

医学生化

检测人成纤维细胞增殖的 XTT 比色法

沈雁* 刘锡麟 唐毅 钟灿灿 梁佩红 李斯明

(广州市红十字会医院, 广州市创伤外科研究所, 广州 510220)

摘要 利用 3 种不同来源的成纤维细胞 (大鼠肾上皮细胞, 人胎肺成纤维细胞, 人成纤维细胞) 的活细胞线粒体脱氢酶在电子偶联剂硫酸酚嗪甲酯 (phenazine methosulfate, PMS) 的协同作用下, 还原四氮唑复合物 (XTT) 形成可溶性的棕黄色甲簪 (formazan) 产物, 测定细胞甲簪的生成量来反映细胞的生长与活性状态, 并与传统的四甲基偶氮唑盐 (MTT) 方法作比较. 结果表明, XTT 方法直接测定水溶性的甲簪产物, 敏感度高于 MTT 法, 具有操作简单、快速、灵敏度高、结果准确的优点, 为成纤维细胞的研究建立了新的检测方法.

关键词 成纤维细胞, 细胞培养, 增殖

学科分类号 O343.6

在研究疤痕成纤维细胞的增殖与药物抑制的实验中, 常用四甲基偶氮唑盐 (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 方法测定活细胞数量变化来反映细胞的生长, 作为检测细胞活性的指标之一, 但实验结果中表明 MTT 对人成纤维细胞 (NF) 产生的甲簪代谢不够敏感, 活细胞数量与甲簪产生的颜色不成比例, 相对于其他成纤维细胞如大鼠肾上皮细胞 (NRK), 人胎肺成纤维上皮细胞 (MRC-5) 的显色弱. 为了获得更敏感的成纤维细胞活性的检测方法, 我们试用四氮唑复合物 (2, 3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide, XTT) 比色法代替 MTT 法, 以 NF 为主并与 NRK, MRC-5 等类成纤维细胞进行对照. Scudiero 等^[1]首次采用 XTT 进行体外细胞增殖和药物敏感检测, 国内学者开始将 XTT 比色法用于细胞活性的检测^[2, 3]. XTT 是一种与 MTT 类似的衍生物, 当 XTT 与电子偶联剂硫酸酚嗪甲酯 (phenazine methosulfate, PMS) 共同使用时, 可被活细胞线粒体脱氢酶还原而成水溶性的棕黄色的甲簪 (formazan) 产物, 其产物的生成量与活细胞数量成正相关, 在 450 nm 处有较大的吸收峰. 在一定范围内的吸光度与其活细胞的数量成线性关系, 用酶标仪测吸光度 (A) 反映活细胞的数量. 本方法有灵敏度高, 操作简单, 快捷等优点.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

四氮唑复合物 (2, 3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide, XTT), 四甲基偶氮唑盐 (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT), 硫酸酚嗪甲酯 (phenazine methosulfate, PMS) 和二甲基亚砷 (dimethyl sulphoxide, DMSO) 均购自美国 Sigma 公司. 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 96 孔细胞培养板购自美国 Corning 公司, 酶标仪购自日本 Rader 仪器公司.

1.2 XTT 试剂配制

XTT 用 60℃ 预热培养液配制, 浓度为 0.2 g/L (1.485 mmol/L), 过滤除菌, 新鲜配制; PMS 溶于 pH 7.2 PBS, 离子强度 I 为 0.15 mol/kg, 浓度为 5 mmol/L, 避光保存 20 d 内用完, 显色工作液 XTT/PMS 体积比为 200/1.

1.3 细胞与细胞培养

人胎肺成纤维上皮细胞 (MRC-5) 来自中山大学医学院细胞库, 大鼠肾上皮细胞 (NRK) 来

* 通讯联系人.

Tel: 020-84412233-8419, E-mail: ann8cn@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-01-08, 接受日期: 2002-01-28

源于四川肿瘤研究所, 正常皮肤成纤维细胞 (NF) 由本所分离. 3 种细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养, 隔天换液一次, 细胞融合成片后, 0.25% 胰酶消化传代.

1.4 甲簪产物的吸光度分析

分别用培养液稀释一定数量的 MRC-5、NRK 和 NF 细胞, 加入 XTT/PMS 工作液, 2 h 后直接在酶标仪上用不同波长测定吸光度, 观察吸光度最大值.

1.5 PMS 浓度的选择

以细胞数为 20×10^4 /孔, XTT 终浓度为 0.297 mmol/L (0.2 g/L), PMS 浓度分别为: 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 观察 PMS 浓度对 3 种细胞吸光度的影响.

1.6 XTT 加入后孵育时间的选择

在加入 XTT 后, 分别在 1、2、4 h 测定 3 种细胞的吸光度 (A) 曲线.

1.7 MTT 测定

种植细胞浓度与 XTT 法相同, 加 MTT 工作液 5 mg/L, 每孔 50 μL , 继续培养 4 h 后, 加 100 μL DMSO, 摇匀后 15 min 比色, 主波长 570 nm, 参考波长 690 nm, 以不加细胞孔作为空白, 重复 3 孔取均值.

1.8 统计分析

应用 SPSS8.0 软件进行检验, 计算相关系数, 进行数据处理.

2 结 果

2.1 XTT 甲簪产物吸收光谱

3 种细胞的 XTT 甲簪产物吸收光谱, 最大吸收峰的均值在 450~460 nm 处 (细胞浓度为 1×10^6 /孔) (图 1).

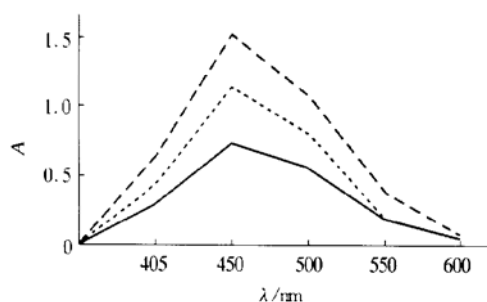


Fig. 1 The formazan product absorption spectrum of three kinds of cells

-----: NRK; - - - - : MRC-5; —: NF.

2.2 PMS 浓度对 XTT 值检测的影响

加入 XTT-PMS, 在 1~4 h 内比色, 检测到 PMS 浓度在 5~25 $\mu\text{mol/L}$ 相关最显著, 其相关系数分别是: $r(\text{NF}) = 0.992$, $r(\text{MRC-5}) = 0.992$, $r(\text{NRK}) = 0.997$ ($P < 0.01$, $\alpha = 0.05$), PMS 浓度与细胞数呈线性相关, 其吸光度是随 PMS 浓度增高而增高, 当 PMS 达到 25~100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 出现平台线, 吸光度不再增高, 如果增加 PMS 浓度, 就会使 PMS 的空白吸光度增大. 实验表明: PMS 最适浓度为 5~25 $\mu\text{mol/L}$. 显色工作液 XTT/PMS 的比例为 200/1 (体积比), 中止反应时, 每孔加显色工作液 50 μL . 加显色工作液目的在于减少本底的颜色, 以 PMS 5 $\mu\text{mol/L}$ 为宜 (图 2).

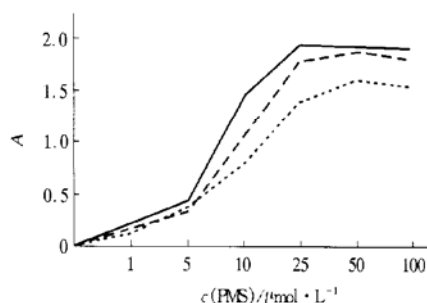


Fig. 2 The influence of different PMS concentration for absorbance of NF was measured by XTT assay

—: NF; - - - - : MRC-5; -----: NRK.

2.3 XTT 加入后继续孵育时间的选择

在加入 XTT 后, 分别在 1、2、4 h 测定 NF 细胞在不同浓度的吸光度 (A) 曲线, XTT 在 2 h 内测定 A 值与细胞梯度之间基本是线性, 相关性最显著 (图 3), 相同条件下检测 MRC-5, NRK 结果相类似.

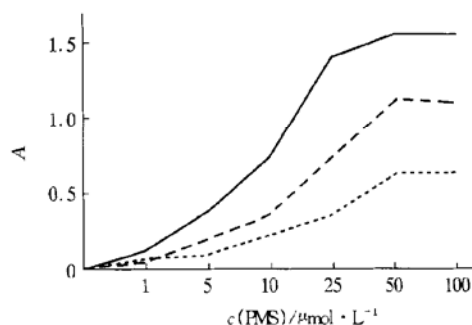


Fig. 3 The absorbance of NF was measured in different culture time after adding XTT

-----: 1 h; - - - - : 2 h; —: 3 h.

2.4 XTT法与MTT法的比较

在细胞数量为每孔 $0.1 \times 10^4 \sim 20 \times 10^4$ 范围内, 检测 NF 细胞, XTT 及 MTT 的甲簪产物与细胞数量呈显著的线性关系 (图 4), 但 MTT 的 A 值在 0~0.3 之间成线性, 而 XTT 的 A 值在 0~1.9 之间成线性, 提示 XTT 法敏感性大于 MTT 法. 细胞浓度在 1×10^5 /孔以上, 曲线出现下降, 提示细胞浓度太高, 超出线性范围. 同法测定 MRC-5、NRK, 得出同样结论.

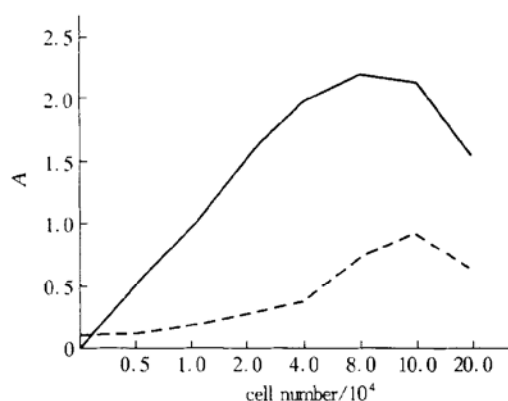


Fig. 4 The comparison of XTT and MTT assay for measuring fibroblast

—: XTT; - - - - : MTT.

3 讨 论

测定细胞的数量、细胞的生存或者细胞的增殖, 已有许多生物学的测定法, 这些方法包括手动或自动细胞计数、同位素 (^3H 或 ^{125}I) 标记、活细胞比色分析 (如 MTT、甲基蓝^[4]、中性红^[5]等). MTT 法已被广泛用于细胞的检测^[6], 但 MTT 被活细胞代谢形成的甲簪产物不溶于水, 需被有机溶剂溶解, 而溶解甲簪的溶剂又有几种, 而且评价不一^[7], 有的用 DMSO 溶解, 但要尽快比色, 显色随时间而加深; 有的加 20% SDS-0.1 mol/L HCl 溶解, 需过夜溶解等, 因此选择不同的溶剂对结果都有一定的影响. 而 XTT 是检测活细胞的线粒体酶来反映细胞数量, 是反映细胞活性指标之一. XTT 被细胞代谢形成的甲簪产物能溶于水, 且显色稳定, 可直接上机比色, 并且可以连续检测, 明显缩短检测时间, 提高效率.

XTT 法在无 PMS 的条件下, NF 细胞对 XTT 的代谢能力很低, 采用了电子偶联剂硫酸酐甲酯 (PMS), 其代谢能力明显提高. 本实验结果显示: 对于 NF 来说, 建立 XTT 法检测 NF 的条件是,

XTT 经加热 60℃ 培养液溶解 ($1.485 \mu\text{mol/L}$), 过滤除菌, 配制 5 mmol/L PMS, 混合体积比是 XTT/PMS=200/1, 在 96 孔板中, 每孔接种细胞 100 μL , 细胞浓度控制在 $0.1 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ /孔内, 加入 25 μL 显色工作液 (终浓度为 XTT 0.297 mmol/L, PMS 为 $5 \mu\text{mol/L}$), 37℃, 5% CO_2 孵育 2 h; 每孔中加 10×10^4 个细胞测定 A 值, 测定波长 450 nm, 参考波长 655 nm.

在相同的细胞浓度, XTT 的 A 值可达 1.5, 比 MTT 的 A 值 0.3 大 5 倍, 说明在 NF 细胞活性检测中, XTT 法敏感性大于 MTT 法. 但 XTT 法也有不足之处, 如 XTT 需预温后的培养液溶解才比较完全, XTT-PMS 需即配即用, 不宜久放, 试剂久放颜色会加深, 最好是立即加入培养板中, 使结果更稳定. 本法不适用于细胞浓度太高如细胞浓度在 2×10^5 /孔以上, 会由于细胞发生接触抑制, 使活细胞数量减少而出现曲线下降.

本试验显示, 在 NF 的增殖及抑制检测上, XTT 比色法完全可以替代 MTT 法, 而且敏感性较高, 操作简便, 快捷, 结果准确, 可用于创伤疤痕研究, 正常与疤痕成纤维细胞的药敏试验, 生长与抑制试验等.

参 考 文 献

- Scudiero D A, Shoemaker R H, Paull K D, *et al.* Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988, **48** (17): 4827~4833
- 吴楠, 崔恒, 钱和平, 等. 检测卵巢癌的细胞活性的 XTT 比色法的建立. *北京医科大学学报*, 1998, **30** (1): 83~84
Wu N, Cui H, Qian H P, *et al.* *J Beijing Med Uni*, 1998, **30** (1): 83~84
- 唐毅, 刘建伟, 李斯明, 等. XTT-PMS 法检测肝癌细胞的生长与药敏性. *中华肝脏杂志*, 2000, **8** (4): 243
Tang Y, Liu J W, Li S M, *et al.* *Chin J Hepatic*, 2000, **8** (4): 243
- Oliver M H, Harrison N K, Bishop J E, *et al.* A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plated: application for assessment of growth factors. *J Cell Sci*, 1989, **92** (Pt 3): 513~518
- Lowik C W, Alblas M J, Van de Ruij M, *et al.* Quantification of adherent and nonadherent cells cultured in 96-well plates using the supravital stain neutral red. *Anal Biochem*, 1993, **213** (2): 426~433
- 沈雁, 唐毅, 李斯明, 等. 碱性成纤维细胞生长因子与透明质酸协同对培养兔软骨细胞的影响. *中华创伤杂志*, 2000, **16** (6): 337~339
Shen Y, Tang Y, Li S M, *et al.* *Chin Traumatol*, 2000, **16** (6): 337~339
- 陈子庆, 丁小健, 潘世杨, 等. MTT 比色法测定 NK 细胞活性及影响因素. *上海医学检验杂志*, 1995, **10** (2): 69
Chen Z Q, Ding X J, Pan S Y, *et al.* *Shanghai J Lab Med*, 1995, **10** (2): 69

XTT Colorimetric Method for Detecting Cellular Growth of Human Fibroblasts

SHEN Yan^{*}, LIU Xi-Lin, TANG Yi, ZHONG Can-Can, LIANG Pei-Hong, LI Si-Ming

(Institute of Traumatic Surgery, Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou 510220, China)

Abstract In order to establish a sensitive method for detecting cellular growth of fibroblasts. Three kinds of fibroblasts were used, including normal rat kidney (NRK), human embryo lung fibroblast cell (MRC-5) and normal human fibroblast (NF). In those cells, mitochondrion dehydrogenase together with phenazine methosulfate (PMS) reduces 2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) and a water soluble and light brown formazan product is formed. Cell growth and viability were obtained by measuring the metabolic product and compared with the traditional 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. It was shown that three kinds of cells have different metabolic response to XTT. XTT method directly detected water soluble formazan product. Its sensitivity was higher than MTT. These results indicate that it is a simple, rapid, sensitive and stable method. XTT colorimetric method establishes a new detective method for keloid research of traumatic surgery.

Key words fibroblast, cell culture, proliferation

^{*} Corresponding author. Tel: 86-20-84412233-8419, E-mail: ann8cn@yahoo.com.cn

Received: January 8, 2002 Accepted: January 28, 2002

欢迎订阅 欢迎投稿 《生物化学与生物物理进展》2003 年征订启事

《生物化学与生物物理进展》是国内外公开发行的全国性学术期刊,由中国科学院生物物理研究所和中国生物物理学会共同主办。主要报道生物化学、分子生物学、生物物理学及神经科学等领域的国内外最新进展,设有微型述评、综述与专论、研究报告、技术与方法、研究快报等十几个栏目。本刊自 1974 年创刊以来,始终以推动生命科学发展和促进国家经济建设为宗旨,不断提高学术、编辑和出版质量。经过二十余年的不懈努力,已成为一个在我国生命科学、基础医学及其他相关领域具有一定影响、深受广大读者欢迎及专家好评的学术期刊。1999 年荣获首届中国期刊奖提名奖。被 SCIE、CA 等国际权威检索系统收录。ISI 最新出版的期刊引征报告表明,本刊 2001 年影响因子(即 SCI 影响因子) 0.112。

本刊国际连续出版物号: ISSN 1000-3282, 国内统一刊号: CN 11-2161/Q, 邮发代号: 2-816。目前为双月刊(逢双月 20 日发行),国际标准开本(210 mm × 297 mm),164 页,每本订价 ¥25.00 元(全年 150.00 元)。若错过邮局订阅,请直接与编辑部联系。

编辑部地址:北京朝阳区大屯路 15 号中国科学院生物物理研究所

邮政编码:100101

电话:(010) 64888459

E-mail: prog@sun5.ibp.ac.cn

网址: http://www.pibb.ac.cn