

EDTA 在骨脱钙中的应用*

王海彬, 吴宇峰, 刘少军

(广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510407)

摘要: 研究不同浓度的 EDTA 在 3 种动物鼠、兔、人骨骼脱钙中的作用效果。取大鼠、兔、人的大小不同的骨(松质骨、皮质骨)在不同 EDTA 浓度下脱钙, 并进行电镜、酶学和免疫组化的观察。在磁力搅拌下, 松质骨 3 d 完成脱钙, 皮质骨需要 5 d 的时间; 而无磁力搅拌的情况下, 松质骨的脱钙需要 12 d, 而皮质骨大于 12 d。据不同动物部位和有无磁力搅拌下, 采用不同的脱钙浓度和时间。

关键词: 乙二胺四乙酸二钠盐; 骨

中图分类号: R332; R681 **文献标识码:** A

过去人们常使用硝酸、蚁酸等脱钙, 随着电镜、免疫组化等技术的发展, EDTA 已成为骨科常用的脱钙剂, 但其作用浓度和时间掌握一直比较混乱, 本实验研究了 EDTA 在不同动物骨骼的作用效果和方法。

1 材料和方法

(1) 主要的试剂: 乙二胺四乙酸二钠盐简称为 EDTA (上海试剂一厂) 用 NaOH (上海试剂一厂) 按要求配成 $\rho = 1\%$ 、 5% 、 10% 、 15% 的 EDTA, 调整 pH = 7.2, TGF- β 1McAb (上海细胞生物研究所, 工作浓度 (体积比) 1:100), ABC 试剂盒 (美国 Vector 公司), 固定液: $\rho = 4\%$ 多聚甲醛-0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2~7.4) (上海试剂一厂)

(2) 取 6 月龄大鼠、新西兰大白兔、成年人 (未见明显骨质疏松) 的股骨头和股骨用摆锯锯切成 1.5 mm 厚的骨片, 需作电镜的先用 $\rho = 2.5\%$ 的戊二醛固定, 脱钙后用磷酸盐缓冲液 (pH = 7.2) 冲洗 12 h。作骨质的酶染色和组化的标本可用冷丙酮、或 4 % 多聚甲醛固定 24 h, 脱钙后用磷酸盐缓冲液 (pH = 7.2) 冲洗 12 h。

(3) 把松质骨片和骨干放于包埋盒中, 悬吊于烧杯中, 杯中分别放入不同浓度的 EDTA, 外套 0 °C 冰水中磁力搅拌, 每 12 h 换液一次。另一组松质骨片和骨干悬吊于烧杯中, 杯中分别放入不同浓度的 EDTA, 放于 0 °C 冰水中, 但不进行磁力搅拌, 每 12 h 换液一次。

(4) 每 12 h 换液时用针尖探刺骨质脱钙情况, 如骨质已软化, 给予电镜、ATP 酶染色及组化染色。

(5) 各组固定后分别进行以下处理。① 电镜: 用 0.1% 磷酸缓冲液再冲洗 24 h, $\rho = 1\%$ 锇酸后固定, 常规包埋, 制作半薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铝染色, 用 JEM-200CX 透射

* 收稿日期: 2000-09-18; 作者简介: 王海彬 (1970~), 男, 主治医师; 研究方向: 骨坏死, 骨细胞学。

电镜观察; ② 酶的染色: $\rho = 0.1\%$ 磷酸缓冲液再冲洗 24 h, 用英国 Shandon 公司的 AS620 型冷冻切片机切片, 片厚 $12\ \mu\text{m}$, 恒冷箱温度 $-19 \sim -24\ ^\circ\text{C}$, Wachstein-Meisel 镁激活酶法, 作用 20 min 后, 流水冲洗, $\rho = 1\%$ 的硫化铵 1 min, 双蒸水洗, 甘油明胶封固; ③ 免疫组化: 常规石蜡包埋后, 组织切片脱蜡至水, $\rho = 0.3\%$ 过氧化氢孵育, 滴加 1:20 稀释的羊血清, 滴加 1:100 的一抗, $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜, 加 1:200 稀释的生物素化羊抗兔免疫球蛋白, 室温下孵育 30 min, 加 1:100 稀释的过氧化酶一卵白素, 室温下孵育 30 min, 滴加 DAB, 室温下孵育 (2~10) min, 苏木素复染, 中性树胶封片。

2 结 果

(1) 磁力搅拌下, 动物的股骨头、干在不同 EDTA 浓度下, 作用时间如表 1 所示, 24 h 后, 用大头针刺可感到骨质坚硬。48 h 后, $\rho(\text{EDTA}) = 10\%$ 和 15% 两组股骨头骨质边缘及中心大部分均已软化, 但 $\rho(\text{EDTA}) = 1\%$ 和 5% 两组骨质仍硬。72 h 后, $\rho(\text{EDTA}) = 10\%$ 和 15% 两组股骨头骨质边缘及中心均已软化, 可进行电镜、组化等后处理。96 h 后, $\rho(\text{EDTA}) = 5\%$ 组股骨头骨质软化, 可进行后处理。96~120 h 后, $\rho(\text{EDTA}) = 1\%$ 组股骨头骨质软化。实验各组股骨干软化的时间均大于 120 h。骨细胞的电镜如图 1, ATP 酶如图 2, TGF- β 染色如图 3。

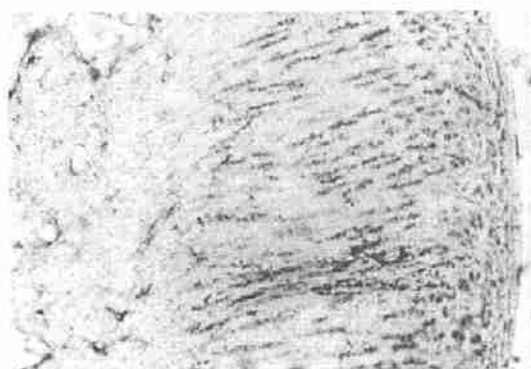


图 1 骨的 ATP 酶染色, $\times 100$

见软骨下骨的骨细胞明显的深染, 以细胞膜为主



图 2 电镜, $\times 5000$

见骨细胞核深染, 胞质内有一脂滴, 左上方可见胶原纤维图

表 1 动物股骨头、干在不同 EDTA 浓度下, 磁力搅拌下的作用时间 (h)

动物	部位	1%	5%	10%	15%
大鼠	股骨头	96	84	72	72
	股骨干	> 200	144	120	108
兔	股骨头	120	96	72	72
	股骨干	> 200	156	144	120
人	股骨头	96	72	60	60
	股骨干	> 200	192	156	120

(2) 未作磁力搅拌组以 5%、10% 组在第 12 d 的各组动物松质骨发生软化, 但皮质骨

骨质仍然质硬。

3 讨论

(1) 在进行骨组织的电镜、组化、酶学等方面实验时,需用 EDTA 进行脱钙,EDTA 是一种无色结晶粉末,在 160℃ 以下不分解,但加热易变色,在 EDTA 充分溶解的情况下,溶液呈酸性,使用时需用 1 N 的 NaOH 液调整为中性或略碱性^[1]。EDTA 是种螯合剂,可于碱土金属及其他金属离子形成 1:1 的螯合物,从而起到脱钙的作用。

(2) 对于骨质需要进行电镜、组化及酶学等方面观察的标本,应尽快给予脱钙。脱钙的效果和时间及 EDTA 的浓度有重要的相关性,浓度越高,时间越长,脱钙的效果越好。各种动物松质骨的进行电镜、组化等实验时,10% EDTA 的浓度脱钙 3 d 内可达满意的结果。如果组织切成小于 1 mm 的薄片,5% 至 10% 的 EDTA 浓度在 2 d 内可达到软化的效果。各种动物皮质骨的进行电镜、组化等实验时,10% EDTA 的浓度脱钙 8 d 内可达满意的结果。同时尽可能避免使用高浓度(大于 10%)的脱钙剂,以免影响细胞的结构。国内外用 15% 的 EDTA 溶液, pH = 7 给予骨质脱钙,需用 2 周至 3 个月,时间周期过长,且高浓度的脱钙液影响观察细胞的超微结构^[2,3]。Kawai 认为 10% 的 EDTA 4℃ 脱钙,可取得良好的结果。卡氏^[4]认为,不超过 5 mm 厚度的小块组织于 pH = 7 的 5.5% EDTA,每 4、5 d 换液 1 次,更换 3 次后,再每天换液 1 次,可达脱钙的效果^[5]。

(3) 应用 EDTA 脱钙,和其它脱钙剂相比,EDTA 可减少组织的损伤,特别是减少细胞超微结构的破坏。文献记录用 EDTA 进行脱钙时间较长,作者应用磁力搅拌的方法,并进行每 12 h 换液 1 次,保证了脱钙所需要的最大浓度,并可最大程度的减少组织的损伤,使抗原、酶和细胞器等结构得以保存。

参考文献:

- [1] 张孙玮,汤福隆,张泰,等.现代化学试剂手册[M](第 2 分册).北京:化学工业出版社,1987.296~297.
- [2] 龚志锦,詹容洲.组织制片和染色技术[M].上海:上海科学技术出版社,1994.283~284.
- [3] 刘介眉,严庆汉,路英杰,等.病理组织染色的理论方法和应用[M].北京:人民卫生出版社,1983.134~135.
- [4] KAWAI K. Steroid-Induced Accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head[J]. J Bone and Joint Surg, 1985,6.67-A:755~762.
- [5] C F A,卡林.组织病理学与组织化学技术手册[M].北京:科学出版社,1982.68~69.

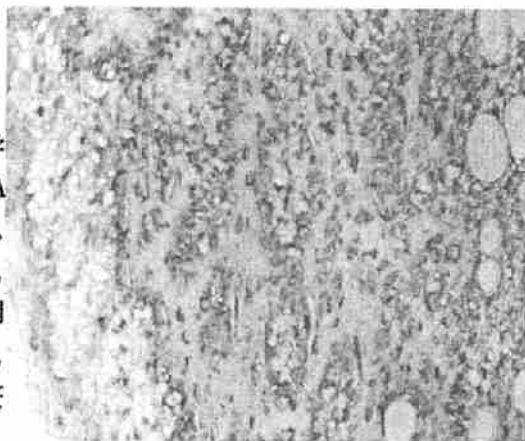


图 3 骨的 TGF-β 染色 × 100 倍,棕色的染色为 TGF-β 阳性区

An Application of EDTA in Bone Decalcification

WANG Hai-bin^{*}, WU Yu-feng, LIU Shao-jun

Abstract: Effect of bone decalcification in mouse, rabbit and human by different concentration EDTA is discussed. Cortex and cancellous bone of mouse, rabbit and human are decalcified, then are observed through electron microscopy, enzymology and immunochemistry. With magnetic force mixing round, cancellous bone is decalcified within 3 days. Cortex is decalcified within 5 days. Without magnetic force mixing round, cancellous bone is decalcified within 12 days. Cortex is decalcified more than 12 days. Based on these results, different time and concentration of EDTA are suggested according to different animal portion and with magnetic force mixing round or not.

Keywords: EDTA; bone

* Postdoctoral Workstation of Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM & Pharmacology, Guangzhou 510405, China