

细胞凋亡的 MTT 染色法检测

冯春琼¹, 马文丽¹, 宋艳斌¹, 郭秋野¹, 吴清华¹, 郑文岭² (¹第一军医大学分子生物学研究所, 广东 广州 510515; ²广州军区总医院分子肿瘤学研究所, 广东 广州 510010)

摘要:目的 研究 MTT 染色法用于检测细胞凋亡的可行性。方法 以 As₂O₃ 诱导 K562 细胞建立凋亡细胞模型, 并比较以下 3 种方法检测凋亡的结果。MTT 染色法检测、直接在光镜下进行形态学观察以及 DNA 凝胶电泳。结果 MTT 染色法可准确判定细胞凋亡, 并可清晰分辨正常细胞、凋亡细胞和死亡细胞。结论 MTT 染色法是一种简单、可行的检测细胞凋亡的方法。

关键词: 细胞凋亡; MTT 染色; 三氧化二砷; K562 细胞

中图分类号: R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2002)03-0262-02

Detection of cell apoptosis by MTT assay

FENG Chun-qiong¹, MA Wen-li¹, SONG Yan-bing¹, GUO Qiu-ye¹, WU Qing-hua¹, ZHENG Wen-ling²

¹Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Institute of Molecular Oncology, General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract Objective To study the feasibility of using MTT assay to detect cell apoptosis. Methods K562 cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% calf serum and 4 μmol/L arsenic trioxide. Apoptosis was induced in the cultured cells by As₂O₃, and the cells were detected with optical microscope, DNA gel electrophoresis and MTT staining respectively. Result MTT staining could also accurately detect cell apoptosis, by which the apoptotic cells were easily distinguished from normal cells and dead cells. Conclusion MTT staining is simple, convenient and practical for detecting cell apoptosis.

Key words: cell apoptosis; MTT assay; arsenic trioxide; K562 cells

噻唑蓝 (MTT) 染色法操作简单、快速、结果准确, 一般广泛应用于新药筛选、细胞毒性实验、肿瘤放射敏感性实验^[1-3]。近来, 也有实验室用 MTT 法绘制细胞生长曲线。

研究细胞凋亡的方法很多, 如形态学的方法和生化检测法等, 但均存在一些不尽如人意之处。我们在实验中发现, 经 MTT 染色后, 凋亡细胞呈现出极其明显的形态学改变, 为了研究 MTT 染色法在细胞凋亡检测中的应用, 我们以三氧化二砷 (As₂O₃) 诱导 K562 细胞凋亡为模型并对不同方法检测其凋亡情况的结果进行了观察比较。

1 材料与方 法

1.1 试剂

RPMI1640 培养基 (Gibco BRL)、精制小牛血清 (Hyclone)、As₂O₃ (Sigma)、MTT 和二甲基亚砷 (DMSO) (上海生物工程公司)、DU530 紫外分光光度计 (美国

Beckman 公司)。

1.2 溶液及其配置

As₂O₃ 贮备液: 取 As₂O₃ 适量溶于 100ml 120mmol/L 的 NaOH 溶液中, 配成 1mmol/L 的贮备液, 过滤除菌, 4℃ 贮存^[4]; MTT 溶液: 取 MTT 适量溶于 50ml 0.01mol/L 的 PBS 液 (pH 7.4) 中, 磁场搅拌使溶, 配成 2g/L 的 MTT 溶液, 过滤除菌, 4℃ 贮存。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将 K562 细胞置于含 10% 精制小牛血清和青霉素、链霉素各 100U/ml 的 RPMI1640 培养基中, 常规培养 (37℃, 5% CO₂)。以 1.5×10⁵ 个细胞/ml 的浓度接种, 在细胞对数生长期加药, 处理组加入 As₂O₃, 使其终浓度为 4 μmol/L, 对照组加入与处理组相同摩尔数的 NaOH, 继续培养。

1.3.2 光镜下检测细胞凋亡 细胞加药后, 常规培养 24h, 光镜下观察。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳 参照文献 [5] 进行。

1.3.4 MTT 法检测细胞凋亡 MTT 染色操作参照文献 [6], 光镜下观察。

2 结果

2.1 光镜观察

处理组的 K562 细胞经 As₂O₃ 作用 24h 后经光

收稿日期: 2001-11-08

基金项目: 广东省自然科学基金 (984092); 广州市重大科技攻关项目 (99Z02201)

作者简介: 冯春琼 (1972-), 女, 云南曲靖人, 1995 年毕业于华西医科大学, 助教, 电话: 020-85140114-89097, E-mail: fengchunqiong@263.net

镜观察可见细胞形态不圆整,细胞核固缩、裂解成质膜包绕的碎片,且有凋亡小体出现,呈现明显的细胞凋亡形态;对照组细胞则形态完整,核物质分布均匀,细胞不表现出凋亡(图 1)。

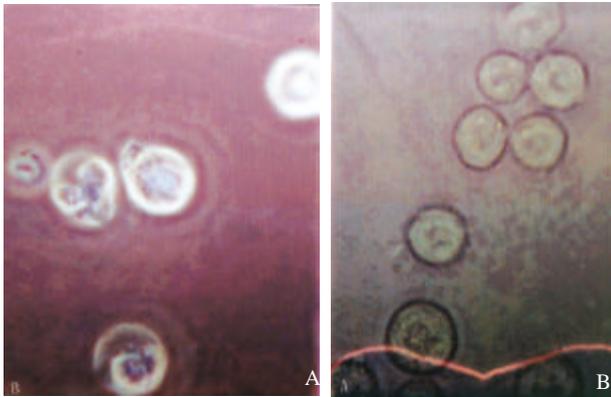


图 1 处理组 (A) 和对照组 (B) 细胞培养 24h 后的光镜形态观察 ($\times 40$)

Fig.1 Light microscopic observation of As_2O_3 -treated and control K562 cells $\times 40$
A: As_2O_3 -treated; B: Control

2.2 DNA 凝胶电泳

经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测发现,处理组细胞 DNA 提取物可见明显的梯状条带,对照组细胞则无(图 2)。

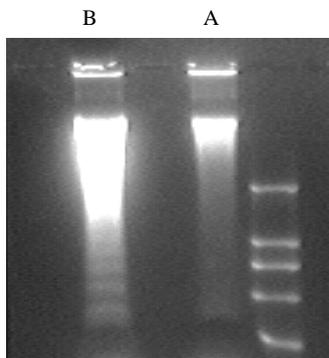


图 2 对照组 (A) 和处理组 (B) 细胞的电泳图

Fig.2 Electropherogram of As_2O_3 -treated and control K562 cells
Atypical DNA ladder was presented in DNA gel electrophoresis. A: Control; B: As_2O_3 -treated

2.3 MTT 染色法检测细胞凋亡

细胞加入 MTT 共培养 4 h 后,在普通光学显微镜下,发现对照组细胞呈圆形,结构完整,胞浆连续,形成的蓝紫色结晶分布比较均匀。而处理组细胞形态不圆整,体积变小,边缘有起泡现象,形成的蓝紫色结晶在细胞边缘聚集,成新月状或边界分明的颗粒块状浓染区域。部分细胞成空泡状,无蓝紫色结晶沉着(图 3)。

3 讨论

目前常用的细胞凋亡检测法大多存在着一些不

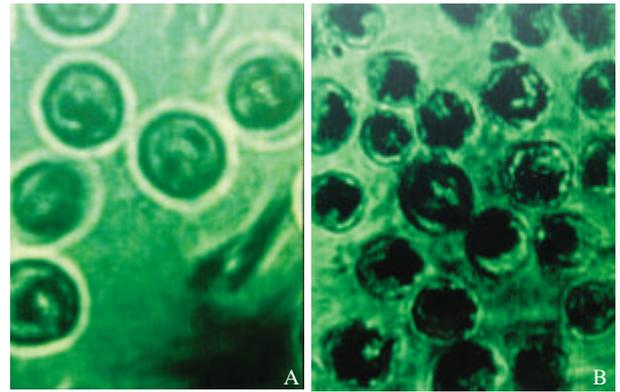


图 3 对照组 (A) 和处理组 (B) 细胞 MTT 染色 ($\times 40$)
Fig.3 MTT staining of As_2O_3 -treated and control K562 cells $\times 40$
A: Control; B: As_2O_3 -treated (4 $\mu\text{mol/L}$)

尽如人意之处,如光镜直接观察法,细胞各部分明暗对比不够显著,且缺乏有说服力的特征或标志;荧光染色法,需要配备荧光显微镜,当紫外光激发过久时会出现荧光淬灭现象,荧光显色持续时间短,不稳定;DNA 凝胶电泳法检测所需时间长,操作繁琐,电泳中使用的 EB 还有致癌的危险;流式细胞术检测则需先进的仪器设备,运行成本过高,限制了它的广泛应用。

MTT, 化学名为 3-(4,5)-2-噻唑-(2,5)-二苯基溴化四氢唑蓝,其有效成分四唑蓝能与活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶作用而被还原为不溶于水的蓝色结晶——甲臞(formazan)并沉淀在细胞中,而死细胞则无此功能。利用 MTT 这一特性,经其染色后即可在光镜下直接检测细胞凋亡。

总结本研究经验,我们认为 MTT 染色法用于检测细胞凋亡有如下优点:(1)可较好区分正常、凋亡及死亡的细胞:在生长良好的活细胞中,蓝色结晶的分布与正常细胞中细胞器线粒体的分布一致,着色均匀;凋亡细胞在光镜下可见蓝色结晶聚集成团块,在细胞的边缘形成半月形或块状的致密浓染小区域,呈典型的凋亡细胞的形态学特征;死亡细胞则与 MTT 不反应,呈空泡样,不着色;(2)方法简单,易于操作,结果判定直观、准确:MTT 与细胞作用后,细胞各部分的阴暗对比增强,光镜下可非常清晰地观察到细胞凋亡的特征;(3)对仪器设备的要求不高,只需普通的光学显微镜即可,利于推广应用;(4)呈色稳定,长时间观察也不会出现染色减弱现象。

综上所述,我们认为 MTT 染色法是一种简单、可行的检测细胞凋亡的方法。

致谢:衷心感谢分子生物学实验室刘智、李燕等同志的大力协助。

(下转 266 页)

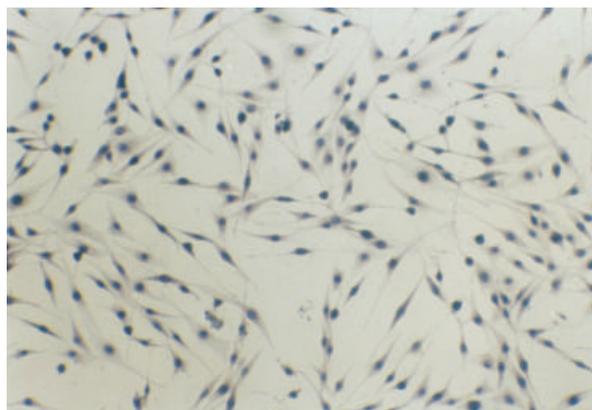


图 4 LoVo 细胞中的 P-gp 免疫组化染色
(SABC 染色, ×160)

Fig.4 Immunohistochemical observation of P-gp expression in LoVo cells (SABC staining, ×160)

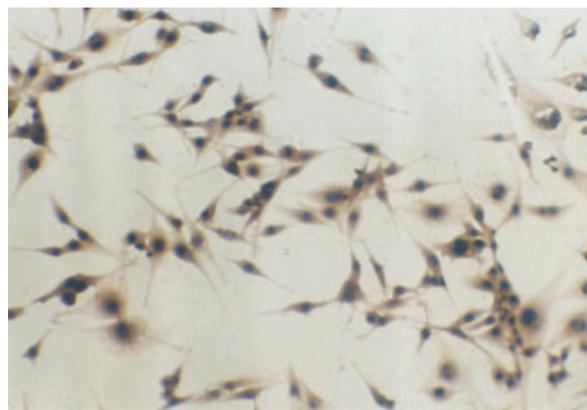


图 5 LoVo/Adr 细胞中的 P-gp 免疫组化染色
(SABC 染色, ×160)

Fig.5 Immunohistochemical observation of P-gp expression in LoVo/Adr cells (SABC staining, ×160)

LoVo 细胞中,阿霉素集中分布在细胞的核区,而在耐药株中,核区分布显著减少,相对在胞质中增多,这与国外报道一致^[4,5]。这种异常分布使得阿霉素在耐药细胞内远离作用靶点细胞核,不能发挥抗癌作用。因此,我们认为,化疗药物在细胞内的异常分布可增进其对化疗药物的耐受性,是肿瘤细胞发生耐药的原因之一。但目前关于药物在 MDR 细胞中分布异常有着不同的解释,有学者^[5]认为药物可能通过类似 P-gp 机制或其他机制(如细胞内 pH 值改变、磷脂膜成分改变等)而聚集在胞质的某些细胞器中,远离靶点。虽然人们普遍认为细胞膜上 P-gp 是导致药物进入胞内的主要机制,但 Maraldi 等^[6]研究表明在 MDR 细胞中,P-gp 在细胞核上的表达是阻止药物进入核区的直接原因。我们观察到加用 VP 后,可使阿霉素在耐药细胞分布发生改变,基本可恢复到敏感状态,即阿霉素进入到核区增多,这可能与 P-gp 有关。VP 不仅抑制了细胞膜上 P-gp,使细胞内药物聚集增加,而且能使储留在胞浆中药物重新进入核内,恢复细胞对药物的敏感性。

我们认为,与共聚焦扫描显微镜相比,用荧光显微镜观察阿霉素在细胞内分布更为方便、快捷、经济,

其缺点是不能将荧光值半定量,但仍不失为一种实用的方法。

参考文献:

- [1] Leveque DJ,ehl F. P-glycoprotein and pharmacokinetics [J]. *Anticancer Res*, 1995, 15(2): 331-6.
- [2] Uchiyama K, Kokubu N, Watanabe T, Nakajima M. A bioassay for the activity of PSC833 in human serum for modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance [J]. *Anticancer Drugs*, 2000, 11(7): 583-90.
- [3] Labroille G, Belloc F, Bilhou N, Aberra C, et al. Cytometric study of intracellular P-gp expression and reversal of drug resistance [J]. *Cytometry*, 1998, 32(2): 86-94.
- [4] Morjani H, Millot J M, Belhoussine R, et al. Anthracycline subcellular distribution in human leukemic cells by microspectrofluorometry: factors contributing to drug-induced cell death and reversal of multidrug resistance [J]. *Leukemia*, 1997, 11(7): 1170-9.
- [5] Weaver J L, Pine P S, Aszalos A, et al. Laser scanning and confocal microscopy of daunorubicin, doxorubicin, and rhodamine 123 in multidrug-resistant cells [J]. *Exp Cell Res*, 1991, 196(2): 323-9.
- [6] Maraldi N M, Zini N, Santi S, et al. P-glycoprotein subcellular localization and cell morphology in MDR1 gene-transfected human osteosarcoma cells [J]. *Biol Cell*, 1999, 91(1): 17-28.

(上接 263 页)

参考文献:

- [1] Diaz R C, Montaner B, Perez T R. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1 [J]. *Histol Histopathol*, 2001, 16(2): 415-21.
- [2] Leonardi A, De Franchis G, Fregona I A, et al. Effect of cyclosporin A on human conjunctival fibroblasts [J]. *Arch Ophthalmol*, 2001, 119(10): 1512-7.
- [3] Bedoya L M, Sanchez P S, Abad M J, et al. Anti-HIV activity of me-

- dical plant extracts [J]. *J Ethnopharmacol*, 2001, 77(1): 113-6.
- [4] Charies P, Caryn N K, Guofu F, et al. Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcl-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-xL [J]. *Blood*, 2000, 95(3): 1014-22.
- [5] Herrmann M, M Lorenz H, Vollr, et al. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments [J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(24): 5506-7.
- [6] 程宝鸾. 动物细胞培养技术 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000. 131-2.