

2.5.3 MTT测定法步骤

- 1) 取对数生长期ACC-M细胞, 0.25%胰蛋白酶消化后, 计数;
- 2) 用10%新生牛血清RPMI1640培养液调细胞密度为 $2 \times 10^4/\text{ml}$;
- 3) 将细胞悬液以每孔 $100 \mu\text{l}$ 加入96孔培养板中间 6×10 个孔, 吸取PBS加入四周36孔, 每孔 $100 \mu\text{l}$;
- 4) 置于 37°C , 5% CO_2 孵箱中培养24h后, 弃去中间 6×10 个孔中液体, 分别加入含0、12.5、25、50、 $100 \mu\text{mol/L}$ PD98059 ($\text{DMSO} \leq 0.5\%$) 的培养液 $100 \mu\text{l}$;
- 5) 加药后第二天, 在中间 6×10 个孔中加入 $10 \mu\text{l}$ MTT溶液 $20 \mu\text{l}$, 37°C 孵育4h;
- 6) 吸净培养液, 每孔加入 $100 \mu\text{l}$ MTT溶解液, 振荡10min, 酶联免疫检测仪570nm测各孔OD值, 计算PD98059作用下的细胞增殖率。

细胞增殖率=实验组平均OD/对照组平均OD $\times 100\%$, 当比值小于100%时, 细胞增殖受到抑制, 大于100%时, 为细胞增殖促进。

2.6 统计学分析

采用SPSS 10.0软件对细胞增殖率进行统计, 对照组和实验组间的比较采用student t 检验。

二. 结果

1. ACC-M 细胞倒置相差显微镜下观察

可见上皮样 ACC-M 细胞呈集落样贴壁生长, 细胞轮廓清楚, 为扁平多角形, 呈“铺路石”样排列; 细胞异形性明显, 可见少量多核, 巨核细胞(图 1.1), 可见有丝分裂, 细胞核浆比例较大, 核仁清晰, 通常有 2—3 个核仁(图 1.2)。ACC-M 增殖较快, 每两天传代换液。

2. ACC-M 细胞 HE 染色观察

光镜下可见 ACC-M 细胞呈多角形, 异形性明显, 核浆比例较大, 可见少量多核, 巨核细胞。

3. ACC-M 中 ERK1/2 的表达

ERK1/2 在 ACC-M 细胞的胞浆中阳性表达(图 1.3~1.4)。