

锥虫蓝直接染色法鉴定人羊膜细胞活力方案研究

杨文贤 朱富军 詹球 吕礼芳 王磊 刘亮 辛海明 童亚林

【摘要】 目的 摸索锥虫蓝直接染色法在人羊膜细胞活力快速鉴定中的适宜浓度及染色时间。
方法 取健康剖宫产产妇的胎膜 6 张,浸泡后分离羊膜并剪成 1 cm × 1 cm 备用。(1)取部分制备好的羊膜分别浸泡于 1、2、3、4 g/L 4 种浓度的锥虫蓝溶液中,每个浓度下各浸泡 1、3、4、10 min 后取出,在 PBS 中漂洗 30 s,更换 PBS,继续漂洗 30 s。在光学显微镜下选取 4 个视野拍照,每个视野计数 1000 个细胞,同时计数蓝染细胞计算细胞死亡率。(2)另取部分制备好的羊膜浸泡于 0.5 g/L 氯己定 1 h 后行锥虫蓝直接染色,锥虫蓝溶液浓度与染色时间为前一实验结果选定的浓度、时间,并与 1 g/L 锥虫蓝染色 10 min 对比。后续操作及检测同前一试验。对数据行两因素析因设计方差分析、Duncan 多范围检验及 LSD 检验。
结果 (1)1、2、3 g/L 锥虫蓝染色 1、3 min 后细胞死亡率相近 (P 值均大于 0.05),染色 4、10 min 后细胞死亡率明显高于 1、3 min (P 值均小于 0.05)。4 g/L 锥虫蓝染色 1、3、4 min 后细胞死亡率相近 (P 值均大于 0.05),染色 10 min 后细胞死亡率显著高于 1、3 min (P 值均小于 0.05)。锥虫蓝浓度为 2、3、4 g/L 时,各时相点细胞死亡率都显著高于 1 g/L (P 值均小于 0.05)。(2)对经 0.5 g/L 氯己定浸泡 1 h 羊膜染色显示,1 g/L 锥虫蓝染色 1 min 细胞死亡率 [(72.6 ± 7.4)%] 显著低于预计死亡率 (100.0%, $P < 0.05$),染色 3 min 细胞死亡率 [(95.3 ± 5.6)%],染色 10 min 细胞死亡率 [(99.8 ± 5.0)%] 与预计死亡率相近 (P 值均大于 0.05)。
结论 锥虫蓝直接染色法鉴定人羊膜细胞活力的适宜方案为浓度 1 g/L,染色时间 3 min。

【关键词】 锥虫蓝; 着色剂; 羊膜; 时间因素; 浓度因素

随着新鲜与保存人羊膜在眼科、烧伤科、神经外科等领域被广泛应用^[1-4],人羊膜细胞活力鉴定也日显重要。鉴定羊膜细胞活力可以从细胞活性和形态、酶活力及分泌功能等不同方面进行判断^[5-6]。锥虫蓝拒染试验仍然是较为经典而简单有效的方法。

许丽英等^[7]采用单个悬浮细胞锥虫蓝染色排除法的改良方法,将羊膜直接置入锥虫蓝溶液中染色。此方法笔者简称为锥虫蓝直接染色法,但其提出的染色方案(锥虫蓝浓度 1 g/L,染色时间 10 min)因染色时间过长,可能导致正常羊膜细胞亦被蓝染出现死亡率增加的假象。笔者拟采用析因设计筛选出锥虫蓝直接染色法在鉴定羊膜活力时,锥虫蓝的适宜浓度及染色时间,为规范此鉴定方法提供相关依据。

1 材料与方 法

本研究经解放军第一八一医院医学伦理委员会批准,以该院剖宫产产妇弃用胎膜为试验对象,产妇均签署知情同

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2013.03.020

基金项目:全军医学科学技术研究“十二五”面上基金(CWS11J277);全军医学科学技术研究“十一五”计划课题(06MA121);广西自然科学基金(桂科自 0991290);广西科学研究与技术开发计划(桂科攻 1140003A-39)

作者单位:541004 桂林,广西师范大学生命科学学院(杨文贤、王磊、刘亮);解放军第一八一医院烧伤整形科(朱富军、辛海明、童亚林),动物实验室(詹球、吕礼芳)

通信作者:童亚林,541002,Email:181tyl@sina.com,电话:0773-2081665

意书。

1.1 羊膜制备

选取 6 张足月龄胎膜,产前检查梅毒、人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、巨细胞病毒等均为阴性,剖宫产后 15 min 内取材。取出的胎膜置于无菌容器中冰浴运送至无菌实验室。无菌生理盐水洗净胎膜后放入抗生素溶液(50.0 mg/L 青霉素、50.0 mg/L 链霉素和 2.5 mg/L 两性霉素 B)中浸泡 10 min,再将羊膜与绒毛膜钝性分离后剪成 1 cm × 1 cm 大小备用。

1.2 锥虫蓝溶液配制

称 4 g 锥虫蓝用少量蒸馏水研磨,加双蒸水至 100 mL,充分混匀后用滤纸过滤,4 ℃ 保存。使用时以 PBS 分别稀释锥虫蓝使其浓度达 1、2、3、4 g/L。

1.3 试验方法

1.3.1 锥虫蓝染色时间及浓度筛选 取部分制备好的羊膜分别浸泡于 1、2、3、4 g/L 锥虫蓝溶液中,各浓度下各浸泡 1、3、4、10 min 后取出,在 PBS 中漂洗 30 s,更换 PBS,继续漂洗 30 s。用 BX-51 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),在 200 倍视野下选取 4 个视野拍照,每个视野计数 1000 个细胞,同时计数蓝染细胞,计算细胞死亡率。细胞死亡率(%) = 蓝染细胞数 ÷ 1000 × 100%。

1.3.2 锥虫蓝染色时间及浓度验证 另取部分制备好的羊膜浸泡于 0.5 g/L 氯己定 1 h 后,行锥虫蓝直接染色,锥虫蓝溶液浓度与染色时间依照前一实验结果选定的浓度、时间,并与 1 g/L 锥虫蓝染色 10 min 进行对比。后续操作及检测同 1.3.1。

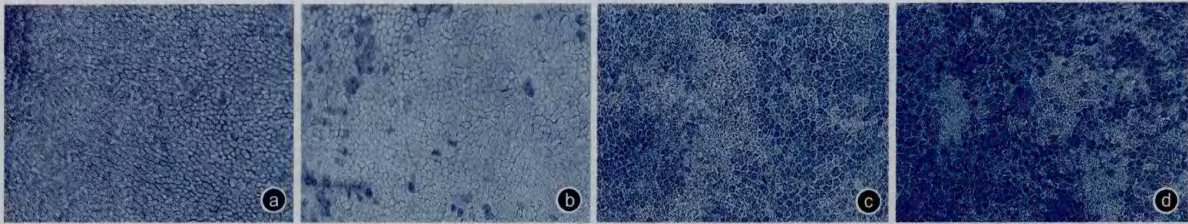


图 1 1 g/L 锥虫蓝溶液各时相点下染色效果比较 光学显微镜 $\times 200$ 。a. 染色 1 min, 细胞死亡数较少, 蓝染很淡; b. 染色 3 min, 细胞死亡数较少, 蓝染较深; c. 染色 4 min, 细胞死亡数增加, 蓝染变深; d. 染色 10 min, 细胞死亡数明显增多, 蓝染色深

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件行两因素析因设计方差分析、Duncan 多范围检验及 LSD 检验 (软件自动略去该统计量值)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 锥虫蓝染色时间及浓度初步筛选结果

1, 2, 3 g/L 锥虫蓝染色 1, 3 min 之后细胞死亡率相近 (P 值均大于 0.05), 染色 4, 10 min 后细胞死亡率均明显高于 1, 3 min (P 值均小于 0.05)。4 g/L 锥虫蓝染色 1, 3, 4 min 后细胞死亡率相近 (P 值均大于 0.05), 染色 10 min 后细胞死亡率显著高于 1, 3 min (P 值均小于 0.05)。当锥虫蓝浓度为 2, 3, 4 g/L 时, 各时相点细胞死亡率都显著高于 1 g/L (P 值均小于 0.05)。所以锥虫蓝浓度应选取 1 g/L, 染色时间在 1, 3 min 之间。见图 1, 表 1。

表 1 不同浓度锥虫蓝染色不同时间细胞死亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

锥虫蓝浓度	样本数	染色 1 min	染色 3 min	染色 4 min	染色 10 min
1 g/L	16	8.4 \pm 0.8	9.2 \pm 0.4	15.6 \pm 2.8 ^{bc}	33.4 \pm 3.0 ^{bc}
2 g/L	16	15.2 \pm 0.9 ^a	17.1 \pm 0.7 ^a	25.0 \pm 5.6 ^{abc}	40.6 \pm 2.5 ^{abc}
3 g/L	16	28.4 \pm 1.1 ^a	30.7 \pm 1.1 ^a	38.9 \pm 5.3 ^{abc}	52.1 \pm 2.6 ^{abc}
4 g/L	16	43.5 \pm 1.1 ^a	45.5 \pm 4.6 ^a	47.7 \pm 5.2 ^a	60.2 \pm 2.8 ^{abc}

注: 浓度因素主效应: $F = 451.13$, $P < 0.01$; 时间因素主效应: $F = 872.55$, $P < 0.01$; 二者交互作用: $F = 5.03$, $P < 0.05$; 1 g/L 时浓度主效应: $F = 382.15$, $P < 0.01$; 1 g/L 时时间主效应: $F = 207.55$, $P < 0.01$; 2 g/L 时浓度主效应: $F = 568.25$, $P < 0.01$; 2 g/L 时时间主效应: $F = 332.27$, $P < 0.01$; 3 g/L 时浓度主效应: $F = 598.78$, $P < 0.01$; 3 g/L 时时间主效应: $F = 689.56$, $P < 0.01$; 4 g/L 时浓度主效应: $F = 879.32$, $P < 0.01$; 4 g/L 时时间主效应: $F = 456.25$, $P < 0.01$; 与 1 g/L 比较, ^a $P < 0.05$; 与染色 1 min 比较, ^b $P < 0.05$; 与染色 3 min 比较, ^c $P < 0.05$

2.2 锥虫蓝染色适宜时间及浓度验证结果

对在 0.5 g/L 氯己定中浸泡 1 h 羊膜进行染色的结果显示, 1 g/L 浓度下, 染色 1 min 细胞死亡率 (72.6 \pm 7.4)% 低于预计死亡率 (100.0%, $P < 0.05$), 染色 3 min 细胞死亡率 [(95.3 \pm 5.6)%]、染色 10 min 细胞死亡率 [(99.8 \pm 5.0)%] 与预计死亡率比较, 差异均无统计学意义 (P 值均大于 0.05)。

3 讨论

锥虫蓝作为细胞染料具有疏水-亲水构型, 在水溶液中带有负电荷, 能与细胞膜蛋白质分子结合, 对组织细胞有一定的毒害作用^[8]。有研究表明, 浓度为 0.6, 1.0, 2.0 g/L 的锥虫蓝, 对兔视网膜的损伤逐渐加重^[9]。锥虫蓝易进入细胞膜完整性被破坏、膜通透性增加的死亡细胞 (早期凋亡细胞除外), 这些细胞在显微镜下显示细胞质被蓝染, 而正常活细胞在一定时间内不易着色, 以此可判断细胞死亡与否^[10-11]。

本实验结果显示, 各浓度下染色 1 min 与 3 min 时细胞死亡率相近。对 0.5 g/L 氯己定浸泡 1 h 完全死亡的羊膜进行染色, 浓度为 1 g/L 时, 3 min 与 10 min 染色效果相近, 因此适宜的染色时间应选 3 min。当浓度为 2, 3, 4 g/L 时, 各时相点细胞死亡率均明显高于 1 g/L, 所以锥虫蓝浓度应选取 1 g/L。因此, 本试验确定的锥虫蓝适宜浓度为 1 g/L, 此浓度下适宜染色时间为 3 min。这与许丽英等^[7]提出的染色方案——锥虫蓝浓度为 1 g/L, 染色时间为 10 min 有所不同。羊膜在染色 10 min 时细胞死亡率远大于 3 min, 这可能与染色时间延长后锥虫蓝对羊膜细胞造成的损伤更大有关; 如果染色时间偏短 (1 min) 则容易出现假阴性 (未蓝染) 结果, 可能与锥虫蓝进入细胞效率降低有关。在任一时间下, 随着锥虫蓝浓度的升高, 假阴性 (蓝染) 出现的概率增加。假阴性及假阳性结果都会影响对真实结果的判断。另外, 新鲜羊膜在 1 g/L 浓度染色 1 min 时仍然有部分死亡细胞, 可能是前期撕、挤、压等医疗操作所致。

在实验过程中, 笔者观察到由于羊膜解剖差异导致的厚薄不一会影响显微镜观察^[12]。所以笔者建议, 染色时尽量在同一区域选取羊膜。锥虫蓝直接染色法结合了羊膜组织薄且为单层细胞的生物学特性, 改良了单个悬浮细胞的锥虫蓝染色排除法, 避免了酶消化这一复杂过程, 更为方便快捷, 且其适宜染色方案为浓度 1 g/L, 染色时间 3 min。

参考文献

- [1] Kothari CR, Goudar G, Hallur N, et al. Use of amnion as a graft material in vestibuloplasty: a clinical study. Br J Oral Maxillofac Surg, 2012, 50 (6): 545-549.
- [2] Pessolato AG, Martins Ddos S, Ambrósio CE, et al. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. Burns, 2011, 37 (7): 1192-1201.
- [3] 华萍, 任越, 熊亚雯, 等. 羊膜对家兔神经损伤修复影响的实验研究. 江西医学院学报, 2009, 49 (11): 38-39.
- [4] 华萍, 涂桂林, 余万霞, 等. 冷冻干燥对羊膜组织形态与生物

活性因子的影响. 南昌大学学报(医学版), 2010, 50(4): 43-46.

[5] Ema H, Suda T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood*, 2012, 120(11): 2174-2181.

[6] 华萍, 华东, 赵集帅, 等. 不同保存方法对羊膜生物学性能影响的比较研究. 南昌大学学报(医学版), 2010, 50(11): 6-11.

[7] 许丽英, 陈家棋, 周世有, 等. 新鲜羊膜的活性维持方法研究. 中国实用眼科杂志, 2002, 2(20): 137-139.

[8] 彭彬, 吴晶晶, 李焯, 等. 贴壁培养细胞台盼蓝拒染试验的方法学探讨. 激光生物学报, 2011, 2(20): 269-273.

[9] 齐世欣. 台盼蓝对视网膜毒性的实验研究. 天津: 天津医科大学, 2006.

[10] Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*, 2001, Appendix 3: Appendix 3B.

[11] Wu H, Yang JM, Jin S, et al. Elongation factor-2 kinase regulates autophagy in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 2006, 66(6): 3015-3023.

[12] Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res Ther*, 2011, 2(3): 25.

(收稿日期: 2012-07-02)
(本文编辑: 贾津津)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊“疑难病例析评”栏目征稿

《中华烧伤杂志》已开辟“疑难病例析评”栏目, 结构分“病历摘要”和“分析与讨论”两部分。(1)作者在文题下署名, 而非仅在文末注明由何人整理, 作者拥有论文的著作权。(2)“分析与讨论”部分不采用依次发言的形式, 而由作者系统归纳, 形成思路清晰、条理清楚、分析得当、科学性强的原创性临床论文。论文性质等同于本刊“论著”。(3)所分析的病例不一定都具备病理检查结果, 但必须经科学手段确诊。

病例选择: (1) 疑难病例, 特别是涉及多学科、多领域的疑难病例。(2) 误诊且有经验教训的病例。(3) 诊断已经明确, 但病情危重或有诸多并发症, 治疗上甚为棘手的病例。(4) 罕见病例。(5) 其他对临床实践有指导或提示意义的病例。以上病例须最终获得明确诊断或成功治疗, 临床资料应齐全, 能提供实验室、影像学和(或)病理确诊证据。

写作格式: 文题可用主要症状、体征或诊断命题, 各短语之间用一线连接。正文分“病历摘要”和“分析与讨论”两部分。“病历摘要”部分需交代清楚患者主诉、病史(包括既往史)、作者接诊后的诊治经过等。应提供必要的实证图片。字数以不超过 1000 字为宜(不包括图片)。“分析与讨论”部分要求逻辑性强, 条理清楚, 能较好地体现正确的临床思维, 对读者的临床工作有实际借鉴意义。重点部分可采用序号标示法, 以突出层次。

写作上应满足以下要求: (1) 开门见山, 首先说明本病例需要从哪几个方面讨论; (2) 阐述诊断和治疗思路, 如何发现并优先处理疾病的关键问题; (3) 将疑点、鉴别诊断要点另行列出, 指出通过什么手段排除相关疾病; (4) 给出病例的最后诊断和诊断依据; (5) 若为误诊, 则需总结经验教训; (6) 若为罕见病, 则需介绍目前国内外的最新进展; (7) 列出相关的国内外主要参考文献。字数以控制在 2000 ~ 2500 字为宜。

本刊编辑部

关于表图中角码符号标注顺序及文字注释的说明

《中华医学会系列杂志编排规范》规定, 表格中注释用角码 a、b、c、d 等应标注在数据右上方, 按先纵后横的顺序出现, 即先标注第 1 纵列, 从上到下, 再标注第 2 纵列, 以此类推依次标注 a、b、c、d 等。表格下方对 a、b、c、d 等的说明按照各字母在表格中出现的顺序(同前, 先纵后横)进行相关描述。见表 1。

表 1 不同材料移植术后各时相点各组小型猪烧伤创面 α 平滑肌肌动蛋白阳性血管数比较(条, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周	术后 4 周	F ₂ 值	P ₂ 值
壳聚糖支架组	24	6.2 ± 2.3 ^a	12.0 ± 2.8 ^{ab}	16.8 ± 2.7 ^{abc}	13.8 ± 1.7 ^{ab}	20.448	<0.01
磺化羧甲基壳聚糖支架组	24	12.5 ± 1.4	21.8 ± 2.3 ^b	36.0 ± 4.7 ^b	23.0 ± 3.0 ^b	58.879	<0.01
ADM 支架组	24	5.7 ± 1.5 ^a	13.7 ± 2.7 ^{abc}	18.3 ± 2.1 ^{abc}	14.5 ± 2.2 ^{ab}	36.325	<0.01
油纱对照组	24	4.7 ± 2.0 ^a	9.7 ± 1.8 ^{ab}	12.7 ± 2.3 ^{ab}	14.7 ± 2.9 ^a	24.000	<0.01
F ₁ 值		22.637	28.087	62.651	18.055		
P ₁ 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		

注: 表中数据为每 400 倍视野下观察结果; F₁、P₁ 值为组间同一时相点比较所得, F₂、P₂ 值为组内各时相点比较所得; 与磺化羧甲基壳聚糖支架组比较, ^aP < 0.05; 与组内前一时相点比较, ^bP < 0.05; 与油纱对照组比较, ^cP < 0.05

各类统计图中注释用角码也采用 a、b、c、d 等标注; 根据 $\bar{x} \pm s$ 表示的数据所绘统计图, 需用线段在图上标明 s 值。

本刊编辑部