

甲酸混合酸脱钙液在兔股骨头制片中的应用*

周正丽, 汤华军, 王 云(泸州医学院人体解剖学教研室, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 观察甲酸混合酸脱钙液对股骨头组织的制片效果。**方法** 采用成年新西兰大白兔 10 只, 切断股骨头圆韧带, 取股骨上 1/3 段置于甲酸混合酸脱钙液中脱钙 1 周, 随即常规脱水、透明、石蜡包埋, 制备 5 μm 厚纵切片, 行 HE 染色。**结果** 所有组织切片厚薄均匀, 未见脱片现象, 股骨头完整性较好, 各层次分明, 骨小梁结构完整, 软骨细胞、骨细胞细胞形态清晰, 着色鲜艳。**结论** 选用甲酸混合酸脱钙液制片股骨头组织具有脱钙时间相对较短、操作简单、组织结构完整、染色效果较好的特点。

【关键词】 股骨头; 兔; 脱钙

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.10.038 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)10-1426-01

股骨头坏死是骨关节外科常见难疾, 动物模型实验研究是当前股骨头坏死研究的热点之一^[1-2], 通过组织病理切片评估股骨头病变的进程是股骨头坏死检查的金标准, 而股骨头组织由于其硬度较大, 易脱片、易破碎、染色不佳等常使制片效果不尽如人意, 其中脱钙液的选择是影响制片效果的关键。故本文选择股骨头坏死常备实验动物—经济实用性健康兔为制片对象, 拟采用甲酸混合酸脱钙液制作切片以观察其制片效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年新西兰大白兔 10 只, 雌雄不拘, 体重 2.0~2.5 kg, 由泸州医学院实验动物中心提供, 本研究所采用的动物实验操作程序符合动物实验相关伦理要求。

1.2 主要试剂与仪器 试剂包括生理盐水、戊巴比妥钠、甲酸、浓盐酸、三氯化铝、甲醛、石蜡、苏木精染液、伊红染液、甘油、二甲苯等。实验仪器磁力搅拌器(上海跃进医疗器械厂), 热恒温电烤箱(上海跃进医疗器械厂), RM 2235 石蜡切片机(Leica), YS100 光学显微镜(Nikon), 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 取材 以 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 剂量耳缘静脉注射麻醉动物; 依次切开皮肤、浅筋膜, 钝性分离各层臀肌, 切开髋关节囊, 切断股骨头韧带, 显露股骨头, 选择骨干 1/3 处将股骨锯断, 在低温冰块上迅速剔除股骨附着的肌肉及结缔组织, 将其置于 10% 甲醛中固定 48 h。

1.3.2 甲酸混合酸脱钙液的配置 取甲酸 5 mL, 浓盐酸 8.5 mL, 称量三氯化铝 7 g, 混匀后加蒸馏水定容至 100 mL, 现配现用。

1.3.3 股骨头组织切片的制作 将标本置于甲酸混合酸脱钙液中, 磁力搅拌器搅拌混匀, 静置脱钙 1 周, 之后以大转子为中心, 纵行剖开股骨头, 常规脱水、透明, 随即石蜡包埋, 采用石蜡切片机制备 5 μm 厚纵切片, 行 HE 染色。

2 结果

所有组织切片厚薄均匀, 无刀痕, 均未见脱片现象, 肉眼可见切片股骨头完整性较好, 软骨区、骨小梁区、骺板区结构清晰, 层次分明。光学显微镜下可见骨小梁结构完整, 无折叠; 软骨细胞、骨细胞细胞形态清晰可见, 细胞核无明显收缩现象, 细胞核与细胞质着色清晰, 红蓝相间, 色彩鲜艳; 脂肪细胞、小血管等结构分明, 色泽鲜明。见图 1、2。

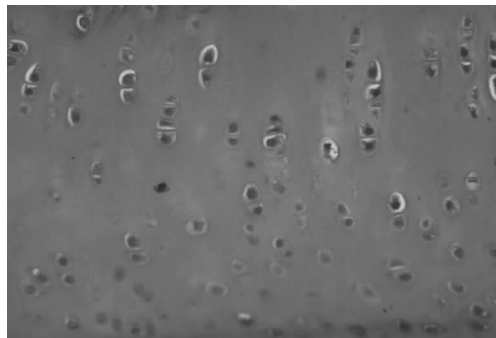


图 1 软骨细胞, HE 染色 40×10 倍

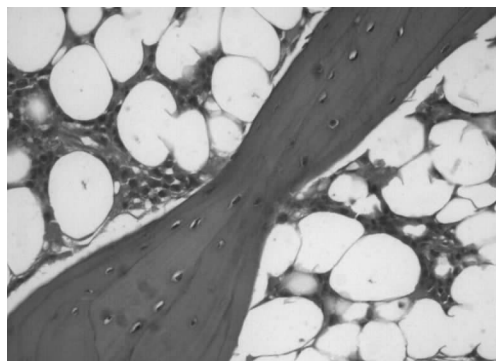


图 2 骨细胞及脂肪细胞, HE 染色 40×10 倍

3 讨论

脱钙是指用物理或化学方法将骨组织标本中的有机组织和钙盐分离, 通过去除钙盐和无机盐从而获得完整的胶原纤维组织, 只有去除无机盐物质, 才能使组织软化行切片染色观察^[3], 可见股骨头组织制片脱钙液的选择是制片成功的关键。脱钙若不彻底, 钙盐遗留, 切片易破碎、残缺, 影响制片的质量; 脱钙过度, 则脱钙液中的酸类物质又会损伤组织中的抗原, 破坏组织细胞的形态结构, 导致染色效果不佳。

目前, 骨组织切片常选用的脱钙液包括以硝酸为主的酸性脱钙液和乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙液。硝酸尽管具有脱钙能力强、时间短等优点, 但易出现脱钙过度, 细胞明显肿胀至使细胞结构不完整, 细胞核染色能力减弱, 返蓝困难而至细胞核呈淡红色, 对比度明显降低^[4]。EDTA 是一种优良的脱钙整合剂, 对组织破坏极小, 能保持组织细胞的完整(下转第 1428 页)

* 基金项目: 泸州医学院校级课题 (2013ZRQN073)。

染最常见。由表 1 可见,本研究中痰标本中检出 1 206 株(78.01%),高于其他报道^[2-3],由此可见铜绿假单胞菌对呼吸系统的感染影响严重,按照目前该菌的耐药特点,一旦发生呼吸道特别是肺部的感染,治疗起来将非常困难,所以要重点关注,尤其要加强对于年老体弱、免疫功能低下患者的呼吸道护理和监测。其次是尿液尿标本 111 株(7.18%),分泌物标本 105 株(6.79%),血液标本 50 株(3.23%),菌血症患者的预后较差,对发现铜绿假单胞菌血液感染的患者要尽早进行对症治疗和重点监测,否则病死率特别高。而导管标本 18 株(1.16%),对于这种侵入性治疗的患者,要加强无菌操作,目标把感染降到最低。

在医院各科室的分布中,位列前 3 位的分别是大学城分院 ICU 426 株(27.55%)、大学城分院呼吸科 175 株(11.32%)和芳村分院 ICU 117 株(7.57%)。大学城分院 ICU、大学城分院呼吸科和芳村分院 ICU 这 3 个科室间患者状态特点都很相近,ICU 主要都是老年人、病情严重、治疗时间长以及治疗时多使用广谱抗菌药物甚至大量使用激素类的、侵入性治疗如气管插管、留置管道等病情较为复杂的患者,所以像铜绿假单胞菌这样的条件致病菌在 ICU 的感染率就会非常高。而大学城分院呼吸科的患者以老人居多,其余多为肺部功能较弱的,因此患者的肺部功能差就会导致其咳嗽反射减弱,深部痰不能轻易、及时咳出,大大增加了铜绿假单胞菌的感染概率。除了 ICU 和呼吸科外,神经科的感染率也相对很高,外科(普外、泌外)的情况也不乐观,提示医院应当在术前、术后患者的护理方面多下工夫,注重提高无菌操作的能力,尽量把机会性感染降到最低。

铜绿假单胞菌的耐药情况也很严重,这与铜绿假单胞菌的外因和内因密切相关,外因就是对感染者的治疗时使用的抗菌药物,内因就是由于该菌具有比较特殊的细胞壁和细胞膜结构,对许多抗菌药物存在固有耐药,并可通过诱导产生 β -内酰胺酶、外膜低渗透、外膜孔蛋白缺失、青霉素结合蛋白改变和主动外排系统等机制对多种抗菌药物产生继发耐药^[4]。由表 3

可知,头孢唑啉、呋喃妥因、头孢曲松、氨苄西林、复方磺胺甲噁唑、头孢替坦的耐药率均超过 96%,在临床治疗时这些药已经不能再使用了,氨曲南和头孢哌酮的耐药率超过 30%,而哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦的耐药率为 20%~30%,可见复合用药的耐药率明显降低,在以后的治疗中,可考虑选择复合用药。耐药率低于 20%的有左旋氧氟沙星、环丙沙星、亚胺培南、美洛培南、妥布霉素和阿米卡星,比汪红等^[5]、张涛等^[6]报道的耐药率还低,这可能与本次研究的是中医院,收集标本不同和中医院的抗感染习惯用药多是中药、西药混合使用,大大降低了细菌耐药性改变的可能。阿米卡星的肾毒性强,医生都很少使用,这也是其耐药率最低的原因之一。

总之,医院内铜绿假单胞菌的感染情况和耐药情况都很严重,只有充分掌握铜绿假单胞菌的最新感染和耐药性情况,才能为患者提供更好的、更有针对性的治疗方案。

参考文献

[1] 邓芳,张健,张世勇,等.多重耐药铜绿假单胞菌感染的危险因素及耐药性分析[J].重庆医学,2013,42(35):4304-4306.
[2] 万忠林,周环宇.铜绿假单胞菌耐药性 480 株分析[J].中国医药指南,2010,8(13):262-263.
[3] 孙珊,张莉萍.1274 株铜绿假单胞菌在临床细菌感染中的分布及耐药性分析[J].重庆医学,2011,40(3):226-228.
[4] Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Drugs, 2007, 67(3):351-368.
[5] 汪红,宁长秀,钟桥石,等.2012 年临床分离菌分布及耐药性分析[J].中国感染与化疗杂志,2014,14(1):63-68.
[6] 张涛,季萍,张朝霞.2011-2012 年我院临床病原菌分布及耐药性分析[J].中国抗菌药物杂志,2014,39(1):71-76.

(收稿日期:2014-11-15 修回日期:2015-02-11)

(上接第 1426 页)

结构,尤其细胞显微化学改变甚微,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,短者数周常者数月,不适用于大面积骨组织脱钙^[5]。

本研究选用甲酸混合酸脱钙液辅以三氯化铝,其中甲酸对组织的破坏程度较轻,脱钙时间范围宽松;盐酸可明显增加脱钙速度,而且对组织具有收缩作用;三氯化铝的加入,铝离子易被吸附的特性可以起到保护剂的作用,从而减缓盐酸对细胞核着色的影响,同时它又是 HE 染色苏木精的媒染助染剂,可辅助得到优良的染色效果。且甲酸混合酸脱钙液脱钙时间仅 1 周,脱钙中间不换液,不水洗,组织损伤较少,即可保证脱钙彻底,又可使各结构层次不分离,取得良好的染色效果。此外,还发现脱钙后充分水洗也是影响制片成功的因素之一,组织脱钙后经流动的自来水充分冲洗,自来水的弱碱性可中和残留在组织中的脱钙液酸性,有利于切片的苏木素着色。

综上所述,甲酸混合酸脱钙液辅以三氯化铝对骨组织标本脱钙有一定的优越性,值得在临床实验中使用。

参考文献

[1] Poignard A, Lebouvier A, Cavet MA, et al. New preclini-

cal porcine model of femoral head osteonecrosis to test mesenchymal stromal cell efficiency in regenerative medicine[J]. Int Orthop, 2014, 38(9):1837-1844.

[2] Hwang Y, Park J, Choi SH, et al. Traumatic and Non-traumatic osteonecrosis in the Femoral Head of a Rabbit Model[J]. Laboratory Animal Research, 2011, 27(2):127-131.
[3] 戚亦萍,吴明媛,王明海,等.兔膝关节炎骨关节组织切片的制备方法[J].上海交通大学学报:农业科学版,2009,27(3):314-317.
[4] 罗灿峰,莫木琼,钟觉民.不同的脱钙液在骨组织制片中的比较应用[J].中国实用医药,2011,6(19):27-28.
[5] 沈溪明,何欣欣,吴东霞,等.不同浓度和 pH 值 EDTA 脱钙液对下颌骨免疫组化结果的影响[J].临床与实验病理学杂志,2014,30(6):696-698.

(收稿日期:2014-11-05 修回日期:2015-02-05)