技术方法

文章编号:1000-5404(2007)22-2196-02

流式细胞术PI染色法检测胃蛋白酶消化时间对细胞凋亡的影响

刘江惠,郭建文,王 静,刘 亮,李金梅,左连富 (河北医科大学第四医院肿瘤研究所,石家庄 050011)

提 要:目的 探讨凋亡样品制备时,胃蛋白酶消化时间对凋亡的影响。**方法** 采用0.5%胃蛋白酶分别对胃癌、食管癌、乳腺癌、淋巴瘤和卵巢癌细胞株进行消化,观察不同时间点流式细胞术PI染色法检测凋亡的情况。**结果** 多数细胞株消化时间在20~30 min时所形成的凋亡峰位较好,而肝癌、淋巴瘤细胞则在15~20 min时形成的峰位较好。**结论** 流式细胞术PI染色法检测凋亡时,需不断摸索实验的条件,才能得到最佳结果。

检测凋亡的方法很多,如DNA断裂点的TUNEL和荧光素标记的膜联蛋白V(FITC-Annexin V)联合PI染色双参数技术定量法、荧光探针JC-1法、线粒体膜电位法以及凋亡基因蛋白测定法等[1,2]。而流式细胞术PI染色法则以检测细胞数量大,速度快,简便经济,而且细胞可以长期保存,成批检测,误差较小等优势而被广泛采用。但是,制备合格的单细胞悬液是准确检测凋亡的前提。以往,在流式样品制备方面报道较少,尤其在流式细胞术检测凋亡的样品制备技术方面。为了找到一种较理想的制备合格单细胞悬液的方法,我们对培养细胞收集后,用胃蛋白酶消化,对消化时间进行观察,摸索出了较好的消化时间点,以期给其他实验者提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞株

乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、食管癌、卵巢癌细胞株由河北医科大学第四医院科研中心提供,加入凋亡因素处理后,收集培养细胞。

1.2 方法

取培养细胞1×10^6/ml,加入0.5%胃蛋白酶2 ml(配制方法见参考文献[3]),分别消化5、10、15、20、30 min及1 h。加入8 ml PBS终止消化。制成单细胞核悬液,离心1 000~1 200 r/min,4 min,弃上清,留0.1 ml液体以悬浮细胞。

1.3 染色

参考文献[3]的方法配置PI染液,加入PI染液1 ml,染色30 min,500目铜网过滤,上机检测。

1.4 流式细胞仪检测条件及参数

采用美国Beckman Coulter公司生产的Epics-XL Ⅱ型流式细胞仪,激发光源为15 mW氩离子激光器,激发波长为488 nm,应用Expo 32 ADC进行免疫荧光数据分析,用Muticycle AV分析软件对DNA细胞周期拟合分析。检测前以flow-check™ Fluorpheres(10 μm)荧光微球(REF 6605359 Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835)作为标准样品调整仪器,变异系数*CV*值在2%以内。

作者简介:刘江惠(1964-),女,河北省石家庄市人,副主任技师,主要从事病理技术方面的研究。电话:(0311)86095337
通讯作者:左连富,电话:(0311)86095337,E-mail:jingwang1977@hotmail.com
收稿日期:2006-09-07;修回日期:2006-12-20

2 结果

结果判定:①以亚G_0/G_1期峰完全独立,正态,无拖尾,与G_0/G_1期峰和细胞碎片峰完全分离,G_0/G_1期峰*CV*值≤5%为好,用(++++)代表。②以出现独立的亚G_0/G_1峰,但有少量的拖尾,与G_0/G_1期峰和细胞碎片峰基本分开,G_0/G_1期峰*CV*值≤5%为较好,结果易分析,用(+++)代表。③出现凋亡峰位,但与G_0/G_1期峰和细胞碎片峰相连,结果尚可分析,但有一定的误差,用(++)代表。④细胞碎片峰部分掩盖凋亡峰位,且与G_0/G_1期峰相连,不易分析,结果误差较大,用(+)代表。⑤没有明显的凋亡峰位,并与碎片峰连成一片,与G_0/G_1期无明显的界限。结果无法分析,用(-)代表。

根据上述标准,对不同种类培养细胞、消化不同时间后进行检测,凋亡情况见表1。

表1 不同培养细胞与消化时间的关系

细胞	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	50 min
淋巴瘤细胞	+	++	++++	+++	++	-
乳腺癌细胞	+	+	++	+++	+++	+
食管癌细胞	+	+	++	++++	+++	+
卵巢癌细胞	+	++	++	+++	++	-
肝癌细胞	+	+	+++	++++	++	+

3 讨论

细胞凋亡在核酸内切酶作用下,DNA分子降解,导致小分子DNA漏出,核DNA含量下降,细胞质内出现DNA片段,形成有规律的核小体,经证实为180~200 bp的DNA片段[4,5],加入胃蛋白酶后,消化掉细胞膜,使其以独立的核小体微粒形式存在于悬液中,用流式细胞术PI染色法检测,呈现出1个独立的DNA含量较低的峰位,即亚G_0/G_1期峰位。根据亚G_0/G_1期峰可以计算凋亡细胞的百分率;而坏死细胞的DNA断裂点为无规则的杂乱片段,一般荧光含量很低,无独立峰位。利用这一特征,也可以区别凋亡与坏死细胞。因此,制备出良好的单细胞悬液样品,是呈现出较好亚G_0/G_1期峰位的关键。否则,检测结果就相差甚远,且重复性很差。

同时,坏死细胞经胃蛋白酶消化后,杂乱的片段可进一步发生降解。在直方图上显示为低前散、低荧光、低侧散的特征,可与凋亡峰区别开;但是,如果坏死细

胞或其他原因形成的碎片过多就会影响甚至掩盖凋亡峰位。因此,掌握好不同细胞的消化时间,对完全打破细胞膜,形成良好的细胞核、凋亡小体悬液,并准确计数凋亡率至关重要。消化掉细胞膜,使细胞内形成的凋亡小体完全释放到悬液中,同时也避免了核小体在细胞质中与另一小体重合,通过流式细胞仪检测点时,被疑为一体;或不完全重叠,其含量不在180~200 bp,引起峰位偏移。因此,用胃蛋白酶消化细胞是制备凋亡细胞样品必不可缺少的环节。

本实验表明,不同种类的细胞膜对胃蛋白酶的抗性不同,但其机制尚少见报道。不同细胞在用胃蛋白酶消化时,消化时间对凋亡小体峰位形成是一关键步骤,我们要掌握好消化时间,防止消化时间过长。细胞膜被破坏后,细胞核膜也被破坏,形成碎片峰位;或消化时间不够,细胞核小体也不能完全释放,从而影响凋亡率的计算。因此,掌握最佳消化时间,是凋亡峰位形成好坏的关键步骤。

检测细胞凋亡的实验中制备样品的步骤较多,可以说每一步都是影响因素,我们只有在工作中不断摸索,才能找到稳定的方法,得出准确的凋亡结果。

关键词:胃蛋白酶;消化时间;PI染色法;凋亡
中图法分类号:R446 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Bacso Z, Everson R B, Eliason J F. The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented[J]. Cancer Res, 2000, 60(16): 4623-4628.
[2] 刘瑛琪, 李天德, 楮晓雯, 等. 利用荧光探针JC-1检测心肌细胞线粒体膜电位的改变[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(8): 716-718.
[3] 左连富. 流式细胞术与生物医学[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1996: 91-93.
[4] Bertho A L, Santiago M A, Coutinho S G. Flow cytometry in the study of cell death[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000, 95(3): 429-433.
[5] Cen X, Zhu P, Yu J, *et al*. Effective chemotherapy induce apoptosis *in vivo* in patients with leukemia[J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(1): 74-77.

(编辑 陈聪连)

文章编号:1000-5404(2007)22-2197-02

技术方法

CTA减影法在颅内动脉瘤检查中的应用价值

陈 轶,孙清荣,廖翠薇,戚跃勇 (第三军医大学新桥医院放射科,重庆 400038)

提 要:**目的** 评价CT血管造影(CT angiography, CTA)减影法在颅内动脉瘤诊断中的应用价值。**方法** 采用CTA检查拟诊为颅内动脉瘤42例,分别运用常规法及减影法进行CTA成像,包括多平面重建(MPR)、最大密度投影(MIP)、容积重建(VR),并评价图像质量。**结果** 常规法15例中检出动脉瘤12个,由于瘤体邻近颅底骨骼遮盖重叠而漏检3个大脑前动脉瘤;减影法27例中,4例因弹簧圈和支架影响瘤体欠清楚外,检出31个动脉瘤(4例患者为多发动脉瘤)。减影法能清晰显示瘤体、瘤颈、载瘤动脉和周围血管的关系。常规法图像后处理时间约为30 min,而减影法约为15 min。**结论** CTA减影法3D成像对颅内动脉瘤的成像效果优于常规CTA,但对检查支架和弹簧的图像显示不如常规CTA扫描清晰。

多层螺旋CT血管成像(CT angiography, CTA)作为一种无创性检查手段,在颅脑血管及血管相关性疾病的诊断方面越来越受到重视[1]。成功的成像技术是获得高质量CT图像的基础,也是疾病诊断的首要因素。本研究借鉴数字减影血管造影(digital subtraction angiography, DSA)的原理,在CTA的基础上获得较清晰的血管影像,观察更直观,旨在进一步优化颅脑CTA的扫描方案。

作者简介:陈 轶(1973-),女,重庆市人,技师,主要从事CT技术方面的研究。E-mail: yichen996@hotmail.com
通讯作者:戚跃勇,电话:(023)68774676
收稿日期:2006-12-13;**修回日期**:2007-05-23

1 材料与方法

1.1 材料

收集行颅脑CTA检查的病例42例,男性24例,女性18例,年龄6~77岁,平均38.2岁。检查前4 h禁食,仔细询问病史,排除碘造影禁忌证,向患者解释检查过程,以取得患者的充分配合。采用GE16排螺旋CT(LightSpead 16 Slices, MSCT)进行检查。42例均行常规DSA检查。

使用非离子型造影剂安射力320,总量75~100 ml,通过高压注射器一次性快速推进,注射速度4 ml/s,注射及扫描期间密切观察患者的情况。扫描采用两种方法。

1.2 方法

常规法:15例应用直接延迟时间法,延迟时间统一确定为15~20 s,电压120 kV,电流120 mA,螺距0.562∶1,层厚