

一经洗涤就可能从细胞上洗脱下来。

人胃癌 $\gamma$ 照像结果显示,从48小时起即未见显像,96小时的Lca/Sca为3.03,洗涤后的胃癌细胞不能再测出放射性,所有这些结果都反映了在人胃癌部位的少量同位素的存在主要是由于血流及非特异吸附所造成的,不是单抗LC-1与人胃癌细胞特异性结合的积聚。我们在这方面的工作与李明采用 $^{125}\text{I}$ 标记单抗LC-1和正常小鼠IgM分别经腹腔注入荷人肺腺癌(SPC-A<sub>1</sub>)裸鼠体内,72小时的定位系数为1.38的结果相似<sup>[11]</sup>。这说明采用试验和对照肿瘤接种同一裸鼠进行放射免疫试验是值得采用的方法。同时这样的方法或可减少因个体差异造成的误差,也可避免裸鼠价格昂贵、正

常小鼠IgM来源困难等因素的限制。

### 参 考 文 献

- [1] 葛锡锐等, 1989, 实验生物学报, 22: 359.
- [2] Garcia-Gonzalez, M. et al., 1988, *J Immunol Meth.*, 111: 17.
- [3] 陈登鸿等, 1982, 实验生物学报, 15: 247.
- [4] 张素胤等, 1987, 中国药理学报, 8: 366.
- [5] 王龙宝等, 1987, 肿瘤, 7: 52.
- [6] 俞雁宾等, 1987, 中华肿瘤杂志, 9: 165.
- [7] 肖祥熊等, 1985, 实用放射免疫分析及其临床意义, P 43, 同济大学出版社.
- [8] Mc Cready, D. R. et al., 1989, *J. NCI.*, 81: 682.
- [9] Koji, T. et al., 1980, *Cancer Res.*, 40: 3013.
- [10] Khaw, B. A. et al., 1984, *J. Nucl Med.*, 25: 592.
- [11] 李明等, 1992, 实验生物学报, 25: 31.

## MTT 法快速测定 TNF 活性

虞冠华 龙 娜 施凤霞 许祥裕 丁树标 罗丽华

(南京军区军事医学研究所 210002)

肿瘤坏死因子(TNF)能特异地杀伤肿瘤细胞,对正常组织无明显的毒性作用,因而受到人们的普遍关注。近年来的研究发现, TNF还具有抗病毒、免疫调节、伤口愈合<sup>[1-3]</sup>等作用,同时临床研究也表明,体内TNF量异常与肿瘤<sup>[4]</sup>、感染<sup>[5]</sup>、自身免疫<sup>[6]</sup>等均有关系。因此,建立一个简易、快速、稳定的TNF检测方法对基础理论的研究,尤其是临床上的普及应用是非常必须的。

TNF的定量测定是基于TNF对L 929细胞的细胞毒性作用。根据示踪方法的不同分为同位素释放法<sup>[7]</sup>、形态学法<sup>[8]</sup>、染色法<sup>[9]</sup>等。同位素法有客观指标,微量、灵敏,应用较多。但设备要求高,需要酶消化,程序长,容易造成同位素污染。形态学法用肉眼判断结果,受人为因素影响较大。染色法根据染料不同有结晶紫法、MTT法等。本文用MTT进行染色示踪,并改进了加细胞和样品的时间,使整个测定在30小时内完成,操作简单方便,结果

稳定。

### 材 料 和 方 法

#### 一、材料

- 1、L 929细胞:引自上海第二军医大学,10% FCS 1640条件下贴壁培养。
- 2、TNF标准品:美国Biogene公司产品。
- 3、重组TNF样品:本室制备纯化。
- 4、放线菌素D:Fluka Biochemika公司产品,用10%FCS 1640配成2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,滤菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。
- 5、MTT:Fluka Biochemika公司产品,用0.01 mol/L PBS pH 7.2—0.14 mol/L NaCl配成5 mg/ml,滤菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,两周内使用。
- 6、 $^3\text{H}$ -TdR:上海原子能研究所。
- 7、酶标仪:Titertek Multiskan plus MKII型,英国Flow公司。
- 8、液体闪烁计数器:LS 6000 SE型,美国Bac-kem公司。

#### 二、方法

- 1、靶细胞处理:传代培养3—4天、处于对数生长期的L 929细胞,用0.25%胰蛋白酶消化后,

10%FCS 1640 离心洗涤 3 次, 调整细胞浓度备用。

2、TNF 活性测定: (1) 快速法: 将上述 L 929 细胞加入 96 孔板中, 100  $\mu\text{l}$ /孔, 然后加入稀释好的 TNF 标准品和样品, 每个稀释度 3 复孔, 50  $\mu\text{l}$ /孔, 各孔中再加入放线菌素 D 50  $\mu\text{l}$ , 使终浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。对照组为每孔 150  $\mu\text{l}$  10% FCS 1640, 50  $\mu\text{l}$  放线菌素 D。100% 生长为每孔 100  $\mu\text{l}$  细胞, 50  $\mu\text{l}$  10% FCS 1640, 50  $\mu\text{l}$  放线菌素 D。均为 3 复孔。培养板置 37 $^{\circ}\text{C}$  5% $\text{CO}_2$  饱和湿度培养 24 小时。(2) 常规法: 与快速法基本相同, 只是  $2 \times 10^5/\text{ml}$  浓度的细胞先于培养板中(100  $\mu\text{l}$ /孔)培养 24 小时, 再加样品和放线菌素 D, 进行 24 小时杀伤。

3、MTT 染色示踪活性: 加入样品 24 小时后, 取出培养板, 每孔加入 20  $\mu\text{l}$  MTT 溶液, 继续培养 4 小时, 小心吸弃每孔上清 180  $\mu\text{l}$ , 再加入 100  $\mu\text{l}$  二甲亚砜, 微型振荡器上振荡 5 分钟, 酶标仪测定光吸收。测定波长 490 nm, 参考波长 630 nm。

4、 $^3\text{H-TdR}$  释放示踪活性: 标记  $^3\text{H-TdR}$  的 L 929 细胞加入细胞培养板各孔中, 操作同快速法。TNF 杀伤 24 小时后, 酶消化收集细胞于玻璃纤维纸上, 液闪计数 cpm 数。

## 结 果

### 一、最适细胞浓度的选择

用培养液调整不同浓度的 L 929 细胞接种于 96 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养 24 小时后用 MTT 染色, 比较不同浓度细胞代谢 MTT 的程度, 选择最适细胞浓度。如图 1 所示, 接种浓度在  $1 \times 10^5$ — $4 \times 10^5/\text{ml}$  范围时, 测的 OD 值呈良好的线性关系,  $r = 0.9934$ , 细胞浓度大于

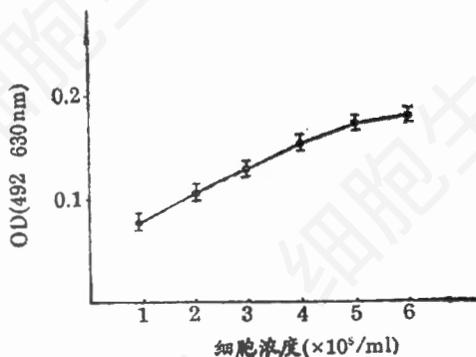


图 1 细胞浓度与 OD 值的关系

$5 \times 10^5/\text{ml}$  时, OD 值增加与细胞浓度非线性关系, 倒置镜下观察细胞相互重叠, 营养不足, 不能充分生长和代谢 MTT。因此, 短程实验中均选用  $4 \times 10^5/\text{ml}$  细胞浓度。

### 二、本法与 $^3\text{H-TdR}$ 释放法对同一样品测定结果的比较

检测结果如图 2 所示。样品为同一次稀释的 TNF 标准品, 图中每一点为 3 次测定平均值。本法 50% 杀伤所对应的稀释度为 1:8.05,  $^3\text{H-TdR}$  释放法为 1:7.84, 统计学处理表明  $P > 0.05$ , 因此, 本法与同位素法测定结果无显著差异。

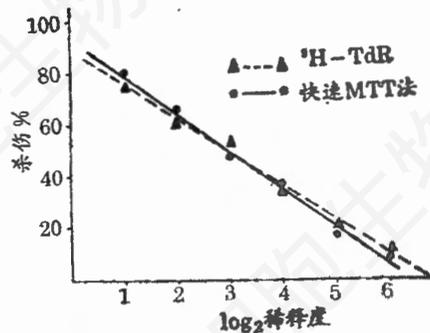


图 2 快速 MTT 法与  $^3\text{H-TdR}$  法检测 TNF 活性比较

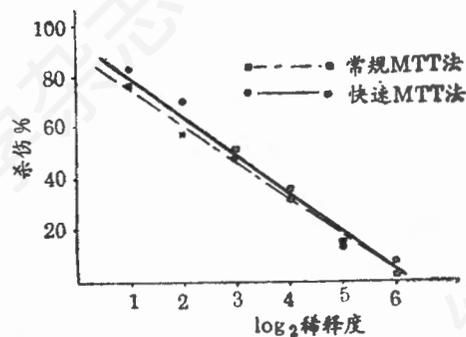


图 3 快速 MTT 法与长程 MTT 法检测 TNF 活性比较

### 三、本法与常规 MTT 法对同一样品测定结果的比较

对同一样品测定结果见图 3。本法 50% 细胞生长抑制率所对应的稀释度为 1:7.28, 常

(上接封三)

规 MTT 法为 1:7.46( $P>0.05$ )。

#### 四、本法测定 TNF 结果的稳定性

用本法对同一 TNF 样品进行了五次重复测定, 结果见表 1, CV=5.8%, 表明本法具有良好的重复性。

表 1 快速 MTT 法测定 TNF 样品的重复性

实验次数	50%细胞生长抑制率 对应稀释度		样品 TNF 活性 (U/ml)
	标准品	样品	
1	1:7.72	1:5142	$6.6 \times 10^4$
2	1:7.64	1:4870	$6.3 \times 10^4$
3	1:7.98	1:4831	$6.0 \times 10^4$
4	1:7.50	1:5214	$6.9 \times 10^4$
5	1:7.82	1:4790	$6.1 \times 10^4$
平均	1:7.73	1:4969	$6.4 \times 10^4$

#### 讨 论

MTT 比色分析的原理是利用活细胞线粒体脱氢酶将染料 MTT 还原成甲臜颗粒, 以颗粒溶解后所呈现的染色深浅(以 OD 值表示)反映活细胞的数量以及细胞代谢的活跃程度, 在 IL-2 活性测定中应用较广<sup>[10]</sup>。TNF 测定是直接细胞毒性试验, 用细胞死亡数或残存活细胞量来表示。当 TNF 作用于 L 929 细胞时, 高活性孔中 L 929 细胞存活数少, 细胞代谢减弱, 代谢 MTT 的能力也小, 显色后的颜色浅。低活性孔中 L 929 细胞存活数较多, 显色后颜色也就较深。而不加样品的孔中, 细胞就能更好地代谢 MTT, 达到实验条件下的 100% 生长。因此用 MTT 染色示踪 TNF 活性, 理论上是完全可行的。从本文的实验结果来看, 实际应用也有其特殊的优越性。首先避免了同位素操作带来的防护、污染、特殊仪器设备等问题; 其次显色操作在 96 孔板原位进行, 不需要收集细胞和转移到其它载体上, 减少了实验误差; 再次用酶标仪一次可测定多块板, 测定的样品数目可以大大增加。

文献报道的 TNF 测定大多是将细胞和样品于不同时间加入 96 孔板中, 即细胞在 96 孔板中培养 1—3 天后再加入样品。这主要是使

L 929 细胞先在 96 孔板中贴壁, 并生长达一定的浓度。按此方法, 整个测定操作至少需要 2 天, 有时需要 4 天, 不仅流程长而且增加了污染的机会。本法改进了样品对靶细胞的作用时间, 将样品和细胞同时加入 96 孔板, 28 小时就能完成整个实验, 使测定时间大大缩短。为保证测定的灵敏度, 我们采取了两条措施, 一是采用对数期生长的 L 929 细胞, 并在测定前一天进行换液, 添加含较高浓度小牛血清的培养液, 使 L 929 细胞处于增殖旺盛时期, 对 TNF 敏感性增加。二是提高细胞浓度, 快速法测定中用  $4 \times 10^5/\text{ml}$ , 比常规法提高一倍, 酶标仪测定时 OD 读数也相应提高, 100% 细胞增殖孔和样品杀伤孔之间的差异加大, 微量的 TNF 活性即能显示出来。我们的实验结果表明, 1 U/孔(相当于 0.01 ng)的 TNF 就能被测定。

快速 MTT 比色测定法由于 TNF 样品对 L 929 细胞实施杀伤的时间与常规法一样, 所以其可靠性与常规法有良好的可比性。由于本法简易、快速、特异、可靠, 故可被认为是易于普及和推广应用的一种好方法。

#### 参 考 文 献

- [1] Pennica D. et al., 1984, *Nature*, 312: 724.
- [2] Yoshio, N. et al., 1987, *Jpn J Cancer Res*, 78: 87.
- [3] Monney DP. et al., 1990, *Ann Surg*, 211(2): 124.
- [4] Theilmann L. et al., 1990, *Pneumologie* 44: 735.
- [5] Damas P. et al., 1989, *Crit care Med*, 17: 975.
- [6] Maury CP. et al., 1989, *Int J Tissue React*, 11: 189.
- [7] Michael RR. et al., 1981, *Infect Immunol*, 31: 380.
- [8] 智刚等, 1991, *生物化学杂志*, 7: 89.
- [9] Bharat BA. et al., 1984, *J Biochem*, 259: 686.
- [10] Deuis G. et al., 1986, *J Immun Meth.*, 94: 57.