

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.24.001

• 基础研究 •

改良的肥大细胞甲苯胺蓝染色法*

梁玉婷[#] 彭霞[#] 林堃 尹悦 李莉[△]

(上海交通大学附属第一人民医院检验科 上海 200080)

摘要 目的:本研究旨在运用一种改良的甲苯胺蓝染色方法鉴定体外分离培养的肥大细胞形态,为肥大细胞研究提供简便的检测方法。**方法:**体外诱导分化培养小鼠骨髓来源的肥大细胞,4周后收集细胞、固定、染色。比较不同固定温度及时间对甲苯胺蓝染色效果的影响,确定最佳条件。**结果:**SCF和IL-3体外培养诱导出小鼠骨髓来源肥大细胞。肥大细胞用改良的甲苯胺蓝染色后细胞着色效果较好,细胞多呈圆形或椭圆形且胞膜较完整,胞浆中充满大量的紫红色颗粒。**结论:**本研究成功运用一种适用于体外培养小鼠骨髓源肥大细胞的甲苯胺蓝染色法,并发现肥大细胞在37℃充分固定后进行染色,可以降低肥大细胞发生脱颗粒。此操作方法稳定性好、简便,适用于体外培养的肥大细胞形态学观察。

关键词:肥大细胞;甲苯胺蓝;染色

中图分类号:R-33; R446.61 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)24-4601-05

The Modified Toluidine Blue Staining Method for Mast Cell*

LIANG Yu-ting[#], PENG Xia[#], LIN Kun, YIN Yue, LI Li[△]

(Department of Laboratory Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: This study aimed to identify the morphology of mast cells by using a modified toluidine blue staining scheme, so as to provide a powerful reference for the experimental basis research of mast cells. **Methods:** Bone marrow-derived mast cells were induced in vitro. After 4 weeks, the cells were collected, fixed, and stained. Mast cells were fixed at different temperature during different time. The optimum condition was determined by comparing the effects of toluidine blue staining. **Results:** Bone marrow cells were induced to differentiate into mast cells by SCF and IL-3 in vitro. When mast cells were stained with modified toluidine blue staining, the staining effect was better. Mast cells were round or oval and the cell membrane was complete and the cytoplasm was filled with a large number of purple particles. **Conclusion:** In this study, we successfully applied a modified toluidine blue staining method to mast cells cultured in vitro. The results showed that the condition at 37 °C full fixation with staining could reduce the degeneration of mast cells. This method was easy to operate with good stability. It was suitable for the morphological observation of mast cells cultured in vitro.

Key words: Mast cell; Toluidine blue; Staining

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R446.61 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)24-4601-05

前言

肥大细胞(Mast cell, MC)起源于骨髓的多能造血干细胞,当其进入外周循环后,迁移至定居处并分化成熟^[1]。成熟的肥大细胞广泛分布于结缔组织及皮肤,呼吸道和胃肠道等器官的粘膜,沿血管分布。随着对肥大细胞功能的深入研究,发现肥大细胞不仅是I型超敏反应的效应细胞^[2],而且在人体多种疾病(包括过敏性哮喘^[3]、荨麻疹^[4]、动脉粥样硬化^[5]、系统性红斑狼疮^[6]、

肺移植^[7]、胃肠道疾病^[8-10]、出血性疾病^[11]、乳腺肿瘤^[12]、子宫内膜异位征^[13]、精子发育形成^[14]等)中发挥了重要的免疫作用,目前的研究已将肥大细胞置于免疫学的中心^[15]。虽已确定肥大细胞与各种疾病的相关性,但对其分子机制了解甚少。

肥大细胞是一类具有多功能的细胞群体,其生理和病理生理功能与胞浆内含有丰富的颗粒密切相关^[16],这些颗粒物质主要包括蛋白酶类、生物胺类、细胞因子及生长因子等。当肥大细胞受外源性或内源性刺激时,可部分或完全脱颗粒,以极快的

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81601395);上海市科委引导类项目(14411963200)、(16YF1409200)

作者简介:梁玉婷(1989-),博士研究生,主要研究方向:肥大细胞活化与疾病,电话:15800572352, E-mail: liangyuting666@126.com;

彭霞(1988-),博士,初级检验技师,主要研究方向:肥大细胞活化与疾病,电话:13761811974, E-mail: pengxiajiao1@163.com

[#] 为共同第一作者

[△] 通讯作者:李莉,博士生导师,教授,主要研究方向:肥大细胞活化与疾病,电话:021-63840090, E-mail: annylish@126.com

(收稿日期:2017-04-05 接受日期:2017-04-26)

速度将胞内预先储存的颗粒释放出来发挥相应的功能。很多物质均可引起肥大细胞活化而发生脱颗粒,根据其活化途径不同,通常分为免疫性和非免疫性活化。一方面免疫性活化是肥大细胞激活的经典途径。肥大细胞表面高表达 Fc ϵ RI 受体(IgE 高亲和力受体),当与 IgE 过敏原形成 IgE-抗原复合物,使相邻 Fc ϵ RI 受体交联迅速启动信号转导级联反应,导致肥大细胞脱颗粒^[17],释放大量过敏性介质,如类胰蛋白酶、白三烯、组胺及多种细胞因子,引起过敏性疾病如哮喘等。这种肥大细胞活化方式与其表面受体的密度及与 IgE 结合的数目有密切关系^[18,19]。肥大细胞表面也表达 IgG 高亲和力受体(Fc γ RI)^[20],此受体的桥联也可以活化肥大细胞引起脱颗粒。另一方面非免疫性活化是肥大细胞的激活不依赖受体交联而发生脱颗粒^[21]。常见的激活物有补体片段、神经肽、离子载体 A23187、人工合成的多聚胺类物 Compound48/80、细胞因子和某些毒素等。由于肥大细胞胞浆中含有特异性的颗粒,所以这些颗粒的染色成为肥大细胞形态学鉴定的基础。

众所周知,肥大细胞胞浆存在大量嗜碱性颗粒,其颗粒成分可能是肥大细胞参与疾病进程的重要途径之一^[22]。成熟肥大细胞最显著的形态特征是其胞浆中含有大量的溶酶体样分泌颗粒(也称为分泌性溶酶体)^[23]。这种分泌颗粒早在十九世纪后期即由德国科学家保罗·埃利希在结缔组织细胞胞浆中观察到^[24]。从那时起,用于鉴定肥大细胞的主要标准是细胞胞浆中存在分泌颗粒,且易被阳离子染料着色。这些阳离子染料主要包括甲苯胺蓝,阿尔新蓝,硫酸小檗碱等,其中甲苯胺蓝染色法是观察肥大细胞形态学的最常用方法之一。目前,国内外文献报道的甲苯胺蓝染色方法大多是对组织中的肥大细胞鉴定,而对体外培养的悬浮肥大细胞研究少有报道。本研究通过相关的对比实验,对原甲苯胺蓝染色法进行了改良,探索出一种适用于

体外培养的肥大细胞染色法。此方法染出的肥大细胞着色较好,且胞膜完整,胞内颗粒明显,具有操作简便等优势,为肥大细胞的形态学研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4-6 周龄雄性 BALB/c 小鼠。动物购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640 培养基、青链霉素(Penicillin-Streptomycin, 100 $\times$)、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;L-谷氨酰胺(L-glutamine, 200 mM)、非必需氨基酸(NEAA, 100 $\times$)、丙酮酸钠(sodium pyruvate, 100 mM)购自美国 Sigma 公司;重组小鼠干细胞因子(Recombinant Murine Stem Cell Factor, SCF)、重组小鼠白介素-3(Recombinant Murine IL-3)购自美国 PeproTech 公司;PE-Cyanine7-anti-mouse Fc ϵ RI、FITC-anti-mouse CD117 购自美国 eBioscience 公司;甲苯胺蓝、高锰酸钾、二甲苯购自国药集团化学试剂有限公司;免疫染色固定液购自碧云天有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠骨髓源肥大细胞(Bone marrow culture-derived mast cell, BMMC)分离及培养 将小鼠脱颈处死,去皮并取出小鼠双侧下肢,整个过程尽量在 2 分钟内完成。分离肌肉组织,取出双侧股骨及胫骨,剪除两端骨髓,2 mL 针筒反复冲洗,直至骨干变白。针管抽吸反复吹打成单细胞悬液,计数细胞密度。按 5 $\times$ 10⁵ 个/mL 密度接种于六孔板。置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中培养。每周更换 BMMC 培养液(配方见表 1),直至第 4 周,维持细胞密度在 1 $\times$ 10⁶ 个/mL 左右。

表 1 BMMC 培养液配方

Table 1 The composition of BMMC media

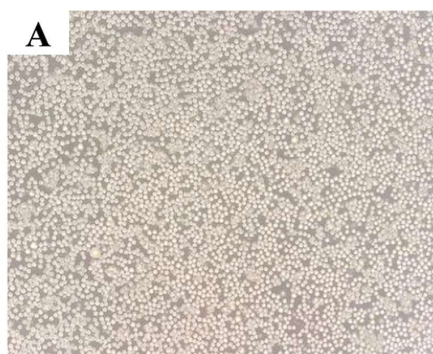
Reagent Name	Volume	Final concentration
RPMI-1640	85 mL	---
FBS	10 mL	10%
Penicillin-Streptomycin(100 $\times$)	1 mL	1%
L-glutamine(200 mM)	2 mL	4 mM
NEAA(100 $\times$)	1 mL	1 $\times$
sodium pyruvate(100 mM)	1 mL	1 mM
Murine IL-3 1 mg/mL	1 μ L	10 ng/mL
Murine SCF 1 mg/mL	2 μ L	20 ng/mL

1.2.2 肥大细胞表面标志的检测 收集培养 4-6 周的 BMMC, PBS 洗涤细胞 2 次,并调整细胞浓度至 2 $\times$ 10⁶ 个/mL。向 4 支流式管中分别加入 100 μ L 上述细胞悬液。分组如下:①空白对照;②加入 FITC-CD117 抗体;③加入 PE-Cy7-Fc ϵ RI 抗体;④同时加入 FITC-CD117 抗体和 PE-Cy7-Fc ϵ RI 抗体。室温、避光孵育 30 min 后 PBS 洗涤重悬,用流式细胞仪进行检测。

1.2.3 改良的肥大细胞甲苯胺蓝染色步骤 ① 1%甲苯胺蓝染液的配置:1.0 g 甲苯胺蓝溶于 80 mL 双蒸水中配制 A 液。0.6 g 高锰酸钾溶于 20 mL 双蒸水配制 B 液。待 A 液完全溶解后煮沸 10 min,然后将已溶解的 B 液逐滴加入 A 液中,再煮沸 10 min,使甲苯胺蓝充分氧化,用双蒸水补足至 100 mL。待自然冷却后过滤调 pH 值至 1.0 备用。② 取培养成熟的 BMMC 用

PBS 洗涤两次后分为 4 组每组约 5×10^6 个细胞。向 BMMC 中加入免疫染色固定液, 细胞分别于 4°C 、 37°C 固定 0.5 和 1 小时。^② 用 PBS 洗去各组细胞中的固定液, 最后用 0.5 mL PBS 重悬细胞, 缓慢吹打细胞, 并将细胞悬液滴入载玻片上, 置于 37°C 温箱烘干。^③ 待细胞烘干后, 用 1% pH 1.0 的甲苯胺蓝染液染色约 2 min, 细流水缓慢冲洗约 30 s。^④ 用二甲苯透明 2 min, 中性树胶封片。

1.2.4 观察固定温度及固定时间对甲苯胺蓝染色效果的影响 比较不同组间肥大细胞的颗粒及胞浆染色情况。40 倍物镜下随机挑选几个视野数 100 个细胞, 并计算未脱颗粒及脱颗粒肥大细胞数。本实验重复 3 次, 柱形图采用软件 GraphPad Prism 5.0 制作。



2 结果

2.1 小鼠骨髓源肥大细胞的表征

用 SCF 和 IL-3 在体外诱导小鼠骨髓细胞向肥大细胞定向分化。在培养第 2 天部分细胞贴壁, 贴壁细胞形态多呈圆形或梭形, 上层悬浮细胞大小形状不均一, 这些细胞则为肥大细胞祖细胞。骨髓细胞培养 6-8d 左右红细胞逐渐消失。随着培养时间的延长, 悬浮细胞在 SCF 和 IL-3 的诱导下渐趋增多, 变为大小、形状均匀的圆形细胞(图 1A)。培养 4 周后用流式细胞仪检测细胞表面 CD117 和 Fcε RI 的表达, 双阳性的细胞超过 90%, 即为小鼠骨髓来源的肥大细胞(图 1B)。结果表明通过此方法我们成功地诱导小鼠骨髓细胞向肥大细胞定向分化。

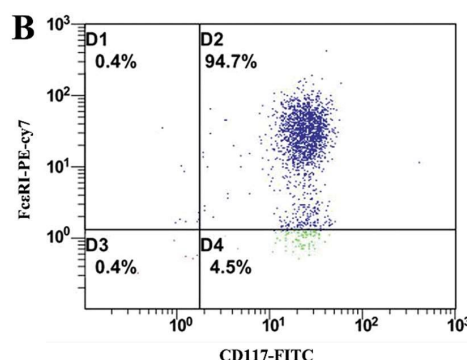


图 1 骨髓源肥大细胞(BMMC)的表征

A. 显微镜下观察 BMMC 呈大小均一的圆形, $\times 200$; B. 流式细胞仪检测 BMMC CD117 和 IgE 高亲和力受体 Fcε RI 的表达

Fig.1 Characteristics of bone marrow mast cells (BMMC)

A. The microscope capacitates a large number of uniform size round BMMC to be observed, magnification $\times 200$;

B. The expression of CD117 and IgE high affinity receptor (Fcε RI) on bone marrow-derived mast cell membrane was detected by flow cytometry

2.2 甲苯胺蓝染色观察肥大细胞形态

光学显微镜下观察固定温度及时间对肥大细胞甲苯胺蓝染色的影响(见图 2), 结果显示悬浮肥大细胞在 37°C 固定下进行甲苯胺蓝染色, 细胞着色效果较好, 且未脱颗粒的细胞数较多。肥大细胞多呈圆形, 胞核呈圆形或椭圆形, 胞浆中充满大量紫红色颗粒, 细胞膜较完整。而在 4°C 固定的细胞发生脱颗粒的相对较多, 低温环境可能刺激肥大细胞活化而引起脱颗粒。40 倍物镜下随机挑选几个视野数 100 个细胞, 计算不同固定条件下脱颗粒及未脱颗粒的细胞数, 比较几种固定方法的效果。从表 2 及图 3 可以得知细胞在 37°C 固定条件下, 脱颗粒的肥大细胞数少, 且在固定 1 小时的效果较佳。而在 4°C 条件固定的肥大细胞染色后较多的细胞已发生脱颗粒(见图 3)。此结果表明肥大细胞无论在 37°C 还是 4°C 条件下均未充分固定, 导致肥大细胞在染色时发生脱颗粒。对比两种温度下固定 1 小时的结果, 表明 37°C 固定条件下更适宜肥大细胞的甲苯胺蓝染色, 此温度更接近肥大细胞生长的温度, 而温度较低时肥大细胞则易发生脱颗粒。

3 讨论

肥大细胞主要分布在结缔组织、皮肤和粘膜等处的天然免疫细胞, 参与固有和适应性免疫应答^[1], 胞浆中颗粒极易被各种

阳离子染料着色, 甲苯胺蓝染料是最常用的染料之一。本研究主要根据已报道的组织肥大细胞甲苯胺蓝染色法基础上加以改良, 对比分析组织肥大细胞染色步骤和体外培养肥大细胞的染色差异而建立的一种体外培养肥大细胞的甲苯胺蓝染色方法。

观察组织中肥大细胞的形态标本多为 10% 甲醛固定后石蜡包埋切片, 故甲苯胺蓝染色前需进行二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水^[25], 此过程可能会导致部分肥大细胞发生脱颗粒, 甚至细胞破碎而影响实验结果, 同时长时间应用 10% 甲醛固定组织使组织 pH 降低, 不利于细胞着色。有研究者改良使用丙酮脱水, 再用二甲苯透明, 避免细胞与水接触, 进而降低细胞破损的机率^[26]。以上研究表明肥大细胞对某些固定液比较敏感, 使染色结果不稳定, 染色效果不佳。目前较常用的固定液有中性甲醛、戊二醛-多聚甲醛等。中性甲醛的渗透力较强, 在某种程度上可以破坏肥大细胞的分泌颗粒, 进而影响其染色效果, 而戊二醛-多聚甲醛则须固定较长时间。本研究对比了中性甲醛、戊二醛-多聚甲醛和免疫染色固定液的效果, 基于组织染色的实验步骤, 发现免疫染色固定液(4%多聚甲醛)对组织细胞穿透性好, 降低了组织细胞的收缩性, 保证肥大细胞固定效果的同时, 减少了其脱颗粒的风险, 是最佳的固定液, 为之后的甲苯胺蓝染色准确反映肥大细胞形态提供了基础。

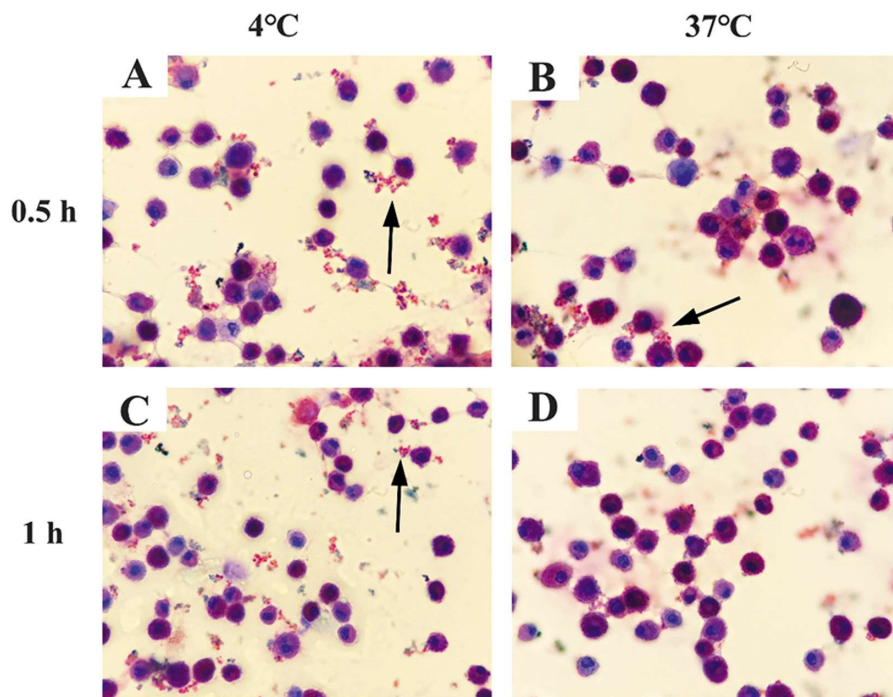


图 2 肥大细胞的甲苯胺蓝染色
Fig. 2 Toluidine blue staining for mast cells
注:黑色箭头表示脱颗粒的肥大细胞。
Note: Black arrows represent degranulated mast cells.

表 2 固定温度及时间对肥大细胞甲苯胺蓝染色效果的影响
Table 2 Effects of different fixation methods on the staining of toluidine blue for mast cells

Methods	Total cell count	Undegranulated cell count	Degranulated cell count
4°C fixation 0.5 h	100	63	37
4°C fixation 1 h	100	75	25
37°C fixation 0.5 h	100	82	18
37°C fixation 1 h	100	88	12

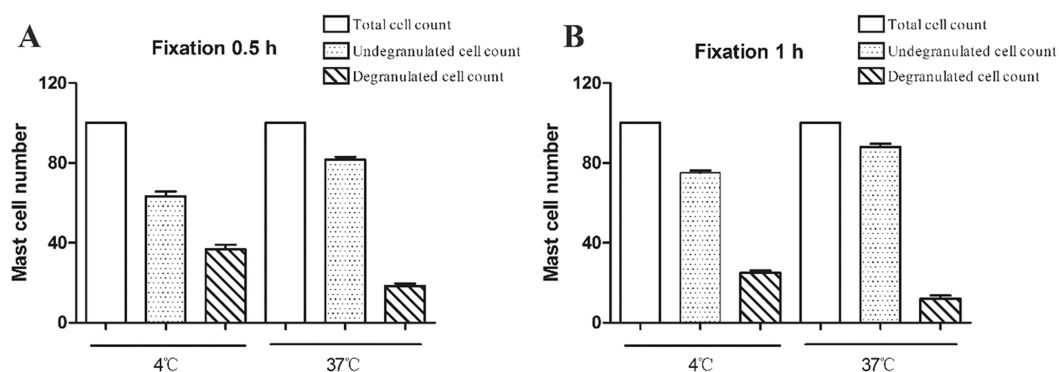


图 3 固定温度及时间对肥大细胞甲苯胺蓝染色效果的影响
Fig. 3 Effects of different fixation methods on the staining of toluidine blue for mast cells

有研究表明大鼠腹膜肥大细胞(RPMC)在相对较低的温度下细胞生长缓慢,且更易发生脱颗粒^[27]。本研究尝试从这一角度观察固定的温度和时间对肥大细胞染色效果的影响,实验中选取了两个温度点(37°C和4°C)和两个时间点(0.5和1小时)进行固定。研究发现在相同固定时间内,与4°C固定的肥大

细胞相比,37°C固定后、染色的肥大细胞较少发生脱颗粒,细胞膜结构比较完整,与之前文献报道的结论相一致。这表明肥大细胞易受外界环境刺激,不同环境、温度,对肥大细胞活力和功能均可造成一定影响,具体机制尚待进一步探讨。就固定时间而言,固定0.5小时的细胞较固定1小时的细胞脱颗粒细胞数

目增加。可能的原因是细胞在半小时之内固定不充分,而之后的染色步骤可能会导致肥大细胞脱颗粒。本研究表明,体外培养的肥大细胞用甲苯胺蓝染色时存在诸多易变因素,所以应注意对固定液、固定温度和固定时间等进行合理的选择,以获得最佳染色效果。

综上所述,此改良的肥大细胞甲苯胺蓝染色方法和常规组织肥大细胞染色方法相比,操作过程更简便、快捷、少环境污染以及降低了实验过程对肥大细胞脱颗粒的影响。且稳定性好,利于体外培养肥大细胞形态学观察,不仅为肥大细胞的实验研究奠定了基础,而且为观察肥大细胞脱颗粒提供了可行性依据,同时也可以将本染色方法拓展至临床上其他细胞的染色,进而使其得到广泛的应用。

参考文献(References)

- [1] Galli SJ, Tsai M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(7): 1843-1851
- [2] Hugle T. Beyond allergy: the role of mast cells in fibrosis [J]. *Swiss Med Wkly*, 2014, 144: w13999
- [3] Steinke JW, Payne SC, Borish L. Eosinophils and Mast Cells in Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease [J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2016, 36(4): 719-734
- [4] Panaszek B, Pawlowicz R, Grzegorzka J, et al. Autoreactive IgE in Chronic Spontaneous/Idiopathic Urticaria and Basophil/Mastocyte Priming Phenomenon, as a Feature of Autoimmune Nature of the Syndrome[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2017, 65(2): 137-143
- [5] Rohm I, Sattler S, Atiskova Y, et al. Increased Number of Mast Cells in Atherosclerotic Lesions Correlates with the Presence of Myeloid but not Plasmacytoid Dendritic Cells as well as Pro-inflammatory T Cells[J]. *Clin Lab*, 2016, 62(12): 2293-2303
- [6] Kaczmarczyk-Sekula K, Dyduch G, Kostanski M, et al. Mast cells in systemic and cutaneous lupus erythematosus [J]. *Pol J Pathol*, 2015, 66(4): 397-402
- [7] Jungraithmayr W. The putative role of mast cells in lung transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2015, 15(3): 594-600
- [8] Bischoff SC. Mast cells in gastrointestinal disorders [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 778: 139-145
- [9] Vanuytsel T, van Wanrooy S, Vanheel H, et al. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism[J]. *Gut*, 2014, 63(8): 1293-1299
- [10] Sato H, Zhang LS, Martinez K, et al. Antibiotics Suppress Activation of Intestinal Mucosal Mast Cells and Reduce Dietary Lipid Absorption in Sprague-Dawley Rats [J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(5): 923-932
- [11] Seidel H, Molderings GJ, Oldenburg J, et al. Bleeding diathesis in patients with mast cell activation disease [J]. *Thromb Haemost*, 2011, 106(5): 987-989
- [12] Faustino-Rocha AI, Gama A, Oliveira PA, et al. Modulation of mammary tumor vascularization by mast cells: Ultrasonographic and histopathological approaches[J]. *Life Sci*, 2017
- [13] Binda MM, Donnez J, Dolmans MM. Targeting mast cells: a new way to treat endometriosis[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(1): 67-75
- [14] Windschuttl S, Nettersheim D, Schlatt S, et al. Are testicular mast cells involved in the regulation of germ cells in man?[J]. *Andrology*, 2014, 2(4): 615-622
- [15] Lundquist A, Pejler G. Biological implications of preformed mast cell mediators[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(6): 965-975
- [16] Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(7): 478-494
- [17] Bulfone-Paus S, Nilsson G, Draber P, et al. Positive and Negative Signals in Mast Cell Activation[J]. *Trends Immunol*, 2017
- [18] Sutton BJ, Gould HJ. The human IgE network [J]. *Nature*, 1993, 366(6454): 421-428
- [19] Marone G, Spadaro G, Palumbo C, et al. The anti-IgE/anti-FcεpsilonR1α autoantibody network in allergic and autoimmune diseases[J]. *Clin Exp Allergy*, 1999, 29(1): 17-27
- [20] Yu Y, Blokhuis BR, Garssen J, et al. Non-IgE mediated mast cell activation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 778: 33-43
- [21] Trieselmann NZ, Soboloff J, Berger SA. Mast cells stimulated by membrane-bound, but not soluble, steel factor are dependent on phospholipase C activation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(4): 759-766
- [22] Vukman KV, Forsonits A, Oszvald A, et al. Mast cell secretome: Soluble and vesicular components[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017
- [23] Gurish MF, Austen KF. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets[J]. *Immunity*, 2012, 37(1): 25-33
- [24] Ribatti D, Crivellato E. Mast cell ontogeny: an historical overview[J]. *Immunol Lett*, 2014, 159(1-2): 11-14
- [25] Atiakshin D, Samoilova V, Buchwalow I, et al. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification [J]. *Histochem Cell Biol*, 2017
- [26] 刘月霞, 齐亚灵, 李文, 等. 肥大细胞甲苯胺蓝法的实验研究[J]. *黑龙江医药科学* 2000, 23(2): 71
- [26] Liu Yan-xia, Qi Ya-ling, Li Wen, et al. Experimental study of mast cell toluidine blue method [J]. *Heilongjiang Medical Science*, 2000, 23(2): 71
- [27] Wang R, Yin X, Zhang H, et al. Effects of a Moderately Lower Temperature on the Proliferation and Degranulation of Rat Mast Cells [J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 8439594