维普资讯 http://www.cqvip.com

Optimal conditions of primary culture for small intestinal epithelial cells

Wu Feng, et al
Department of Pediatric Surgery, College of Pediatrics

On the basis of preceding work in establishing a reproducible method for small intestinal epithelial cells of fetal rat in primary culture,we investigaged the optimal culture conditions of small intestinal epithelial cell.The epithelial organoids of small intestine were obtained from Wistar fetal rats,and were successfully cultured on collage-coated plates in DEME medium.MTT colorimetric assay was developed to allow a reproducible and quantitative measurement of proliferation of small intestinal epithelial cells in primary culture,so as to get the optimal culture data at different conditions.Results showed that cultural medium quality,incubative time,CO_2u concentration,the amounts of incubated epithelial organoids,fetal calf serum level and the time of administrated drug were major influential factors in the process of epithelial growth in primary culture.The optimal culture data of these factors were also obtained.It is concluded that many factors can influence the growth of small intestinal epithelium in the process of primary culture.The optimal culture conditions would be useful to investigate the effects of extracellular matrix constituents,hormones,growth factors,and specific nutrients on the epithelial structure,function,proliferation,and differentiation in the small intestine.

KEY WORDS Small intestine; Epithelial cell; Primary culture; Optimal culture condition

225-229 (4)

WST-1法用于抗恶性肿瘤药物筛选的实验研究

R979.1
R965.1

基础医学院病理生理教研室 蓝 轲* 范维珂
医学检验系分析化学教研室 黄 昕

提 要 WST-1是一种新型的四唑盐。它生成水溶性的有色物质，比色时不需额外的溶解步骤。在本研究中，我们将WST-1用于胃癌细胞株SGC-7901的抗癌药物筛选试验。我们的研究表明：①最适细胞接种数0.5×10^4-1×10^4/孔。②.WST-1显色法的最佳波长450nm。③.WST-1显色法重复性良好，组内变异系数为3.5%～8.7%。④WST-1法比MTT法敏感。⑤.WST-1法比MTT法简便。⑥.WST-1法用于抗癌药物筛选结果与MTT法具有良好的符合性。结果表明.WST-1法具有快速、简便的特点，是体外瘤株筛选抗癌新药和临床肿瘤药敏试验的可靠方法。

关键词 WST-1法; MTT法; 抗癌药物敏感试验; SGC-7901细胞株 药物筛选
中图分类号 R979.1

近年来，恶性肿瘤的发病率在世界范围内呈不断上升的趋势。随着医学科学的进展，恶性肿瘤的治疗方法也在不断涌现。但就目前来看，手术、放疗和化疗仍然是治疗恶性肿瘤的主要手段。合理使用化疗药物往往是肿瘤治疗成功的关键。由于肿瘤存在耐药的问题，如何选择对肿瘤敏感的抗癌药物对化疗至关重要。迄今为止，用于抗癌药物筛选的肿瘤药敏试验已形成体内外十余种方法。体内试验由于耗时长，价格昂贵，已逐步被体外实验取代。目前国内外常用的方法有Salmon

*男，1971-12生，研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

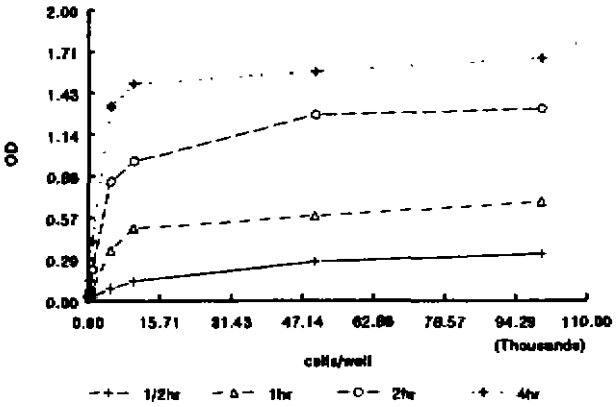


图1 WST－1的代谢动力学

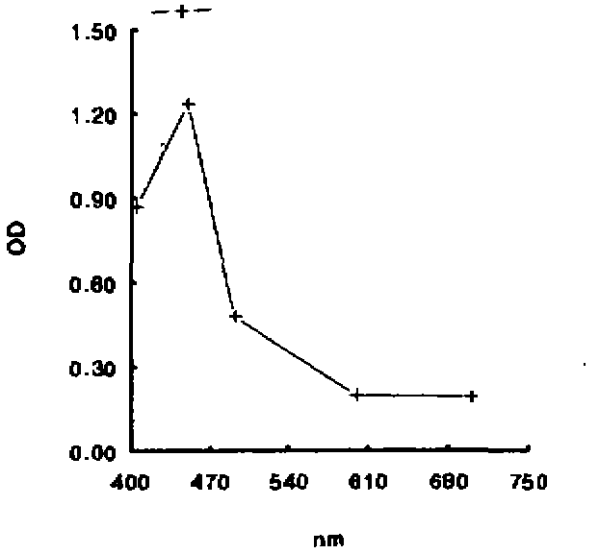


图2 WST－1检测法最适比色波长的选择

法、同位素掺入法及MTT法等[1,2,3]，前二种方法由于需要特殊条件及一定的设备，且同位素掺入法有放射性污染，故不宜在一般实验室推广。MTT法是目前较常用的方法。其原理是利用活细胞线粒体脱氢酶将四甲基偶氮唑盐MTT(3－[4,5－-Dimethylthiazol－2－yl]－2,5 diphenyltetrazolium bromide)转化为有色物质，产生有色物质的数量与活细胞的多少成正比，用有机溶剂二甲亚砜(DMSO)将有色物质溶解后进行比色，根据OD值计算活细胞的存活率。由于MTT经线粒体脱氢酶转化产生的有色物质为非水溶性，比色前需将细胞培养液吸去，再加入DMSO溶解有色物质比色，实验步骤略显繁琐，且在吸去培养液的过程中，可能吸掉有色物质，对实验结果造成干扰。因此，MTT法尚不是最佳的细胞活力检测方法。国外新近报导了一种新型的四唑盐 WST－1(4－[3－(4－Iodopheny－2－(4－nitrophenyl)－2H－5tetrazolio]－1,3 benzene disulfonate)，经线粒体脱氢酶转化后产生水溶性有色物质，可直接进行比色，从而避免了MTT法的缺点。国内尚未见报导。本实验就WST－1显色法用于抗癌药物筛选试验的可行性及该法的最佳实验条件进行了探讨，现报导如下：

1 材料与方法

1.1 肿瘤细胞株 选用本室保存的人胃腺癌SGC－7901。

1.2 试剂 MTT(Fluka)，溶解于PBS中，5mg/ml，抽滤除菌备用；WST－1即用型(Boehringer Mannheim)；二甲亚砜(苏州正兴化工研究所，分析纯)；RPMI1640(Gibco)；新生小血清(华西生化制品厂)；胰蛋白酶(Difco)；抗癌药物；抗癌药物：丝裂霉素C(MMC，日本协和发酵工业株式会社)；长春新碱(VCR，上海第十一制药厂)；顺铂(CDDP，云南个旧生物化学制药厂)；足叶乙甙(VP16，济南齐鲁制药厂)；5－氟尿嘧啶(5－Fu，天津人民制药厂)；阿霉素(ADM，意大利爱宝大药厂)

1.3 96孔培养板(Corning，美国)

1.4 显色步骤 ①取对数生长中期SGC－7901细胞株一瓶，0.1%胰蛋白酶消化，用RPMI1640完全培养液制成单细胞悬液；②台盼兰染色，计算活细胞数；③调整细胞浓度。 将一定量的细胞接种于96孔培养板内，200μl/孔；④5%CO_2，37°C培养一定时间(1－3天)后，分别加入MTT或WST－1各20μl；⑤继续培养1/2－4小时，WST－1组可直接比色；MTT组小心吸去培养液，加入DMSO200μl，振荡5分种后比色，比色波长600mm[4]。比色时均设立试剂对照。

1.5 最适细胞接种数的选择及WST－1与细胞反应时间的确定 将SGC－7901细胞按1×10^2～1×10^5/孔分别接种于96孔培养板，200μl，分别在1/2，1，2，4小时四个时间点比色，并绘制细胞数与OD值的关系曲线。

1.6 WST－1法最佳波长的选择 选用最适细胞接种数，作8个平行孔，按前述方法操作后，分别用不同波

维普资讯 http://www.cqvip.com

长(405nm、450nm、492nm、600nm、700nm)进行比色，OD值最大者作为最佳波长。

1.7 WST－1法的组内重复性实验 相同条件下，分别用一定量的SGC－7901细胞接种至96孔培养板，每种细胞数作8个平行孔，每孔200μl，培养24小时后加入WST－1 20μl/孔，4小时后比色，根据OD值计算每组的均值和变异系数(CV)。

1.8 WST－1法与MTT法敏感性的比较 相同条件下，将细胞按不同浓度接种至96孔培养板，培养24小时后按前述方法分别加入WST－1及MTT比色，绘制细胞数与OD值关系曲线并比较。

1.9 WST－1法与MTT法用于抗癌药物筛选的比较 ①将细胞按最适接种数接种至96孔培养板；②抗癌药物按1倍及10倍血峰浓度（药物剂量见表1)分别加入细胞孔，每种药物的每种浓度作3个平行孔[5-6]；③培养2天后，分别加入WST－1或MTT，4小时后比色。操作已如前述。根据OD值计算存活率并比较两种试剂的异同。实验需设立试剂对照及阴性对照。肿瘤细胞存活率＝实验组OD值/阴性对照组OD值×100%；结果判定：肿瘤细胞存活率<30%则该药为高度敏感；30～50%为中度敏感；>50%为不敏感[3]。数据采用配对t检验。

表1 抗癌药物1倍(Cmax×1)及10倍(Cmax×10)血峰浓度(μg/ml)

drugs	Cmax×1	Cmax×10
ADM	0.4	4.0
MMC	3.0	30.0
VCR	0.5	5.0
5－FU	10.0	100.0
VP－16	10.0	100.0
CDDP	10.0	100.0

2 结果

2.1 最适细胞接种数的选择及WST－1与细胞反应时间的确定 随细胞数的增多，WST－1法显色亦逐渐加深，OD值也随之升高(见表2)；根据细胞数与OD值的关系曲线，确定0.5×10^4～1×10^4为最适细胞接种数；WST－1与细胞反应1小时后即有明显显色，确定2～4小时反应时间较为适宜(图1)

2.2 WST－1法最佳波长的选择 将1×10^4个肿瘤细胞接种至96孔板，共8个平行孔，24小时后加入WST－1(方法已如前述)再培养2小时，培养液变为橙红色，在不同波长下比色，450nm处出现最大吸收峰(图2)，故选择450nm为最佳波长。

表2 不同细胞数在不同时间点比色的OD值

细胞数	OD值			
	1/2 h	1 h	2 h	4 h
1×10^2	0.015	0.026	0.036	0.043
5×10^2	0.025	0.041	0.080	0.141
1×10^3	0.027	0.075	0.216	0.408
5×10^3	0.087	0.347	0.818	1.333
1×10^4	0.135	0.497	0.957	1.488
5×10^4	0.269	0.580	1.270	1.569
1×10^5	0.322	0.680	1.313	1.663

2.3 重复性实验 相同条件下，四组样品的OD值重复性良好，CV值在3.5%～8.7%之间(表3)。

表3 WST－1组内重复性实验的OD值测定结果

组	1	2	3	4
n	4	4	4	4
$\bar{x}\pm s$	0.941±0.082	1.602±0.057	0.608±0.032	0.826±0.058
CV(%)	8.7	3.5	5.2	7.0

2.4 WST－1法与MTT法敏感的比较 在相同条件下，WST－1法所测得的OD值明显高于MTT法测得的OD值(图3)，说明WST－1法比MTT法敏感($P<0.05$)

2.5 WST－1法与MTT法用于抗癌药物筛选的比较 抗癌药物与肿瘤细胞作用两天后，分别经WST－1 法及MTT法比色，根据OD值算出细胞存活率(%)配对t检验发现两种方法具有良好的一

表4 1倍血峰浓度药物与细胞作用后细胞存活率(%)的结果

	MTT法	WST－1法	d值
ADM	5.1(敏感)	4.3(敏感)	－0.8
MMC	85.5(耐药)	76.7(耐药)	－8.8
VCR	50.6(耐药)	74.1(耐药)	23.5
5－FU	68.1(耐药)	76.7(耐药)	8.6
VP－16	77.9(耐药)	83.7(耐药)	5.8
CDDP	10.4(敏感)	3.3(敏感)	－7.1

维普资讯 http://www.cqvip.com

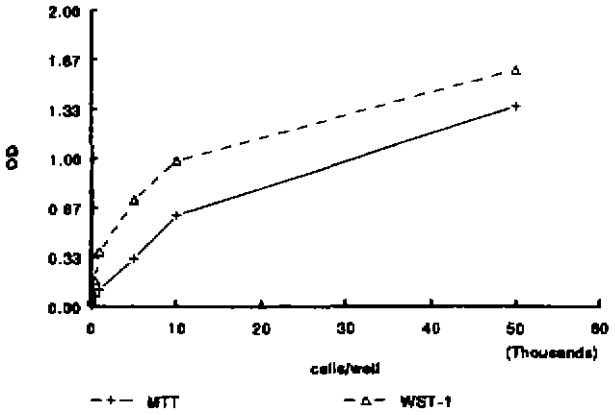


图3 WST－1法与MTT法敏感性的比较

表5 10倍血峰浓度药与细胞作用后细胞存活率(%)的结果

	MTT法	WST－1法	d值
ADM	2.8(敏感)	3.1(敏感)	0.3
MMC	39.5(中敏)	32.4(中敏)	－7.1
VCR※	40.9(中敏)	60.4(耐药)	19.5
5－FU	37.8(中敏)	34.5(中敏)	－3.3
VP－16	3.2(敏感)	6.9(敏感)	3.7
CDDP	7.8(敏感)	6.3(敏感)	－1.5

※VCR结果有差别($P<0.05$)

致性，$P>0.5$(表4，5)

3 讨论

迄今为止，国内外已经发展起了多种体外的抗癌药物筛选试验。Salmon首先建立了肿瘤细胞的双层琼脂原代培养法[7]，为肿瘤体外抗癌药物筛选奠定了基础；其后，Friedman将同位素掺入法用于肿瘤药敏试验。这两种方法技术设备要求较高，且后者具有放射性污染，不宜在一般实验室推广。Mosmann首先将MTT法用于细胞生长的检测[8]，随后国内外学者将该法用于体外抗癌药物筛选。与Salmon法及同位素掺入法比较，该法具有简便易推广的特点。但是，MTT由活细胞线粒体脱氢酶转化生成的紫色结晶为非水溶性，需加入DMSO溶解后方能比色，故略显繁琐；另外在加入DMSO前需吸尽培养液，在此操作中，有可能吸掉部分紫色结晶产物，对实验结果造成干扰。因此，国外已开发出新型的四唑盐如XTT和WST－1，这些新的四唑盐经活细胞线粒体脱氢酶转化产生的有色物质为水溶性的，不需加入有机溶剂即可比色，简化了实验步骤，并且保证了实验的准确性，因此日益受到重视。

在本研究中，我们探讨了WST－1法用于抗癌药物筛选的可能性及其最佳的工作条件。在最适细胞接种数的选择实验中，我们发现0.5×10^4～1×10^4/孔较为适宜，在此条件下OD值处于比色分析的理想读数范围，细胞数过低或过高曲线斜率均不佳，从而影响结果的准确性。在WST－1法与MTT法敏感性的比较中，为使结果准确，必须保证二者实验条件完全一致。我们在实验中采用同一块96孔培养板，ABCD行正向为WST－1试剂对照组及实验组；EFGH行反向为MTT试剂对照组及实验组。最后分别用450nm及600nm对两个实验组进行比色。在WST－1法及MTT法用于抗癌药物筛选的实验中，我们也采用同样的方法，1倍血峰浓度药物与细胞作用在一块培养板上进行，10倍血峰浓度药物与细胞作用在另一块培养板上进行，仍然采用正向和反向进行WST－1及MTT比色。这样，在条件一致的情况下，两种方法比色的结果才有可比性。1倍血峰浓度药物与细胞作用时，两种方法结论符合率为100%；10倍血峰浓度药物与细胞作用时，两种方法结论符合率为83.3%。两者总的符合率为91.5%。通过配对t检验，两种方法所得存活率无显著性差异($P>0.5$)，进一步说明两种显色法具有良好的一致性。在体外肿瘤药敏试验中，多数学者认为1倍血峰浓度药物与细胞作用后的检测结果更符合临床[9,10]。本实验结果显示①.WST－1显色法在96孔培养板的最适细胞接种数为0.5×10^4～1×10^4/孔。②.WST－1显色法的最佳波长为450nm.③WST－1显色法重复性良好。④.WST－1法比MTT法敏感。⑤.WST－1法比MTT法简便。⑥.WST－1法

维普资讯 http://www.cqvip.com

用于抗癌药物筛选结果与MTT法具有良好的符合性。

综上所述，本研究证明WST－1法具有快速、简便的特点。它克服了MTT法的缺点，也比MTT法敏感，是体外瘤株筛选抗癌新药和临床肿瘤药敏试验的可靠方法。

(感谢本室汤为学副教授提供抗癌药物及指导部分实验)

参 考 文 献

1.Salmon SE. et al. New Engl J Med 1978;298:1321
2.许德凤.等.肿瘤 1988;5:252
3.汤为学.等.重庆医科大学学报 1992;17(2):103
4.王瑞雪.等.重庆医科大学学报 1991;16(4):330
5.张丽萍.等.实用肿瘤杂志 1997;12(2):81
6.Sondak VK. et al. Cancer 1985;55:1367
7.Salmon SE. et al.Science 1977;197:461
8.Mosmann T. et al. J Immunol Meth 1983;65:55
9.Kaspers GJL. et al. Br J Cancer 1991;64:469
10.Kohnoe S. et al.Eur J Surg Oncol 1991;17:47

(收稿日期 1997－12－18)

Experimental study on WST－1 assay used for anticancer drug screenning

Lan ke, et al
Department of Pathophysiology, The College of Basic Medicine

WST－1 is a new kind of tetrazolium salts. It yields water－soluble cleavage products which can be measured without an additional solubilization step. In the present study, the procedure for the study of anticancer drug screenning on gastric cancer cell line SGC－7901 using WST－1(tetrazolium dye)assay has been observed in vitro. Our study showed that:(1).The optimal target cell concentration was 0.5×10^4～1×10^4/well for SGC－7901.(2).The optimal wavelength for measuring the absorbance of the formazan product was 450nm(max.absorption at this wavelength).(3).WST－1 assay was more sensitive than MTT assay.(4)The CV of WST－1 assay was about 3.5％～8.7％.(5).WST－1 assay was more convenient than MTT assay.(6).The results of the two methods were comparable or having no significant difference between these two methods. It can be said that WST－1 assay is a simple, rapid and reliable method for screenning anticancer drugs using cell line in vitro and for anticancer drug sensitivity test of human solid tumor.

KEY WORDS WST—1 assay; MTT assay; Anticancer drug screenning; SGC－7901 cell line