

细胞浓度和作用时间对细胞毒性检查法影响的探讨

李丽^{*},周建平,胡宇驰
(北京市药品检验所,北京 100035)

[摘要] 目的:摸索浸提液法中能灵敏反映细胞毒性的最适宜培养时间;探讨细胞接种浓度对判断细胞毒性结果灵敏度的影响。方法:采用 MTT 法测定 7 批不同受试样品浸提液与 L-929 细胞(细胞接种浓度分别为 1×10^4 个/mL 和 1×10^5 个/mL)作用(1~7)d 细胞毒性分级,从中寻找最适宜的培养天数。结果:在样品浸提液与 1×10^4 个/mL L-929 细胞相互作用(1~7)d 中,随着作用时间的延长,细胞毒性作用越来越显著,从 d3 起,细胞毒性分级已经稳定;在样品浸提液与 1×10^5 个/mL L-929 细胞相互作用的(1~7)d 中,随着作用时间的延长,细胞毒性作用越来越显著,从 d2 起,细胞毒性分级已经稳定,从 d5 起细胞的吸光度值出现下降。结论:细胞毒性作用具有时效性。在细胞接种浓度 1×10^4 个/mL 条件下,能灵敏反映细胞毒性的最短的培养时间为 72 h。在细胞接种浓度 1×10^5 个/mL 条件下,能灵敏反映细胞毒性的最短的培养时间为 48 h。增大细胞接种浓度能缩短细胞毒性出现的时间,增大判断细胞毒性敏感度。

[关键词] 细胞毒性; MTT 法; 影响因素

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)14-0101-04

Study on Effect of Cell Concentration and Action Time to Cytotoxicity Tests

LI Li^{*}, ZHOU Jian-ping, HU Yu-chi
(Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the most appropriate time reflecting cytotoxicity sensitively, to study the effect of cell inoculating concentration determining the sensitivity of cytotoxic results. **Method:** Seven test extracts interacted with L-929 cells (the inoculating concentration was $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$) from 1 to 7 days in MTT method to determining the most appropriate day which reflected the cytotoxicity sensitively. **Result:** The extension of cytotoxicity increased with the extracts interacting with $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ cells from 1 to 7 days. It was 3 rd day that the cytotoxicity classification became stabilized. The extension of cytotoxicity increased with the extracts interacting with $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ cells from 1 to 7 days. It was 2nd day that the cytotoxicity became stabilized, and from the 5th day the absorbance value of cells decreased. **Conclusion:** The effect of cytotoxicity has relationship with time. In $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ inoculating concentration condition, the shortest appropriate time reflecting cytotoxicity was 72 h. In $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ inoculating concentration condition, the shortest incubation time reflecting cytotoxicity was 48 h. Increased cell inoculating concentration could shorten the time of cytotoxicity, increase the sensitivity of cytotoxicity.

[Key words] cytotoxicity; MTT method; influencing factors

[收稿日期] 20110725(004)

[通讯作者] ^{*}李丽,硕士学位,主管药师,从事药物临床前安全性评价研究, Tel:010-83288837, E-mail:lili800214@163.com

[4] 田硕. HPLC 测定莲芝消炎胶囊中穿心莲内酯的含量[J]. 中国中药杂志, 2008,33(15):1914.

[5] 刘菊,张红伟,张耀军. 不同厂家不同批次消炎利胆片中脱水穿心莲内酯含量分析[J]. 中华中医药学刊, 2011,29(2):402.

[6] 任睿,张园园. 反相高效液相色谱法测定喉舒宁片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量[J]. 中南药学, 2011,9(4):271.

[责任编辑 顾雪竹]

细胞毒性检查法是医疗器械产品注册必须进行的安全性评价之一,也是很多药物或化学品进行毒性及疗效筛选的常用手段,在动物实验科学研究领域中,由于减少、优化、替代原则的倡导也越来越倾向于利用细胞实验来进行初步的研究从而达到目的。目前国内外的有关细胞毒性检查的标准均未作出明确而详细的规定,这就使得不同的实验室和不同的实验人员由于对标准的理解不同而导致的检验方法差异,使得不同实验室间的检查数据缺乏可比性。

影响细胞毒性实验结果的因素很多,如不同的检查方法、细胞接种浓度、受试物的制备、细胞与受试物相互作用时间、评价结果的指标等等。本研究通过对目前科研领域和常规检测中最常用的 MTT 法其影响因素进行探讨,可以提高医疗器械、药包材以及新药研发的细胞试验水平,能够为以后医疗器械、药包材等生物学评价标准的修改和提高提供依据。

1 材料

1.1 试剂 L-929 细胞(购自中国科学院细胞库), MEM 细胞培养基(Invitrogen 公司,批号 1333049), 标准胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,批号 TC070131HB-0128), MTT (A Johnson Matthey Company,批号 10112525), 二甲基亚砷(北京现代东方精细化学品有限公司,批号 20070518)。

1.2 仪器 PB602-N 型天平(瑞士梅特勒-托利多集团), HRSP-H 系列生化培养箱(青岛海尔特种电冰柜有限公司), Spectra Max 190 型酶标仪(Molecular Devices), 5410 型二氧化碳培养箱(Precision Scientific)。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 操作方法 采用 MTT 法测定 7 批不同受试样品浸提液与 L-929 细胞作用 1~7 d 的细胞毒性分级,从中寻找最适宜的培养天数。试验共分为空白对照组细胞培养液、阴性对照组聚乙烯、阳性对照组 5% DMSO,7 个样品组样品浸提液。

选用传代后 48~72 h 生长旺盛且达到近汇合状态的 L-929 细胞,胰酶消化用细胞培养液配制成 1×10^4 个/mL 和 1×10^5 个/mL, 96 孔板中每孔加入 100 μ L 细胞培养液,37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 24 h 后弃培养液加入等量的浸提液,在加样后的 1~7 d 每天取出一块培养板,每孔加入 20 μ L 5 g·L⁻¹ MTT 溶液,继续培养 4 h 后,弃浸提液,每孔加入 150 μ L

DMSO 振荡 10 min,酶标仪测定每孔在 570,630 nm 波长下的吸光度^[1]。计算相对增殖度(RGR)。

$$RGR = A/A_0 \times 100\%$$

RGR,相对增殖度;A,供试品组吸光度;A₀,空白对照组吸光度。

2.1.2 样品处理 样品浸提液按照 GB/T16886.12-2005 中规定的浸提比例进行,浸提液为细胞培养液,浸提条件为 37 $^{\circ}$ C,24 h。见表 1。

表 1 样品浸提比例标准^[2]

厚度/mm	浸提比例 (表面积或质量/体积) $\pm 10\%$
<0.5	6 cm ² ·mL ⁻¹
0.5~1.0	3 cm ² ·mL ⁻¹
>1.0	1.25 cm ² ·mL ⁻¹
不规则形状固体器械	0.2 g·mL ⁻¹
不规则形状多孔器械 (低密度材料)	0.1 g·mL ⁻¹

2.1.3 细胞毒性判定标准 试验成立条件为阴性对照细胞毒性为 0 级,阳性对照细胞毒性至少为 3 级。在试验成立的前提下判定样品细胞毒性分级,将不同作用时间的细胞毒性分级及相对增殖度进行比较,分析最适宜的培养时间。见表 2。

表 2 细胞毒性反应分级标准^[3]

级别	相对增殖率/%
0	≥ 100
1	80~99
2	50~79
3	30~49
4	0~29

2.1.4 统计分析 采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析。

2.2 结果

2.2.1 样品浸提液的制备 阴性对照材料和 7 批样品的浸提液制备按照 GB/T16886.12-2005 中规定的浸提比例进行,浸提液为细胞培养液,浸提条件为 37 $^{\circ}$ C,24 h,具体内容见表 3。

2.2.2 1×10^4 个/mL 细胞接种浓度的结果 由表 4 可见,空白对照组、阴性对照组、样品 3~7 对 L-929 细胞的生长没有明显的抑制作用,其 1~7 d 的吸光度随着作用时间的延长逐渐增大;阳性对照组和样品 1、样品 2 对 L-929 细胞生长具有明显的抑制,其 A 值明显低于空白对照组,具有统计学差异($P < 0.05$)。

通过对所有组别的相对增殖率(RGR)进行我

表 3 样品浸提液制备信息

组别	名称	批号	取样量	浸提比例
阴性	聚乙烯树脂	WB061201R5	1.20 g	0.2 g·mL ⁻¹
样品 1	袜型医疗压力带	51280220202513	60 cm ²	6 cm ² ·mL ⁻¹
样品 2	医用镀银敷料	070425-39	30 cm ²	3 cm ² ·mL ⁻¹
样品 3	通用修复材料	30802001458	1.96 g	0.2 g·mL ⁻¹
样品 4	聚乙烯树脂	WE081201R1	2.00 g	0.2 g·mL ⁻¹
样品 5	Rubber Stopper	AMG20080725	2.02 g	0.2 g·mL ⁻¹
样品 6	陶瓷牙科托槽	—	2.06 g	0.2 g·mL ⁻¹
样品 7	活检钳头	080820	2.08 g	0.2 g·mL ⁻¹

表 4 1×10⁴ 个/mL 细胞接种浓度 1~7 d 的 A 值($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	A 值						
	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
空白	0.261±0.012	0.373±0.009	0.703±0.010	1.016±0.092	1.554±0.051	1.916±0.106	2.050±0.004
阴性	0.252±0.021	0.362±0.011	0.608±0.095 2	0.970±0.053	1.528±0.039	1.836±0.105	1.939±0.005
阳性	0.167±0.013 ¹⁾	0.170±0.006 ¹⁾	0.163±0.024 ¹⁾	0.191±0.011 ¹⁾	0.206±0.018 ¹⁾	0.109±0.019 ¹⁾	0.118±0.024 ¹⁾
样品 1	0.183±0.014 ¹⁾	0.151±0.011 ¹⁾	0.199±0.024 ¹⁾	0.157±0.015 ¹⁾	0.217±0.028 ¹⁾	0.075±0.008 ¹⁾	0.125±0.009 ¹⁾
样品 2	0.166±0.010 ¹⁾	0.170±0.008 ¹⁾	0.163±0.022 ¹⁾	0.177±0.015 ¹⁾	0.216±0.031 ¹⁾	0.120±0.007 ¹⁾	0.144±0.027 ¹⁾
样品 3	0.268±0.013	0.376±0.006	0.698±0.025	0.938±0.096	1.444±0.107	1.652±0.099	1.926±0.201
样品 4	0.258±0.013	0.353±0.015	0.652±0.037	0.953±0.048	0.846±0.083	1.739±0.107	1.912±0.203
样品 5	0.252±0.011	0.322±0.026	0.587±0.037	0.934±0.058	1.343±0.058	1.666±0.206	0.830±0.107
样品 6	0.267±0.015	0.397±0.012	0.650±0.036	0.983±0.043	1.579±0.085	1.840±0.102	2.048±0.301
样品 7	0.262±0.023	0.354±0.006	0.582±0.050	0.950±0.034	1.454±0.105	1.658±0.266	1.829±0.205

注:与空白对照组比较¹⁾ $P<0.05$ 。

们发现,对 L-929 细胞没有明显抑制作用的阴性对照组、样品 3 至样品 7 的 RGR 在 1~7 d 中维持在 100% 上下,而具有明显抑制作用的阳性对照组、样品 1 和样品 2 随着作用时间的延长其 RGR 逐渐降低。根据 RGR 进行细胞毒性分级后,阴性对照组细胞毒性为 1 级,阳性对照组在 d1 细胞毒性为 2 级, d2 的细胞毒性为 3 级,从 d3 起细胞毒性为 4 级,按照试验成立判断标准从 d2 起试验已经成立。在 2~7 d 中,样品 3 至样品 7 的细胞毒性分级为 0 级或 1 级,无细胞毒性。阳性对照、样品 1、样品 2 在 d1 的细胞毒性为 2 级,d3 的细胞毒性为 3 级,从 d3 起细胞毒性维持在 4 级。说明能灵敏反应细胞毒性最短的培养时间为 72 h。见图 1,2。

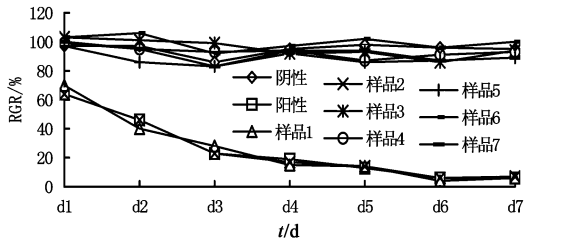


图 1 L-929 细胞 1×10⁴ 个/mL 接种浓度 1~7 d 相对增殖率 (RGR)

2.2.3 1×10⁵ 个/mL 细胞接种浓度的结果 由表 5 可见,空白对照组、阴性对照组、样品 3~7 的 A 值随

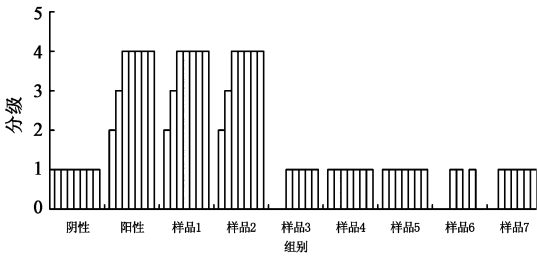


图 2 L-929 细胞 1×10⁴ 个/mL 接种浓度 1~7 d 细胞毒性分级

着作用时间的延长而增加,但从 d5 起 A 值反而降低,原因可能是细胞接种浓度增大至 1×10⁵ 个/mL,生长至 d5 细胞密度过大,没有继续生长的空间,细胞出现死亡,所以 5~7 d 数据的可信性降低,该部分结果只采用 1~4 d 的数据。

分析 1~4 d 的数据发现,空白对照组、阴性对照组、样品 3~7 的 A 值随着作用时间的延长逐渐增大,对 L-929 细胞生长无明显抑制作用;阳性对照组、样品 1 和样品 2 对 L-929 细胞生长具有明显抑制作用,具有统计学差异 ($P<0.05$)。

通过对 RGR 进行比较发现,对 L-929 细胞没有明显抑制作用的阴性对照组、样品 3~7 的 RGR 在 1~4 d 中维持在 100% 上下,而具有明显抑制作用的阳性对照组、样品 1 和样品 2 随着作用时间的延长其 RGR 逐渐降低。根据 RGR 值进行细胞毒性分级后,

表 5 1×10^5 个/mL 细胞接种浓度(1~7) d 的 A 值($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	A 值						
	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
空白	1.114 ± 0.101	1.403 ± 0.080	2.340 ± 0.196	2.423 ± 0.200	2.111 ± 0.107	1.639 ± 0.101	1.628 ± 0.049
阴性	0.967 ± 0.041	1.213 ± 0.070	2.266 ± 0.103	2.317 ± 0.195	2.021 ± 0.172	1.597 ± 0.102	1.499 ± 0.039
阳性	0.523 ± 0.029 ¹⁾	0.273 ± 0.065 ¹⁾	0.199 ± 0.011 ¹⁾	0.195 ± 0.009 ¹⁾	0.194 ± 0.013 ¹⁾	0.144 ± 0.007 ¹⁾	0.122 ± 0.010 ¹⁾
样品 1	0.388 ± 0.021 ¹⁾	0.154 ± 0.017 ¹⁾	0.177 ± 0.018 ¹⁾	0.109 ± 0.008 ¹⁾	0.148 ± 0.016 ¹⁾	0.062 ± 0.013 ¹⁾	0.075 ± 0.004 ¹⁾
样品 2	0.427 ± 0.020 ¹⁾	0.144 ± 0.049 ¹⁾	0.172 ± 0.020 ¹⁾	0.168 ± 0.023 ¹⁾	0.174 ± 0.013 ¹⁾	0.141 ± 0.015 ¹⁾	0.126 ± 0.016 ¹⁾
样品 3	1.277 ± 0.101	1.298 ± 0.055	2.125 ± 0.171	2.338 ± 0.195	2.101 ± 0.164	1.840 ± 0.103	1.669 ± 0.042
样品 4	1.086 ± 0.101	1.261 ± 0.093	2.190 ± 0.098	2.318 ± 0.155	2.056 ± 0.104	1.973 ± 0.098	1.833 ± 0.084
样品 5	0.990 ± 0.100	1.236 ± 0.165	2.152 ± 0.127	2.360 ± 0.103	2.109 ± 0.176	1.611 ± 0.102	1.626 ± 0.042
样品 6	1.204 ± 0.101	1.374 ± 0.175	2.191 ± 0.200	2.331 ± 0.106	2.079 ± 0.175	1.603 ± 0.104	1.561 ± 0.056
样品 7	1.063 ± 0.089	1.285 ± 0.080	2.262 ± 0.169	2.246 ± 0.098	2.030 ± 0.099	1.402 ± 0.101	1.363 ± 0.058

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

阴性对照组细胞毒性为 1 级,阳性对照组在 d1 细胞毒性为 3 级,从 d2 起细胞毒性为 4 级,按照试验成立判断标准从 d1 起试验已经成立。在 1~4 d 中,样品 3~7 的细胞毒性分级为 0 级或 1 级,无细胞毒性。阳性对照、样品 1、样品 2 在 d1 的细胞毒性为 3 级,从 d2 起细胞毒性为 4 级。说明能灵敏反应细胞毒性最短的培养时间为 48 h。见图 3,4。

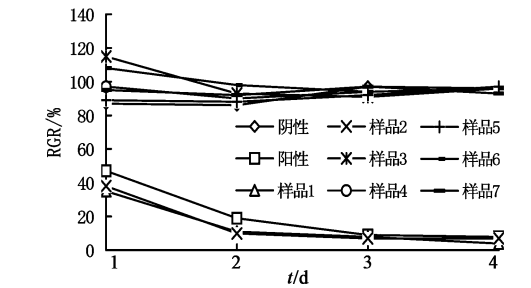


图 3 L-929 细胞 1×10^5 个/mL 接种浓度 1~4 d 相对增值率

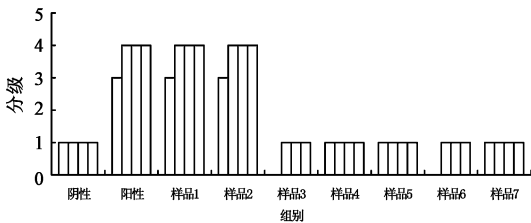


图 4 L-929 细胞 1×10^5 个/mL 接种浓度 1~4 d 细胞毒性分级

3 讨论

《美国药典》中细胞毒性检查法是对细胞形态及细胞死亡情况进行显微镜下肉眼观察和计数^[4],此方法虽然是最传统的方法,但是受人为主观因素的影响较大,缺乏更客观的量化数据。

目前医疗器械注册产品标准引用最多的是 GB/T16886. 5-2003,该标准中最常用到的方法是浸提液法^[5]。但该标准对实验方法的规定只是原则性的,对实际检验过程中的具体操作则过于笼统。

1×10^4 个/mL 细胞接种浓度的结果表明能灵敏反应细胞毒性最短的培养时间为 72 h,这与 GB/

T14233. 2-2005 中 MTT 法细胞毒性检查中规定的作用时间一致^[3],该结果还表明作用时间在 3~7 d 所表现出的细胞毒性结果基本一致,这有利于在实际试验过程中能够根据具体情况合理安排时间。

1×10^5 个/mL 细胞接种浓度的结果表明能灵敏反应细胞毒性最短的培养时间为 48 h,该结果较 1×10^4 个/mL 细胞接种浓度能灵敏反应细胞毒性最短的培养时间 72 h 提前 24 h 出现了细胞毒性反应。说明增大细胞接种浓度至 1×10^5 个/mL 能缩短细胞毒性出现的时间,增大判断细胞毒性敏感度。但该接种浓度从 d5 起 A 值反而降低,原因可能是细胞接种浓度增大至 1×10^5 个/mL,生长至 d5 细胞密度过大,没有继续生长的空间,细胞出现死亡,说明细胞接种浓度不能过大,如果在判断细胞毒性结果之前细胞密度过大反而抑制细胞的生长导致结果判断的灵敏度下降。

总之,由本次研究结果表明, 1×10^4 个/mL 细胞接种浓度的结果表明能灵敏反应细胞毒性最短的培养时间为 72 h, 1×10^5 个/mL 细胞接种浓度的结果表明能灵敏反应细胞毒性最短的培养时间为 48 h,增大细胞接种浓度至 1×10^5 个/mL 能缩短细胞毒性出现的时间,增大判断细胞毒性敏感度。

[参考文献]

[1] 葛迎春,马天舒,刘平,等. 四逆汤类方提取物对离体小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(2):28.

[2] 中华人民共和国国家标准 GB/T 16886. 12-2005[S]. 北京:中国标准出版社,2005:5.

[3] 中华人民共和国国家标准 GB/T 16886. 5-2003[S]. 北京:中国标准出版社,2003:80.

[4] 中华人民共和国国家标准 GB/T 14233. 2-2005[S]. 北京:中国标准出版社,2005:8.

[5] 《美国药典》[S]. USP31:88.

[责任编辑 顾雪竹]