技术方法

文章编号:1000-5404(2006)11-1262-02

MTT法与BrdU ELISA法检测成纤维细胞增殖的可靠性比较

刘 苇,李 平,熊仁平,周元国 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学中心,重庆 400042)

提 要:目的 比较MTT法与BrdU ELISA法检测成纤维细胞增殖的可靠性。**方法** 原代培养大鼠成纤维细胞,分别在细胞60%汇合和80%汇合时,以250 pg/ml TGF-β刺激细胞增殖,48 h后分别用MTT法和BrdU ELISA法,以及免疫组化方法检测细胞增殖情况。**结果** 细胞60%汇合时MTT检测组和BrdU ELISA检测组与各自的对照组比较,比值分别为1.46和1.70,检测值近似;细胞80%汇合时二者分别为1.0和2.5,免疫组化结果显示TGF-β刺激组蓝染的增殖细胞明显高于对照组。**结论** 与MTT法相比,BrdU ELISA更能客观地反映细胞增殖情况。

细胞增殖检测技术广泛应用于分子生物学、遗传学、肿瘤生物学、免疫学、药理和药代动力学等研究领域。细胞增殖检测方法目前常用的有MTT(噻唑蓝比色)法、^{3}H-TdR(氚胸腺嘧啶核苷)标记法、BrdU(5-溴脱氧尿嘧啶核苷)ELISA法等。为了更清楚地认识几种方法原理的差异,确定各自的应用目的和条件,我们用MTT和BrdU 2种方法对在TGF-β的刺激下处于不同生长期的培养成纤维细胞进行了检测。因为TGF-β对成纤维细胞有显著的促增殖作用[1],我们通过前期实验发现250 pg/ml浓度TGF-β刺激增殖效果最佳。因此,本实验选取该条件来比较MTT法与BrdU ELISA法检测细胞增殖的差异。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

健康Wistar大鼠,雌雄不拘,购自第三军医大学大坪医院实验动物中心,DMEM培养基(Hycolone,美国);兔抗Ⅰ型胶原抗体(博士德公司,武汉);兔S-P试剂盒(中山公司,北京);TGF-β(转化生长因子 transforming growth factor β, Pepro Tech,美国);BrdU ELISA试剂盒(5-溴脱氧尿嘧啶核苷 Bromodeoxyuridine,Roch,美国);MTT(噻唑蓝 Thiazolyl Blue,Sigma,美国);多功能荧光读板机(Bio-tak,美国)。

1.2 原代大鼠皮肤成纤维细胞培养和鉴定

采用组织块贴壁法原代培养成纤维细胞,Ⅰ型胶原抗体免疫组化方法鉴定成纤维细胞,取3~5代进行实验。

1.3 MTT法与BrdU ELISA法检测细胞增殖的比较

1.3.1 实验设计和分组 实验选取细胞密度60%汇合和80%汇合2个点进行实验。以细胞数2×10^3/孔接种96孔板,分别在细胞60%汇合及80%汇合时,加入含0.4%血清的DMEM同步化细胞48 h,再加入250 pg/ml TGF-β刺激细胞增殖,对照组加入含0.4%血清的DMEM,48 h后用MTT法和BrdU ELISA法检测增殖情况。每个实验组4孔细胞,重复实验3次。

1.3.2 细胞增殖的BrdU ELISA法测定 实验预设空白对照组和背景对照组:空白对照组不加细胞只加培养液和实验试剂,背景对照组除不加标记液外其余条件同实验组。多功能荧光读板机470 nm读板,参考波长490 nm。比色结果减去空白对照为实验结果。背景对照旨在去除非特异性影响,应小于0.1。

1.3.3 细胞增殖的MTT法测定 实验预设空白对照组,比色时以空白孔调零。

1.4 免疫组化方法检测细胞增殖

细胞80%汇合时,加入含0.4%血清的DMEM同步化细胞48 h,刺激组加入250 pg/ml TGF-β,对照组不加TGF-β,48 h后用BrdU抗体检测细胞增殖情况。

2 结果

细胞密度60%汇合点:MTT检测组与BrdU ELISA检测组与各自的对照组比较比值分别为1.46和1.70,提示2种方法都能较好反应细胞增殖情况。细胞密度80%汇合点:MTT检测组与BrdU ELISA检测组与对照组比值分别为1.0和2.5,BrdU ELISA检测结果显示TGF-β刺激增殖明显,而MTT检测结果则没有增殖。免疫组化方法观察到蓝染的阳性增殖细胞高于对照组。

3 讨论

细胞增殖是指细胞在周期调控因子的作用下,通过DNA复制,RNA转录和蛋白质合成等复杂反应而进行的分裂繁殖过程,其中核DNA含量的复制倍增是整个过程的重要特征。MTT法通过检测琥珀酸脱氢酶的变化来间接反映活细胞的数量,而活细胞中不仅有新增殖的细胞也有原来的父代细胞,因此其反应结果只有在新增殖细胞数远大于父代细胞时才可能在一定程度上代表增殖细胞。BrdU ELISA法和^{3}H-TdR标记法分别通过检测掺入到细胞增殖过程中新合成DNA中的BrdU和^{3}H-TdR来反映细胞增殖的情况[2,3]。BrdU标记技术已越来越多地用于检测细胞的增殖动力学[4]。

我们的实验结果显示,在细胞密度不大时(60%

作者简介:刘 苇(1971-),女,重庆市人,实验师,主要从事细胞生物学和分子生物学方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68757731,E-mail: liuping731@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-09-14;修回日期:2006-03-27

汇合)MTT法对TGF-β刺激成纤维细胞增殖的检测结果与BrdU ELISA检测法近似。在细胞密度较大时(80%汇合),MTT法显示TGF-β刺激成纤维细胞没有促进增殖作用;但BrdU ELISA检测显示TGF-β对成纤维细胞具有显著地促进增殖作用,免疫组化方法也观察到蓝染的阳性增殖细胞明显高于对照组。从而证实MTT反映的结果受细胞生长状态及密度的显著影响:当细胞密度较小处于对数增长期时,新生细胞占活细胞的比例较大,这时的检测结果与BrdU ELISA近似;当细胞密度较大形成接触抑制时,新生细胞占活细胞的比例较少,MTT检测不易得出正确的结果。而BrdU ELISA通过检测细胞增殖过程中新合成的DNA来反映细胞增殖的情况。无论新生细胞比例的多寡,DNA复制客观存在,所以当细胞密度较大(80%汇合)时,BrdU ELISA检测更为客观准确。

综上所述,与MTT法相比,BrdU ELISA法更能客观地反映细胞增殖情况。

关键词:MTT法;BrdU ELISA法;细胞增殖
中图法分类号:R329-33 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] KIMURA A, KATOH O, HYODO H, *et al*. Transforming growth factor-beta regulates growth as well as collagen and fibronectin synthesis of human marrow fibroblasts[J]. Br J Haematol, 1989, 72(4): 486-491.
[2] LIN P, ALLISON D C. Measurement of DNA content and of tritiated thymidine and bromodeoxyuridine incorporation by the same cells[J]. J Histochem Cytochem, 1993, 41(9): 1435-1439.
[3] BATTEGAY E J, RAINES E W, SEIFERT R A, *et al*. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells *via* complex control of an autocrine PDGF loop[J]. Cell, 1990, 63(3): 515-524.
[4] WILDEMANN B, SCHMIDMAIER G, ORDEL S, *et al*. Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied IGF-I and TGF-beta1: comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2003, 65(1): 150-156.

(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2006)11-1263-01

个案与短篇

体外循环下冠状动脉旁路移植术手术配合的体会

王庆梅,陈小丽 (第三军医大学西南医院手术室,重庆 400038)

冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting, CABG)是治疗冠心病的有效手段,其中微创冠脉旁路移植是近年来心血管外科的最新进展[1,2]。我院1995年1月至2005年10月开展在体外循环下CABG 33例,现将手术配合总结并讨论如下。

1 临床资料

33例患者,男性18例,女性15例,平均年龄63.5岁。体质量57~81 kg,平均70.5 kg。本组患者旁路移植血管平均3.2支。1例因心脏复跳后突发大面积心肌梗死,其余均获得手术成功。术后早期复查心电图ST段恢复正常者26例,6例心电图显示心肌缺血性改变有不同程度改善。

用物准备:除常规心脏手术所需器械及物品外还需准备冠状动脉搭桥器械,包括冠状动脉刀,冠状动脉角度剪2把,显微镊2~3把,显微持针器2把,小号和中号钛夹钳,钛夹,侧壁钳,打孔器1套,直径1、1.5、2.0 mm血管探条各1条,钝头冠状动脉灌注针1支,头灯1套,高频电刀,氩气电刀各1台。

作者简介:王庆梅(1969-),女,四川省自贡市人,主管护师,主要从事手术室护理及肝移植围手术期护理方面的研究。电话:023-68754007

收稿日期:2006-03-02;修回日期:2006-04-02

药品准备有罂粟碱、肝素钠等,缝线准备2/0涤纶线,4/0、5/0、7/0、8/0 Prolene缝线,$0^{\#}$~$10^{\#}$慕丝线。

术中配合:(1)巡回护士配合 术前1 d巡回护士到病房访视患者,详细了解病情和手术方式,通过查阅病历,了解其确切诊断,有无肺动脉高压,手术入路及复杂程度,心、肺、肾等重要器官的功能状况[3]。主动与患者及家属交流,正确认识手术的方式以及手术麻醉所需的准备情况,耐心地解答患者及家属提出的相关问题,建立医患间的信任感,解除或减轻患者恐惧焦虑的心理。手术当日提前备好手术所需药品,迎接患者时态度和蔼,可巧妙地询问一些与手术无关的话题以分散患者的注意力,稳定患者的情绪。查对清楚后常规于患者右上肢建立静脉通道,并协助麻醉医生行桡动脉穿刺、颈内静脉插管并抽取200 ml患者自体血抗凝后备用。在麻醉诱导、维持及苏醒期间,巡回护士要协助麻醉医师给药、插管;熟悉心脏监护仪及除颤器的使用并在紧急情况下配合抢救工作[4]。待患者麻醉后行导尿,安置手术体位,平卧后胸骨后垫高,双上肢包裹后放于身体两侧,双下肢稍外旋,患者两侧臀下粘贴2张负极板,协助手术开台。

(2)手术护士配合。①切取血管移植物 手术分2组同时进行,1组取正中劈胸骨开胸切口游离胸壁乳内动脉,用高频电

(下转1266页)