

细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其应用

洪庆涛, 宋岳涛*, 唐一鹏, 刘春梅

(北京中医药大学基础医学院形态系, 北京 100029)

摘要: 采用乳酸脱氢酶比色法测定细胞培养液乳酸脱氢酶的漏出率是一个稳定而实用的指标。本法既可客观衡量细胞的受损程度, 也可进行药物干预的正确评价, 也是进行药物筛选的一种有效方法。

关键词: LDH; 细胞培养

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)01-89-04

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是存在于细胞浆内参与糖酵解最后一步即丙酮酸和乳酸相互转化时的一种催化酶。LDH在正常人体血浆中含有少量, 均系来源于组织细胞, 但在某些疾病时所累及的细胞会额外释放入血或脑脊液, 故临床上常用血清或脑脊液LDH活性测定来诊断疾病和进行药物治疗作用的评价^[1,2]。进行离体细胞培养时, 如果培养的细胞受损(如体外模拟脑缺血再灌注损伤), LDH也会由细胞漏出至培养液中^[3,4], 因此通过细胞培养液LDH漏出率的测定可以较客观地衡量细胞的受损程度, 若加药物干预, 又可较实际地评价药物的治疗作用。我室长期从事中药对缺血性脑病治疗作用的实验研究, 积累了不少相关经验, 现整理成文愿与同道交流。

1 常规的细胞培养液LDH漏出率的比色测定

常规的细胞培养液LDH漏出率的比色测定通常要先进行细胞培养液LDH活性和细胞匀浆液LDH活性的测定, 然后通过计算求出细胞培养液LDH的漏出率。

1.1 细胞培养液LDH活性的比色测定

1.1.1 原理 乳酸与氧化型辅酶I(NAD)在LDH催化作用下生成丙酮酸和还原型辅酶I(NADH), 丙酮酸再和2,4-二硝基苯肼反应生成2,4-二硝基苯腙, 后者在碱性溶液中呈棕红色, 从而通过比色法测定丙酮酸含量推算出LDH的活力。

1.1.2 所用试剂 基质缓冲液: 一般为含0.3mol/L的乳酸锂溶液, pH 8.8。我室通常用乳酸和二乙醇胺配制, 如配200ml, 取乳酸4.328 ml、二乙

醇胺3.86 ml, 加双蒸水约160ml, 以1mol/L的NaOH溶液调节pH至8.8, 然后加双蒸水到200ml。

NAD溶液: 11.3mmol/L, 即每15mg溶于2ml双蒸水中, 4℃保存, 至少可用两周。

2,4-二硝基苯肼溶液: 1 mmol/L, 称取其重200mg, 加4mol/L盐酸250 ml, 溶解后加水至1000 ml。

NaOH溶液: 0.4mol/L。

丙酮酸钠标准液: 1μmol/ml用基质缓冲液在临用前配制。

1.1.3 操作步骤

I. 吸出待测培养孔内的培养液, 以3000rpm离心10分, 取上清液进行检测。

II. 按表一步骤加液, 见下页。

III. 充分混匀, 室温3-5'后比色, 比色波长440nm, 以空白管调零, 测定各管吸光值(OD值)。

1.1.4 计算 细胞培养液LDH的活性(为细胞培养液LDH的绝对漏出量)。

细胞培养液LDH的活性(金氏单位*) = $OD_{\text{测定管}} / OD_{\text{标准管}} \times \text{标准管浓度} \times 1000$

(*注: 每1000 ml培养液37℃与基质作用15', 在反应体系中产生1μmol丙酮酸为1个金氏单位, 计算公式来自LDH测试盒说明书。)

细胞培养液LDH的活性也可用速率法包括LDH-L法(Wahlefeld法)和LDH-P法进行测定^[5]。

表2是我们对一次体外模拟脑缺血4小时后正常组、模型组和用药组细胞培养液和细胞匀浆液LDH的比色测定结果(OD值)。表3是细胞培养液LDH

的活性及其漏出率的统计结果。

1.2 细胞匀浆液 LDH 活性测定

将待测培养孔内的培养液吸出后, 加入等量 PBS 液, 用细胞刮板刮取细胞并收集到相应编号的容器内, 在超声波破碎上将细胞破碎, 然后进行细胞匀浆液蛋白含量及 LDH 活性的测定。

1.2.1 细胞匀浆液蛋白含量的测定 以牛血清白蛋白溶液 (1mg/ml) 为标准液, 用考马斯亮兰 G-250 定蛋白试剂进行比色测定, 计算公式是:

$$\text{细胞匀浆液蛋白含量 (mg-pr/ml)} = \text{OD}_{\text{测定管}} / \text{OD}_{\text{标准管}} \times \text{标准液蛋白含量} / \text{细胞匀浆液样品量}$$

(注: 标准液蛋白含量 = 牛血清白蛋白溶液标准液的浓度 × 所取牛血清白蛋白标准液的体积)

表 4 列出了本次实验细胞匀浆液蛋白含量的测定结果 (分别取牛血清白蛋白标准液和细胞匀浆液各 100 μ l 进行测定)。

1.2.2 细胞匀浆液 LDH 活性测定 测定法与细胞

培养液 LDH 活性测定法相同, 计算公式是:

$$\text{细胞匀浆液 LDH 活性} = \text{OD}_{\text{测定管}} / \text{OD}_{\text{标准管}} \times \text{丙酮酸钠标准液浓度} / \text{细胞匀浆液蛋白含量} \times 1000$$

(注: 单位也是金氏单位, 即每克蛋白 37 $^{\circ}$ C 与基质作用 15', 在反应体系中产生 1 μ mol 丙酮酸为 1 个金氏单位, 计算公式也来自 LDH 试剂盒说明书。)

如表 2 中所列细胞匀浆液 LDH 比色测定的 OD 值, 通过公式计算得出细胞匀浆液 LDH 的活性, 结果见表 5。

1.3 细胞培养液 LDH 漏出率的测定

$$\text{细胞培养液 LDH 漏出率 (\%)} = \text{培养液 LDH 总活性} / (\text{培养液 LDH 总活性} + \text{细胞匀浆液 LDH 总活性}) \times 100$$

(注: 1) 培养液 LDH 总活性 = 培养液 LDH 的活性 × 培养液的体积;
2) 细胞匀浆液 LDH 总活性 = 细胞匀浆液 LDH 的活性 × 细胞匀浆液蛋白含量 × 细胞匀浆液的体积;
3) 计算时一定要注意单位的换算。

本次实验细胞培养液 LDH 漏出率的计算结果见表 3 中的 LDH 漏出率(1)。

表 1 细胞培养液 LDH 活性的比色测定法步骤

加入物(ml)	标准空白管	标准管	测定空白管	测定管
丙酮酸钠标准液		0.1		
上清液			0.1	0.1
基质缓冲液	0.5	0.5	0.5	0.5
双蒸水	0.2		0.1	
	37 $^{\circ}$ C 水浴 5'			
NAD 溶液		0.1		0.1
	37 $^{\circ}$ C 水浴 15'			
2,4-二硝基苯肼溶液	0.5	0.5	0.5	0.5
	37 $^{\circ}$ C 水浴 15'			
NaOH 溶液	5	5	5	5

注: 也可将上述每种溶液减半使用, 但稳定性较差。

表 2 丙酮酸钠标准液、细胞培养液和细胞匀浆液比色测定结果 (OD 值)

丙酮酸钠标准液	细胞培养液			细胞匀浆液			
	正常组	模型组	用药组	正常组	模型组	用药组	
0.163	0.017	0.016	0.017	0.09	0.061	0.07	
0.156	0.011	0.014	0.014	0.082	0.058	0.068	
0.167	0.02	0.018	0.017	0.086	0.051	0.072	
0.148	0.019	0.015	0.015	0.097	0.064	0.077	
0.171	0.014	0.013	0.013	0.083	0.059	0.084	
0.161	0.022	0.021	0.015	0.092	0.066	0.062	
均数	0.161	0.017	0.016	0.015	0.088	0.060	0.072
标准差	0.006	0.003	0.002	0.001	0.005	0.004	0.006

表 3 细胞培养液 LDH 的活性及其漏出率统计结果 (M \pm SD, n=6)

	正常组	模型组	用药组
LDH 的活性	106.625 \pm 19.669	100.414 \pm 13.803	94.203 \pm 7.591
LDH 的漏出率(1)	16.115 \pm 1.879	21.249 \pm 2.210*	17.484 \pm 1.789#
LDH 的漏出率(2)	16.116 \pm 2.066	21.249 \pm 2.576*	17.484 \pm 1.890#

注: * 代表和正常组比较 $P < 0.05$, # 代表和模型组比较 $P < 0.05$ 。

表4 细胞匀浆液蛋白含量的测定结果(mg/ml)

标准液 OD 值	细胞匀浆液 OD 值			细胞匀浆液蛋白量		
	正常组	模型组	用药组	正常组	模型组	用药组
0.377	0.189	0.125	0.163	0.531	0.351	0.458
0.315	0.154	0.098	0.148	0.433	0.275	0.416
0.356	0.183	0.138	0.139	0.514	0.388	0.390
0.349	0.168	0.117	0.176	0.472	0.329	0.494
0.373	0.21	0.121	0.154	0.590	0.340	0.433
0.363	0.172	0.106	0.142	0.483	0.298	0.399
均数	0.356	0.179	0.118	0.504	0.330	0.432
标准差	0.016	0.015	0.011	0.041	0.029	0.030

表5 细胞匀浆液 LDH 的活性测定统计结果(M±SD, n=6)

	正常组	模型组	用药组
匀浆液 LDH 的活性	1100.47±114.415	1144.896±128.461	1041.638±95.082

2 简化的细胞培养液 LDH 漏出率的比色测定

经过公式推导和精确计算(过程从略), 如果细胞培养液和细胞匀浆液 LDH 活性的测定是在同一条件下进行, 且所取样品质量也一致的话, 细胞培养液 LDH 漏出率的测定可完全省去许多中间步骤, 只需进行细胞培养液和细胞匀浆液 LDH 的比色测定, 通过 OD 值直接求出细胞培养液 LDH 的漏出率, 实验结果更准确可靠, 其计算公式为:

$$\text{细胞培养液 LDH 漏出率}(\%) = \frac{\text{培养液 OD 值}}{(\text{培养液 OD 值} + \text{细胞匀浆液 OD 值})} \times 100$$

本次实验简化的细胞培养液 LDH 漏出率的计算结果见表三中的 LDH 漏出率(2)。

这种简化的细胞培养液 LDH 漏出率的比色测定具有许多优点:

- (1) 不必进行丙酮酸钠标准液的比色测定。
- (2) 不必进行细胞匀浆液蛋白含量的测定。

(3) 操作过程简化, 既节省时间又使实验结果更准确可靠, 因为在进行细胞匀浆液蛋白含量的测定时不免会造成部分蛋白的丢失; 减少了操作过程中带来的误差。

- (4) 计算步骤减少, 减少了系统误差。
- (5) 可节约经费。

3 测定方法比较

3.1 细胞培养液 LDH 活性的测定和细胞培养液 LDH 漏出率的测定

通过大量实验, 我们认为应用 LDH 活性的比色测定法检测细胞培养液 LDH 的漏出率能客观地反映

培养细胞的损伤情况, 尤其在体外模拟缺血再灌注损伤中是一稳定而实用的指标。若只进行细胞培养液 LDH 活性的测定, 检测到的只是细胞培养液 LDH 的绝对漏出量, 这并不能客观地评价培养细胞的多少和细胞损伤程度的大小, 比如在细胞培养液 LDH 活性相同的情况下, 培养孔内细胞密度小的其 LDH 的漏出率就大, 反之则相反。细胞培养液 LDH 漏出率的测定, 既不需要用丙酮酸钠标准液来定量, 也不必行培养细胞的蛋白检测, 方法简便但结果可靠。

如分析表 2 和表 3 的测定结果, 如果从细胞培养液 LDH 的活性来看, 在体外模拟脑缺血再灌注损伤中正常组、模型组和用药组三组间无统计学差异; 但从细胞培养液 LDH 的漏出率来看, 模型组和正常组、用药组和模型组间均有统计学意义, 说明体外模拟脑缺血造成了培养细胞的损伤, 使其 LDH 的漏出率增加, 用该种药物可减轻其损伤。

3.2 细胞培养液 LDH 活性测定的三种方法比较

比色法测定虽反应时间较长并需在 37℃ 恒温水浴中进行, 但比色测定时间短, 结果可靠而稳定。LDH-L 法, 样品于比色杯中混匀保温 30s 后开始读数, 每 30s 读一次数, 直至 2min, 计算每分钟吸光度的上升速率($\Delta A/\text{min}$), 比色测定时间较长。LDH-P 法也需测定每分钟吸光度的下降速率($-\Delta A/\text{min}$), 稳定性较差。

4 应用

4.1 评价培养细胞损伤程度的大小

在细胞培养的许多研究中都要制作损伤模型,

如体外模拟脑、心肌细胞、内皮细胞等的缺血再灌注损伤、药物损伤、机械性损伤等,作细胞损伤程度大小的比较时均可用细胞培养液 LDH 的漏出率来进行客观评价,在相同条件下细胞培养液 LDH 漏出率高的细胞损伤程度就大。

4.2 评估药物治疗作用的好坏

在实验研究中常用 LDH 漏出量的多少来评估药物治疗作用的好坏^[6,8],在同一条件下 LDH 漏出率低的治疗组药物疗效好。用此可进行某些药物组方和拆方间药效作用的比较。

4.3 可用于药物的筛选

如对同病异治的许多药物或同一药物不同剂量间疗效的比较均可用此办法进行筛选。我室曾承担不少此类课题的研究均取得满意的效果。

5 注意事项

5.1 作细胞培养液 LDH 活性的比色测定时一定要用无血清培养液培养细胞,以排除血清的干扰,否则实验结果偏大。

5.2 尽可能现取现测,如果收集的细胞培养液放置时间较长,LDH 的活性就会下降,所测数据偏小。不同的 LDH 同工酶对冷的敏感性有差异,LDH₄ 和 LDH₅ 对冷特别不稳定,因此细胞培养液和细胞匀浆液不能储放于 -20℃ 冰箱中过夜。加入 NAD⁺ 或谷胱甘肽可以阻止活性丧失。

5.3 同一批实验要尽量用一次配制的溶液,否则可比性较差。

5.4 用比色法测定时所用 NaOH 较关键,如不纯有时无法进行比色测定。

5.5 用比色法测定时应严格在 37℃ 恒温水浴锅内进行各步反应,如温度过高溶液颜色加深无法进行比色测定。

参 考 文 献

- [1] 刘立,王友联,张枢等. 环孢霉素 A 对局部脑缺血再灌注损伤的改善作用[J]. 中风与神经疾病杂志, 2002, 19(2): 106 - 107.
- [2] 邵京山,薛敏,冯玉兰等. 复方丹参注射液对脑出血 CT 及脑脊液 LDH 的影响[J]. 实用中西医结合临床, 2002, 2(5): 1 - 2.
- [3] LOBNER D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis [J]? *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, 96: 147 - 152.
- [4] SHUAIB A, SOCHOCKA E, ISHAQZAY R, et al. Protective effect of hypothermia during ischemia in neural cell cultures[J]. *Neurochem Res*, 1993, 18(6): 663 - 665.
- [5] 叶应妩,王毓三. 血清乳酸脱氢酶活性速率测定法 [M]. 叶应妩,王毓三主编.《全国临床检验操作规程》.南京:东南大学出版社,1997,195 - 196.
- [6] 郭秀丽,张世玲. 达曲班对体外培养心肌细胞缺氧缺血性损伤的保护作用[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(10): 460 - 462.
- [7] 胡建军,洪庆涛,唐一鹏,等. 天麻素对缺血再灌注损伤星形胶质细胞的保护作用及其对一氧化氮合成酶活性的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(5): 11 - 15.
- [8] SUURONEN T, KOLEHMAINEN P, SALMINEN A. Protective effect of L-Deprenyl against apoptosis induced by okadaic acid in cultured neuronal cells [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2000, 59(12): 1589 - 1595.

Determination and Application of Leakage Rate of Lactate Dehydrogenase in the Cultured Medium of Cells

HONG Qing Tao, SONG Yue Tao*, TANG Yi Peng, LIU Chun Mei
(Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: It is a stable and practical criterion to determine the leakage rate of lactate dehydrogenase(LDH) in the cultured medium of cells by the colorimetric method of LDH. The method not only can measure objectively the damaged degree of cells and evaluate properly the role of medicine intervention, but also is a effective way of drug screening.

Key words: LDH; cell culture

*Corresponding author, E-mail: syt521800@sohu.com