

· 基础研究 ·

## 大鼠骨骼双染标本的制作方法\*

张 宏,李啸红<sup>△</sup>

(遵义医学院珠海校区人体解剖与组织胚胎学教研室,广东珠海 519041)

**摘要:**目的 探讨大鼠骨骼双染方法,为制作教学陈列用标本或研究胚胎正常骨骼形态发育以及胚胎骨骼畸形提供基本的实验方法。方法 将 18 d 胎鼠及生后 1 d 仔鼠去除皮肤、皮下脂肪组织及内脏,用阿利新蓝染液染软骨,再用含氢氧化钾的茜素红染液染骨,最后通过逐级甘油脱水、透明并保存。结果 已骨化的骨被茜素红染成红色或紫红色,软骨被阿利新蓝染成蓝色,其他组织为无色透明状,在体视镜下可清楚地观察到骨骼的发育形态。结论 采用茜素红和阿利新蓝双染法,可使去除皮肤、皮下脂肪组织及内脏的整体胎鼠和仔鼠骨和软骨获得最佳染色效果,是研究骨和软骨发育较为直观的方法,也是制作教学陈列标本的好方法。

**关键词:**大鼠;骨骼;软骨;双染法;注意事项

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.02.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)02-0153-02

## The methods of the rat skeleton double stain and preparation\*

Zhang Hong, Li Xiaohong<sup>△</sup>

(Human Anatomy and Embryo Department of Zunyi Medical College Zhuhai Campus, Zhuhai, Guangdong 519041, China)

**Abstract: Objective** To discuss the methods of rat skeleton double stain, in order to provide basic testing methods for making display samples for teaching or studying the normal skeleton morphological development and the skeletal deformity of embryos. **Methods** The 18 d fetal rat and filial rat 1 d after birth were removed skin, subcutaneous adipose tissue and viscera, and their cartilages were first dyed by the dye solution of Alcian blue, and then dyed by the dye solution of alizarin red containing potassium hydroxide, and finally dehydrated by several levels of glycerin, made transparent and stored. **Results** The ossificated skeletons were dyed to red or amaranth by the alizarin red, the cartilages were dyed to blue by the Alcian blue, and other tissues were transparent. The development morphology of the skeleton could be clearly observed through stereoscope. **Conclusion** The dual dying method that adopts alizarin red Alcian blue could achieve the best dying effect on the skeletons and cartilages of complete fetal rats and filial rats whoes skins, subcutaneous adipose tissue and viscera had been removed, so it is a relatively direct method to study the development of skeletons and cartilages, and also a good method for making display samples for teaching.

**Key words:** rat; skeleton; cartilage; dual dying method; precautions

茜素红对已骨化骨骼的染色有较强的特异性,很容易将其显示成红色或紫红色,自 1897 年有学者采用茜素红对骨骼进行单染以来,该方法已成为研究骨骼畸形的常用方法。根据阿利新蓝可使软骨中硫酸软骨素、硫酸角质素等主要成分呈现蓝色的特点,有学者等改进了单染法,采用茜素红和阿利新蓝对骨骼标本进行双重染色,使之成为研究骨和软骨发育较为直观的方法。近年来,国内外学者对于双染的方法进行了不断的改良<sup>[1-3]</sup>,在实践中作者对骨骼的双染方法进行了适当的改进,并补充其他学者都很少提及的相关操作注意事项,使双染法能更好地应用于各种原因导致的胚胎骨骼畸形的研究以及胚胎正常骨骼形态发育的基础研究或是制作教学陈列用标本。

**1 材料与方**

**1.1 实验动物** 选用体质量(250±20)g 的 SD 大鼠,每天晚上 20:00 按 2:1 进行雌雄合笼,次晨 8:00 取出雄鼠,并仔细检查雌鼠阴道,以查见阴栓者为妊娠第 0 天。将阴栓阳性鼠随机分成孕 18 d 阴性对照组、孕 18 d 阳性对照组和自然分娩组,每组 3 只。孕 18 d 阳性对照组孕鼠于孕 10 d 时以维甲酸 100 mg/kg 灌胃一次,其他组则不施加干预因素。

**1.2 实验药品与试剂** 维甲酸(山东良福制药有限公司,批号:20083494)、阿利新蓝(上海蓝季科技发展有限公司,批号:090130)、茜素红(中国医药集团上海化学试剂公司,批号:

F000117)等。

**1.3 染色液的配制**

**1.3.1 茜素红原液和应用液的配制** (1)茜素红原液:取冰乙酸 5 mL、纯甘油 10 mL、1.0% 水合氯醛 60 mL,混合后加茜素红粉末适量。边加边搅拌直至饱和为止,室温避光保存。(2)茜素红应用液:取茜素红原液 1 mL 加入 1% 氢氧化钾溶液定容至 1 000 mL。

**1.3.2 阿利新蓝染液** 取 150 mg 阿利新蓝染料,加入 950 mL 75% 乙醇,再加 50 mL 冰醋酸。

**1.3.3 透明液的配制** (1)透明液 I:甘油 20 份、蒸馏水 77 份、2% 氢氧化钾溶液 3 份混合而成;(2)透明液 II:甘油 75 份、蒸馏水 25 份;(3)保存液即透明液 III:100% 的甘油中加入适量的麝香草酚。

**1.4 染色处理步骤** 自然分娩的仔鼠用乙醚进行麻醉,其余两组孕鼠于孕 18 d 乙醚吸入麻醉后,解剖腹部,剖开子宫取出胚胎。首先将胎鼠和仔鼠浸于 70 °C 的水浴中约 10~30 s,取出,剥皮去内脏后,再将标本完全浸入阿利新蓝染液中,48~72 h 后更换液体,放入茜素红应用液 2~8 h,骨和软骨着色良好后,将标本入透明液 I、II 中各 1~2 d,如果透明度不佳,可适当延长在透明液中的时间。染色成功后的标本放入保存液中保存。

## 2 结 果

双染成功的标准为已骨化的骨骼被茜素红染成红色或紫红色,软骨则被阿利新蓝染成蓝色,在红色的骨周围或两端都是染成蓝色的软骨。双染的标本在体视镜下可清楚地观察到骨骼的发育形态(图 1)。

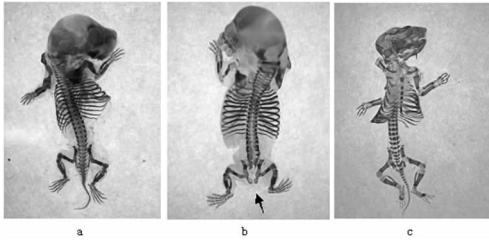


图 1 大鼠胚胎及胎仔骨骼双染

## 3 讨 论

### 3.1 标本制作体会

**3.1.1 染液的配制和保存** 用蒸馏水配制茜素红饱和液(即原液)时并不需要精确称量,配制好后转入棕色瓶中避光保存,但保存时间不应超过 6 个月。茜素红染液应用液、阿利新蓝染液均要求常温避光保存,保存时间不应超过 2 个月,否则会致标本着色过浅或无法着色。

### 3.1.2 胚胎标本的处理

**3.1.2.1 剥皮** 在染色前将皮肤、皮下脂肪组织去除干净,有利于染料对骨和软骨的渗透,获得整体标本的最佳染色结果。如果来不及对标本进行剥皮处理,可先将标本浸过热水后暂时保存在 4% 的盐水中 4~6 h 或在 75% 乙醇中固定 4~6 h,也有利于皮肤和皮下组织的剥离。热水处理标本时水温不宜过高,否则去皮时易损伤标本的肢端或致鼠尾部分脱落,从而影响标本的完整性。

在去皮时,可用眼科小弯镊直接撕脱皮肤,在剥离背部皮肤时,应仔细去除肩胛骨之间的脂肪组织,否则会影响到此处椎骨的染色效果,同时要防止因过度剥离而致上肢骨与躯干分离。在剥除腰部肌肉时则不宜剔得太干净,否则躯干骨会与后肢骨骼分离,从而影响标本整体美观和不利于观察后肢骨的发育情况。当撕脱皮肤至踝关节和腕关节处时要小心,很容易连同趾(指)一起撕脱,从而影响标本的完整性,因此,在撕至踝关节和腕关节时可先保留趾(指)部的皮肤,以免撕脱趾(指)骨。在剥离颈前和胸骨前面的皮肤和脂肪时,尽量将脂肪组织、气管、食管等剔除干净,以免影响对胸骨和下颌骨的染色效果,不利于观察胸骨骨化情况。

**3.1.2.2 去内脏** 用 2 把眼科小弯镊从脐周撕开腹部皮肤及肌肉,去除腹腔脏器,然后将镊子尖端穿过膈伸入胸腔,将心肺与膈一起拖出。在取胸、腹腔脏器时注意不要损伤到胸廓的结构,如扯断肋骨和胸骨等。

**3.1.3 染色和透明处理** 剥皮后的标本放入装有阿利新蓝染液的称量瓶中,染色期间摇动瓶子 2~3 次,并注意检查标本着色情况,必要时用镊子翻动标本,以免标本与瓶壁接触的一面因没有与染液充分接触而影响着色。48~72 h 后用吸管将阿利新蓝染液吸出,换入茜素红应用液并注意观察染液颜色,如果发现颜色变浅而标本染色不佳时需要重新更换茜素红应用液,标本在茜素红应用液中浸染 2 h 后要注意观察标本,并不时用吸管吸取染液冲刷标本,如果发现躯干部分染色已较好,肢体末端指(趾)部的皮肤用液体冲洗时能自然地与指(趾)骨分离并脱落,且末端骨与软骨染色良好时换入梯度甘油(透明液 I、II)中进行脱水和透明。

茜素红应用液浓度过高将使未能剥离干净的软组织与骨均被染成红色,从而影响观察。因此,最好不要使用太高浓度的茜素红应用液,必要时可以通过适当延长标本在茜素红应用液中的时间来增加染色效果。透明液 I、II 中含有氢氧化钾,可起到分色和透明作用,使骨和软骨以外的组织呈无色透明状,从而提高骨和软骨染色的反差。如果标本四肢末端的皮肤处理得不是很好时,可通过延长在低浓度甘油中的时间,使标本进一步浸解和透明,但至少每 0.5 小时应观察标本一次,防止因时间过长而致骨骼的松散或部分解体,同时茜素红应用液和甘油中的氢氧化钾浓度不应过高,以免损伤标本。

能否成功染色的关键在于标本是否剥离干净,如果标本不够干净,那么在染骨时通常会残留的组织与骨染成一样的颜色,从而影响对骨发育的评价。因此,在倒入茜素红染液前,如发现标本还有较多软组织,可以再次对其进行处理直到干净。

由于浸解后骨骼软化,因此最好不要用钳取转移标本的方式去更换液体,而是用吸管吸取液体换液,以免损伤标本。

**3.1.4 染色后标本的保存** 为便于对染色后标本骨骼的观察,可用宽底的玻璃称量瓶(40 mm×40 mm)装标本,这样既便于观察,同时能防止染液被蒸发,但应注意在一个容器内不要放置过多的标本,最好是每瓶 1~2 个,因为标本过多,过于拥挤会延长染色时间。对于已有部分损伤的标本,如尾部断开、四肢与躯干分开的标本,则每个瓶只装一个。

没有经过脱水处理的标本,容易发生霉变,从而影响观察。因此,双染成功的标本经过逐级梯度甘油进行透明和脱水后,加入 100% 甘油保存,同时加少许麝香草酚以防腐。

**3.2 传统的发育毒性研究中,多采用骨骼单染法来评价骨骼发育是否异常,由于母鼠有咬食畸形仔鼠的习性,因此在发育毒性研究中常在孕鼠分娩前剖腹取胎,而对于 18 d 的大鼠胚胎标本,由于只有部分骨化,另一部分骨骼仅以软骨的形式存在,采用单染后仅骨化部分染色,软骨部分无法被染色。通过双染,骨化的骨骼着红色或紫红色、软骨着蓝色,能很好地显示骨和软骨的发育情况,是研究骨骼发育畸形中较经济且简单易行的方法,能较全面准确地评价骨骼畸形的发生<sup>[4]</sup>。染色成功的标本可参考 Neubert 评分系统对四肢骨骼的发育情况进行评价<sup>[5-6]</sup>,通过合理选择稳定的骨化指标可对毒物的致畸效应进行正确评价<sup>[7-8]</sup>,并借助双染法对骨骼畸形建模是否成功进行评价<sup>[9]</sup>,通过评分将胚胎早期难以肉眼分辨的畸形胎鼠分离出来,对真正发生畸形的胎鼠进行研究,从而提高了结果的可靠性<sup>[10]</sup>,而正确的诊断则更有利于早期开展针对性的治疗<sup>[11]</sup>。**

骨骼双染标本的制作,为动物学的骨骼研究、比较解剖学的研究和实验教学提供了直观、真实的形态学素材,在实验教学中能激发学生的学习兴趣,使学生对动物骨骼的发育过程和各骨的位置关系有更直观的认识,同时骨骼双染的标本可以长期保存,作为陈列和展览所用<sup>[12-14]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 李勇,王维林,袁正伟,等.一种简捷可靠的胎鼠骨和软骨双重染色技术[J].中国医科大学学报,2004,33(2):189-190.
- [2] Menogola E, Broccia ML, Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage[J]. Teratology, 2001, 64(3):125-133.
- [3] 刘万祥,蔡滢,王长月.骨骼透明标本制作及应用[J].天津医科大学学报,2002,8(3):377-378.
- [4] 罗聪,任榕娜,胡渝华,等.抗癫痫药妥泰(下转第 157 页)

床中 CO<sub>2</sub> 人工气腹较开腹手术更易促进腹腔肿瘤播散和种植、转移这一现象的可能机制之一。下一阶段作者将应用免疫组化和 Western blot 技术分析 CO<sub>2</sub> 作用后 CAV-1 基因蛋白水平的变化;还将通过构建真核表达载体使宫颈癌 HeLa 细胞 caveolin-1 过表达与低表达,然后通过体外细胞功能试验研究 HeLa 细胞的生物学行为的变化,从而了解 CO<sub>2</sub> 作用后 caveolin-1 在宫颈癌 HeLa 细胞中所承担的角色。有关 CO<sub>2</sub> 气腹后恶性肿瘤的增殖、侵袭能力增强机制是个复杂的过程,是各个方面、多个基因综合作用的结果,有关 caveolin-1 在腹腔镜 CO<sub>2</sub> 气腹影响宫颈癌细胞生物学变化的关系中所占的比重还有待进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 林飞,潘灵辉. CO<sub>2</sub> 气腹对裸鼠腹腔宫颈癌细胞生长与转移的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(1): 14-16.
- [2] 林飞,潘灵辉. 体外模拟 CO<sub>2</sub> 气腹环境对宫颈癌细胞生长与转移的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(9): 1013-1016.
- [3] Canis M, Botchorishvili R, Wattiez A, et al. Tumor growth and dissemination after laparotomy and CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum; a rat ovarian cancer model[J]. *Obstet Gynecol*, 1998, 92(1): 104-106.
- [4] Ishida H, Murata N, Idezuki Y. Increased insufflation pressure enhances the development of liver metastasis in a mouse laparoscopy model[J]. *World J Surg*, 2001, 25(12): 1537-1539.
- [5] Supryniewicz FA, Disbrow GL, Krawczyk E, et al. HPV-16E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells[J]. *Oncogene*, 2008, 27: 1071-1078.
- [6] Orlichenko L, Weller SG, Cao H, et al. Caveolae mediate growth-factor induced disassembly of adherens junctions to support tumor cell dissociation[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(19): 4140-4152.
- [7] Liu J, Wang XB, Park DS, et al. Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation [J]. *Biol Chem*, 2002, 277: 10661-10668.

- [8] Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers[J]. *FEBS Lett*, 1998, 436(1): 3-10.
- [9] Han F, Gu D, Chen Q, et al. Caveolin-1 acts as a tumor suppressor by down-regulating epidermal growth factor receptor-mitogen-activated protein kinase signaling pathway in pancreatic carcinoma cell lines[J]. *Pancreas*, 2009, 38(7): 766-774.
- [10] Sloan EK, Stanley KL, Anderson RL. Caveolin-1 inhibits breast cancer growth and metastasis[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 7893-7897.
- [11] Burgermeister E, Xing XB, Christoph R, et al. Differential expression and function of caveolin-1 in human gastric cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8519-8526.
- [12] Wiechen K, Diatchenko L. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene [J]. *American Journal of Pathology*, 2001, 159: 1635-1643.
- [13] Bender FC, Reymond MA, Bron C, et al. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 5870-5878.
- [14] Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288: 494-506.
- [15] Wikman H, Kettunen E, Seppanen JK, et al. Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array[J]. *Oncogene*, 2002, 21: 10-13.

(收稿日期: 2011-07-09 修回日期: 2011-08-22)

(上接第 154 页)

- 对大鼠胚胎骨骼发育影响的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2003, 11(6): 11-13.
- [5] 李勇, 张天宝. 发育毒理学研究方法和实验技术[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000: 84-89.
  - [6] Neubert D, Hinz N, Bauman I. Attempt upon a quantitative evaluation of the degree of differentiation of or the degree of interference with development in organ culture [J]. In: *G Thiemeed. ole of Pharmacokinetics in Prenatal and Perinatal toxicology*, Stuttgart, 1978: 337-349.
  - [7] 吴德生, 董奇勇, 衡正昌, 等. 在致畸研究中小鼠胎鼠发育迟缓的评价指标[J]. 四川医学院学报, 1984, 15(1): 59-63.
  - [8] 王心如. 毒理学实验方法与技术[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 70-85.
  - [9] 李勇, 王维林, 袁正伟, 等. 丙戊酸诱导胎鼠发生隐性脊椎裂畸形的模型建立[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 6(1):

38-41.

- [10] 钟永盛, 贾艳丽, 陈斌, 等. 先天性马蹄内翻足动物模型胚胎后肢(芽)评分系统的建立[J]. 中华小儿外科杂志, 2006, 30(6): 397-400.
- [11] 万梓鸣, 李明. 先天性马蹄内翻足治疗进展[J]. 重庆医学, 2010, 39(8): 991-993.
- [12] 刘万胜, 黄明辉, 刘力华, 等. 青蛙骨骼染色透明标本的制作及应用[J]. 现代预防医学, 2008, 35(9): 1700-1701.
- [13] 刘万胜, 黄明, 刘力华. 新生儿骨骼染色透明标本的制作方法[J]. 卫生职业教育, 2004, 24(14): 94-95.
- [14] Cortés-delgado N, Pérez-torres J, Hoyos JM. Staining procedure of cartilage and skeleton in adult bats and rodents[J]. *Int J Morphol*, 2009, 27(4): 1163-1167.

(收稿日期: 2011-07-10 修回日期: 2011-08-18)