

研究简报

利用草鱼 CIK 细胞和 MTT 法测定镉和铬毒性试验的优化

谭凤霞 王 敏 王卫民

(华中农业大学, 农业动物遗传育种与繁殖 教育部重点实验室, 武汉 430070)

OPTIMIZATION OF MTT ASSAY FOR THE DETERMINATION OF CYTOTOXICITY OF Cd²⁺ AND Cr⁶⁺ IN KINDEY CELL LINE OF GRASS CARP

TAN Feng-Xia, WANG Min and WANG Wei-Min

(Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

关键词 :MTT 法 ; 草鱼 CIK 细胞系 ; 镉 ; 铬 (VI) ; 细胞毒性

Key words :MTT; CIK of grass carp; Cd²⁺; Cr⁶⁺; Cytotoxicity

中图分类号 : X174 文献标识码 : A 文章编号 : 1000-3207(2006)03-0371-04

四噻唑蓝 (MTT) 比色法是由 Mosmann 提出后 Tada 和 Green 等人又对该方法进行了改进。MTT 法是根据活细胞的线粒体脱氢酶能使四噻唑盐 MTT 裂解为蓝色的产物, 且生成量与存活细胞数呈正比, 根据颜色的深浅, 用比色法进行检测。经多次改进, 该方法已实现半自动化操作, 其简单、经济、快速、无放射性污染, 检测结果与同位素掺入法有良好的一致性, 是一种可以和放射活性测定法相媲美的检测细胞毒性和细胞增殖的敏感方法。

本文利用主要养殖鱼类草鱼的肾脏细胞系 CIK 为靶细胞, 从 MTT 法的细胞接种浓度、MTT 浓度及温育时间等几个重要参数, 研究了对 CIK 细胞应用 MTT 法进行化合物毒性测定的条件, 并根据最适条件, 测定了氯化镉 (CdCl₂) 和重铬酸钾 (K₂Cr₂O₇) 对草鱼 CIK 细胞的毒性, 建立了一种利用鱼类细胞系 (草鱼 CIK 细胞) 进行化合物毒性测定的方法。由于每种细胞系各具有不同的生物学特性及对有毒物质不同的敏感性, 因此该测定方法的建立, 在水产养殖环境毒理的领域中, 将具有一定的应用价值。

1 材料与方法

1.1 仪器 倒置显微镜 (LEICA), 超净工作台 (哈东联), CO₂

培养箱 (SANYO), 紫外可见分光光度计 (TU-1800SPC), BIO-680 型酶标仪 (BIORAD)。

1.2 细胞株 草鱼 CIK 细胞株由中国科学院水生生物所病毒室和武汉大学汤明亮同学惠赠, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3 培养液 Media 199, 简称 M199, (Gibco BRL) 完全培养液, 内含 10% 的新生小牛血清 (Gibco BRL), 每毫升含 100 单位的青霉素和链霉素, 4℃ 保存。

1.4 主要试剂 磷酸缓冲液 (PBS), pH7.4; 胰酶 (Trypsin, 1:250) 为 Amersco 商品, 溶于上述 0.01mol/L 的 PBS, 浓度为 0.25%, 过滤除菌, -20℃ 冰箱保存; 噻唑蓝 (MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium Bromide) 为 Amersco 商品, 溶于上述 0.01mol/L 的 PBS, 浓度为 5mg/mL, 过滤除菌, 4℃ 冰箱避光保存; 二甲基亚砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO), 分析纯, 中国医药 (集团) 上海试剂公司产品; 氯化镉 (CdCl₂ · 2.5H₂O), 分析纯, 北京双环试剂公司产品; 重铬酸钾 (K₂Cr₂O₇), 分析纯, 广东汕头市西陇化工厂产品。

1.5 接种细胞数目的选择 将生长良好的草鱼 CIK 细胞用 0.25% 胰酶消化后, 制成细胞悬液, 稀释至 1.2 × 10³—2.0 ×

收稿日期 : 2005-08-24; 修订日期 : 2006-02-20

基金项目 : 湖北省科技攻关课题 (2005AA401C41); 农业部 948 课题 (2005Z37) 资助

作者简介 : 谭凤霞 (1979—), 女, 山东潍坊人, 在读硕士, E-mail: tanfengxia@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者 : 王敏 (1956—), 高级工程师, E-mail: wangmin@mail.hzau.edu.cn

10^5 个/孔接种到96孔板上,每个浓度3个复孔,每孔 $100\mu\text{L}$,5%CO₂条件下25℃培养24h,然后每孔加入 $25\mu\text{L}$ MTT溶液,继续培养4h,弃培养液每孔加入 $150\mu\text{L}$ DMSO,振荡10min,经紫外可见分光光度计可见光范围内扫描后得到吸收光谱曲线,求得最大吸收峰,然后在BIO-680酶标仪测A值(也称光密度OD值)。

1.6 MTT终浓度的选择 按20000个/孔接种细胞,24h后分别加入不同浓度的MTT溶液,每个浓度3个复孔,使其终浓度分别达到0.5,1.0,1.5,2.0mg/mL,再继续培养4h后,然后测定A值。

1.7 MTT加入后培养时间的选择 实验分6组,每组3个复孔,每孔20000个细胞,培养24h后,分别于测定前1,2,3,4,5,6h加入 $25\mu\text{L}$ MTT溶液,然后测定其A值。

1.8 细胞毒性实验 按2000个/孔接种CIK细胞,培养24h后弃培养液,换以 $100\mu\text{L}$ 分别含不同浓度的氯化镉和重铬酸钾的新鲜培养液,染毒24h后,每孔加入 $25\mu\text{L}$ 5mg/mL的MTT,再培养4h后测A值,并相应地求出半数生长抑制浓度(IC_{50})。实验设加细胞的阴性对照和不加细胞的空白对照,并按下式分别求出各浓度的氯化镉和重铬酸钾MTT相对还原量(存活率):存活率(%) = 实验组A值/对照组A值 × 100%。

2 结果与分析

2.1 MTT法的甲瓒最大吸收波长的选择

各孔加入MTT后,可见有针状蓝紫色结晶出现,即甲瓒(Formazan),加入DMSO振荡后,结晶溶解,经紫外可见分光光度计可见光范围内扫描后得到吸收光谱,见图1。为了避免A值过高或过低时,对检验结果灵敏度的影响,当最大吸收峰的峰型比较尖锐时,往往选用吸收稍低,峰型稍平坦的次强峰和峰肩进行测定,故从图中看,波长与吸收峰成良好线性的范围为450nm至550nm和550nm至650nm,在此范围内有三种滤光片可以选择,分别为490nm、570nm和630nm,由于570nm滤光片与最大吸收峰550nm最接近,本实验选用570nm滤光片作为测定波长。

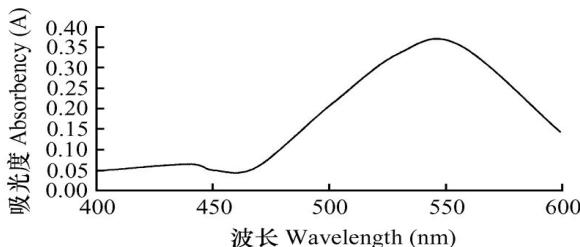


图1 MTT裂解产物甲瓒的吸收光谱

Fig. 1 The absorption band of formazan

2.2 细胞数量与甲瓒形成呈相关性

以细胞数量为横坐标,A值为纵坐标,如图2,在一定范围内细胞数量与A值显示出较强的正相关。细胞浓度过高或过低,则不能反映细胞代谢情况,当细胞数量在 1.2×10^3 — 5×10^4 个/孔之间时,细胞数量与甲瓒形成量呈良好的相关性,证明在一定的范围内,甲瓒的形成量可以客观地反映细胞数量及活性状态,故将此范围定为MTT比色测定的线性范围。细胞数少于1000个/孔,结果重复性不好,大于50000个/孔,则出现平台期(Plateau),本实验选用20000个/孔的细胞接种数量。

10^3 — 5×10^4 个/孔之间时,细胞数量与甲瓒形成量呈良好的相关性,证明在一定的范围内,甲瓒的形成量可以客观地反映细胞数量及活性状态,故将此范围定为MTT比色测定的线性范围。细胞数少于1000个/孔,结果重复性不好,大于50000个/孔,则出现平台期(Plateau),本实验选用20000个/孔的细胞接种数量。

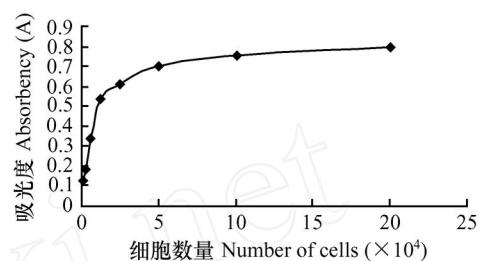


图2 细胞数量与吸光度的关系

Fig. 2 Effect of the initial number of cells on the amount of MTT of formazan produced

2.3 MTT的量对吸光度的影响

细胞培养一定时间后,分别在细胞数量相同的孔中加入11.1μL、25μL、42.8μL和66.7μL的MTT(5mg/mL),使终浓度分别为0.5mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL和2.0mg/mL,结果如图3所示,MTT的量增大,A值略有增加,但随着MTT量的增大,超过一定量后,A值会有所下降,本实验表明,在MTT的加入量为25μL,MTT的终浓度为1mg/mL时,A值最大,本实验选用MTT的加入量为25μL,使终浓度为1mg/mL。

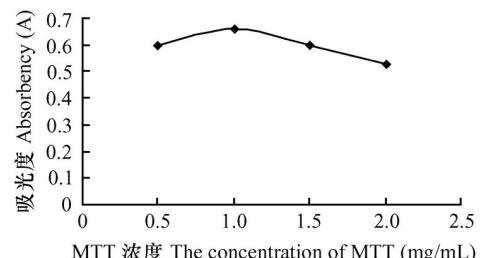


图3 MTT终浓度与吸光度的关系

Fig. 3 Effect of the concentration of the MTT solution on the amount of MTT formazan produced

2.4 加入MTT后培养时间对吸光度的影响

细胞培养一定时间后,分别在培养结束前的6h后,每隔1h加入MTT,继续培养,培养结束后测定A值,结果如图4表明,加入MTT后,A值随培养时间的延长而升高,在前4h,培养时间与甲瓒的量呈良好的相关性,4h后,A值逐渐增加不明显,曲线开始变平。本实验选择4h为MTT加入后的培养时间,可获得最佳的实验结果。

2.5 镉和铬(VI)离子的细胞毒性

用MTT法所确定的最佳条件观察了不同剂量的氯化镉和重铬酸钾,分别染毒24h后的细胞毒性,结果显示无论是氯化镉还是重铬酸钾,不同浓度的重金属离子处理后,草鱼CIK细胞在倒置显微镜下可见细胞变圆、崩解,贴壁率下降出

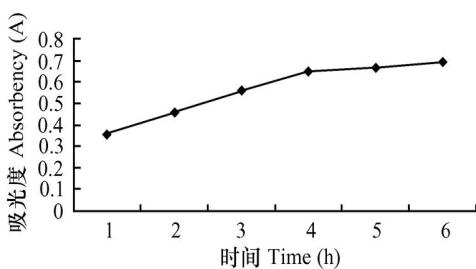


图 4 培养时间与吸光度的关系

Fig. 4 Effect of the incubation period with MTT on the amount of MTT formazan produced

现细胞悬浮,并且细胞发生死亡和培养液中出现碎片等现象。MTT 的相对还原量(即细胞存活率)随毒物浓度的增加而逐渐降低,并且甲瓒生成量的减少与染毒浓度有依赖关系,存在良好的剂量-效应关系。

氯化镉和重铬酸钾分别处理草鱼 CIK 细胞 24h 后存活率的变化如图 5 和图 6 显示,以不同浓度的氯化镉和重铬酸钾分别作用于草鱼 CIK 细胞 24h 后,随着浓度的增高,细胞的存活率逐渐下降。细胞存活率与染毒浓度有依赖关系,其存活率与浓度的自然对数之间为良好的线性关系,其回归方程分别为 $Y(Cd^{2+}) = -0.2025 \ln(X) - 1.6254 (r^2 = 0.9959)$, 其 IC_{50} 为 $2.76 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 和 $Y(Cr^{6+}) = -0.2306 \ln(X) - 1.8998 (r^2 = 0.9932)$, 其 IC_{50} 为 $3.02 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

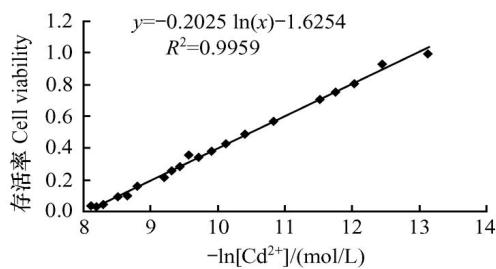


图 5 镉离子对草鱼 CIK 细胞的 24h 细胞毒性(存活率)

Fig. 5 Cytotoxicity of Cd^{2+} to CIK of grass carp for 24h (cell viability)

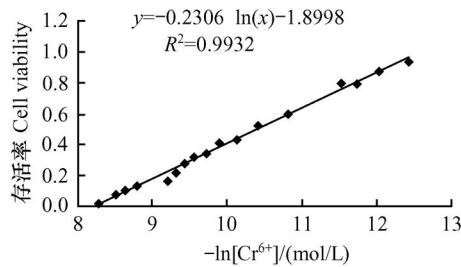


图 6 铬(VI)对草鱼 CIK 细胞的 24h 细胞毒性(存活率)

Fig. 6 Cytotoxicity of Cr^{6+} to CIK of grass carp (cell viability)

3 讨论

3.1 MTT 法的主要影响因素

MTT 法被用来检测细胞毒性和细胞增殖具有许多优点,

然而影响 MTT 法的测定结果的因素也很多,Hansen^[1]指出,针对不同的细胞应选用不同的实验条件,尤其是接种细胞的数量、培养时间的长短、甲瓒溶解缓冲液的种类等都直接影响 A 值的测定。

体外实验的抑制率往往与细胞接种量呈负相关,接种量较少时易得到较高的抑制率。对不同类型的细胞系进行测定时,可能需要采用不同的细胞数(一般可选择每孔细胞 10^3 — 10^5 个)。实际工作中,宜选用较少的接种量,一方面可以防止因对照组细胞生长过密造成生长停滞,另一方面也可避免由此造成的光吸收饱和、出现坪台效应造成的假象,避免因抑制偏低造成的假阴性。本实验发现细胞数少于 1000 个/孔,结果重复性不好,大于 50 000 个/孔,则出现坪台期(Plateau)。

每孔 MTT 量对检测结果也产生一定的影响:MTT 的量增大,A 值略有增加,但随着 MTT 量的增大,超过一定量后,A 值会有所下降,原因可能是当 MTT 量较多时,毒物作用后,活力较差的细胞也有足够的 MTT 进入,生成甲瓒,使毒物孔 OD 值升高。本实验表明,在 MTT 的加入量为 25 μL ,MTT 的终浓度为 1mg/ mL 时,A 值最大。

另外 MTT 的分解代谢产物甲瓒为不溶性紫色结晶,必须使其处于溶解状态才能测定。用于此目的的裂解液很多,包括 DMSO、酸化的 SDS、异丙醇、丙醇、乙醇等。边兴艳和陈洁^[2]对几种溶解液的溶解效果进行了比较,其结果表明,DMSO 溶解力量最强,能在 10min 内将甲瓒颗粒完全溶解,但需去除上清,因为 DMSO 与孔中残存的 MTT 发生反应,颜色随着时间的延长而加深,使测定底本 A 值偏高,故使用 DMSO 易受孔中 MTT 残余量或加样量变化的影响,比色必须在一定时间内完成。本实验选取 DMSO 作为甲瓒裂解液,室温振荡 10min 后迅速测定,结果重复性较好。

3.2 细胞毒性的检测

随着环境污染的加重,利用培养的细胞进行水环境污染物的检测成为热门研究,例如陈加平等^[3,4]对近年来比较关注的微囊藻毒素对大鼠肾 NRK 细胞的毒性进行了研究。虽然镉和铬是两种研究比较多的重金属,但这两种金属对细胞的毒性研究主要集中在对人类和哺乳动物的细胞系,而对鱼类细胞系方面的研究相对较少。在体外细胞毒性实验中,细胞半数抑制浓度(IC_{50})被认为是代表存活细胞数目变化的一个最有用的指标,然而国内外以 IC_{50} 和毒性范围为指标采用 MTT 法研究发现,这两种金属离子对不同的细胞系的毒性有一定的差别。Olabarrieta 等^[1]分析了镉离子对 LLC-PK1 处理 24h 后的 IC_{50} 在 50—60 $\mu\text{mol/L}$ 之间;Sauvant 等^[5]对镉离子对 L-929 细胞 MTT 法分析表明其 24h 的 IC_{50} 为 9 $\mu\text{mol/L}$;马华智等^[6]的研究发现重铬酸钾对 CHL 细胞的 IC_{50} 为 8.02 $\mu\text{mol/L}$;Maracine 等^[7]检测了六种重金属盐在虹鳟 RTG2 细胞系中的细胞毒性,得出镉染毒 20h 后的 IC_{50} 为 120 $\mu\text{mol/L}$;镉和铬对草鱼 CIK 细胞系的 24h IC_{50} 分别为 27.6 $\mu\text{mol/L}$ 和 30.2 $\mu\text{mol/L}$,与他人的研究结果不尽相同,其原因可能是由于不同细胞株对镉和铬的敏感性不同所致。

参考文献:

- [1] Olabarrieta I , Azou B L , Yuric S , et al. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models[J]. *Toxicology in Vitro*, 2001, **15**:511—517
- [2] Bian X Y , Chen J , A comparison of five formazan dissolution in MTT Assay [J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*. 1998, **16**(1) :34—35[边兴艳,陈洁.MTT比色法中五种甲瓒溶解液的比较[J].临床检验杂志,1998,16(1):34—35]
- [3] Chen J P , Xu L H , FU W Y , et al. Bax expression of fat nephrocyte NRK induced by microcystin LR [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(4) :450—451[陈加平,徐立红,傅文字,等.微囊藻毒素LR诱导大鼠肾NRK细胞Bax蛋白表达[J].水生生物学报,2004,28(4):450—451]
- [4] Chen J P , FU W Y , Wen D P , et al. Damage of microcystin LR on rat lymphocytes DNA[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(6) :677—678[陈加平,傅文字,翁登坡,等.微囊藻毒素LR对大鼠淋巴细胞DNA的损伤作用[J].水生生物学报,2004,28(6):677—678]
- [5] Sauvant M. P , Peptin D , Bohatier J , et al. Toxicity assessment of 16 inorganic environmental pollutants by six bioassays[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1997, **37**:131—140
- [6] Ma H Z ,Sheng H Z , Qin A P , et al. Comparative study on toxicities of potassium dichromate and chromium chloride[J]. *Carcinogenesis , Teratogenesis and Mutagenesis* , 2003, **15**(3) :171—173[马华智,盛和章,秦爱平,等.氯化铬和重铬酸钾毒性的比较研究[J].癌变·畸变·突变,2003,15(3):171—173]
- [7] Maracine M and Segner H. Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A , 1998, **120** :83—88