

ANALYSIS OF AFFECTING FACTORS OF HSP68 SYNTHESIS IN C₆RAT GLIOMA CELLS

XU Cun Shuan XIA Min WU Yan HU Yi Hong LU Ai Ling ZHAO Xu Yong
(Biology Department, Henan Normal University, Xin Xiang 453002)

ABSTRACT

In this paper, effect of serum, nutrition, cellular density etc on heat shock response of C₆ rat glioma cells (C₆ cells) was analyzed by western blot, protease renatured electrophoresis, density measure and so on. The results show, within certain serum concentration in medium ($\leq 30\%$), the higher concentration is, the longer it takes time to switch on the synthesis of HSP68; different nutrition can affect quantity and time of C₆ cells in synthesizing HSP68. In addition, the heat shock response of C₆ cell in different growth stages is quite distinct, it is suggested that the cells in stable phase are suitable materials for the study of stress mechanism of heat shock.

Key words: C₆ rat glioma cells Medium New born calf serum Heat shock protein68(HSP68)

实验技术

酸性磷酸酶法检测体外培养细胞数

陈学清 杨晓鸣 潘国宗 朱 峰

(中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院消化内科 北京 100730)

在体外细胞增殖和抑制/杀伤试验中,活细胞计数是一个常用的指标。它常可用于测定细胞对一些生长因子刺激的反应,或评价化疗药物对瘤细胞杀伤的效果。但要进行准确的细胞计数,并非易事^[1]。如常用的显微镜下直接计数,不仅费时,而且差异很大($>20\%$)。在细胞数较少的时候,准确的细胞计数则更困难。为了便于临床和科研工作,本文将介绍一种简便、准确的细胞计数方法。其适用于96孔板培养中的贴壁和悬浮的培养细胞。

材 料 和 方 法

一、材料和试剂

硝基苯磷酸盐(p-nitrophenyl phosphate, Sigma104)、胰蛋白酶、顺铂(cisplatin)、RPMI 1640为Sigma公司产品。Triton X-100为Serva产品。胎牛血清

(医科院血研所)购自天象人生物公司。人重组表皮生长因子(hrEGF)购自邦定公司。其他试剂为国产分析纯。96孔细胞培养板为Costar产品。

二、细胞和细胞系及其培养

小鼠成纤维细胞系(NIH3T3)、小鼠骨髓瘤细胞系(SP2/0)、人大肠癌细胞系(LOVO)和人白血病细胞系(K562)均接种于10%胎牛血清(FCS)RPMI 1640培养液中(含青霉素80U/ml,链霉素100U/ml),置5%CO₂,37℃水饱和培养箱中培养。3-4天传代培养(贴壁细胞用传代前常规胰酶消化)。

三、瘤细胞增殖和杀伤试验

将大肠癌细胞按一定浓度接种于96孔细胞培养板中,并加入一定浓度的顺铂或hrEGF。分别于培养第3天、第5天用酸性磷酸酶法作细胞计数。活细胞计数用台盼蓝拒染法。

四、酸性磷酸酶细胞计数法^[1]

培养于96孔细胞板的细胞去细胞培养液(悬浮细胞用离心法),每孔用0.01mol/L PBS(pH7.0)200 μ l洗

涤1次。加入10mmol/L的硝基苯磷酸盐溶液100 μ l (0.1mol/L醋酸缓冲液配制,含0.1% Triton X-100),置于37 $^{\circ}$ C温育一定时间后,每孔加入1mol/L碳酸氢钠10 μ l中止反应。用多孔酶标仪(titertke)405nm处检测光吸收度。

五、资料分析

用直线回归分析细胞数与光吸收度的相关性。

结 果

一、活细胞数与光吸收度的关系 96孔细胞培养板每孔加入100 μ l反应底物后,在37 $^{\circ}$ C下温育2小时,结果如图1所示,各组细胞中,随着细胞数的增加,每孔所测得的光吸收度也相应增加。以细胞数为自变量,光吸收度为应变变量作直线回归,发现各组的相关系数均 >0.99 。台盼蓝拒染法检测了相应的各组96孔细胞培养板中的活细胞数,结果表明,所有各组中活细胞数均 $>97\%$ 。这表明,光吸收度可以很好地反映每孔的活细胞数,而且检测范围较大(250— 2.5×10^4 细胞/孔)。

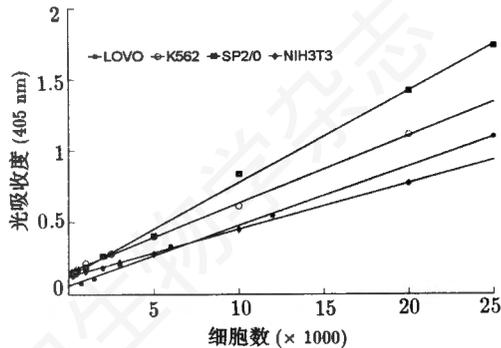


图1 活细胞数与光吸收度的关系

二、酶反应时间对光吸收度的影响以LOVO细胞系为例,检测了温育时间对光吸收度的影响。参考图1的结果,我们选择了250细胞/孔和5000细胞/孔与空白对照组相比。结果如图2所示,在这3组中,发现随着温育时间的延长,相应的光吸收度均随之增加。1小时以下,所测定的光吸收度值较低,如5000细胞/

孔时,第0.5小时光吸收度为0.110;温育4小时光吸收度则可达0.761。但是,随着温育时间的延长,空白对照组的光吸收度也相应增加。如第1小时空白对照组光吸收度为0.018,第4小时可达0.065。结果表明,温育时间的延长使非特异性底物反应增加。

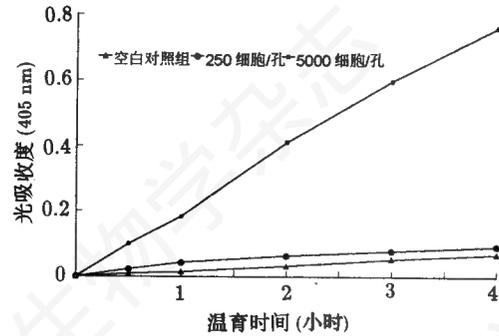


图2 温育时间对酸性磷酸酶计数法光吸收度的影响

三、酸性磷酸酶法对细胞增殖和杀伤的检测 在细胞增殖试验中,96孔细胞培养板加入3000/孔细胞,并分别加入 10^{-5} mol/L— 10^{-13} mol/L的hrEGF。如图3所示,随着加入的hrEGF浓度的增加,所测的光吸收度也相应增

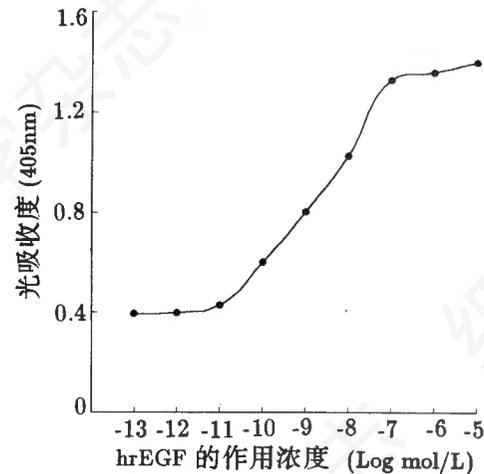


图3 不同浓度的hrEGF对LOVO细胞增殖的影响

加,与之相反,在细胞杀伤试验中,96孔培养板加入 10^4 /孔细胞,分别加入 10^{-4} — 10^{-9} mol/L的顺铂。如图4所示,随着加入的顺铂浓度的增加,所测得的光吸收度相应降低。增殖和杀伤试验的所得的作用浓度与细胞数的曲线均呈“S”形,经检验在一定的范围内细胞数与给药浓度呈对数相关关系。说明酸性磷酸酶法能较好地反映上皮细胞对hrEGF刺激引起的增殖反应以及顺铂对上皮细胞的杀伤效应。

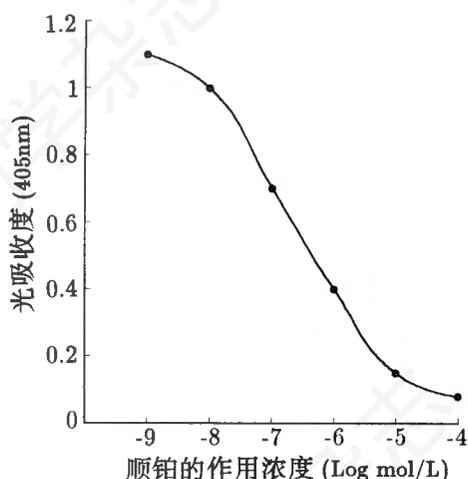


图4 不同浓度的顺铂对LOVO细胞的杀伤作用

讨 论

细胞增殖/杀伤试验中,有多种方法用于细胞计数,包括显微镜下直接细胞计数或电子颗粒计数、测定细胞的蛋白质或DNA的含量、细胞容积测定、染料法和细胞内酶活性测定等。常用的直接细胞计数或电子颗粒计数法较为费时,样品间差异大。细胞蛋白质或DNA的含量虽然在一定程度上可以代表细胞数,但操作复杂。而细胞容积和染料法的灵敏度均较低。因此,以上方法均不适用于大量样品的研究^[1,2]。

一种好的细胞计数法,应该操作简便,结果准确可靠,可以用于自动检测。所以,细胞内酶活性方法在近来得到发展。早期用于细胞计数的细胞内酶法有乳酸脱氢酶法^[3],现很少应用。目前较为常用的有四甲基偶氮唑盐微量酶反应

比色法(MTT法)。该方法的原理是:活细胞内线粒体琥珀酸脱氢酶能催化MTT形成蓝色甲胍,其形成的量与活细胞数的功能状态呈正相关,但其缺陷是灵敏性差,而且重复性不佳^[4]。

本研究采用的酸性磷酸酶计数法,其原理是细胞内的酸性磷酸酶在酸性环境下可以分解磷酸酶底物硝基苯磷酸盐,其产物形成量可用酶标仪在405nm检测。由于内皮细胞含有大量的酸性磷酸酶,所以其最初由Connolly等人用于内皮细胞计数,结果发现其灵敏度高(可达100细胞/孔),重复性好^[1]。后有人重复其实验也得到很好的结果^[5]。我们于1993年将其用于大肠癌HT29细胞和人胃粘膜上皮细胞GES-1的计数,发现也有良好的相关性^[6,7]。这便提示,该方法将可能有较广的应用范围。

为此,我们选择了几种不同类型的细胞用于酸性磷酸酶法检测。结果发现,该法可准确地用于人白血病细胞(K562)、人大肠癌细胞(LOVO)、小鼠成纤维细胞(NIH3T3)和小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)的计数。细胞数和光吸收度的相关系数均大于0.99。这表明,上皮细胞和间质细胞、贴壁和悬浮性细胞,人以及其他种类细胞均可适用于酸性磷酸酶法计数。

我们还探讨了温育时间对酸性磷酸酶细胞计数的影响。发现随着时间的延长,相应细胞的光吸收度增加,但空白对照的光吸收度也增加。由于温育时间过短(<1h)光吸收度值较低,过长则背景过高(图2)。故推荐酶反应时间控制在2—3h。事实上,我们还发现,对于有些细胞如大肠癌HCT-8酶反应时间1h就可以取得满意的结果(结果未示)。各类型细胞的酸性磷酸酶的含量是不一样的,从本研究的图1可以说明这一点。因而,对于各类型细胞间检测的灵敏度是不一致的。我们选择了酸性磷酸酶含量较低的LOVO作了灵敏度的检测。图2的结果显示,250细胞/孔的光吸收度均大于空白对照组,提示至少对某些酸性磷酸酶含量较高的细胞而言,本方法的检测细胞数可达 10^2 细胞/孔。但由于酸性磷酸酶含量较低的细胞数在 10^2

水平时,光吸收度与空白对照间较为接近,故推荐实验时细胞数应在 10^3 水平。

由于细胞损伤时,其细胞膜受到损害使胞浆的酸性磷酸酶逸出,可能对酸性磷酸酶细胞计数法有影响。因此,我们比较了该法用于检测细胞增殖(无细胞损伤)和杀伤(有细胞损伤)。结果表明,该法可以准确地反映细胞增殖和细胞杀伤的情况。其原因可能与本方法在加磷酸酶反应底物前,用 PBS 洗涤除去了损伤细胞的酸性磷酸酶有关。

总之,本研究结果表明,酸性磷酸酶法不仅可用于内皮细胞的计数,也可以用于上皮和间质等贴壁和悬浮生长的细胞计数。可以广泛地应用于体外评价细胞对各种因子的增殖和抑制反应、评价细胞对化疗药物的敏感性等,值得推广。

摘 要

利用小鼠成纤维细胞系(NIH3T3)、小鼠骨髓瘤细胞系(SP2/0)、人大肠癌细胞系(LOVO)和人白血病细胞系(K562),评价酸性磷酸酶(APA)法用于检测体外各类型细胞的增殖

和杀伤作用。用直线回归分析光吸收度与每孔活细胞数的关系。结果表明,APA法能准确地反映检测的活细胞数(相关系数均 >0.99)。本方法不仅能很好地检测表皮生长因子对细胞的增殖作用,也能够检测顺铂对体外细胞的杀伤作用。结果表明APA法简单、灵敏,可以用于上皮和间质等贴壁和悬浮生长的细胞计数。

关键词:细胞计数 酸性磷酸酶 细胞增殖 细胞损伤

参 考 文 献

- [1] Connolly DT, et al., 1986, *Anal. Biochem.*, 152:136-140.
- [2] 陈军等, 1997, *癌症*, 16:231-232.
- [3] Jauregui HO, et al., 1981, *In vitro.*, 17:1100-1103.
- [4] 肖冰等, 1994, 姜泊、张亚历、周殿元主编, *分子生物学常用实验方法*. 人民军医出版社. 北京. 第1版, 95-102.
- [5] 沈敏等, 1989, *上海第二医科大学学报*, 9:149-151.
- [6] 陈学清等, 1994, *胃肠病学和肝病杂志*, 3:279-281.
- [7] 陈学清等, 1997, *新消化病学杂志*, 5:357-359.

ACID PHOSPHATASE ASSAY (APA) FOR DETERMINATION OF CELL NUMBER IN CULTURE

CHEN Xue-qing YANG Xiao-ou PAN Guo-zong et al.

(Peking Union Medical College (PUMC) Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730)

ABSTRACT

An acid phosphatase assay (APA) for determination of the numbers of various cell types in culture was evaluated. 4 cell lines were used, including NIH3T3, SP2/0, LOVO (human colon cancer cell line) and K562 (human leukemic cell line). The cells were seeded into 96-well culture plates in different density, which were measured by APA, and linear regression was used to test the relationship of absorbance and cell number per well. The results showed that the relationship between cell number per well and absorbance determined by APA was excellent ($r > 0.99$ in 4 cell lines). Also, the proliferative curve of LOVO cells stimulated by epidermal growth factor and killing curve of LOVO cells treated with cisplatin were precisely recorded using APA. It was found that the assay could detect at least 25.80 cells per well, and reaction times recommended for APA should be between 2-3 hours. It is suggested that APA is a rapid, simple, precise and sensitive method for determination of cell number, including adherent and non adherent cells.

Key words: Cell number determination Acid phosphatases Cell proliferation Cell injury