维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1991年第16卷第4期

MTT法用于抗癌药物筛选的实验研究△

病理生理教研室 王瑞雪 骆云鹏 韦 克 汤为学

提 要 本文就MTT法在抗癌药物筛选试验中的应用方面进行了初步探讨，结果显示该方法简便、快速。细胞浓度以1—5×10⁴个/孔较为适宜，吸光度30min内不变。DMSO为MTT法的想理溶剂，但需除去蛋白质的影响。MTT以5mg/ml与细胞反应4h为佳、批内CV值为10%左右。四种抗癌药物对瘤株细胞SW-480作用后，其敏感程度各异

关键词 MTT法；抗癌药敏试验；SW-480细胞株
中图分类号 R979.1

近年来，随着恶性肿瘤发病率的不断上升，各国都在研究和开发抗癌新药。鉴于抗癌药品种繁多，筛选工作量大，寻找简便、快速、具有实用价值的抗癌药物筛选方法实为当前肿瘤化疗研究的重要内容之一。目前国内外常用方法有Salmon法[1]、同位素掺入法[2]及MTT法等。由于前两法需要一定的特殊条件和设备，在一般实验室中不易建立，本文介绍一种采用微孔板培养肿瘤细胞，其中活细胞对可溶性MTT (3-4, 5Dimethylthiazol-2, 5diphenyl tetrazolium bromide) 可产生一种不溶性紫色结晶产物——甲臜，其量与细胞数成正比，将其溶解在有机溶剂中，于一定波长范围内，通过比色分析可反映存活细胞数变化。本文就MTT显色法用于抗癌药物筛选试验的可行性及该法的优选实验条件进行了探讨，并结合我们的经验加以介绍。

材料和方法

1. 材料

（1） 肿瘤细胞株 选用人结肠癌细胞株SW-480（来自美国纪念斯隆—凯特林癌症中心），常规培养于完全培养液中。将对数生长期细胞，经胰酶消化，RPMI1640洗涤后，用完全培养液制成单细胞悬液，备用。

（2） 培养液 ①不完全培养液：为RPMI 1640（GIBCO或日水制药公司）培养液；②完全培养液RPMI1640培养液内含10%新生牛血清。

（3） 试剂 MTT(Sigma或Fluka)：溶解于PBS中，浓度分别为1.25、2.5、5和10mg/ml，抽滤除菌；二甲亚砜(DMSO，北京医药公司)；异丙醇（重庆东风试剂厂）；抗癌药物：长春碱(VLB，上海第十一制药厂)；丝裂霉素C(MMC，日本协和发酵工业株式会社)；顺铂(CDDP，云南个旧市生物化学制药厂)；5-氟尿嘧啶(5Fu，天津市人民制药厂）按需要配制成系列不同浓度，供用。

（4） 96孔无菌培养板(Corning，美国)。

2. 实验步骤

（1） 显色法：取上述备用SW-480单细胞悬液，经0.4%台盼兰进行活细胞计数，按200μl/孔接种到96孔培养板，置二氧化碳培养箱（7% CO_2）中，于37℃及一定湿度下培养一定时间；500×g离心10min，弃上清，每孔加入不完全培养液和20μlMTT液。继续培养2-6h，离心，弃上清，每孔加入DMSO或酸性异丙醇200μl，在振荡器上

△：卫生部资助课题。

维普资讯 http://www.cqvip.com

振摇5min，在自动酶标读数仪（Bio-Rad E2550型）上进行比色，波长600nm。

（2） 各种抗癌药物对SW-480细胞的细胞毒试验：其方法是在96孔板中按上述方法接种一定量的瘤细胞悬液，分别加入不同浓度的药物后培养72h；培养结束前4h按前述显色步骤显色及比色，计算瘤细胞存活率。

$$\text{肿瘤细胞存活率}=\frac{\text{OD测定}}{\text{OD对照}}\times 100\%$$

结 果

1. 细胞浓度及培养时间的选择 MTT法显色深浅随板孔中细胞数目增加而逐渐加深，OD值亦随之升高(图1)。细胞经不同时间培养后，结果表明：12h后细胞呈明显增殖过程。本工作中确定以24h生长期细胞和1—5×10⁴/孔细胞数为研究条件。

2. 培养液中血清蛋白质对结果的影响 直接在完全培养液中加MTT液，及换为不完全培养液加MTT液，其光密度值可相差近倍，显示血清成份会影响MTT显色结果。

3. MTT浓度的选择和MTT与细胞反应时间的确定 采用4种不同浓度MTT，并经不同反应时间后，比色结果显示，以5mg/ml的MTT浓度及4h反应时间较为适宜(图2)。

4. 不同溶剂对MTT显色反应的影响 本实验采用DMSO和酸性异丙醇二种溶剂进行显色效果的对比性研究，结果表明DMSO对甲臜产物溶解效果较好，其OD值明显高于酸性异丙醇(图1)。

5. 吸收光谱的确定及显色稳定性的观察 选用国产酶标分光光度计（四川分析仪器厂）进行吸收光谱测定，结果如图3所示：以DMSO作为溶剂时，最大吸收峰分别为540nm和574nm；用酸性异丙醇作为溶剂时，其最大吸收峰为570nm；且前者峰值明显高于后者。鉴于自动酶标仪仅有600nm滤光片，我们取1×10⁴—1×10⁵个/孔间的五种细胞浓度，经MTT显色后，其结果与国产酶标仪（波长540nm和600nm）的测得值进行直线回归分析，其相关系数r值分别为−0.9959、−0.9914及−0.9963，斜率a为1.4867、1.8203及1.4979，证明线性良好，斜率接近。

显色后不同时间的比色测定结果显示，加入溶剂30min内，OD值基本稳定不变。此后，光密度值则渐呈下降趋势。

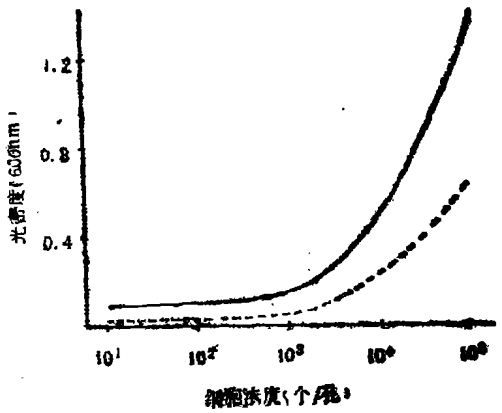


图1. 不同细胞浓度反应曲线
——DMSO 溶液
……酸性异丙醇溶液

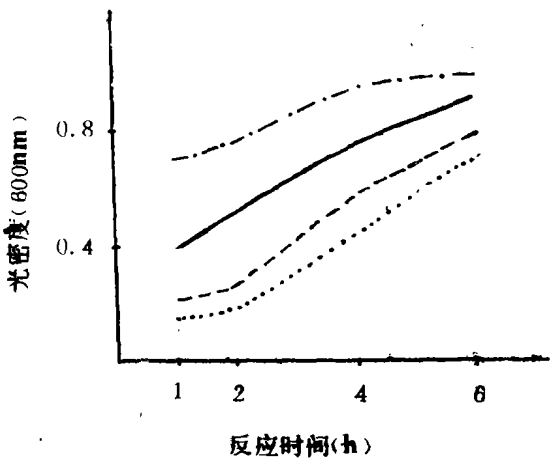


图2. MTT与细胞反应时间曲线
MTT浓度——5mg/ml-·-·-10mg/ml
——2.5mg/ml……1.25mg/ml

维普资讯 http://www.cqvip.com

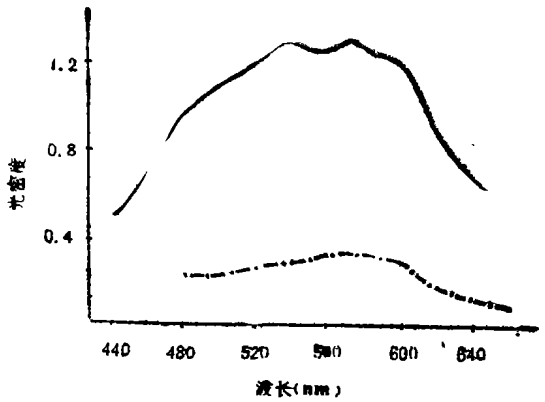


图3. MTT显色法的吸收光谱曲线
——DMSO溶液
·-·-·酸性异丙醇溶液

6. 重复性试验 相同条件下，五组样品测定结果重复性良好，CV 值在10%左右（表1）。

7. 不同抗癌药物对SW-480结肠癌细胞的细胞毒作用 结果显示经 72h 作用后，细胞对各种药物的敏感程度有明显差异（图4a、b、c、d），其ID_{50}分别如图4a、b、c、d虚线所示。

讨 论

1983年 Mosmann[3]首先将 MTT法用于细胞生长的检测后，目前该法已广泛用于

表 1 五组样品的重复性

组	1	2	3	4	5
n	8	8	8	8	8
$\bar{X}\pm SD$	0.896±0.099	0.831±0.094	0.632±0.062	0.658±0.071	0.634±0.062
CV(%)	11.08	11.27	9.93	10.78	9.78

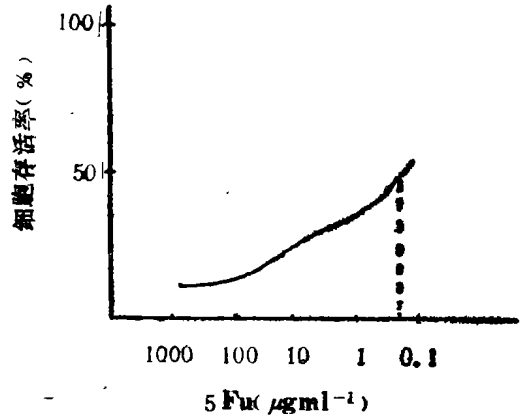


图4(a) 5Fu 药物剂量反应曲线

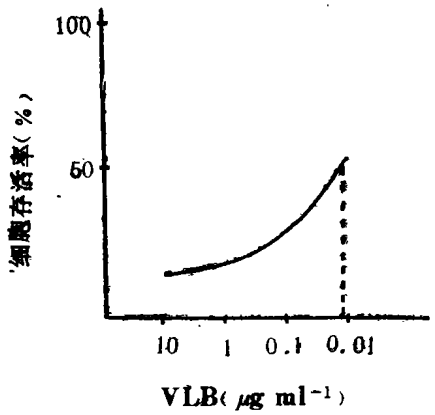


图4(c) VLB药物剂量反应曲线

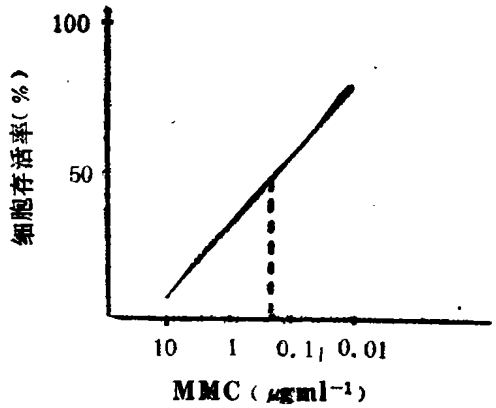


图4(b) MMC药物剂量反应曲线

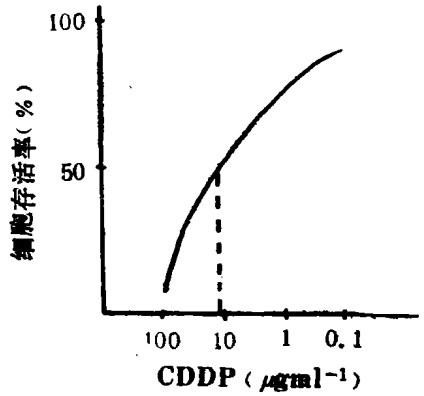


图4(d) CDDP药物剂量反应曲线

维普资讯 http://www.cqvip.com

淋巴细胞转化[6]、IL-2[4,5]等多种淋巴因子的测定、以及体外抗癌药敏试验等。1985年Heeg[4]和1987年Carmichael[7]分别就MTT法与同位素掺入法、Salmon氏法进行了比较，认为MTT显色法具有快速、简便，其敏感度与同位素掺入法相同，因此受到人们的重视。

MTT的产物甲臜是由细胞内线粒体脱氢酶将MTT转化为紫色结晶，其与活细胞的数量有关，而红细胞和死细胞无此作用。甲臜的生成量不仅取决于细胞浓度，而且与MTT浓度以及MTT同细胞反应时间有关。我们还发现，较为适宜的细胞浓度为1—5×10^4/孔，在此条件下OD值正处于比色分析的理想读数范围，细胞浓度过高或过低均影响结果的准确性。MTT浓度为5mg/ml，反应时间2—4h可获得较满意的OD值和良好的反应线性曲线。此外，显色后宜在30min内完成比色，此时的稳定性较佳。

MTT显色法中，在加入溶剂后，其结果受培养液中某些成份的影响。我们发现在低血清浓度时OD值有所下降，而在高血清浓度时则会因蛋白质沉淀使OD值相对增加，消除这一影响可通过在加入MTT前改换完全培养液为不完全培养液。至于培养液中碱性环境里酚红指示剂颜色的影响，可靠调整溶液的pH值来解决。

研究结果还证明，DMSO在溶解甲臜与显色结果方面均较酸性异丙醇为优，因此作者认为DMSO是MTT法中宜采用的较为理想的有机溶剂。用DMSO溶解甲臜时，其吸收曲线在503nm处有一最大吸收峰[7]。由于残留培养液的存在，培养液中一定浓度的某些离子(HCO^-_3)会改变吸收光谱，从而在我们的研究中发现有两个吸收峰，分别为540nm和574nm，540nm处的峰顶较高而平坦，故选用540nm作为测定波长较适宜。鉴于本研究采用的自动酶标读数仪只有600nm的滤光片，其光密度读数较国产酶标分光光度计540nm处读数略低，但线性良好，斜率接近，可以替用。

综上所述，本试验工作证明MTT法具有快速、简便，在一般实验室易于推广等诸多优点，可作为体外瘤株细胞筛选抗癌新药和临床抗肿瘤药敏试验的可靠方法。

本文范维珂教授审阅并提供SW-480细胞及病生教研室各位同仁在工作中大力支持，一并致谢。

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] Mosmann T, et al. J Immunol Meth 1983; 65:55

[4] Heeg K, et al. J Immunol Meth 1985; 77:237

[5] 薛彬，等. 北京医科大学学报 1987; 2:125

[6] 薛彬，等. 中国卫生毒理学杂志 1988; 1:61

[7] Carmichael J, et al. Cancer Res 1987; 47:936

(收稿日期1991—05—15)

EXPERIMENTAL STUDY ON MTT ASSAY USED FOR AONTICANCER DRUG SCREENNING

Wang Ruixie et al
Department of pathophysiology

In this paper the procedure for the study of anticancer drug screenning on colon cancer cell line SW-480 using MTT (tetrazolium dye) assay has been observed in