

# MTT 法测定两种光敏剂对大肠癌细胞株 HR-8348 的光动力效应

何立明 蔡心涵 郑树 郁琳琳

(浙江医科大学肿瘤研究所, 杭州 310009)

**提要** 用人大肠癌细胞株 HR-8348 对激光光敏剂藻蓝蛋白(Phycocyanin)和蚕砂卟啉(CPD<sub>1</sub>)作光动力学治疗, MTT 法测定结果。在含有藻蓝蛋白 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 1640 培养液处理大肠癌细胞, 采用波长 630 nm 的铜泵染料激光照射(12  $\text{J}/\text{cm}^2$ )后, 测定细胞生存率分别为 22.1%, 37.6%, 89.7%, 各组间  $P$  值均小于 0.001。同样方法蚕砂卟啉含有 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  测得细胞生存率分别为 20.1%, 25.9%, 31.5%。MTT 法快速, 简便, 可用于多种光敏剂的筛选试验。

**关键词** MTT 法, 光敏剂, 光动力效应

## 1 引言

应用溴化四甲基偶氮唑盐(MTT)酶生物学的原理, 能反映细胞生存率的 MTT 试验<sup>[1]</sup>, 具有快速、简便的特点, 广泛用于肿瘤细胞的体外试验和临床筛选药物敏感试验<sup>[2,3]</sup>。我们用人大肠癌细胞株 HR-8348 对两种激光光敏剂藻蓝蛋白(Phycocyanin)和蚕砂卟啉(CPD<sub>1</sub>)在用激光光动力学治疗后, 以 MTT 法测定结果, 比较两者的光动力效应。

## 2 材料和方法

### 2.1 光敏剂

(1) 藻蓝蛋白由国家海洋局第二研究所提供; (2) 蚕砂卟啉由杭州民生制药厂生产。

### 2.2 试剂、仪器和细胞株

(1) MTT 由华美生物试剂技术公司进口分装; (2) 酶联免疫检测仪由南京华东电子管厂生产; (3) 激光光源为脉冲铜激光机, 由浙江大学机电设备厂生产; (4) 人大肠癌细胞株 HR-8348 由浙江省肿瘤研究所提供。

### 2.3 方法

大肠癌细胞株在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中含 15% 小牛血清的 1640 培养液生长至细胞旺盛时, 0.25% 胰酶消化, 吹散细胞均匀接种于 96 孔培养板中, 待细胞长至铺满孔底, 换成无小牛血清的培养液, 分别加入两种光敏剂的各个浓度培养液, 作用 4 小时后弃液体, 用 630 nm

的铜泵染料激光以同一光斑对 96 孔培养板中的细胞以  $12 \text{ J/cm}^2$  的能量密度照光。照毕用 Hanks 液洗两次,加入含小牛血清的培养液,继续放 24 小时后加 MTT 磷酸缓冲液,4 小时后用异丙醇终止反应,使 MTT 代谢成蓝紫色,由酶联仪比色定量打出各个细胞生成率的数据。

### 3 结 果

藻蓝蛋白治疗浓度为  $100 \mu\text{g/ml}$ ,  $50 \mu\text{g/ml}$ ,  $25 \mu\text{g/ml}$  加入 96 孔培养液板中,光照射后 MTT 法测得细胞生成率分别为 22.1%, 37.6%, 89.7%, 各浓度组间比较  $P$  值均小于 0.001, CPD<sub>4</sub> 组浓度为  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $5 \mu\text{g/ml}$ ,  $2.5 \mu\text{g/ml}$ , 照后生成率为 20.1%, 25.9%, 31.5%, 各浓度组间无明显差别(见表 1)。对照组不用激光照射,藻蓝蛋白组浓度为  $25 \mu\text{g/ml}$ ,  $50 \mu\text{g/ml}$ , 细胞生成率为 153% 和 88.2%; CPD<sub>4</sub> 浓度  $5 \mu\text{g/ml}$  时为 21.1%(见表 2)。

Table 1 Comparison of the photodynamic effect of phycocyanin and CPD<sub>4</sub> on the survival rates of cultured cells

	Phycocyanin ( $\mu\text{g/ml}$ )			CPD <sub>4</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	25	50	100	2.5	5.0	10.0
Groups	1	2	3	4	5	6
Means(%)	89.7	37.6	22.1	20.1	25.9	31.5
S. D.	31.0	17.6	12.4	9.4	20.0	25.9
P value	< 0.001 <sup>a</sup>		< 0.001 <sup>b</sup>	0.30 <sup>c</sup>		0.29 <sup>d</sup>

Comparison between groups: A: 1:2; B: 2:3; C: 4:5; D: 5:6;

Comparison between group 4 and 6,  $P = 0.09$

Table 2 Comparison of effect of phycocyanin and CPD<sub>4</sub> of different concentrations on the survival rates of cultured cells

	8348 cells		Phycocyanin ( $\mu\text{g/ml}$ )		CPD <sub>4</sub> ( $5 \mu\text{g/ml}$ )
	Irradiated	Nonirradiated	25	50	
Groups	1	2	3	4	5
Means(%)	99.4	93.1	153.0	88.2	21.1
S. D.	15.5	20.9	35.8	9.5	13.2
P value	0.13 <sup>a</sup>		< 0.001 <sup>b</sup>	0.02 <sup>c</sup>	< 0.001 <sup>d</sup>

Comparison between groups: A: 1:2; B: 1:3; C: 1:4; and D: 1:5;

Except group 2, all were not irradiated.

Table 3 Comparison of photodynamic effect of phycocyanin and CPD<sub>4</sub> on the survival rates of culture cells

	Phycocyanin ( $50 \mu\text{g/ml}$ )		CPD <sub>4</sub> ( $5 \mu\text{g/ml}$ )	
	Nonirradiated	Irradiated	Nonirradiated	Irradiated
Means (%)	88.2	37.6	21.1	25.9
S. D.	9.5	17.6	13.2	20.0
t value	9.0		0.7	
P value	<0.001		0.26	

藻蓝蛋白和 CPD<sub>1</sub> 分别用浓度 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 以照光和不照光再测定细胞生成率, 前者为 37.6% 和 88.2%,  $P$  值小于 0.001, 显示有明显的光动力效应; 后者照光后细胞生成率为 25.9%, 而不照光亦有 21.1%, 显示有否照光差别不大(见表 3)。

实验还显示 HR-8348 细胞在无光敏剂的作用下有否照射激光对细胞生成率无显著差别(见表 2)。

## 4 讨 论

目前我国已研制出新的光敏剂<sup>[4]</sup>, 但成本较高。藻蓝蛋白从海洋生物螺旋藻中提取, 由于其维生物、氨基酸、矿物质和微量元素极为丰富, 而脂质和可消化吸收的糖类物质含量低, 已作为广泛的保健食品和药物的开发利用<sup>[5]</sup>。1988 年 Morcos<sup>[6]</sup> 首先用藻蓝蛋白照射小鼠骨髓瘤细胞后发现细胞的存活率仅 15%, 而单纯激光照射瘤细胞或加藻蓝蛋白但不照光的生成率有 69% 和 71%。我们应用人大肠癌细胞株含有藻蓝蛋白经激光照射后, 细胞生存率随着藻蓝蛋白的浓度增高而降低, 有良好的线性关系, 各浓度组间有显著差异, 显示有明显的剂量效应和光动力效应, 其结果优于 CPD<sub>1</sub>, 二者在对 NIH 小鼠 S180 移植瘤的实验中也有类似的结果<sup>[7]</sup>。藻蓝蛋白既是一种营养保健食品, 用于光动力学治疗就不必避光, 值得进一步研究和开发利用。

实验中使用的藻蓝蛋白浓度高于 CPD<sub>1</sub> 的 10 倍, 是由于在预试验中发现 CPD<sub>1</sub> 在高于 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时, 不照光细胞也几乎全部死亡, 说明该药的浓度不宜过大<sup>[9]</sup>。而藻蓝蛋白在较小的浓度下不能有效地反映光动力效应。一定浓度(如 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )时的藻蓝蛋白使细胞的生存率明显增高, 可能是该制品对细胞有促生长作用<sup>[9]</sup>。

MTT 试验快速、简便, 结果重复性好, 可半自动操作, 显色定量可减少主观性, 适用于多种光敏剂的筛检试验。

## 参 考 文 献

- 1 Mosmann T. . Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Method*, 1983, 65:55~63
- 2 鱼 达, 郁琳琳. 四氮唑盐(MTT)法测定 K562 细胞化疗敏感的最适条件. *中国药理学报*, 1993, 14(2): 137~140
- 3 辛华雯, 王润帮, 杜光祖 等. MTT 法在恶性肿瘤体外药物敏感试验中的临床应用. *实用癌症杂志*, 1994, 9(2):73~75
- 4 许德余, 陈文晖, 张 洁 等. 光动力新药血卟啉单甲醚 HMME 的研究. *中国激光医学杂志*, 1993, 2(1):1~3
- 5 范 晓, 韩丽君, 郑乃余. 我国常见食用海藻的营养成份分析. *中国海洋药物杂志*, 1993, 48(4):32~38
- 6 Morcos N. C., Berns M., Henry W. L. . Phycocyanin laser activation cytotoxic affects and uptake in human atherosclerotic plaque. *Lasers Surg. Med.*, 1988, 8(1):7~10
- 7 蔡心涵, 郑 树, 何立明 等. 藻蓝蛋白-激光治疗小鼠 S180 移植瘤的实验研究. *中国癌症杂志*, 1994, 4(1):33~35
- 8 崔俊辉, 郑 树, 吴金民 等. 叶绿素衍生物 CPD<sub>1</sub> 和脉冲铜激光对小鼠移植瘤的光动力学效应的研究. *中华肿瘤杂志*, 1994, 16(2):106~109
- 9 张成武. 微藻中的生物活性物质. *中国海洋药物杂志*, 1992, 43(2):20~29

## The Photodynamic Effect of 2 Photosensitizers on Colon Cancer Line HR-8348 Measured with MTT Assay

He Liming Cai Xinhan Zheng Shu Yu Lingling  
(Cancer Institute, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310009)

**Abstract** The photodynamic effect of 2 photosensitizers, phycocyanin and CPD<sub>4</sub>, on colon cancer line HR8348, was measured with MTT assay. HR8348 cells were incubated in RPMI-1640 medium containing a series of concentrations of phycocyanin (100, 50 and 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and subsequently subjected to an irradiation of a pulsed copper vapour laser at the wavelength of 630 nm and a fluence of 12 J/cm<sup>2</sup>. The cell survival rates were 22.1, 37.6 and 89.7%, respectively, ( $P < 0.001$ ). The survival rates of cells treated with another photosensitizer, CPD<sub>4</sub>, at the concentrations of 10, 5 and 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , were otherwise 20.1%, 25.9% and 31.5%. MTT was a speedy and handy approach for screening photosensitizers.

**Key words** MTT, photosensitizer, photodynamic

## 全国激光加工产业应用研讨会在上海召开

由中国光学学会激光加工专业委员会和上海市发展新兴技术和新兴工业办公室主办、上海激光(集团)总公司承办的“全国激光加工产业应用研讨会”于1995年10月19~21日在上海市漕河泾高新技术开发区召开,50余名专家出席了会议。

会议交流了激光加工产业的发展情况和工作经验;探讨了发展激光加工产业的方法和途径;发布激光加工设备的研究、制造和攻关成果。

激光加工是制造技术中的新技术,它在诸如切割、焊接、热处理、雕刻、打标、毛化、快速成形等方面加工时所表现出的先进性以及所带来的经济效益,已逐步地确立了它在制造业中的地位。与会专家评估了激光加工产业的市场和发展潜力,号召激光科学家和企业家携手合作,进一步开拓我国的激光加工产业。

我国大约在70年代初便开始用激光进行工业加工。到目前,我国在微电子工业、汽车工业、钢铁工业、造船工业、石油工业、航空航天工业和铁道工业已经用上了激光技术。激光加工产业的产值逐年上升,去年的产值约4千万元。

(纪 钟)