

文章编号: 1004 - 7271(2007)02 - 0157 - 05

## MTT 比色法在药物对鱼类细胞的 毒性检测中的应用

杨先乐<sup>1,2</sup>, 林茂<sup>2</sup>, 喻文娟<sup>2</sup>, 王翔凌<sup>2</sup>, 房文红<sup>2</sup>

(1. 上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海 200090;

2. 上海水产大学农业部渔业动植物病原库, 上海 200090)

**摘要:** MTT 检测的 OD 值与细胞量之间呈显著的线性正相关 ( $R^2 > 0.96$ ), 能较好地反映活细胞密度。MTT 的作用浓度及反应时间对此 OD 值均有较大影响, 根据实验结果在细胞的 MTT 检测中, 采用 0.5 mg/mL 为 MTT 作用浓度, 4 h 为反应时间。细胞接种量对最终的细胞活力有一定影响, 根据实验结果在鱼类细胞毒性实验中, 选取每孔  $2.0 \times 10^4$  为最初接种量 (初始密度为  $10^5$  cell/mL), 对照 SMMC7721 细胞则选择每孔  $0.5 \times 10^4$  细胞接种量 (初始密度为  $2.5 \times 10^4$  cell/mL)。通过优化的 MTT 比色法检测抗生素和多环芳香烃等药物对细胞的毒性, 药物的剂量-效应曲线以 Logistic 模型拟合, 获得实验药物对不同细胞的半致死浓度  $IC_{50}$ , 结果表明, 多环芳香烃的毒性通常大于抗生素, 研究还发现药物对 CIK、GCL、PCK 细胞的  $IC_{50}$  显著高于 SMMC7721 细胞 ( $P < 0.05$ )。

**关键词:** 噻唑蓝; 鱼类; 细胞; 毒性

中图分类号: S 941.91 文献标识码: A

## MTT assay applied to detect the toxicity of drug on fish cell lines

YANG Xian-le<sup>1,2</sup>, LIN Mao<sup>1</sup>, YU Wen-juan<sup>2</sup>, WANG Xiang-ling<sup>2</sup>, FANG Wen-hong<sup>2</sup>

(1. E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 200090, China;

2. Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture,  
Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** OD value in MTT assay had remarkable linear correlation with cell number, so it could well present the density of viable cells. Concentration and response time of MTT had great influence on that value, and the best of them were chosen to be 0.5 mg/mL and 4 h respectively according to the result in MTT test. Inoculating cell number had certain effect on the viability of cells. It was optimum that fish cell lines inoculated by  $2.0 \times 10^4$  cells in each well (equal to  $10^5$  cell/mL) and the control SMMC7721 inoculated by  $0.5 \times 10^4$  cells (equal to  $2.5 \times 10^4$  cell/mL). Examined with the optimized MTT method and fit by the Logistic model,  $IC_{50}$  of various drugs to inhibit cell viability were acquired.  $IC_{50}$  values revealed that polyaromatic hydrocarbons had higher cytotoxicity than antibiotics. Furthermore,  $IC_{50}$  values of drugs in CIK, GCL and PCK cell lines were higher than those in SMMC7721 ( $P < 0.05$ ).

收稿日期: 2006-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371109); 上海市教委 E-研究院建设资助项目 (E03009); 上海市重点学科建设资助项目 (Y1101)

作者简介: 杨先乐 (1948 -), 男, 湖南桃源人, 教授, 主要从事水产动物疾病学与药理学方面的研究。Tel: 021 - 65710870, E-mail: xlyang@shfu.edu.cn

**Key words:** methylthiazoletetrazolium; fish; cell; toxicity

活细胞线粒体呼吸链上的脱氢酶(如:琥珀酸脱氢酶和心肌黄酶等)能将黄色的噻唑蓝(MTT)还原成蓝紫色的甲臃(FMZ),且 FMZ 生成量与活细胞量成正比,其反应式如下:



基于上述原理的 MTT 比色法可用来检测活细胞数,与较为精确的同位素渗入法所得结果无显著差异<sup>[1]</sup>。但要获得更加可靠的实验结果,还必须充分了解不同的受试细胞数量与 MTT 还原产物吸光值之间的线性关系,并考虑接种细胞量、MTT 作用浓度及反应时间等影响因素。鱼类细胞与哺乳类动物细胞在生理基础、生长条件等方面有相似处,但也存在较多的差异。本文以人肝癌细胞为对照,针对鱼类细胞优化了 MTT 比色法,并在此基础上检测渔药和环境毒物(主要为多环芳香烃化合物)对鱼类细胞的毒性,以期使其成为渔药临床试验和药物毒性试验的一道标准化程序。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

草鱼肝细胞系 GCL、草鱼肾细胞系 CIK、大黄鱼肾细胞系 PCK 和对照人肝癌细胞系 SMMC7721 由农业部渔业动植物病原库提供。鱼类细胞系以 M199 培养基置于 28 °C、5% CO<sub>2</sub> 下培养,人肝癌细胞系以 RPMI - 1640 培养基置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下培养。

### 1.2 试剂

RPMI - 1640、M199 基础培养基购自 Gibco - BRL 公司,恩诺沙星(ENR)、利福平(RIF)、苯巴比妥(PB)、乙氧异吩噻嗪酮(ERF)均为 Sigma 公司产品,多氯联苯 - 1254(PCB - 1254)、2,3,7,8 - 四氯二苯并(p)二噁啉(2,3,7,8 - TCDD)、苯并(a)芘(BaP)为 Supelco 公司产品,β - 萘黄酮(BNF)、3 - 甲基胆蒽(3 - MC)购自 Fluka 公司,红霉素(ERM)为 BIB 公司产品。

### 1.3 MTT 比色法

细胞每孔 200 μL 接到 96 孔板中培养一段时间后,每孔加入 5.5 mg/mL MTT 20 μL。置培养箱中孵育 4 h 后,产生蓝紫色沉淀。将细胞培养板倒置,轻晃弃掉上清液。加入 150 μL DMSO,振荡 30 min,使蓝紫色结晶物溶解。用酶标仪(Bio - Tek EL311)在波长 492 nm 下检测各孔 OD 值,利用该值计算与其成正比关系的细胞数  $N^{[2-4]}$ 。

### 1.4 细胞群体倍增水平

细胞群体倍增水平(population doubling level, LD)指细胞数量在一定时间内倍增的次数,其计算公式为:  $LD = \lg(N_t/N_0)/\lg 2$ 。  $N_0$  和  $N_t$  分别表示开始时和培养  $t$  小时后的细胞数<sup>[5]</sup>。

### 1.5 药物对细胞的毒性实验

药物依次倍半稀释制成 7 个梯度样品,以相应溶剂做空白对照。细胞每孔 180 μL 接到 96 孔板中预培养 24 h 后,分别加入 20 μL 待测样品,继续培养 72 h。进行 MTT 检测,并计算各个梯度样品中细胞的存活率( $N_{\text{样品}}/N_{\text{空白}}$ )<sup>[5]</sup>。

利用 SigmaPlot 8.0 软件的 Logistic 模型对药物抑制细胞生长的剂量 - 效应曲线进行拟合。方程式如下,式中  $F(x)$  表示当药物浓度为  $x$  时的细胞的存活率,  $p_0$  表示药物浓度趋向无穷大时的细胞存活率,  $p_{100}$  表示空白对照组细胞的存活率,  $n_H$  表示 Hill 常数,  $EC_{50}$  表示抑制效应达 50% 时的药物浓度,即半抑

制浓度  $IC_{50}$ <sup>[6]</sup>。

$$F(x) = p_0 + \frac{p_{100} - p_0}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^{n_H}}$$

## 2 结果

### 2.1 MTT 比色法检测 OD 值与细胞量的关系

用台盼蓝排斥法制备  $5 \times 10^5$  cell/mL 的活细胞悬液,在 96 孔板中用培养液进行倍半稀释,培养 12 h 贴壁后进行 MTT 检测。结果表明,细胞量与 FMZ 产量(吸光值)呈显著的线性正相关( $R^2 > 0.96$ ) (图 1)。实验结果还显示不同细胞的 MTT 脱氢酶作用是有差异的,在相同细胞量下,MTT 脱氢酶能力大小顺序是 SMMC7721 > CIK > GCL > PCK。

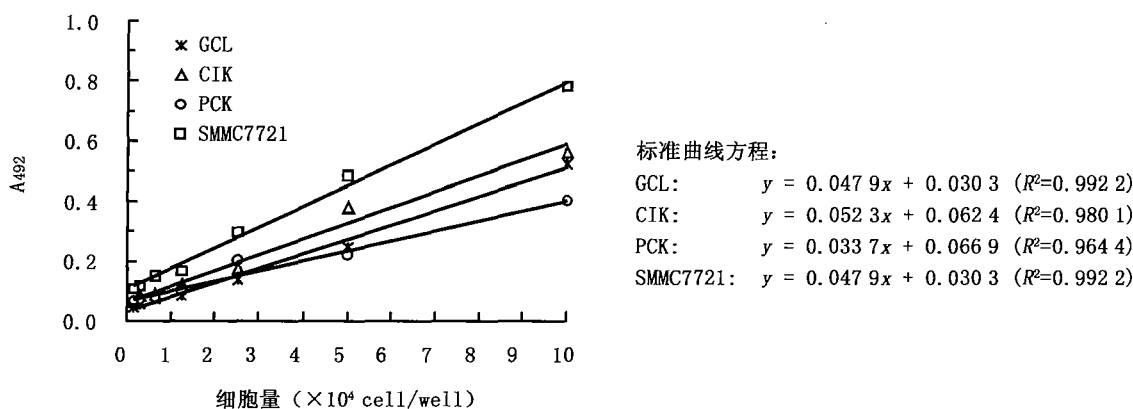


图 1 MTT 比色法检测活细胞数的标准曲线( $n=4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 1 Standard curve for determination of viable cell number in MTT assay

### 2.2 MTT 作用浓度与反应时间

每孔  $10^5$  个细胞预培养 12 h 后进行 MTT 检测,结果表明 MTT 的作用浓度及反应时间对 OD 值均有较大影响(图 2)。在 0.3 ~ 0.5 mg/mL 范围内,随着 MTT 浓度的增大 OD 值线性增加;另一方面,在 1 ~ 4 h 内,随着 MTT 反应时间延长 OD 值线性增加。根据上述结果,在细胞 MTT 检测中,采用 0.5 mg/mL 为 MTT 作用浓度,4 h 为反应时间。

### 2.3 细胞接种量的选择

为使药物作用期间,细胞活力处于最佳状态,需选择合适的细胞接种量。将细胞按不同接种量在 96 孔板中培养 4 d 后,进行 MTT 分析。结果表明(图 3),CIK、GCL、PCK 以每孔  $1.5 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^4$  的细胞量接种可达到较高的倍增水平,根据实验结果在鱼类细胞毒性实验中,选取每孔  $2.0 \times 10^4$  为最初接种量(初始密度为  $10^5$  cell/mL),对照 SMMC7721 细胞则选择每孔  $0.5 \times 10^4$  细胞接种量(初始密度为  $2.5 \times 10^4$  cell/mL)。

### 2.4 药物对细胞的毒性

通过优化的 MTT 比色法检测药物对细胞的毒性,药物抑制细胞生长的剂量 - 效应曲线呈反“S”形,以 Logistic 模型进行回归分析可以获得较高的相关系数(图 4)。拟合所得药物对不同细胞的半致死浓度  $IC_{50}$  越小,毒性越大,实验结果表明多环芳香烃的毒性通常大于抗生素,其中 TCDD 和 PCB 毒性最强,ERM 最弱。研究还发现药物对 CIK、GCL、PCK 细胞的  $IC_{50}$  显著高于 SMMC7721 细胞( $P < 0.05$ ) (表 1),也就是说鱼类细胞对药物的耐受能力显著强于人肝癌细胞,一方面可能与鱼类所处的生活环境

有关,另一方面可能是鱼类细胞培养温度较低(28℃),使药物毒性在一定程度上也受到了削弱。

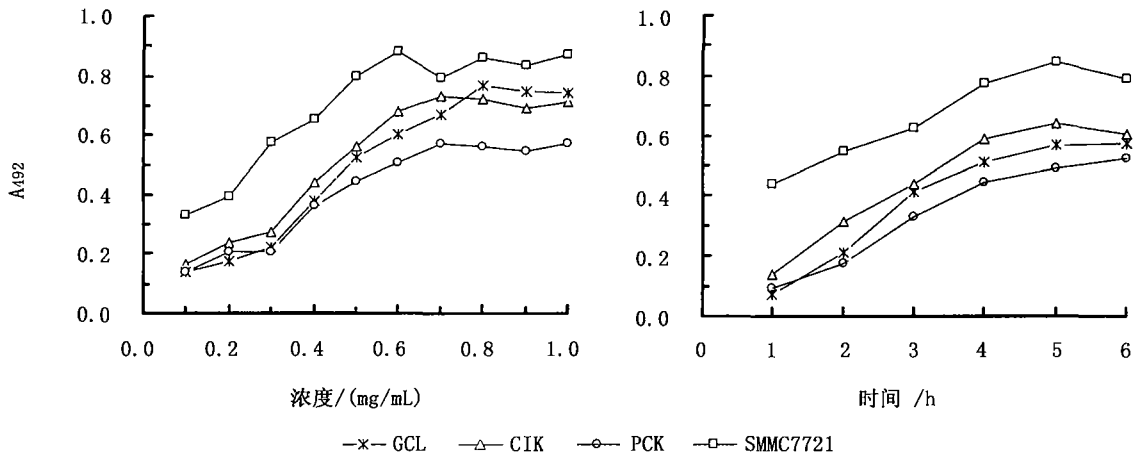


图2 MTT作用浓度与反应时间对OD值的影响( $n=4, \bar{x} \pm s$ )  
Fig.2 Effect of MTT concentration and reaction time on absorbency in MTT assay

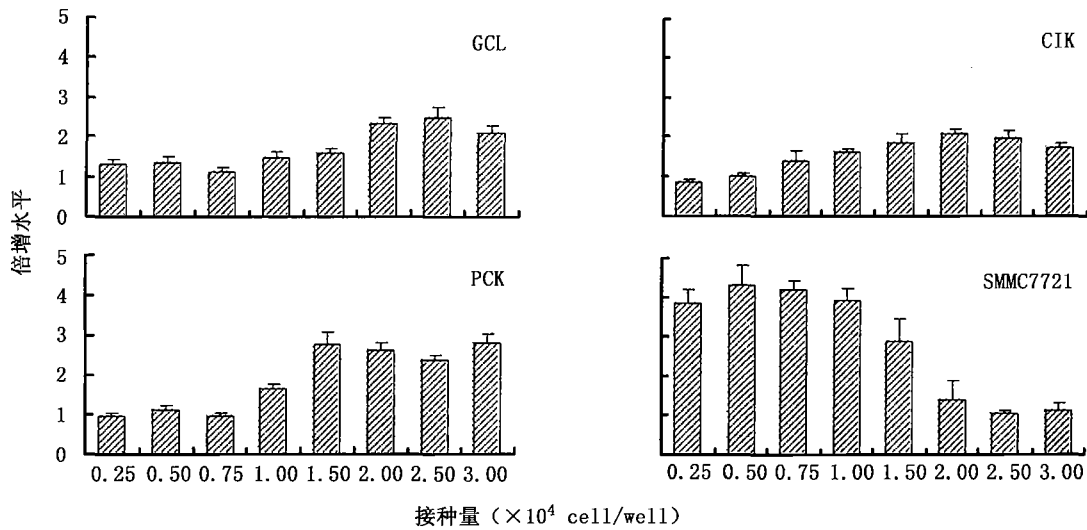


图3 接种量对细胞倍增水平的影响( $n=4, \bar{x} \pm s$ )  
Fig.3 Effect of cell density to inoculate on population doubling level

### 3 讨论

目前,在对药物的毒性评价中通常采用动物整体实验,哺乳动物以鼠和兔为代表,鱼类动物则以斑马鱼和剑尾鱼为代表<sup>[7]</sup>。动物实验具有直接和直观的优点,但也存在一些缺陷,比如药物用量大、操作麻烦、个体差异大等。为此,一些学者利用细胞实验操作方便、灵敏、节约以及不易受外界因素干扰等特点,在一定程度上以体外实验代替体内实验,而一些实验数据表明,细胞实验与动物实验所得药物的 $IC_{50}$ 具有一定的相关性和可比性<sup>[8]</sup>。人类体细胞或同源癌细胞已广泛应用于检测药物对人体的潜在毒性,而鱼类细胞毒检测也同样可成为渔药的急性和慢性毒性试验的有力佐证。

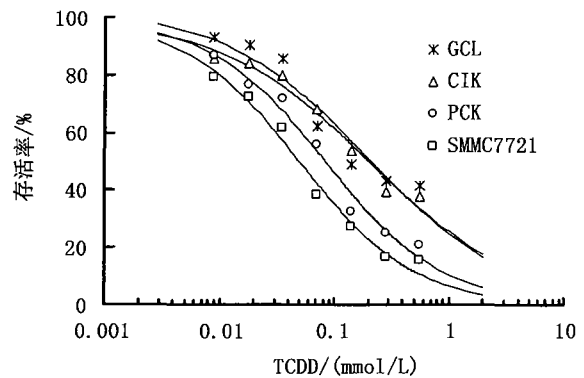


图4 药物(TCDD)细胞毒作用的剂量-效应曲线  
Fig.4 Dose-response curves on cytotoxicity of drug(TCDD) ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

表 1 药物对不同细胞系生长的半抑制浓度  
 Tab. 1 Half-inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) of drug to effect on cell viability

药物	$IC_{50}$ (mmol/L)				
	GCL	CIK	PCK	SMMC	
抗生素	ENR	6.16	4.35	4.22	1.09
	RIF	6.61	9.39	14.00	6.47
	ERM	10.06	10.43	8.01	8.24
多环芳香烃	TCDD	0.19	0.20	0.08	0.05
	PCB	0.12	0.58	0.08	0.07
	PB	4.51	3.89	3.78	1.33
	BaP	3.39	2.22	1.32	0.62
	3-MC	1.58	4.05	0.74	1.01
	BNF	5.18	6.16	8.63	5.83
	ERF	0.56	1.07	2.05	0.35

细胞毒实验要求对细胞的活力进行定量的研究,目前可用的方法主要有染料排斥法、克隆(集落)形成法、三磷酸腺苷发光法、同位素渗入法以及 MTT 比色法等。其中 MTT 比色法是一种定量检测细胞的新方法,该方法快速、简便,实验成本低,人为误差较小而且较精确,重复性好,没有放射性污染,可应用于药物对细胞的毒性检测。

#### 参考文献:

- [1] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *J Immunol Methods*, 1983,65:55-63.
- [2] 沈 慧,王万银,秦海宏,等. MTT 比色法绘制不同锌浓度下细胞生长曲线[J]. *广东微量元素科学*; 2004, 1(11): 16-18.
- [3] 杨智源,郑忠辉,黄耀坚,等. 海洋放线菌细胞毒抗肿瘤活性物质的初筛[J]. *中国海洋药物*, 1999,2:52-55.
- [4] 张建清,刘晓波. 噻唑蓝比色法检测细菌生长和存活状况的研究[J]. *卫生研究*, 2002,31(5): 361-363.
- [5] 程宝鸾. 动物细胞培养技术[M]. 广州:华南理工大学出版社, 2000.
- [6] Laville N, Gomez E, Casellas C, *et al.* Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes[J]. *Toxicol*, 2004,196:41-55.
- [7] 方展强,张凤君,郑文彪,等. 多氯联苯对剑尾鱼  $Na^+/K^+$  ATPase 活性的影响[J]. *水产学报*, 2004,28(1): 89-92.
- [8] Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicol: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples[J]. *Toxicol In Vitro*, 2001, 15(4): 477-488.