DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.049
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2002

文章编号:1000-5404(2002)07-0855-03

论著

双标记流式细胞术定量分析5-FU诱导胃癌细胞早期凋亡

雷 晓,余佩武 (第三军医大学附属西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 以Annexin V-FITC/PI双标记流式细胞术检测5-FU诱导胃癌细胞株SCG7901早期凋亡。方法 250、125、50以及25 mg/L不同浓度5-FU处理SCG7901胃癌细胞0、6、12、18、24、30 h,Annexin V-FITC/PI双标记流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡。结果 早期(0~24 h)瘤细胞凋亡比例随5-FU作用剂量增加和时间延长而显著提高($P<0.01$);后期(24~30 h)瘤细胞以坏死增加为主($P<0.01$)而凋亡比例反而降低。结论 5-FU诱导细胞凋亡呈时间以及剂量依赖关系。Annexin V/PI双标记法可以清楚区分正常、坏死、机械损伤以及凋亡细胞群落,是定量分析早期细胞凋亡的准确方法。

关键词:胃癌;凋亡;5-氟尿嘧啶;Annexin V;流式细胞术
中图法分类号:R329.28;R446.113;R735.2 文献标识码:A

Quantitative analysis of early apoptosis of gastric tumor cells induced by 5-FU with Annexin V-FITC/PI double-labeled flow cytometry

LEI Xiao, YU Pei-wu (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To quantify the early apoptosis of gastric cancer cell line SCG7901 induced by 5-FU flow cytometry with Annexin V-FITC and PI double labeling. Methods The tumor cells were treated with 5-FU at concentration of 250, 125, 50, and 25 mg/L. The apoptosis was detected 0, 6, 12, 18, 24, 30 h after the treatment by using flow cytometry with Annexin V-FITC and PI double labeling method. Results Early apoptosis percentage of tumor cells (0—24 h) was increased significantly with the affected time and the content of 5-FU. But it was decreased during 24—30 h after the treatment, while more necrotic cells were seen at same time. Conclusion 5-FU can induce early apoptosis of tumor cells in a time and dosage-depended manner. Annexin V-FITC/PI double labeling flow cytometry can distinguish dead cells from early apoptotic cells and be of great use in tumor cell apoptosis quantitative analysis.

Key words: gastric cancer; apoptosis; 5-FU; Annexin V; flow cytometry

化疗药物可以通过诱导肿瘤细胞凋亡而抑制、杀灭肿瘤。但通常的肿瘤细胞凋亡研究方法包括凋亡小体形态学观察、DNA凝胶电泳看Ladder、DNA断裂末端标记(TUNEL)等均存在灵敏性与特异性的矛盾,尤其是不易将坏死细胞与凋亡细胞区分开。细胞凋亡的早期细胞膜变化有磷脂酰丝氨酸(Phosphatidy serine,PS)暴露,这一改变早于细胞形态改变及DNA断裂。Annexin V是一种Ca^{2+}依赖磷酸脂结合蛋白,对PS有高度亲和性,可以用作检测PS暴露的特异性探针检测细胞早期凋亡[1]。本研究利用Annexin V—FITC/PI双标记流式细胞术检测5-FU诱导胃癌细胞株凋亡,探讨该方法在早期细胞凋亡检测中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 胃癌细胞株及其培养 人胃腺癌细胞株SCG7901购自上海细胞生物所。细胞在含10%小牛血清的DMEM(GIBCO)培养基37 ℃、5%CO_2、饱和湿度下培养,取对数生长期细胞。

1.1.2 主要试剂与仪器 Annexin V Flous Staining Kit(Roche)、5-FU;流式细胞仪(Beckman Coulter, Epics XL型)

1.2 方法

1.2.1 肿瘤细胞处理 收集对数生长期细胞,调浓度为1×10^6个/ml,接种于24孔培养板,每孔1 ml。细胞培养箱培养48 h后用新鲜培养基换液,同时分250、125、50、25 mg/L终浓度加入5-FU。在药物处理6、12、18、24、30、36 h后以0.25%胰酶消化、吹打收集,PBS离心洗涤2次后备用。

1.2.2 流式细胞仪检测 按1∶1∶50比例将Annexin V-FITC、PI、HEPES缓冲液配成Annexin V—FITC/PI染液。每100 μl染液重悬1×10^6个瘤细胞,室温下孵育15 min后加入1 ml HEPES缓冲液混匀上机。以488 nm波长激发525、620 nm带通滤片分别检测FITC和PI荧光。每样本收集20 000个细胞荧光信号。

1.2.3 数据分析 Annexin V-FITC/PI双标记流式细胞术可以将实验样本中正常、坏死、凋亡细胞区分开。以FITC和PI荧光作双参数点图,可见肿瘤细胞分为四个亚群:A:Annexin V-FITC—、PI—,代表活细胞。B:Annexin V-FITC—、PI+,代表机械损伤细胞。C:Annexin V-FITC+、PI—,为早期凋亡细胞。D:Annxin V-FITC+、PI+为坏死细胞。分别计数四群细胞比例并在不同5-FU浓度组和处理时间长短间进行t检验。

2 结果

2.1 流式细胞检测

Annexin V-FITC/PI双参数图上可见初期细胞主要分布于第三象限(Annexin V—PI—)。5-FU处理后肿瘤细胞分布出现明显改变,第四象限细胞(Annexin V+PI—)增加并随时间进程比例提高。后期第二象限细胞(Annexin V+PI+)分布也明显增加,见图1。

作者简介:雷 晓(1970—),重庆市人,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤生物治疗方面的研究。电话(023)68755991

收稿日期:2001-08-22;修回日期:2001-10-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

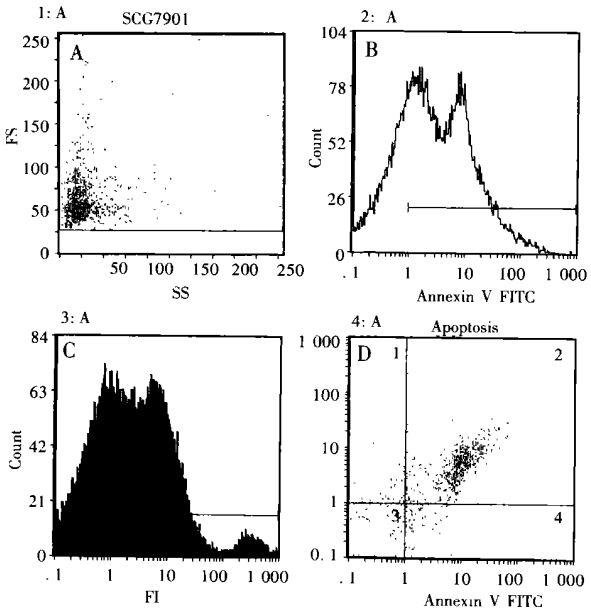


图 1 125 mg/L 5-FU 作用 24 h 后流式细胞术检测凋亡

Fig 1 Results of flow cytometry with Annexin V-FITC/PI double labeling on the apoptosis of cancer cells induced by 5-FU

2.2 数据分析

分析表明, SCG7901 细胞在 5-FU 处理 6 h 后其细胞凋亡在各浓度组间无明显变化(1.52%～4.15%, $P>0.05$); 药物作用 12 h 后, 光镜观察未发现各组间有明显变化, 细胞依旧贴壁生长, 但流式细胞术在各药物处理组均可以检测到明显细胞凋亡, 12～24 h 间细胞凋亡随时间进程逐步提高。并且, 各组间细胞凋亡比例在药物浓度间差异有显著性意义($P<0.01$)。其中高浓度组(250 mg/L)在 24 h 点肿瘤细胞凋亡比例达 61.2%。

肿瘤细胞坏死也逐渐增加并呈明显时间依赖关系但坏死比例对药物浓度的依赖关系远不如细胞凋亡明显。药物作用 24～30 h 以后, 50～250 mg/L 浓度组肿瘤细胞凋亡不增反降。光镜观察培养细胞, 可见药物处理 24～30 h 后瘤细胞出现大片脱落、悬浮。同时流式细胞仪检测发现: 无药物处理组瘤细胞的凋亡与坏死比例也有增加(14.6% 和 6.21%)。这可能与培养板孔中肿瘤细胞大量增殖、培养基营养消耗有关, 见图 2, 3。

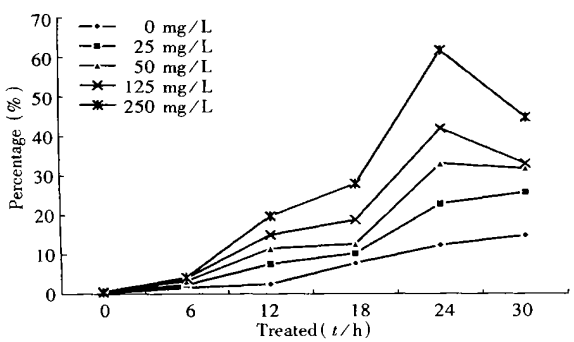


图 2 SCG7901 肿瘤细胞凋亡的时间、剂量关系曲线

Fig 2 Curve of apoptosis percentage of 5-FU induced SCG7901 cells under treated time and drug contents

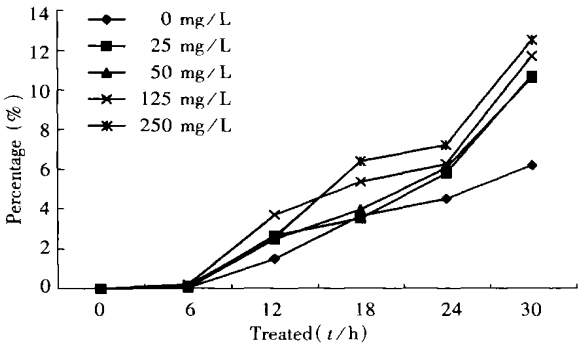


图 3 SCG7901 肿瘤细胞坏死的时间、剂量关系曲线

Fig 3 Curve of necrotic percentage of 5-FU induced SCG7901 cells under treated time and drug contents

3 讨论

细胞凋亡事件发生时间顺序一般依次为受体激活、线粒体功能减低、Caspase 家族激活、PS 暴露、DNA 断裂、形态改变等。传统的凋亡检测方法如观察凋亡小体、TUNEL 法标记 DNA 断裂实际是检测凋亡晚期甚至是已经死亡细胞的改变。检测凋亡早期细胞膜 PS 暴露的方法, 比检测 DNA 断裂或形态改变更能反映凋亡的启动。因此, 使用能特异性结合细胞膜 PS 的 Annexin V 作为探针, 可以检测细胞早期凋亡。并且, 利用碘化丙啶(PI)不能透过完整细胞膜的特点, 可以使用 Annexin V/PI 双标记法将凋亡细胞、坏死细胞、损伤细胞与正常细胞区别开[3]: 其中 Annexin-V 单阳性细胞为凋亡细胞, Annexin-V 与 PI 双阳性细胞为坏死细胞, 双阴性细胞为活细胞。利用此方法定量分析常规化疗药物 5-FU 对于胃癌细胞株 SCG7901 的凋亡诱导作用也看到: 经 5-FU 作用后, 光镜下各组细胞形态在 12 h 点并无明显改变, 无法与对照组相区别。而使用双标记流式细胞术检测发现: 50～250 mg/L 浓度组肿瘤细胞的 Annexin-V-FITC 单阳性细胞比例较其 6 h 点时已经有明显增加, 说明其细胞已有早期凋亡。5-FU 作用 24 h 后光镜下才可见显著细胞生长状态改变, 而此时细胞凋亡比例已达到高峰。因此, Annexin V/PI 双标记法可以在细胞形态尚未出现改变时检测到细胞凋亡。此后, 由于使用 24 孔板培养细胞, 加入其中的 5-FU 没有洗出, 持续作用于肿瘤细胞, 使其完全失去增殖能力, 而培养孔中的 Annexin-V 单阳性细胞会进一步转化为 Annexin-V/PI 双阳性细胞, 造成后期 30 h 点检测发现 50～250 mg/L 浓度组细胞凋亡比例下降。不是凋亡减少, 而是凋亡细胞转化为死亡细胞的原因。同样, 由于培养孔没有换液, 空白组在培养一定时间后, 由于细胞快速增殖、营养物质消耗, 其凋亡和死亡也有增加的趋向。

本研究表明, Annexin-V/PI 双标记流式细胞术在细胞形态尚未明显改变时可检测出早期凋亡增加, 快速准确得到时间、浓度与凋亡的关系曲线, 并且能将凋亡细胞与坏死细胞区分开。说明该方法在检测细胞早

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

期凋亡中有特异性、准确性高的特点，为探讨化疗药物对肿瘤细胞的作用机制及效果分析提供理想手段；并为临床早期凋亡检测提供新手段。

参考文献：

[1] Vermes I, Hannen C, Steffens-Nakken H, *et al*. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phasphatidylserine expression early apoptotic cells using flourescein labeled Annexin V. J. Immunol[J]. Methods, 1995, 184(1): 39－51.

[2] 郑骏年，谢叔良，陈家成 等. 流式细胞术定量检测细胞凋亡 3 种方法的比较研究. 中国免疫学杂志[J]. 1999, 15(10): 467－469.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2002)07-0857-01

个案与短篇

急性脑卒中并发高渗性非酮症糖尿病昏迷的治疗体会

Experiences in the treatment of acute cerebral paralysis complicated with nonketogenic hyperosmolar hyperglycermic coma

汪　毅　（合川市人民医院急救中心内科，合川 401520）

例 1，男，54 岁。患者入院前 1 年患“脑梗死”后遗留左侧肢体轻瘫，入院前 1 d 出现右侧肢体活动不灵伴言语不清入院治疗。否认高血压、糖尿病、冠心病史。入院查体：体温 36 ℃，血压 146/98 mmHg。心、肺、腹未见异常。意识清楚，不完全运用性失语。左眼裂小，左侧瞳孔(2.5 cm)＜右侧瞳孔(4.1 mm)，左眼球略内陷，眼球各方向运动自如。左面部汗少。右侧鼻唇沟浅，伸舌右偏。左侧肢体肌力Ⅱ级，右侧肢体肌力Ⅱ级。双侧病理征呈阳性。入院当日头颅 CT 提示：双侧基底核区脑梗死。心电图：冠状动脉供血不足。血常规、血钾、钠、氯、血尿素氮、二氧化碳结合力、血脂均正常，血糖 15.5 mmol/L，尿糖(＋)，尿酮体(－)。给予 20%甘露醇 125 ml 加速尿 20 mg，每日 3 次，静滴，同时给予丹参针，ATP、辅酶 A，5%GS＋胰岛素等治疗，同时注意保持出入量及电解质的平衡。入院第 2 天，病情加重，出现嗜睡状态，入院第 3 天，呈昏迷状态。急查血糖 44.0 mmol/L。血钾 5.1 mmol/L，钠 150 mmol/L，氯 96 mmol/L，血尿素氮 10 mmol/L，二氧化碳结合力 19.98 mmol/L，尿糖(＋＋＋＋)，尿酮体(＋)，血浆渗透压力 364.0 mOsm/L。考虑并发高渗性昏迷，停用脱水剂，给予大量补液，小剂量胰岛素静脉滴注(6 U/h)，同时加强对症处理。病情一度好转，但于入院第 4 天死亡。

例 2，男，60 岁。患者于入院前 1 天，看电视中突然出现左侧肢体活动不灵，伴头痛、呕吐，以“脑出血”收入院。高血压病史 10 年。否认糖尿病、冠心病史。入院查体：温度 36 ℃，血压 173/113 mmHg。心、肺、腹未见异常。嗜睡状态，脑膜刺激呈阴性。两眼球向右凝视，左侧肢体肌力 0 级，右侧病理呈阳性。入院当日头颅 CT 提示：右侧基底核区脑出血，心电图、血常规、血脂正常，血糖 11.6 mmol/L，尿糖(－)，尿酮体(－)。给予 20%甘露醇 125 ml 加速尿 20 mg，每日 4 次静脉滴注，同时给予止血、预防感染、纠正水电解质平衡等处理。入院第 7 天，病情突然加重，呈浅昏迷状态。复查头颅 CT 提示为右侧基底核区脑出血吸收期，无新出血灶，复查血糖 50.0 mmol/L，血钾 5.5 mmol/L，钠 140 mmol/L，氯 92 mmol/L，血尿素氮 24.6 mmol/L，二氧化碳结合力 19.60 mmol/L，尿糖(＋＋＋)，尿酮体(＋)，计算渗透压为 365.6 mOsm/L。考虑并发高渗性昏迷，停用脱水剂，增大补液量，同时小剂量静脉滴注胰岛素(6 U/h)及对症治疗。入院第 9 天死亡。

例 3，女，52 岁。患者于入院前 3 d 无诱因出现右侧肢体无力伴言语不清，以“脑梗死”收入院。高血压病史 20 年，糖尿病病史 10 年。入院查体：体温 36.8 ℃，血压 195/105 mmHg。心、肺、腹未见异常。意识清楚，不完全运动性失语，同时有命名性失语，失读，计算不能，不能识别手指，左右侧认识不能，书写不能，右侧鼻唇沟浅，伸舌右偏。右侧肢体肌力Ⅱ级，右侧病理呈阳性。入院次日头颅 CT 提示：左侧基底核区及顶枕叶区多发性脑梗死。心电图、血常规正常。血糖 58 mmol/L，尿糖(－)，尿酮体(－)。给予甘露醇、低分子右旋糖酐、ATP、辅酶 A 等治疗，同时注意水电解质平衡。入院第 3 天出现烦躁、口渴、呕吐，当晚出现昏迷。急查血糖为 37.8 mmol/L，尿糖(＋＋＋)，尿酮体(＋)，血钾 5.2 mmol/L，血钠 140 mmol/L，血氯 110 mmol/L，血尿素氮 20 mmol/L，二氧化碳结合力 19.60 mmol/L，计算渗透压为 897.9 kPa(348.2 mOsm/L)。考虑并发高渗性昏迷，给予小剂量胰岛素(6 U/h)静脉滴注，同时给予增大补液量及对症治疗。入院第 4 天死亡。

2　讨论

急性脑血管病并发高渗性昏迷，病死率极高[1]。在治疗急性脑血管病的过程中，首先应预防高渗性昏迷的发生，需注意：①脱水剂用量及使用时期，对有糖尿病或血糖高的患者应慎重。②慎用激素治疗，尤其在血糖增高时。③在血糖增高时，应适量应用胰岛素治疗。其次是早发现及时治疗。出现意识障碍时，下列情况要考虑到合并高渗性昏迷的可能，并及时查血糖、尿糖等化验。①临床症状难以用急性脑血管病解释或相应治疗无效者；②重度脱水或休克，而尿量并无明显减少甚至增多者，③出现原因不明的进行性意识障碍，尤其静脉滴注大量脱水剂、葡萄糖、激素或合并感染时。治疗高渗性昏迷需大量补液，而大量补液又可致颅压升高，使病性恶化。故补液要适量，速度以迅速纠正血浆的高渗状态和脱水、恢复血容量为宜。同时用胰岛素治疗，使血糖缓慢稳定地下降至理想水平。还要加强对症处理及注意监测水电解质及酸碱平衡。

关键词：脑血管疾病；糖尿病；高渗性昏迷
中图法分类号：R743.306；R587.2　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 黄耀忠. 脑卒中并发高血糖高渗性非酮症综合征 11 例报告[J]. 新医学，2000, 31(6): 348.

（编辑　张大春）

作者简介：汪　毅(1962－)，男，重庆市人，主治医师，主要从事神经内科、急救医学方面的研究。电话：(023)42720953

收稿日期：2002-04-27；修回日期：2002-06-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net