大鼠膝关节软骨不同染色方法的差异*★

高改霞[1]，卫小春[2]，李 凯[2]，卫建平[1]

Different staining methods for rat knee articular cartilage

Gao Gai-xia[1], Wei Xiao-chun[2], Li Kai[2], Wei Jian-ping[1]

Abstract

BACKGROUND: Extensive research has been made concerning articular cartilage by domestic and foreign scholars. Different staining methods are needed to analyze the results of the research, but there was less research applying various staining methods to cartilage research or exploring staining mechanism.

OBJECTIVE: To explore the advantages and disadvantages of rat knee joint with different staining methods.

METHODS: Articular cartilage of the normal rat knee joint was sampled. The structure of normal cartilage was observed through the histological staining of hematoxylin-eosin, safranin O, alcian blue, toluidine blue, safranin-alcian blue, as well as safranin-fast green.

RESULTS AND CONCLUSION: Tidemarks with blue, red and blue colors could be observed in hematoxylin-eosin, safranin O and toluidine blue staining, respectively. The stain intensity of Safranin O and toluidine blue staining were increased toward tidemark. Thus, Safranin O staining was superior to other methods in observing tidemark. The four-layer structures of cartilage were exhibited clearly, with arranged chondrocytes columnar and basophilic matrix in hematoxylin-eosin staining. The safranin O staining showed that the four-layer structure of cartilage was clear, and the matrix at bottom was stained redder than other places. Alcian blue staining showed that, peripheral chondrocytes were strong stained at pH1.0, which stained deeper at PH2.5. The cartilage structure was not clearly in toluidine blue staining, with clearly nuclei and almost no coloring cytoplasm, but matrix was stained light blue purple. Safranim-alcian blue staining showed that the cartilage surface and matrix exhibited different red, which was deep red at the bottom zones, but the surrounding of chondrocytes was stained blue. There was obviously contrast between cartilage tissue and bone tissue in safranin O staining, which showed red in the former and green in the latter. The results demonstrated that the 4-layer structure of cartilage can be observed by all above methods, especially safranin O staining, which is excellent in observing cartilage layers and tidemark structures. Hematoxylin-eosin staining provides better outcomes than other methods in observing morphologic changes of chondrocyte.

Gao GX, Wei XC, Li K, Wei JP. Different staining methods for rat knee articular cartilage. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(24): 4385-4389. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景：国内外学者对关节软骨对软骨进行了大量研究，需要用不同的染色方法对研究结果进行分析，但将多种染色方法同时应用于软骨研究及探讨染色机制的较少。

目的：探讨不同染色方法对大鼠膝关节软骨染色的优缺点。

方法：取正常大鼠膝关节软骨，行苏木精-伊红、番红O、阿尔辛蓝、甲苯胺蓝、番红-阿尔辛蓝、番红-固绿染色，观察软骨结构。

结果与结论：苏木精-伊红、番红O、甲苯胺蓝染色均可观察到潮线，分别为蓝色、红色和蓝色，番红O和甲苯胺蓝染色强度朝潮线方向增强，番红O染色对潮线的观察优于其他染色方法。苏木精-伊红染色关节软骨4层结构清晰，软骨细胞呈柱状排列，基质呈均匀呈嗜碱性染色。番红O染色显示4层结构层次清楚，基质深层染色最红。阿尔辛蓝染色显示，pH 1.0时软骨细胞周边部分被阿尔辛蓝强烈染色，pH 2.5时阿尔辛蓝染色较深。甲苯胺蓝染色显示组织结构层欠清，胞核染色清晰，胞浆几乎不着色，基质呈淡蓝紫色。番红-阿尔辛蓝染色显示软骨表面及基质呈不均一的红色，深层颜色较深，软骨细胞周围蓝染；番红-固绿染色显示软骨基质呈均匀的红色，软骨下骨呈绿色，软骨组织与骨组织分对比鲜明。提示上述各种方法均可观察到软骨的四层结构，但以番红O染色显示软骨各层和潮线结构最佳；苏木精-伊红染色观察软骨细胞形态变化较其他方法清楚。

关键词：关节软骨；染色方法；优缺点；大鼠；膝关节；软骨组织工程
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.24.004

高改霞，卫小春，李凯，卫建平. 大鼠膝关节软骨不同染色方法的差异[J].中国组织工程研究与临床康复，2010，14(24):4385-4389. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

[1]Department of Pathology, [2]Department of Orthopaedics, Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Gao Gai-xia★, Studying for master's degree, Department of Pathology, Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China gg2857ergaoer@163.com

Correspondence to: Wei Jian-ping, Chief physician, Department of Pathology, Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China wjp123555@sina.com

Supported by: the Open Fund for Key Laboratory in Shanxi Province*

Received: 2010-01-06
Accepted: 2010-02-20

山西医科大学第二医院，[1]病理科，[2]骨科，山西省太原市 030001

高改霞★，女，1977年生，山西省河津市人，汉族，山西医科大学在读硕士，主要从事关节软骨研究。gg2857ergaoer@163.com

通讯作者：卫建平，主任医师，山西医科大学第二医院病理科，山西省太原市 030001 wjp123555@sina.com

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:1673-8225(2010)24-04385-05

收稿日期: 2010-01-06
修回日期: 2010-02-20
(20090929010/GW·Z)

0 引言

关节软骨位于活动关节的表面，是一种高度特异的连接组织，仅有少量的细胞分布[1]。软骨细胞产生细胞外基质，基质主要由胶原纤维、蛋白聚糖和水组成，是软骨的主要成分。根据软骨细胞和纤维的形态结构关节软骨可分4层[2]。Ⅰ层浅表层富含胶原；Ⅱ层中间层、Ⅲ层辐射层或称深层均富含蛋白聚糖；Ⅳ层钙化软骨层。国内外学者对关节软骨对软骨进行了大量研究，需要用不同的染色方法对研究结果进行分析，但将多种染色方法同时用于软骨研究的较少，为了给软骨研究提供实验依据，本实验采用苏木精-伊红染色、番红O染色、阿尔辛蓝染色、甲苯胺蓝染色、番红-阿尔辛蓝染色及番

红-固绿6种组织化学染色方法，对10只大鼠膝关节软骨组织进行观察。

1 材料和方法

设计：组织学对比观察。

时间及地点：于2008-08/2009-07在山西医科大学临床第二附属医院骨科实验室完成。

材料：雄性健康Wistar大鼠10只，由山西医科大学实验动物中心提供。因月龄大小与潮线有关，小月龄大鼠发育欠成熟无潮线结构出现，大月龄大鼠可观察到潮线结构，所以选取2月龄大鼠5只，4.5月龄大鼠5只，体质量270~350 g。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

主要试剂：

试剂	来源
番红-O	Sigma 公司
阿尔辛蓝	Schmid Gmbh
甲苯胺蓝	Sangon 进口分装
固绿	Solarbio

实验方法：

标本的处理：实验动物全部颈椎脱臼处死，取双侧膝关节作为标本。标本切取后立即投入40 g/L多聚甲醛固定48 h，后入20%EDTA二钠(pH 7.15)溶液浸泡，隔天换液一次，连续脱钙12 d，至组织完全脱钙。

组织化学染色：标本固定、脱钙后，正中矢状面剖开，取内外侧半关节，经逐级乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡后关节切面紧贴包埋盒底部包埋，切片机先切除约0.7 mm，以去除交叉韧带等组织，达软骨负重区，连续切片厚4.0~5.0 μm。切片常规脱蜡至水，自来水冲洗后行不同组织化学染色：

常规苏木精-伊红染色[3]：切片入苏木精浸染5 min，水洗，再入伊红浸染5 min，水洗，二甲苯透明，中性树胶封固。

番红O染色[4]：2.5 g番红O溶于体积分数95%乙醇100 mL制成2.5%番红O乙醇溶液作为母液，使用时再稀释为0.5%的番红O水溶液(20 mL母液加80 mL蒸馏水)[5]。0.5%番红O染液滴染1 min，如染色时间太短染色不充分，染色时间长于1 min则染色效果等同于染色1 min，镜下体积分数95%乙醇分化数秒，风干，二甲苯透明，中性树胶封固。

阿尔辛蓝染色[6]：1%阿尔辛蓝8GX溶于3%醋酸制成pH值2.5的阿尔辛蓝染液；1%阿尔辛蓝8GX溶于0.1 mol/L的盐酸中制成pH值1.0的阿尔辛蓝染液。切片分别入pH值为2.5和pH值为1.0的1%阿尔新蓝染液染色50 min，如室温过低适当延长染色时间，自来水冲洗，二甲苯透明，中性树胶封固。

甲苯胺蓝染色[7]：切片入甲苯胺蓝染液30 min，自来水冲洗，冰醋酸分化至胞核清晰，分化时间不易过长否则容易导致分化过度，再次自来水冲洗，风干后二甲苯透明，中性树胶封固。

番红-阿尔辛蓝染色[8]：0.5%番红O染液滴染1 min，镜下体积分数95%乙醇分化数秒，再入1%阿尔辛蓝pH值2.5的染液50 min，严格控制番红染色时间否则易遮盖阿尔辛蓝染色，自来水冲洗，二甲苯透明，中性树胶封固。

番红-固绿染色法[9]：切片入1%固绿浸染1.5 min；乙酸分化数10 s；再入0.5%番红O染液浸染1 min；体积分数95%乙醇分化数秒；自来水冲洗；二甲苯透明；中性树胶封固。

染色结束后用 Olympus IX70显微镜，DP71型CCD观察染色结果并进行图像采集，观察经不同化学方法染色后的软骨负重区组织学形态。组织化学染色方法中各种染料在软骨组织中的着色原理如下：

软骨组织中各种染料的着色原理：

染料	软骨组织结合部位	颜色
苏木精	软骨基质、阴离子基团	蓝色
番红 O	硫酸软骨素、硫酸角质素	红色
阿尔辛蓝	硫酸根、羧基	蓝色
甲苯胺蓝	硫酸根、磷酸盐、醛基	蓝色
固绿	胶原纤维	绿色

主要观察指标：正常大鼠膝关节软骨负重区的形态结构。

设计、实施、评估者：设计为第二作者，实施为第一、三作者，评估为第二、四作者。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色结果 关节软骨的4层结构清晰，软骨表面光滑、完整，软骨细胞呈柱状排列，基质呈均匀呈嗜碱性染色，软骨细胞呈强嗜碱性染色，见图1。

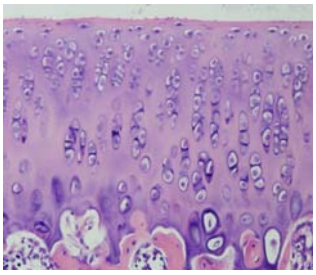

Figure 1 Hematoxylin-eosin staining of rat knee articular cartilage (×200)
图 1 大鼠膝关节软骨苏木精-伊红染色(×200)

2.2 番红O染色结果 4层结构层次清楚，浅表层染色较淡，朝潮线方向染色增强，基质深层染色最红，见图2。

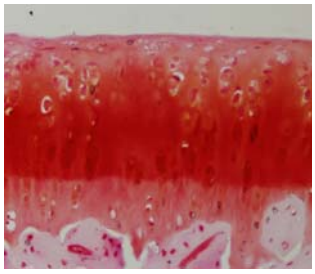

Figure 2 Safranin O staining of rat knee articular cartilage (×200)
图 2 大鼠膝关节软骨番红 O 染色(×200)

2.3 阿尔辛蓝染色结果 pH 1.0时阿尔辛蓝染色可见软骨基质呈较浅的蓝色，软骨细胞周边部分被阿尔辛蓝强烈染色，中心部分多呈未染状态。pH 2.5时阿尔辛蓝染色较深，见图3。

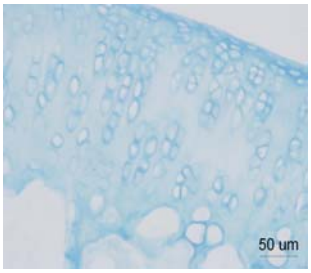

Figure 3 Alcian blue staining of rat knee articular cartilage (×200)
图 3 大鼠膝关节软骨阿尔辛蓝染色(×200)

2.4 甲苯胺蓝染色结果 组织结构层欠清，细胞核被染成蓝色，胞核染色清晰，胞浆几乎不着色，基质呈淡蓝紫色，见图4。

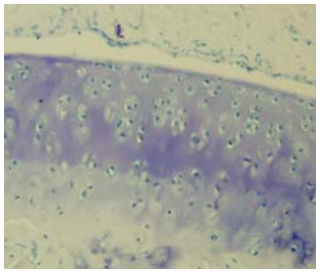

Figure 4 Toluidine blue staining of rat knee articular cartilage (×200)
图 4 大鼠膝关节软骨甲苯胺蓝染色(×200)

2.5 番红-阿尔辛蓝染色 软骨表面及基质呈不均一的红色，深层颜色较深，软骨细胞周围蓝染，见图5。

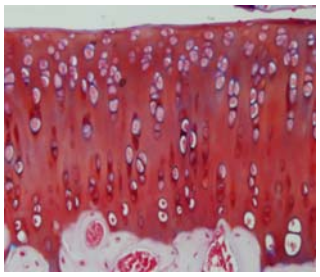

Figure 5 Safranin-alcian blue staining of rat knee articular cartilage (×200)
图 5 大鼠膝关节软骨番红-阿尔辛蓝染色 (×200)

2.6 番红-固绿染色结果 软骨基质呈均匀的红色，与单独番红O染色相比红染较暗，软骨下骨呈绿色，软骨组织与骨组织分对比鲜明，见图6。

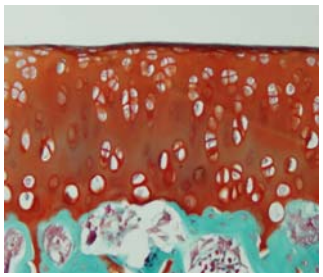

Figure 6 Safranin-Fast green staining of rat knee articular cartilage (×200)
图 6 大鼠膝关节软骨番红-固绿染色(×200)

3 讨论

关节软骨具有支撑质量和减少摩擦的作用，它的组织结构和生化成分对维持关节的正常功能是必不可少的。目前，国内外学者对关节软骨进行了大量的研究，多采用上述染色方法中的一种或几种。国外学者约从20世纪40年代开始有关染色方法的研究，到七八十年代达到高峰，可能是由于研究趋向成熟此后有关染色方法的报道逐渐减少。国内有关关节软骨染色方法及原理的研究甚少。本实验将6种组织化学染色方法应用于正常大鼠膝关节软骨的研究，通过染料着色原理来探讨各种染色方法的优缺点，给软骨研究提供实验依据。

通常以苏木精-伊红染色为标准来观察组织的形态结构，因软骨基质中含有大量酸性黏多糖易于和碱性染料苏木精结合，因此苏木精-伊红染色的切片上基质呈嗜碱性染色。软骨细胞所处的软骨陷窝周围由于富含硫酸软骨素因此呈强嗜碱性染色。对观察软骨细胞形态变化较其它方法清楚。

番红O是一种碱性染料即阳离子染料，研究表明番红O与蛋白聚糖中的多聚阴离子结合[10]，确切地说与硫酸软骨素和硫酸角质素结合，不与胶原结合[4]。番红O以正染的形式染色时，与多聚阴离子的浓度成正比，因此可间接反映基质中蛋白聚糖的含量和分布。国外学者通过染料实验得出：番红O染色的强度曲线与邻近软骨固定电荷的密度曲线呈线性相关(r=0.900~0.995)；而且染色分布在切片上始终一致。因此认为番红O是对软骨基质中蛋白聚糖进行组织化学定量的很好的阳离子染料[11]。并且，有利于通过图像分析系统来反映蛋白聚糖浓度的改变[12]。蛋白聚糖在软骨不同深度区域的含量分布不同[13]，在浅表层蛋白聚糖的含量最低，而在未钙化软骨的最深部蛋白聚糖的含量最高[14]。本实验在番红O染色的切片上清楚地观察到蛋白聚糖的这一分布特征，Ⅰ层染色较浅、Ⅱ、Ⅲ层染色朝潮线方向染色加深，与国外研究相符。

阿尔辛蓝是一种铜酞菁染料，用来染色酸性黏多糖底物和其他阴离子底物，Scott等[15]认为染色机制是阳离子染剂与阴离子底物间通过盐键结合染色。通过添加盐和调节氢离子浓度优先对某些底物染色，pH值影响染色的性状，利用不同pH值可区分酸性黏多糖的物质类别。pH值为1.0时，阿尔辛蓝仅与蛋白多糖的硫酸根结合，pH值为2.5时，与蛋白多糖的硫酸根、羧基结合形成盐键[16]，这一点从作者研究的切片上可以看出：在富含硫酸根的部位如软骨细胞所处的软骨陷窝染色呈深蓝色，基质染色呈浅蓝色，而且pH值1.0切片上基质的染色较pH值2.5时染色较浅。

甲苯胺蓝是一种吩噻嗪类异染性阳离子染料，即在一定条件下染酸性物质时，染色结果与染料固有的颜色不同。常用来显示组织切片上的细胞核和黏多糖，以异染形式在基质主要与硫酸根、在细胞核与磷酸盐和醛基通过静电引力相结合，但pH1.0时磷酸基不被离子化，不参与染色[17-20]。有研究表明在pH值3.0~3.6甲苯胺蓝仅对软骨基质以异染的形式着色[21]。认为软骨基质的异染性是由于酸性黏多糖的存在，主要指硫酸软骨素[22]。作者在研究中发现甲苯胺蓝在染细胞核时呈深蓝色，染基质时呈淡紫蓝色与上述研究相符。

番红-阿尔辛蓝染色：阿尔辛蓝染色对固定和快速脱钙的灵敏度使得阿尔辛蓝对证明关节软骨蛋白聚糖量变的研究成为一种不可靠的方法。阿尔辛蓝染色应当伴随生物测量或者与番红O正染色结合对结果作出全面解释[8]。作者在研究中将这两种染色方法结合起来，更全面地反映了软骨的染色特点。

番红-固绿染色：固绿为酸性染料，是最大分子的阴离子染料，可溶于水或乙醇，与结构较疏松的胶原纤维能较牢固结合，不易褪色。钙化软骨层与软骨下骨具有相同的无机成分，且连接紧密，但两者的有机成分(胶原蛋白类型)不同，钙化软骨层为Ⅱ型胶原，软骨下骨胶原含量丰富主要是Ⅰ型胶原，组织切片上软骨嗜碱性，骨嗜酸性。故用番红-固绿染色后软骨与嗜碱性染料番红结合呈红色，软骨下骨与嗜酸性染料固绿结合呈绿色，形成鲜明对比将软骨组织与骨组织区分开。番红-固绿染色是国外研究关节疾病反映软骨变化比较常用的一种染色方法，国内对软骨的研究亦有应用但相对较少。对于软骨损伤严重的疾病用番红-固绿染色可以更直观地观察到软骨与软骨下骨和骨组织间的关系。

潮线：本实验实验动物的年龄从2~4.5个月龄不等，2月龄大鼠的组织切片上观察不到潮线，可能是由于动物发育欠成熟，而4月龄左右大鼠的组织切片上可清楚地观察到波浪状潮线。最初潮线被认为是一条嗜苏木精的约10 μm厚的单线结构[23]，经典描述是：分离钙化和未钙化的软骨行苏木精-伊红染色时一条波浪状嗜碱性线[24]，且被认为是一种特殊的结构并非人为构造[25]。之后的研究表明潮线含有特殊的糖蛋白，并有一个电镜可观察到的独特组织学三层结构出现[25]。作者研究结果提示光镜下苏木精-伊红、番红O、甲苯胺蓝染色均可观察到潮线，分别为蓝色、红色和蓝色，番红O和甲苯胺蓝染色强度朝潮线方向增强。番红O染色对潮线的观察优于其他的染色方法。阿尔辛蓝对潮线不显示阳染，可能由于其生色团相对大且平坦，与潮线不发生明显相互作用[25]。

由于软骨基质含大量阴离子基团，故对软骨的染色多采用阳离子染料，其中甲苯胺蓝染色显示的结构与番红O染色相似[26]，可能的原因是番红O象甲苯胺蓝一样以非常相似的方式与相同的分子相互作用[25]，但切片上甲苯胺蓝染色显示的软骨层次不如番红O染色清楚，可能的原因是对番红O不着色而对甲苯胺蓝着色的醛基在胶原或蛋白聚糖分布均一，因此甲苯胺蓝染色层次欠清。Poole，Bulstra等[27-28]研究表明阳离子染料如甲苯胺蓝、番红O均可用来从组织切片上对蛋白聚糖进行半定量分析，可反映基质的变化。由于甲苯胺蓝的异染性，不适合重复性研究，用番红O染色可重复实验结果[12]，因此多采用番红O染色反映基质中蛋白聚糖含量和分布的变化。

虽然番红O传统上被认为是一种异染性染料，然而，经乙醇处理后可能破坏了异染性染料间的相互作用，因此，染料能以近乎正染的形式对蛋白聚糖着色。正染即染料只有一个最大吸收光谱。如果染料有一个以上清楚的吸收峰则为异染，异染时的染色不能与蛋白聚糖的浓度成比例。这种说法解释了在现有的染色条件下可以对与番红O结合的蛋白聚糖进行化学计量[11]。由此番红O被广泛应用于关节疾病的研究，但是对某些蛋白聚糖丢失严重的疾病，番红O不着色，而单克隆抗体显示硫酸角质素和硫酸软骨素均存在，表明在基质严重减少的情

况下限制了番红O着色，需要采用更灵敏的方法[29]。

综上，在对软骨组织进行研究时，根据研究需要和研究目的恰当选取所需的染色方法，选取能更好地反映该部位的染色方法，可以提高对组织形态结构的认识。

4 参考文献

[1] Lohmander S.Proteoglycans of joint cartilage Structure, function,turnover and role as markers of joint disease.Bailliere Clin Rheum.1988;2:37-62.
[2] Beiser IH,kant IO.Subchondral bone drilling:a treatment for articular cartilage defecta. Foot Surg.1990;29(6):595-601.
[3] Zhonghua Yixuehui.Beijing：Renming Junyi Chubanshe.2004：37-41.
中华医学会编著.临床技术操作规范.病理学分册[M].北京：人民军医出版社,2004:37-41.
[4] Rosenbeg L.Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage.J Bone Joint Surg Am.1971; 53(1): 69-82.
[5] Xu YX,Wei XS.Zhonghua Yiyao Weisheng Zazhi.2004;1(4):73.
许岩霞,魏雪松.番红花红单一染色法检查奈瑟氏淋病双球菌[J].中华医药卫生杂志,2004,1(4):73.
[6] Quintarelli G, Scott JE, Dellovo MC. The chemical and histochemical properties of Alcian Blue. II. Dye binding of tissue polyanions.Histochemie.1964;4:86-98.
[7] Ramalingam K, Ravindranath MH.Histochemical significance of green metachromasia to toluidine blue.Histochemie. 1970;24(4): 322-327.
[8] Jubb RW, Eggert FM.Staining of Demineralized Cartilage II.Quantitation of Articular Carticular Proteoglycan after Fixation and Rapid Demineralization.Histochemistry.1981;73:391-396.
[9] Noeske K.Discrepancies between cytophotometric alkaline Fasr Green measurements and nuclear histone protein content.Histochem J.1973;5(4):303-311.
[10] Aaron RK, Jolly G, Ciombor DM, et al. Histochemical Method for the Demonstration of Calcifying Cartilage. Calcif Tissue Int. 1988; 43(4):244-249.
[11] Kiraly K, Lapvetelainen T, Arokoski J,et al.Application of selected cationic dyes for the semiquantitative estimation of glycosaminoglycans in histological sections of articular cartilage by microspectyophotometry.Histochem J.1996;28:577-590.
[12] Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, et al.Microspectro photometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections with Safranin O.Histochemistry.1985;82(3):249-255.
[13] Stockwell R, Scott J.Distribution of acid glycosaminoglycans in human articular cartilage.Nature.1967;215(5108):1376-1378.
[14] Bayliss M,Venn M,Maroudas A,et al.Structure of proteoglycans from different layers of human articular cartilage.Biochem J.1983; 209(2):387-400.
[15] Scott JE, Dorling J.Differential staining of acid glycoaminoglycansy alcian blue in salt solutions.Histochemie.1965;5:221-233.
[16] Bancroft J,Stevens A.Theory and Practice of Histological Techniques.2nd ed.Churchill Livingstone,N.Y,1982:194-198.
[17] Erenpreisa J, Freivalds T. Anisotropic staining of apurinic acid with toluidine blue.Histochemistry.1979;60(3):321-325.
[18] Landemore G, Quillec M, Oulhaj N,et al.Kurloff cell ultrastructure after combined formaldehyde-cetylpyridinium chloride fixation and high-iron diamine staining.Histochem J.1993;25(1):64-76.
[19] Mello ML. Toluidine blue binding capacity of heterochromatin and euchromatin of Triatoma infestans Klug.Histochemistry.1980; 69(2): 181-187.
[20] Cao WG,Chen L,Jiao QC,et al.Guangpuxue yu Guangpu Fenxi. 2003;23(3):587-590.
曹稳根,陈雷,焦庆才,等.硫酸软骨素与天青A空间定向相互作用机理的研究[J].光谱学与光谱分析,2003,23(3):587-590.
[21] Lansdown AB.A silver-impregnation-toluidine blue technique for demonstration of embryonic skeletal structures in paraffin sections.Histochemie.1968;13(2):192-195.
[22] Meyer K.Biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase.Physiol.1947;27:335-359.
[23] Gannon FH,Sokoloff L.Histomorphometry of the aging human patella:histologic criteria and controls.Osteoarthr Cartil.1999; 7(2):173-181.
[24] Fawns HT,Landells JW.Histochemical studies of rheumatic conditions.1.Observations on the fine structures of the matrix of mormal bone and cartilage.Ann Rheum Dis.1953;12(2):105-113.
[25] Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, et al.The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint.J Mol Hist. 2005;36(3):207-215.
[26] Lillie RD.Wiliams & Wilkins.Conn’s Biological Stains.HJ.1977; 9th ed.
[27] Poole A.The relationship between Toluidine Blue staining and hexuronic acid content of cartilage matrix.Histochem J.1970; 2(5):425-430.
[28] Bulstra SK, Drukker J, Kuijer R, et al.Thionin staining of paraffin and plastic embedded sections of cartilage.Biotech Histochem. 1993;68(1):20-28.
[29] Camplejohn KL,Allard SA.Limitations of safranin ‘o’ staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies.Histochemistry.1988;89(2):185-188.

来自本文课题的更多信息--

基金资助：山西省重点实难室开放基金。

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。

课题的创新点：疾病的研究以正常的组织形态结构为基础，本实验以正常大鼠关节软骨为研究对象，系统分析了软骨对各种染料着色的优缺点，当建立不同动物模型后可针对性的选用染色方法，为研究软骨的病理变化提供实验依据，类似研究在国内少见报道，得到山西省重点实验室开放基金项目资助。

课题评价的“金标准”：实验指标的评估未用“金标准”，原因是不同的实验室所购买染料的厂家、批次等有所不同，且所参考的操作流程不完全一致，故同一种染色方法在不同条件下所染出的切片在颜色等方面略有差别但机制一致。

设计或课题的缺陷与不足：国内外可见关于各种染料研究的报道，但软骨是一种特殊的结缔组织，将染料直接应用于软骨尚缺乏系统研究，本实验仅做了初步探讨有待进一步研究。

提供临床借鉴的价值：通过研究发现应用各种染色方法可以将软骨中不同成分的组织显示出来，发生病理变化时，可通过应用不同染色方法更好地观察某种组织成分的增加或减少，为进一步认清病变提供帮助。