

# EXAKT切磨系统在带金属种植体软硬组织切片中的应用\*\*◆

齐进, 黄萍, 张连方, 丰盛梅, 邓廉夫

## Application of EXAKT systems in the preparation of sections of soft and hard tissues containing metal implants

Qi Jin, Huang Ping, Zhang Lian-fang, Feng Sheng-mei, Deng Lian-fu

### 文章亮点:

①采用EXAKT切磨系统技术能制作出高质量的软、硬组织薄层切片。②EXAKT切磨系统可清晰显示各种组织结构和人工植入物。

### Abstract

**BACKGROUND:** It is difficult to cut thin sections of cortical bone and tissues installed with hard implant using Polycut microtome. Recently, such sections are commonly fabricated with EXAKT system.

**OBJECTIVE:** To prepare thin sections of soft and hard tissues that contained metal implants by using EXAKT system.

**METHODS:** The samples were obtained from the distal femur of rat, the fracture callus in mouse femur, the canine mandible with titanium alloy implant and the porcine coronary artery containing Co-Cr stent. The samples were fixed with polyformaldehyde and dehydrated with acetone, and then embedded with methylmethacrylate. The embedded samples were cut into 300  $\mu\text{m}$  thick sections and then ground down to 5-10  $\mu\text{m}$ . The thin sections were stained with hematoxylin-eosin or toluidine blue when necessary and observed under light microscope.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Toluidine blue staining showed that metaphyseal mineralized trabecular bone in the tissue sections of rat distal femur was light blue, and cortical bone was integrated with no fragmentation. The light blue host bone of the canine mandible with titanium alloy implant sections was closely integrated with the black metal implant and formed a solid interface. The callus sections of the tetracycline-labeled mouse femoral shaft fracture showed significant double fluorescence band under fluorescence microscope (ultraviolet light). Hematoxylin-eosin staining of the porcine coronary artery sections containing Co-Cr stent showed that the scaffold material remained in place without detachment or wavering phenomenon from the vessel wall, and the tissue was contained without shrinkage or collapse. The results suggest that proper use of EXAKT system is able to produce high-quality sections of soft and hard tissues, which can show the tissue structures and installed implant clearly.

Qi J, Huang P, Zhang LF, Feng SM, Deng LF. Application of EXAKT systems in the preparation of sections of soft and hard tissues containing metal implants. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(35): 6555-6559. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

### 摘要

**背景:** 目前常用的Polycut硬组织切片机难以制作皮质骨或含坚硬植入物组织的薄层切片, 近年来这些切片多用EXAKT硬组织切磨系统进行制作。

**目的:** 实验采用EXAKT切磨系统制作含金属内植物的软、硬组织薄层切片。

**方法:** 取大鼠股骨远端、小鼠股骨干骨折部、带有钛合金种植体的犬下颌骨和带有钴铬支架的猪冠状动脉标本, 经多聚甲醛固定和丙酮脱水后用有机玻璃(甲基丙烯酸甲酯)浸透包埋。组织包埋块用EXAKT系统作厚度约300  $\mu\text{m}$ 的切片, 然后磨片至厚5-10  $\mu\text{m}$ 的切片。不同切片用苏木精-伊红和甲苯胺蓝染色后在光学显微镜下观察形态。

**结果与结论:** 甲苯胺蓝染色显示, 大鼠股骨远端骨组织切片中干骺端矿化骨小梁呈浅蓝色、皮质骨结构完整, 无碎裂。含带有钛合金种植体的犬下颌骨切片浅蓝色宿主骨与黑色金属种植体密切结合, 形成牢固的界面。四环素标记的小鼠股骨干骨折部骨痂切片, 在荧光显微镜(紫外光)下显示明显的双层荧光带。苏木精-伊红染色的包裹钴铬合金支架材料的猪冠状动脉组织切片显示, 支架材料维持在原位, 与血管壁无脱离或游移现象, 组织无皱缩或折叠。结果提示, 采用EXAKT切磨系统技术能制作出高质量的软、硬组织薄层切片, 可清晰显示各种组织结构和人工植入物。

**关键词:** EXAKT 切磨系统; 骨; 植入物; 有机玻璃; 切片; 骨组织构建

齐进, 黄萍, 张连方, 丰盛梅, 邓廉夫. EXAKT切磨系统在带金属种植体软硬组织切片中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(35):6555-6559. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

Shanghai Key Laboratory of Osteoarthropathy, Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, Rui Jin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Qi Jin, Technician in charge, Shanghai Key Laboratory of Osteoarthropathy, Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, Rui Jin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China  
jinjin838@hotmail.com

Huang Ping, Technician in charge, Shanghai Key Laboratory of Osteoarthropathy, Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, Rui Jin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China  
pinghping@yahoo.com.cn

Qi Jin and Huang Ping contributed equally to the paper.

Corresponding author: Deng Lian-fu, M.D., Professor, Shanghai Key Laboratory of Osteoarthropathy, Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, Rui Jin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China  
lfdeng@msn.com

## 0 引言

Supported by: Fund of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, No. 11XJ21035\*; Non-governmental Cooperation Projects of Shanghai Science and Technology Commission, No.10410702000\*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.35.019

Received: 2012-05-03  
Accepted: 2012-06-12

对含荧光素标记的骨组织常用Polycut硬组织切片机进行切片,优点是能切5~10 μm厚的切片,清晰显示骨结构和荧光标记<sup>[1-3]</sup>,缺点是切坚硬皮质骨易发生骨碎裂,导致切片质量较差,并且不能切割金属植入物。因此,切皮质骨和含金属植入物的骨标本常用Leica骨切片机或慢速金刚环锯<sup>[4-6]</sup>。这些器械切出的切片较厚,常超过100 μm,需要用磨片机甚至手工进行磨片<sup>[4-6]</sup>。这样磨出的切片厚度不一,甚至产生同一切片不同部位的厚薄不均,导致镜下观察时难以聚焦,影响照片质量。对于这些常规设备难以制作的硬组织切片,目前多用德国EXAKT硬组织切磨系统进行制备<sup>[7-9]</sup>,这些切片能达到<20 μm的厚度,并保持硬组织,组织与植入物之间的原有组织结构形态。

实验介绍采用EXAKT硬组织切磨系统制备皮质骨及含内植物软硬组织薄切片的具体方法及可能达到的效果。

## 1 材料和方法

**设计:** 组织学实验。

**时间及地点:** 于2008/2011上海市伤骨科研究所完成。

**材料:** 软硬组织标本均在2008/2011上海市伤骨科研究所实验室收集。包括:①3月龄雌性SD大鼠的股骨远端组织标本。②含四环素双标记的3月龄小鼠股骨干骨折部骨痂组织标本。③含钛合金种植体的雄性犬下颌骨组织标本。④含植入钴铬合金支架的雄性猪冠状动脉组织标本。

**主要试剂和仪器:**

试剂及仪器	来源
多聚甲醛溶液	苏州市第二化工研究所有限公司
体积分数 100%纯丙酮溶液	上海凌峰化学试剂有限公司
甲基丙烯酸甲酯(有机玻璃)	上海华东理工大学配制
EXAKT 510 脱水仪, EXAKT 520 光固化包埋机, EXAKT 300 CP 切片机, EXAKT 400 CS 磨片机	德国艾卡特公司
ZEISS Imager M1 光镜显微镜	德国蔡司公司

**方法:**

**主要观察指标:** 各组染色标本内的显微结构,不同软硬组织切片的显示效果。

**组织固定、脱水和包埋:** 新鲜组织块置于40 g/L多聚甲醛固定液中固定48 h后流水冲洗24 h,在EXAKT 510脱水仪中用100%丙酮溶液脱水。脱水后将组织块置入塑料模具,在EXAKT 520光固化包埋机中做有机玻璃包埋。

**组织切片:** 有机玻璃聚合后去除塑料模具,用Technovit 4000黏合剂将有机玻璃包埋标本黏于载玻片A。将载玻片A真空吸附于EXAKT 300 CP切片机夹具上,通过激光在包埋标本上定位,用金刚锯条切割暴露标本表面。将载玻片A吸附于EXAKT 400 CS磨片机对标本表面进行抛光。在EXAKT 401载片黏合装置上用Technovit 7210 VLC胶水将载玻片B黏附于标本的抛光面。如此载玻片A、包埋标本和载玻片B合成一个类似三明治的结构。将三明治结构的载玻片A侧吸附于EXAKT 300 CP 切片机夹具上,从载玻片B侧通过自动步进定位装置切割厚度约300 μm的切片。

把黏附切片的载玻片B吸附于带滚动磨盘装置和电子测量控制系统的EXAKT 400 CS微磨片装置,针对不同标本预先设定磨片的厚度。在各级SiC&Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>沙纸上磨片至预定厚度,最后用细砂纸对切片表面进行抛光。整个过程通过AW100测量控制系统进行控制。实验的切片最终厚度为5~10 μm。

**切片染色方法:**

**苏木精-伊红染色:** 将苏木精直接滴加于植入钴铬支架的猪冠状动脉切片组织表面,视标本类型掌握染色时间,通常5~30 min,流水清洗残留染液后切片置入体积分数1%盐酸乙醇30 s,流水冲洗后再入温水返蓝,而后进入伊红复染1 min,自然干燥后直接用BASO病理封固胶封固,光学显微镜下观察组织形态。

**甲苯胺蓝染色:** 将体积分数1%甲苯胺蓝染液直接滴加于大鼠股骨远端骨组织切片和含带有钛合金种植体的犬下颌骨切片表面5~30 min(染色时间视标本类型而定),流水冲洗,待自然干燥后直接用BASO病理封固胶封固。不染色切片直接用BASO病理封固胶封固,光学显微镜下观察各组组织形态。

采用免疫荧光染色观察小鼠股骨骨折骨痂组织形态,荧光显微镜下观察组织形态。

上海市骨关节病损重点实验室,上海市伤骨科研究所,上海交通大学医学院附属瑞金医院,上海市200025

齐进,女,1973年生,上海市人,汉族,2006年上海交通大学医学院毕业,主管技师,主要从事硬组织切片制作骨形态计量学研究。jinjin838@hotmail.com

并列第一作者:黄萍,主管技师。pinghpingh@yahoo.com.cn

通讯作者:邓廉夫,男,博士,教授,上海市骨关节病损重点实验室,上海市伤骨科研究所,上海交通大学医学院附属瑞金医院,上海市200025。ldeng@msn.com

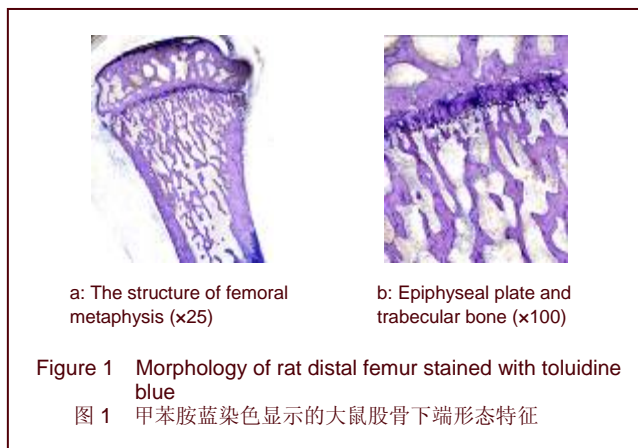
中图分类号:R318  
文献标识码:A  
文章编号:2095-4344(2012)35-0655-05

收稿日期:2012-05-03  
修回日期:2012-06-12  
(20120309014/WJ C)

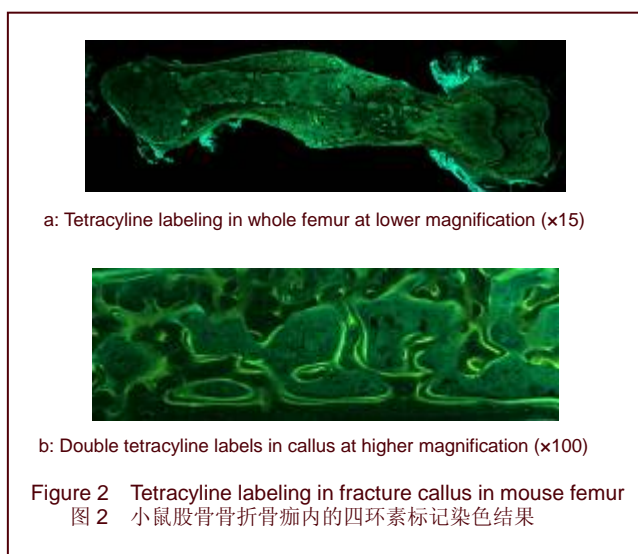
## 2 结果

**2.1 切片质量控制结果** 各种骨标本及含内植物的软、硬组织标本, 经有机玻璃包埋后, 均可通过EXAKT切磨系统制作出5~10 μm厚的薄切片。由于磨片厚度经螺旋测微器自行测量, 因此切片各部位厚度均一(差别不超过±0.01 μm), 且切片表面光整。光镜下聚焦后各部位结果均能清晰显示。

**2.2 不同软硬组织切片的显示效果** 甲苯胺蓝染色的大鼠股骨远端骨组织切片显示, 切片中干骺端矿化骨小梁呈浅蓝色、而未矿化的骨小梁表面类骨质及骺板软骨基质呈深蓝色; 浅蓝色的皮质骨结构完整, 无碎裂, 见图1。

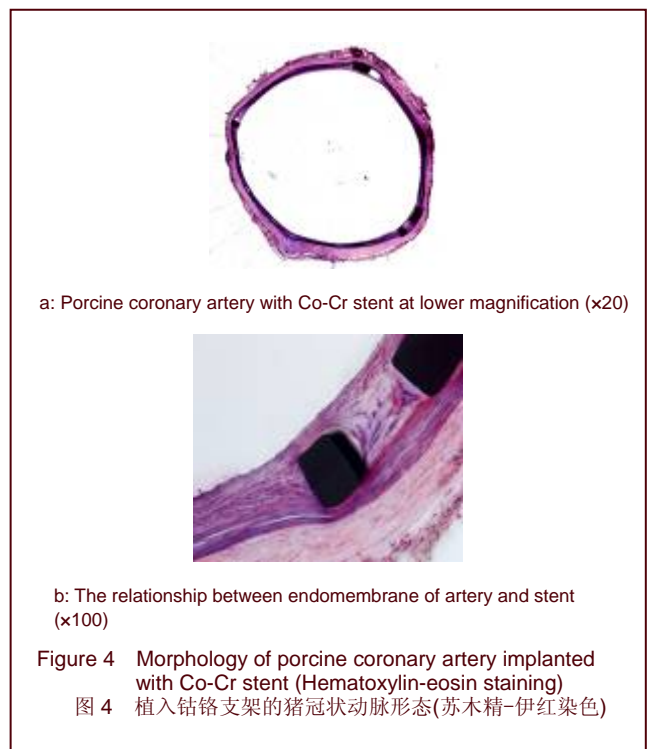
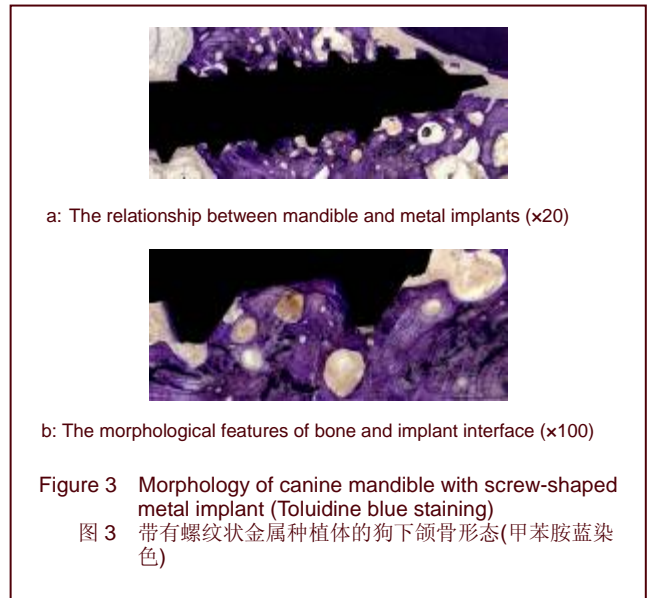


四环素标记的小鼠股骨骨痂切片(未作其他染色)显示, 在荧光显微镜(紫外光)下显示明显的双层荧光带, 据此可测定新骨形成和骨改建, 见图2。



甲苯胺蓝染色后的含螺旋状金属种植体的犬下颌骨切片显示, 金属种植体保持在原位, 浅蓝色宿主骨与

黑色金属种植体紧密结合, 形成牢固的界面, 见图3。苏木精-伊红染色的包裹钴铬合金支架材料的猪冠状动脉组织切片显示, 支架材料维持在原位, 与血管壁无脱离或游移现象, 组织无皱缩或折叠, 见图4。



## 3 讨论

骨是一种坚硬的结缔组织, 如做石蜡切片, 需先进

行脱钙。虽然脱钙骨切片常用于观察骨的细胞变化<sup>[10]</sup>, 但脱钙过程可引起组织结构皱缩, 影响骨结构的定量分析。更重要的是以四环素为代表的骨荧光标记物与新骨内钙盐螯合<sup>[11-12]</sup>, 脱钙可使荧光标记消失, 影响对骨改建的动态分析。因此, 对做形态计量观察的骨标本采用不脱钙有机玻璃包埋技术进行处理<sup>[13-14]</sup>。有研究对含金属植入物的骨标本也采取不脱钙技术进行处理<sup>[15]</sup>, 主要有2个原因: ①脱钙不能软化金属植入物。②脱钙引起的骨组织皱缩可引起骨-植入物界面分离, 不能反映愈合过程中植入物与骨的结合情况。

虽然不脱钙的有机玻璃包埋能够维持硬组织(骨、牙)和金属植入物的形态结构完整性, 但切片技术往往是保证观察质量的关键。最多用于硬组织切片的是德国Polycut硬组织切片机, 可切5~10 μm的薄切片。除了实验研究外, 该切片技术在临床上广泛用于髌骨活检标本<sup>[16-17]</sup>。

髌骨活检结果既是诊断骨质疏松和多种骨病的金标准, 而且也是评判治疗效果的重要指标<sup>[18]</sup>。髌骨活检前一段时间服用2次四环素进行新骨双重标记, 使新骨形成区有两条荧光条带<sup>[17-19]</sup>。骨结构和静态骨改建参数的测定在甲苯胺蓝染色切片上进行, 而动态骨改建参数依靠在未染色切片上测量四环素荧光条带的长度和2条条带的间距。荧光标记在薄切片中的清晰度远优于厚切片。

然而, Polycut切片机适用于髌骨这类含大量松质骨和较疏松皮质骨的部位<sup>[20]</sup>, 不适合切致密皮质骨, 更不能切割坚硬的金属植入物。因此, 许多研究采用慢速金刚环锯切割皮质骨或含金属植入物骨标本<sup>[5-6]</sup>。但用环锯切出的切片往往大于100 μm, 经磨片也只能达到50 μm, 而且磨片厚度不易掌握。这种厚片内的结构较难聚焦, 尤其是骨内荧光标记, 常会影响测试的精确性。目前越来越多学者用EXAKT硬组织切磨系统制作皮质骨和含金属植入物骨切片<sup>[7-9]</sup>。该系统对切、磨片厚度均可精确调控, 最终片厚可达5~10 μm, 且厚度均一。实验发现用EXAKT硬组织切磨系统制备的薄层骨切片在显微镜下容易聚焦, 由于切片各部位厚度均匀, 较少出现聚焦困难的现象。因此, 即使在高倍镜下也可显示清晰的骨结构和荧光标记。此外由于骨结构形态保持完好, 该切片还适用于观察金属内植物与骨的界面情况, 这对研究骨内植物的愈合具有重要意义。

对软组织作显微镜观察一般采用石蜡切片, 但在植入钴铬合金支架的情况下石蜡切片不一定适用。原因是石蜡切片刀难以切动较硬的合金支架, 硬切容易造成支

架变形或碎裂。此外, 支架和动脉组织硬度不一, 在切片时容易造成二者分离。因此需要寻找一种新的方法来处理这种标本。实验对植入钴铬合金支架的猪冠状动脉采用硬组织切片方法进行处理取得了良好的效果。镜下显示支架及动脉结构完好, 两者呈密切结合。本次实验结果提示对含有金属材料的软组织可用有机玻璃包埋方法。有机玻璃浸透可增加软组织的硬度, 在切片时不易发生变形。对这种有机玻璃组织包埋块用EXAKT硬组织切磨系统制作切片可获得满意的观察效果。因此, 实验为观察含金属支架的软组织提供了一个有效的方法。

综上所述, EXAKT硬组织切磨系统适用于制作皮质骨和含金属内植物组织的薄层切片, 这种切片可做各种染色进行定量组织形态观察, 可广泛应用于骨科、口腔、肿瘤、心血管及整形外科等研究领域。

#### 4 参考文献

- [1] Dang GD. Zhonghua Waike Zazhi. 1989;27(1):57-59. 党耕町. 骨组织形态测量学[J]. 中华外科杂志, 1989, 27(1):57-59.
- [2] Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, et al. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(9):3128-3135.
- [3] Prestwood KM, Gunness M, Muchmore DB, et al. A comparison of the effects of raloxifene and estrogen on bone in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85(6):2197-202.
- [4] Huang LF, Li QN, Liao JM, et al. Guangdong Jiepo Xue Tongbao. 1994;16(2):151-153. 黄莲芳, 李青南, 廖进民, 等. 不脱钙骨标本制片技术的探讨[J]. 广东解剖学通报, 1994, 16(2):151-153.
- [5] Lin DJ, Chuang CC, Lin JH, et al. Bone formation at the surface of low modulus Ti-7.5Mo implants in rabbit femur. Biomaterials. 2007;28(16):2582-2589.
- [6] Vashishth D, Koontz J, Qiu SJ, et al. In vivo diffuse damage in human vertebral trabecular bone. Bone. 2000;26(2): 147-152.
- [7] Jensen LN, Jensen JS, Gottfredsen K. A method for histological preparation of undecalcified bone sections containing acrylic bone cement. Biotech Histochem. 1991;1(2):82-86.
- [8] Rolf HJ, Enderle A. Hard fallow deer antler: a living bone till antler casting? Anat Rec. 1999;255(1):69-77.
- [9] Knabe C, Kraska B, Koch C, et al. A method for immunohistochemical detection of osteogenic markers in undecalcified bone sections. Biotech Histochem. 2006;81(1): 31-39.
- [10] Emerton KB, Hu B, Woo AA, et al. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. Bone. 2010;46(3):577-583.
- [11] Frost HM, Villanueva AR, Roth H, et al. Tetracycline bone labeling. J New Drug. 1961;1:206-216.
- [12] Lee TC, Mohsin S, Taylor D, et al. Detecting microdamage in bone. J Anat. 2003;203(2):161-172.

- [13] Parfitt M, Qiu S, Palnitkar S, et al. Abnormal bone remodeling in patients with spontaneous painful vertebral fracture. *J Bone Miner Res.* 2011;26(3):475-85.
- [14] Qiu S, Phipps RJ, Ebetino FH, et al. Effect of risedronate on osteocyte viability and bone turnover in paired iliac bone biopsies from early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 2010;87(5):392-397.
- [15] Warreth A, Polyzois I, Lee CT, et al. Generation of microdamage around endosseous implants. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(12):1300-1306.
- [16] Qiu MC, Yang BE, Wang JY, et al. *Zhonghua Yixue Zazhi.* 1990; 70(12):686-690.  
邱明才,杨宝恩,王觉英,等.正常人髂骨形态计量参数的研究[J].*中华医学杂志*,1990,70(12):686-690.
- [17] Rao DS. Practical approach to bone biopsy. *Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretations.* CRC Press, USA. 1983.
- [18] Parfitt AM. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Summary of proposed system. *Bone Miner.* 1988;4(1):1-5.
- [19] Han ZH, Palnitkar S, Rao DS, et al. Effects of ethnicity and age or menopause on the remodeling and turnover of iliac bone: implications for mechanisms of bone loss. *J Bone Miner Res.* 1997;12(4):498-508.
- [20] Liu WJ,Zhong SZ.*Zhongguo Yixue Wuli Xue Zazhi.*2004;21(5): 262-264.  
刘文军,钟世镇.大鼠松质骨切片图像的三维重建与定量分析[J].*中国医学物理学杂志*,2004,21(5):262-264.

## 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 上海交通大学医学院基金(11XJ21035), 课题名称: 骨质疏松性骨组织的形态学计量、无机物物质组分检测与 DEXA 测量间的相关性分析; 上海市科委非政府间合作项目(10410702000), 课题名称: 针对骨修复过程的关键环节构建多级联性促进骨修复的生物材料及其机理研究。

**作者贡献:** 实验的设计、实施、评估均由齐进、黄萍、张连方、丰盛梅共同完成。齐进、黄萍成文, 邓廉夫审阅修改, 齐进、邓廉夫对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 所有动物实验均经过瑞金医院动物管理委员会批准。

**文章概要:** 实验对做形态计量观察的骨标本和含金属植入物的软硬组织标本采用不脱钙有机玻璃包埋技术进行处理。实验采用 EXAKT 硬组织切磨系统制作皮质骨和含金属植入物的软硬组织切片, 能获得厚薄均一的 5~10  $\mu\text{m}$  薄切片。实验发现 EXAKT 硬组织切磨系统制作的薄切片在高倍镜下更容易聚焦, 可清晰显示组织结构及荧光标记。

## EXAKT切磨系统在带金属种植体软硬组织切片中的应用◆

作者: [齐进](#), [黄萍](#), [张连方](#), [丰盛梅](#), [邓廉夫](#)  
作者单位: [上海市骨关节病损重点实验室, 上海市伤骨科研究所, 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海市200025](#)  
刊名: [中国组织工程研究](#)  
英文刊名: [Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research](#)  
年, 卷(期): 2012(35)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_xdkf201235021.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_xdkf201235021.aspx)