

多酚类化合物对 MTT 法测定细胞活性的影响

赵稳兴,赵晶,梁崇礼(成都军区昆明总医院,云南 昆明 650032)

摘要:目的 探讨多酚类化合物对 MTT 法测定细胞活性的影响。方法 测定咖啡酸、咖啡酸苯酯、槲皮素、芦丁、橙皮苷和香叶木素等几种多酚类化合物在不同浓度条件下,对 MTT 法测定肝细胞活性的影响,并与 ^3H -TdR 测定结果进行比较。结果 咖啡酸、咖啡酸苯酯、槲皮素、芦丁、橙皮苷剂量依赖地使 MTT 法测定细胞活性的结果偏高,结果与 ^3H -TdR 不一致。结论 在研究多酚类化合物或含有多酚类化合物的中药对细胞活性影响时,需考虑其对 MTT 测定方法的影响,选用 ^3H -TdR 为佳。

关键词:多酚类化合物;MTT;细胞活性

中图分类号:R965 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2004)04-0263-03

Influence of polyphenols on MTT method in detecting cell activity

ZHAO Wen-xing, ZHAO Jing, LIANG Chong-li (Kunming General Hospital, Chengdu Command, Kunming 650032, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate the influence of polyphenols on MTT method in detecting the cell activities. **METHOD** Hepatic cell activities were detected by MTT at different doses of caffeic acid, caffeic acid phenethyl ester, quercetin, rutin, naringenin, diosmin, and were compared with the results detected by ^3H -TdR. **RESULTS** Hepatic cell activities detected by MTT were dose-dependently increased by polyphenols such as caffeic acid, caffeic acid phenethyl ester, quercetin, rutin, naringenin, and were not consistent with that detected by ^3H -TdR. **CONCLUSION** The influence of polyphenols on MTT methods must be considered. When investigating roles of polyphenols or traditional Chinese medicine with polyphenols in cell activities.

KEY WORDS:polyphenols; MTT; cell activity

测定细胞活性常用的方法有 MTT 法和 ^3H -TdR 同位素示踪技术。与 ^3H -TdR 法相比,MTT 经济、简便、快捷并且不存在同位素污染,因此得到较广泛的应用。然而,我们在用 MTT 法研究中药中所含的多酚类化合物对肝细胞活性的影响时,观察到一些多酚类化合物干扰 MTT 法的测定结果。

1 材料与方法

1.1 材料

咖啡酸(caffeic acid, CA)、咖啡酸苯酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)、槲皮素(quercetin, QU)、芦丁(rutin, RU)、橙皮苷(naringenin, NA)、香叶木素(diosmin, DIO)、胶原酶 II、MTT 等购自 Sigma 公司,DMEM、FBS 为 GIBCO 公司产品, ^3H -TdR 购自中国原子能研究所。

1.2 方法

1.2.1 MTT 和 ^3H -TdR 测定多酚类化合物对肝细胞活性的影响

1.2.1.1 肝细胞分离培养 参考文献^[1]方法分离细胞,将其培养于含 10% FBS, 0.5 u/mL 胰岛素, 10 u/mL 谷氨酰胺的 DMEM 培养基中。

1.2.1.2 MTT 和 ^3H -TdR 检测多酚类化合物对肝细胞活性的影响比较。

取 96 孔细胞培养板,每孔加 5×10^5 / mL 肝细胞 100 μL ,

培养 8 h 后,分别加 CA、CAPE、QU、RU、NA、DIO 等,使其终浓度分别为 0.0、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$ 。 ^3H -TdR 法测定时,加 1.85 μBq /孔 ^3H -TdR,继续培养 24 h 后,将细胞吸附于玻璃纤维滤纸上,液闪仪上测定 cpm 值。MTT 法参考文献^[2,3]方法进行,先将肝细胞培养 24 h 后,每孔加 20 μL 5% MTT,继续培养 4 h 后,每孔加 100 μL DMSO 溶解,以 630 nm 为参考波长,590 nm 为测定波长,测定其 A 值。以上 2 项测定各设一个加入等体积生理盐水的空白对照组。

1.2.2 多酚类化合物对 MTT 法测定结果的影响 于 96 孔细胞培养板上,每孔加 100 μL DMEM 培养基,将 CA、CAPE、QU、RU、NA、DIO 等溶于 DMSO 中,然后加到细胞培养板上,使其终浓度分别为 0.0、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$,再加 20 μL 5% MTT,于细胞培养箱中孵育 4 h 后,每孔加 100 μL DMSO,充分混匀溶解后,测定 A 值。

2 结果

2.1 MTT 和 ^3H -TdR 测定肝细胞活性 表 1 显示,用 MTT 法检测到随着药物浓度增加,CA、CAPE、QU、RU、NA 使培养肝细胞的 A 值增加,并且 CA 和 QU 的影响最为明显,当药物浓度分别大于 10.0、20.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$ 时增量有统计学差异。可见,用 MTT 法检测到使其肝细胞的活性增加,然而用 ^3H -TdR 的研究表明,CA、CAPE、QU、DIO 等使 ^3H -TdR 掺

基金项目:云南省自然科学基金(No 2000C0031 Q)

入肝细胞 DNA 减少,分别在其浓度大于 40.0 和 80.0 $\mu\text{mol/L}$ 时具有统计学差异,表明其在高浓度条件下具有抑制肝细胞增殖活性(见表 2)。由此可见,在研究多酚类化合物对细胞

表 1 MTT 法测定肝细胞活性(A 值)

Tab 1 Hepatic cell activities detected by MTT (A)

化合物	0.0 $\mu\text{mol/L}$	5.0 $\mu\text{mol/L}$	10.0 $\mu\text{mol/L}$ ¹⁾	20.0 $\mu\text{mol/L}$	40.0 $\mu\text{mol/L}$	80.0 $\mu\text{mol/L}$
CA	0.48 $\pm$ 0.09	0.49 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.12 ¹⁾	0.78 $\pm$ 0.16 ²⁾	0.82 $\pm$ 0.15 ²⁾	0.91 $\pm$ 0.21 ²⁾
CAPE	0.42 $\pm$ 0.10	0.40 $\pm$ 0.09	0.51 $\pm$ 0.11	0.62 $\pm$ 0.13 ²⁾	0.62 $\pm$ 0.16 ²⁾	0.78 $\pm$ 0.14 ²⁾
QU	0.44 $\pm$ 0.11	0.45 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.12 ¹⁾	0.65 $\pm$ 0.14 ²⁾	0.22 $\pm$ 0.13 ²⁾	0.88 $\pm$ 0.17 ²⁾
RU	0.45 $\pm$ 0.10	0.49 $\pm$ 0.13	0.59 $\pm$ 0.10 ¹⁾	0.68 $\pm$ 0.12 ²⁾	0.75 $\pm$ 0.20 ²⁾	0.84 $\pm$ 0.17 ²⁾
NA	0.46 $\pm$ 0.12	0.48 $\pm$ 0.09	0.44 $\pm$ 0.08	0.46 $\pm$ 0.12	0.52 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.12 ²⁾
DIO	0.40 $\pm$ 0.07	0.41 $\pm$ 0.08	0.44 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.07	0.43 $\pm$ 0.06

注:对照组比较,¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

Note:¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, compared with the control group

表 2 ³H-TdR 法测定肝细胞增殖活性(cpm)

Tab 2 Hepatic cell activities detected by ³H-TdR (cpm)

化合物	0.0 $\mu\text{mol/L}$	5.0 $\mu\text{mol/L}$	10.0 $\mu\text{mol/L}$	20.0 $\mu\text{mol/L}$	40.0 $\mu\text{mol/L}$	80.0 $\mu\text{mol/L}$
CA	1560 $\pm$ 312	1621 $\pm$ 298	1532 $\pm$ 199	1361 $\pm$ 208	1210 $\pm$ 210 ¹⁾	820 $\pm$ 208 ²⁾
CAPE	1478 $\pm$ 248	1692 $\pm$ 321	1727 $\pm$ 286	1582 $\pm$ 277	1320 $\pm$ 180	980 $\pm$ 212 ¹⁾
QU	1450 $\pm$ 178	1566 $\pm$ 2902	1421 $\pm$ 188	1212 $\pm$ 206	888 $\pm$ 128 ¹⁾	692 $\pm$ 112 ²⁾
RU	1527 $\pm$ 226	1477 $\pm$ 218	1533 $\pm$ 284	1521 $\pm$ 268	1400 $\pm$ 210	1280 $\pm$ 206
NA	1511 $\pm$ 302	1420 $\pm$ 210	1466 $\pm$ 248	1528 $\pm$ 287	1470 $\pm$ 190	1203 $\pm$ 168
DIO	1399 $\pm$ 204	1290 $\pm$ 222	1162 $\pm$ 184	1320 $\pm$ 180	1178 $\pm$ 148	841 $\pm$ 240 [#]

注:对照组比较,¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, compared with the control group

2.2 多酚类化合物对 MTT 测定方法的干扰

图 1 显示,在没有细胞存在的条件下,CA,CAPE,QU, RU,NA 等能使 MTT 的 A 值增加,呈剂量依赖关系,可见这几种化合物是与 MTT 直接相互作用,改变了其 A 值。

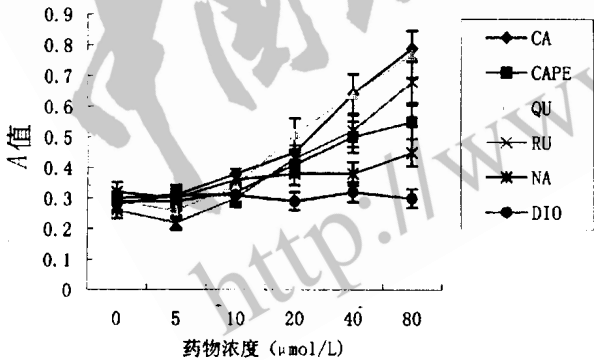


图 1 多酚类化合物对 MTT 法的影响

Fig 1 The influence of polyphenols on MTT

3 讨论

MTT 和 ³H-TdR 是检测细胞活性常用的方法,其根据是细胞能量代谢水平和 DNA 合成水平相平行的原理。MTT 法是根据活细胞线粒体中的脱氢酶将 MTT(偶氮唑盐)还原成紫蓝色的甲臢(formazan),死细胞则无此功能,从而可用比色法推测细胞存活和增殖程度。³H-TdR 则是根据 ³H-TdR 掺入 DNA 的量来判断细胞增殖和活性。由于 MTT 法较之 ³H-TdR 法,经济、简便、快捷,又无放射性物质的污染,因而被广泛用于研究细胞因子,化学物质,中药及其有效成份等

活性的影响时,MTT 法和 ³H-TdR 方法获得不同,甚至是完全相反的结果。

对细胞活性和增殖的影响,在许多实验室都用 MTT 法取代了 ³H-TdR 法^[2-4]。

然而,我们在研究多酚类化合物时,观察到 MTT 法测定结果和显微镜下所见细胞的形态初步判断细胞活性的结果并不完全一致。本实验采用体外培养的肝细胞,比较了多酚类化合物存在条件下,MTT 法和 ³H-TdR 法测定肝细胞活性的不同,结果表明,多酚类化合物如 CA,CAPE,QU, RU, NA 等剂量依赖地使 MTT 法所测得细胞活性增加。再用 ³H-TdR 研究时,CA,CAPE,QU,DIO 等使 ³H-TdR 掺入肝细胞减少。MTT 法与 ³H-TdR 检测结果不一致,仍至完全相反。经不存在细胞条件下的实验结果表明,几种多酚类化合物不是通过影响细胞脱氢酶对 MTT 的还原反应,而是直接与 MTT 相互作用,使 A 值增加,其机制仍需进一步探讨。

多酚类化合物具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节和细胞增殖抑制等多种药理作用,并且是中药中的主要有效成分之一,在细胞水平的研究中,常用到 MTT 法来检测中药或其有效成份化合物对细胞活性和增殖的影响。在研究此类化合物对细胞活性影响时,不宜使用 MTT 法,或需要考虑其对 MTT 法的影响。认识多酚类化合物对 MTT 法的影响,对用此方法进行药物筛选与研究,获得可靠实验结果有重要的意义。

参考文献

[1] 邹原.肝细胞生长因子对四氯化碳损伤原代培养大鼠肝细胞的保护作用[J].中国应用生理学杂志,1997,13(3):228.

- [2] Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods , 1983 ,65 :55 .
- [3] 李翠玲 . MTT 比色分析法的改良及初步应用[J]. 上海免疫学杂志 ,1996 ,16(5) :306 .

- [4] 李杰 . MTT 法在肿瘤研究中的改良和应用进展[J]. 中国肿瘤临床 ,1998 ;25(4) 312 .
- [5] 戴宏 . 人实体瘤化疗敏感性实验 MTT 法影响因素的研究[J]. 苏州医学院学报刊 ,1996 ,16(5) :868 .

收稿日期 :2003-07-15