

方法,当细胞死亡时,它能通过变性的细胞膜与解体的细胞核 DNA 结合,而令其着蓝色,活细胞不着色。此外我们还分别测定了培养细胞在不同时间缺氧条件下 LDH 和 K^+ 流出量的变化。LDH 和 K^+ 广泛存在于动物各组织细胞及神经细胞的胞浆内,缺氧后神经细胞膜通透性增高,导致 LDH 和 K^+ 从胞内流出增加。本实验结果稳定,重复性好,为我们进一步研究神经细胞缺氧损伤后的恢复及药物的保护作用提供了一个较好的实验模型。

摘 要

用培养 12 天的新生大鼠海马神经细胞,置于 90% N_2 和 10% CO_2 条件下,分别观察缺氧培养 4、8、12 和 24 小时后神经元的形态变化,细胞死亡率的变化以及缺氧损伤后细胞内 LDH 和 K^+ 流出量的变化。结果表明:缺氧后,神经细胞肿胀,继而细胞膜破裂,细胞死亡率增高,LDH 和 K^+ 流出量增加。神经元

缺氧的损伤随缺氧时间的延长而加剧。

参 考 文 献

- [1] Kass, IS. et al., 1992, *Neuroscience.*, 49 (3): 537—543.
- [2] Radek, R. J. and Giardina, W. J., 1992, *Neuroscience Letters.*, 139: 191—193.
- [3] Dong, WQ. et al., 1988, *Stroke.*, 19: 498—502.
- [4] Sher, P. K. and Hu, S., 1992, *Neuroscience.*, 47 (4): 979—984.
- [5] Tombaugh, G. C. and Sapolsky, R. M., 1990, *Brain Res.*, 506: 343—345.
- [6] 王天佑等, 1989, 中国病理生理杂志, 5 (5): 293—298.
- [7] 颜贻谦等, 1992, 生理学报, 44 (5): 524—527.
- [8] Wang, F. Z. and Nelson, P. P., 1989, *J. Physiological Sciences.*, 5 (4): 277—287.
- [9] Wang, FZ. et al., 1990, *J. Neuroscience Res.*, 25: 312—323.
- [10] 丁爱石和王福庄, 1988, 军事医学科学院院刊, 12 (5): 377—380.

红细胞低温显微动态图象处理技术的建立和应用研究

柏乃庆 许亚勇 秦兰梯 徐澄清 马 庆

(上海血液中心输血研究所 200003)

Diller^[1]首先报道低温生物显微录象系统,其后随着计算机技术、图象记录和冷台技术的迅速发展,在原有基础上作了进一步的改进。如用 IBM/PC 计算机取代了单板机,结合图象处理来研究哺乳动物细胞的形态、物理和化学参数的变化。目前该系统已成为低温生物学与组织器官保存研究的必备条件。虽然国内姚柯敏^[2]等首次报道了应用该类型系统对红细胞和白细胞形态以及冰冻过程进行初步观察,但不能实时记录红细胞在冰冻和复温过程中的实验参数(如年、月、日、时、温度和降温速率等)、红细胞伪彩色处理和测量红细胞的面积及体

积、红细胞结晶变化的动态规律、冰冻损伤机理。为达到上述目的,故开展本题研究。

材 料 和 方 法

一、材料

(一) 红细胞低温显微动态图象处理系统 本系统由显微镜、摄录像机、计算机控温和图象处理等四部分组成。

(二) 低温保护剂的处方 针对六种甘油红细胞保护剂,除每 100 ml 含有甘油量不同以外(分别为 0、20 g、30 g、40 g、50 g、60 g),其它均添加乳酸钠 3 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ 0.2 g, KCL 0.03 g。

(三) 样品制备

1. 实时记录红细胞冰冻保存的动态图象样品制备
取 10 ml 肝素抗凝血液, 离心 (3000 rpm/min) 15 min, 弃上清液后用生理盐水洗涤 2 次 (2500 rpm/min) 各 15 min, 然后用生理盐水 1:9 稀释, 再用 40% 甘油保护剂以 1:1 比例添加到红细胞中, 在室温下静置 30 min。

2. 不同浓度甘油红细胞的制备

1) 浓缩红细胞的制备 每次取正常人血液 18 ml 置于 5 ml ACD-B 方保养液中混匀, 分成 6 份, 分别离心 (2500 rpm/min) 15 min, 弃血浆, 即为浓缩红细胞。

2) 不同浓度甘油的 50% 红细胞制备 将上述的

6 份浓缩红细胞分别加入 0%、20%、30%、40%、50% 和 60% 六种保护剂, 按比例 1:1 混匀, 于室温静置 30—60 min, 备用。

3) 不同浓度甘油的 5% 红细胞制备 将上述的 6 份浓缩红细胞先用生理盐水洗涤 2 次, 每次离心 (2500 rpm/min) 15 min, 分别按 1:9 的比例添加生理盐水混匀, 即为红细胞悬液, 再分别加入 0%、20%、30%、40%、50% 和 60% 六种保护剂, 按比例 1:1 混匀, 于室温静置 30—60 min, 备用。

二、方法

(一) 红细胞低温显微动态图象处理系统的联接方式见图 1。

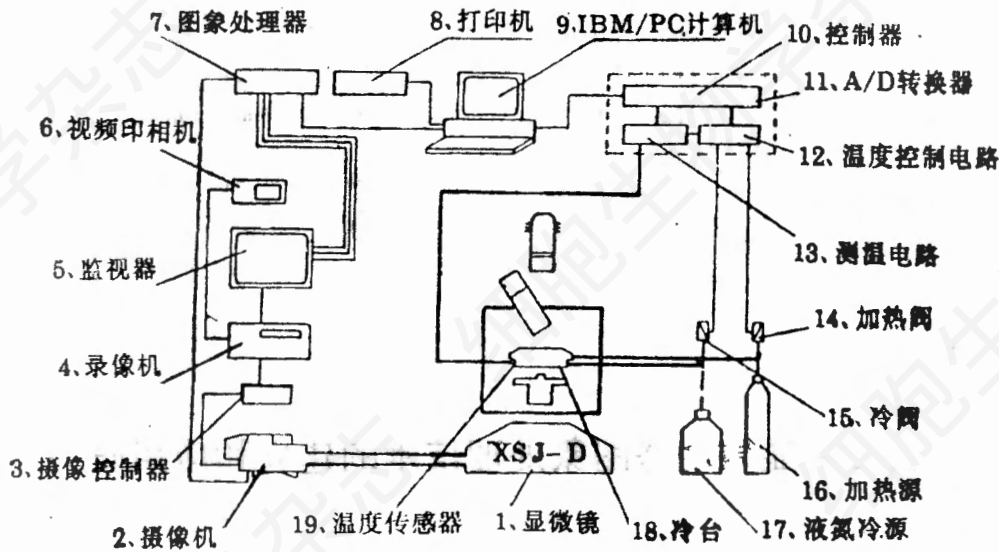


图 1 红细胞低温显微动态图象处理系统示意图

(二) 红细胞在冰冻过程中的实时记录 包括计算机、图象采集卡与摄录象机的联接见图 2。

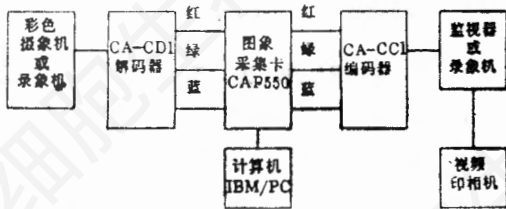


图 2 计算机、图象采集卡与摄录象机的联接示意图

(三) 红细胞伪彩色处理 将存入计算机内的红细胞图象进行去噪声处理 (平滑边缘增强, 中值滤波, 二值化和灰度变换) 而呈现伪彩色。

(四) 红细胞的面积、体积测量 在原始图象上

开一窗口, 按用计算机图象处理方法测量冰冻过程中的红细胞面积、体积中的方法, 处理窗口内的细胞。测出细胞所占区域的象素, 并与标尺所占象素进行比较, 计算出细胞的面积绝对值, 再根据细胞的立体几何特征建立体积计算模型, 计算其体积 (见图版图 3 A、B)。

(五) 不同浓度保护剂的红细胞在降温过程中的相变点温度变化。

吸取 20 ml 样品置于冷台载玻片上, 将液氮输通管插入冷台通道内, 以 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率从室温降至 -30°C , 平衡 5 min, 然后迅速升至室温。其记录方法是用图象采集卡将摄录象机的视频信号转换成数字信号, 并与计算机中的控制参数 (数字信号) 混合, 经编码器转换成视频信号输出到录像机, 录制实

表 1 用标准电势校正两次仪表结果

温度(°C)	显示温度(°C)	温度(°C)	显示温度(°C)	温度(°C)	显示温度(°C)
0	0	-70	-70.03	-140	-140.14
-10	-10.03	-80	-79.95	-150	-149.92
-20	-19.97	-90	-90.05	-160	-159.98
-30	-30.01	-100	-99.94	-170	-169.97
-40	-40.09	-110	-110.07	-180	-180.05
-50	-49.93	-120	-119.90	-190	-190.07
-60	-60.13	-130	-130.17	-200	-199.84

表 2 5段降温动态温度精度测试

设定温度(°C)	实测温度(°C)	设定温度(°C)	实测温度(°C)	设定温度(°C)	实测温度(°C)
13.12	13.14	-15.02	-15.09	-50.63	-50.14
10.68	10.72	-20.27	-20.13	-55.09	-55.22
4.00	4.18	-25.08	-25.14	-60.28	-60.07
4.00	3.96	-30.45	-30.18	-65.71	-65.97
-0.03	0.15	-35.63	-35.75	-70.45	-70.20
-5.32	-5.43	-40.10	-40.31	-75.38	-75.17
-10.15	-10.13	-45.21	-45.35	-79.25	-79.48

验过程,并同时可以从监视器中观察实验过程中的各种图象,也可存入计算机内供随时分析备用。

(六) 观察红细胞在冰冻开始、冰晶形成瞬间和复温后的图象,方法同(五)。

(七) 低温保护剂对红细胞冰冻保存损伤的影响,方法同(五)。

结 果

一、红细胞低温显微动态图象处理系统

在低温显微红细胞动态图象处理系统中温度测量精度将直接影响样品的温度测量和冰冻过程动态温度的精度。使用由上海市计量局标定的温度计,静态温度精度的标定和动态温度精度测试结果见表1和表2。

以上结果,温度精度为 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$,符合设计要求。

二、实时记录红细胞冰冻保存的动态图象

图版图1为图象采集卡记录的红细胞图象,从图可以看出本系统能记录实验日期(年、月、日、时间)和瞬时温度(T)及降温速率(R)等参数,从而实现了红细胞样品图象与实验参数的实时记录要求。其精度明显高于现场录音报告的记录方式,不受人为因素的影响。此结果也可存入计算机内,长期备用。

三、伪彩色处理

对图版图1的红细胞图象进行去噪声处理后,再进行线性彩色处理而呈现伪彩色,结果见图版图2。

四、红细胞面积和体积测定

图3为根据红细胞图象处理获得的平面形态所建立的四种面积、体积计算模型;(a)旋

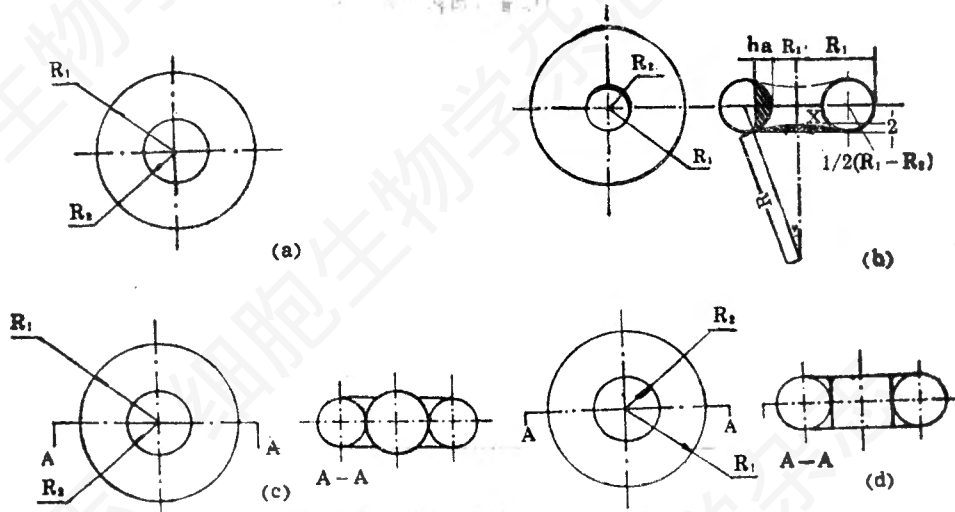


图3 红细胞的四种计算模型

转圆环体；(b) 双凹扁平旋转体；(c) 旋转圆环体加内接球体；(d) 旋转圆环体加内接圆柱体。

图版图3B为计算机测量得到的结果，其中SMM为红细胞正俯视截面的外周面积， SMM_1 为内周面积， R_1 、 R_2 对应半径， V_1 、 V_2 、 V_3 、 V_4 分别对应上述四种红细胞计算模型的测量值。除上述测量值外还可以测量冷冻过程中红细胞的体积，并证明红细胞的体积随温度的下降而逐渐收缩(结果见图4)，最大收缩率为10.5%。

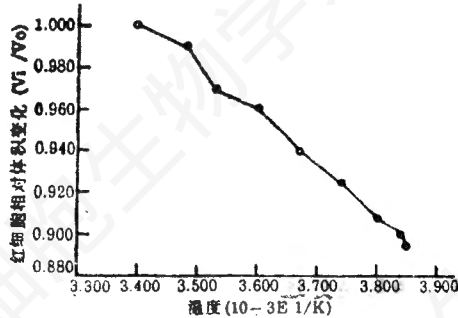


图4 冰冻过程中红细胞体积(相对值)与温度变化的关系

五、不同浓度保护剂和红细胞在降温过程中相变点温度变化

图5结果表明，当降温速率恒定时($-1^{\circ}C/$

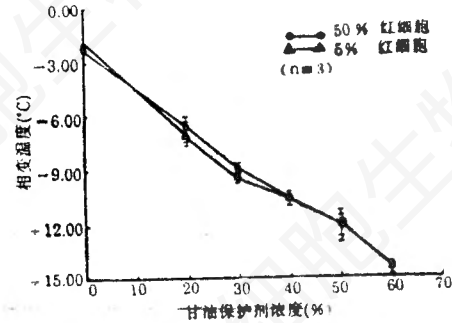


图5 不同浓度保护剂和血细胞在降温过程中相变点温度变化(降温速率 $-1^{\circ}C/min$)

min)低温保护剂的相变点温度与保护剂浓度有关，并随浓度的增加而呈线性下降，即冰晶点向后推移，而细胞浓度的高低对相变点温度则无影响，但冰晶形状有较大差别。高浓度细胞样品以网软冰晶生长，且速度较快，而形成较窄冰道(见图版图4A、B)。

六、低温保护剂对红细胞冰冻保存损伤的影响

实验结果表明，未添加保护剂的红细胞在复温以后红细胞全部破坏，而添加保护剂的红细胞在复温以后仍呈完整形态，这说明低温保护剂的作用。

讨 论

Diller、姚柯敏等报道的实验系统, 可以从显示器上观察细胞样品在冰冻过程中的细胞形态随温度、保护剂浓度的变化^[1,2], 但无法实时测量温度、降温速率和细胞形态变化之间的定量关系。Dietz 和陈蔚等借助图象处理仪分析细胞形态与实验参数的变化, 弥补了上述不足, 但又不能达到实时测量的目的^[3-5]。本研究工作综合并改进国内外现有同类设备性能, 根据国内的加工工艺特点, 集程序降温、动态图象与实验参数的记录、数字图象处理和分析等技术为一体, 建立了低温显微红细胞动态图象处理系统, 并用于研究红细胞在冰冻时热力学变化规律与冰冻损伤之间的关系。经实验应用和运行结果表明, 本系统能够达到以下要求:

(1) 实时测量精度与控温精度达到热电偶温度计测温的最佳值($< \pm 0.5^{\circ}\text{C}$)。系统建立的红细胞图象处理方法能对红细胞进行去噪声伪彩色处理, 使模糊不清的图象变得清晰。

(2) 实时记录红细胞在冰冻过程中的实验参数与细胞形态, 其精度明显高于现场报告录音记录方式, 并且能将细胞图象转换成数字文件便于存入计算机, 长期备用。这对于分析冰冻过程中的红细胞热力学性质与变化规律、进一步探讨红细胞的冰冻损伤机理提供了精确、快速、直观的实验手段。

(3) 从图版图 2、3 的结果可见, 系统建立的微机图象处理方法是可行的, 提出的红细胞体积计算模型可用于体积测量、判断保存红细胞质量的好坏。该方法也可推广应用于立体结构更为复杂的其它细胞。

摘 要

本文报道了一种新型的低温生物学实验系统——红细胞低温显微动态图象处理系统, 该系统将先进的计算机控温、图象处理技术和低温显微镜及摄录象机有机地联成一体。将此技术应用于红细胞的低温冰冻保存实验, 具有能实时记录血细胞在冰冻过程中的实验参数(如时间、温度、降温速率等)与细胞图象, 能对其图象处理及面积、体积测量, 也能使细胞呈现伪彩色及测定红细胞冰冻损伤程度。该系统是一新的综合性的低温生物学研究仪器, 对研究器官保存与移植具有明显意义。

参 考 文 献

- [1] Diller, K. R., 1982, *J. Microscopy*, 126, Pt. 1, 9-28.
- [2] 姚柯敏等, 1986, 低温工程, 5 (6): 1-7.
- [3] Dietz, T. E., 1982, *Cryobiology*, 19, 539-549.
- [4] Dietz, T. E., 1984, *Cryobiology*, 21, 200-208.
- [5] 陈蔚等, 1991, 生物医学工程学杂志, 8 (1): 67-70.

Cell Research(细胞研究)

Cell Research 是由中国科学院上海细胞生物学研究所承办的英文版国际性学术刊物。以介绍国内外细胞生物学领域的研究成果, 促进国际学术交流, 推动我国细胞生物学的发展。1990年创刊, 科学出版社出版, 1992年起由科学出版社纽约分社向国外发行, 暂为半年刊。刊登动、植物细胞生物学方面的短篇论著、研究简报和评论性等文章。

欢迎细胞生物学学会会员和广大细胞生物学工作者投稿和订阅。

来稿请寄: 上海市岳阳路 320 号, 200031

中国科学院上海细胞生物学研究所 Cell Research 编辑部 收

订阅联系: 科学出版社上海办事处发行科 连秉亮

上海市枫林路 270 号, 200032