

大鼠尾椎间盘不同切片方式及染色方法的组织学观察比较

赵宇朋^{1,2}, 周平辉^{1,2}, 官建中^{1,2}

(1. 蚌埠医学院第一附属医院骨科, 蚌埠 233000; 2. 安徽省组织移植重点实验室, 蚌埠 233000)

[摘要] 目的 比较大鼠尾椎间盘不同切片方式及染色方法的优缺点, 为相应的临床诊断及实验研究奠定理论基础。方法 收集SD大鼠尾椎间盘, 制成冷冻切片及石蜡切片后, 分别行苏木精-伊红染色(HE染色)、番红-固绿染色、Masson染色、甲苯胺蓝染色, 以及针对一型胶原蛋白(type I collagen, COL-I)、二型胶原蛋白(type II collagen, COL-II)和糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)的免疫荧光染色, 对比观察椎间盘各层组织形态及蛋白表达的情况。结果 在染色方法中, 石蜡切片HE染色能清晰显示各层组织; Masson染色能清晰显示纤维环组织及髓核组织; 番红-固绿染色及甲苯胺蓝染色能较好地显示软骨各层及软骨下骨结构。冷冻切片的免疫荧光染色中, 纤维环组织的胶原蛋白多为COL-I, 髓核组织中胶原蛋白多为COL-II, 而GAG多由髓核细胞及髓核样细胞分泌。结论 观察椎间盘各层组织时, 选用HE染色及Masson染色等染色, 其中石蜡切片优于冷冻切片; 观察椎间盘各种蛋白的表达及分布时, 选用免疫荧光染色, 其中冷冻切片优于石蜡切片。

[关键词] 椎间盘; 石蜡切片; 冷冻切片; 免疫荧光; 特殊染色; 大鼠

[中图分类号] R-33; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0100-08

Comparison of Different Slicing and Staining Methods of Caudal Intervertebral Discs in Rats

ZHAO Yupeng^{1,2}, ZHOU Pinghui^{1,2}, GUAN Jianzhong^{1,2}

(1. Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China; 2. Key Laboratory of Tissue Transplantation of Anhui Province, Bengbu 233000, China)

Correspondence to: Guan Jianzhong, E-mail: jzguan2002@163.com

[Abstract] **Objective** To compare the advantages and disadvantages of different slicing and staining methods of caudal intervertebral disc in rats, so as to provide a theoretical basis for clinical diagnosis and experimental research. **Methods** The caudal intervertebral discs of SD rats were collected and made into frozen sections and paraffin sections. Hematoxylin-eosin staining (HE staining), safranin O-fast green staining, Masson staining, and toluidine blue staining of the caudal intervertebral disc sections, and immunofluorescence staining of type I collagen (COL-I), type II collagen (COL-II) and glycosaminoglycan (GAG) were performed to observe the tissue morphology and protein expression. **Results** Of the selected staining methods, HE staining of the paraffin sections clearly showed each layer structure of intervertebral discs; Masson staining results showed fibrous annulus tissues and nucleus pulposus tissues; safranin O-fast green staining and toluidine blue staining results showed cartilage layers and subchondral bone structures. In the frozen sections with immunofluorescence staining, COL-I was dominant in fibrous annulus, COL-II was dominant in nucleus pulposus, and GAG was mainly secreted by nucleus pulposus cells and nucleus

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31700854); 蚌埠医学院科研创新团队(BYKC201910); 蚌埠医学院研究生创新计划(BYYCXZ1929)

[作者简介] 赵宇朋(1995—), 男, 硕士研究生, 从事骨组织工程学研究。E-mail: 15255222891@163.com

[通信作者] 官建中(1971—), 男, 硕士, 主任医师, 教授, 从事修复医学与骨组织工程学研究。E-mail: jzguan2002@163.com

pulposus-like cells. **Conclusion** When observing the layer structure of intervertebral discs, staining techniques such as HE staining and MASSON staining should be chosen, and paraffin sections are better than frozen sections. When observing the expression and distribution of various proteins of intervertebral discs, immunofluorescence should be selected, and frozen sections are superior to paraffin sections.

[Key words] Intervertebral disc; Paraffin section; Frozen section; Immunofluorescence; Special staining; Rats

椎间盘疾病是引起下腰痛的最常见原因之一。在全球范围内,椎间盘疾病的终生患病率高达总人口的84%,而且严重的椎间盘疾病致残率较高,易导致巨大的医疗/社会成本。最新研究表明,全美国每年用于诊断和治疗椎间盘退行性变的费用高达859~1 000亿美元^[1-2]。

大鼠是骨科研究常用的实验动物之一,因其尾椎与人体椎间盘有相似的解剖构造,研究者常用大鼠尾椎间盘模拟正常的人体椎间盘^[3-4]。而组织形态学观察常用于椎间盘退行性变的临床诊断及基础研究,在深入探讨其发病机制及治疗方法上起着重要的作用^[5-6]。椎间盘切片方法包括石蜡切片和冷冻切片。因切片方法及染色步骤的不同,椎间盘染色结果在大体形态学、免疫组织化学和免疫荧光等方面均存在差异^[7]。笔者查阅文献发现,很少有研究者探究大鼠尾椎间盘不同切片方式及染色方法得到的观察结果的差异性。因此,本研究拟制作横切及纵切的SD大鼠尾椎间盘石蜡切片标本及冷冻切片标本,并分别行苏木精-伊红染色(HE染色)、Masson染色、番红-固绿染色、甲苯胺蓝染色及免疫荧光染色,观察椎间盘骨性结构、软骨终板、纤维环组织、髓核组织四层结构的组织学特点,以及一型胶原蛋白(collagen type I, COL-I)、二型胶原蛋白(collagen type II, COL-II)和糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)在椎间盘组织中的表达及分布情况,从而分析对比2种切片方法和5种染色方法对病理检测结果的影响,为椎间盘相关研究提供理论及实践数据^[6]。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性SD大鼠12只,平均体质量为250 g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司

[SCXK(鲁)2019-0003],饲养于蚌埠医学院科研楼组织工程学实验室[SYXK(皖)2017-001]。本研究经蚌埠医学院实验动物福利伦理委员会审查批准,编号为伦动科批字2019第100号。

1.2 实验试剂及实验仪器

HE染色试剂盒、Masson染色试剂盒、番红-固绿染色试剂盒及甲苯胺蓝染色试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;兔抗鼠COL-I多克隆抗体(工作液体积稀释比例为1:200)、兔抗鼠COL-II多克隆抗体(1:200)和兔抗鼠GAG多克隆抗体(1:200)均购自美国Affinity公司;羊抗兔Cy3抗体(1:150)购自武汉三鹰生物技术有限公司;Hoechst 33342(4 μg/mL)、质量分数为4%的多聚甲醛溶液、PBS平衡盐溶液 and EDTA脱钙液(pH7.2)均购自北京兰杰柯科技有限公司。

荧光显微镜(型号Obsever Z1)购自德国ZEISS公司;冷冻切片机(型号CM3050 S)购自德国Leica公司;石蜡切片机(型号EM2245)购自北京盛科信德科技有限公司。

1.3 实验取材

腹腔麻醉后以颈椎脱臼法处死SD大鼠,然后于动物手术室依次剥离大鼠尾部皮肤、筋膜、肌层,取出圆环状尾椎间盘标本,放置于4%多聚甲醛溶液中浸泡12 h后取出。用PBS冲洗标本3次,最后放置于EDTA脱钙液(pH7.2)中脱钙30 d,每隔24 h更换一次新鲜的脱钙液。

1.4 切片方法

分别采用冷冻切片法和石蜡切片法进行组织切片(均包括横切和纵切),两种切片制作方法的对比如表1所示。无论冷冻切片还是石蜡切片,均需经过梯度乙醇溶液脱水及包埋机处理。相比冷冻切片而言,石蜡切片的操作步骤繁琐,须经高温处理,但组织切片较薄,不易脱片。

表 1 大鼠尾椎间盘冷冻切片及石蜡切片的方法对比

Table 1 Comparison of preparation methods for frozen sections and paraffin sections of caudal intervertebral discs in rats

	冷冻切片	石蜡切片
准备	取出尾椎间盘, 修剪多余组织; PBS 浸泡 3 次, 每次 5 min	操作同冷冻切片
脱水	乙醇溶液梯度脱水(70%、80%、95% 和 100% 乙醇溶液依次脱水 30 min)	乙醇溶液梯度脱水(70%、80%、95% 和 100% 乙醇溶液依次脱水 1 h)
透明	—	正丁醇透明过夜
浸蜡	—	石蜡浸泡过夜
包埋	用 OCT 包埋剂置换标本中残余乙醇, 并于包埋盒中进行包埋	将浸蜡后的标本移入包埋机石蜡中, 以利于切片
切片	用冷冻切片机—21℃常规冷冻切片, 切片厚度为 9 μm	用石蜡切片机切成 4 μm 左右的石蜡带, 随后进行摊片及烤片。

1.5 染色方法

1.5.1 HE 染色

石蜡切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液脱水后, 用苏木精浸染 6 min, 随后经盐酸乙醇溶液分化数秒, 用伊红浸染 10 min, 最后用梯度乙醇溶液脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。冷冻切片无需二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液处理, 于常温下晾干后直接行 HE 染色。

1.5.2 Masson 染色

石蜡切片脱蜡脱水同 HE 染色, 随后用苏木精染色细胞核 5 min, 经盐酸乙醇溶液分化数秒后, 用温水返蓝 4~6 min; 用 Masson 试剂盒中丽春红试剂温染及冰醋酸浸洗后, 将切片浸入 2% 苯胺蓝液复染, 最后行二甲苯透明及中性树胶封固。冷冻切片无需二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液处理, 于常温下晾干后直接依上述步骤行 Masson 染色。

1.5.3 番红-固绿染色

石蜡切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液脱水后, 用 1% 番红染液浸染 2 min, 用 1% 固绿染液对比染色 1 min; 经体积分数 95% 的乙醇溶液分化数秒后, 用番红染色 3 min; 再经体积分数为 95% 的乙醇溶液分化数秒后, 自然晾干, 二甲苯透明, 中性树胶封固。冷冻切片无需二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液脱水, 其余操作同石蜡切片。

1.5.4 甲苯胺蓝染色

石蜡切片经二甲苯脱蜡后, 梯度乙醇溶液

脱水, 用甲苯胺蓝染色约 30 min, 随后用自来水冲洗, 冰醋酸分化至细胞核清晰, 再用乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。冷冻切片无需二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液脱水, 其余操作同石蜡切片。

1.5.5 免疫荧光染色

将 4℃ 保存的石蜡切片置于 25℃ 复温, 然后转移至 60℃ 烤箱中烘片 2 h; 进行二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 经枸橼酸钠缓冲液沸水浴 15 min 行抗原修复, PBS 洗涤 15 min; 经透膜液透膜, 用免疫组织化学笔将切片四周画一圈, 加入正常山羊血清封闭 20 min; 加入一抗(分别为兔抗鼠 COL-I、COL-II 和 GAG 多克隆抗体, 工作液体积稀释比例均为 1:200), 孵育过夜; PBS 洗涤后, 加入二抗(Cy3 标记的羊抗兔抗体, 工作液体积稀释比例为 1:150), 孵育 2 h; 经 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 随后用 Hoechst 33342 (2.5 μg/mL) 染色细胞核, 并用甘油封固; 切片干燥后, 置于荧光显微镜下观察。冷冻切片无需二甲苯脱蜡, 也不需要行抗原修复, 其余操作同石蜡切片。

1.6 实验观察指标

主要通过荧光显微镜于明场及荧光状态下观察骨、软骨终板、椎间关节、纤维环组织和髓核组织的形态完整性, 以及 COL-I、COL-II 和 GAG 蛋白在上述尾椎间盘组织结构中的分布情况, 放大倍数分别为 100 倍及 200 倍。

2 结果

2.1 组织学染色

2.1.1 尾椎间盘石蜡切片标本染色

大鼠尾椎间盘石蜡切片标本用不同方法染色的结果如图 1 所示。HE 染色可见：椎间盘纵切面上骨、软骨终板、纤维环组织和髓核组织四层结构清晰；纤维环组织呈环状排列，纤维蛋白排列柔和规整，纤维环组织与髓核界限较为清晰；纤维环细胞与髓核细胞呈梭形，核质分明，红蓝颜色适度；软骨下骨及骨小梁结构完整。Masson 染色可见：椎间盘形态结构完整、清晰；胶原纤维呈蓝色，胶原纤维层与肌层红蓝相间，界限明显，可见明显的胶原纤维网；椎间盘纤维环排列规整柔顺，与髓核组织分界清晰明显，能较好地反映纤维组织的形态。番红 - 固绿染色可见：纵切面上，椎间盘四层结构清晰可见，红绿对比明显，软骨基质呈均匀红色；纤维环 - 髓核组织分界线大致清晰，但不如 Masson 染色界限明显，能较好地呈现椎间盘结构的正常形态。甲苯胺蓝

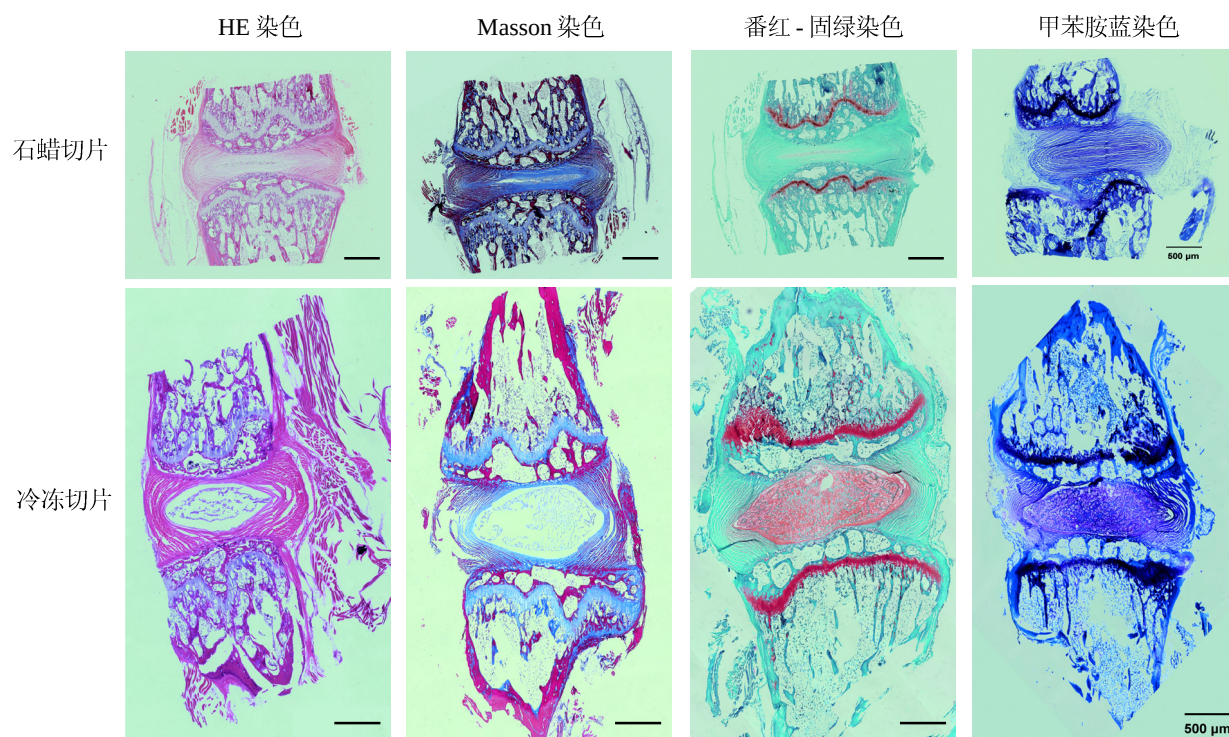
染色可见：纵切面上，椎间盘形态大致清晰，上下软骨终板呈蓝紫色；软骨细胞核染色清晰，与纤维环分界清楚，能够较好地呈现椎间软骨形态。

2.1.2 尾椎间盘冷冻切片染色

大鼠尾椎间盘冷冻切片标本用不同方法染色的结果如图 1 所示。HE 染色、Masson 染色、番红 - 固绿染色和甲苯胺蓝染色结果均显示：整个冷冻切片大致能表现出髓核组织、纤维环组织、上下软骨终板及椎骨；但是整体而言，相对于石蜡切片，整张冷冻切片破碎感明显，髓核组织不能完全呈现；另外，用同样的染色液染色时，冷冻切片比石蜡切片的颜色更为艳丽。

2.2 免疫荧光染色

大鼠椎间盘石蜡切片的免疫荧光染色效果很差（图略），可能与制片过程中高温导致结合抗原脱落有关；而冰冻切片的免疫荧光染色结果良好，如图 2 和图 3 所示。其中，免疫荧光试剂 Hoechst 将纤维环细胞及髓核细胞的细胞核染成蓝紫色，COL- I、COL- II 和 GAG 经 Cy3 试剂交联后被染成明显的红色荧光。100 倍视野下



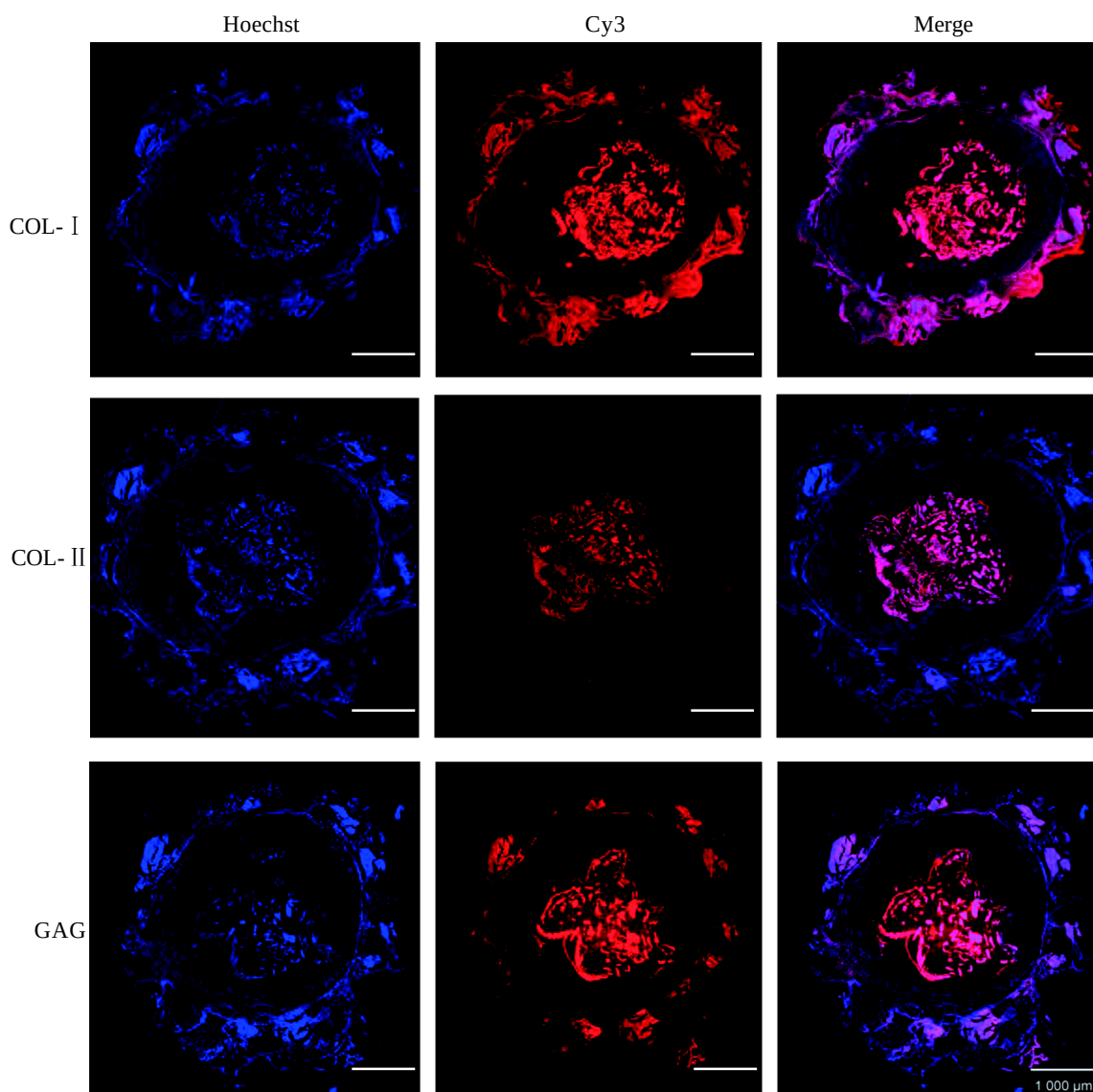
注：各图放大倍数相同，标尺均为 500 μm 。

图 1 大鼠尾椎间盘石蜡切片（纵切）和冷冻切片（纵切）不同方法染色的结果对比（ $\times 100$ ）

Figure 1 Comparison of different staining results of longitudinal paraffin sections and longitudinal frozen sections of caudal intervertebral discs in rats ($\times 100$)

可观察到椎间盘组织的宏观形态,以明确髓核组织与纤维环组织的形态分布(图2)。由图2可见,在椎间盘横切面上,纤维环组织与髓核组织界限分明;COL-I在纤维环组织中显著表达;COL-II在髓核及纤维环中均表达,但在髓核中表达较多;GAG多由髓核细胞及髓核样细胞分泌,广泛存在于髓核组织中,而在纤维环组织中几乎不表达。

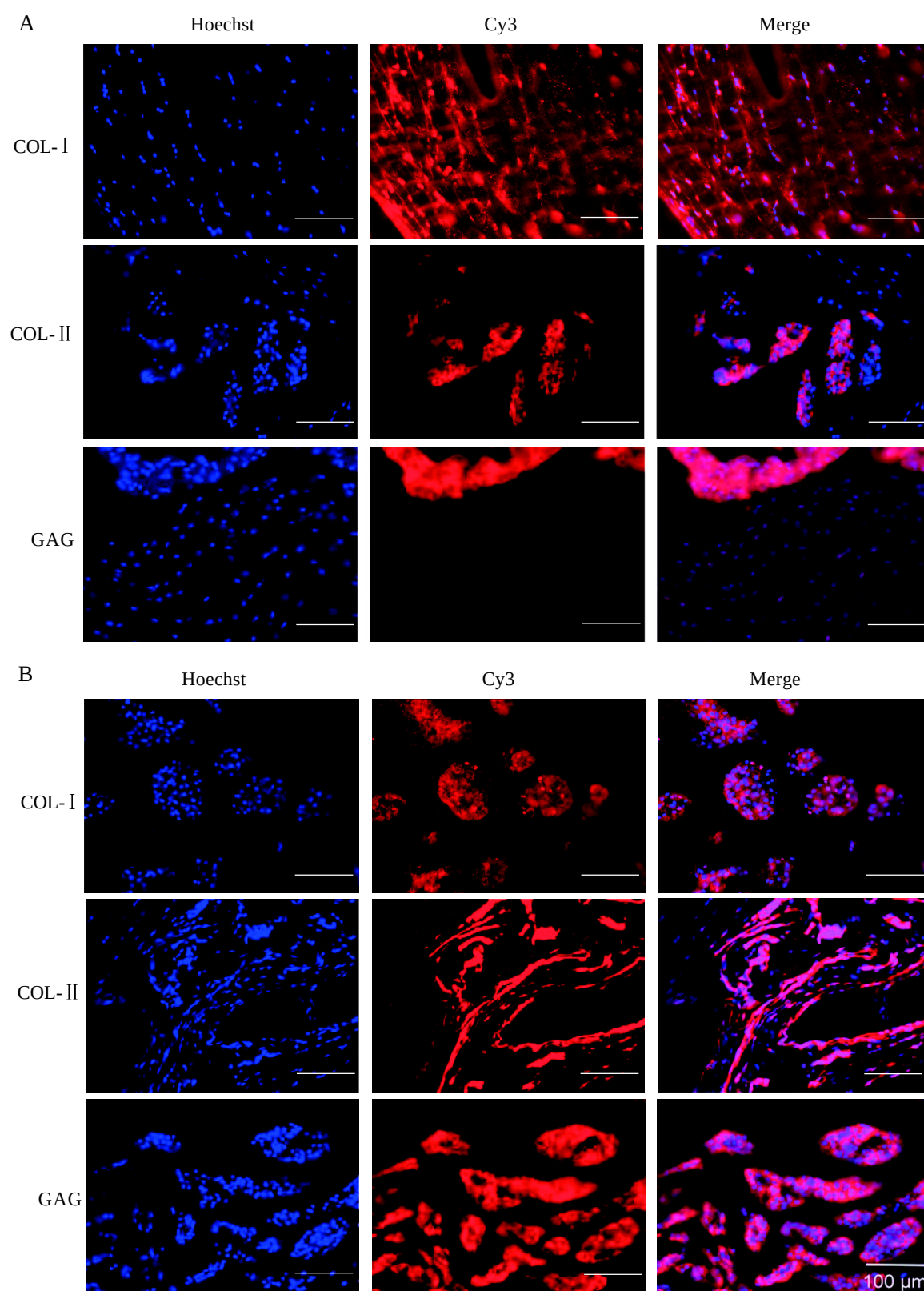
进一步提高观察倍数,在200倍视野下更清晰地观察椎间盘组织中形态蛋白的表达分布差异(图3),A为纤维环的免疫荧光结果,B为髓核组织的免疫荧光结果。由图3可见,COL-I在纤维环组织中较多表达;COL-II在纤维环组织及髓核组织中均表达,但在髓核组织中表达较多;GAG在髓核组织中荧光明亮饱满,在纤维环组织中仅有少量伪影存在。



注:免疫荧光试剂Hoechst染色细胞核,Cy3标记的二抗结合目的蛋白一抗,Merge为两者的集合。COL-I为一型胶原蛋白,COL-II为二型胶原蛋白,GAG为糖胺聚糖。各图放大倍数相同,标尺均为1 000 μm 。

图2 大鼠尾椎间盘冷冻切片(横切)的免疫荧光结果($\times 100$)

Figure 2 Immunofluorescence results of cross frozen sections of caudal intervertebral discs in rats ($\times 100$)



注：A 为纤维环的免疫荧光结果；B 为髓核组织的免疫荧光结果；COL- I 为一型胶原蛋白，COL- II 为二型胶原蛋白，GAG 为糖胺聚糖。各图放大倍数均相同，标尺均为 100 μm。

图 3 大鼠尾椎间盘横切面上 COL- I、COL- II 和 GAG 的局部表达情况 (× 200)

Figure 3 Local expressions of COL- I, COL- II and GAG in cross sections of caudal intervertebral discs in rats (× 200)

3 讨论

椎间盘退行性疾病是我国乃至世界范围内最为常见的骨科疾病之一,是胸腰背疼痛的主要原因,给社会带来很大的健康隐患和经济负担。正常人体椎间盘位于上下椎体之间,其包括内侧的髓核、外侧的纤维环及上下软骨终板^[8]。正常的椎间盘具有一个密闭的微环境,营养物质供应依赖于椎间盘上下软骨终板的细小毛细血管,使椎间盘拥有分散应力、维持椎体高度和正常运动的功能,正常的椎间盘微环境具有低氧、高乳酸、低pH及高渗的特点^[9]。纤维环组织是非均一性的组织,其由20~25层同心圆环状结构组成。大体上,纤维环组织由内向外可分为内、中、外3个区域,各区域的细胞类型、微观结构和生化组成各不相同。纤维环组织中含有丰富的I型胶原纤维,其与椎间韧带一起维持了脊柱前屈后伸等运动。纤维环的破裂是椎间盘退行性变发生的病理生理机制^[10]。髓核组织呈胶冻样,包括细胞及细胞外基质,细胞包括髓核间充质干细胞及终末分化的髓核细胞,细胞外基质包括聚集蛋白聚糖、蛋白多糖,以及包绕成核状的II型胶原纤维^[8]。

正常状态下细胞外基质的合成与分解处于动态平衡,而炎症因子诱导的髓核细胞外基质稳态的打破是发生椎间盘退行性变的最主要原因^[11]。病理学诊断能在宏观形态和微观结构上反映炎症因子、细胞质蛋白等在椎间盘组织中的表达水平,同样,特殊染色方法在辨认椎间盘骨、软骨终板、纤维环组织和髓核组织四层结构的完整性上有不可忽视的作用^[12-13]。

HE染色是最常用的染色方法之一^[14],能清晰地显示椎间盘各层组织,在分辨骨及软骨终板的形态方面具有参考意义。Masson染色对于椎间盘胶原纤维的分辨及髓核组织与纤维环组织的分辨明显优于HE染色,可见明显的胶原纤维网,能较好地反映纤维组织的形态,是检测椎间盘组织较为适合的染色方法之一。番红-固绿染色及甲苯胺蓝染色在椎间盘各层结构的显色及组织形态学方面都不及Masson染色,但是可以明显看到骨与软骨的分布及各层结构,对于椎间盘椎小关节失衡和软骨终板炎的诊断有临床价值^[15]。

相对于上述染色方法,免疫荧光技术在组织胶原蛋白定位的研究上具有敏感度高、特异度高和精确度高的特点,可用于微量蛋白的检测,以及COL及GAG分布的定量分析^[16-17]。本研究中,免疫荧光染色结果如图2所示,纤维环组织中胶原蛋白大部分为COL-I,伴有少量COL-II;髓核组织中胶原蛋白大部分为COL-II,少量为COL-I;GAG多由髓核细胞及髓核样细胞分泌。

石蜡切片及冷冻切片均是检测椎间盘组织病理形态学的常规方法^[18]。本研究发现,石蜡切片操作复杂,经过高温、浸蜡等操作时,椎间盘组织表面的待测抗原极易脱落,荧光染色结果很不理想^[19]。相反,冷冻切片无需高温操作,制片方法简单易行;而且椎间盘横切片荧光蛋白完整,层次分明;免疫荧光结果清亮通透,荧光层次分明,纤维环及髓核组织中的COL-I、COL-II和GAG等成分荧光明显,有良好的临床基础及实验价值。但是对于椎间盘形态学检测,石蜡切片的效果要优于冷冻切片。石蜡切片所制的椎间盘标本经染色后软骨基质损伤较少,切片染色较好,纤维环组织及髓核组织细胞形态良好,细胞核染色清晰可见,整个切片经染色后几乎无脱片;而且染色步骤顺利,所需染色时间短。对于冷冻切片而言,其切片厚度约为9 μm,厚于石蜡切片的5 μm;即使使用防脱载玻片,经染色后,整个切片仍明显脱片,染色情况较差;而且染色过程耗时较长,切片着色结果较差。

本研究还对比了大鼠尾椎间盘横向及纵向切片情况,发现对于石蜡切片而言,因骨、软骨终板、纤维环组织和髓核组织的组织密度不同,在本实验条件下很难制作出椎间盘横向切片;但是对于冷冻切片而言,因为包埋剂的软化作用,可以制作出厚度约为9或10 μm的椎间盘横向或纵向切片。进一步观察椎间盘的组织学形态,发现纵向的椎间盘切片包括了骨、软骨终板、纤维环组织及髓核组织四层结构,有良好的临床价值;但对于观察椎间盘髓核组织是否膨出,纤维环组织的完整性,COL-I、COL-II及GAG的分布情况而言,横向的椎间盘切片有组织学优势^[20]。

病理学检测是研究椎间盘退行性变的实验基

础,但大多数实验人员在判断及选择切片形式及染色方法上耗费了大量的时间与精力。本研究比较了大鼠尾椎间盘不同切片方式及染色方法的组织学观察结果差异性,为相应的基础研究者提供了一定的理论依据及实验经验。

参考文献:

- [1] GOUBERT D, OOSTERWIJCK J V, MEEUS M, et al. Structural changes of lumbar muscles in non-specific low back pain: A systematic review[J]. *Pain Physician*, 2016, 19(7): E985-E1000.
- [2] CHOI H, TESSIER S, SILAGI E S, et al. A novel mouse model of intervertebral disc degeneration shows altered cell fate and matrix homeostasis[J]. *Matrix Biol*, 2018, 70: 102-122. DOI:10.1016/j.matbio.2018.03.019.
- [3] VINCENT K, MOHANTY S, PINELLI R, et al. Aging of mouse intervertebral disc and association with back pain [J]. *Bone*, 2019, 123:246-259. DOI:10.1016/j.bone.2019.03.037.
- [4] CHEN T, CHENG X F, WANG J C, et al. Time-course investigation of intervertebral disc degeneration induced by different sizes of needle punctures in rat tail disc[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:6456-6465. DOI:10.12659/MSM.910636.
- [5] JI H Z, LI J Y, SHAO J, et al. Histopathologic comparison of condylar hyperplasia and condylar osteochondroma by using different staining methods[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2017, 123(3):320-329. DOI:10.1016/j.oooo.2016.10.027.
- [6] SCHWAN S, LUDTKA C, FRIEDMANN A, et al. Long-term pathology of ovine lumbar spine degeneration following injury via percutaneous minimally invasive partial nucleotomy[J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(11):2376-2388. DOI:10.1002/jor.24402.
- [7] YU J S, YANG T, DAI J W, et al. Histopathological features of condylar hyperplasia and condylar Osteochondroma: a comparison study[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2019, 14(1): 293. DOI:10.1186/s13023-019-1272-5.
- [8] LAWSON L Y, HARFE B D. Developmental mechanisms of intervertebral disc and vertebral column formation[J]. *Wiley Interdiscip Rev: Dev Biol*, 2017, 6(6): e283. DOI: 10.1002/wdev.283.
- [9] LAMA P, ZEHRA U, BALKOVEC C, et al. Significance of cartilage endplate within herniated disc tissue[J]. *Eur Spine J*, 2014, 23(9):1869-1877. DOI:10.1007/s00586-014-3399-3.
- [10] BOWLES R D, SETTON L A. Biomaterials for intervertebral disc regeneration and repair[J]. *Biomaterials*, 2017, 129: 54-67. DOI:10.1016/j.biomaterials.2017.03.013.
- [11] IRIUCHISHIMA T, RYU K. Bicruciate substituting total knee arthroplasty improves stair climbing ability when compared with cruciate-retain or posterior stabilizing total knee arthroplasty[J]. *Indian J Orthop*, 2019, 53(5):641-645. DOI:10.4103/ortho.IJOrtho_392_18.
- [12] 袁维, 周小小, 蔡攀, 等. 终板下椎体缺血诱导兔椎间盘退行性变模型的建立及终板中内皮素1的表达[J]. *脊柱外科杂志*, 2020, 18(2):118-124. DOI:10.3969/j.issn.1672-2957.2020.02.010.
- [13] XIAO Z F, HE J B, SU G Y, et al. Osteoporosis of the vertebra and osteochondral remodeling of the endplate causes intervertebral disc degeneration in ovariectomized mice[J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1):207. DOI:10.1186/s13075-018-1701-1.
- [14] CHLIPALA E, BENDZINSKI C M, CHU K, et al. Optical density-based image analysis method for the evaluation of hematoxylin and eosin staining precision[J]. *J Histotechnol*, 2020, 43(1):29-37. DOI:10.1080/01478885.2019.1708611.
- [15] CHEN C, ZHOU T J, SUN X J, et al. Autologous fibroblasts induce fibrosis of the nucleus pulposus to maintain the stability of degenerative intervertebral discs[J]. *Bone Res*, 2020, 8:7. DOI:10.1038/s41413-019-0082-7.
- [16] 王玉芳, 徐晓艳, 武彦. 常用特殊染色在病理诊断中的应用[J]. *实用医技杂志*, 2013, 20(12):1357-1358.
- [17] CHEN D, JIANG X. Correlation between proteolytic enzymes and microangiogenesis in degenerative intervertebral disc nucleus[J]. *J Invest Surg*, 2019:1-6. DOI:10.1080/08941939.2019.1679921.
- [18] LIU S, YANG S D, HUO X W, et al. 17 β -Estradiol inhibits intervertebral disc degeneration by down-regulating MMP-3 and MMP-13 and up-regulating type II collagen in a rat model[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(Suppl 2):182-191. DOI:10.1080/21691401.2018.1453826.
- [19] 吕俊耀, 于晓军, 刘卯阳. 常规组织切片染色制作中常见问题及其解决方法[J]. *法医学杂志*, 2008, 24(1):51-53. DOI:10.3969/j.issn.1004-5619.2008.01.014.
- [20] PFANNKUCHE J J, GUO W, CUI S B, et al. Intervertebral disc organ culture for the investigation of disc pathology and regeneration—benefits, limitations, and future directions of bioreactors[J]. *Connect Tissue Res*, 2020, 61(3/4): 304-321. DOI:10.1080/03008207.2019.1665652.

(收稿日期: 2020-07-23 修回日期: 2020-11-18)