

doi: 10.16118/j.1008-0392.2018.06.013

· 基础研究 ·

三种染色方法在小鼠下颌第一磨牙牙根不同发育时期的染色效果比较

蒋伟东^{1,2,3}, 朱佩琪^{1,2,3}, 周 诺^{1,2,3}

(1. 广西口腔颌面修复与重建研究自治区级重点实验室, 广西 南宁 530021; 2. 广西颅颌面畸形临床医学研究中心, 广西 南宁 530021; 3. 颌面外科疾病诊治研究重点实验室(广西高校重点实验室), 广西 南宁 530021)

【摘要】目的 比较 3 种染色方法在小鼠下颌第一磨牙牙根不同发育时期的染色效果, 为选择合适的染色方法提供参考。**方法** 选取出生后第 5、7、14、21 天的 ICR 小鼠, 制备小鼠下颌第一磨牙冠状切片, 采用 H-E 染色、Masson 染色法和 Gomori 染色法进行组织形态学研究, 比较染色结果。**结果** 在小鼠出生后第 5 天(PN5)至 PN7 为牙根发育起始阶段, H-E 染色显示: 成牙本质细胞、成釉细胞及上皮根鞘细胞形态最为清晰; Masson 染色法显示: 图片色彩鲜艳, 牙釉质、牙本质及前期牙本质间层次分明; Gomori 染色方法显示: 细胞核呈单一的蓝黑色, 但软、硬组织对比度不佳。从 PN14 小鼠牙齿开始萌出到 PN21 牙根发育基本完成阶段, H-E 染色显示: 成釉细胞、成牙本质细胞及牙周膜成纤维细胞形态最为清晰; Masson 染色法显示: 牙骨质与牙槽骨间的胶原纤维排列规则, 牙槽骨形态清晰; 而 Gomori 染色效果总体不佳。**结论** 在小鼠下颌第一磨牙牙根不同发育时期, 3 种染色方法各有优势。H-E 染色适用于各类细胞形态的观察, Masson 染色适用于牙体硬组织及骨组织的观察, Gomori 染色法总体效果不佳。

【关键词】 牙根发育; 上皮根鞘; H-E 染色; Masson 染色法; Gomori 染色法

【中图分类号】 R781 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1008-0392(2018)06-0066-05

Application of three staining methods during root development of mandibular first molar in mice

JIANG Wei-dong^{1,2,3}, ZHU Pei-qi^{1,2,3}, ZHOU Nuo^{1,2,3}

(1. Guangxi Key Laboratory of Oral and Maxillofacial Rehabilitation and Reconstruction, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 2. Guangxi Clinical Research Center for Craniofacial Deformity, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Oral and Maxillofacial Surgery Disease Treatment, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

【Abstract】Objective To compare the effects of three different staining methods during the root developmental stages of mandibular first molar in mice. **Methods** The coronal sections of mandibular first molars were prepared from ICR mice at the postnatal day5 (PN5), PN7, PN14 and PN21. H-E staining, Masson trichrome staining and Gomori staining were used to analyze the root development, and the staining results were compared among three methods. **Results** From PN5 to PN7, the root development was at the initial stage, the morphology of odontoblast, ameloblast and Hertwig's root sheath (HERS) were stained clearly in H-E staining. The results of Masson trichrome staining were brightly colored with distinct layers of enamel, dentin and predentin. In Gomori staining, the nucleus

收稿日期: 2018-08-22

基金项目: 国家自然科学基金(81670970)

作者简介: 蒋伟东(1993—), 男, 硕士. E-mail: jiangwd93114@outlook.com

通信作者: 周 诺. E-mail: nuozhou@hotmail.com

were in a single blue-black color, but the contrast of soft and hard tissue was poor. From PN14 (tooth eruption stage) to PN21 (root development completed stage), the morphology of odontoblast, ameloblast and periodontal fibroblast stained clearly in H-E staining. Masson staining was the most effective method to investigate periodontal tissues as the collagen fiber was arranged regularly between the cementum and alveolar bone. Gomori staining was generally inferior to the other two methods.

Conclusion The three different staining methods in the root development of the mandibular first molar in mice have their own advantages. H-E staining is appropriate for the observation of all kinds of cell morphology. Masson trichrome staining is suitable for the tooth hard tissue and bone tissue. Gomori staining is generally inferior to other two methods.

【Key words】 root development; Hertwig's root sheath; hematoxylin and eosin staining; Masson trichrome staining; Gomori staining method

组织形态学染色方法有助于在微观下研究组织形态^[1],对牙根生长发育阶段的研究十分重要。目前,最常用的染色方法是 H-E 染色,该染色方法技术成熟,已广泛应用于组织学研究中,但其在运用过程中仍有缺陷,如对组织间隙的染色弱、H-E 试剂容易产生沉淀而影响染色结果等^[2]。除 H-E 染色外,Masson 染色法及 Gomori 染色等方法也广泛应用于组织学的研究,其中 Masson 染色法常用于胶原纤维及骨组织的染色^[3-5],而 Gomori 染色法能将口腔组织染成对比鲜明的红绿色^[6]。

小鼠下颌第一磨牙牙根从出生后第 5 天(PN5)开始发育,到出生后第 21 天(PN21)牙根发育基本完成,在这一过程中,牙根及其相关牙周组织发生了一系列的变化^[7]。为了更好的观察到其细致精确的组织学改变,此次研究选取处于牙根不同发育时期的 ICR 小鼠下颌第一磨牙作为研究对象,采用上述 3 种染色方法染色,比较其在牙体硬组织、牙周膜胶原纤维、牙槽骨等组织的染色效果,为研究不同发育阶段牙根选择合适的染色方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

实验所用 ICR 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司;H-E 试剂盒(KGA 224)、Masson 染色试剂盒(KGMST-8003)购自江苏凯基生物技术有限公司;天青石蓝 B、甘油、磷钨酸、冰醋酸、甲基绿、苏木精染液购自美国 Sigma 公司;硫酸铁铵购自成都麦卡希试剂公司;蒸馏水、变色酸 2R 购自上海阿拉丁科技股份有限公司。Gomori 染液的制备如下。(1)天青石蓝染

液:天青石蓝 B 0.5 g,硫酸铁铵 5 g,甘油 14 mL,蒸馏水 100 mL,将硫酸铁铵溶于蒸馏水中,放置 24 h 后加入天青石蓝,稍加温水煮沸,冷却后过滤再加甘油;(2)变色酸染液:变色酸 2R 0.8 g,磷钨酸 1 g,冰醋酸 1 mL,蒸馏水 100 mL;(3)甲基绿染液:甲基绿 0.5 g,蒸馏水 100 mL。

主要实验器材:组织处理仪(STP 120)购自美国 Thermo Fisher 公司;石蜡包埋机(LEICA EG1150H)、石蜡切片机(LEICA RM2235)、烤片机(LEICA HI 1220)购自德国 Leica 公司,采用日本 Olympus 光学显微镜采集系统采集图片。

1.2 标本制备

以小鼠出生当日早晨定为 0 d (postnatal day 0, PN0),分别选取 PN5, PN7, PN14, PN21 的小鼠各 3 只,乙醚麻醉后断颈处死,分离下颌骨,用 PBS 冲洗 3 次后,置于 4%多聚甲醛固定液(pH=7.4)中室温固定 24 h,10%EDTA 脱钙液中脱钙,使用梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制成 5 μ m 厚的冠状组织学切片,4 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.3 H-E 染色法

常规方法脱蜡至水,滴加苏木精染液染色 5 min,水洗,返蓝 10 min,滴加伊红染液 20 s,水洗 2~3 s,冲洗掉多余染液后放入梯度乙醇中脱水,置于二甲苯中,封片^[6]。

1.4 Masson 染色法

切片脱蜡至水,滴加 1 滴苏木精染色液,染色 10 min,冲掉染液后流水冲洗 5 min,滴加 1 滴复合染色液,染色 5 min,冲掉染液后滴加 1 滴磷钨酸 40 s,甩干后滴加苯胺蓝染液 2 min,冲掉染液放入 60 $^{\circ}$ C

烘箱烘干,封片^[2]。

1.5 Gomori 染色法

常规方法脱蜡至水,用天青石蓝染液染色 10 min,水洗,再用明矾苏木精染液染核,水洗,盐酸乙醇分化,显蓝。变色酸 2R 染液染色 5 min,2%冰醋酸水溶液冲洗 3 次,观察牙本质以及牙骨质等密质骨呈红色且其他部分无色后,使用亮绿染液复染 1 min。使用梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片^[6]。

2 结 果

2.1 PN5 时小鼠下颌第一磨牙切片 3 种染色法效果比较

小鼠下颌第一磨牙在 PN5 时,其牙冠不断发育,牙冠硬组织继续生成,从牙尖向牙颈延伸,开始形成上皮根鞘(Hertwig's root sheath,HERS)^[8]。3 种染色法均可观察到牙釉质、牙本质、前期牙本质、成釉细胞、成牙本质细胞以及 HERS 等结构,见图 1。H-E 染色结果显示:各类细胞以及 HERS 的形态清晰,细胞核呈鲜明的蓝紫色,牙釉质、牙本质、前期牙本质三者分界明显。Masson 法结果显示:图片色彩鲜艳,牙釉质被染成鲜红色,牙本质呈蓝色,提示其富含胶原。HERS 明显,牙槽骨清晰可见,包绕整个牙胚,较其他两者更为清晰,但成釉细胞与成牙本质细胞形态不太清晰。Gomori 染色法结果显示:牙釉质与牙本质层次分明,牙釉质被染成暗红色,牙本质呈蓝灰色,但各类细胞的形态不够清晰,细胞核呈单一的蓝黑色。

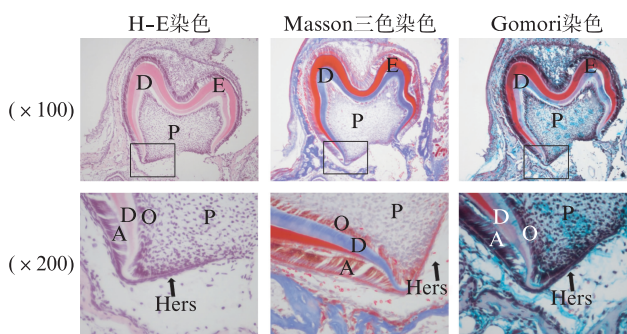


图 1 小鼠 PN5 时小鼠下颌第一磨牙 3 种方法染色结果
Fig.1 The result of the mandibular first molar root in postnatal day 5 mice by three different staining methods

P: 牙髓,A: 成釉细胞,O: 成牙本质细胞,E: 牙釉质,D: 牙本质,HERS: 上皮根鞘;放大 200 倍选取的范围为放大 100 倍中的方框处

2.2 PN7 时小鼠下颌第一磨牙发育形态学比较

小鼠的下颌第一磨牙在 PN7 时,牙冠发育已经完成,颈环游离端的内外釉上皮细胞增生形成双层细胞的 HERS。根鞘内层细胞诱导牙乳头细胞分化,使得 HERS 不断生长,实现牙根的形成^[9]。在该时期,H-E 染色、Masson 法、Gomori 染色结果与 PN5 时期基本相同。Mason 法总体染色效果较其他两种方法好,牙釉质、牙本质以及前期牙本质层次分明,色彩鲜艳,特别是包绕牙胚的牙槽骨轮廓清晰可见,但成牙本质细胞与成釉细胞形态在 H-E 染色中最为清晰,见图 2。

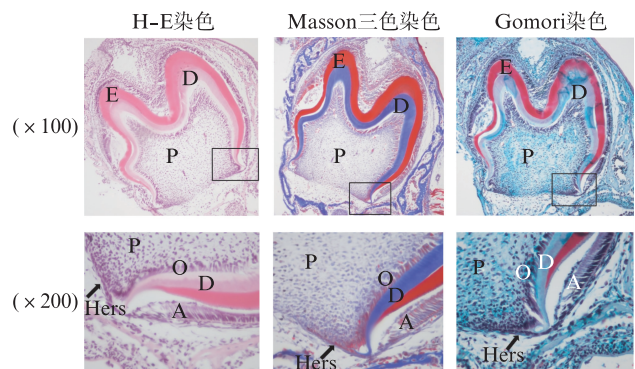


图 2 小鼠 PN7 时小鼠下颌第一磨牙 3 种方法染色结果
Fig.2 The result of the mandibular first molar root in postnatal day 7 mice by three different staining methods

P: 牙髓,A: 成釉细胞,O: 成牙本质细胞,E: 牙釉质,D: 牙本质,HERS: 上皮根鞘;放大 200 倍选取的范围为放大 100 倍中的方框处

2.3 PN14 时 3 种染色法效果比较

小鼠下颌第一磨牙在 PN14 时,随着 HERS 不断生长,牙根继续发育,逐渐形成牙髓腔的形态,同时,在牙本质增厚的过程中,根鞘变性中断,根鞘细胞进入牙囊中,牙囊细胞再移向根部牙本质,与牙本质接触后,分化为成牙骨质细胞,分泌牙骨质基质,矿化形成牙骨质^[10]。这一阶段是牙周组织形成的关键时期,组织学着重观察其 HERS 以及牙骨质、牙周膜韧带和支持性牙槽骨等。

在 3 种染色方法结果中,牙釉质因为脱钙,不能观察到。H-E 染色结果显示:HERS 细胞形态清晰,牙周膜成纤维细胞及牙槽骨清晰可见,但胶原纤维形态不够分明。Masson 染色结果显示:HERS 比较直观;牙周胶原纤维排列整齐、规则;牙槽骨形态也比较清晰,与周边玫瑰红的肌肉组织界限分明,与 H-E 染色相比效果更好,但牙周膜成纤维细胞染色效果较差。Gomori 染色效果是三者中最差的,细胞

形态与组织结构层次均不清晰,见图 3。

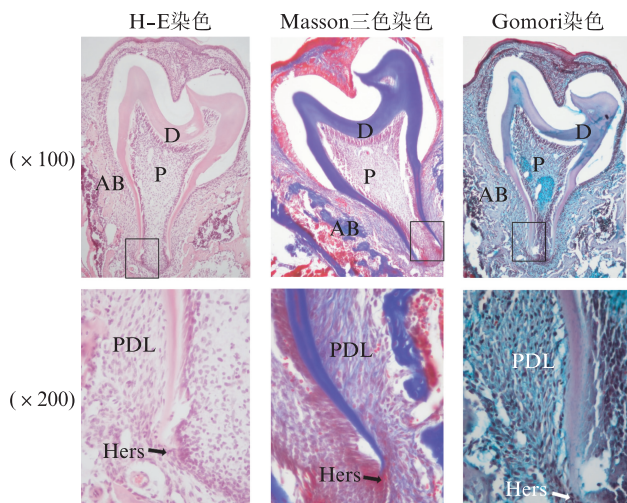


图 3 小鼠 PN14 时下颌第一磨牙 3 种方法染色结果
Fig.3 The result of the mandibular first molar root in postnatal day 14 mice by three different staining methods

HERS: 上皮根鞘, AB: 牙槽骨, PDL: 牙周纤维, P: 牙髓, D: 牙本质; 放大 200 倍选取的范围为放大 100 倍中的方框处

2.4 PN21 时 3 种染色法效果比较

小鼠的下颌第一磨牙在 PN21 时, 牙根发育基本完成, 牙齿已经萌出^[11]。在 3 种染色方法结果中, 牙釉质因经脱钙处理, 无法被观察到; 该时期牙骨质和牙本质分界不清; 但牙槽骨、牙周纤维及牙骨质三者界限分明。H-E 染色结果显示: 牙本质与牙骨质呈淡粉红色, 牙周组织中, 牙周膜纤维细胞呈梭形排列, 牙周纤维形态清晰但对比度不强。Masson 染色结果结果显示: 牙本质呈靛蓝色, 牙周组织中胶原纤维排列规则整齐, 但牙周膜成纤维细胞形态不清。Gomori 染色结果中, 牙本质、牙骨质以及牙槽骨染色呈灰色; 牙周组织中, 成纤维细胞核形态清晰, 但胶原纤维排列不够清晰, 见图 4。

3 讨 论

牙齿的生长发育是一个十分复杂的过程。研究^[12-13]表明, 哺乳类动物的牙齿发育是牙源性上皮与牙源性间充质相互作用的结果。有关牙齿的生长发育国内外学者已经做了大量的研究, 但多集中在牙齿开始发育到牙冠发育成熟, 对牙根发育的研究相对较少, 且对于牙根的研究相对集中于牙周纤维、HERS 和上皮剩余等组织^[14]。当牙冠发育即将完成之时, 成釉器的内釉上皮和外釉上皮在颈环处增

生, 向未来根尖孔方向生长, 形成称为 HERS 的双层组织, 从而启动了牙根发育^[15]。本研究通过比较 H-E 染色法、Masson 法和 Gomori 染色法在小鼠磨牙牙根不同发育阶段的染色效果, 筛选出不同组织在不同时期中最优的染色结果, 这对系统而全面的研究牙根发育形态学具有重要的意义。

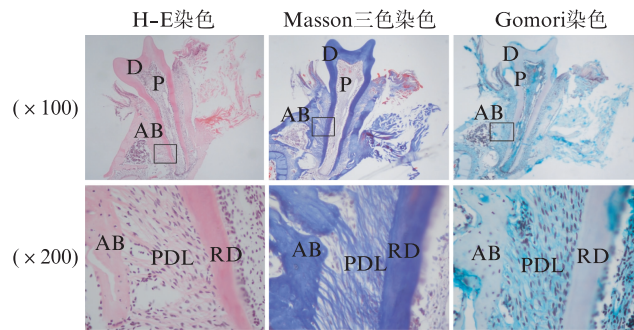


图 4 小鼠 PN21 时下颌第一磨牙 3 种方法染色结果
Fig.4 The result of the mandibular first molar root in postnatal day 21 mice by three different staining methods

AB: 牙槽骨, PDL: 牙周纤维, RD: 根部牙本质, P: 牙髓, D: 牙本质; 放大 200 倍选取的范围为放大 100 倍中的方框处

在这 3 种方法中, H-E 染色方法简便, 但它只能简单将细胞核和细胞质染成紫蓝色与粉红色。且伊红染液若不能熟练掌握染色时间, 可能会导致染色偏红。Masson 法虽然相对复杂, 但能够根据组织的密度不同, 将牙齿的牙本质、牙釉质、牙骨质以及牙槽骨等组织的形态进行鲜明的对比。实验结果中, 牙本质、牙周膜纤维和牙槽骨因富含胶原, 被染成靛蓝色, 细胞核呈蓝紫色。与 H-E 染色法相比, Masson 染色不会出现染色过度的情况, 切片图像更为清晰, 且 3 种颜色使图片更加鲜艳。与 H-E 及 Masson 染色法比较, Gomori 染色法成本便宜且染液保存时间较长。Gomori 染色法为两步染色, 先用天青石蓝和明矾苏木精染核, 再以变色酸 2R 和亮绿两种染液分别将相应的组织和细胞成分有选择地染成红色及绿色。结果展示出牙釉质呈暗红色, 牙本质、牙骨质及牙槽骨呈灰色, 细胞核呈蓝黑色, 牙髓及牙周纤维呈水绿色。

从 3 种染色方法的效果来看, H-E 染色细胞形态较为清晰, 细胞核与细胞质层次分明, 但牙齿硬组织以及牙周组织层次感不强, 适合于成牙本质细胞、成釉细胞以及 HERS 的细胞形态的观察。与其相比, Masson 法中牙釉质、牙本质、牙周纤维、HERS

以及牙槽骨的形态最明显,特别使富含胶原成分的组织染色明显,该结果与韩天龙等^[2]的实验结果相一致,适合牙根发育过程中硬组织以及牙周相关组织的组织学研究。Gomori 染色中细胞核的形态比较明显,但牙齿硬组织以及牙周组织的界限不够清晰,且此方法易出现染色不均匀,某些组织染色过深等问题,故在牙根、牙骨质发育时期不建议使用 Gomori 染色。综上所述,上述 3 种染色方法各有优缺点,研究人员可根据研究需要,选择最合适的染色方法。

【参考文献】

- [1] ALTURKISTANI H A, TASHKANDI F M, MOHAMMEDSALEH Z M. Histological stains: a literature review and case study [J]. *Glob J Health Sci*, 2016, 8(3): 72 - 79.
- [2] 韩天龙,王敏,红敏,等. Masson 三色染色与 HE 染色在豚鼠牙齿组织石蜡切片中的比较研究及应用 [J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(3): 55 - 57.
- [3] RENTSCH C, SCHNEIDERS W, MANTHEY S, et al. Comprehensive histological evaluation of bone implants [J]. *Biomatter*, 2014, 4(1): e27993.
- [4] SELVAM S P, PONNIAH I. Expression of ameloblastin in the human tooth germ and ameloblastoma [J]. *Oral Diseases*, 2018, 24(8): 1538 - 1544.
- [5] IOHARA K, UTSUNOMIYA S, KOHARA S, et al. Allogeneic transplantation of mobilized dental pulp stem cells with the mismatched dog leukocyte antigen type is safe and efficacious for total pulp regeneration [J]. *Biomedical Research*, 2018, 9(1): 116.
- [6] 程敏,王颖,李保泉,等. 改良 Gomori 特殊染色在口腔硬组织切片中的应用 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2006, 13(2): 101 - 102.
- [7] 蒋备战,柴田俊一,王佐林. Versican 对牙根发育影响的动物实验研究 [J]. *口腔颌面外科杂志*, 2010, 20(2): 91 - 94.
- [8] LUAN X, ITO Y, DIEKWISCH T G. Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath [J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(5): 1167 - 1180.
- [9] LI J, PARADA C, CHAI Y. Cellular and molecular mechanisms of tooth root development [J]. *Development*, 2017, 144(3): 374 - 384.
- [10] HUANG X F, CHAI Y. Molecular regulatory mechanism of tooth root development [J]. *Int J Oral Sci*, 2012, 4(4): 177 - 181.
- [11] SHIBATA S, YONEDA S, YANAGISHITA M, et al. Developmental changes and regional differences in histochemical localization of hyaluronan and versican in postnatal molar dental pulp [J]. *Int Endod J*, 2002, 35(2): 159 - 165.
- [12] 盖立婷,徐高祥,姜秋. 影响牙根发育因素的研究进展 [J]. *口腔医学研究*, 2015, 31(5): 531 - 533.
- [13] 陈蔚婷,叶远舟,蔡昀,等. β -catenin 在小鼠下颌第一磨牙发育过程中的表达 [J]. *同济大学学报(医学版)*, 2017, 38(3): 19 - 24.
- [14] HIROSE N, SHIMAZU A, WATANABE M, et al. Ameloblastin in Hertwig's epithelial root sheath regulates tooth root formation and development [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54449.
- [15] ITAYA S, OKA K, OGATA K, et al. Hertwig's epithelial root sheath cells contribute to formation of periodontal ligament through epithelial-mesenchymal transition by TGF- β [J]. *Biomed Res*, 2017, 38(1): 61 - 69.