

## FDA-PI 双色荧光分光光度法检测细胞活性变化

祁爱群

钱凯先 邵健忠 严庆丰

施沁清

(上海市血液中心 上海 200051)(浙江大学生物系 杭州 310027)(上海化学试剂研究所 上海 200333)

测定对细胞的杀伤率,测定细胞活性的变化,在生物学上有着广泛的用途,较传统的方法是用放射显影,后来出现了一些新的测定方法,如 MTT 检测法,测定细胞内酶活性变化等,不同方法各具特色。1985 年 Jones 等人报道了他们在动物细胞培养中应用 FDA-PI 双色荧光法鉴别细胞活力,用于荧光显微镜的观察和摄影,效果良好<sup>[1,2]</sup>。在本篇论文中我们重新设计,用 FDA、PI 两种荧光染料着色样品,用可激发这两种荧光染料的光来激发,再用荧光分光光度计检测 C<sub>60</sub>对 S<sub>180</sub>肿瘤细胞的杀伤作用,效果非常好,很简便直观地通过测出 FDA、PI 双峰峰值的高低变化来观察细胞的杀伤情况。同时,我们用 MTT 方法进行细胞杀伤情况的检测,并将这两种方法进行比较,可以看出 FDA-PI 双色荧光法有许多 MTT 法不具备的优点,为测定细胞的杀伤提供了一种新的良好的途径。

## 材料和 方法

## 1. 材料

光敏剂 C<sub>60</sub>由浙江大学化学系提供,S<sub>180</sub>实体瘤株由浙江省医学科学院提供,96 孔板由华美生物工程公司提供,RPMI1640 为 GIBCO 公司产品,微孔滤膜为上海医药工业研究所生产,FDA (Fluorescein Diacetate,双醋酸荧光素),PI(Propidium Iodide,碘化砷)均为 SIGMA 公司产品,由杭州大学生命科学学院提供,S1-CJ-ICQ 型数字式照度计由浙江大学生产,其余试剂均为国产分析纯试剂,溶液配制均采用三蒸水。

2. C<sub>60</sub>-脂质体的制备

用卵磷脂包裹 C<sub>60</sub>,制备出溶于水的 C<sub>60</sub>-脂质体,采用修改后的逆向蒸发技术<sup>[3]</sup>制备 C<sub>60</sub>-脂质体,得到均匀的黄棕色液体,经 Sepharose 4B 柱(2.8×20cm)

分离,以 PBS(pH=7)作洗脱液,流速 12ml/h,最终可得到浅黄色的 C<sub>60</sub>-脂质体,未包进的 C<sub>60</sub>留在柱顶。取少量 C<sub>60</sub>-脂质体测 UV-VIS 谱,观察特征吸收峰,另取少量脂质体用等体积正己烷萃取出 C<sub>60</sub>,测其 329nm 处的吸光值,与 C<sub>60</sub>正己烷的标准吸光度曲线对照,得出 C<sub>60</sub>-脂质体中 C<sub>60</sub>的含量。其余 C<sub>60</sub>-脂质体用直径为 0.22μm 的微孔滤膜过滤灭菌,充氮气保存于 4℃冰箱中。

## 3. 标准细胞悬液的配制

用生长旺盛的 S<sub>180</sub>肿瘤细胞悬液与经过高温处理后的 S<sub>180</sub>肿瘤细胞悬液进行配比,配制成含活细胞为 10%,30%,50%,70%,75%,80%,85%,90% 的标准细胞悬液。

## 4. 光照处理

将 S<sub>180</sub>实体瘤从荷瘤小鼠体上解剖下来,匀浆散散,以每瓶 0.5ml 的量,分装到洁净的培养瓶中,传代培养,待稳定生长后,每瓶加入浓度分别为 50μg/ml,40μg/ml,30μg/ml,20μg/ml,0μg/ml 的 C<sub>60</sub>-脂质体各 1ml,再加入 RPMI 1640 培养液中培养 2 天,置于碘钨灯下做不同的光照强度的光照处理,用数字式照度计检测光强,光强分别为 4000 lux,3000 lux,2000 lux,1000 lux,0 lux,光照时间为 5 分钟。

## 5. 染料的配制和染色

5mg FDA 溶解在 1ml 丙酮中,避光贮藏在 4℃的冰箱中,使用时取 0.4ml FDA 贮藏液加入到 5ml 0.65 mol/L 甘露醇中,按此比例获 FDA 染色溶液。将 2mg PI 溶解在 5ml 0.65mol/L 甘露醇中,按此比例配成 PI 染色溶液。

## 6. 荧光检测

将标准细胞悬液 2ml,FDA 和 PI 染液各 0.5ml 混匀,加入比色皿中,置于荧光分光光度计中测量荧光强度(扣除空白值),记录图谱,激发波长为 450nm。

本文 1999 年 5 月 31 日收到,11 月 11 日接受。

光照处理后的细胞悬液进行同样处理和检测。

### 7. MTT 方法检测

用 MTT<sup>[4]</sup>方法重做上述杀伤实验。并对细胞总数计数。

## 结 果

### 1. 标准曲线的建立

记录标准细胞悬液荧光强度,计算峰高之比( $H_{比}$ )和活死细胞浓度之比( $C_{比}$ ),经直线回归后,得:

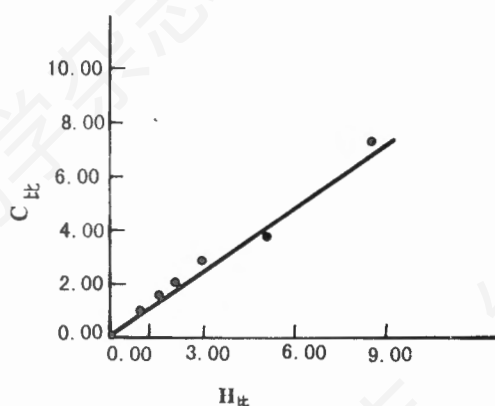


图1 细胞杀伤标准曲线

$H_{比}: H_{516nm}/H_{594nm}$ ,  $C_{比}: C_{活}/C_{死}$ , 回归方程为:  $C = 1.2 H$ 。

### 2. 双色荧光法检测肿瘤细胞的杀伤

当光强为 0 lux 时,各种  $C_{60}$ 浓度对  $S_{180}$ 肿瘤细胞活性影响并不显著, $H_{比}$ 较空白对照,即  $C_{60}$ 浓度为  $0\mu g/ml$ ,光强为 0 lux 时的  $H_{比}$ 相差不大,各  $P > 0.05$ 。

当  $C_{60}$ 浓度为  $0\mu g/ml$ 时,各光强对  $S_{180}$ 肿瘤细胞存活的影响也不大,变化不显著。 $H_{比}$ 较空白对照的  $H_{比}$ 相差不大,各  $P > 0.05$ 。

当  $C_{60}$ 浓度为  $30\mu g/ml$ 时,由 FDA-PI 双色荧光光谱可明显看出,在光的激发下, $C_{60}$ -脂质体对  $S_{180}$ 肿瘤细胞产生了明显的杀伤作用。见表 1。

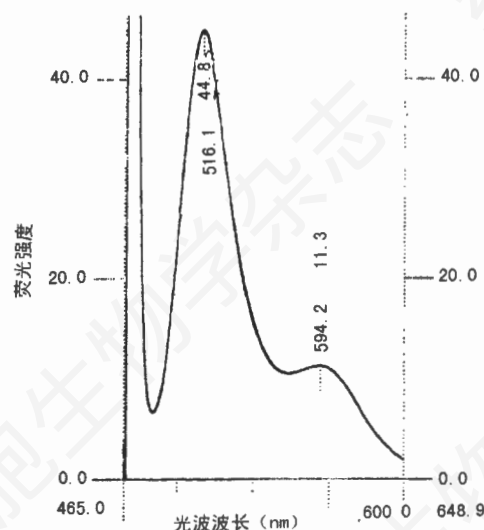


图2 光强为 1000 lux,  $C_{60}$ 浓度为  $30\mu g/ml$ 时,  $S_{180}$ 肿瘤细胞双色荧光光谱

### 3. MTT 法检测肿瘤细胞的杀伤

经 MTT 法检测结果可以看到阴性对照(光强为 0 lux),阳性对照( $C_{60}$ 浓度为  $0\mu g/ml$ )与空白对照(光强为 0 lux,  $C_{60}$ 浓度为  $0\mu g/ml$ )的光密度值以统计学角度来看是没有什么明显区别的。即  $P > 0.05$ 。

当  $C_{60}$ 浓度为  $30\mu g/ml$ 时,在不同光照条件下,细胞明显被杀伤。

## 讨 论

$C_{60}$ 是 90 年代分子科学研究的热点之一,开创  $C_{60}$ 研究的三位科学家荣获了 1996 年诺贝

表 1 不同光强对  $S_{180}$ 肿瘤细胞的杀伤影响( $C_{60}$ 浓度为  $30\mu g/ml$ )

光强 (lux)	0	1000	2000	3000	4000
$H_{比}$ 值	$7.98 \pm 0.33$	$6.30 \pm 0.26$	$3.50 \pm 0.15$	$1.20 \pm 0.07$	$0.57 \pm 0.03$
$C_{比}$ 值	$9.58 \pm 0.40$	$7.56 \pm 0.31$	$4.20 \pm 0.18$	$1.44 \pm 0.08$	$0.68 \pm 0.04$
$C_{活}\bar{X}\%$	$90.6 \pm 0.36$	$87.8 \pm 0.42$	$80.7 \pm 0.67$	$59.0 \pm 1.41$	$40.5 \pm 1.28$
P 值		$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$

注:以上值均为  $\bar{X} \pm SE, n=10$ 。

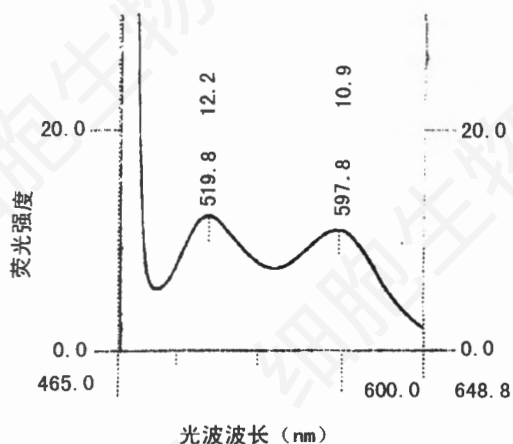


图3 光强为 3000 lux,  $C_{60}$ 浓度为 30 $\mu$ g/ml 时, S<sub>18</sub> 肿瘤细胞双色荧光光谱

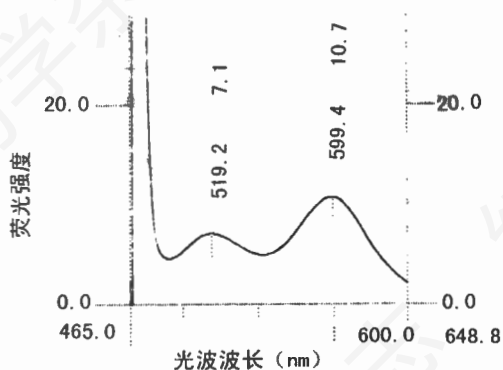


图4 光强为 4000 lux,  $C_{60}$ 浓度为 40 $\mu$ g/ml 时, S<sub>18</sub> 肿瘤细胞双色荧光光谱

尔化学奖,  $C_{60}$ 与光敏剂血卟啉相似, 在有氧和光的激发下, 可产生大量的单线态氧杀伤细胞, 分子生物学进一步研究表明,  $C_{60}$ 可光致切断 DNA 键, 另外寡聚核苷  $C_{60}$ 可杂交到单链 DNA 上, 在有光和氧的情况下, 作用于单链区的鸟嘌呤核苷, 专一性地引起 DNA 损伤<sup>[5,6]</sup>。目前国际上对  $C_{60}$ 的生物学研究已广泛开展起来,  $C_{60}$

不仅可杀伤离体细胞, 而且对活体动物细胞<sup>[7]</sup>、肿瘤<sup>[8]</sup>杀伤作用的报道也越来越多, 本实验正是利用  $C_{60}$ 的这种光动力学作用, 来杀伤离体肿瘤细胞。

FDA 本身不发荧光, 渗入活细胞后, 释放出荧光素来, 在蓝色光激发下发射出黄绿色的荧光来, PI 只能进入有缺损的膜或固定的死亡细胞, 在蓝色光激发下发出桔红色的荧光, 活性高的细胞发出强烈的黄绿色荧光, 活性低的稍显黄绿色, 死亡细胞和细胞碎片是桔红色, 而且这两种荧光在 518nm, 和 597nm 处无峰重叠。在以往的实验中, 人们只分别用了 FDA 和 PI 荧光染色特性, 进行染色鉴定, 后来 Jones 等人首次将这两种染料结合起来, 用于荧光显微镜的观察, 我们在这次实验中, 首次将这种方法, 用到荧光分光光度计上, 在两种荧光染料作用下, 样品会发射出两种荧光, 从 518nm 和 579nm 光谱峰的高低可以直观地看到死活细胞浓度的变化, 同时两峰的测值也会被测出, 通过比较测值的大小变化, 能方便地计算出细胞的杀伤率, 这是一种新的简便的方法。

在实验结果的分析中, 我们采用的是峰高的比值来进行计算<sup>[9]</sup>。细胞发出的荧光强度与细胞浓度成正比, 荧光强度又可通过峰高来反映, 因而细胞浓度与峰高成正比。用标准细胞悬液测定, 经直线回归, 也可得出此正比关系。见图 1。由峰高比值的变化的变化; 可间接看出死活细胞浓度的变化, 然后由统计学显著差异分析判断各实验条件之间的差异情况。

用 MTT 方法重复上述实验, 从实验结果可以看出两种方法的结果是一致的, FDA-PI 双色荧光法完全可以替代 MTT 方法来正确地

表 2 不同光强对肿瘤细胞的杀伤作用的影响( $C_{60}$ 浓度为 30 $\mu$ g/ml)

光强(lux)	0	1000	2000	3000	4000
OD(490nm)	0.980 $\pm$ 0.022	0.927 $\pm$ 0.025	0.855 $\pm$ 0.026	0.624 $\pm$ 0.022	0.445 $\pm$ 0.027
C(cells/ml)	55000 $\pm$ 12000	52000 $\pm$ 1400	48000 $\pm$ 15000	35000 $\pm$ 1200	25000 $\pm$ 1500
$C_{活}$ (%)	91.7 $\pm$ 2.1	86.7 $\pm$ 2.3	80.0 $\pm$ 2.4	58.3 $\pm$ 2.1	41.7 $\pm$ 2.5

注: 以上值均为  $\bar{X} \pm SE$ 。

检测细胞的杀伤,而且双色荧光法有着 MTT 方法所不具有的优点。第一,双色荧光法较 MTT 法灵敏度高,荧光检测本身具有灵敏度高的特点,因而双色荧光法能够在细胞浓度很低时测定出细胞的杀伤情况,更加准确地观察细胞死活的变化,因而也比 MTT 法有着更为广泛的应用范围。第二,双色荧光法较 MTT 法精确度高,MTT 法直接仅仅测定活细胞的光密度值,在各种客观因素的影响下存在着系统误差,而双色荧光法测定死、活细胞的两种荧光值,实验结果的数据处理采用的是双峰比值,因而可大大减少系统误差。第三,MTT 法可测得活细胞的浓度,利用细胞计数测定细胞总数,才能测定整个细胞悬液死活细胞浓度,而双色荧光法则能精确地直接测出死活细胞的比例,也能测出了死活细胞的浓度,因而更加准确清楚地反映出细胞被杀伤的情况。

### 摘 要

本文建立了 FDA-PI 双色荧光分光光度法来推测细胞活性的变化,通过图谱初步地观察,进一步测定荧光测值,可以定性和定量地进行

分析,此方法简便易行,直观,为测量细胞活性的变化提供一种良好的新方法。

关键词:细胞活性 荧光分光光度计 双醋  
酸荧光素(FDA) 碘化砷(PI) C<sub>60</sub>  
S<sub>100</sub>细胞株

### 参 考 文 献

- [1] Jone. K. H. et al., 1985, *J. Histochem., Cytochem.*, **33**:77-79.
- [2] 黄纯农, 1988, 细胞生物学杂志, **10**: 133-135.
- [3] Szoka, F., et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. USA.*, **75**:4194.
- [4] Mosmann, J., *J. Immun. Methods*, 1983, **65**: 55.
- [5] F. Diederich & C. Thilgen, 1996, *Science*, **271**:317.
- [6] H. Tokuyama and E. Nakamura, 1994, *J. Org. Chem.*, **59**:1135-1138.
- [7] Kamat Jayashree P et al., 1998, *Chemico Biological Interactions*, **114**(3):145-159.
- [8] Tabata-yasuhiko et al., 1997, *Japanese Journal of Cancer Research*, **88**(11):1108-1116.
- [9] 郭尧君, 荧光实验技术及其在分子生物学中的应用(第二版), 1983, 科学出版社.

## A FLUOROMETRY METHOD TO DETERMINE CELL VIABILITY BY DOUBLE STAINING WITH FLUORESCEIN DIACETATE AND PROPIDIUM IODIDE

QI Ai Qun QIAN Kai Xian SHAO Jian Zhong YAN Qing Feng  
(Zhe jiang University, Hang zhou, 310027)  
SHI Qin Qing  
(Shanghai Chemical Reagent Research Institute Shanghai, 200333)

### ABSTRACT

We established a new double-staining procedure using fluorescein diacetate and propidium iodide to determine cell viability in cell suspension. By watching the fluorograph and calculating the fluorescence value we can do quantitative and qualitative analysis of the cell viability. The method is simple and viable.

Key words: Cell viability Spectrofluorophotometer Fluorescein diacetate (FDA) Propidium iodide(PI) C<sub>60</sub> Cell strain S<sub>100</sub>