

是: (1) 肝组织从离体到消化分离时间应控制在 1 h 内; (2) 消化分离是最关键的第 1 步, 本实验室采用了磁力搅拌器, 用 DMEM 液配成的质量分数为 0.05% 的 θ 型胶原酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温转子消化肝组织, 时间控制在 30 min 左右, 这样不仅可以消化完全且对肝细胞几乎没有损伤; (3) 消化过滤后的肝细胞悬液中主要的杂质细胞是红细胞, 因此用了红细胞裂解液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 3~5 min 后离心清洗可破碎清除几乎所有的红细胞; (4) 如果所取的肝细胞质量不好 (如患者年纪过大, 有脂肪肝、肝硬化等), 可采用 Percoll 液离心纯化法获取密度较高的肝细胞。采用此方法, 可以较易获取标本, 节省肝脏资源, 也节省了昂贵的胶原酶, 消化纯化接种整个实验过程只需 2~3 h, 所需成本经济, 操作简单, 适于

在小实验室推广。但是这短期的肝细胞培养, 大多适于在 1 星期内进行实验操作, 因为超过这个期限, 肝细胞对受试物的反应能力会迅速下降。所以, 此方法对于长期的毒性研究不大合适。

参考文献:

- [1] 韩聚强, 刘树贤, 胡大荣, 等. 体外肝细胞培养技术新进展. 河北医科大学学报, 2002, 23: 182-186.
- [2] 刘斌, 刘戈, 邓跃华, 等. 小块人肝组织肝细胞分离和培养的实验研究. 消化外科, 2000, 2: 22-29.
- [3] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版社, 2004: 250-252.

(收稿日期: 2005-05-10)

中图分类号: Q2-33 文献标识码: B 文章编号: 1002-3127(2006)03-0186-03

#技术与方法#

改良 MTT 法检测 HePG2 细胞增殖的研究

安飞云, 廖春华, 边寰峰

(中南大学湘雅公共卫生学院卫生毒理学系, 长沙 410078)

关键词: MTT 法; 二甲基甲酰胺; 检测; HEPG2 细胞增殖

MTT 比色法广泛用于检测培养细胞的生长和增殖、评价化学物的细胞毒性以及抗肿瘤药物的敏感试验。由于 MTT 的代谢产物甲瓚 (formazan) 为水不溶性的, 必须采用合适的有机溶剂溶解后, 才能通过酶标仪或分光光度计进行检测。通常的方法是在加入噻唑蓝 (MTT) 培养 4 h 后, 吸出培养基, 加入 DMSO 溶解甲瓚后比色测定。去除培养基的操作较为繁琐, 且引起一定的实验误差, 同时对悬浮生长的细胞, 其应用也受到一定的限制。我们在应用 MTT 比色法检测化学物和药物的细胞毒性的实际工作中, 根据 MTT 比色法存在的主要问题, 采用二甲基甲酰胺 (DMF) 作为甲瓚的溶剂, 以 HePG2 肝肿瘤细胞株为研究对象, 对现行的 MTT 比色法作了一定的改进。

1 材料与方法

1.1 细胞株 HePG2 人类肝肿瘤细胞株由中南大学

湘雅医学院细胞生物室提供。

1.1.2 主要仪器和试剂 MK 3 型酶标仪, UV27501 紫外可见分光光度计, N, N2 二甲基甲酰胺 (DMF, 分析纯, 天津市大茂化学试剂厂), MTT (美国 Sigma)。

1.1.3 试剂配制 MTT 溶液: 用 PBS 配制成 5 mg/ml, 0.122 Lm 滤膜过滤除菌, 分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。pH 调节混合液: 取盐酸 1 ml, 冰醋酸 91.6 ml, 加水 131.4 ml。甲瓚裂解液: 于 200 ml 体积分数为 50% 的 DMF 溶液中缓慢加入 SDS 28 g, 经磁力搅拌充分溶解后, 普通滤纸过滤, pH 调节混合液调 pH 值至 4.7。

1.1.4 实验方法 将对数生长期的 HePG2 细胞用 DEME 培养液稀释成一定密度的细胞悬液, 分别接种于 96 孔培养板 (100 μL 孔) 或 24 孔培养板 (1 mL 孔), 置 CO_2 培养箱内培养过夜。次日 96 孔培养板每孔加入 10 μL MTT 溶液, 24 孔培养板每孔加入 100 μL 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h。然后采用 2 种不同的方法加入甲瓚裂解液: (1) 不吸出培养基直接加入甲瓚裂解液 (直接法), 96 孔和 24 孔培养板加入量分别为 100 μL 或 1 mL; (2) 吸出培养基后加入甲瓚裂解液 (吸出法); 96

基金项目: 西班牙 CSIC 资助项目 (2002CN0008)

作者简介: 安飞云, 教授, 研究方向: 金属毒理学、分子毒理学。

孔和 24 孔培养板每孔加入量分别为 200 μ l 或 2 ml。继续置 CO₂ 培养箱内孵育至甲瓚全部溶解后,于微量振荡器上轻轻震荡混匀 15 min, 96 孔板于酶标仪上测定 (570 nm), 24 孔培养板将裂解液吸出用 751 型紫外可见分光光度计 (570 nm) 检测。

115 统计学方法 采用 SPSS 11.5 软件、Pearson 法进行相关系数分析。

2 结果

211 最大吸收波长的测定 HePG22 细胞以 5×10^4 Pml 的细胞密度接种于 24 孔培养板, 对直接法或吸出法得到的蓝紫色液体, 分别于 400~ 640 nm 的进行光谱扫描。由图 1 可见, 直接法与吸出法的吸收光谱基本相同, 最大吸收峰均位于 560~ 580 nm 之间, 二者呈明显的正相关, 相关系数 $r = 0.986$, $P < 0.01$ 。

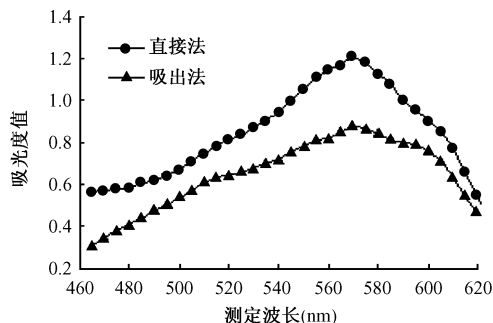


图 1 直接法与吸出法最大吸收峰的比较

212 测定时间的选择 加入 MIT 溶液 4 h 后, 培养孔底部可见许多蓝紫色结晶的沉淀, 加入 SDS2DMF 溶液 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后开始溶解, 随孵育时间的延长, 溶解逐步完全。甲瓚溶解的速度与细胞代谢生成的甲瓚量有明显的关系, 在接种的细胞密度较低时, 甲瓚生成较少, 2 h 后已能完全溶解, 显微镜下未见蓝色的沉淀颗粒, 测定的吸光度值基本稳定。但接种细胞密度如超过 25×10^4 Pml 以上时, 完全溶解需要 4 h 或更长的时间, 测定的吸光度值才趋于稳定。

213 细胞密度与吸光度之间的关系 采用 96 孔培养板分别接种不同细胞密度的细胞悬液, 培养过夜后, 加入 MIT 溶液 10 μ l 孵育 4 h, 如上直接加入甲瓚裂解液 100 μ l 或吸出培养基后加入甲瓚裂解液 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后于酶标仪测定各孔的吸光度值。直接法或吸出法测定的吸光度与细胞密度均存在着明显的相关关系, 相关系数分别为 0.988 和 0.994, P 值均小于 0.0001。

214 HePG22 细胞增殖的检测 采用 96 孔培养板, 接

种 5×10^4 Pml 细胞密度的 HePG22 细胞 100 μ l, 分别于不同时间加入 MIT 溶液后, 按上述方法测定吸光度。由图 2 可见, 随着培养时间的延长, 细胞不断增殖, 细胞数量急剧增加, 在 48 h 内, 吸光度值与细胞增殖呈明显的线性关系, 但随培养时间持续延长, 吸光度值的增加趋于平稳。

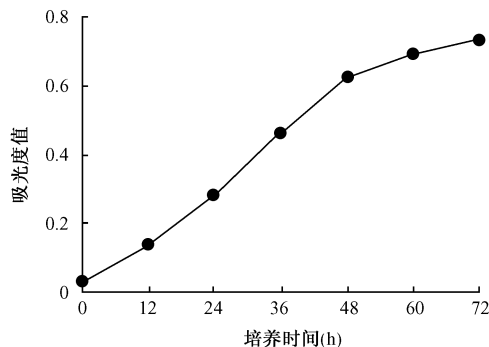


图 2 细胞增殖与吸光度值的关系

3 讨论

现行的 MIT 法其关键的问题是 MIT 的代谢产物甲瓚为不溶水的结晶物, 通常在加入有机溶剂前需吸净全部的培养基, 这不仅操作较为麻烦, 而且也产生一定的实验误差, 同时对悬浮生长细胞的应用也受到一定的限制。赵承彦等^[1] 比较了多种有机溶剂对甲瓚的溶解性, 表明 DMSO 在混合水相中溶解性较差; 而乙醇、异丙醇、正丁醇等却具有较高的挥发性, 因此均不宜采用作为直接加入的溶剂。边兴艳等^[2] 在加入 MIT 试剂后, 吸出部分培养基, 直接加入体积分数为 20% 的 SDS2DMF 酸性溶液 (pH = 2.10) 作为甲瓚的溶剂, 测定了淋巴细胞的增殖反应, 表明细胞密度与 MIT 的显色反应有较好的线性关系, 提示用 DMF 作为甲瓚的溶剂具有一定的价值。本试验采用 14% SDS2DMF 酸性溶液 (pH = 4.17), 以 HePG22 细胞作为检测对象, 从最大吸收波长, 测定时间, 吸与不吸出培养基加入甲瓚裂解液比较, 细胞密度与显色反应之间的关系等方面对直接加入 14% SDS2DMF 酸性甲瓚裂解液的改良 MIT 法进行了评价, 结果表明用 14% SDS2DMF 酸性溶液对甲瓚具有较好的溶解性, 不吸出培养基直接加入对最大吸收波长无影响, 其显色反应与细胞密度有良好的线性关系, 可作为细胞增殖、细胞毒性检测等方面简单、快速、稳定的方法。根据我们使用该法用于抗肿瘤药物的筛选实验和化学物的细胞毒性检测, 在以下几个方面需加以注意: ① DMF 具有一定的毒性, 在配制和使用 DMF 时应带防护手套; ② 根据不(下转第 188 页)

不同类型辐射的联合毒效应

曹毅, 童建

(苏州大学放射医学与公共卫生学院, 江苏 苏州 215007)

关键词: 联合毒效应; 电磁辐射; 电离辐射

在研究辐射与其他因子联合作用的类型时, 常常是按照其生物学机制而不是从统计学或数学的角度进行判断。如果联合暴露中, 一个因子能够对辐射的随机效应产生修饰作用, 即增强或减弱一个生物学过程中不同阶段的损伤, 或者作用于不同的效应分子位点, 被称为协同或拮抗作用。相反则被定义为相加作用, 后者多被用于确定性效应, 并根据程度的不同而又分为亚相加和超相加作用^[1]。

1 不同类型电离辐射的联合作用

不同类型的电离辐射均可导致一定的细胞学效应, 并在基础研究和临床治疗领域被广泛应用。由于作用机制的相似性, 不同类型的电离辐射在杀伤生物细胞方面, 效应是可以相加的。例如, 中国仓鼠 V79 细胞在体外首先 Y 以氦离子 (LET= 180 kePVum), 然后用 X 射线 (225 kVp) 进行照射, 对细胞的杀伤作用符合相加模式, 而且没有处理顺序上的区别^[2]。

全身照射和局部照射的联合作用。雄性小鼠接受全身亚致死到致死剂量的 C 照射 (1~ 11 Gy), 同时对局部皮肤进行 50 Gy 的 B 照射 (¹⁷¹Tm), 以机体免疫抑

制和局部皮肤烧伤为指标, 观察联合作用。当 C 照射剂量低于 4 Gy 时, 未见交互作用, 在 4~ 8 Gy 时皮肤的损伤反应变慢, 最大反应出现在 10~ 25 d 之间。作者认为, 全身大剂量的 C 照射可减轻局部的辐射损伤, 其可能的机制是延长了后者的反应时间, 从而导致亚相加的结果^[3]。

中子和 C 照射的联合作用。以克隆形成单位 (CFU) 为指标, 观察中子和 C 照射对大鼠骨髓的联合毒性。2 Gy 剂量的中子单独照射时, 骨髓中的有核细胞数和 CFU2S 显著减少, 伴有广泛的细胞遗传学损伤。如果此后再给予持续的 C 射线 (6 Gy, 剂量率 0.157 GyPd), 对中子照射的骨髓损伤程度没有明显的增加, 但是在 C 照射期间 CFU2S 始终处于较低的水平, 直至照射结束后才开始逐渐回升。整个过程中中子和 C 射线的联合作用呈现超相加性质^[4]。

¹³⁷Cs 的 C 外照射 (1~ 4 Gy) 和 ²³⁹Pu 的 A 内照射 (913~ 93 kBq/kg 体重) 致雄性大鼠骨肉瘤的联合效应^[5]。共同暴露时, 骨肉瘤的发生率比单独暴露的更高, 出现时间更早, 同时病理学检查显示更多的癌组织病灶和更快的转移扩散。在免疫系统和生化指标方面, 改变也很明显。通过测定大鼠胸腺、脾和骨髓的细胞数量及其核酸代谢速率, 得到的结果符合相加模型。在对狗的试验中, 当联合暴露于 C 外照射 (0.125~ 2 Gy) 和吸入含 25% ²⁴¹Am 的 ²³⁹Pu 氧化微粒 (7~ 10 kBq/kg) 后, 血清中丙氨酸转氨酶、天冬氨酸氨基转移酶和乳

基金项目: 江苏省高校自然科学基金重大项目 (05KJA33013); 苏州大学医学发展基金资助项目 (EE126518); 苏州大学放射医学与防护省级重点实验室开放课题资助项目 (KJS05027)

作者简介: 曹毅, 副研究员, 研究方向: 放射毒理学。

通讯作者: 童建, 教授, 博士生导师, 研究方向: 毒理学。

(上接第 187 页) 同的实验目的, 选择适当的细胞接种密度, 应尽量控制细胞终密度在 5×10^4 Pml~ 30×10^4 Pml 范围内, 如低于或高于此密度范围, 细胞密度与吸光度之间的线性关系有一定的偏差; § 为保证甲瓞的充分溶解, 在加入裂解液后至少 37 e 孵育 4 h, 在比色测定前, 最好用振荡仪轻轻振荡 15 mim 左右; 为避免非实验因素的影响, 应采用无细胞体系的培养基作为本底对照, 在计算时减去本底值, 结果更为可靠。

参考文献:

- [1] 赵承彦, 靖志安, 牛青霞. MIT 显色反应实验条件分析. 河南医学研究. 2000, 9: 102-116.
- [2] 边兴艳, 杨明艳, 张英. 改良 MIT 比色法测定淋巴细胞增殖反应. 吉林医学院学报. 1997, 17: 28-29.