

细胞凋亡检测方法探讨

崔巍* 唐炳华¹ 王硕仁

(北京中医药大学, 中医内科学教育部重点实验室; 北京市普通高校重点实验室(中医内科学), 北京 100700;

¹北京中医药大学基础医学院人体机能系, 北京 100029)

摘要 采用图例法和比较法分析评价细胞凋亡检测方法的应用范围和检测结果的相关性, 指出只有选择多种适当的方法进行综合检测, 才能对结果做出正确而合理的分析判断。流式细胞术简便、快速, 从膜上分子、胞内蛋白到 DNA 水平全方位多角度分析凋亡, 可作为检测细胞凋亡的首选方法。

关键词 细胞凋亡; 检测方法; 分析评价

细胞凋亡的概念最早是由英国阿伯丁大学病理学教授 JF Kerr 通过对肝脏细胞的研究提出的, 又称为细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)。它是一个主动的、受基因控制的、高度有序的一系列生理病理反应^[1]。2002 年 10 月 7 日悉尼·布雷诺尔(S Brenner, 英国)、罗伯特·霍维茨(HR Horvitz, 美国)和约翰·苏尔斯顿(JE Sulston, 英国), 因在器官发育的遗传调控和细胞程序性死亡方面的研究, 获诺贝尔生理与医学奖。此后, 与之相关的课题成为生命科学界最为热门的研究项目之一。

随着细胞凋亡研究的持续升温, 凋亡细胞的检测技术和方法也不断推陈出新, 如荧光显微镜检、电子显微镜检、流式细胞分析、DNA 电泳、末端转移标记技术、免疫组织化学染色法等^[2], 然而如何选择适当的方法并对检测结果做出正确的判断及恰如其分的解释仍是值得探讨的问题。本文根据部分文献报道及多年实践经验, 针对细胞凋亡的各种检测方法及应用范围进行分析, 以期为其研究提供一个技术方法的平台。

1 细胞凋亡的形态学观察

1.1 光学显微镜和倒置显微镜

对于体外培养的细胞, 用倒置显微镜观察可见凋亡细胞体积变小、形态改变, 贴壁细胞出现皱缩、变圆、脱落(图 1)。用吉姆萨、瑞氏染色后, 高倍光学显微镜下可见凋亡细胞出现染色质浓缩、致密深染、边缘化。但对于一般组织切片, 光学显微镜很难观察到凋亡小体等典型的凋亡形态。本方法可用于凋亡现象的初步观察。

1.2 荧光显微镜

以荧光染料对细胞核染色质进行染色, 通过荧光显微镜观察其荧光变化即可评判正常、凋亡和死亡细胞。常用的凋亡细胞 DNA 特异性染料有: Hoechst 33342 和 Hoechst 33258 等, 死亡细胞染料有: 碘化丙啶(propidium iodide, PI)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)或 7-氨基-放线菌素 D(7-Aminoactinomycin D, 7-AAD)等。

Hoechst 33342 与 DNA 的结合是非嵌入式的, 主要结合在 DNA 的 A-T 碱基区, 它可进入完整的细胞膜。紫外光激发时正常细胞和凋亡细胞可被 Hoechst 33342 染色, 显示蓝色荧光, 凋亡细胞由于细胞膜的通透性增强、染色质凝集等现象表现为亮蓝色荧光, 并可见亮蓝色凋亡小体^[3]。PI 与 DNA 的结合是嵌入式的, 不能进入细胞膜完整的细胞中, 坏死细胞由于膜完整性破损, 可被 PI 染料染色显示红色荧光。根据这些特性, 用 Hoechst 33342 结合 PI 染料对细胞进行双染色, 就可在荧光显微镜上将正常、凋亡和坏死细胞区别开来(图 2)。本方法简便易行, 可用于细胞涂片或滴片定性观察细胞凋亡现象。

1.3 电子显微镜

关于凋亡细胞的超微结构特征, 包括透射电镜和扫描电镜下的改变, 在许多文献中已有详尽描述^[2,4]。细胞凋亡过程中细胞核染色质的形态学改变分为三期: 凋亡 I 期, 细胞核内染色质高度盘绕, 出现许多称为气穴现象的空泡结构; II a 期, 核染色质高度凝

收稿日期: 2007-04-06 接受日期: 2007-06-14

* 通讯作者。Tel: 010-84013695, Fax: 010-64010817, E-mail:

cuiwei1117@sina.com

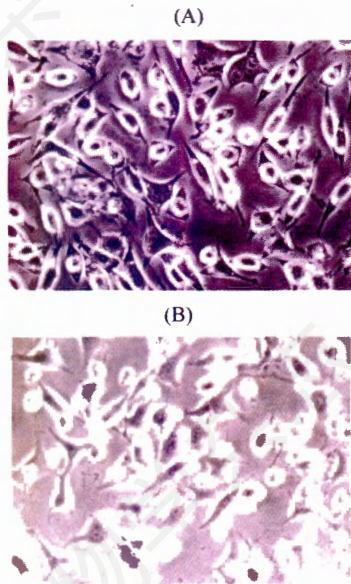


图1 倒置显微镜观察细胞凋亡现象(200×)

A: 正常细胞; B: 凋亡细胞。图片选自本重点实验室工作留存的照片。

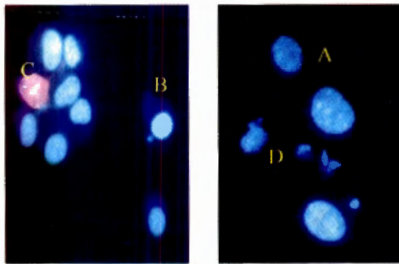


图2 缺氧/缺糖诱导神经细胞凋亡的荧光显微镜观察(Hoechst 33342与PI双染)(400×)

A: 正常细胞; B: 凋亡细胞; C: 死亡细胞; D: 凋亡小体。图片选自本重点实验室工作留存的照片。

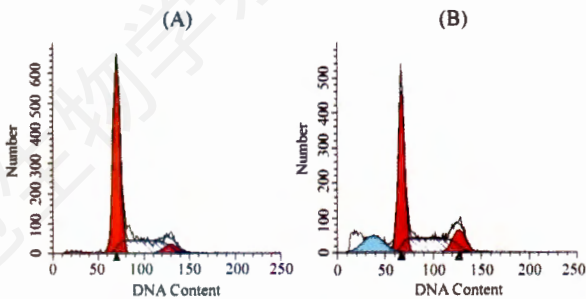


图3 流式细胞仪分析凋亡细胞DNA含量

A: 正常细胞; B: 凋亡细胞。图片选自本重点实验室工作留存的照片。

聚、浓缩成半月形或帽状附于核膜; II b期, 细胞核裂解为碎块, 产生凋亡小体^[4]。本方法的缺点是样品制作过程较复杂、范围局限, 在凋亡细胞数较少时

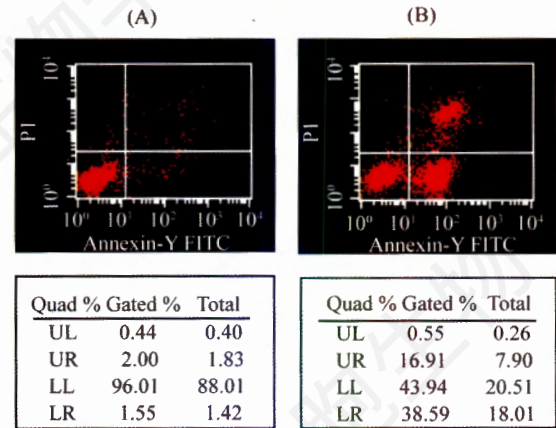


图4 流式细胞仪测定小鼠胸腺细胞早期凋亡

A: 正常对照细胞; B: 诱导凋亡细胞。UL: 死亡细胞; UR: 晚期凋亡细胞; LL: 活细胞; LR: 早期凋亡细胞。图片选自本重点实验室工作留存的照片。



图8 免疫组化分析caspase-3活性(200×)

A: 正常细胞; B: 早期凋亡细胞。图片选自本重点实验室工作留存的照片。

需进行大量的观察才能观察到典型的凋亡改变。但此方法仍然是定性凋亡细胞的可靠方法, 为细胞凋亡形态学观察的金指标。

2 细胞凋亡的流式细胞术分析

2.1 DNA含量测定(PI染色法)

PI染色法是利用流式细胞术检测细胞凋亡最早使用的方法^[5-7]。PI荧光染料分子不能进入完整的细胞膜, 但细胞经固定、打孔后PI可直接进入细胞插入到DNA碱基对之间, 流式细胞仪通过检测掺入

的PI荧光强度来表示DNA含量。

凋亡细胞DNA含量降低,故在正常的 G_0/G_1 峰前有一亚 G_0/G_1 峰出现^[3],即为凋亡峰(AP峰)(图3)。

本方法通过DNA含量的降低粗略定量凋亡细胞百分比,不能区分早期、晚期及坏死细胞。可作为凋亡细胞的初步筛选。

2.2 磷脂酰丝氨酸外翻分析(膜联蛋白法)

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)正常位于细胞膜的内侧,但在细胞凋亡的早期,PS可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。膜联蛋白(annexin V)是一种分子量为35~36 kDa的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白,能与PS高亲和力特异性结合。将膜联蛋白V进行荧光素(FITC、PE)标记,以标记了的膜联蛋白V作为荧光探针,利用流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生^[6,7]。

PI是一种核酸染料,它不能透过完整的细胞膜,但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,将膜联蛋白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(图4)。

检测方法:将正常培养和诱导凋亡的悬浮细胞($0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$)用PBS洗2次,加入100 μ l结合缓冲液(binding buffer)和20 μ g/ml FITC标记的膜联蛋白V,室温避光30 min,再加入50 μ g/ml PI,避光反应5 min后,加入400 μ l结合缓冲液,立即用流式细胞仪进行定量检测。此方法可区分早期、晚期凋亡细胞,是定量检测细胞凋亡的方便而可靠方法之一。与PI染色法结合起来,可计算出凋亡细胞时间窗。

2.3 DNA断裂片段分析

在细胞发生凋亡后,最早出现胞膜外翻等现象,之后发生的程序性改变之一,就是细胞核酸内切酶激活,出现DNA断裂片段^[6]。核酸酶将染色质的高级结构断裂为50~300 kb的片段,最终断裂为200 bp大小的DNA碎片。DNA碎片检测的方法是外源性TdT催化反应,常指“end-labeling”或“TUNEL”^[8,9]。现在可以使用Apo-BrdU Kit,用流式细胞术来检测凋亡细胞由于DNA断裂,造成DNA链3'-OH增多的情况。

检测方法:首先将细胞用70%冷乙醇固定过夜,次日洗涤细胞进行细胞染色。经DNA标记液标记,抗体应用液处理,PI/RNase A Solution染色,最后以流式细胞仪测定DNA片断含量(图5)。此方法适用于检测晚期凋亡细胞总量。

2.4 线粒体膜势能的检测

线粒体在细胞凋亡过程中起着关键的枢纽作用^[7,10],多种细胞凋亡刺激因子均可诱导不同的细胞发生凋亡,而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。

线粒体跨膜电位的存在,使一些亲脂性阳离子荧光染料罗丹明123等可结合到线粒体基质,其荧光的增强或减弱说明线粒体内膜电负性的增高或降低。

检测方法:将正常培养的细胞和诱导凋亡的细胞加入罗丹明123进行荧光染色,37 $^{\circ}$ C平衡30 min,洗涤后,流式细胞仪检测细胞的荧光强度(图6)。线粒体膜跨膜电位的变化应与其他细胞凋亡检测相结合,才能共同阐明凋亡机制。

2.5 细胞内钙离子浓度的变化

研究发现 Ca^{2+} 是凋亡细胞的启动因素之一。细胞凋亡时由于胞浆 Ca^{2+} 浓度增高,置换了细胞核内的 Zn^{2+} ,激活了内切酶导致细胞发生特异性变化,而许多酶都介导参与了 Ca^{2+} 信号通道。我们可通过Fluo-3染色观察细胞内钙离子浓度的变化。

检测方法:将正常培养的细胞和诱导凋亡的细胞加入Fluo-3进行荧光染色,37 $^{\circ}$ C平衡45 min,洗涤后,流式细胞仪检测细胞的荧光强度(图7)。细胞内钙离子浓度的变化与线粒体膜跨膜电位一样应与其他细胞凋亡检测相结合,共同阐明凋亡机制。

3 细胞凋亡的分子生物学和细胞组织化学方法测定

3.1 凝胶电泳分析

细胞凋亡时主要的生化特征是其染色质发生浓缩,染色质DNA在核小体单位之间的连接处断裂,形成50~300 kb长的DNA大片段,或180~200 bp整数倍的寡核苷酸片段,在凝胶电泳上表现为梯形电泳图谱(DNA ladder)^[11-13]。细胞经处理后,采用常规方法分离提纯DNA,进行琼脂糖凝胶和溴化乙锭染色,在凋亡细胞群中可观察到典型的DNA梯形图谱。如果细胞量很少,还可在分离提纯DNA后用 32 P-ATP和脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)使DNA标记,然后进行电泳和放射自显影,观察凋亡细胞中DNA梯形图谱。本方法特异性较强,灵敏性较差,适用于凋亡细胞较多的样本。如凋亡细胞不足10%,最好选用其他检测方法。

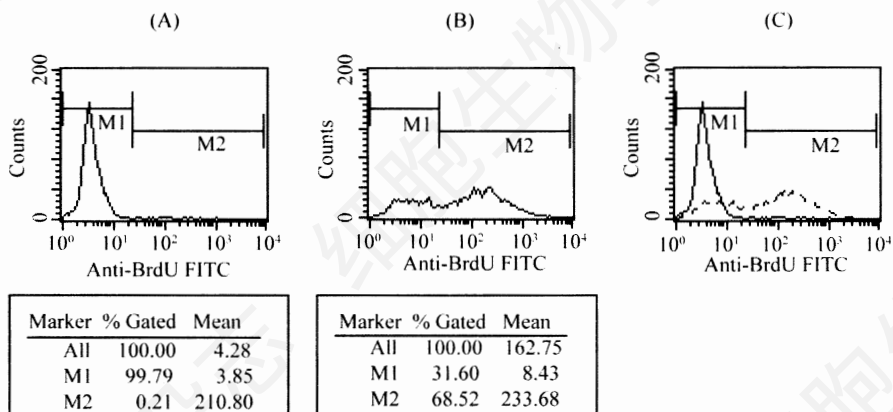


图5 流式细胞仪分析凋亡细胞DNA断裂片段

A: 正常细胞; B: 凋亡细胞; C: A和B叠加。图片选自本重点实验室工作留存的照片。

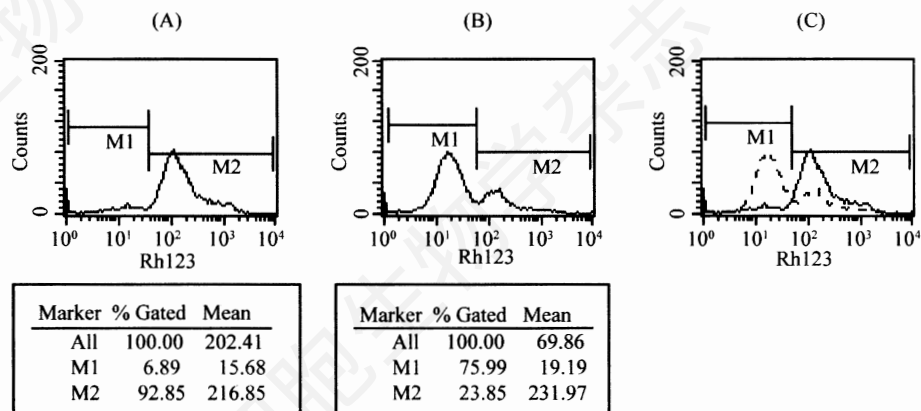


图6 流式细胞仪检测线粒体跨膜电位

A: 正常细胞; B: 凋亡细胞; C: A和B叠加。图片选自本重点实验室工作留存的照片。

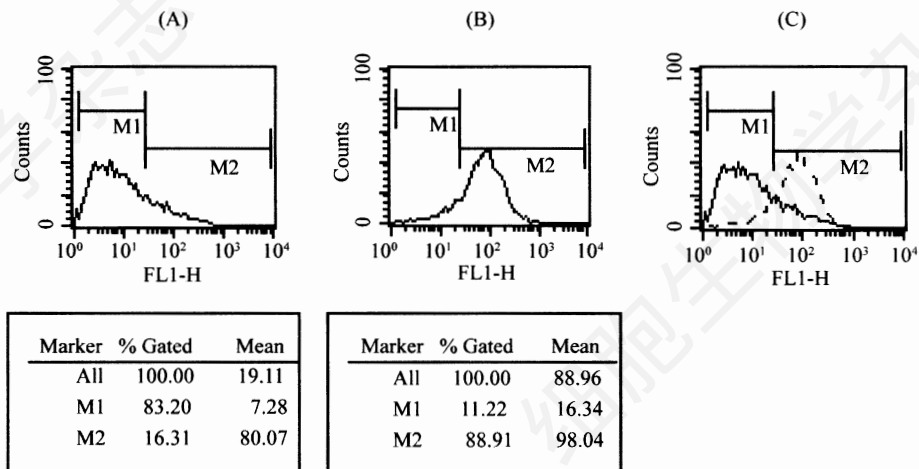


图7 流式细胞仪检测细胞内钙离子浓度

A: 正常细胞; B: 凋亡细胞; C: A和B叠加。图片选自本重点实验室工作留存的照片。

3.2 免疫组化分析

免疫组化在凋亡细胞分析中应用极为广泛。如

基因的表达^[14], 促凋亡基因: *ced-3*、*ced-4*、*c-Myb*、*c-Myc*、*p53*、*MyD118*、*GADD45*、*ICE*、

Bax 等, 抑凋亡基因: ced-9、Bcl-2、Bcl-xL、MCL1、MyD116 等; 细胞因子和蛋白质含量的分析^[6,7]: TNF- α 、Fas、TRAIL、APO-3、INF- γ 、caspase-3、caspase-9 等。下面仅以 caspase-3 活性的检测为代表说明之。

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用, 其中 caspase-3 为关键的执行分子, 它在凋亡信号转导的许多途径中发挥功能。caspase-3 正常以酶原(32 kDa)的形式存在于胞浆中, 在凋亡的早期阶段, 它被激活, 活化的 caspase-3 由两个大亚基(17 kDa)和两个小亚基(12 kDa)组成, 裂解相应的胞浆细胞核底物, 最终导致细胞凋亡。因此在细胞凋亡早期, caspase-3 活性明显增强(图 8)。但在细胞凋亡的晚期和死亡细胞, caspase-3 的活性明显下降。所以, 在 caspase-3 活性检测中要重点把握时间窗, 分析细胞凋亡的全过程。

免疫组化染色法虽然应用极为广泛, 但其只限于半定量检测, 分析时难免受主观因素影响。因此, 必须结合其他凋亡检测方法综合分析。

4 分析和评价

细胞凋亡是细胞主动参与自身死亡的过程。凋亡细胞具有一些特殊的形态学改变和生化特征, 包括质膜改变、细胞核固缩、核内 DNA 裂解、caspases 级联激活以及细胞凋亡相关蛋白的变化等等。许多疾病的发生与细胞异常凋亡有关, 如 Alzheimer 氏综合征、Hodgkin 氏综合征、移植排斥、自身免疫性疾病、肿瘤、ADIS 等。因此对细胞凋亡的研究成为研究疾病机制和药物开发的热点之一。

随着细胞凋亡研究的深入, 其检测方法不断推陈出新。作为金指标的形态学观察, 尤其是透射电镜观察虽然具有不可替代的作用, 但是由于其过程复杂、范围局限, 推广应用受到一定限制。而近年来发展起来的流式技术已成为细胞凋亡分析的主流。流式细胞分析具有简便、快速、特异性好、灵敏度高的特点, 从膜上分子、胞内蛋白到 DNA 水平全方位多角度分析凋亡, 可作为检测细胞凋亡的首选方法。

4.1 凋亡早期

在细胞凋亡早期主要特征是细胞膜不对称性发生改变, 即磷脂酰丝氨酸 PS 外翻, 但细胞膜仍保持完整性; 另外还伴随有线粒体膜电位与线粒体通透性改变。

用荧光标记的膜联蛋白 V 和 PI 对细胞进行双染, 检测细胞膜水平膜联蛋白 V 即可实现早期细胞凋亡

检测。双阴性为正常活细胞; 膜联蛋白 V 阳性, PI 阴性的为早期凋亡细胞; 双阳性为晚期凋亡细胞; 膜联蛋白 V 阴性, PI 阳性的为坏死细胞(图 4)。该检测方法省时、可靠, 是目前最常用的早期凋亡检测方法。

线粒体膜势能下降是凋亡最早发生的事件之一, 线粒体崩溃预示细胞凋亡不可逆转。亲脂性阳离子荧光染料如罗丹明 123 等可结合到线粒体基质, 其荧光强度的减弱说明线粒体内膜电负性的降低, 表明细胞出现凋亡(图 6)。正常细胞流式检测平均荧光强度值为 202.41, 凋亡细胞减小到 69.86。该方法操作简便快速, 只需将试剂直接加入细胞悬液, 30 min 温育, 洗涤后即可进行检测。

4.2 凋亡中期

细胞凋亡的信号途径主要有两条, 一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶 caspase, 一条是通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活 caspase^[15]。活化的 caspase 可以依次激活其他 caspase 形成级联反应, 促发细胞凋亡。在目前已知的 14 种 caspase 中, caspase-3、caspase-8、caspase-9 与凋亡的关系最为密切。

Caspase-3 在细胞凋亡中起着不可替代的作用。前已述可用免疫组化法半定量检测 caspase-3 表达。用流式细胞术同样可检测 caspase-3 表达^[7], 其方法比免疫组化法简便、快速, 并可进行定量分析。

凋亡通路的研究涉及多个指标的综合分析, 凋亡执行蛋白 caspase-3 通过裂解聚 ADP 核糖聚合酶(Poly-ADP-ribose polymerase, PARP)等扣动凋亡扳机, caspase-3 介导的凋亡通路也可以被 Bcl-2 阻断, 因此在凋亡过程中确定三者的关系是非常重要的。流式细胞 CBA (cytometric bead array) 技术^[16,17]可以准确定量凋亡过程中 caspase-3、PARP 和 Bcl-2 的关系。只需 50 μ l 样本, 3 h 温育, 流式检测, 并配有分析软件计算结果, 可对多个样本同时进行较高通量的操作, 三项指标检测一次完成。

4.3 凋亡晚期

细胞凋亡晚期, 核酸内切酶活化将 DNA 片段断裂, 使用凝胶电泳的方法可以观察到 DNA 断裂片段形成的“DNA 梯形图谱”。但是电泳法灵敏性较差, 不易做出明显的 DNA 条带。

流式技术检测凋亡细胞的 DNA 断裂碎片, 克服了电泳法的缺点。它可以通过在 DNA 片段末端掺入荧光标记物, 用流式细胞仪上进行检测。在 Apo-BrdU 分析中, TdT 催化 DNA 单链和双链 3'-OH 末端

非模板依赖性的 Br-dUTP 掺入反应。与其他三磷酸脱氧核苷酸的大分子复合物(如荧光素、生物素或地高辛标记等)相比较, Br-dUTP 更容易掺入进凋亡细胞的基因组中。完成 Br-dUTP 掺入反应后, 使用荧光标记的 BrdU 抗体(anti-BrdU FITC)进行细胞染色, 再用流式细胞仪来检测, 即可得到细胞凋亡的分析结果(图 5)。

综上所述, 细胞凋亡研究必须根据标本和病变的特点, 在充分了解各种方法的原理及应用范围的基础上, 选择多种适当的方法进行综合检测, 才能对结果做出正确而合理的分析判断。根据多年的实践经验和文献报道, 我们认为, 流式细胞术是目前检测细胞凋亡最简便、快速而可靠的方法。随着对细胞凋亡认识的深化和相关技术的进展, 期待更敏感、更特异的检测方法面世, 这对于病理状态中细胞凋亡的研究将具有重要意义。

参考文献(References)

- [1] 张文根等。细胞生物学杂志, 2004, **26**: 257
- [2] Otsuki Y *et al.* *Prog Histochem Cytochem*, 2003, **38**: 275
- [3] Michels G *et al.* *Toxicology*, 2005, **206**: 337
- [4] 林 敏等。癌症, 2007, **26**: 351
- [5] Formichi P *et al.* *J Cell Physiol*, 2006, **208**: 289
- [6] Savitskiy VP *et al.* *Cytometry B Clin Cytom*, 2003, **56**: 16
- [7] Yao G *et al.* *Mol Immunol*, 2006, **43**: 915
- [8] Kylarova D *et al.* *Acta Histochemica*, 2002, **104**: 367
- [9] Lecoer H. *Exp Cell Res*, 2002, **277**: 1
- [10] Lizard G *et al.* *Cytometry*, 1995, **21**: 275
- [11] Sgonc R *et al.* *Exp Gerontol*, 1998, **33**: 525
- [12] Zhan XA *et al.* *Arch Toxicol*, 2006, **80**: 74
- [13] Schwerdt G *et al.* *Toxicol Sci*, 2005, **85**: 735
- [14] Roy AM *et al.* *Mol Cancer Ther*, 2005, **4**: 81
- [15] 严璘璘等。细胞生物学杂志, 2006, **28**: 193
- [16] Zartman JK *et al.* *J Neurooncol*, 2004, **67**: 3
- [17] Chauhan V *et al.* *Radiat Res*, 2007, **167**: 87

Investigate on the Methodology of Detecting Apoptosis

Wei Cui*, Bing-Hua Tang¹, Shuo-Ren Wang

(Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Ministry of Education; Beijing Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; ¹Department of Human Functions, School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract By the methods of graphical presentation and comparison, we analyzed and evaluated the relevance between the results got by different apoptosis-detecting techniques and its applicability. Then we found that the more right and reasonable judgments rely on the combination using of different appropriate apoptosis-detecting techniques. Among these methods, flow cytometry has its own advantages. It is more convenient and faster to detect much apoptosis features including membrane moleculars, intracytoplasmic proteins, and DNA fragments. Thus, flow cytometry is recommended to be used as the first choice for apoptosis-detecting.

Key words apoptosis; detecting techniques; analysis and evaluation

Received: April 6, 2007 Accepted: June 14, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-10-84013695, Fax: 86-10-64010817, E-mail: cuiwei1117@sina.com