

改良Alamar Blue法检测结直肠微小组织块的活力***☆

甘嘉亮¹, 高 枫¹, 曹云飞¹, 廖 存², 黄家豪², 唐双意³

Viability of tissue fragments in colon and rectum detected using modified Alamar Blue assay

Gan Jia-liang¹, Gao Feng¹, Cao Yun-fei¹, Liao Cun², Huang Jia-hao², Tang Shuang-yi³

Abstract

BACKGROUND: Alamar Blue assay is one of the common methods to evaluate histic or cellular viability. It is widely used to detect cell viability at present. However, using Alamar Blue assay to detect the viability of tissue fragments has not been reported.

OBJECTIVE: To detect the viability of the regular tissue fragments and cancer tissue fragments in the mucous membrane of colon and rectum using modified Alamar Blue assay.

METHODS: Based on cell viability detect assay of Alamar Blue, the viability of the regular tissue fragments and cancer tissue fragments in the mucous membrane of colon and rectum was assessed using absorbance per unit mass. The detecting time was chosen at 0, 6, 12, 18, 24, 30 and 36 hours according to the specification of the Alamar Blue assay and the pre-experiment results. Every specimen was divided into seven groups and the blank control hole was established.

RESULTS AND CONCLUSIONS: Absorbance per unit mass reflected the change tendency of proliferation activity in tissue fragments as the culture time went on. Both regular tissue fragments and cancer tissue fragments in the mucous membrane of colon and rectum reached the best proliferative state at 12-24 hours after culture. It confirms that the modified Alamar Blue assay is a sensitive and effective way to evaluate the viability of colorectal tissue fragments.

Gan JL, Gao F, Cao YF, Liao C, Huang JH, Tang SY. Viability of tissue fragments in colon and rectum detected using modified Alamar Blue assay. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(2): 273-276.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: Alamar Blue 法是测定组织细胞活性的方法之一, 目前多数应用在细胞系活力测定方面, 尚未见应用于微小组织块活力的评价。

目的: 采用改良 Alamar Blue 法评价结直肠正常黏膜组织块和癌组织块的活力。

方法: 以细胞活力测定的 Alamar Blue 法为基础, 应用单位质量吸光度来评价结直肠正常黏膜组织块和癌组织块的活力。根据检测试剂盒说明书和预实验结果, 实验选择 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 h 作为检测时间点, 每一例标本分为 7 组, 设空白对照孔。

结果与结论: 单位质量吸光度能够随培养时间的推移, 很好地反映组织块增殖活力的变化趋势, 结直肠正常黏膜组织块和癌组织块培养 12~24 h 达到良好的增殖状态, 证实改良 Alamar Blue 法是评价结直肠微小组织块灵敏有效的新型检测方法之一。

关键词: 微小组织块; Alamar Blue 法; 增殖; 活力; 组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.02.019

甘嘉亮, 高枫, 曹云飞, 廖存, 黄家豪, 唐双意. 改良 Alamar Blue 法检测结直肠微小组织块的活力[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(2): 273-276 [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Colorectal and Anal Surgery,
²Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China;
³Postgraduate College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Gan Jia-liang☆, Studying for doctorate, Department of Colorectal and Anal Surgery, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China gjl259@126.com

Correspondence to: Gao Feng, Doctor, Professor, Department of Colorectal and Anal Surgery, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China gaofeng0771@126.com

Supported by: the Scientific Research Foundation of Education Bureau of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 201012MS039*, 201012MS041*; Innovation Project of Guangxi Graduate Education No.2011105981002D 34*

Received: 2011-09-01
Accepted: 2011-12-02

0 引言

传统的细胞活力测定方法以四甲基偶氮唑盐(MTT)法为代表, 常常应用在体外细胞增殖、药敏检测等实验^[1-3]。近几年逐渐被Alamar Blue法为代表的新方法所取代, 不过Alamar Blue法绝大多数都是局限应用在细胞系活力测定方面。

实验因后续研究需要, 要求最大限度地收集结直肠正常黏膜组织块和癌组织块的培养上清作蛋白组学研究, 故在前期的研究工作中, 尝试应用改良的Alamar Blue法来评价结直肠正常黏膜组织块和癌组织块的活力, 取得较满意的结果, 现报道如下。

1 材料和方法

设计: 组织学体外实验。

时间及地点: 于2010-02/09在广西医科大学医学科学实验中心细胞培养室完成。

材料: 3例新鲜的结直肠癌组织和癌旁5 cm以远的相应正常黏膜组织均取自本科室手术病例, 术前病理活检证实均为腺癌, 术前未作放化疗。

离体后立即用无菌生理盐水各自反复冲洗去除血迹、粪便等污物, 然后放入预冷含有适量Hank's液的15 mL无菌coning离心管内, 4℃保温盒保存, 在10~15 min之内送到实验室。根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗

广西医科大学第一附属医院, 结直肠肛门外科, 药剂科, 广西壮族自治区南宁市 530021; 广西医科大学研究生学院, 广西壮族自治区南宁市 530021

甘嘉亮, 男, 1972 年生, 广西壮族自治区贵港市人, 汉族, 广西医科大学在读博士。gjl259@126.com

通讯作者: 高枫, 博士, 教授, 广西医科大学第一附属医院结直肠肛门外科, 广西壮族自治区南宁市 530021 gaofeng0771@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)02-00273-04

收稿日期: 2011-09-01
修回日期: 2011-12-02
(20110407014/WJ · LX)

机构管理条例》^[4], 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
Alamar blue 试剂盒	上海生博医学生物工程有限公司
无酚红高糖 DMEM 培养基	杭州吉诺生物技术有限公司
Hank's 液(粉剂)	Sigma 公司
酶标仪	美国 MULTISKAN EX PRIMARY EIA V 2.3

方法:

结直肠黏膜和癌组织标本及处理: 在洁净台置于无菌玻璃皿内用无菌器械分别清理标本, 去除坏死组织、剪除黏膜下组织, 各切一小块常规做苏木精-伊红染色。

根据预实验摸好的抗污染流程进行无菌处理后, 黏膜组织更换至另一个无菌玻璃皿(含适量Hank's液), 展开剪成约0.3 cm×0.3 cm的组织块。

癌组织更换至无菌青霉素瓶(含适量Hank's液), 剪碎成约0.3 cm³的组织块, 100目不锈钢细胞筛过滤去除单个细胞、碎片和太小的组织块, 剔除未能剪碎明显不符合要求的较大癌组织块。

黏膜组织块和癌组织块各自再用双抗Hank's液重悬洗涤、低温离心3次, 含双抗无酚红无血清培养基(简称条件培养基)重悬洗涤、低温离心2次, 最后用1.5 mL无菌离心管分装成7份, 离心去除水分, 分别称湿质量, 冰上等候移至培养板培养。

组织块增殖活力测定: 根据检测试剂盒说明书和预实验结果, 实验选择0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 h作为检测时间点, 因此每例标本分为7组, 每组每次实验根据组织量多少分别设有4或5个复孔, 设空白对照孔, 周边孔弃用, 每孔加200 μL条件培养基。

用锡纸包装培养板避光, 置于37 °C恒温、体积分数5%CO₂, 饱和湿度培养箱培养, 培养18 h时更换1次18, 24, 30, 36 h四组各孔的条件培养基(无酚红高糖DMEM培养基)。

按检测时间点每孔加入 Alamar blue 20 μL, 再继续培养6 h, 将培养板置于酶标仪上, 以630 nm为参考波长, 570 nm为实验波长测定吸光度(A)值, 把每组各孔A值相加得到总A值, 除以各组湿质量, 即获得各个检测时间点的单位质量吸光度。

主要观察指标: 各孔A值, 各组湿质量, 各单位质量吸光度。

2 结果

2.1 各检测时间点单位质量吸光度 见表1。

表 1 3 例标本 7 个检测时间点单位质量吸光度
Table 1 Absorbance per unit mass of three specimens at seven time points

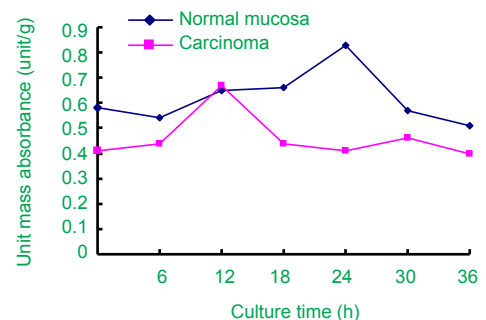
Culture time (h)	Absorbance per unit mass (unit/g)					
	N1	Ca1	N2	Ca2	N3	Ca3
0	0.58	0.41	0.64	0.27	0.52	0.44
6	0.54	0.44	0.59	0.24	0.62	0.55
12	0.65	0.67	0.64	0.34	0.52	0.88
18	0.66	0.44	0.59	0.61	0.68	0.73
24	0.83	0.41	0.58	0.62	1.08	0.83
30	0.57	0.46	0.38	0.59	0.89	1.26
36	0.51	0.40	0.25	0.58	0.53	1.17

N represents normal tissue fragments; Ca represents cancer tissue fragments; 1, 2 and 3 represent the serial number of specimen

如表1所示, 单位质量吸光度能够随培养时间的推移, 很好地反映了组织块增殖活力的变化趋势。

2.2 组织块增殖活力变化趋势 结直肠离体标本中, 正常黏膜组织块增殖活力在0~24 h保持基本不变或达到增殖高峰, 24 h后增殖活力明显降低。

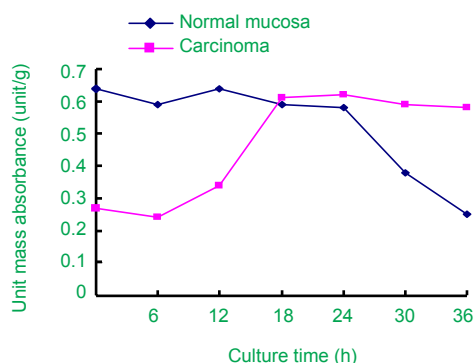
癌组织块增殖活力在12~24 h达到增殖高峰或处于良好增殖状态, 具体变化趋势详见图1~3。



The viability of the normal mucosa tissue fragments of the first specimen began to decrease when reached its biggest viability at 24 h after culture. The viability of the cancer tissue fragments maintained the level of 0 h after reached its maximum at 12 h after culture

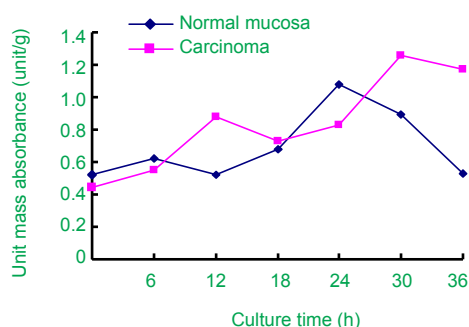
Figure 1 Viability of colorectal tissue fragments in specimen 1 detected using modified Alamar Blue assay

图 1 改良 Alamar Blue 法检测标本 1 结直肠微小组织块的活力



The viability of the normal mucosa tissue fragments of the second specimen became be lower than the level of 0 h after reached its maximum level at 24 h after cultivation. The viability of the cancer tissue fragments gradually ascended and maintained the higher level at 18 h after culture

Figure 2 Viability of colorectal tissue fragments in specimen 2 detected using modified Alamar Blue assay
图2 改良 Alamar Blue 法检测标本 2 结直肠微小组织块的活力



The viability of the normal mucosa tissue fragments of the third specimen became be lower than the level of 0 h after reached its maximum level at 24 h after culture. The viability of the cancer tissue fragments gradually heightened and maintained the ascending higher level during 12-30 h after culture

Figure 3 Viability of colorectal tissue fragments in specimen 3 detected using modified Alamar Blue assay
图3 改良 Alamar Blue 法检测标本 3 结直肠微小组织块的活力

3 讨论

活力测定是许多实验研究常用的基本方法之一。根据研究原理一般分为直接法和间接法。直接法常用的方法有双重核酸染色法等^[5], 间接法常用的方法有WST-8, CCK和MTT等^[6-8]。无论是直接法还是间接法, 其应用范围主要集中在增殖、药敏、细胞毒性、最低抑菌浓度以及抗肿瘤药物筛选等方面的研究评价, 这些研究对象大多数为细胞, 而针对组织块的活力研究报道相对很少。组织块活力测定以皮片活力测定最常见, 常用于组织工程或烧伤移植皮片活力的评价^[9-10]。尽管已有许多活力测定的方法, 但均有步骤繁琐、不够灵敏或反应产物污染无法利用已检测组织细胞作后续实验等缺点。

Alamar blue是一种水溶性新型荧光染料, 被有活力的组织或细胞摄入后, 氧化型的靛青蓝指示剂被活细胞线粒体还原成稳定的粉红色产物, 然后释放到培养基中, 使培养基颜色逐渐发生改变。利用酶标仪或荧光酶标仪检测实际A值, 就间接反映了组织细胞在某个时间点的活力程度, 连续检测不同时间点就反映了活力变化的趋势。与MTT法相比, Alamar blue法具有操作步骤简单、灵敏度高、高通量、无污染无放射性等优点, 检测后的组织细胞仍可以做后续实验不受影响^[11-12]。目前, Alamar blue法已经用于细胞系增殖、细胞毒性、药物筛选等方面的活力研究^[13-14], 尚未见应用于组织块活力评价。实验尝试把Alamar blue法应用在结直肠正常黏膜块和癌组织块的活力评价方面, 取得了较好的结果。

实验显示, 改良Alamar blue法能够反映结直肠正常黏膜块和癌组织块的活力变化。既往研究表明, 在一定范围内活细胞数目与A值存在良好的线性关系^[6]。尽管组织块的A值受组织块厚度、面积、质量等多个标本因素影响^[5], 但归根到底主要与组织块中活细胞数目的最为密切。实验需要检测的结直肠正常黏膜块和癌组织块无法像皮片那样可以精确控制上述多个因素, 而实验实验目的只是寻找摸索出反映这两种组织块增殖状态最佳的培养时间段, 为后续实验打基础, 所以根据研究需要, 同时考虑质量具有可控性特点, 故设计出单位质量吸光度评价指标, 在相同质量情况下, 吸光度值越大, 在一定程度上反映了组织块中活细胞数目就越多。实验显示, 正常组织黏膜块的单位质量吸光度, 在0~24 h培养时间内保持基本不变或逐渐升高达到最大, 但培养24 h后明显降低; 而癌组织块的单位质量吸光度, 则以培养12~24 h达到最大或处于高值水平。单位质量吸光度能够随培养时间的推移, 很好地反映了组织块增殖活力的变化趋势。所以实验认为, 培养12~24 h可使体外结直肠正常黏膜组织块和癌组织块都达到良好的增殖状态, 培养24 h是正常黏膜组织块增殖活力趋势发生明显变化的时间拐点。

总之, 实验以细胞Alamar blue法为基础, 设计出单位质量吸光度评价指标, 对于一些无法控制规则形状的组织块而又需要评价其增殖活力时, 改良Alamar blue法组织块活力检测不失为一种灵敏有效的新型检测方法之一。

4 参考文献

- [1] Bai H, Wang Q, Wu T, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(3):438-441.
白海, 王茜, 吴涛, 等. 人脐血间充质干细胞培养及对异体外周血T淋巴细胞增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(3): 438-441.
- [2] Chen B, Cui J, Xie XM, et al. Preadipocyte viability, proliferation, and apoptosis in young rats following dynamic mechanical force stimulation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(19):3597-3600.

- [3] Gen M, Yin YC, Cao YC, et al. Zhongguo Weichang Waik Zazhi. 2008(11):276-279.
耿明,尹迎春,曹永成,等.化疗药物对原代胃癌细胞的体外杀伤效应及其与Bcl-2表达的关系[J].中华胃肠外科杂志,2008(11):276-279.
- [4] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01.
- [5] Jia XM, Ji XF, Yang HY. Zhonghua Waik Zazhi. 2002;40(2):139-141.
贾晓明,纪晓峰, Yang HY. 双重核酸染色法测定皮肤活力的研究[J].中华外科杂志. 2002;40(2):139-141.
- [6] Stoddart MJ. WST-8 analysis of cell viability during osteogenesis of human mesenchymal stem cells. Methods Mol Biol. 2011;740:21-25.
- [7] Han SB, Shin YJ, Hyon JY, et al. Cytotoxicity of voriconazole on cultured human corneal endothelial cells. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(10):4519-4523.
- [8] Kilani-Jaziri S, Frachet V, Bhourri W, et al. Flavones inhibit the proliferation of human tumor cancer cell lines by inducing apoptosis. Drug Chem Toxicol. 2011.
- [9] He X, Wu JJ, Yang GH. Chongqing Yixue. 2008;37(9):914-917.
贺旭,伍津津,杨桂红.复方壳多糖组织工程皮肤活力测定的研究[J].重庆医学. 2008;37(9):914-917.
- [10] Jia XM, Yang HY, Kim L, et al. Zhonghua Waik Zazhi. 1999;37(3):183-185.
贾晓明, Yang HY, Kim L, 等. 一种新的皮肤活力检测方法的研究[J].中华外科杂志, 1999;37(3):183-185.
- [11] Yang Y, Liu BR, Qian XP. Xiandai Zhongliu Yixue. 2006;14(1):6-8.
杨阳,刘宝瑞,钱晓萍. Alamar blue法用于体外培养细胞活性检测的方法研究[J].现代肿瘤医学, 2006,14(1):6-8.
- [12] Lu Y, Wang B, Zheng MQ, et al. Zhongguo Fanglao Zazhi. 2007;29(6):499-501.
陆宇,王彬,郑梅琴,等.应用Alamar blue和MTT测定抗结核药物最低浓度[J].中国防痨杂志, 2007,29(6):499-501.
- [13] Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, et al. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. Hum Reprod. 2007;22(5):1304-1309.
- [14] Jayanthan A, Incoronato A, Singh A, et al. Cytotoxicity, drug combinability, and biological correlates of ABT-737 against acute lymphoblastic leukemia cells with MLL rearrangement. Pediatr Blood Cancer. 2011;56(3):353-360.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 广西教育厅科研资助项目, 课题名称: CEA 阳性和 CEA 阴性结肠癌蛋白组学比较研究”(201012MS039)和“蛋白组学技术及其在结肠癌中的应用研究”(201012MS041); 广西 2011 年研究生教育创新计划项目(2011105981002D34)。

作者贡献: 第一、二作者进行实验设计, 实验实施为第一作者, 实验评估为第三作者, 标本收集和实验协助为第四、五、六作者, 第一作者成文, 第二、三作者审校, 第一、二作者对文章负责。

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。

伦理批准: 患者及其授权人对生物标本处置知情, 实验方案经医学伦理委员会批准。

本文创新性: 检索 CNKI、万方、维普和 PubMed 数据库 2000/2010, 检索词“组织块活力, Alamar blue 法”, 由最终检索认定实验方法在应用方面具有先进性。课题中应用的 Alamar blue 法, 在国内外实验研究中都有许多应用, 主要集中在细胞系增殖、药敏、细胞毒性及药物筛选等方面的活力研究, 尚未见应用在组织块活力测定方面的研究。

《中国神经再生研究(英文版)》(NRR) 杂志 2012 年 10 大组稿重点

《中国神经再生研究(英文版)》(NRR)	NRR杂志出版重点:	NRR杂志特色:
杂志:	○神经发生、神经可塑性与神经再生	高质量: 坚持篇篇国际专家精审, 保证文章学术质量。 坚持篇篇母语专家语言润色, 保证文章语言质量。
2008年1月起已被SCI, CA, SCOPUS, EM, IC等国际重要数据库收录, 同时被中国统计源期刊(英文版), 中国科学引文数据库核心版收录, 并被美国OVID期刊全文数据库收录, 可	○神经干细胞与神经细胞的再生	短时效: 经同行评议后可采用稿件, 可于6月出版, 特殊优秀稿件可于3个月出版。
同时被全球2000余家机构检索和阅读。	○组织工程与神经再生	多元化: 为作者提供其所需的服务, 如向SCI期刊投稿相关服务。
2011年杂志以旬刊出版, 注重出版时效, 严格保证发行时间。	○神经退行性变与神经再生	NRR杂志文章体例:
2011年6月SCI首次公布NRR杂志影响因子为0.18。	○中枢神经系统的再生	研究原著、综述、学术探讨、循证医学、调查报告、典型病例等。
	○周围神经系统的再生	
	○中医药与神经再生	
	○基因治疗与神经再生	
	○神经再生的新兴技术	
	○神经再生的转化医学	