

实验研究

MTT法和SUB-G1法检测金克对胃癌细胞的抑制作用

黄辛武*

摘要:目的:拟探讨金克是否能诱导胃癌细胞凋亡,金克能否有效用于胃癌患者的治疗。方法:利用MTT法和SUB-G1法分析金克诱导抑制细胞的能力。将不同浓度的金克与胃癌细胞孵育,在不同的时间点收获,探求金克诱导胃癌细胞抑制的最佳作用时间及作用浓度。结果:通过MTT法和SUB-G1法分析结果显示金克对胃癌细胞的抑制作用,浓度为1.5g/L的金克诱导胃癌细胞36小时后抑制率达到高峰。结论:MTT法和SUB-G1法是两种快捷、有效检测药物作用的方法,金克对于胃癌细胞的抑制作用介于低度敏感和不敏感之间,但是其能增强免疫,无明显毒副作用,具有广泛的临床应用前景。

关键词:金克;胃癌细胞;抑制作用;SUB-G1法;MTT法

中图分类号:R285.6 文献标识码:B

文章编号:1006-0979(2006)03-0054-03

槐耳浸膏作为一种重要的抗癌中药,目前已有其成品(金克^R槐耳颗粒国家一类新药)运用于临床,对肝癌、肺癌、食管癌、胃癌等均有独特疗效。已有实验表明槐耳浸膏能诱导人肺腺癌细胞A549凋亡。但其诱导细胞凋亡的机制仍不清楚。本实验拟探讨金克是否能诱导胃癌肿瘤细胞凋亡,通过MTT法和SUB-G1分析金克诱导抑制细胞的能力,以阐明其在胃癌化疗中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂:金克(槐耳浸膏)由江苏盖天力药业有限公司提供,碘化丙啶(PI),核糖核酸酶(Rnase A)FITC标记的膜联蛋白(FITC-Annexin-V),PRMI-1640培养基,以上均为Sigma公司产品,MTT(晶美生物),小牛血清(Gibco公司),0.25%胰酶,0.04mol/L酸化异丙醇(天津天正精细试剂厂)。

1.2 细胞:胃癌细胞株MKN-28,购自武汉大学。

1.3 仪器和器材:FAC-Sort流式细胞仪(美国B.D公司),台式高速离心机,恒温水浴箱,低温冰箱,高压灭菌锅,磁力震荡器,微量加样器,恒温CO₂培养箱,超净工作台,高温烤箱,超低温冰箱,超滤除菌器(美国Gelman公司),移液器(10UL、5-40UL、5-200UL、1000UL各/个),96孔、24孔培养板若干,酶联免疫测定仪(BIO-RAD),孔板离心机(SIGMA-4K15),倒置显微镜(XDS-1)。

2 实验方法

2.1 药品制备:精确称取槐耳浸膏1000mg(由江苏盖天力药业有限公司提供),将其溶解于10ml PRMI-1640培养基,以0.22um超滤除菌器(美国Gelman公司)过滤除菌,制备成10mg/ml的PRMI-1640浓缩含药培养液,实验时稀释成不同浓度备用。

2.2 细胞培养和处理

2.2.1 细胞培养:胃癌细胞株MKN-28(购自武汉大学)用常规方法培养。培养条件:加1%青霉素、1%链霉素、10%小牛血清的PRMI-1640培养液,相对湿度94%,5%CO₂,37℃,细胞浓度2×10⁵/ml传代。

2.2.2 细胞处理:胃癌细胞株用常规方法培养,取对数生长期细胞进行实验。将细胞分为对照组、不同浓度金克(0.75g/L,1.5g/L,3.0g/L)诱导组,共同培养12h后,每6h收集细胞,共收8次,然后将每组细胞分3份,分别用于MTT法、SUB-G1法检测。

2.3 MTT法检测金克对胃癌MKN-28的抑制作用:将对数生长期胃癌细胞用0.25%胰酶消化,用灭菌PBS稀释离心去上清,用培养基重悬细胞计数,调整细胞浓度为10⁶/ml,将细胞按每孔90ul种板,将细胞分为对照组、不同浓度金克(0.75g/L,1.5g/L,3.0g/L)诱导组,每孔设两复孔,按6h、12h、18h、24h、30h、36h、42h、48h设计分别种板,分别在6h、12h、18h、24h、30h、36h、48h收获,用孔板离心机离心去上清,0.25%胰酶消化,每孔加90ul培养基重悬细胞,每孔加MTT10ul,并增设阴性对照,37℃孵育4小时,每孔加入0.04mol/L酸化异丙醇100ul,用吸管反复吹打使接近结晶颗粒溶解后,用免疫酶标仪在570nm波长测光密度值(OD值)。

2.4 SUB-G1法检测金克诱导胃癌MKN-28细胞的凋亡:将对数生长期细胞分为对照组、不同浓度(0.75,1.5,3.0g/L)金克诱导组,共同培养18h后,第6h收集细胞,然后将每组细胞分两份,分别用SUB-G1法检测。将收获新鲜细胞用PBS洗涤次,80%的冰乙醇固定过夜,PBS洗涤1次,加100μl浓度为10mg/L的PI和50μl浓度为0.1%的Rnase A,室温下避光放置20min,用流式细胞术检测。经上述处理的细胞,荧光标记成功后,应用FAC Sort流式细胞仪检测。经488nm激光激发,被标记细胞发射的红色(PI)被FAC Sort流式细胞仪的标准透镜接受。应用Cellquest软件(B.D.公司,美国),对上述

*湖北省咸宁市中心医院 (437100)

2005年10月10日收稿

所测细胞的单参数荧光强度、任一细胞群体的平均荧光强度进行分析。

2.5 结果的判断

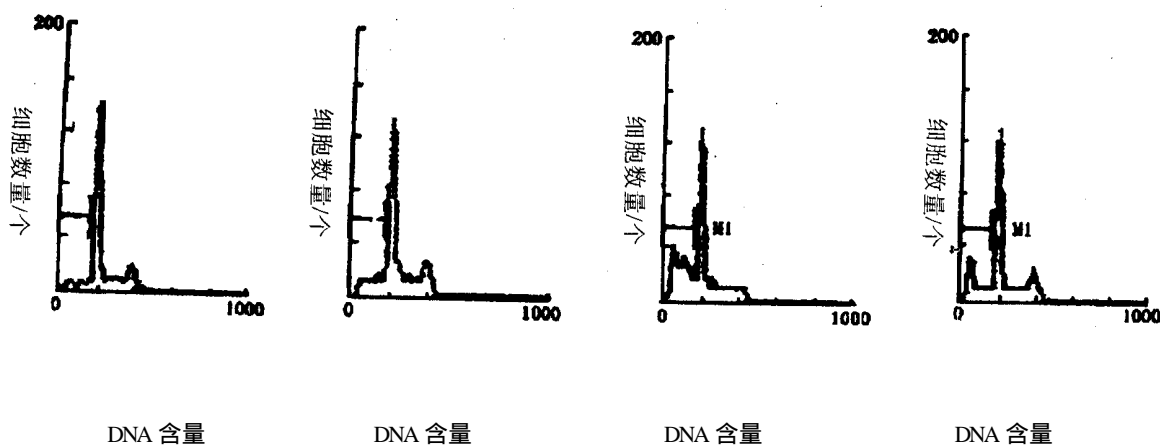
2.5.1 MTT法取3个复孔光密度值(OD)的平均值作为细胞在此药组的平均光密度值(OD)。按公式计算肿瘤细胞的抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{用药组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}} \times 100\%$$

表1 金克对 MKN - 28 细胞抑制率的影响

不同浓度组	不同作用时间							
	6h	12h	18h	24h	30h	36h	42h	48h
0.75g/L	6.92	7.96	9.42	10.11	13.26	18.02	17.56	18.51
1.50g/L	8.09	10.32	15.26	20.75	24.62	32.56	30.49	32.01
3.00g/L	13.56	15.21	18.93	22.14	27.32	31.17	29.24	31.24

3.2 Sub - G1 检测 1.5g/L 金克诱导 MKN - 28 细胞凋亡率: 分别如下图所示:
对照组 4.2% 24h 19.76% 36h 33.46% 48h 29.38%



从以上的表中可以看出 MTT 法检测 1.5g/L 金克作用 36h 达到最佳抑制率 32.56%,同时,在该药物浓度及时间用 SUB - G1 检测金克诱导 MKN - 28 细胞凋亡率 33.46%,均高于 30%。金克对诱导 MKN - 28 细胞的凋亡作用介于低度和中度敏感^[1]。

4 讨论

四唑盐快速比色法(MTT法)是一种检测细胞存活和生长的方法。1983年 Mossman 根据细胞能量代谢水平与 DNA 合成水平相平行的原理,建立了四唑盐比色法^[2]。由于活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶能脱下琥珀酸氢原子,使其氧化成延胡索酸。而 MTT 作为脱下氢原子的接受剂被还原成蓝紫色的甲基蓝,反应产物甲基蓝颜色深浅与活细胞数目成正比。凡具有代谢活性的细胞无论处于静止期还是分裂期,都有还原 MTT 的作用,而死细胞和红细胞则没有这种能力^[3,4]。利用此原理测定抗肿瘤药物作用于肿瘤细胞的变化并计算出药物对肿瘤细胞的抑制率。自 MTT 法应用于抗肿瘤药物

2.5.2 被(PD)标记细胞经 488nm 激光激发发射的红色荧光被 FAC Sort 流式细胞仪的标准透镜接受。应用 Cellquest 软件(B. D. 公司,美国),对上述所测细胞的单参数荧光强度、任一细胞群体的平均荧光强度进行分析。

3 结果

3.1 金克对 MKN - 28 细胞抑制率的影响(%)见表 1。

敏感性试验以来,其以简单、快速、敏感性好等优点而被临床和科研广泛应用。但作为一种新的方法仍存在一些问题,如(1)三个平行孔之间的吸光度值的标准差平均值为 0.08,对肿瘤细胞抑制率越高则吸光度值越低,同样误差情况下,结果产生的差异相对越大,所获结果就会高于实际敏感性结果^[5]。(2)某些有色药物易影响酶标仪的检测结果造成假阴性。(3)反应产物甲基蓝的溶解剂的不稳定性也会影响结果的精确度。(4)研究人员发现丝裂霉素作用 3 天后的死细胞中仍保留了活细胞 24% 的琥珀酸脱氢酶活性,使甲基蓝产量偏高^[6],这也会影响 MTT 法的灵敏度。本实验中使用的药物金克为有色药物,在实验过程中使用孔板离心机去上清的方法除去有色液体,重悬细胞,排除药物颜色对实验结果的干扰而使实验结果更为精确。

细胞凋亡(apoptosis, Ap)是不同于坏死(necrosis)的一种自主的程序性自杀性死亡(programmed cell death, PCD)。在细胞凋亡晚期,细胞内核酸内切酶激活,并在核小体间切割

DNA链,使DNA降解为以核小体(200bp)为单位的片段。细胞被固定后,小分子DNA片段由胞内渗出,细胞内DNA含量明显降低,在G₁期峰前以Sub-G₁峰的形式出现而被识别^[7,8,9]。由此原理建立的Sub-G₁法因其操作简便快捷且费用低而得到广泛应用。但对于早期凋亡细胞而言,断裂的DNA片段较少或片段较大,DNA因而渗出较少,故应用Sub-G₁法无法检测到早期凋亡细胞,且其不能准确地分析细胞凋亡的周期时相性,因此,Sub-G₁法的应用具有一定的局限性。

Nakazato等将根治性切除胃癌病例(N=262例),术后随机分为单纯化疗组(MMC+5-FU)和免疫化疗组(MMC+5-FU+槐耳颗粒)进行实验,所有病例随访5年以上,发现免疫化疗组的5年无病生存率70.7%,而单纯化疗组仅为59.4%,两组之间差异显著($P < 0.01$)^[10,11]。总之,MTT法和SUB-G₁法是两种快捷,有效检测药物作用的方法,同时,(1)金克能直接诱导肿瘤细胞凋亡;(2)金克能提高机体的免疫力;(3)金克对机体无毒副作用;(4)金克对中晚期肿瘤患者能明显改善存活率。金克对于胃癌细胞的抑制作用介于低度敏感和不敏感之间,但是其能增强免疫,无明显毒副作用,具有广泛的临床应用前景。

参考文献:

- [1] 辛华雯,王润帮,杜光祖. MTT法在恶性肿瘤体外药物敏感试验中的临床应用[J]. 实用癌症杂志,1994,9(2):73-75.
- [2] Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to Proliferation and cytotoxicity assay [J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55.
- [3] Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines [J]. Cancer Res, 1988, 48: 4827-4833.
- [4] Turtinen LW, Juran BD. Standardization and comparison of an XTT based TNF alpha bioassay with a TNF-alpha ELISA [J]. Biotechniques, 1998, 24: 232-234, 236-238.
- [5] Boayue KB, Gu L, Yeager AM, et al. Pediatric acute myelogenous leukemia cells express IL-6 receptor and are sensitive to a recombinant IL-6-Pseudomonas exotoxin [J]. Leukemia, 1998, 12: 182-191.
- [6] Sargent JM, Taylor CG. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia [J]. Br J Cancer, 1989, 60: 206.
- [7] Gong JP, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gelelectrophoresis and flow cytometry [J]. Anal Biochem, 1994, 218: 314-319.
- [8] Grczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z, et al. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase assays [J]. Cancer Res, 1993, 52: 1945-1951.
- [9] Elstein KH, Thomas DJ, Zucker RM. Factors affecting flow cytometric detection of apoptotic nuclei by DNA analysis [J]. Cytometry, 1995, 21: 170.
- [10] Nakazato H, Koike A, Saji S, et al. Efficacy of immunotherapy as adjuvant treatment after curative resection of gastric cancer [J]. Lancet, 1994, 343: 1122-1126.
- [11] 刘星野,周默巍,徐枫,等. 金克槐耳颗粒配合FAM晚期胃癌38例[J]. 浙江肿瘤,1995,5(3):189.

Inhibition of Gastric Cancer cells Induced by Jinke

Huang xing - wu

The Central Hospital of Xianning, Hubei 437100, China.

[Abstract] Objective: To study the ability of Jinke to induce the Gastric Cancer cells(MKN-28), and Jinke may be used in Gastric Cancer patients' chemotherapy. Methods: The ability of Jinke to inhibit cells is detected by the MTT method, the inhibition ratio reached its top apex, then we detect the apoptosis rate induced by Jinke with the Sub-G₁ method. Results: When MKN-28 cells were induced by Jinke with the Sub-G₁ method. Results: When MKN-28 cells were induced by 1.5g/L Jinke, after 36h, with the MTT method, the inhibition ratio reached its top apex, Apoptosis rate detected by Sub-G₁ method; after 36h reached to the top apex. Conclusions: That JINKE could induce Gastric cancer cells to apoptosis, though the chemotherapy sensitivity is not as so high, without side effect, JINKE may enhance patients immune ability and increases living ratio of late phase cancer patients, so its clinical use is very important.