



单染与复染在观察 SIRT1 基因敲除小鼠骨关节炎切片中的差异比较

于红燕¹, 杨占东¹, 杨琪², 于斐^{3*}

(1. 滨州市滨城区市立医院, 山东滨州 256600; 2. 空军总医院, 北京 100142; 3. 北京大学深圳医院, 广东深圳 518036)

【摘要】目的 通过 SIRT1 基因敲除建立相关小鼠膝关节骨关节炎模型, 在此基础上观察各种不同单独染色或复合染色技术在观察软骨组织切片形态学中的差异。方法 将小鼠膝关节组织标本分为 2 组: SIRT1^{-/-} 小鼠假手术组($n=6$, A 组), SIRT1^{-/-} 小鼠骨关节炎模型组($n=6$, B 组)。通过前交叉韧带横断加内侧半月板切除术建立膝关节骨关节炎模型, 行 HE 染色、番红 O-固绿染色、番红 O-阿利新蓝染色、番红 O 染色、固绿染色、阿利新蓝染色, 6 种单独染色或复合染色方式观察膝关节软骨组织形态学变化。结果 番红 O-固绿染色、番红 O-阿利新蓝染色在观察软骨细胞的细胞形态、软骨分层结构的情况、II 型胶原纤维的显示、潮线及软骨下骨的改变中, 效果更好; 而番红 O 染色、阿利新蓝染色在观察软骨组织缺失方面有一定的优势。结论 在观察 SIRT1 基因敲除小鼠膝关节骨关节炎软骨组织切片中, 与单独染色相比, 复合染色在获得软骨结构的各种信息方面优势更加明显。

【关键词】 SIRT1 基因; 基因敲除; 小鼠动物模型; 骨关节炎; 单独染色; 复合染色

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 10-0034-06

doi: 10.3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 10. 007

Observation of the articular cartilage of osteoarthritis in SIRT1 gene knock-out mice through single staining and compound staining

YU Hong-yan¹, YANG Zhan-dong¹, YANG Qi², YU Fei^{3*}

(1. Binchengqu Shili Hospital, Binzhou 256600, China; 2. Air Force General Hospital, Beijing 100142;
3. Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036)

[Abstract] **Objective** To establish osteoarthritis model of the knee joint in mice on the basis of knocking out SIRT1 gene and to observe the differences in the morphology of the cartilage tissue using single staining and compound staining. **Methods** The knee joint specimens were divided into two groups: SIRT1^{-/-} control group (group A, $n=6$) and SIRT1^{-/-} osteoarthritis model group (group B, $n=6$). The knee anterior cruciate ligament was traversed, and the ipsilateral medial meniscus was cut to establish an osteoarthritis model of knee joint. HE staining, safranin O-fast green staining, safranin O-alcian blue staining, safranin O staining, fast green staining, alcian blue staining were used to observe the morphological changes in the articular cartilage of the knee. **Results** Safranin O-fast green staining and safranin O-alcian blue staining showed better results in observation of the morphology of chondrocytes, the structure of cartilage layers, the presence of type II collagen, tide line and the changes of subchondral bone. While the safranin O staining and alcian blue staining had certain advantages in the observation of the defects of cartilage tissue. **Conclusions** Compared with the

[基金项目] 广东省自然科学基金 - 博士启动项目(2016A030310070); 深圳市科创委资助项目(JCYJ20160428173412866)。

[作者简介] 于红燕(1965-), 女, 副高, 研究生。E-mail: 434674348@qq.com

[通讯作者] 于斐(1989-), 男, 研究生。研究方向: 骨关节炎、骨科生物材料。E-mail: oscarfyu@163.com

single staining, the compound staining used in this study have obvious advantages in obtaining useful information of the cartilage structure in the observation of morphology of cartilage tissues in *SIRT1* gene knock-out mice.

[Key words] *SIRT1* gene; Gene knockout; Mouse model; Osteoarthritis; Single staining; Compound staining

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨的退变丢失为基础的多因素慢性疾病,在50岁以上人群中的发病率极高,仅次于心血管疾病居第二位^[1],容易造成患者的生活质量降低,严重者可导致残疾,给国家和家庭带来了沉重的负担。沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, *SIRT1*),是一种与衰老密切相关的III型去乙酰化酶基因,在哺乳动物中研究深入,近年来研究证实,*SIRT1*基因可以通过PI3K/AKT^[2]、NF-κB^[3]等信号通路的作用与OA相关联,并在OA发生发展中起到重要的作用。我们前期研究证实,当*SIRT1*基因条件性敲除后,OA发生更加明显^[4],因此,在*SIRT1*基因条件性敲除的基础上进行OA的观察效果更加明显。在OA的相关研究中,病理学检查用处较大,而各种染色技术因其能够直观反应OA软骨组织的形态学变化而经常使用,不同染色技术在观察OA关节软骨切片中作用很大。

在以往OA相关的研究中,单独染色或者几种染料复合染色观察OA软骨组织的切片均有使用,但是观察效果各不相同,很少有对单独染色及复合染色的效果进行分析对比,研究单独染色与复合染色的区别以及各自的染色规律。为了探求不同的单独染色与复合染色在观察OA软骨组织切片中的相关作用,我们在软骨组织*SIRT1*基因条件性敲除的小鼠基础上,分析OA发生前后膝关节软骨组织中各种单独染色和复合染色对于膝关节软骨组织的观察效果,通过常规HE染色、番红O-固绿染色、番红O-阿利新蓝染色、番红O染色、固绿染色、阿利新蓝染色6种单独染色或复合染色方式探讨OA关节软骨组织形态学研究中的染色规律及应用中的优缺点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级B6;129-Sirt1tm1Ygu/J^[5](*SIRT1*^{co/co})小鼠和FVB-Tg(Col2a1-cre/ERT)KA3Smac/J^[6](Col2-CreERT2)小鼠,各3只雌性与3只雄性,12~13周龄,购买自美国杰克逊实验室。实验用小鼠饲养于北京大学/香港科技大学医学中心深圳医院实验动物中心[SYXK(粤)2015-0106]SPF级屏障区

域的PVC鼠笼内,持续过滤通气,自由饮食,清洁饮水,每日保持12 h光照/黑暗循环。实验流程和小鼠处理均遵循实验动物管理规范,并按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

Fast green solution、safranin O solution购自Scytek公司;苏木素购自广州速聚生物有限公司;伊红Y购自行知生物科技有限公司;阿利新蓝购自北京雷根生物技术有限公司;中性树胶购自国药集团化学试剂有限公司。

光学显微镜、组织自动脱水机、组织自动包埋机、石蜡切片机(德国Leica公司);高压灭菌器(日本Hirayama公司);超净台(苏净集团安泰公司);鼠台(河南省原阳县振华教学仪器公司);显微器械(上海医疗器械有限公司手术器厂);4℃冰箱(中国海尔公司);体视显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 软骨特异性敲除*SIRT1*基因小鼠的繁育

将*SIRT1*^{co/co}小鼠与Col2-CreERT2小鼠交配,获得Col2-CreERT2;*SIRT1*^{co/co}小鼠,15个月月龄Col2-CreERT2;*SIRT1*^{co/co}小鼠,腹腔注射他莫昔芬(10 mg/mL,1 mg/(mL·g),每日1次,连续注射5 d),即获得*SIRT1* cKO小鼠(*SIRT1*^{-/-}小鼠),从而更好的模拟OA在人群中的发病规律。基因敲除及鉴定方法参照本实验组前期研究^[4]。

1.3.2 实验分组及膝关节OA模型的建立

他莫昔芬注射完毕7 d后,*SIRT1*^{-/-}小鼠行右侧膝关节前交叉韧带横断加内侧半月板切除术建立OA模型,左侧膝关节仅切开滑膜囊行假手术作为对照,手术后3个月建立膝关节OA模型。实验样本分为2组:*SIRT1*^{-/-}小鼠假手术组(n=6,A组):*SIRT1*基因敲除,膝关节进行假手术;*SIRT1*^{-/-}小鼠骨关节炎模型组(n=6,B组):*SIRT1*基因敲除,膝关节手术造成OA模型。具体方法参照本实验组前期研究^[4]。

1.3.3 染色

HE染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,切片,苏木素染核15 min,流水冲洗1 min,静水放置5 min,0.5%伊红染液3 min,流水冲洗。

番红O-固绿染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,

切片,番红 O 染液滴染 20 min,自来水洗 10 s,60℃ 预热固绿滴染 30 s,蒸馏水急洗一次,番红 O 染液复合染色 10 min,自来水冲洗 10 s。

番红 O-阿利新蓝染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,切片,番红 O 染液滴染 20 min,流水冲洗,阿利新蓝染色液采用改良 Lison 法配制^[7],阿利新蓝染液 24 h,流水冲洗。

番红 O 染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,切片,番红 O 染液滴染 20 min,流水冲洗。

固绿染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,切片,60℃ 预热固绿滴染 30 s,流水冲洗。

阿利新蓝染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,切片,阿利新蓝染色液采用改良 Lison 法配制,阿利新蓝染液 24 h,流水冲洗。

2 结果

2.1 软骨整体情况

A 组小鼠软骨组织表面光滑平整,软骨各层结构清晰可以分辨,软骨细胞数量较多,形态均一,散在分布,部分细胞可以看到细胞核,II 型胶原分布较均匀,潮线平整光滑,位置适中,软骨下骨形态清晰。B 组小鼠软骨组织表面凹凸不平,部分位置出现糜烂、缺损,甚至出现钙化,软骨各层结构分辨不清,比较单一,软骨细胞数量减少,大小不等,成簇分布,II 型胶原遭到破坏,潮线扭曲不规则,出现前移,甚至有部分潮线可以看到血管通过,软骨下骨形态分辨不清(图 1、2)。

2.2 软骨细胞结构

A 组小鼠软骨组织切片中,软骨细胞的数量较多,形状多为圆形或类圆形,大小均一,在软骨各层中分布均匀,细胞核清晰可见,着色均匀。B 组小鼠软骨组织切片中,软骨细胞数量减少,在不同软骨层中数量有差异,细胞形状大小不一,分布紊乱甚至成簇分布,细胞核着色变浅。在软骨细胞结构的观察方面,复合染色分辨更加清晰,对于不同细胞结构着色有所差异,单独染色只能通过同一颜色的深浅分辨细胞不同结构。HE 染色可以看到软骨细胞的细胞核为蓝紫色,细胞质为粉红色;番红 O-固绿染色的细胞核为蓝绿色,细胞质淡红色;番红 O-阿利新蓝染色中细胞核为淡蓝色,细胞质淡红色;而在单独番红 O 染色、固绿染色、阿利新蓝染色中,细胞核和细胞质均为单一的颜色,仅深浅不同(图 1、2)。

2.3 软骨分层

A 组小鼠的大部分切片中,能够分清软骨表层、移行层、辐射层和钙化层,其中几种复合染色更容易观察到软骨的四层结构,在观察效果上单独染色要劣于复合染色,在不同单独染色和复合染色中,各层面积有所不同。B 组小鼠软骨组织四层结构分辨不清,由于表面的破坏使得部分软骨层缺失,但是在 B 组小鼠软骨组织的切片中,阿利新蓝染色、番红 O 染色这两种单独染色方式与其他单独染色方式相比,在观察软骨组织缺失上表现出一定的优势,缺少软骨组织的地方两种染料着色变浅,而在整体的观察效果上,复合染色方式仍然优于单独染色方式。HE 染色、番红 O-固绿染色、番红 O-阿利新蓝染色这几种复合染色中,可以看到以辐射层为中心向两侧分别产生颜色变化,而番红 O 染色、固绿染色、阿利新蓝染色这几种单独染色中颜色比较单一(图 1、2)。

2.4 II型胶原纤维

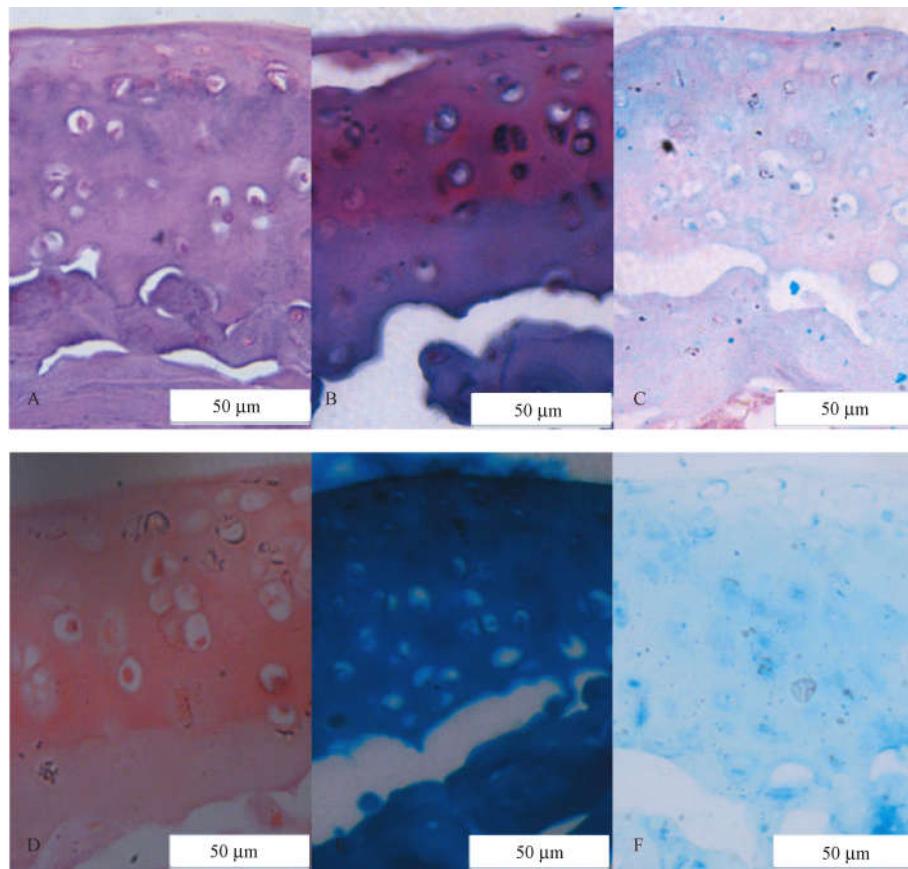
II 型胶原纤维是软骨组织特异性的胶原纤维,能够对软骨进行定位,不同染色方式下 II 型胶原的着色不同。A 组小鼠软骨组织切片中,II 型胶原可能仅由于小鼠年龄较大导致表达减少,整体破坏较轻,单独染色中着色比较均匀,复合染色中可因颜色的差异进行分辨。B 组小鼠软骨组织切片中,II 型胶原因为 OA 的发生而破坏严重,单独染色中着色变浅,复合染色中颜色单一。HE 染色和番红 O 染色中,该区域呈粉红色;固绿染色、阿利新蓝染色、番红 O-固绿染色和番红 O-阿利新蓝染色中该区域呈蓝绿色或淡蓝色。但是由于染料数量的不同,与单独染色相比,复合染色在分辨 II 型胶原中,由于颜色丰富效果更好(图 1、2)。

2.5 潮线

潮线可以区分软骨的深层和钙化层,呈波浪状。A 组小鼠软骨组织切片中,潮线完整光滑,位置适中,没有血管通过。B 组小鼠软骨组织切片中,潮线扭曲不规则,出现中断,发生前移,部分位置可以看到血管通过潮线。复合染色在观察潮线的过程中优势更加明显,能够明显看到潮线的形态以及周围的各种结构组织,单独染色仅能部分区分潮线形态,甚至无法分辨潮线(图 1、2)。

2.6 软骨下骨

A 组小鼠软骨组织切片中,软骨下骨较厚,染色均匀,结构比较规律。B 组小鼠软骨组织切片中,软骨下骨变薄,染色单一,结构紊乱。在观察效果上仍然是复合染色优于单独染色(图 1、2)。



注: A 为 HE 染色; B 为番红 O-固绿染色; C 为番红 O-阿利新蓝染色; D 为番红 O 染色; E 为固绿染色; F 为阿利新蓝染色。

图 1 $SIRT1^{-/-}$ 小鼠假手术组膝关节软骨组织形态($\times 400$)

Note. A is HE staining; B is Safranin O-fast green staining; C is Safranin O-alcian blue staining; D is Safranin O staining; E is fast green staining; F is Alcian Blue staining.

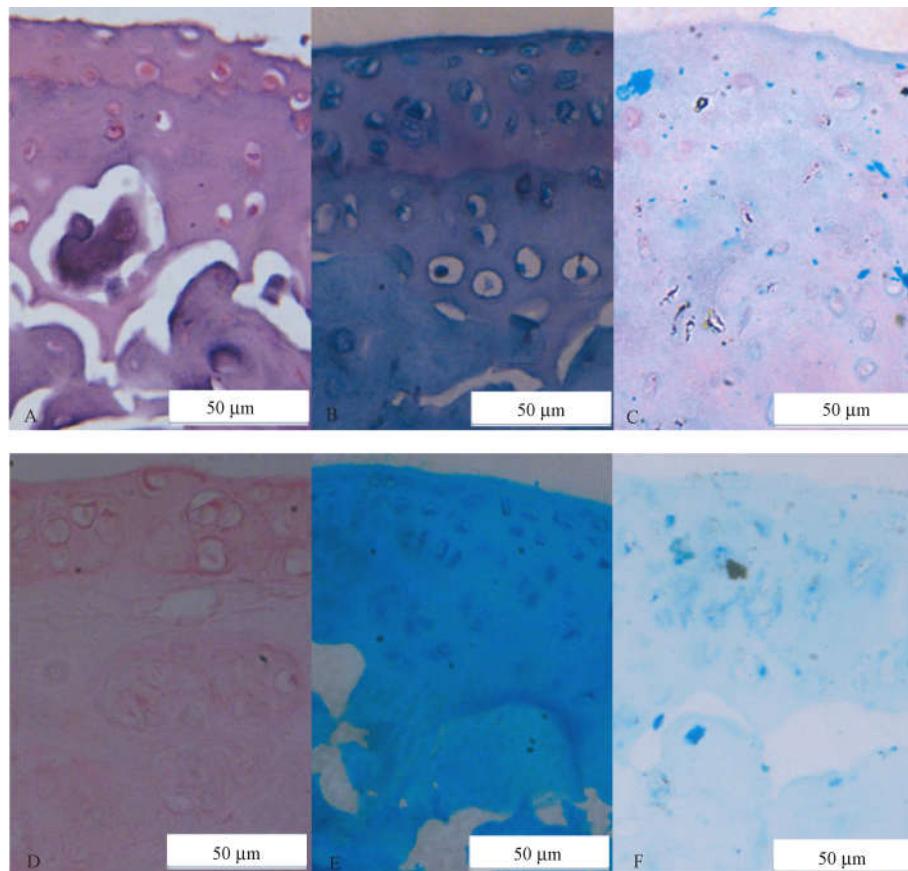
Fig. 1 Morphology of knee joint cartilage in the $SIRT1^{-/-}$ mice control group

3 讨论

OA 是一种与衰老、肥胖、遗传等因素密切相关的慢性退行性疾病, 病理特点是严重的、局限性软骨破坏, 深达骨质, 临幊上也出现相应的症状。 $SIRT1$ 基因因与衰老关系密切而参与到 OA 的发生发展过程中, 并且可以通过 PI3K/AKT^[2]、NF- κ B^[3] 等信号通路的作用影响到 OA 的进程, 当小鼠软骨组织中 $SIRT1$ 基因条件性敲除之后, 可以加重 OA 的发生发展, 从而更加有利于观察 OA 软骨组织的切片情况。因此, 我们利用软骨组织 $SIRT1$ 基因特异性敲除的小鼠膝关节 OA 模型, 观察不同单独染色及复合染色在观察 OA 软骨组织切片中的效果, 为后续研究提供便利的条件。

苏木素是一种碱性染料, 从洋苏木中提取, 氧化后可生成苏木精, 可将酸性成分染成蓝色。而伊

红是一种酸性染料, 可将细胞浆、结缔组织等染成红色或粉红色。苏木素常与伊红同时使用, 作为病幊学中常规的 HE 染色, 用于与其他染色方式进行对照。阿利新蓝是一种大分子共轭染料, 该染料带有阳离子, 可与酸性基团相结合, 从而形成不溶性复合物^[8]。在软骨组织中, 阿利新蓝可以与黏多糖结合, 将软骨细胞及软骨基质染成浅蓝色, 从而对软骨组织特异性着色。番红 O 是一种碱性染料, 可与蛋白多糖结合, 而软骨组织是一种嗜酸性的组织, 与番红 O 结合后软骨基质及软骨细胞特异性的红染。固绿则为一种酸性染料, 可与蛋白结合, 并与嗜酸性的骨结合形成蓝绿色^[9]。不同染色方法因染料的不同而具有一定的特异性, 从而使物质显现出不同的效果, 鉴于我们以往研究中发现, 在软骨组织中观察比较多的几个结构分别为软骨细胞的细胞形态、软骨分层结构的情况、II 型胶原纤维的



注:A为HE染色;B为番红O-固绿染色;C为番红O-阿利新蓝染色;D为番红O染色;E为固绿染色;F为阿利新蓝染色。

图2 *SIRT1^{-/-}*小鼠骨关节炎模型组膝关节软骨组织形态($\times 400$)

Note. A is HE staining; B is Safranin O-fast green staining; C is Safranin O-alcian blue staining; D is Safranin O staining; E is fast green staining; F is Alcian Blue staining.

Fig. 2 Morphological changes of knee joint cartilage in the *SIRT1^{-/-}* mouse OA model group

显示、潮线及软骨下骨的分辨作为对比重点,用于研究几种单独染色及复合染色的效果。

我们在研究中发现,*SIRT1*基因敲除后OA发生时,软骨组织破坏严重,软骨细胞数量减少,形态不一,分布紊乱,细胞结构难以观察,软骨层变薄,四层结构更难分辨,II型胶原破坏,染色面积减少,潮线扭曲不规则,发生前移,部分位置有血管通过,软骨下骨变薄,结构不规律。复合染色在整体观察效果上优于单独染色,在软骨细胞结构、软骨分层、II型胶原和软骨下骨的观察上,复合染色由于多种染料的存在,使不同结构或者部位着色不同,更容易区分辨别不同的结构及部位。例如在软骨细胞的观察中,HE染色可以看到软骨细胞的细胞核为蓝色,细胞质为粉红色;番红O-固绿染色的细胞核为蓝绿色,细胞质淡红色;番红O-阿利新蓝染色中细胞核为淡蓝色,细胞质淡红色;而在单独番红O

染色、固绿染色、阿利新蓝染色中,细胞核和细胞质均为单一的颜色。在软骨分层的观察中,复合染色可以看到以辐射层为中心向两侧分别产生颜色变化,单独染色中颜色则比较单一。在潮线的观察上,复合染色效果也优于单独染色,复合染色可在潮线处因颜色的交替呈现出明显的界线,从而更好的反应潮线情况,单独染色则没有这个优势。然而,单独染色也有其一定的好处,比如在观察软骨组织的缺失方面,阿利新蓝染色和番红O染色中,缺失软骨处颜色变浅甚至消失,比其他单独染色和复合染色更加明显。另外,单独染色所用试剂较少,与复合染色相比,价格低、操作简单,而且染色成功的几率更高。

综上所述,不同的单独染色及复合染色,在观察*SIRT1*基因敲除小鼠膝关节骨关节炎软骨组织切片时有不同特点,番红O-固绿染色、番红O-阿利新

蓝染色在观察软骨细胞的细胞形态、软骨分层结构的情况、II 型胶原纤维的显示、潮线及软骨下骨的改变中,效果更好;而番红 O 染色、固绿染色在观察软骨组织缺失方面有一定的优势;固绿染色单独使用效果不如前几种染色好。在研究中,应该结合实验室的研究条件、经费、实验周期长短等多种因素综合选择染色方法,以得到预期的效果。

参考文献:

- [1] Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41: 1343–1355.
- [2] Yu F, Zeng H, Lei M, et al. The effects of SIRT1 gene knockout through the activation of SREBP2 protein mediated PI3K/AKT signal pathway on osteoarthritis in mice [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2016, 36(5): 683–690.
- [3] Lei M, Wang JG, Xiao DM, et al. Resveratrol inhibits interleukin 1 β -mediated inducible nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes by activating SIRT1 and thereby suppressing nuclear factor- κ B activity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(2–3): 73–79.
- [4] 于斐,雷鸣,曾晖,等.高龄小鼠沉默信息调节因子 1 基因敲除后膝关节骨关节炎模型的建立 [J].中国组织工程研究杂志,2015,19(49):7895–7901.
- [5] Bonzo, Brocker C, Jiang C, et al. Hepatic sirtuin 1 is dispensable for fibrate-induced peroxisome proliferator-activated receptor- α function in vivo [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 306(7): E824–E837.
- [6] Nakamura, Nguyen MT, Mackem S. Kinetics of tamoxifen-regulated Cre activity in mice using a cartilage-specific CreER(T) to assay temporal activity windows along the proximodistal limb skeleton [J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(9): 2603–2612.
- [7] 李彦会,刘永春,史敏.三种阿利新蓝染色方法效果观察 [J].河北医科大学学报,2005,26(6):464.
- [8] 张巧全,余年,林兴建,等.阿利新蓝染色对脑膜瘤的诊断价值 [J].临床神经病学杂志,2015,28(1):46–48.
- [9] 姚瑞娟,孙爱军,施丽英,等.番红 O-固绿染色在关节组织学应用的改进 [J].解剖学杂志,2011,34(5):716–718.

[收稿日期] 2017–02–07

(上接第 33 页)

- [19] Tellow LC, Woolley DE. Expression of vitamin D receptors and matrix metalloproteinases in osteoarthritic cartilage and human articular chondrocytes in vitro [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2001, 9(5): 423–431.
- [20] Li S, Niu G, Wu Y, et al. Vitamin D prevents articular cartilage erosion by regulating collagen II turnover through TGF- β 1 in ovariectomized rats [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2016, 24(2): 345–353.
- [21] Neu CP, Khalafi A, Komvopoulos K, et al. Mechanotransduction of bovine articular cartilage superficial zone protein by transforming growth factor beta signaling [J]. *Arthritis Rheumat*, 2007, 56(11): 3706–3714.
- [22] Miyatake K, Iwasa K, Mcnary S M, et al. Modulation of superficial zone protein/lubricin/PRC4 by kartogenin and transforming growth factor-beta1 in surface zone chondrocytes in bovine articular cartilage [J]. *Cartilage*, 2016, 7(4): 388–397.
- [23] 李思维,牛国栋,刘忠军,等. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 调控关节软骨 II 型胶原降解的实验研究 [J]. 中华骨与关节外科杂志, 2015, 8(2): 161–166.
- [24] Young AA, McLennan S, Smith MM, et al. Proteoglycan 4 downregulation in a sheep meniscectomy model of early osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(2): R41–R51.
- [25] Jay GD, Fleming BC, Watkins BA, et al. Prevention of cartilage degeneration and restoration of chondroprotection by lubricin tribosupplementation in the rat following anterior cruciate ligament transection [J]. *Arthr Rheumat*, 2010, 62(8): 2382–2391.
- [26] Lee SY, Niikura T, Reddi AH. Superficial zone protein (lubricin) in the different tissue compartments of the knee joint: modulation by transforming growth factor beta 1 and interleukin-1 beta [J]. *Tissue Eng Part A*, 2008, 14(11): 1799–1808.
- [27] Oestergaard S, Sondergaard BC, Hoegh-Andersen P, et al. Effects of ovariectomy and estrogen therapy on type II collagen degradation and structural integrity of articular cartilage in rats: implications of the time of initiation [J]. *Arthr Rheumat*, 2006, 54(8): 2441–2451.
- [28] Richette P, Dumontier MF, Francois M, et al. Dual effects of 17β -oestradiol on interleukin 1 β -induced proteoglycan degradation in chondrocytes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63(2): 191–199.
- [29] Arden NK, Cro S, Sheard S, et al. The effect of vitamin D supplementation on knee osteoarthritis, the VIDEO study: a randomised controlled trial [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2016, 24(11): 1858–1866.

[收稿日期] 2017–04–20