素的表达(IHC, ×200)

Fig. 2 Expression of osteocalcin of mice in each group (IHC, ×200)

### [参考文献]

- [1] 熊正文,黄勇,胡海霞,等.微波-EDTA 快速脱钙技术及其在免疫组化染色中的应用[J].解剖学杂志,2003,26(5):506-508.
- [2] 刘宪军,陈萍,徐林娜.改良硝酸脱钙方法的研究及应用[J].当代医学,2010,16(31):42-43.
- [3] 熊正文,孙印臣,张绪斌,等.“低温微波-硝酸快速脱钙”技术研究及应用[J].中国实验动物学杂志,2002,12(6):37-39.
- [4] 刘大维,初同伟,张良,等.EDTA 微波脱钙骨的免疫组化染色[J].第三军医大学学报,2003,25(1):77-78.
- [5] Zhou R, Tang W, Ren Y X, et al. (5R)-5-Hydroxytryptolide attenuated collagen-induced arthritis in DBA/1 mice via suppressing interferon-gamma production and its related signaling[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 318(1):35-44.
- [6] 潘琳,赵天德,潘子昂,等.实验病理学技术图鉴[M].北京:科学出版社,2012:418.
- [7] 肖诚,赵宏艳,王燕,等.益肾蠲痹丸对肾虚证与脾虚证胶原诱导性关节炎大鼠的疗效比较[J].中日友好医院学报,2014,28(2):102-107.
- [8] González-Chávez S A, Pacheco-Tena C, Macías-Vázquez C E, et al. Assessment of different decalcifying rotocols on osteopontin and osteocalcin immunostaining in whole bone specimens of arthritis rat model by confocal immunofluorescence[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(10):1972-1983.
- [9] 黄美雅,黄玉梅,林燕萍,等.EDTA 脱钙方法的实验观察[J].福建中医药,2007,38(4):46-47.
- [10] 左汝铎.含钙硬组织制片技术及组织化学脱钙法[J].湖北医学院学报,1986,7(4):391-395.

[责任编辑 刘德文]