技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)09-1386-04

流式细胞仪检测细胞凋亡的几种方法的比较

吴建勇,赵德璋
(重庆医科大学生命科学研究院,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索运用流式细胞仪来检测细胞凋亡的方法。方法:采用流式细胞仪对 DNA 含量、磷脂酰丝氨酸、线粒体膜电位、钙离子浓度的检测,分析细胞凋亡情况。结果:DNA 含量测定存在一定误差;磷脂酰丝氨酸测定能准确反映细胞早晚期凋亡情况;线粒体膜电位、钙离子浓度测定能准确反映凋亡细胞的生理指标,如果结合形态学分析将更为客观。结论:通过比较实验方法,为将来采用流式细胞仪检测细胞凋亡提供更准确的实验方法。

【关键词】流式细胞仪;细胞凋亡;DNA 含量;磷脂酰丝氨酸;膜电位;钙离子
【中国图书分类法分类号】R329.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-26

Comparison among several methods for apoptosis examination by Flow Cytometry

WU Jian-yong, et al
(*Institute of Life Science, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the methods of using Flow Cytometry to examine the apoptosis. *Methods*: Flow Cytometry was used to examine the DNA content, the phosphatidyl serine, the mitcchondrial membrane potential and the calcium ion, the apoptosis was analyzed. *Results*: The DNA content had some deflexion.The phosphatidyl serine examination can reflect the early and advanced stage apoptosis punctually. The mitcchondrial membrane potential and the calcium ion examination can reflect the physiological index of apoptosis cell. But if combined with morphology the analysis will be more objective. *Conclusion*: Through comparing empirical method, we find more precise methods of using the Flow Cytometry to examine the apoptosis in the future.

【Key words】Flow Cytometry; Apoptosis; DNA content; Phosphatidyl serine; Mitcchondrial membrane potential; Calciumion

以往分析细胞凋亡只是关心细胞是死是活,而现在更加关注细胞到底是怎么死的,因为哪条通路受到了影响,究竟哪个阶段发生了凋亡,应该如何去阻止它。凋亡是一个相当复杂的信号级联,参与其中的蛋白活性起了至关重要的作用[1]。然而,凋亡和坏死的许多特征相互重叠,因此有必要采用两种或更多不同的方法来验证细胞的死亡方式。

流式细胞仪(Flow cytomet,FCM)是一种在功能水平上对单细胞或其它生物粒子进行定量分析和分选的检测手段,流式细胞仪的优点是速度快、精度高、准确性好,当细胞发生凋亡这样缓慢和不一致的过程时,流式细胞仪的检测更为准确[2]。

本研究通过流式细胞仪对细胞 DNA 含量、磷脂酰丝氨酸、

作者介绍:吴建勇(1981-),男,助理实验师,硕士,
研究方向:细胞分子生物学。

参 考 文 献

[1] Eigner U, Schmid A, Wild U, et al. Analysis of the comparative workflow and performance characteristics of the VITEK 2 and Phoenix systems[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3829-3834.

[2] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 18th informational supplement M100-S16. Wayne, Pa: National Commitlee for Clinical and Laboratory Standards 2008.

[3] Murakami K, Minamide W, Wada K, et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(10): 2240-2244.

[4] Skov R, Smyth R, Larsen A R, et al. Phenotypic detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus by disk diffusion testing and Etest on Mueller-Hinton agar[J]. J. Clin. Microbiol, 2006, 44(12): 4395-4399.

[5] Felten A, Grandry B, Lagrange P H, et al. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test[J]. J. Clin. Microbiol, 2002, 40(8): 2766-2771.

(责任编辑:冉明会)

线粒体膜电位、钙离子浓度的检测，来探讨几种方法对细胞凋亡分析的特点，总结出最适合流式细胞仪分析细胞凋亡的方法。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要试剂

人脐静脉内皮细胞（Human umbilica vascular endothelial cell，HUVEC）购至武汉细胞库、脂多糖（Lipopolysaccharides，LPS）购至 sigma 公司，Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购至 roch 公司，JC-1、罗丹明 123 膜电位检测试剂盒，Fluo-3 钙离子浓度检测试剂盒购至碧云天公司。

1.2 细胞培养

在 DMEM/F12 完全培养基（内含 10%胎牛血清，100 μg/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素）中培养，贴壁生长至融合状态，用 1.25 g/L 的胰酶消化传代，选择生长良好的 HUVEC 进行实验。对照组为未加药的 HUVEC 细胞组，实验组为加入浓度为 20 mg/L 的 LPS 刺激一定时间的 HUVEC 细胞组。各组细胞终浓度均为 5×10^5 个 /ml。

1.3 方法

1.3.1 DNA 含量分析法　胰酶消化细胞，经 PBS 洗 2 次，收集细胞。加入预冷 70%乙醇，于 4℃固定过夜。离心收集细胞，加入溴化乙锭（50 μg/ml），RNase A（100 μg/ml），4℃避光孵育 30 min。上流式细胞仪进行检测。

1.3.2 磷脂结合蛋白 AnnexinV-FITC/PI 法　胰酶消化细胞，经 PBS 洗 2 次，收集细胞。加入 FITC 标记的 Annexin-V 室温避光 30 min，再加入 PI，避光反应 5 min 后，加入适量 Buffer，上流式细胞仪进行检测（具体步骤参照试剂盒说明书）。

1.3.3 线粒体膜电位检测法　胰酶消化细胞，经 PBS 洗 2 次，收集细胞。分别用终浓度为 Rhodamine 123（1 mmol/L）或终浓度 JC-1（1 mmol/L）进行染色，37℃平衡 30 min，流式细胞仪检测细胞的荧光强度（具体步骤参照试剂盒说明书）。

1.3.4 钙离子浓度检测法　胰酶消化细胞，经 PBS 洗 2 次，收集细胞。浓度为 5 μ mol/L 的 Flou-3/AM，在 37℃恒温下负载 30 min，使 Fluo-3 进入细胞内，充分洗去未负载上的荧光探测剂。上机检测（具体步骤参照试剂盒说明书）。

2 结　果

2.1 通过 DNA 含量分析细胞凋亡

细胞凋亡时，核酸内切酶激活，导致 DNA 断裂。用碘化丙啶（PI）染色后分析，可在二倍体 $G_{0/1}$ 峰前出现“亚二倍体”峰，即凋亡峰，根据此峰可测出凋亡细胞百分率[3]。从图 1 中可以看出，经 LPS 刺激后的细胞，DNA 发生断裂，凋亡峰明显增加。对照组（G_1:64.27%，S:21.07%，G_2:14.66%，Apoptosis:0.10%）；实验组（G_1:54.14%，S:27.34%，G_2:18.51%，Apoptosis:14.73%）。通过 DNA 含量测定检测细胞凋亡的方法简便，结果直观，实验成本较低，但是其局限性在于特异性和敏感性均不高。

2.2 通过 AnnexinV-FITC/PI 法分析细胞凋亡

细胞膜的重排发生在凋亡的早期，这种重排导致磷脂酰丝氨酸（PS）从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中[4]。这一事件可通过 Annexin V 的染色来检测。Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白，可与凋亡细胞膜上外翻的 PS 相结合，采用荧光（如 FITC）标记的 Annexin-V 来与凋亡细胞结合[5]。碘化丙啶是一种核酸染料，在凋亡中晚期的细胞和死细胞，PI 能够透过细胞膜而使细胞核红染。因此将 Annexin-V 与 PI 匹配使用，就可以将凋亡早晚期的细胞以及死细胞区分开来。从图 2 中可以看出，经 LPS 刺激后的细胞，坏死细胞、早期凋亡及晚期凋亡细胞都明显增加。对照组（UL:0.76%，UR:0.38%，LL:98.26%，LR:0.61%）；实验组（UL:8.61%，UR:2.94%，LL:72.71%，LR:15.75%）。这种方法的特点就是细胞分群比较明显，结果更为灵敏，但是试剂费用也比较昂贵。

2.3 通过线粒体膜电位检测分析细胞凋亡

JC-1 在浓度低或线粒体膜电位低时以单体存在，激发波长为 488 nm，发射波长为 529 nm，呈绿色荧光。当浓度升高或线粒体膜电位升高时形成聚合体，此时激发波长为 490 nm，发射波 590 nm，呈红橙色荧光[6]。从图 3 可以看出，经 LPS 刺激后的细胞，从红色荧光（细胞处于正常状态）到绿色荧光的变化，说明膜电位下降，该细胞可能处于凋亡早期。对照组（UR:98.65%，LR:1.35%）；实验组（UR:76.48%，LR:

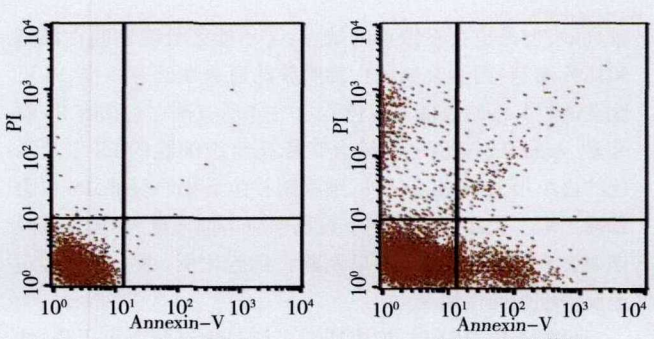


图 1　DNA 含量测定结果

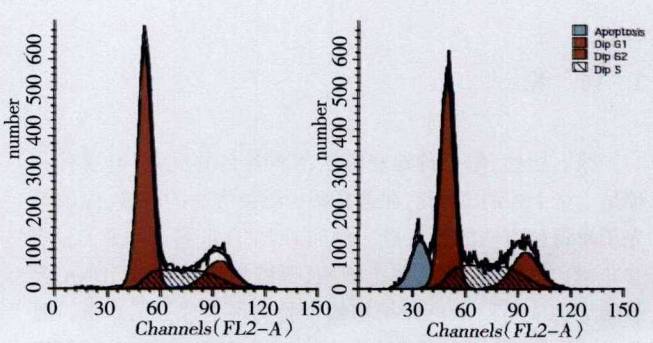


图 2　磷脂酰丝氨酸测定结果

23.52%）。这种方法比较直观地反映了膜电位的升降情况。

罗丹明 123（Rhodamine 123）是一种可透过细胞膜的阳离子荧光染料，是一种线粒体跨膜电位的指示剂。正常细胞中能够依赖线粒体跨膜电位进入线粒体基质，荧光强度减弱或消失。而在凋亡发生时，线粒体膜完整性破坏，线粒体膜通透性转运孔开放，Rho123 重新释放出线粒体，发出强黄绿色荧光。从图 4 可以看出，经 LPS 刺激后的细胞，绿色荧光强度增加，意味着膜电位下降，细胞发生凋亡。对照组（Mean：13.49）；实验组（Mean：26.79）。同 JC-1 法一样，该法通过对细胞生理指标的监测检测来反映细胞凋亡，结果直观、灵敏。

2.4　通过钙离子浓度检测分析细胞凋亡

Fluo-3-Am 为高度特异性 Ca^{2+} 荧光指示剂，可以灵敏地反映细胞内游离钙离子浓度的变化，Fluo-3-Am 进入细胞后经非特异性酯酶脱去 Am 酯，成为脂溶的 Fluo-3 留在细胞内，当 Fluo-3 与细胞内游离钙结合后，其荧光强度是本身的 40 倍以上。从图 5 可以看出，经 LPS 刺激后的细胞，绿色荧光强度增加，意味着细胞发生凋亡。对照组（Mean：8.71）；实验组（Mean：22.80）。该法可以弥补通常采用的原子吸收光谱法测定组织钙不能区别细胞内外 Ca^{2+} 含量之不足，但是外界环境因数的干扰会对实验结果带来一定误差。

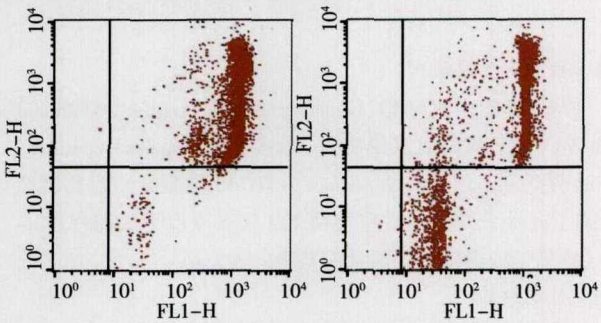


图 3　线粒体膜电位测定结果（JC-1 法）

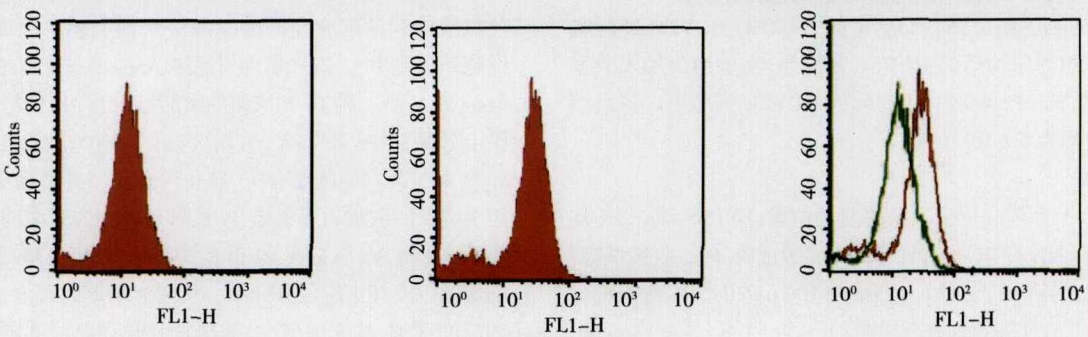


图 4　线粒体膜电位测定结果（Rho123 法）

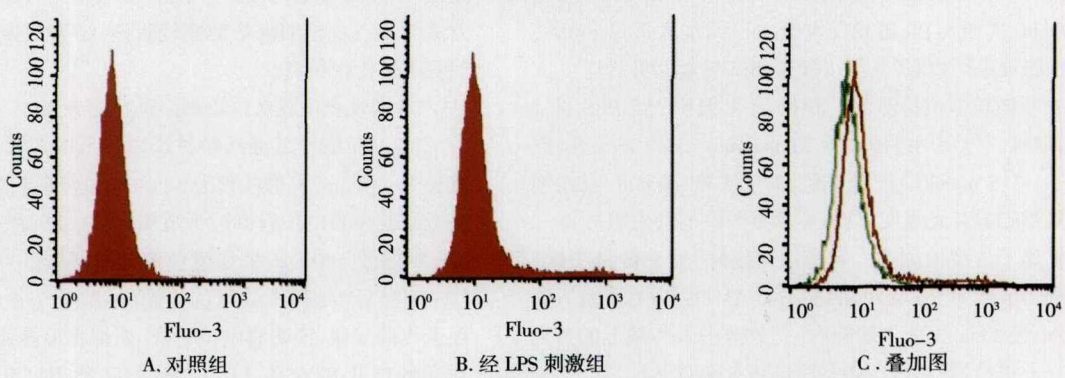


图 5　钙离子浓度测定结果

3　讨　论

综上所述，每一种检测方法都有各自的优势，但没有一种是十全十美的。因此，在选择凋亡检测方法的时候，应该首先了解每种方法的优缺点。例如 DNA 含量测定的亚 $G_{0/1}$ 峰并非凋亡细胞所特有，凋亡细胞、机械损伤细胞、低 DNA 含量的细胞或不同染色体结构的细胞均可造成亚 $G_{0/1}$ 峰。因此，这种方法我们不推荐使用。Annexin-V-FITC/PI 法虽然比较灵敏，但是也存在缺点的缺点：①不能区分晚期凋亡细胞和坏死细胞（因为晚期凋亡细胞膜的通透性已有增强，PI 可能会透过其细胞膜使其着色）。②并非所有凋亡的细胞 PS 都外翻，Annexin-V 也可能结合在坏死组织细胞的 PS 以及活化的血小板上的 PS。另外，细胞因补体活化的裂解，PS 也会暴露出来。此法在标本制备过程中应多加注意，尽量降低晚期凋亡和坏死比例，增加早期凋亡细胞比例，也能比较客观地反映细胞凋亡情况。

LPS 诱导 HUVEC 细胞凋亡可能是通过膜电位下降，线粒体不能维持其功能而导致的。线粒体跨膜电位的下降，被

认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件，它发生在细胞核凋亡特征(染色质浓缩、DNA 断裂)出现之前，一旦线粒体崩溃，则细胞凋亡不可逆转[7,8]。Barreso G 等证实精子线粒体膜电的丧失是精子凋亡的一个普遍特征，发生于多种因素所诱导的精子凋亡过程中[9]。吴永明等探讨精子早期凋亡过程中质膜磷脂酰丝氨酸(PS)外翻与线粒体膜电位丧失的相关性，证明凋亡精子百分率与线粒体膜电位丧失精子百分率间均呈正相关[10]。钙离子是细胞内最重要的第二信使之一，参与调控细胞和组织的许多生理活动[11]。钙离子在细胞凋亡过程中发挥着重要作用，早在 1977 年，Kaiser 等发现在糖皮质激素诱导的胸腺细胞凋亡中，有 Ca^{2+} 内流增强的现象[12]。大量实验结果证明，在大多数细胞凋亡过程中，细胞内钙离子浓度有所增加。而另一方面，在很多实验系统中，细胞内钙离子浓度的降低也可促进细胞凋亡。因此，可能不只是细胞内钙离子浓度的升高或降低引起细胞凋亡，而起决定作用的因素在于维系某一细胞生存的钙离子浓度的稳态失调[13]。流式细胞术一次测量细胞数量大，故测定结果较为准确，误差小，因此在活的细胞中进行测定，极有助于生命科学中对线粒体膜电位和 Ca^{2+} 浓度变化的研究。但是，这些染料并不能说明细胞凋亡的机制，应与其他凋亡检测方法进行综合分析，如将 caspase 分析、形态学、生化等方法共同使用。

随着流式细胞仪技术的发展以及越来越多的荧光探针、检测试剂盒的出现。流式细胞仪以其快速、灵敏、准确的特点，成为检测细胞凋亡的重要手段。除上述 4 种方法外，还可测定溶酶体质子泵、凋亡细胞内 pH 值和 RNA 含量等的特征变化，在选择方法前还需考虑细胞样品性质、凋亡诱导剂特性、所需要获得的信息及技术限制。另外，采用流式细胞仪对凋亡细胞的单一特征测定通常不足以判定细胞亡，应进行多参数分析或结合形态学的评价才更为准确。随着对细胞凋亡研究的不断深入，流式细胞仪在细胞凋亡研究中势必将会发挥更加重要的作用。

参 考 文 献

[1] 赛 燕. 细胞凋亡机制中的关键性蛋白活性调控与临床疾病新药设计[J].现代医药卫生，2004，6：690-692.

[2] 王书奎，周振英.实用流式细胞术彩色图谱[M].上海：第二军医大学出版社，2004.4.

[3] 林珏龙.流式细胞仪对凋亡细胞作用的研究[J].现代诊断与治疗，2002，13(4)：226.

[4] 丛玉隆.流式细胞仪及其临床应用[J].医学检验与临床，2006，17(4)：1-2.

[5] Vermes J，Haanen C，Steffens N，et al.A novelassay for apoptosis：Flow cytometric detetion of phosphatidy lserineex pression on early apoptic cells using fluoreescine labeled Annexin V[J]. Immunol Methods，1999，184(1)：39-42.

[6] Salvioli S，Ardizzoni A，Franceschi C，et a1.JC-1，but not DiOC6 (3) or Rhol23，is a reliable fluorescent probe to assess △φ changes in intact cells：implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis[J].FEBS Lett，1997，411：77-82.

[7] SuzukiK，KoslinS，PersonV，et al.Time cotlrse ofthe apoptotlc cascade and effects of caspase inhlbitors in adult rat ventriculRr cardiomyoeytes[J]. J Mol Cell Cardiol，2001，33(5)：983

[8] Mohamad N，Gutierrez A，Nunez M，et al.Mitochondrial apoptotic pathways[J]. Biocell，2005，29(2)：149-161.

[9] Barreso G，Taylor S，Momhedi M，et al.Mitoehondrial merebrahe potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers：a comparison of two different sperm subpopulations [J].Fertil Steril，2006，85(1)：149-154.

[10] 吴永明，夏欣一，潘连军，等.精子质膜磷脂酰丝氨酸外翻与线粒体膜电位的关系[J].生殖与避孕，2006，26(12)：735-739.

[11] 康华光.膜片钳技术及其应用[M].北京：科学出版社，2003.130-151.

[12] Kaise N，Edelman I S.Calcium depend ence of glueocorticoid induced lymphocytolysis[J].Proe Natl Acad Sci USA，1977，74：638-642.

[13] 敖 琳，曹 佳.细胞凋亡中 Ca^{2+} 稳态失调机制的研究进展[J].国外医学分子生物学分册，2001，23(2)：106-109.

(责任编辑：冉明会)

欢迎投稿，欢迎订阅

《医学教育探索》

邮发代号 78-127