

# 丫啶橙 - 碘化丙啶双染色法观察大鼠耳蜗基底膜毛细胞活性

原红艳<sup>1</sup> 张淑香<sup>1</sup> 李兴启<sup>2</sup> 李树华<sup>3</sup>

**【摘要】** 目的 探讨大鼠耳蜗基底膜毛细胞活性鉴别的实验观察方法。方法 采用丫啶橙 - 碘化丙啶(acridine orange - propidium iodide, AO/PI)双染色法,荧光显微镜观察,检测经组织培养后新生大鼠耳蜗基底膜毛细胞的活性。结果 在激发光下染色后的活细胞核是亮绿色,失活细胞核呈橙红色。当染液 pH 为 6.5, AO 浓度为 0.1‰ 时,细胞染色不足,浓度超过 1.5‰ 时,出现“过染”,最适染色浓度为 1‰;当 1‰ AO 的 pH 值低于 5.0 时毛细胞蒙上红晕,背景模糊,当 pH 值高于 7.4 时,不能区分死亡细胞与活细胞, pH 值 6.5 ~ 7.0 时,染色效果最好。结论 用 pH 为 6.8 的 1‰ AO、0.1‰ PI 染色,可清晰分辨死/活细胞。

**【关键词】** 毛细胞; 组织培养; 丫啶橙; 碘化丙啶

**【中图分类号】** R339.16 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1006 - 7299(2006)05 - 0377 - 02

## Observation of the Role of Acridine Orange - Propidium Iodide in the Identification of Hair Cell Status in a Laboratory Condition

Yuan Hongyan\*, Zhang Shuxiang, Li Xingqi, et al.

(\* Affiliated Hospital of Chinese People Armed Police Force Medical College, Tianjin, 300162, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate an experimental method of the identification of the viability of the hair cells of the basilar membrane of the rat cochlea. **Methods** A method of acridine orange - propidium iodide, AO/PI was utilized in this experiment, with which analyzed was the viability of the newly regenerated hair cells of the basilar membrane of the rat cochlea. **Results** Various colors observed in this study were related to the different status of hair cells under different study conditions. Those were discussed in the paper. **Conclusion** The status of live and dead cells can be distinguished when pH values are 6.8 in 1‰ AO and 0.1‰ PI.

**【Key words】** Hair cells; Tissue cultivation; Acridine orange; Propidium iodide

在耳蜗基底膜的形态学研究中,如何准确鉴别细胞活性是至关重要的。对失活细胞染色计数,目前大多数实验室采用曙红染色或台盼兰染色法,这些方法较适于单离细胞或单层组织的染色,而耳蜗基底膜组织块较厚,结构致密,细胞分布复杂,用这些方法完成细胞计数,其准确性受到一定影响,因此本研究采用了丫啶橙 - 碘化丙啶(AO/PI)双染色法进行耳蜗基底膜染色,观察染色液浓度、pH 值对染色效果的影响,摸索出最佳染色条件,以期提供一种准确、快速、简便的鉴别细胞活性的方法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂 1% 丫啶橙(AO)母液:丫啶橙原粉

1 武警医学院附属医院耳鼻咽喉科(天津 300162); 2 解放军总医院耳鼻咽喉研究所; 3 沈阳军区总医院耳鼻咽喉科  
作者简介:原红艳,女,河北人,硕士,主要从事听觉生理及临床听力学研究。

通讯作者:李兴启 (Email:lixq@plagh.com.cn)

100 mg,加 pH 为 6.8 的磷酸盐缓冲液(phosphat buffer, PBS)10 ml,充分溶解后贮于棕色玻璃瓶中,置冷暗处保存(可连续使用 1 年以上)。碘化丙啶(PI)母液:PI 原粉 10 mg 加蒸馏水 10 ml,贮存方法同 AO 母液。不同浓度的 AO 染液:取母液用 pH 为 6.8 的 PBS 配制成 0.1‰、0.5‰、1.0‰、1.5‰、3.0‰ 试验用染液。不同 pH 值的 AO 染液:用不同 pH 值(4.5、5.0、6.5、6.8、7.4、8.0)的 PBS 配 1.0‰ 的 AO 染液。分别取不同 pH 值及不同浓度 AO 于 EP 管中,每管中分别加入 100 μl PI,30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(北京化工厂产品)。

#### 1.2 实验方法

**1.2.1 基底膜的分离与培养** 采用显微解剖技术分离新生大鼠耳蜗基底膜组织,采用组织贴壁法在无血清培养基中培养,其中培养液含 0.05 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,以诱导部分毛细胞死亡。

**1.2.2 基底膜毛细胞活性鉴别** 吸干培养皿内培养液,加入含 100 mmol/L 丫啶橙及 10 mmol/L 碘化

丙啶的 PBS, 染色 6 分钟, 再用 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  溶液分色 1 分钟, 最后用 PBS 冲洗并封固观察。染色效果判断标准及矫正方法: ①良好: 视野明亮清晰, 背景墨绿色或淡绿色, 正常毛细胞核呈亮绿色荧光, 胞浆为鲜橙红色荧光。失活细胞核呈橙红色或橙黄色, 与活细胞区分明显。②过染: 背景暗红或鲜红, 视野混浊不清, 毛细胞核蒙上红晕或染成红色, 无法与失活细胞进行区别, 系因染液 pH 值过高或过低, 染液量多或滴染时间长造成。矫正方法是: 可从盖片边缘滴进生理盐水数滴使盖片浮起, 将盖片推向一边, 往基底膜滴加数滴 0.1M 的  $\text{CaCl}_2$ , 分色 1 小时左右再盖盖片镜检。③染色不足: 背景暗黑或暗绿, 毛细胞核发微绿荧光, 胞浆不着色。多因染液浓度低, 量少或滴染时间过短引起。矫正办法: 可将盖片向一边, 在基底膜上滴 1~2 滴染液, 染 5 分钟, 再盖盖片镜检。

## 2 结果

**2.1 不同浓度染液对染色效果的影响** 当染液 pH 值为 6.8, AO 浓度为 0.1‰ 时, 染色呈现“不足”, 亮度较低, 细胞模糊不清(图 1), 随浓度增加亮度增加; 但浓度超过 1.5‰ 时出现“过染”(图 2)。死亡细胞与活细胞区分不明显。最适染液浓度为 1‰(图 3)。

**2.2 不同 pH 值染液的染色效果** 当 AO 浓度为 1‰, pH 值低于 5.0 时, 毛细胞蒙上红晕, 背景模糊不清(图 4); 当 pH 值高于 7.4 时, 背景黄红混浊(图 5), 不能区分死亡细胞与活细胞。试验结果表明: 染液 pH 值 6.5~7.0 时染色效果良好。

**2.3 最佳染色效果** 用 pH 为 6.8 的 1‰AO, 0.1‰PI 染色后荧光显微镜下观察, 可以清晰分辨死/活细胞, 死细胞呈橙红色, 活细胞呈亮绿色, 细胞边界清晰(图 3)。

## 3 讨论

鉴别细胞活性的方法有多种, 但各有优缺点, 过去常采用苔盼蓝染色法, 染色的细胞数量随时间的延长而增加, 细胞计数必须在 3~5 分钟内完成, 所以结果往往不够准确<sup>[1]</sup>。伊红染色所需时间更短, 判断细胞存亡常有很大的主观性<sup>[2]</sup>。

荧光色素染色法与普通染色法比较, 突出的特点是敏感性高。本研究根据荧光染色法原理及基底膜组织块结构特点, 选用 AO-PI 双染法, 该方法简单快速, 但受浓度、pH 值、淬灭剂等影响, 这些因素相互紧密联系, 在一定条件下相互作用。

浓度对荧光素的发光影响较大, 绝大多数荧光素在溶液中显荧光。浓度极低时增加浓度, 荧光亮度增大, 到一定程度亮度达最大, 再增加浓度亮度保持不变, 浓度再继续增加, 亮度即下降, 出现“浓度猝灭”, 所以配染液时一定要严格把握浓度。

各种荧光素有适宜的 pH 值, 它保持色素分子

与溶剂间的电离平衡, 改变 pH 值是不可忽视的问题。廖元康<sup>[3]</sup>采用 pH 值为 6.5~7.0 的丫啶橙染色效果令人满意。黄念君等<sup>[4]</sup>经不断摸索发现 pH 6.8 对 AO 荧光素最合适, 这与本试验结果相符。此外, 在配染液及用其它试剂、溶剂时应注意避开铁、银等金属及有氧化作用的物质的影响。

目前部分实验室为使死/活细胞的差异更为明显, 观察计数时更易于判断, 减少误差, 常采用 AO-EB 染色法, 以荧光显微镜观察计数。AO 能快速与脂质结合, 能通过细胞膜脂质双层, 进入活细胞, 在胞浆内主要富集于溶酶体, 因而可以标记活细胞, 激发后显绿色荧光。EB 能与 DNA 结合, 但不能通过完整的细胞膜, 只能进入细胞膜已破损的细胞与 DNA 结合, 因而可以标记被补体破膜的死亡细胞, 而对活细胞不染色, 激发后显红色荧光。但 EB 是一种强诱变剂, 并有中度毒性, 取用时必须戴手套且用后含 EB 的溶液需进行净化处理, 较为繁琐<sup>[5]</sup>。PI 是另一种荧光染料, 毒性较小, 与 EB 有类似的染色特点, 即只能进入细胞膜破损的死细胞, 进入细胞后与 DNA 快速结合。PI 的最大激发波长是 490 nm<sup>[6]</sup>, 可以与 AO 在同一波长下激发, 激发后显红色荧光。它是目前流式细胞仪检测中的常用染料, 用于死细胞判别<sup>[7]</sup>, 凋亡细胞检测<sup>[8]</sup>、细胞周期检测<sup>[9]</sup>等。本研究中用 PI 进行死亡细胞的染色能够清晰的分辨死/活细胞, 利于观察。

## 4 参考文献

- Hudson L, Hay FC. Practical immunology [M]. Oxford: Blackwell, 1980. 29~31.
- Mishell BB, Shigi SM. Selected methods in cellular immunology [M]. San Francisco: Freeman, 1980. 16~19.
- 廖元康. 丫啶橙荧光染色法检测嗜碱性点彩红细胞 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1997, 15: 316.
- 黄念君, 陈世明, 应贤平. 丫啶橙荧光染色法在微核试验中的应用 [J]. 遗传, 1986, 8: 29.
- 金冬雁, 黎孟枫, 黄培堂, 等译. 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼蒂斯 T, 主编. 分子克隆试验指南 [M]. 第二版. 北京: 科学技术出版社, 1992. 957~959.
- Fernandez - Botran R, Vetrica V. Methods in cellular immunology [M]. New York: CRC Press, 1995. 29~46.
- Furuya T, Kamada T, Murakami T, et al. Laser scanning cytometry allows detection of cell death with morphological features of apoptosis in cells stained with PI [J]. Cytometry, 1997, 29: 173.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry [J]. Cytometry, 1992, 13: 795.
- Ormerod MG, Kubbies M. Cell cycle analysis of asynchronous cell populations by flow cytometry using bromide oxyuridine label and Hoechst propidium iodide stain [J]. Cytometry, 1992, 13: 678.

(本文图 1~5 见插图第 5-2 页)

(2006-03-09 收稿)

(本文编辑 雷培香)

### DPOAE 监测一次性大剂量顺铂致豚鼠耳毒性的实验研究

(见正文第 357 页)



图2 各实验组豚鼠耳蜗切片结果 2a. 3天组内, 外毛细胞排列规则, 外毛细胞散在缺失, 2b. 5天组外毛细胞缺失增加, 纤毛结构不清晰; 2c. 10天组外毛细胞成片缺失, 毛细胞结构紊乱。

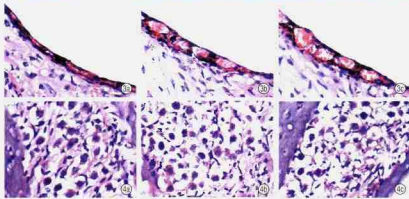


图3 各实验组豚鼠血管纹切片结果 3a. 3天组血管纹正常; 3b. 5天组血管纹血管扩张、充血; 3c. 10天组血管纹血管扩张、充血加重。  
图4 各实验组螺旋神经节切片结果 4a. 3天组螺旋神经节正常; 4b. 5天组螺旋神经节变性坏死; 4c. 10天组螺旋神经节大量变性坏死。

### 电凝镫骨动脉对大鼠内耳结构和功能的影响

(见正文第 360 页)

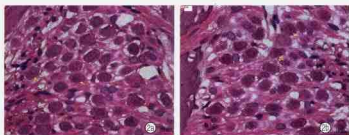


图2a 电凝镫骨动脉豚鼠耳蜗底回螺旋神经节细胞  
图2b 对侧耳蜗底回螺旋神经节细胞

### Y 吡啶-碘化丙啶双染色法观察大鼠耳蜗基底膜毛细胞活性

(见正文第 377 页)

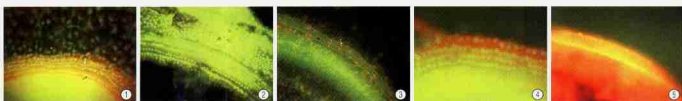


图1 染液 pH 值为 6.8, AO 浓度为 0.1% 时的耳蜗基底膜染色图片 染色呈现“不足”, 亮度较低, HHC(白色箭头所示)、OHC(黑色箭头所示)轮廓不清。  
图2 染液 pH 值为 6.8, AO 浓度为 1.5% 时的耳蜗基底膜染色图片 出现“过染”, 亮度过高。  
图3 染液 pH 值为 6.8, AO 浓度为 1% 时的耳蜗基底膜染色图片 染色效果好, 可明显区分死/活细胞, 死细胞被染成红色, 余活性细胞被染成绿色。  
图4 AO 浓度为 1%, pH 值低于 5.0 时的耳蜗基底膜染色图片 毛细胞染上红晕, 背景模糊不清。  
图5 AO 浓度为 1%, pH 值高于 7.4 时的耳蜗基底膜染色图片 背景黄红混浊。

### NKCC1 基因敲除小鼠的饲养繁殖及其鉴定

(见正文第 379 页)



图2 NKCC1 基因敲除小鼠后代 PCR 结果