

细胞增殖的检测方法

谭亚琦 何焱玲

摘要 细胞增殖一直是生物医学领域研究的热点之一,细胞增殖的检测方法种类繁多,目前主要分为以下几类:代谢活性检测有 MTT 法、XTT 法、MTS 法、WST-1 法、CCK-8 法、CFDA-SE 法、AlamarBlue 及 PrestoBlue 法;DNA 合成检测有³H-TdR 掺入法、BrdU 法及 EdU 法;细胞增殖相关抗原检测有 PCNA 和 Ki67。本文就细胞增殖的各种检测方法各自的优缺点做一综述,以期为科研及临床工作者提供一定的参考。

关键词 细胞增殖 检测方法

中图分类号 R331

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.12.002

细胞增殖是生命体的重要特征,是指细胞经过 DNA 复制、RNA 转录和蛋白质合成等反应而进行的分裂过程。细胞增殖检测是指检测分裂中的细胞数量或者细胞群体发生的变化,细胞增殖检测技术广泛应用于分子生物学、肿瘤生物学、药理和药代动力学等研究领域,不仅在研究细胞的基本生物学特征中非常重要,而且是分析细胞状态、研究遗传性状的一种基本方法,可为探讨疾病的发病机制、诊断疾病及治疗疾病提供有价值的资料。检测细胞增殖的方法目前主要分为代谢活性检测、DNA 合成检测、细胞增殖相关抗原检测等。

一、代谢活性检测

1. MTT 法(噻唑蓝比色法):MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]商品名是噻唑蓝,Mosmann 于 1983 年建立 MTT 比色法。其原理是利用活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶在代谢过程中,能将可溶性四唑盐 MTT 还原为不溶于水的蓝紫色甲臌(formazan)晶体,使用二甲亚砜(DMSO)溶解细胞中的甲臌,酶标仪测定其吸光度值(optical density, A)。由于甲臌生成量与活细胞数量呈正相关,故 A 值可间接反映活细胞的相对数量。此方法简便、经济、快速且无放射性,而被广泛用于各种细胞增殖检测、细胞因子的活性检测及大规模药物筛选^[1]。但因其需要加入 DMSO 溶解甲臌颗粒,且往往因溶解不全而对实验结果造成影响,故重复性差,此外 MTT 结果还受培养环境的影响,重金属

及过氧化物的存在会影响 MTT 检测的准确性^[2,3]。

2. XTT 法(二甲氧唑磺比色法):XTT[2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide]由 Paull KD 等于 1988 年首次合成。XTT 是一种与 MTT 相类似的四唑氮衍生物,经线粒体脱氢酶作用,被活细胞还原成水溶性的棕黄色甲臌,在电子偶合剂如硫酸酚嗪甲脂(PMS)存在时,甲臌的生成量与活细胞数量呈正相关。XTT 法无需溶解还原产物结晶,故较 MTT 法简便、快速,此方法已用于各种细胞增殖的检测、药物筛选、细胞毒性检测等。其缺点是 XTT 只有与电子偶合剂共同使用时才可产生足够的水溶性甲臌,XTT 水溶液不稳定,必须现用现配,此外培养体系中过氧化物的存在及某些代谢产物和试剂会影响检测结果的准确度,这些缺点也限制了 XTT 法的应用^[3]。

3. MTS 法(内盐法):MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium]法检测细胞增殖与 XTT 法相类似,其在偶联剂 PMS 存在时,可被活细胞线粒体中的脱氢酶还原成水溶性的甲臌,测定溶液的 A 值间接反映活细胞的数量。此法无放射性,方便快捷^[4,5]。

4. WST-1 法(四唑单钠盐法):WST-1[2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium]是日本同仁化学研究所(Dojindo)开发的第一个水溶性四唑盐,可被线粒体内的脱氢酶还原成橙黄色的甲臌产物,其产量与活细胞数量呈正相关。与 XTT、MTS 相比,WST-1 产生的甲臌是水溶性的,无需 MTT 的后续溶解步骤,且 WST-1 更加稳定,其产物更易溶解,故而实验结

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81371733)

作者单位:100020 首都医科大学附属北京朝阳医院皮肤科

通讯作者:何焱玲,电子信箱:heyanning@medmail.com.cn

果更稳定,准确性更高^[6]。而且 WST-1 加入后,可在多个时间点多次测定 A 值,便于找到最佳测定时间。

5. Cell Counting Kit-8 (CCK-8): WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphonyl)-2H-tetrazolium] 是 CCK-8 的主要成分, WST-8 也是 Dojindo 开发的水溶性四唑盐,它在电子载体作用下被细胞线粒体中的脱氢酶氧化还原为高度水溶性的橙黄色甲臢产物,检测原理同 WST-1。CCK-8 溶液可以直接使用,无需预配各种成分,而且比 WST-1 更加稳定,产物更易溶解,故而敏感度高、结果准确、重复性好,常用于细胞增殖测定或毒性实验,是一种操作简便、无放射性的比色检测法^[7-9]。更为特殊的是,使用 CCK-8 法对细胞的毒性非常低,细胞经 CCK-8 检测后还可重复用于后续检测实验,有利于降低实验成本。

6. CFDA-SE 法: CFDA-SE (succinimidyl ester of carboxyfluorescein diacetate, 羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯) 是一种膜通透性的荧光素染料,包含一个琥珀酰酯功能基团和两个乙酸盐部分,后者使分子具有膜通透性,可以自由扩散进入细胞内,细胞内的酯酶可去除其乙酸盐基团,使其转变为具有绿色荧光的羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE), CFSE 通过其琥珀酰亚胺基团结合到细胞内氨基上,形成较稳定的酰胺结合物。当细胞分裂时, CFSE 荧光可被平均分配到两个子代细胞中,故而在一个增殖细胞群中,各连续传代细胞荧光强度以 1/2 递减,利用流式细胞术即可分析细胞的增殖情况。CFDA-SE 自 1994 年用于淋巴细胞增殖检测,后又应用于单核细胞、成纤维细胞等; CFDA-SE 标记细胞,没有放射性,而且可根据荧光强度判断细胞的分裂次数;不仅用于体外研究,还可作为示踪剂进行体内研究^[10, 11]。

7. AlamarBlue 和 PrestoBlue: 2011 年 Life Technology 公司陆续推出了 AlamarBlue 和 PrestoBlue 细胞活性检测试剂盒,可在短时间内快速获得细胞活性检测结果。主要有效成分为刃天青 (resazurin),其原理为 AlamarBlue 和 PrestoBlue 作为氧化还原剂指示剂,在氧化状态下无荧光性,而具有代谢活性的细胞可将试剂转换成荧光和比色指示剂,产生荧光信号和吸光度变化,并与活性细胞数呈正比,而受损细胞和无活性细胞具有较低的代谢活性,因此对应的信号较低。试剂为水溶性,在培养基中稳定,且对细胞无毒性,检测

时只需将单一试剂直接加入悬浮细胞或贴壁细胞的完全培养基中,操作简便,可随时间重复测量或进行终点测量,尤其适用于自动化操作及高通量分析,还可在检测结束后回收细胞用于进一步分析或细胞扩增。该试剂可用于细胞增殖、细胞毒性、细胞因子生物活性检测等^[12, 13]。

二、DNA 合成检测

1. 胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR) 掺入法: ³H-TdR 掺入法是用氚 (³H) 标记胸腺嘧啶核苷,即 ³H-TdR 作为 DNA 合成的前体掺入 DNA 合成代谢的过程,通过测定细胞的放射性强度,可以反映 DNA 的复制情况。早期主要用于细胞增殖检测和药物敏感度实验等^[14]。³H-TdR 掺入法虽然敏感度高、特异性强,但由于试剂中带有放射性核素,操作过程中存在放射性危害,故使用上受到很大限制,而且此技术操作繁琐,耗费时间较长,不适用于需要快速完成的实验。

2. 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 法: BrdU (bromodeoxy uridine) 是一种胸腺嘧啶核苷类似物,其胸腺嘧啶环与 5 位 C 连接的甲基被溴取代, BrdU 在 DNA 合成过程中可以代替脱氧胸腺嘧啶核苷掺入到新合成的 DNA 中,加入 BrdU 抗体通过免疫化学方法即可识别新增殖的细胞。相对于 ³H-TdR 法, BrdU 法要快的多,而且染色结果易于镜下观察。但是此方法的缺点在于 BrdU 抗体分子较大,双链 DNA 中互补配对的碱基阻断了 BrdU 抗体与 BrdU 亚单位的结合,为了暴露其抗原表位,细胞或组织标本必须经过变性处理 (酸解、酶解、热解等),而 DNA 变性处理破坏了 DNA 的双链结构,会影响其他染料的结合染色,导致染色弥散,影响实验结果的准确性;另外, DNA 变性有可能破坏细胞内蛋白的抗原识别位点,无法在 BrdU 检测中同时检测其他蛋白。

3. 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶 (EdU) 法: 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU, EdU) 是一种胸腺嘧啶核苷类似物,由乙炔基取代了脱氧胸腺嘧啶环上与 5 位 C 连接的甲基,能在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶掺入正在复制的 DNA 分子中。Salic 等^[15]首次将 EdU 用于检测和标记哺乳动物增殖细胞的 DNA 合成;而后有研究者将 EdU 用于标记鸡胚细胞、果蝇细胞等动物细胞并取得良好效果^[16, 17]。EdU 标记技术是基于其乙炔基能与荧光染料标记的小分子叠氮化合物探针反应,形成较稳定的三唑环,同时,由于这一反应在生物学系统中并不多见,而使得检测产生的背景干预小,敏感度高^[18]。

BrdU 抗体检测细胞增殖时间较长,而应用 EdU 法检测新合成的 DNA 仅需要 1~4h。EdU 标记后,细胞经过固定、透化处理,再和荧光染料试剂孵育 30min,即可用于快速检测细胞 DNA 复制活性,适用于细胞增殖、DNA 修复、细胞标记示踪等方面的研究检测。检测方式可选用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪。与 BrdU 检测方法相比,EdU 法更加快速、灵敏、准确,EdU 染料只有 BrdU 抗体的 1/500,能够轻松透过膜结构,在细胞内容易扩散,而且无需 DNA 变性处理,可有效避免样品损伤,保证双链 DNA 结构的完整性,能在细胞水平更准确地反映 DNA 的复制活性。EdU 染色不会破坏细胞的形态学特征及细胞核抗原识别位点,可以与细胞周期分析在内的其他 DNA 染色相结合,还可以结合其他抗体标记技术,对细胞进行多重检测和多参数分析^[19, 20]。

三、细胞增殖相关抗原检测

1. PCNA: 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 由 Miyachi 等^[21]于 1978 年在系统性红斑狼疮患者血清中首次发现,因其主要表达在多种组织及细胞系的处于增殖期的细胞核而得名,是和细胞周期相关的 36kDa 的核蛋白,作为 DNA 聚合酶 δ 的辅助因子发挥功能,是细胞 DNA 复制过程中的关键因子之一。PCNA 分为可溶性和不可溶性两种,前者在细胞周期各期中均有表达,其含量在 DNA 合成中无明显变化;后者在 G_0 期无表达, G_1 晚期表达增加,S 期表达最高, G_2 期至 M 期逐渐下降,其含量变化与 DNA 合成一致,因此 PCNA 可用于检测处于增殖状态的细胞。研究发现,PCNA 可用于判断恶性肿瘤细胞的增殖,对肿瘤的治疗及判断预后有一定的意义^[22, 23]。

2. Ki67: Ki67 抗原是表达于增殖期细胞的核抗原,1983 年 Gerdes 及其同事利用霍奇金淋巴瘤系 L428 细胞免疫小鼠时制备出了 Ki67 抗体,因研究地点在 Kiel University,产生该抗体的培养板编号为 67,故而命名为 Ki67。由相对分子质量为 345kDa 和 395kDa 的两条多肽链组成,其确切功能目前尚未明确,此抗原可能是为 DNA 复制提供场所的核基质及染色体支架的一种组分,具有非组蛋白的特点。Ki67 可表达在除 G_0 期以外的其他细胞周期中,其单克隆抗体可标记 G_1 后期、S 期、 G_2 期和 M 期细胞核,而 G_0 期和 G_1 早期细胞核不被标记。研究显示,Ki-67 可用于判定细胞的增殖活性,用来识别生长中的正常细胞和肿瘤细胞,在多种肿瘤中均有显著改变,不仅

是确定良、恶性组织生长状态的一种标记,而且在部分肿瘤的组织学分型、肿瘤分级及预后转归中具有一定的意义。

除上述这些细胞增殖的检测方法外,还可以检测 ATP 等酶活性、钙离子内流、细胞膜完整性等,每种检测方法都存在各自的优缺点,研究者应根据不同的实验目的,尽量选择准确性高、重复性好的检测方法或将多种检测方法结合,从而客观、全面地反映实验结果。

参考文献

- Moodley S, Koorbanally NA, Moodley T, *et al.* The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay is a rapid, cheap, screening test for the in vitro anti-tuberculous activity of chalcones [J]. *J Microbiol Methods*, 2014, 104(9): 72-78
- Halmi MI, Ahmad F, Hashim AK, *et al.* Effect of bacterial growth period on the sensitivity of the MTT assay for silver [J]. *J Environ Biol*, 2014, 35(2): 353-355
- Wang S, Yu H, Wickliffe JK. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO_2 [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(8): 2147-2151
- Chan GK, Kleinheinz TL, Peterson D, *et al.* A simple high-content cell cycle assay reveals frequent discrepancies between cell number and ATP and MTS proliferation assays [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63583
- Chen J, Cheng GH, Chen LP, *et al.* Prediction of chemotherapeutic response in unresectable non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(5): 3057-3062
- Yin LM, Wei Y, Wang Y, *et al.* Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(1): 68-72
- Stoddart MJ. WST-8 analysis of cell viability during osteogenesis of human mesenchymal stem cells [J]. 2011, 740(3): 21-25
- Tsukatani T, Suenaga H, Shiga M, *et al.* Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria [J]. *J Microbiol Methods*, 2012, 90(3): 160-166
- Tiwari K, Wavdhane M, Hague S, *et al.* A sensitive WST-8-based bioassay for PEGylated granulocyte colony stimulating factor using the NFS-60 cell line [J]. *Pharm Biol*, 2014, 25(11): 1-6
- Zhang K, Pang K, Wu X. Isolation and transplantation of corneal endothelial cell-like cells derived from in vitro-differentiated human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells & Development*, 2014, 23(12): 1340-1354
- Jbeily N, Claus RA, Dahlke K, *et al.* Comparative suitability of CFDA-SE and rhodamine 6G for in vivo assessment of leukocyte-endothelium interactions [J]. *J Biophotonics*, 2014, 7(6): 369-375

(转第 5 页)

- Dis, 2016, 16:237
 - 12 吴克复,郑国光,马小彤,等. 肿瘤的微进化及其临床意义[J]. 白血病·淋巴瘤, 2014, 23 (10) : 577-580
 - 13 吴克复,郑国光,马小彤,等. 白血病的克隆性演化[J]. 中国实验血液学杂志, 2015,23(1):1-5
 - 14 Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations [J]. Science, 1976, 194(4260):23-28
 - 15 Gerlinger M, McGranahan N, Dewhurst SM, *et al.* Cancer: Evolution within a lifetime [J]. Annu Rev Genet, 2014, 48:215-236
 - 16 Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, *et al.* Cancer Genome landscapes [J]. Science, 2013, 339(6127): 1546-1558
 - 17 McFarland CD, Mirny LA, Korolev KS. Tug-of-war between driver and passenger mutations in cancer and other adaptive processes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(42):15138-15143
 - 18 Pencik J, Pham HTT, Schmoellerl J, *et al.* JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome [J]. Cytokine, 2016, 87: 26-36
 - 19 Klein G. Lymphoma development in mice and humans: Diversity of initiation is followed by convergent cytogenetic evolution [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(5): 2442-2446
 - 20 吴克复,郑国光,马小彤. 多克隆细胞系的研究价值[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(5):909-912
 - 21 褚建新,李肇玫. 615 近交系小鼠及其在实验肿瘤研究中的应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 1989
 - 22 Paguirigan AL, Smith J, Meshinchi S, *et al.* Single-cell genotyping demonstrates complex clonal diversity in acute myeloid leukemia [J]. Sci Transl Med, 2015, 7(281):281re2
 - 23 Ojha J, Ayres J, Secreto C, *et al.* Deep sequencing identifies genetic heterogeneity and recurrent convergent evolution in chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood, 2015, 125(3): 492-498
 - 24 Chen H, He X. The convergent cancer evolution toward a single cellular destination [J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(1):4-12
 - 25 Cunningham JJ, Brown JS, Vincent TL, *et al.* Divergent and convergent evolution in metastases suggest treatment strategies based on specific metastatic sites [J]. Evol Med Public Health, 2015, 2015(1): 76-87
 - 26 吴克复,郑国光,马小彤,等. 肿瘤休眠的机制及其意义[J]. 白血病·淋巴瘤, 2016, 25 (3) :129-133
 - 27 Li S, Garrett-Bakelman FE, Chung SS, *et al.* Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia[J]. Nat Med, 2016, 22(7):792-799
 - 28 Guèze R, Wu CJ. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood, 2015, 126(4): 445-453
 - 29 Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D, *et al.* Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19 (16): 2449-2455
 - 30 Noss EH, Nguyen HN, Chang SK, *et al.* Genetic polymorphism directs IL-6 expression in fibroblasts but not selected other cell types [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2015, 112(48): 14948-14953
 - 31 Bruzzoni-Giovanelli H, Gonzalez JR, Sigaux F, *et al.* Genetic polymorphisms associated with increased risk of developing chronic myelogenous leukemia [J]. Oncotarget, 2015, 6(34): 36269-36277
 - 32 Qidwai T, Khan MY. Impact of genetic variations in C-C chemokine receptors and ligands on infectious diseases [J]. Hum Immunol, 2016, 77(10):961-971
- (收稿日期:2016-09-23)
(修回日期:2016-09-28)
-
- (接第 8 页)
- 12 Boncler M, Rozalski M, Krajewska U, *et al.* Comparion of Presto Blue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2014, 69(1): 9-16
 - 13 Xu M, McCanna DJ, Sivak JG. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2015, 71(1):1-7
 - 14 Ye Q, Ding SF, Wang ZA, *et al.* Influence of ribosomal protein L39-L in the drug resistance mechanisms of lacrimal gland adenoid cystic carcinoma cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15 (12): 4995-5000
 - 15 Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(7): 2415-2420
 - 16 Warren M, Puskarczyk K, Chapman SC. Chick embryo proliferation studies using EdU labeling [J]. Dev Dyn, 2009, 238(4): 944-949
 - 17 Daul AL, Komori H, Lee CY. EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine) labeling of Drosophila mitotic neuroblasts [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2010, 2(7): t5461
 - 18 Buck SB, Bradford J, Gee KR, *et al.* Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies [J]. Biotechniques, 2008, 44(7): 927-929
 - 19 Li B, Zhao H, Rybak P, *et al.* Different rates of DNA replication at early versus late S-phase sections: multiscale modeling of stochastic events related to DNA content/EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine) in corporation distributions [J]. Cytometry A, 2014, 85(9): 785-797
 - 20 Bourge M, Fort C, Soler MN, *et al.* A pulse-chase strategy combining click-EdU and photoconvertible fluorescent reporter: tracking Golgi protein dynamics during the cell cycle [J]. New Phytol, 2015, 205(2): 938-950
 - 21 Naryzhny N, Desouzal V, Siuk W, *et al.* Characterization of the human proliferating cell nuclear antigen physicochemical properties aspects of double trimer stability [J]. Biochem Cell Biol, 2006, 84 (5): 669-676
 - 22 Mahler M, Miyachi K, Peebles, *et al.* The clinical significance of autoantibodies to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) [J]. Autoimmun Rev, 2012, 11(10): 771-775
 - 23 Yildirim A, Kosem M, Sayar I, *et al.* Relationship of PCNA, C-erbB2 and CD44s expression with tumor grade and stage in urothelial carcinomas of the bladder [J]. International Journal of Clinical & Experimental Medicine, 2014, 7(6): 1516-1523
- (收稿日期:2015-02-11)
(修回日期:2015-03-10)