

# 刃天青还原法检测细粒棘球绦虫原头蚴总数

若山古丽·肉孜<sup>1,2</sup>, 高惠静<sup>1</sup>, 刘辉<sup>1</sup>, 肖云峰<sup>1</sup>, 杨宁<sup>1</sup>, 赵军<sup>1</sup>, 王建华<sup>1</sup>, 林仁勇<sup>1</sup>, 温浩<sup>1</sup>, 吕国栋<sup>1</sup>

**摘要:** 目的 建立刃天青还原法体外检测细粒棘球绦虫存活原头蚴总数的实验方法。方法 根据刃天青在活细胞线粒体酶作用下被还原成强荧光物质的原理, 将体外培养的原头蚴, 用2 mg/mL 刀天青染色10 h后, 用荧光分光光度计(激发光波长在560 nm, 发射长590 nm)测定荧光值, 并利用激光扫描共聚焦显微镜形态观察, 通过统计学方法建立活原头蚴总数与对应的荧光值之间的数学模型, 用于存活原头蚴总数的检测。结果 激光扫描共聚焦显微镜观察发现, 死亡的原头蚴经刃天青染色没有荧光, 活的原头蚴经刃天青染色发出红色荧光。活原头蚴总数与对应的荧光值呈线性关系, 建立直线方程 $y=0.019x+6.453$ , 在检验中将测得的荧光值(y)带入该公式即可获得活原头蚴总数, 此数学模型相关系数 $r=0.994, P<0.01$ , 说明每个浓度下活原头蚴总数与每个浓度对应的荧光值之间的相关系数r极显著。结论 本研究建立了刃天青还原法体外快速检测细粒棘球绦虫存活原头蚴总数的实验方法, 该方法可应用于抗包虫病药物体外筛选, 具有避免人为误差、降低人力消耗等优点。

**关键词:** 刀天青; 细粒棘球绦虫; 原头蚴; 总数检测

中图分类号: R383.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2015)04-0334-06

## Detection of amount of protoscolices of *Echinococcus granulosus* with resazurin reduction method

RUOSHANGULI Rou-zhi<sup>1,2</sup>, GAO Hui-jing<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, XIAO Yun-feng<sup>1</sup>,  
YANG Ning<sup>1</sup>, ZHAO Jun<sup>1</sup>, WANG Jian-hua<sup>1</sup>, LIN Ren-yong<sup>1</sup>, WEN Hao<sup>1</sup>, LYU Guo-dong<sup>1</sup>

(1. Xinjiang Major Disease Medical Laboratory and Key Laboratory of the Ministry and Province Cultivation Base, Clinical Medical Research Institute, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

2. Xinjiang Bestmind Biological Technology Development Co., Ltd., Urumqi 830054, China)

**Abstract:** We aimed to establish a new experimental method to detect the total number of living protoscolices of *Echinococcus granulosus* based on the reduction characteristic of resazurin that the resazurin could emit strong fluorescence when reduced by mitochondrial enzyme. The fluorescence values of the protoscolices stained with resazurin was determined by fluorescence spectrophotometer (excitation wavelength at 560 nm, emission wavelength 590 nm), and the morphology were observed by laser scanning confocal microscope. A mathematical model was established based on the relationship between the number of living protoscolices and the corresponding fluorescence values through the statistical method. Results of the laser scanning confocal microscope showed that the living protoscolices stained by resazurin emitted red fluorescence while the death one emitted little fluorescence. According to the relationship between the measured fluorescence values and corresponding protoscolices number, a linear equation  $y=0.019x+6.453$  was established, and the total numbers of living protoscolices could be obtained by putting the fluorescence value (y) into the formula. The correlation coefficient of the mathematical model was  $r=0.994$  and  $P<0.01$ , which showed that the correlation coefficient r between living protoscolices number in each concentration and corresponding fluorescence values of each concentration was very significant. This study established a rapidly experimental method, which based on the reduction characteristic of resazurin, to detect the total number of living protoscolices of *Echinococcus granulosus* *in vitro*.

国家自然科学基金资助项目(No. 81360251); 新疆医科大学第一附属医院科研专项基金资助项目(No. 2010YX01); 新疆重大疾病医学重点实验室开放课题资助项目(SKLIB-XJMDR-2012-2); 教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT1181)

通讯作者: 吕国栋, Email: lgd\_xju@163.com

作者单位: 1. 新疆医科大学第一附属医院, 临床医学研究院, 新疆重大疾病医学重点实验室, 乌鲁木齐 830054;

2. 新疆贝斯明生物技术发展有限公司, 乌鲁木齐 830054

**Keywords:** resazurin; *Echinococcus granulosus*; protoscolices; total number detection

na (No. 81360251), the Scientific Research Foundation of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (No. 2010YX01), and the State Key Laboratory Incubation Base of Xinjiang Major Diseases Research Fund (No. SKLIB-XJMDR-2012-2)

Corresponding author: Lü Guo-dong, Email: lgd\_xju@163.com

囊型包虫病(Cystic echinococcosis),是由细粒棘球绦虫的幼虫寄生于人、羊等中间宿主体内,引起的一种人兽共患病<sup>[1]</sup>。我国是囊型包虫病高发国家之一<sup>[2]</sup>,该病对我国健康卫生事业和畜牧业均有较大的危害,尤其是西部一些省区是该病的流行区,年经济损失达30亿元左右。由于畜牧产品的流通和城市地区犬类等宠物饲养的增多,囊型包虫病呈现由牧业区向农业区和城区扩散,由西部和北部向东部和南部蔓延的趋势<sup>[3]</sup>。

目前,常规抗包虫病药物为苯丙咪唑类药物,包括:甲苯咪唑、阿苯达唑<sup>[4-5]</sup>和奥芬达唑<sup>[6]</sup>等。苯丙咪唑类药物存在肠道吸收差,血药、肝药浓度较低,疗效不稳定,个体差异大等缺点,加大剂量又易造成药物的毒性反应<sup>[7]</sup>,亟需研发新型抗包虫病药物。抗包虫病药物研发的第一步为体外药效学研究,通常采用伊红、台盼蓝等染色剂通过染色后的颜色反应来判断细粒棘球绦虫原头蚴的存活情况。但这些方法均需靠肉眼判断和人工计数,存在一定的人为误差,可靠性低、操作繁琐、耗时长,不利于大规模的抗包虫药物筛选,因此,抗包虫体外药物筛选亟需建立一种快速、简便、准确、可靠的检测活原头蚴总数的方法。

刃天青是一种氧化还原指示剂,本身为暗蓝色的非荧光物质,在活细胞线粒体酶作用下被还原成粉红色强荧光物质。刃天青还原法已广泛应用于细菌、绵羊精子、植物种子、肝细胞等的活性检测或计数工作;刘娜等<sup>[8]</sup>刃天青还原法快速检测鲜牛奶中总菌数,Driessche<sup>[9]</sup>等用刃天青染色定量微生物生物膜活性,Martin<sup>[10]</sup>等采用刃天青测定绵羊精液中活精子数量,Tai<sup>[11]</sup>等用刃天青检测十字花科植物种子的活性,Daniel<sup>[12]</sup>等用刃天青还原法测定细胞在生物反应器中的活性,Valtink<sup>[13]</sup>等用刃天青检测细胞数量和活性来评价角膜存储介质及其部件的质量。而该方法尚未应用于寄生虫的活性检测或计数。本文首次根据刃天青在活细胞线粒体酶作用下被还原成为粉红色强荧光物质的特点,建立了刃天青检测细粒棘球绦虫活原头蚴总数的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源 从新疆乌鲁木齐市屠宰场新鲜采

集自然感染细粒棘球蚴的绵羊肝脏。在无菌条件下,采集原头蚴,并用含有青链霉素的无菌PBS液(pH7.3)洗3次,加入1%pepsin(pH 2.0),37℃消化30 min,期间每隔5 min,轻摇、翻转试管,使原头蚴从育囊中散出,随后用无菌PBS液漂洗3次,倒置显微镜下检查其活性,伊红染色计数若活力大于95%则用含有10%胎牛血清和1%双抗的1640培养基无菌培养于37℃、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱,实验备用。

**1.2 主要试剂** 1640培养基(C11875500BT)、胎牛血清(16010159)和青链霉素均购自于美国Gibco公司;刃天青(R7017-5G)购自于美国Sigma公司。

**1.3 激光扫描共聚焦显微镜检测** 将刃天青染色20 h的原头蚴经PBS清洗3次后,在激光扫描共聚焦显微镜下,放大200倍、激发波长561 nm发射波长580~710 nm、红光下观测及拍照。

**1.4 检测波长的优化** 原头蚴总数分别取0、50、100、200、400、800头,加刃天青浓度为0.2 mg/mL孵育10 h。为了确定最佳的检测波长,选择发射波长520~570 nm,激发波长590 nm、600 nm下进行检测。

**1.5 刃天青浓度的优化** 原头蚴总数分别取0、50、100、200、400、800头,激发波长560 nm发射波长590 nm,刃天青孵育10 h,为了确定最佳的刃天青浓度,选择刃天青浓度分别为0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL进行检测。

**1.6 检测时间的优化** 原头蚴总数分别取0、50、100、200、400、800头,激发波长560 nm发射波长590 nm,加刃天青浓度为0.2 mg/mL的条件下,为了确定最佳的检测时间设置加刃天青过4 h、6 h、8 h、10 h和12 h进行检测。

**1.7 原头蚴总数的检测** 取在37℃体外培养的原头蚴经生理盐水洗涤3次,分别取0、50、100、200、400、800头原头蚴加入96孔细胞培养板中,设置2个副孔。每个孔用含10%胎牛血清的1640培养基定容至250 μL,加入终浓度为0.2 mg/mL的刃天青工作液。37℃的恒温培养箱内孵育10 h,在激发波长560 nm发射波长590 nm下测定荧光值,重复检测1次。

**1.8 实验数据的处理方法** 本实验通过使用Ex-

cel、prism5.0 和生物统计软件 SPSS17.0 对实验数据进行整理和分析。

## 2 结 果

### 2.1 原头蚴在激光扫描共聚焦显微镜检测的照片

原头蚴经刃天青染色 20 h, 置于激光扫描共聚焦显微镜下观察发现: 活的原头蚴经刃天青染色发出红色荧光, 其中原头蚴的小钩和颗粒细胞荧光强度较高, 死亡的原头蚴经刃天青染色没有荧光或荧光亮度很弱(图 1)。

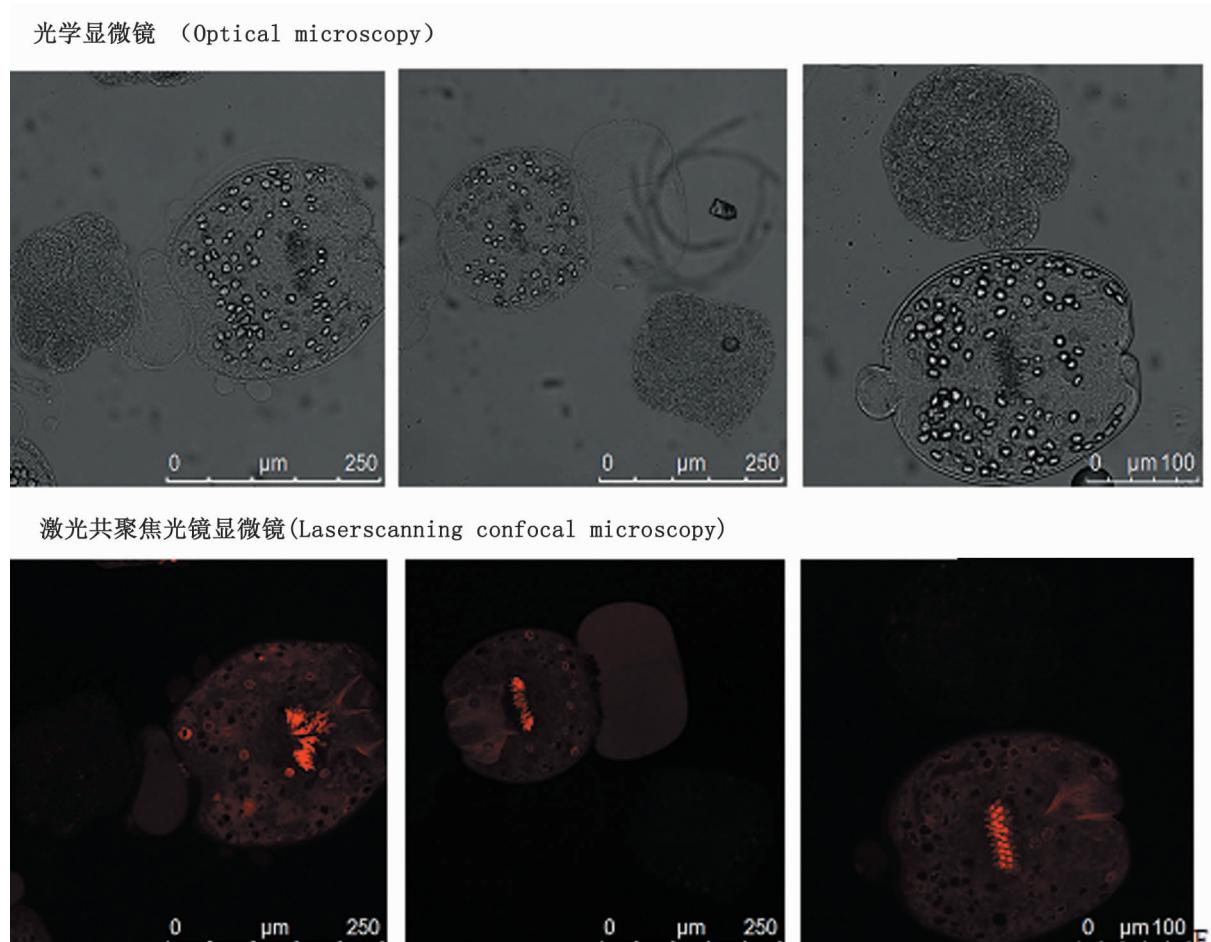


图 1 刀天青染色 20 h 原头蚴在光镜和激光扫描共聚焦显微镜下的图像

Fig. 1 Image in light microscopy and laser scanning confocal microscope of protoscoleces staining by resazurin for 20 h

**2.2 确定最佳检测波长** 根据刃天青的性质, 选择激发波长 520~570 nm, 发射波长 590 nm、600 nm 下进行检测。结果显示, 各激发波长在发射波长 590 nm 下的  $R^2$  值在 0.959 6~0.992 之间, 各激发波长在发射波长 600 nm 下的  $R^2$  值在 0.952~0.983 7 之间, 在激发波长 560 nm 发射波长 590 nm 下检测的每个孔的活原头蚴总数和对应的荧光值之间的相关系数最大, 为 0.992 8(图 2)。

**2.3 确定最佳检测时间** 为优化刃天青的检测时间, 加刃天青 4 h、6 h、8 h、10 h 和 12 h 后, 分别进行检测。结果显示, 各检测时间点的  $R^2$  值在 0.944 3~0.997 5 之间, 加刃天青过 10 h 时检测的每个孔的活原头蚴总数和对应的荧光值之间的相关

系数最大,  $R^2$  为 0.997 5(图 3)。

**2.4 确定最佳刃天青浓度** 为优化刃天青的浓度, 选择刃天青浓度为 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL 分别进行检测。结果表明, 各刃天青浓度的  $R^2$  值在 0.948 1~0.992 0 之间刃天青工作液加 0.2 mg/mL 为最佳, 因为刃天青在此浓度时的每个孔的活原头蚴总数和对应的荧光值之间相关系数最大(图 4)。

**2.5 建立数学模型** 本实验共重复了 9 次, 每次实验 2 个复孔(表 1), 取 18 组实验数据的平均值绘制散点图(图 5), 存活原头蚴总数(x)与荧光值(y)呈正比, 为线型关系。经线型回归分析, 获得方程里  $a = 6.453$ 、 $b = 0.019$ , 回归方程为  $y = 0.019x +$

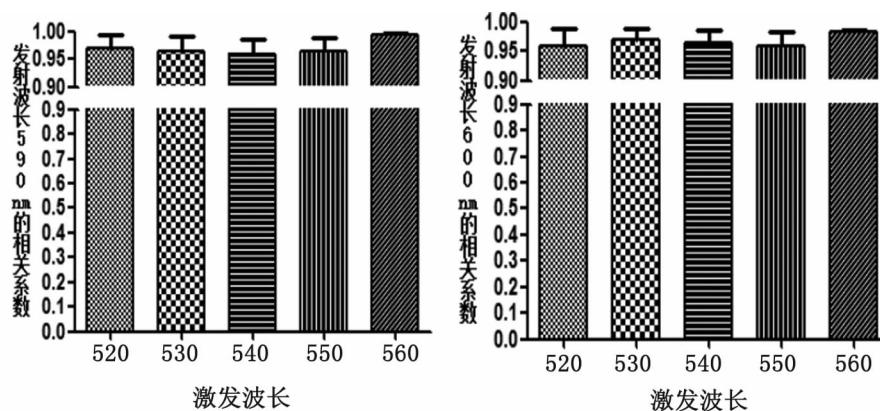
图2 激发波长(520、530、540、550、560、570) nm,发射波长 590 nm、600 nm 下的  $R^2$  值图表

Fig. 2 The  $R^2$  chart on excitation wavelengths (520, 530, 540, 550, 560, and 570) nm and emission wavelength of 590 nm and 600 nm

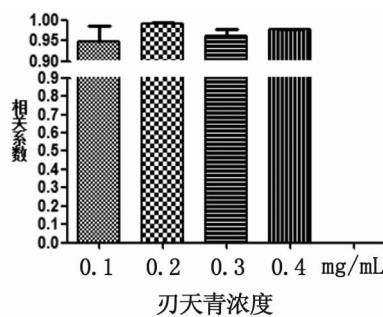
图3 各刃天青浓度的  $R^2$  值

Fig. 3 The  $R^2$  value of various concentrations of resazurin

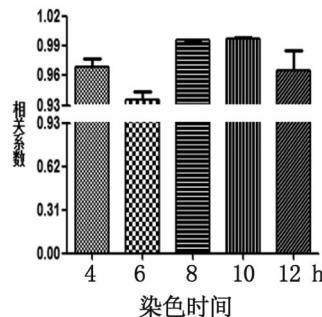
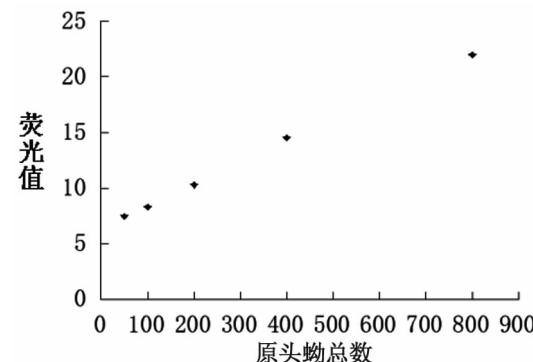
图4 各染色时间的  $R^2$  值

Fig. 4 The  $R^2$  value of various dyeing time of resazurin

$6.453, R^2 = 0.989$ , 相关系数  $r = 0.994$ 。对相关系数  $r$  作显著性检验, 得知  $P < 0.01$ 。说明每个浓度的活原头蚴总数与每个浓度对应的荧光值之间的相关系数  $r$  极显著。

**2.6 可重复性分析** 为了验证该实验方法的可重复性, 对 9 次实验数据进行单因素方差分析, 结果表明, 2 个平行实验中的对应的荧光值的方差近似相同, 因此符合单因素方差分析的条件(表 2)。对每次实验的对应荧光值的 2 个平行测量值做方差分析, 所有测量的平行实验方差基本相同,  $F$  统计量值为 1.79, 小于临界值 6.96, 说明每个平行实验对应



Note: The equation  $y = 0.019x + 6.453, R^2 = 0.989$

图5 原头蚴总数与对应荧光值的散点图

Fig. 5 Scatter diagram of protoscolex number and corresponding fluorescence value

荧光值之间无明显差异; 同样,  $P = 0.155$  大于 0.05 也可以说明不同次实验的活原头蚴总数的不同平行实验之间无明显差异。

### 3 讨 论

本研究利用刃天青在活细胞线粒体酶的作用下被还原成强荧光物质的性质, 建立了检测细粒棘球绦虫存活原头蚴总数的检测方法。0.2 mg/mL 的刃天青染色原头蚴 10 h 后, 利用全波长扫描仪检测激发波长 560 nm、发射波长 590 nm 下的荧光值, 根据已知存活原头蚴总数( $x$ )与对应的荧光值( $y$ )建立数学模型, 即可用于计算未知存活原头蚴的总数。激光扫描共聚焦显微镜的结果(图 1)提示, 在该条件下, 刀天青能够特异性使存活的原头蚴发出红色荧光, 而该红色荧光可被全波长扫描仪检测, 从而根据荧光值可检测存活原头蚴的总数。目前常规的原头蚴计数方法为, 在普通光学显微镜下, 通过判断原头蚴是否被伊红<sup>[14]</sup>、台盼蓝<sup>[15]</sup>等染色剂染色, 来鉴

表 1 每个孔的活原头蚴总数与对应的荧光值

Tab. 1 Corresponding fluorescent value and living protoscoleces amount in each hole

Times for experiment	Parallel experiments	The corresponding fluorescence values of different amount of protoscolex				
		50	100	200	400	800
1	1	6.966 70	7.893 40	9.935 80	14.845 90	20.807 00
	2	7.388 98	7.934 02	9.980 35	14.665 20	22.417 80
2	1	8.180 05	9.071 50	11.113 70	14.618 00	21.612 80
	2	7.797 03	8.780 83	11.105 00	13.304 50	20.654 20
3	1	8.142 96	8.623 08	9.861 96	14.578 20	21.816 00
	2	7.194 52	8.175 50	10.065 50	15.260 70	22.161 60
4	1	7.214 17	7.847 99	9.454 82	13.561 90	22.126 90
	2	6.979 19	7.905 16	9.800 08	14.723 40	22.576 60
5	1	7.371 48	8.293 76	11.112 90	14.981 80	23.392 80
	2	6.840 23	8.185 37	9.967 29	14.565 10	21.513 87
6	1	7.643 56	8.035 10	9.884 20	14.218 30	21.912 50
	2	7.341 81	8.665 09	11.189 20	14.717 50	21.973 40
7	1	8.029 55	8.556 37	11.078 10	14.591 10	20.876 70
	2	8.104 62	8.433 44	9.760 09	13.868 70	21.131 00
8	1	7.418 29	8.189 60	9.574 34	13.743 40	21.831 50
	2	6.988 96	8.118 79	9.607 36	14.956 20	22.572 20
9	1	7.528 98	7.852 36	10.292 20	14.999 00	22.808 50
	2	7.283 56	8.514 74	11.135 20	14.925 70	22.980 20

表 2 原头蚴总数对应的荧光值之间的方差分析

Tab. 2 Analysis of variance between the corresponds fluorescence value and protoscolex amount

Fluorescence value	50 protoscolexes		100 protoscolexes		200 protoscolexes		400 protoscolexes		800 protoscolexes	
	Parallel 1	Parallel 2	Parallel 1	Parallel 2	Parallel 1	Parallel 2	Parallel 1	Parallel 2	Parallel 1	Parallel 2
Sum	67.235	67.179	74.525	74.551	92.430	92.488	130.540	130.590	197.570	197.6
Average	7.471	7.464	8.280	8.283	10.270	10.276	14.504	14.510	21.952	21.956
Standard error	0.433	0.422	0.447	0.471	0.652	0.677	0.645	0.667	0.857	0.756
Variance	0.188	0.183	0.205	0.208	0.487	0.512	0.302	0.309	0.674	0.593

Note: the  $F$  value was 1.79, the critical value of  $F$  is 6.96; the  $P$  value is 0.155

定原头蚴的活性并计数。此方法需靠肉眼判断和人工计数,存在一定的人为误差,当检测的药物数量较多时,耗费人力较高。刃天青染色法能够避免伊红和台盼蓝等染色法的弊端,仅需计数数学模型中的原头蚴总数,在大规模筛选抗虫病药物的工作中具有误差小和方便快捷等优点,已被应用于细菌、绵羊精子、植物种子、肝细胞等物质的活性检测或计数。Samreen 等<sup>[16]</sup>在对多种维生素和畸胎剂对鸡胚心肌细胞微团培养法的影响研究中用刃天青测定鸡胚心肌细胞的活性,Shabafrooz<sup>[17]</sup>等在透明质酸对胶原组织工程支架的肠道生理功能的影响的研究中用刃天青测定细胞的活性和数量。

本研究从刃天青浓度、检测时间、激发波长和发射波长等方面对刃天青的检测条件进行了优化。Alberto 等<sup>[18]</sup>和 John 等<sup>[19]</sup>研究中,刃天青的激发

波长为 530 nm 或 560 nm,发射波长为 590 nm,刃天青终浓度为 0.5 mg/mL,检测时间为 19 h 或 45 h。本研究选择激发波长范围为 520~570 nm,发射波长为 590 nm 和 600 nm,刃天青浓度为 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL 和 0.4 mg/mL,检测时间为 4 h、6 h、8 h、10 h 和 12 h 进行检测,基本涵盖了关键的实验参数。结果表明:激发波长 560 nm、发射波长 590 nm 下,加 0.2 mg/mL 刀天青过 4 h、6 h、8 h、10 h 和 12 h 测的结果都较好,即  $R^2$  值分别为 0.969 1、0.935 1、0.995 6、0.997 6、0.965 6(图 2)。本研究认为加刃天青终浓度为 0.2 mg/mL,检测时间为 10 h,激发波长为 560 nm、发射波长为 590 nm 下测的结果相关性最好。

本原头蚴计数方法初步建立,有待在大规模的抗虫病药物体外筛选中应用,以验证该方法的有

效性。另外,本方法的最佳刃天青染色时间为10 h,耗时较长,需要筛选更为快速的荧光染色剂用于细粒棘球蚴虫的计数工作。

本研究首次建立了荧光检测细粒棘球蚴虫活性的实验方法,为包虫病新药及其他寄生虫病药物的研发提供了一种简便、准确度高的实验方法。

## 参考文献:

- [1]Zhang RN, Wulamu MMT. Recent advances on development of coproantigen detection system for dogs infected with *Echinococcus* spp[J]. Chin J Zoonoses, 2013, 04: 398-402. (in Chinese)  
张瑞妮,吾拉木·马木提.棘球绦虫感染犬粪抗原检测研究新进展[J].中国人兽共患病学报,2013,04:398-402.
- [2]Shi DZH, Analysis of China cystic echinococcosis geography[J]. Endem Dis Bull, 2000, 15(1): 74-75. (in Chinese)  
史大中.中国囊性包虫病的地理分析[J].地方病通报,2000,15(1):74-75.
- [3]Wang LY, Wu WP, Zhu XH. The endemic states of hydatidosis in China from 2004 to 2008[J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26(7): 699-702. (in Chinese)  
王立英,伍卫平,朱雪花.2004-2008年全国包虫病疫情分析[J].中国人兽共患病学报,2010,26(7):699-702.
- [4]Davis A, Pawlowski ZS, Dixon H. Multicentre clinical trials of benzimidazole carbamates in human echinococcosis [J]. Bull World Health Organ, 1986, 64(3): 383-388.
- [5]Davis A, Dixon H, Pawlowski ZS. Muhicentre clinical trials of benzimidazole carbarmates in human cystic echinococcosis (phase II)[J]. Bull World Health Organ, 1989, 67(5): 503-508.
- [6]Jiang CP. Hydatid diseases [M]. Beijing: Taihai Publishing House, 2001, (4): 1-2. (in Chinese)  
蒋次鹏.包虫病学[M].北京:台海出版社,2001,(4):1-2.
- [7]Guidelines for treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. WHO Informal Working Group on Echinococcosis[J]. Bull World Health Organ, 1996, 74(3): 231-242.
- [8]Liu N, Su FW. Study on rapid detection of total bacteriacount in milk by using resazurin reduction method[J]. J Henan Univ Technol, 2013, 34(1): 73-76. (in Chinese)  
刘娜,苏丰薇.刃天青还原法快速检测鲜牛奶中总菌数[J].河南工业大学学报:自然科学版,2013,34(1):73-76.
- [9]Van den Driessche F, Rigole P, Brackman G, et al. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms[J]. Microbiol Methods, 2014, 98: 31-34. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.12.011
- [10]Martin LM, Crenshaw C, Dean AJ. Determination of the number of motile sperm within an ovine semen sample using resazurin[J]. Small Ruminant Res, 1999, 2(36): 161-165. DOI: 10.1016/S0921-4488(98)00180-1
- [11]Min TG, Woo SK. A simple quick and nondestructive method for brassicaceae seed viability measurement with single seed base using resazurin[J]. Hort Environ Biotechnol, 2011, 52(3): 240-245.
- [12]Mueller D, Tascher G, Damm G, et al. Real-time *in situ* viability assessment in a 3D bioreactor with liver cells using resazurin assay[J]. Cytotechnology, 2013, 65(2): 297-305. DOI: 10.1007/s10616-012-9486-6
- [13]Schonfelder J, Valtink M, Knels L, et al. Quality assessment of corneal storage media and their components[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2014, 252(1): 77-82. DOI: 10.1007/s00417-013-2482-5
- [14]Yuan LY, Zhang ZZ, Shi BX, et al. *In vitro* cultivation protoscoleces of the protoslices of *Echinococcus granulosus* in edium RPMI-1640 and MEM[J]. J Anim Sci Vet Med, 2008, 05: 16-18. (in Chinese)  
袁丽英,张壮志,石保新,等.细粒棘球绦虫——原头蚴在两种细胞培养液中体外培养的初步观察[J].畜牧兽医杂志,2008,05:16-18.
- [15]Mi XY, Gunuer TEX, Zhang ZZ, et al. Study on *in vitro* cultivation for protoscoleces of the *Echinococcus multilocularis*[J]. Chin J Anim Infect Dis, 2011, 19(4): 67-70. (in Chinese)  
米晓云,古努尔·吐尔逊,张壮志,等.多房棘球绦虫一泡球蚴的体外培养研究[J].中国动物传染病学报,2011,19(4):67-70.
- [16]Samreen M, Margaret P. Effects of multivitamins and known teratogens on chick cardiomyocytes micromass culture assay [J]. Iran J Basic Med Sci, 2013, 16(9): 996-1003.
- [17]Shabafrooz V, Mozafari M, Kohler GA, et al. The effect of hyaluronic acid on biofunctionality of gelatin-collagen intestine tissue engineering scaffolds[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 10: 101-102. DOI: 10.1002/jbm.a.34984
- [18]Mariscal A, Lopez-Gigoso RM, Carnero-Varo M, et al. Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82(4): 773-783. DOI: 10.1007/s00253-009-1879-x
- [19]O'Brien J, Wilson I, Orton T, et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(17): 5421-5426.