

## 4 种细胞毒活性方法评价紫草素体外肿瘤细胞抑制作用效果

柴冰阳<sup>1,2</sup>, 陈泽慧<sup>1,2</sup>, 张闪闪<sup>1,2</sup>, 应雪<sup>1,2</sup>, 张波<sup>1,2\*</sup>

1. 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002

2. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002

**摘要:** **目的** 研究4种细胞毒活性测定方法对紫草素体外肿瘤细胞抑制作用的评价效果,对紫草素为代表的天然色素在细胞毒活性评价中常出现的假阴性现象进行对比分析。**方法** 将紫草素与其高敏感株急性早幼粒白血病 HL-60 细胞和低敏感株人非小细胞肺癌 A549 细胞体外共培养,通过台盼蓝法、磺酰罗丹明 B (SRB) 法、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法和四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法进行平行实验,测定紫草素在 0.4~128  $\mu\text{mol/L}$  抑制细胞生长的量效关系曲线。**结果** 台盼蓝法、SRB 法、CCK-8 法、MTT 法测得紫草素对 HL-60 细胞的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 分别为 0.57、0.77、1.36、1.01  $\mu\text{mol/L}$ ,对 A549 细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为 6.30、10.38、13.48、15.24  $\mu\text{mol/L}$ 。紫草素浓度分别在 3.2、32  $\mu\text{mol/L}$  以下时,4种检测方法得到其对2种细胞的抑制率均呈线性增长,超过此浓度即出现差异。其中台盼蓝法与 SRB 法结果一致性良好,而 MTT 法与 CCK-8 法测得的抑制率较低。对于 HL-60 细胞,紫草素 12.8  $\mu\text{mol/L}$  时,CCK-8 测得抑制率为 81%,台盼蓝法为 96%;对于 A549 细胞,紫草素 128  $\mu\text{mol/L}$  时,MTT 法测得抑制率为 89%,台盼蓝法为 99%。紫草素的吸收光谱与甲臞在波长 400~600 nm 存在重叠,最大重叠峰在 550~570 nm,CCK-8 试剂与紫草素对 HL-60 细胞存在协同抑制效应。台盼蓝法结果显示高浓度紫草素几乎完全杀死板孔内细胞,相比对照组差异显著,但 MTT 法和 CCK-8 法结果出现假阴性。**结论** 紫草素为代表的天然色素的细胞毒活性评价不建议使用 MTT 法和 CCK-8 法,推荐使用 SRB 法和台盼蓝法。

**关键词:** 紫草素; 细胞毒活性评价; 四甲基偶氮唑盐法; 磺酰罗丹明 B 法; CCK-8 法; 台盼蓝法

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)01-0172-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.026

## Evaluation effects of four cytotoxicity methods on *in vitro* inhibition of shikonin against tumor cells

CHAI Bing-yang<sup>1,2</sup>, CHEN Ze-hui<sup>1,2</sup>, ZHANG Shan-shan<sup>1,2</sup>, YING Xue<sup>1,2</sup>, ZHANG Bo<sup>1,2</sup>

1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education, Shihezi 832002, China

2. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China

**Abstract: Objective** To study the effects of four cytotoxicity evaluation methods on the inhibition rate of shikonin (SK) *in vitro*, and to compare the pseudo-negative phenomenon often found in the evaluation of cytotoxic activity of natural pigments represented by naphthoquinones in *Lithospermum erythrorhizon*. **Methods** SK was co-cultured with its high-sensitive strain HL-60 cells and low-sensitivity strain A549 cells, trypan blue method, sulforhodamine B (SRB) method, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) and MTT cytotoxicity test were used for parallel experiments to determine the dose-effect relationship curve of SK (0.4—128  $\mu\text{mol/L}$ ) inhibiting the growth of cells. **Results** The half-inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of shikonin on HL-60 cells was determined by trypan blue method, SRB method, CCK-8 method, and MTT method, which was 0.57, 0.77, 1.36, and 1.01  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. For A549 cells, the  $\text{IC}_{50}$  was 6.30, 10.38, 13.48, and 15.24  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. When the concentration of shikonin was below 3.2  $\mu\text{mol/L}$  and 32  $\mu\text{mol/L}$ , the inhibition rate of the two kinds of cells increased linearly by the four methods, followed by differences. Among them, the results of the trypan blue method and the SRB method are in good agreement, while the MTT method and the CCK-8 method have lower inhibition rates. At 12.8  $\mu\text{mol/L}$ , the inhibitory rate of SK on HL-60 cell measured by CCK-8 was 81%, while the inhibitory rate measured by trypan blue method was 96%, and at 128  $\mu\text{mol/L}$  the inhibitory rate of SK on A549 cells measured by MTT method was 89%, however, the inhibitory rate measured by trypan blue method was 99%. The absorption spectrum of SK overlapped with formazan

收稿日期: 2018-05-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460566); 国家自然科学基金资助项目 (U1603122)

作者简介: 柴冰阳 (1995—), 女, 硕士, 从事肿瘤药理学研究。Tel: 18119257611 E-mail: 1113115779@qq.com

\*通信作者 张波 (1978—), 男, 研究生导师, 教授, 从事系统药理学与中药药理学研究。Tel: (0993)2057670 E-mail: bozhang\_lzu@126.com

at the wavelength from 400 to 600 nm, with the maximum overlap peak from 550 to 570 nm, and CCK-8 reagent had a synergistic inhibitory effect on HL-60 with SK. The results of trypan blue method showed that SK at the highest dose almost completely killed cells in the plate wells, which was significantly different from the control group, but both MTT method and CCK-8 method resulted in a pseudo-negative phenomenon. **Conclusion** Therefore, cytotoxicity test of natural pigments represented by naphthoquinones in *L. erythrorhizon*, MTT method, and CCK-8 method are not recommended, while SRB method and trypan blue method are suggested.

**Key words:** shikonin; evaluation of cytotoxicity; MTT assay; sulforhodamine B method; cell counting kit-8; trypan blue method

四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法是 1983 年由 Mosmann 提出的用于快速测量细胞增殖、细胞活性及细胞毒性的方法<sup>[1]</sup>, 因其价格低廉, 简单灵敏而被广泛应用于抗肿瘤药物筛选。台盼蓝拒染法 (trypan blue exclusion test, TBEX) 是检测体外培养细胞存活率的常用方法。磺酰罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB) 法是美国国立肿瘤研究所 (NCI) 认可的标准抗肿瘤筛选方法<sup>[2]</sup>, SRB 与细胞内组成蛋白质的碱性氨基酸结合来标示细胞增殖情况, 因无操作时间限制而用于高通量药物筛选。Cell counting kit-8 (CCK-8) 法因操作简便、准确度和灵敏度高而被广泛使用<sup>[3]</sup>, WST-8 在电子载体 1-甲氧基-5-甲基吩噻嗪磺酸二甲酯 (1-methoxy PMS) 存在的情况下被细胞内脱氢酶还原成水溶性的甲臜, 并与活细胞数量成正比。CCK-8 法是 MTT 法的升级版, SRB 法常用于与 MTT 法互相验证。在长期使用 MTT 比色法过程中, 发现 MTT 可能与化学试剂发生反应, 药物对线粒体功能产生影响也会干扰药物的药效<sup>[4]</sup>, 色素类受试物可能会干扰 MTT 的检测效率。

以紫草萘醌为代表的天然色素有凉血、活血、清热、解毒的功能, 其中紫草素及其衍生物已被证实有抗菌、抗炎和抗肿瘤的药理作用<sup>[5-6]</sup>。在前期的文献检索和对比中发现紫草素的细胞毒活性差异较大<sup>[7-14]</sup>, MTT 法的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 结果偏高, 认为萘醌色素可能对 MTT 法的结果存在干扰。本研究以紫草素高敏感株急性早幼粒白血病 HL-60 细胞和其低敏感株人非小细胞肺癌 A549 细胞为模型, 选取最常用的 TBEX 法、SRB 法、CCK-8 法和 MTT 比色法展开对比研究。

## 1 材料

### 1.1 细胞

HL-60 细胞购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, A549 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

### 1.2 药物与试剂

紫草素 (批号 SLBL2993V, 质量分数 ≥ 98%)、

台盼蓝 (批号 620C058) 和 SRB (批号 05605DC) 试剂盒均购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清购自美国 Biological Industries 公司; IMDM 培养基和 DMEM-F12 培养基购自 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学公司; MTT 试剂盒购自北京索莱宝公司。

### 1.3 仪器

Thermo 3131 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司; ZHJH 1112B 超净工作台购自上海智城分析仪器制造有限公司; BDS200-PH 倒置生物显微镜购自重庆奥特光学仪器有限公司; Thermo VarioFlash 3001 多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

HL-60 细胞用含 20% 胎牛血清、100 kU/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 IMDM 培养液 (pH 7.5) 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。A549 细胞使用含 10% 胎牛血清、100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM-F12 培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。

### 2.2 TBEX 法测定细胞抑制率

取对数生长期的细胞用完全培养液调整细胞浓度为  $2 \times 10^5$  个/mL, 接种于 24 孔板内, 每孔 1 mL, 设对照组和紫草素各浓度组。HL-60 细胞分别加入 0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 μmol/L 的紫草素, A549 细胞加入 4、8、16、32、64、128 μmol/L 的紫草素, 每组设 6 个平行孔。在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养 24 h 后收集细胞, 经 0.4% 台盼蓝染色后, 拍照并计数活细胞, 计算细胞抑制率<sup>[15]</sup>。

抑制率 =  $1 - \frac{\text{实验组活细胞数}}{\text{对照组活细胞数}}$

### 2.3 MTT 法测定细胞抑制率

取对数生长期的细胞用完全培养液调整细胞浓度为  $4 \times 10^4$  个/mL, 96 孔培养板每孔接种 200 μL, 分组及给药同“2.2”项下, 每组设 6 个复孔, 37 °C 培养 24 h。每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 g/L), 继续培养 4 h, 悬浮细胞 1 000 r/min 离心 10 min 弃上

清, 贴壁细胞直接弃上清后, 加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡 10 min, 酶标仪检测 570 nm 处吸光度 (A) 值, 并根据公式计算抑制率<sup>[16]</sup>。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{对照}}$$

### 2.4 SRB 法测定细胞抑制率

取对数生长期的细胞用完全培养液调整细胞浓度为  $4 \times 10^4$  个/mL, 96 孔培养板每孔接种 200  $\mu\text{L}$ , 分组及给药同“2.2”项下, 每组设 6 个复孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后终止培养。贴壁细胞每孔轻柔加入 50  $\mu\text{L}$  经 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 500 mL/L 三氯醋酸, 静置 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  固定 1 h。去固定液, 用二次蒸馏水冲洗 5 遍, 自然晾干。悬浮细胞每孔轻柔加入 50  $\mu\text{L}$  经 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 800 mL/L 三氯醋酸, 静置 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  固定 1 h, 余同贴壁细胞。干燥后, 每孔加入 4 mg/mL SRB 溶液 100  $\mu\text{L}$ , 室温下染色 10 min, 弃上清, 用 1% 乙酸冲洗 5 遍以去除非特异性结合的染料。自然晾干后每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 酶标仪检测 490 nm 处 A 值, 并计算抑制率<sup>[17]</sup>, 计算方法同“2.3”项下。

### 2.5 CCK-8 法测定细胞抑制率

取对数生长期的细胞用完全培养液调整细胞浓度为  $4 \times 10^4$  个/mL, 96 孔培养板每孔接种 100  $\mu\text{L}$ , 设对照组、实验组及空白组, 紫草素浓度同“2.2”项下, 每组 6 个复孔。37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后终止培养, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 3 h 后, 酶标仪检测 450 nm 处的 A 值, 计算细胞抑制率<sup>[18]</sup>:

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.6 甲臞和紫草素的最强吸收范围比较

取对数生长期的细胞接种于 96 孔板, 细胞浓度  $1 \times 10^4$  个/mL, 每孔加入细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ 。甲臞组每孔加入 100  $\mu\text{L}$  培养液, 紫草素组每孔加入 100  $\mu\text{L}$  12.8  $\mu\text{mol/L}$  紫草素, 设 6 个复孔, 培养 24 h 后加入 MTT 溶液 10  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 4 h, 弃上清, 加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO。用酶标仪在波长 400~600 nm 进行全波长扫描, 测量最强吸收范围。

检测紫草素本底 A 值对 MTT 结果的影响, 取对数生长期的细胞接种于 96 孔板, 细胞浓度为  $1 \times 10^4$  个/mL, 每孔加入细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ 。对照组每孔加入 100  $\mu\text{L}$  培养液; 紫草素给药组每孔加入 12.8  $\mu\text{mol/L}$  紫草素 100  $\mu\text{L}$ ; 紫草素预处理组加入 12.8  $\mu\text{mol/L}$  的紫草素 100  $\mu\text{L}$  预处理 2 h 后洗去药物, 加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO; 紫草素本底组不加细胞, 加入 12.8  $\mu\text{mol/L}$  紫草素 (PBS 稀释) 100  $\mu\text{L}$ 。每组设 6 个复孔, 培养 24 h 后前 2 组每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT 溶液 (5

g/L), 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 4 h, 弃上清, 加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡 10 min, 酶标仪检测 570 nm 处 A 值。

### 2.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组均数间比较用单因素方差分析, 两组间差异比较采用 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 TBEX 法、SRB 法、CCK-8 法和 MTT 法检测紫草素对 HL-60 细胞增殖的影响

TBEX 法、SRB 法、CCK-8 法和 MTT 法检测得到紫草素对 HL-60 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.57、0.77、1.36、1.01  $\mu\text{mol/L}$ , 紫草素浓度在 3.2  $\mu\text{mol/L}$  以下时, 4 种方法抑制率曲线均呈线性增长, 但 CCK-8 法所得抑制率明显低于其余 3 种方法。紫草素浓度高于 3.2  $\mu\text{mol/L}$ , TBEX 法与 SRB 法抑制率曲线仍呈上升趋势且没有显著性差异, 而 MTT 法与 CCK-8 结果出现差异, 抑制率上升趋势减弱甚至下降 (图 1)。在紫草素 12.8  $\mu\text{mol/L}$  时, CCK-8 法测得最大抑制率为 81%, 而 TBEX 法最大抑制率为 96%。4 种方法线性比较为 SRB 法 > TBEX 法 > MTT 法 > CCK-8 法 (表 1)。

### 3.2 TBEX 法、SRB 法、CCK-8 法和 MTT 法检测紫草素对 A549 细胞增殖的影响

TBEX 法、SRB 法、CCK-8 法和 MTT 法检测得到紫草素对 A549 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 6.30、10.38、13.48、15.24  $\mu\text{mol/L}$ , 紫草素浓度在 32  $\mu\text{mol/L}$  以下时, 4 种方法抑制率均呈线性上升, 但 MTT 法与

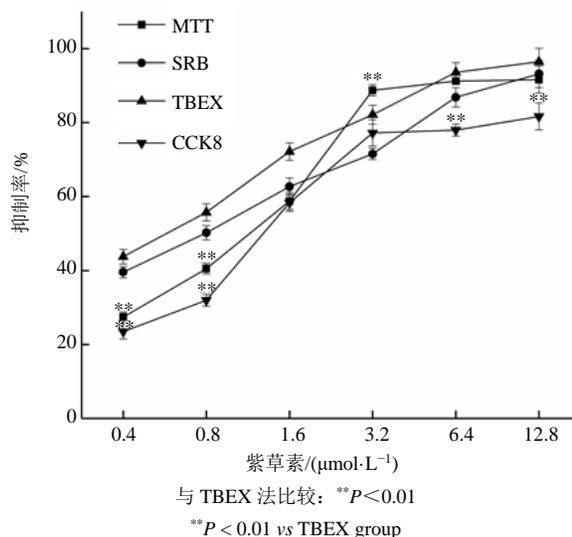


图 1 紫草素作用 HL-60 细胞 24 h 抑制率曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 1 Inhibitory rate curve of shikonin on HL-60 cells after 24 h treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

表 1 4 种方法的线性及 IC<sub>50</sub> 比较 (HL-60 细胞)

Table 1 Linear and IC<sub>50</sub> comparison of four methods (HL-60 cells)

方法	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )
MTT	0.907 1	1.01
CCK-8	0.879 9	1.36
SRB	0.991 0	0.77
TBEX	0.970 0	0.57

CCK-8 法所得抑制率明显低于 TBEX 法与 SRB 法。紫草素浓度高于 32 μmol/L, TBEX 法与 SRB 法细胞抑制率仍呈上升趋势且没有显著性差异, 而 MTT 法与 CCK-8 法结果出现差异, 抑制率上升趋势减弱甚至下降 (图 2)。在紫草素 128 μmol/L 时, MTT 法测得细胞抑制率为 89%, 而 TBEX 法所得细胞抑制率为 99%。4 种方法线性比较为 SRB 法>TBEX>MTT 法>CCK-8 法 (表 2)。

### 3.3 甲臍和紫草素最强吸收范围

在 400~600 nm 波长内, 甲臍和紫草素的吸收峰部分重叠, 说明紫草素本底 A 值可能影响到实验

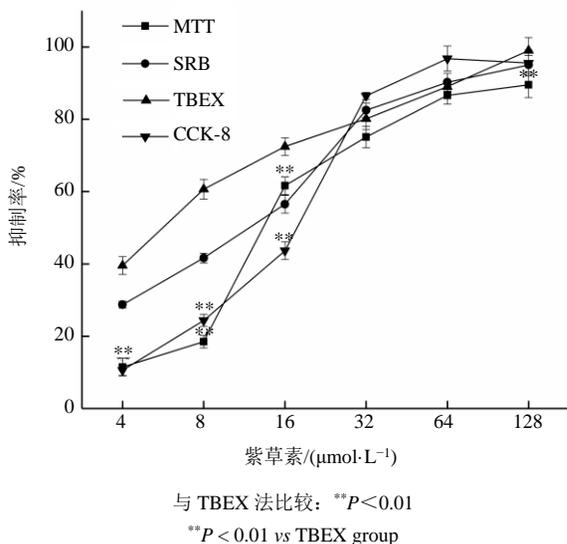


图 2 紫草素作用 A549 细胞 24 h 抑制率曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 2 Inhibitory rate curve of shikonin on A549 cells after 24 h treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

表 2 4 种方法的线性及 IC<sub>50</sub> 比较 (A549 细胞)

Table 2 Linear and IC<sub>50</sub> comparison of four methods (A549 cells)

方法	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )
MTT	0.884 2	15.24
CCK-8	0.883 8	13.48
SRB	0.958 5	10.38
TBEX	0.946 2	6.30

结果, 使检测到的甲臍 A 值偏大, 导致 MTT 法测得的抑制率偏低 (图 3)。为了证明紫草素本底 A 值是否会影响 MTT 结果, 使用紫草素 12.8 μmol/L 预处理 HL-60 细胞 2 h 后洗去药物, 加 DMSO 裂解细胞, 在二者重叠的最强吸收波长 570 nm 处检测 A 值, 检测结果与 MTT 法测得 A 值和紫草素本底 A 值没有显著性差异, 说明高浓度紫草素会影响 MTT 实验结果, 使测得甲臍 A 值增加 (图 4)。

### 3.4 TBEX 法染色结果

在 HL-60 和 A549 细胞中, 分别用 12.8 μmol/L 和 128 μmol/L 紫草素干预, 细胞几乎完全被杀死, 板孔内只有被台盼蓝染色的死细胞, 相比对照组差异显著, 说明此处检测到的 A 值不能代表细胞的数量 (图 5)。

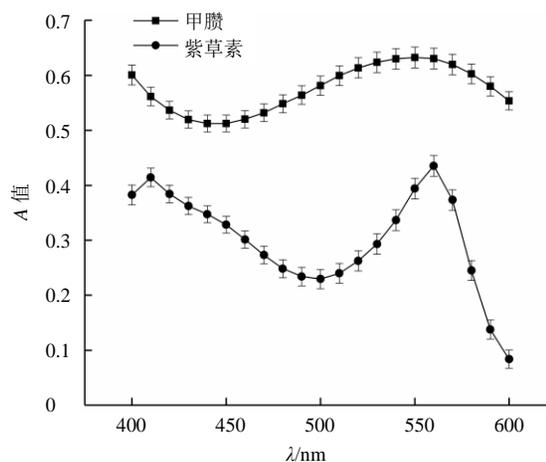


图 3 甲臍与紫草素最强紫外吸收范围 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Strongest absorption range of formazan and shikonin ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

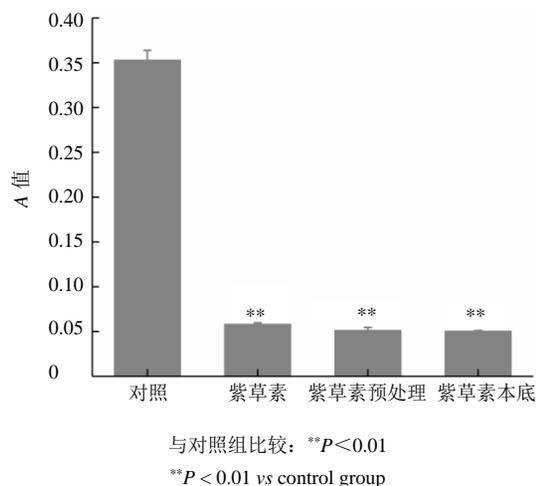


图 4 12.8 μmol/L 紫草素在波长 570 nm 处对 MTT 结果的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Effect of 12.8 μmol/L shikonin on MTT at wavelength of 570 nm ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

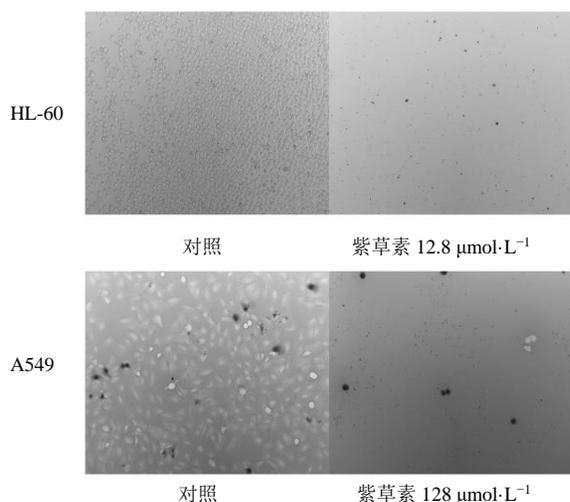


图 5 HL-60 与 A549 细胞台盼蓝拒染法镜下观察结果  
Fig. 5 Picture of trypan blue exclusion method in HL-60 and A549 cells

#### 4 讨论

目前广泛使用的测定细胞活力的方法均是间接法,通过捕捉固定时间点细胞内某个酶的催化性指标来反映细胞活力。MTT 法是最常用的细胞毒活性检测方法,在长期使用过程中, Peng 等<sup>[19]</sup>发现类黄酮化合物如木犀草素和槲皮素可以在不存在细胞的情况下与 MTT 反应。Stepanenکو 等<sup>[20]</sup>发现受药物处理介导的应激、抑制剂非靶效应的细胞适应性代谢及线粒体重编程会导致 MTT 法高估或低估细胞活力; Wang 等<sup>[21]</sup>发现以 MTT 和 3-(4,5-二甲基吡啶-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2h-四唑盐 (MTS) 为基底的检测将低估表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 的抗增殖作用。这些研究中,不适用 MTT 法的药物如类黄酮化合物、EGCG 茶多酚等均属于有色化合物,紫草素类天然色素也属于有色化合物。这些有色化合物在高浓度时会从培养液中析出,也可能蓄积在细胞内。以往的体外研究表明,紫草素对不同敏感性和各种状态的肿瘤细胞均有生长抑制作用<sup>[6-7]</sup>。然而在使用 MTT 法检测细胞毒活性时,紫草素对同种细胞的 IC<sub>50</sub> 值范围较广,其对 HL-60 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 0.35~5.5 μmol/L<sup>[7-11]</sup>,对 A549 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 1.75~12.79 μmol/L<sup>[6,12-14]</sup>,差异悬殊。

通过 4 种常用的细胞毒活力检测方法分析可知,对于 HL-60 细胞,MTT 法和 CCK-8 法所得 IC<sub>50</sub> 明显大于其余 2 种方法,紫草素浓度大于 3.2 μmol/L 后抑制率变化不明显, CCK-8 法检测得到的抑制率

明显偏低。CCK-8 法因操作简便且稳定性好被广泛用于悬浮细胞毒活性检测,然而在 HL-60 细胞中,紫草素的毒性与试剂协同作用导致整体抑制率更低,说明 CCK-8 法不适用于紫草素对 HL-60 细胞的细胞毒活性检测。在 A549 细胞中,MTT 法所得的 IC<sub>50</sub> 值明显大于其余 3 种方法,在紫草素浓度为 128 μmol/L 时抑制率明显小于 TBEX 结果,此外 MTT 法和 CCK-8 法所得抑制率曲线在紫草素浓度大于 32 μmol/L 后抑制率增长趋势减弱,而 TBEX 和 SRB 法结果一致性较好,抑制率曲线呈线性增长。MTT 法是通过测量细胞内琥珀酸脱氢酶催化指标甲臞的 A 值来反映细胞活力,甲臞的蓝紫色与紫草素的紫色非常接近,通过定波长扫描发现二者的最强吸收峰有部分重叠。使用紫草素 12.8 μmol/L 预处理 HL-60 细胞 2 h 后洗去药物,在重叠波长 570 nm 处检测 A 值,发现其与紫草素本底 A 值以及 MTT 检测结果没有显著性差异,因此在 MTT 实验时,测得的 A 值是甲臞的 A 值和孔板内紫草素的 A 值之和,这就是同一体系测得的紫草素 IC<sub>50</sub> 值不同且偏高的原因。

本研究结果表明,紫草素与 MTT 法所测指标甲臞的颜色相近,吸收峰部分重叠,在低浓度紫草素的干预下,MTT 法所测得的 A 值会增加。在高浓度紫草素作用下几乎没有活细胞,但在没有加入 MTT 试剂前板孔中仍有蓝紫色试剂检出,认为是进入细胞的紫草素而非甲臞,使得 MTT 法测量紫草素抗肿瘤药效时 IC<sub>50</sub> 普遍偏高;同时在紫草素高敏感株 HL-60 细胞中 CCK-8 会和紫草素协同作用使检测 A 值增加。因此在进行有色药物的抗肿瘤筛选实验时,要注意有色药物颜色与检测背景里生成的有色物质的颜色差异和试剂的影响,避免药物颜色和试剂毒性对检测结果的影响。

#### 参考文献

- [1] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Method*, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [2] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. *J Nat Cancer Institute*, 1990, 82(13): 1107-1112.
- [3] Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay [J]. *Anal Commun*, 1999, 36(2): 47-50.
- [4] 施文荣, 刘 艳. MTT 法不适用于代谢水平改变的细

- 胞活力检测 [J]. 生物学杂志, 2013, 30(2): 84-86.
- [5] 王文杰, 白金叶, 刘大培, 等. 紫草素抗炎及对白三烯 B4 生物合成的抑制作用 [J]. 药学学报, 1994, 29(3): 161-165.
- [6] 谢晨, 陈韩英, 钟晶, 等. 紫草素通过上调 Nrf2 途径及干预胞内氧化还原平衡稳态诱导 A549 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10): 1445-1451.
- [7] Zhang B, Chen N, Chen H, *et al.* The critical role of redox homeostasis in shikonin-induced HL-60 cell differentiation via unique modulation of the Nrf2/ARE pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, doi: 10.1155/2012/781516.
- [8] History M. Synthesis and biological activity of novel shikonin analogues [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(3): 735-737.
- [9] Duan D, Zhang B, Yao J, *et al.* Shikonin targets cytosolic thioredoxin reductase to induce ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells [J]. *Free Radical Bio Med*, 2014, 70(5): 182-193.
- [10] Trivedi R, Müller G A, Rathore M S, *et al.* Anti-leukemic activity of shikonin: Role of ERP57 in shikonin induced apoptosis in acute myeloid leukemia [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(2): 604-616.
- [11] Hsu P C, Huang Y T, Tsai M L, *et al.* Induction of apoptosis by shikonin through coordinative modulation of the Bcl-2 family p27 and p53 release of cytochrome C, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 52(20): 6330-6337.
- [12] Yeh Y C, Liu T J, Lai H C. Shikonin induces apoptosis, necrosis, and premature senescence of human A549 lung cancer cells through upregulation of p53 expression [J]. *Evid Based Compl Alter Med*, 2015, doi: 10.1155/2015/620383.
- [13] Liu X, Sun G. Shikonin enhances adriamycin antitumor effects by inhibiting efflux pumps in A549 cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4270-4276.
- [14] 曲丹, 徐小嫻, 李钰, 等. 紫草素诱导肺癌 A549 细胞凋亡及对凋亡相关蛋白的影响 [A] // 中华医学会呼吸病学年——2013 第十四次全国呼吸病学学术会议论文汇编 [C]. 北京: 中华医学会, 2013.
- [15] 钟梁, 刘北忠, 郝坡, 等. 苦参碱诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡及对人端粒酶逆转录酶表达的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1507-1510.
- [16] 张闪闪, 李天一, 王晓琴, 等. 内质网应激在三氧化二砷抑制 HL-60 增殖过程中的效应机制 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(11): 1589-1595.
- [17] 周思朗, 屈艳妮, 张健, 等. 一种新的细胞计数方法——磺基罗丹明 B 染色法 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(5): 663-664.
- [18] 芮庄华, 梁永杰. 紫草素对肺腺癌 A549 细胞的生长抑制作用及其机制研究 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2014, 35(3): 30-32.
- [19] Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells [J]. *Colloid Surface B*, 2005, doi: 10.1016/j.colsurfb.2005.07.014.
- [20] Stepanenko A A, Dmitrenko V V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability [J]. *Gene*, 2015, 574(2): 193-203.
- [21] Wang P, Henning S M, David H. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10202.