

细胞凋亡检测方法新进展

高超 华子春*

(南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

摘要 细胞凋亡是生命科学研究热点之一, 检测细胞凋亡的方法层出不穷。目前, 用于体外细胞凋亡检测的方法已相对成熟, 比如: 流式细胞术、TUNEL检测法、DNA片断检测等。而用于体内细胞凋亡检测的试剂则正在研究之中, 各种检测试剂不断出现。其中, Annexin V、Synaptotagmin I-C2A、ApoSense家族分子与其他检测试剂相比具有一定的优势。该文在介绍几种常用的体外细胞凋亡检测方法的同时, 重点介绍上述三种试剂。

关键词 细胞凋亡; Annexin V; synaptotagmin I-C2A; ApoSense

1 引言

细胞凋亡(apoptosis)又称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD), 是细胞在一定生理或病理条件下, 按照自身程序主动性、生理性的死亡过程。细胞凋亡涉及一系列基因的激活、表达以及调控, 是细胞为更好地适应生存环境而采取的主动死亡过程。细胞凋亡不仅在胚胎发生、器官发育及机体免疫等过程中至关重要, 而且在心血管病变、神经性病变、肿瘤的发生等疾病中起重要作用^[1]。一些通过激活或抑制细胞凋亡来治疗疾病的方法不断出现, 如Caspases的激活剂或抑制剂、Bcl-2和survivin的反义RNA、重组的TRAIL等^[2]。因此, 研究细胞凋亡对基础研究和临床应用有重要价值。体外细胞凋亡检测的方法已相对成熟, 比较常用的方法是应用Annexin V-FITC与PI双标记结合流式细胞术检测细胞凋亡。体内细胞凋亡检测目前还处于成长期, 但在临床应用上的价值则日益凸显^[3]。本文在介绍细胞凋亡的形态和生化特征改变的基础上, 综述了常用的体外检测方法, 并重点介绍体内凋亡检测方法中尚处于研究阶段的三类分子。

2 细胞凋亡的形态学和生化特征变化

细胞凋亡过程中伴随着一系列的形态学变化, 首先是细胞变圆并与邻近细胞脱离, 细胞质及胞浆浓缩, 染色质固缩并聚集于核膜附近, DNA通常在核小体连接区被降解为180 bp~200 bp的整数倍片段, 细胞膜突出形成质膜小泡, 脱落后形成凋亡小体, 其内可保留完整的细胞器和致密染色质。由于凋亡小

体被周围细胞吞噬, 无细胞内容物外泄。因此, 不同于坏死, 细胞凋亡过程中的形态学和生化变化可以很大程度地减轻对组织的损害^[4]。

最初人们仅从形态学特征的改变加以认识, 如细胞核皱缩、染色质凝集、细胞膜翻转、DNA片段化、线粒体肿胀和凋亡小体形成等。进一步的研究表明细胞凋亡涉及一系列复杂的生化反应, 是一个需要一系列酶参与的级联反应, 涉及不同基因的表达及调控、信号传导^[2]。目前已知的凋亡通路包括线粒体通路、死亡受体通路和内质网通路。线粒体在凋亡过程中扮演重要角色, 如Caspase激活因子的释放、电子传递链的变化、线粒体膜电位的去极化、细胞的氧化还原反应。线粒体膜上具有调控凋亡的Bcl-2家族蛋白, 该蛋白的结合状态将调节线粒体膜电位的变化, 改变细胞色素C(cytochrome C, Cyt C)等的释放, 从而通过激活Caspase通路导致细胞凋亡, 或直接作用于细胞核引起细胞凋亡。

3 细胞凋亡的体外检测

3.1 形态学检测

细胞凋亡与坏死的区别最早是通过电子显微镜(electron microscopy, EM)发现的。电镜可以观察

收稿日期: 2010-09-29 接受日期: 2010-12-24

“新药创制”科技重大专项(No.2009ZX09103-675)、国家自然科学基金(No.50973046)、江苏省科技厅(No.BY2009147, No.BK2008138, No.BK2010046)、江苏省教育厅(No.JH10-1)和常州市武进区科技局(No.WG2009007, No.WS201004)资助项目

*通讯作者。Tel: 025-83324605, E-mail: zchua@nju.edu.cn

到细胞结构在凋亡不同时期的变化, 由于凋亡细胞在透射电镜下特征明显, 所以EM是区别凋亡与坏死的黄金标准^[5]。EM样品制作过程较复杂, 设备仪器昂贵, 因而没有广泛应用。细胞涂片或组织切片经hematoxylin和eosin(H&E)染色后, 即可直接在光学显微镜(light microscopy, LM)下观察。光镜下凋亡细胞体积缩小、细胞核固缩、染色体集中在核膜内侧, 细胞膜皱缩并包裹细胞碎片形成“凋亡小体”。该方法简便易行, 但分辨率低, 不易检出早期的凋亡细胞。而且, 某些类型的细胞坏死与细胞凋亡形态相似, 不易区分。该方法主观性较强, 可用于凋亡检测的初步判断。光镜的精确性可以通过使用荧光得到提高, 体外培养的细胞经荧光染料处理后, 在荧光显微镜(fluorescence microscopy, FM)下可观察到凋亡细胞的细胞核改变和凋亡小体的形成。这些方法只适用于体外培养的细胞的检测, 但在定量和定性方面较差, 故在实际应用中很少被单独使用。

3.2 DNA片段化检测

DNA被核酸酶剪切被认为是最显著的生化变化^[1]。凋亡细胞的DNA被核酸内切酶在核小体单位间断裂, 形成180 bp~200 bp或其整数倍的寡核苷酸片段, 用琼脂糖凝胶电泳检测显示梯形条带。而坏死细胞DNA则被降解成弥散条带。此方法简便易行, 但梯状条带不能区分细胞凋亡与坏死。此外, DNA电泳法不能进行准确定量。

3.3 TUNEL检测法

TUNEL法最早由Gavrieli^[6]于1992年引入。基本原理是: 由于细胞凋亡中断裂的DNA链会产生大量的3'-OH末端, 把脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)和生物素或地高辛标记的dUTP放在一起温育, TdT将标记的dUTP连接到凋亡细胞DNA片段的3'末端, 然后再用荧光染料标记的生物素或地高辛抗体作为二抗进行反应, 这样可使产生DNA断裂的凋亡细胞标记有增强的荧光^[7]。正常细胞几乎没有DNA的断裂, 很少能够被染色, 而凋亡细胞则显色。但TUNEL法也有其局限性, 如: 组织固定、处理的过程本身会改变检测结果, 对细胞凋亡不是特异性的, 坏死细胞也会被标记。尽管如此, TUNEL法在体外原位检测方面显示出优越性, 被广泛使用。

3.4 细胞色素C的定位检测

正常情况下, 细胞色素C存在于线粒体双层膜之间参与细胞内电子传递。当细胞受到凋亡刺激之

后, Cyt C从线粒体释放到细胞质, 并与细胞质中的凋亡蛋白激活因子1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf 1)结合形成复合物, 启动Caspase级联反应而引起细胞凋亡^[8]。凋亡发生时线粒体内膜上的Cyt C氧化酶亚单位IV(COX4)作为线粒体富集的标志保留在线粒体内, 从凋亡细胞和非凋亡细胞中分离出富集的线粒体, 用Cyt C抗体和COX4抗体可显示Cyt C和COX4的位置, 从而检测凋亡细胞的发生。

3.5 Caspase-3和PARP的活性检测

在哺乳动物细胞凋亡过程中, 一类半胱氨酸-门冬氨酸特异性蛋白酶起关键作用, 称为Caspase。Caspase主要以酶原形式存在于正常细胞中, 通过发生蛋白水解活化。Caspase有多种成员, 可逐级水解活化, 参与炎症反应和凋亡过程^[9]。其中Caspase-3是凋亡通路下游的水解酶, 它在凋亡信号传导的许多途径中发挥功能。正常细胞中Caspase-3以酶原形式存在于胞浆中, 在凋亡的早期阶段被激活, 活化的Caspase-3由两个大小亚基组成, 裂解相应的胞浆细胞核底物, 最终导致细胞凋亡。因此, Caspase-3常被作为细胞凋亡的早期检测指标。但在细胞凋亡的晚期和死亡细胞, Caspase-3的活性明显下降, 无法直接区分凋亡与坏死细胞。

PARP是第一个被认识的Caspase-3底物, 出现在凋亡早期。正常或轻度DNA受损的细胞由PARP帮助修复DNA, 维持基因组稳定。当损伤过度时, 细胞凋亡的启动使PARP水解形成相对分子质量为89 kDa和24 kDa两个片段^[10], 因此可以用针对PARP大片段降解产物的抗体检测细胞是否发生凋亡。

3.6 线粒体膜电位的检测

线粒体在凋亡中起关键作用, 在线粒体尚未发生明显的形态变化时, 其膜电位已经发生了变化^[9,11]。线粒体膜电位的下降被认为是细胞凋亡过程中最早发生的事件。一旦线粒体膜势能耗散, 细胞凋亡将不可逆转。线粒体膜电位变化的检测属于电化学的方法, 使用时需始终保持平衡染液pH的一致性。

3.7 TFAR19的表达与细胞定位

凋亡相关蛋白TFAR19 (TF-1 cell apoptosis related gene 19)是由Ma等^[12]发现的, TFAR19蛋白在细胞凋亡早期表达量显著增加, 并且从细胞质转移到细胞核, 加速了磷脂酰丝氨酸的外翻以及染色体DNA的片段化, 具有促进细胞凋亡的功能。因此, TFAR19蛋白可以作为早期细胞凋亡的检测分子。用荧光素

标记的TFAR19单克隆抗体作为探针,可以检测凋亡早期TFAR19蛋白的表达水平变化及核转位现象^[13]。需要指出的是,一旦TFAR19转移到细胞核,这种核转位现象将从凋亡初期一直维持到凋亡末期,从而可以延长凋亡检测的时间。

3.8 ELISA法

细胞凋亡时钙-镁依赖性核酸酶进入核小体间切割DNA,产生180 bp~200 bp或其倍数的核小体片段。而核小体由于与组蛋白H2A、H2B、H3和H4形成紧密复合物而不被核酸内切酶切割。采用双抗体夹心酶免疫法,应用抗DNA和抗组蛋白的单克隆抗体,与核小体片段形成夹心结构,可特异性检测细胞溶解物中的核小体片段^[13]。ELISA可用于贴壁培养细胞、悬浮培养细胞、血清、血浆等的检测^[5]。该方法可检测早期细胞凋亡,灵敏度高,适用于多样本^[14]。

3.9 流式细胞术

流式细胞术已经成为生命科学研究中的一门常用技术,应用FCM法可以定量检测凋亡细胞并同时获得多项参数。流式细胞术主要包括多种方法,其中Annexin V/PI法是目前较为流行的检测细胞凋亡的方法。细胞凋亡时磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)由细胞膜内侧翻转到细胞膜外侧^[15]。Annexin V是一种钙依赖性的磷脂结合蛋白,对PS具有较高亲和性。它可以较为敏感地检测细胞膜表面的翻转的PS,可特异结合异硫氰酸荧光素(FITC)而保持细胞膜的完整性。另外,变性染色质的荧光染料碘化丙啶(PI)不进入细胞质,因而,在流式细胞仪得到的双变量散点图上,正常活细胞均低染,凋亡细胞Annexin高染PI低染,坏死细胞均高染。该方法快速可靠,不需要固定细胞,从而避免了TUNEL法因固定而出现的DNA片段丢失。Annexin V/PI法是目前较为理想的检测细胞凋亡的方法,缺点是细胞膜的改变持续时间有限,选择检测的时机很重要。

3.10 乙酰胆碱酯酶的变化

乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)是主要存在于神经系统的一种水解酶,在神经传导中执行重要的功能。AChE的经典功能是水解神经递质乙酰胆碱,终止神经递质对于突触后膜兴奋刺激作用,从而保证神经信号在生物体内正常的传导。近年来发现它的许多非经典功能,其在神经细胞的分化、迁移、突触的形成、细胞粘附、肿瘤细胞的增殖与分化等过程中发挥重要作用。体外研究发现当

细胞处于凋亡状态时会大量表达AChE^[16]。使用反义核酸的方法来抑制乙酰胆碱酯酶的表达,可以使一部分细胞免于凋亡^[17]。因此,可以尝试把AChE的变化作为检测细胞凋亡的指标。

4 细胞凋亡的体内检测

细胞凋亡在维持多细胞生物机体稳态、生长发育等生命活动中发挥重要作用。不正常的细胞凋亡会导致组织功能紊乱,包括自身免疫疾病、神经退行性疾病、肿瘤等。肿瘤的治疗方法很多,有效的肿瘤治疗包括通过化疗药物诱导体内细胞凋亡。临床上迫切需要非损伤性的方法来检测癌症病人使用药物的效果,以及对新药药效作出评价^[18]。因此,体内细胞凋亡检测试剂备受瞩目,目前只有处于临床阶段的体内细胞凋亡检测试剂,常规检测试剂尚未出现。Annexin V是最早被广泛研究的一类蛋白质分子,其多种改造后的变体已经面世。Synaptotagmin I-C2A同样具有结合PS的特性,但和Annexin V的变体相比其Kd值偏大,有待改进。另外还有一类放射性小分子化合物——ApoSense家族被用作示踪剂,此类分子分子量小(300 bp~700 bp)且具有结合磷脂双分子层的特性,其家族成员在体内细胞凋亡检测上的地位不断攀升。除此之外,还有通过噬菌体展示文库筛选到的PS结合肽、阳离子脂质体等,因其功能有待进一步验证,所以它们的研究价值不如前面三类分子。至于Caspase-3的活性示踪物,由于Caspase-3不仅仅在细胞凋亡中发挥作用,所以其研究价值也体现不出来^[9]。

4.1 Annexin V在临床上的应用

人膜联蛋白V(Annexin V)具有抗血液凝固的生理作用,最早从人胎盘发现。目前已经发现160个膜联蛋白家族成员,它们都具有钙离子依赖的结合细胞膜上带负电磷脂的特性。在细胞中参与膜转运及膜表面一系列依赖于钙调蛋白的活动,包括囊泡运输、胞吐作用中的膜融合、信号传导和钙离子通道的形成、调控炎症反应、细胞分化和细胞骨架蛋白间的相互作用等。Annexin V是Annexins家族中研究最早、分布最广泛、含量最丰富的成员之一,人Annexin V的相对分子质量为36.5 kDa,是一条由320个氨基酸残基组成的单链蛋白。其主要生理功能包括:钙离子通道活性、抗凝活性、蛋白激酶C抑制活性等。利用Annexin V与磷脂酰丝氨酸的高亲和力结

合特性开发的新型分子探针、药物载体已经得到应用^[18]。

早在1994年,^{99m}Tc-Annexin V就被用于心房颤动病人心房内血栓的检测。尽管结果是让人失望的,但这项研究表明^{99m}Tc-rhAnnexin V可以以安全剂量用于临床放射影像。Kemerink等^[20]用^{99m}Tc标记Annexin V与BTAP的络合物,然而过程复杂,而且反应条件苛刻,以及较低的标记纯度(30%~40%),因而效果并不理想。Tokita等^[21]用^{99m}Tc标记Annexin V与胍基尼克酰胺(HYNIC)络合物,^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V表现出更好的肾、肝、膀胱吸收情况,尤其在腹部有较好的影像。在标记过程中,HYNIC用来修饰rhAnnexin V的氮端Lysine残基,然后方便^{99m}Tc去标记此化合物。将HYNIC-Annexin V与^{99m}Tc-高锝酸盐在锡黄酮存在及室温条件下连接5~10分钟即可。虽然^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V不集中在肝或经肠道排泄,但却集中在肾皮质,从而限制了任何肾旁结构的可视度。尽管有以上缺点,^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V还是被用来确定化疗疗效,检测急性心肌梗塞的细胞凋亡情况,确诊红斑狼疮,检测心肌梗塞进程以及易损斑块、急性中风和阿尔茨海默病人成像^[19]。

其它的放射性标记的Annexin V还有V-117、V-128。V-117是在野生型Annexin V的N端添加6个氨基酸(Ala-Gly-Gly-Cys-Gly-His),且第Cys-316被替换成Serine。V-128则是在氮端具有一个内源性的螯合位点(Ala-Cys-Gly-Cys-Gly-His)的融合蛋白。V-117和V-128在肾脏滞留时间上与^{99m}Tc相比有一定优势(在肠腹部的背景和肾脏放射剂量上降低),V-117的生物分布与HYNIC-Annexin V相比又具有明显优势^[21]。另外,还有实验室使用¹⁸F标记Annexin V。与其他Annexin V衍生物相比,Annexin V-128是Annexin V的衍生物中用于SPECT、PET成像以及作为荧光探针的理想选择。另外,南京大学医药生物技术国家重点实验室构建了一种新的rAnnexin V^[22]——在N末端添加10个连续的组氨酸,rAnnexin V保留了Annexin V原有的特性,同时又增添了螯合金属离子的能力,提高了与放射性元素的结合效率及稳定性,简化了标记方法及反应条件等。已经证明,rAnnexin V对于不同类型的凋亡细胞均具有良好的靶向性^[23-27]。

4.2 Synaptotagmin I-C2A的研究现状

突触结合蛋白(synaptotagmin, Syt)是1981年被发现的一类跨膜蛋白,广泛存在于神经和内分泌细

胞内的分泌囊泡上,作为钙离子依赖性神经递质和激素释放过程中的钙离子感受器^[28]。synaptotagmin是囊泡膜的重要组成成分之一,占囊泡总蛋白质量的7%~8%,由一个位于囊泡的N端、一个单链的跨膜区和一个长的胞质区组成。Syt触发和调节囊泡与靶膜的融合过程,参与对神经递质和激素释放过程的严格调控,以及对细胞的蛋白质与膜转运的调节^[29,30]。突触结合蛋白I (syt I)是突触结合蛋白家族中最具有代表性的成员,syt I的胞质区域(C2AB)由高度保守的两个拷贝的C2结构域组成——靠近囊泡膜的C2A和远离的囊泡膜的C2B,syt I通过C2AB结构域在胞吐过程以及与细胞内组分相互作用中发挥作用。

核磁共振光谱(MRS),尤其是核磁共振成像(MRI)可以作为一个有效的临床检测手段,然而,相对较低的敏感度和空间分辨率限制了它在细胞凋亡检测方面的应用。和Annexin V一样,Syt I-C2A也是以依赖Ca²⁺的方式与带负电的磷脂结合。用Annexin V在体内检测细胞凋亡存在空间分辨率相对较低的缺点,尽管已经达到1 mm~3 mm的空间分辨率。基于此,Zhao等^[31]设计了一种非侵入的高分辨率的方法一把Syt I的C2A结构域与超顺磁性氧化铁纳米颗粒连接^[31]。体外实验表明可以减少自旋-自旋弛豫时间(T2),体内试验表明在存在高水平细胞凋亡的肿瘤区域T2加权像增强。

Jung等^[32]制备了生物素标记的C2A-GST融合蛋白,并分别与抗生物素蛋白和抗生物素蛋白链菌素(二者与生物素有高结合力)连接,用于细胞凋亡的检测。T1或T2加权像结果表明二者都可以用于细胞凋亡的检测。美中不足的是,超顺磁性氧化铁颗粒(SPIO)过大,限制了造影剂由血管向肿瘤部位的扩散。另外,抗生物素蛋白和抗生物素蛋白链菌素都有一定的抗原性,用钆(Gd)代替将是个不错的选择。

Fang等^[33]用^{99m}Tc-标记的C2A检测急性心脏细胞死亡。伽马计数表明,心肌梗死组织放射活性是非对照组的(10.2±5.7)倍,预示着C2A有望成为心肌梗死分子探针。

4.3 ApoSense家族

Damianovich等^[34]开发了一类小分子化合物—ApoSense家族,它们可以在凋亡或坏死细胞内积累。动物实验表明,ApoSense是一种灵敏的、特异性的细胞凋亡检测剂。Damianovich等分别用荧光和放射

标记了ApoSense家族的一个成员——丹磺酰半胱氨酸(DDC),在三种急性肾小管坏死动物模型做了体内肾小管损伤检测:肾热缺血/再灌注、远端肾小管坏死以及盲肠结扎/穿孔术诱导的脓毒症。不同的模型表明ApoSense可以作为诊断用显像剂以实时监测各种类型的肾实质损伤,从而评价其分布与强度。不同于Annexin V的是,DDC集中在凋亡细胞内部,有利于信号的放大,从而提高信噪比。然而DDC相关的放射自显影试验并未开展,成为此项研究的限制。

Aloya等^[35]用ApoSense家族的另一个成员NST-732分别进行了细胞死亡的体内和体外实验。在体外,NST-732在多种类型凋亡细胞内选择性积累。在体内,NST-732同样在临床相关的啮齿动物模型细胞选择性吸收:放射诱导的淋巴细胞死亡、肾缺血/再灌注、脑中风。NST-732的吸收与组织病理学的评价一致。

尽管DDC和NST-732都是小分子化合物,在进入细胞方面有一定优势,但仍有许多问题亟待解决。比如:二者的注射剂(70 mg/kg)量显著高于大部分用于小动物实验的放射性造影剂(0.01 mg/kg~1 mg/kg)或荧光探针(1 mg/kg~5 mg/kg)。而且,至今没有确凿的数据支撑ApoSense家族成员用于体外凋亡检测的亲合力,同样没有清除或常规的生物分布数据,尤其在改进背景比率和清除方面存在问题。

γ -羧基谷氨酸(Gla)在凝血因子结合带负电磷脂表面中起重要作用。基于Gla的烷基丙二酸结构,Cohen等^[36]设计了一种新型的小分子化合物——2-(5-氟代戊基)-2-甲基丙二酸(ML-10),其中的丙二酸模体在ML-10的功能中起重要作用。ML-10的吸收与Caspase的激活、Annexin V的结合、线粒体电势的变化等呈正相关。又由于ML-10上有荧光原子,ML-10有望应用于PET。Shirvan等^[37]首次将¹⁸F-ML-10用作体内中风成像PET探针,为临床诊断决策提供了参考。进一步的应用研究仍在进行之中。

5 结语

细胞凋亡的生理生化过程十分复杂,细胞凋亡检测对于基础研究和临床诊断具有重要意义。目前用于体外细胞凋亡检测的方法很多,但每种方法都有自身的局限性。进行细胞凋亡检测时,可以根据样本的特点,选择合适的方法或多种方法同时进行检测。同时,了解各种方法的原理有助于对检测结果作出客观判断。用于体内细胞凋亡检测的试剂尚

处在研究阶段,有意思的是它们的检测原理大都是通过与凋亡细胞表面结合,这和示踪剂在体内滞留时间较短的要求相一致,进入细胞就又多了一层屏障。Annexin V及其变体、Syt I-C2A和ApoSense家族的某些分子的临床应用取决于它们研究的进展。相信随着对细胞凋亡认识的不断深入和检测技术的发展,特异性更强、灵敏度更高的体内细胞凋亡检测试剂将会面世。

参考文献(References)

- 1 Sgonic R, Gruber J. Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol* 1998; 33(6): 525-33.
- 2 Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* 2002; 326(1-2): 27-45.
- 3 Hakumaki JM, Liimatainen T. Molecular imaging of apoptosis in cancer. *Eur J Radiol* 2005; 56(2): 143-53.
- 4 Zhang JH, Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* 2000; 10(3): 205-11.
- 5 Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 2007; 139(1): 143-56.
- 6 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119(3): 493-501.
- 7 Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother* 1998; 52(6): 252-8.
- 8 Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 87-106.
- 9 Ho PK, Hawkins CJ. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J* 2005; 272(21): 5436-53.
- 10 Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281(28): 1309-12.
- 11 Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274(33): 22932-40.
- 12 Liu H, Wang Y, Zhang Y, Song Q, Di C, Chen G, et al. TFAR19, a novel apoptosis-related gene cloned from human leukemia cell line TF-1, could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawal. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254(1): 203-10.
- 13 Chen Y, Sun R, Han W, Zhang Y, Song Q, Di C, et al. Nuclear translocation of PDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis? *FEBS Lett* 2001; 509(2): 191-6.
- 14 Salgame P, Varadhachary AS, Primiano LL, Fincke JE, Muller S, Monestier M. An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(3): 680-1.
- 15 Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184(1): 39-51.
- 16 Jin QH, He HY, Shi YF, Lu H, Zhang XJ. Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cell. *Acta Pharmacol Sin*. 2004; 25(8): 1013-21.

- 17 Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, He HY, Jin QH, *et al.* Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ* 2002; 9(8): 790-800.
- 18 Blankenberg FG. *In vivo* detection of apoptosis. *J Nucl Med* 2008; 49(Suppl 2): 82-95.
- 19 Blankenberg FG. *In vivo* imaging of apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(10): 1525-32.
- 20 Kemerink GJ, Liu X, Kieffer D, Ceyskens S, Mortelmans L, Verbruggen AM, *et al.* Safety, biodistribution, and dosimetry of ^{99m}Tc-HYNIC-annexin V, a novel human recombinant annexin V for human application. *J Nucl Med* 2003; 44(6): 947-52.
- 21 Tait JF, Brown DS, Gibson DF, Blankenberg FG, Strauss HW. Development and characterization of annexin V mutants with endogenous chelation sites for (^{99m}Tc). *Bioconjug Chem* 2000; 11(6): 918-25.
- 22 Zhang LN, Yang X, Hua ZC. Expression and purification of recombinant human Annexin V in *Escherichia coli*. *Prep Biochem Biotechnol* 2000; 30(4): 305-12.
- 23 郑玉民, 王自正, 杨 翔, 华子春, 王 峰, 方 纬. Tc-Annexin V 衍生物的制备及其生物分布和凋亡显像. *中华核医学杂志* 2007; 27(5): 288-91.
- 24 贾支俊, 冯雪凤, 杨 翔, 华子春, 申景涛, 郭万华. ^{99m}Tc-H-Annexin V 动物体内分布及显像. *中国临床医学影像杂志* 2008; 19(1): 56-8.
- 25 郑玉民, 王自正, 颜 珏, 杨 翔, 华子春, 方 纬, 等. ^{99m}Tc-mHis10-Annexin V 探测非小细胞肺癌细胞凋亡的实验研究. *中华核医学杂志* 2008; 28(6): 378-82.
- 26 宋丽萍, 华子春, 张 欣, 邢海燕, 轩 楠. 应用重组改良型人膜联蛋白检测动脉粥样硬化斑块的实验研究. *中国临床医学影像杂志* 2010; 21(1): 53-5.
- 27 宋丽萍, 华子春, 张 欣, 轩 楠, 邢海燕. 应用重组改良型人膜联蛋白评估兔动脉粥样硬化病变程度的实验研究. *中国临床医学影像杂志* 2010; 21(5): 358-60.
- 28 Tucker WC, Weber T, Chapman ER. Reconstitution of Ca²⁺-regulated membrane fusion by synaptotagmin and SNAREs. *Science* 2004; 304(5669): 435-8.
- 29 Loewen CA, Lee SM, Shin YK, Reist NE. C2B polylysine motif of synaptotagmin facilitates a Ca²⁺-independent stage of synaptic vesicle priming *in vivo*. *Mol Biol Cell* 2006; 17(12): 5211-26.
- 30 Vrljic M, Strop P, Ernst JA, Sutton RB, Chu S, Brunger AT. Molecular mechanism of the synaptotagmin-SNARE interaction in Ca²⁺-triggered vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(3): 325-31.
- 31 Zhao M, Zhu X, Ji S, Zhou J, Ozker KS, Fang W, *et al.* ^{99m}Tc-Labeled C2A domain of synaptotagmin I as a target-specific molecular probe for noninvasive imaging of acute myocardial infarction. *J Nucl Med* 2006; 47(8): 1367-74.
- 32 Jung HI, Kettunen MI, Davletov B, Brindle KM. Detection of apoptosis using the C2A domain of synaptotagmin I. *Bioconjug Chem* 2004; 15(5): 983-7.
- 33 Wang F, Fang W, Zhao M, Wang Z, Ji S, Li Y, *et al.* Imaging paclitaxel (chemotherapy)-induced tumor apoptosis with ^{99m}Tc-C2A, a domain of synaptotagmin I: a preliminary study. *Nucl Med Biol* 2008; 35(3): 359-64.
- 34 Damianovich M, Ziv I, Heyman SN, Rosen S, Shina A, Kidron D, *et al.* ApoSense: a novel technology for functional molecular imaging of cell death in models of acute renal tubular necrosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33(3): 281-91.
- 35 Aloya R, Shirvan A, Grimberg H, Reshef A, Levin G, Kidron D, *et al.* Molecular imaging of cell death *in vivo* by a novel small molecule probe. *Apoptosis* 2006; 11(12): 2089-101.
- 36 Cohen A, Shirvan A, Levin G, Grimberg H, Reshef A, Ziv I. From the Glu domain to a novel small-molecule detector of apoptosis. *Cell Res* 2009; 19(5): 625-37.
- 37 Anat S, Rikki W, Ayelet R, Jun Z, Roymond C, Avi C, *et al.* A novel small molecular-weight ^{18F}-labeled apoptosis marker for PET imaging of apoptosis *in vivo* in experimental stroke. *J Nucl Med* 2006; 47(Suppl 1): 135P.

Progress on Detection of Apoptosis

Chao Gao, Zi-Chun Hua*

(The State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing 210093, China)

Abstract Apoptosis is one of the hotspots in life science research, and there are many methods applied in detecting cell apoptosis. *In vivo* detecting assays are relative mature now, such as flow cytometry assay, TUNEL assay, DNA ladder assay and so on. However, *in vitro* detecting assays are still exploring. Now, there are three major reagents applied in *in vitro* apoptosis detecting: Annexin V, Synaptotagmin I-C2A and ApoSense family. This review focuses on introducing the above three major *in vitro* apoptosis detecting reagents.

Key words apoptosis; Annexin V; synaptotagmin I-C2A; ApoSense

Received: September 29, 2010 Accepted: December 24, 2010

This work was supported by the Drug Innovation Special Project (No.2009ZX09103-675), the Natural Science Foundation of China (No.50973046), the Department of Science and Technology of Jiangsu Province (No.BY2009147, No.BK2008138, No.BK2010046), the Department of Education of Jiangsu Province (No.JH10-1) and the Department of Science and Technology of Wujin District in Changzhou (No.WG2009007, No.WS201004)

*Corresponding author. Tel: 86-25-83324605, E-mail: zchua@nju.edu.cn