

流式双参数检测在肿瘤增殖、分化与凋亡中的应用

谭立军 徐 清 石学耕 汤雪明

(上海第二医科大学细胞生物学实验室 上海 200025)

肿瘤细胞常表现为增殖过度、分化不足或者凋亡受阻。食管癌也不例外^[1]。故遏制瘤细胞的恶性增殖、促进瘤细胞分化和诱导瘤细胞凋亡是治疗肿瘤的有效途径。

检测细胞增殖、分化、凋亡的方法很多,流式细胞仪的优点在于能快速分析细胞群体的特性。双/多参数流式细胞术提供了一种同时检测一个细胞群的两个或多个参数指标的方法,为研究者提供更多有用信息^[2,3]。

文献和本室工作表明(另文报道):维甲酸抑制肿瘤细胞生长;二甲基亚砷诱导瘤细胞分化;三氧化二砷促进瘤细胞凋亡。

本文利用上述模型,将细胞增殖、分化、凋亡的特性与 DNA 分析结合起来进行双参数流式细胞术检测,成功地反映出食管癌细胞增殖、分化、凋亡与细胞周期的关联,从而为进一步的研究提供良好手段。

材料与方 法

1. 细胞培养

人食管鳞癌 EC8712 和 EC1.71 细胞株贴壁生长于 DMEM 培养液(含 10% 小牛血清,庆大霉素 8Ug/ml),置 37℃、5%CO₂培养箱中。实验设二甲基亚砷(DMSO)1% 组、全反式维甲酸(ATRA,溶于乙醇)10μmol/l 组、三氧化二砷(As₂O₃)2μmol/L 组和不加药组。

2. PCNA 表达与细胞 DNA 含量双参数流式细胞计检测

培养细胞消化后经 70% 乙醇 4℃ 固定过夜,PBS

漂洗后用含 1% 牛血清白蛋白及 0.1% Triton X-100 的 PBS 封闭,加抗 PCNA 抗体(1:300)于 4℃ 过夜,PBS 洗后加 FITC 标记的绵羊抗鼠抗体 IgG(华美生物公司,1:100),避光反应一小时,PBS 洗三次。RNase (1mg/ml)消化(37℃)15min,碘化丙啶 PI(10μg/ml)染色。FACScan 检测双荧光强度。实验对照不加一抗。

3. CK4 表达与 DNA 含量的流式细胞计双参数检测

对照组与实验组培养细胞消化后于丙酮(室温)固定 30min。PBS 漂洗后用含 1% 牛血清白蛋白及 0.1% Triton X-100 的 PBS 封闭,加抗 Cytokeratin 4 抗体(CK4,1:300)于 4℃ 过夜,PBS 洗后加 FITC 标记的绵羊抗鼠抗体 IgG(华美生物公司,1:100),避光反应 1 小时,PBS 洗 3 次。RNase 消化,碘化丙啶 PI 染色。FACScan 检测双荧光强度。

4. 凋亡细胞的双参数流式术检测(TUNEL 法)

此法照试剂盒(In-Situ Cell Death Detection Kit, Florescein, R23/25, 1684795, Boehringer Mannheim)进行。培养细胞经药处理后常规消化,PBS/0.1% 牛血清白蛋白于 4℃ 漂洗两次。新鲜配制 4% 多聚甲醛(室温)固定 30 分钟,PBS 漂洗,离心。加 0.1% Triton X-100/0.1% 柠檬酸钠置冰浴 2 分钟以提高细胞通透性,PBS 漂洗。加 TUNEL 反应混合液 50μl 避光于 37℃ 作用 60 分钟,PBS 洗涤后进行 FACScan 检测,并用 PI 染色以进行流式双参数荧光分析。实验对照细胞用的反应混合液中不含末端转移酶。

结 果

1. 细胞增殖核抗原 PCNA 表达与细胞 DNA 含量流式双参数分析

细胞增殖与 DNA 合成直接相关,同时也反映在增殖细胞核抗原 PCNA 的表达上。流式细胞术可通过检测 S 期细胞百分率和 PCNA

* 国家自然科学基金资助(39730270)。

表达双重参数来较好地反映细胞的增殖活性。实验结果显示:维甲酸作用食管癌细胞后,S 期细胞百分率下降(由 28% 降至 17%),同时 PCNA 阳性细胞百分率降低(由 32.6% 下降至 23.7%),并且 PCNA 表达的荧光强度减弱。

进一步分析 PCNA 在细胞周期中的表达,结果表明无论用药否,PCNA 主要在细胞 S 期和 G2 期高表达(均超过 65%),而 G0/G1 期的表达仅 10%。

2. 细胞角蛋白 CK4 表达与 DNA 含量改变的双参数分析

结果显示二甲基亚砷明显降低 S 期细胞百分率(自 28% 至 7%),升高 G0/G1 期百分率。食管癌细胞在二甲基亚砷处理后,细胞角蛋白 CK4 表达的阳性率由 13% 升高到 42%,其荧光强度也较未给药组高(图 1)。进一步分析

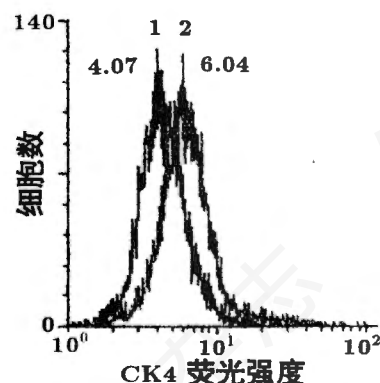


图 1 1%二甲基亚砷处理食管癌细胞前后 CK4 表达的荧光强度变化

1-未加药组 2-二甲基亚砷处理组

CK4 在细胞周期中的表达(方法同上),发现经二甲基亚砷作用后 CK4 在细胞周期各时相中的表达均有所提高,提示其表达与细胞周期关系不大(图 2)。实验重复数次均提示上述变化规律。

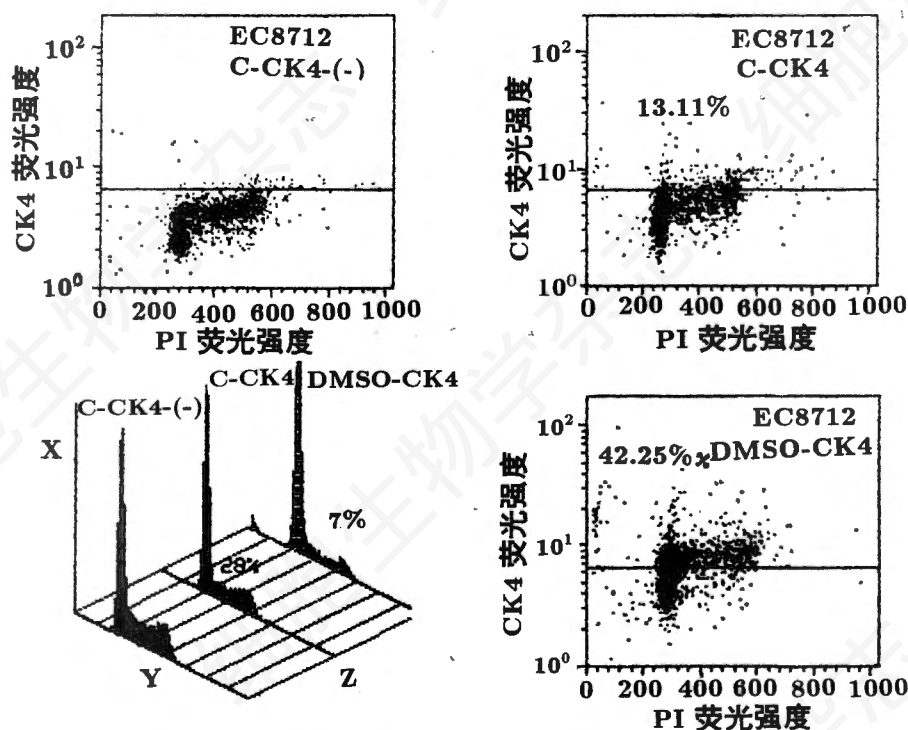


图 2 二甲基亚砷作用 EC8712 细胞 CK4 流式双参数检测

左上:阴性对照(无 CK4 一抗)。

左下:细胞周期分析直方图显示二甲基亚砷使 S 期百分率减少。

右上:未给药 EC8712 细胞 CK4 表达少。

右下:二甲基亚砷作用 EC8712 细胞使 CK4 表达高,且 CK4 阳性细胞分布于细胞周期各时相。

3. 凋亡细胞 DNA 断片与 DNA 含量流式双参数检测

核酸内切酶激活产生的游离 3'-OH 末端 DNA 断片在末端脱氧核苷转移酶 TdT 作用下,掺入荧光素(FITC)标记的脱氧核苷,同时对 DNA 染 PI 进行双参数流式检测。3 次重复实验结果均显示:三氧化二砷作用后 FITC 荧光强度明显增高;出现了 DNA 含量小于主峰(GO/G1)的凋亡细胞群(AP 峰),未给药组则

无凋亡峰。同时,PI 染色的凋亡峰细胞大部分被 TdT 法所标记(90%),即表现为 FITC 荧光显示的 TdT 标记阳性细胞。GO/G1 期细胞也有少部分(20%)被 TdT 所标记,提示这部分细胞也有 DNA 断裂,不过这些小断片尚未漏出细胞核,不属于 AP 峰;而 S 和 GO/G1 期细胞 TdT 标记阳性率小于 5%。因此,可以推测早期凋亡细胞可能来自 GO/G1 期细胞(图 3)。

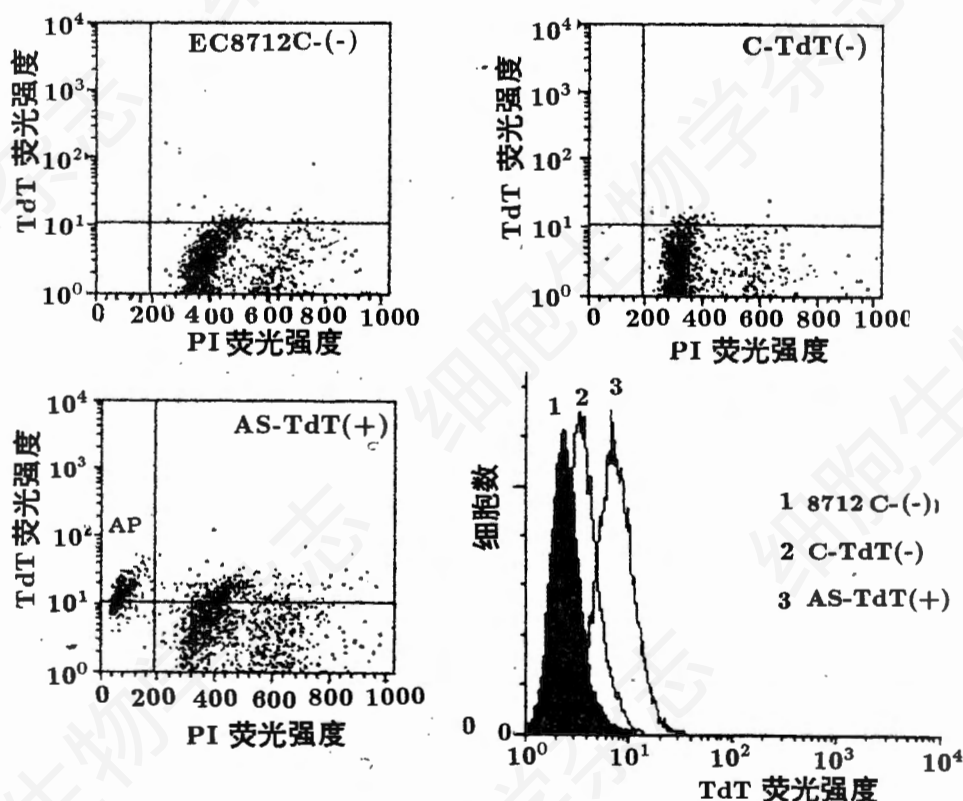


图 3 EC8712 细胞凋亡原位标记及 DNA 流式双参数检测

左上:未给药细胞散点图。

左下:三氧化二砷处理 EC8712 细胞 TdT 标记显示凋亡细胞呈 TUNEL。

右上:EC8712 细胞 TdT 对照(反应液中不加 TdT 酶)散点图。

右下:三氧化二砷处理使 TdT 荧光强度升高。

讨 论

流式细胞术基本功能之一是能够快速测定细胞群的 DNA 含量,分析细胞周期变化和确定 DNA 倍体,因此在肿瘤的诊断与研究中有

重要价值。然而仅有 DNA 含量这一参数的信息是不够的。为得到 DNA 以外的双重信息,以往通过将细胞标本分成两管分别标记和测试不同参数,因为来自同一细胞群体,故可以叠加在一起进行分析。双参数检测则是同时测定同一

细胞的两个参数指标,故能够增加信息,更能如实反映细胞的多重特征。本文围绕细胞周期参数,分别结合 PCNA、CK4、TdT 标记,用流式双参数检测食管癌细胞增殖、分化、凋亡与细胞周期的关系,获得了其他方法不能反映的重要信息。

1. 肿瘤细胞的增殖活性可通过细胞周期分析来反映^[4] PCNA(增殖细胞核抗原)常用于描述细胞增殖能力^[5]。本文将二者结合起来,通过 DNA 与 PCNA 双参数检测,显示维甲酸降低癌细胞 S 期百分率的同时也表现为 PCNA 表达的减少;并且 PCNA 表达主要见于 S 期细胞,与文献报道相符^[6]。因此,充分体现 PCNA 反映细胞增殖活性的可靠性。

2. CK4 表达与食管癌分化密切相关 CK4 表达越高,表示分化越多,可作为食管癌诱导分化的良好指标^[7,8]。双参数显示二甲基亚砷在降低细胞增殖活性的同时升高 CK4 表达水平;并且还发现 CK4 表达与细胞周期似乎关系不大,因为 GO/G1、S、G2/M 期细胞均可有一定比例的 CK4 阳性标记。可能提示二甲基亚砷一旦诱导食管癌细胞 CK4 表达,其产物便可随有丝分裂存在于细胞各阶段。

由 CK4 表达推测药物诱导食管癌后细胞分两群:未诱导成功的癌细胞和诱导分化细胞。两类细胞均在增殖分裂,但可从细胞是否带有 CK4 标记而被区别。因此,增殖应划分为癌细胞恶性增殖和分化细胞“正常”增殖两种过程。

3. TUNEL 法(Terminal dUTP-mediated Nick End Labeling)是目前凋亡细胞检测中开展起来的一项较新技术^[9] 此法能在细胞水平上原位标记凋亡,确定凋亡细胞的位置与细胞类型,还能在先于形态学表现之前早期发现凋亡细胞,并可通过流式细胞仪检测和定量^[10]。本文进一步结合 PI 染色进行双参数测定,显示 PI 染色下的 AP 峰细胞被 TUNEL 特异性识别,从而确切证实三氧化二砷诱导食管癌细胞凋亡的存在;本文还由 TUNEL 标记

与细胞周期的关系推测凋亡细胞早期可能来自于 GO/G1 期细胞。这是食管癌凋亡检测的首次报道。

细胞增殖、分化与凋亡是三大基本生物现象,三者有复杂的关系。二甲基亚砷降低 S 期百分率,同时升高 CK4 表达,推测二甲基亚砷通过诱导细胞分化而降低细胞增殖活性^[11];三氧化二砷可致细胞凋亡,但不影响 S 期细胞的百分率(另文报道),提示它可能通过诱导凋亡作用来降低细胞增殖能力。故本文为进一步探索细胞增殖、分化与凋亡三者的关系提供了有益线索。

摘 要

流式细胞术已在生物医学研究中有广泛应用,双参数流式术显著特点是给同一细胞群提供双重信息。本文成功地将这一先进技术用于食管癌增殖、分化与凋亡的检测,显示流式双参数的广阔应用前景。

关键词:流式细胞术 食管癌 增殖 分化 凋亡

参 考 文 献

- [1] Beppu T, et al., 1994, *J Histochem Cytochem*, 42(8):1177-1182.
- [2] Pellicciari C., et al., 1995, *Cytometry*, 21(4):329-337.
- [3] 谭立军等, 1997, 上海第二医科大学学报, 17(3):178-181.
- [4] Sawtell RM, et al., 1995, *Cytometry*, 22(3):190-199.
- [5] Sasaki K., et al., 1992, *J Histochem Cytochem*, 42(7):957-65.
- [6] Hall PA, et al., 1990, *J Pathol*, 162:285.
- [7] Takahashi H., et al., 1995, *Histopathol*, 26:45-50.
- [8] Viaene AJ, et al., 1994, *J Histochemical*, 26:50-58.
- [9] Luciano L., et al., 1996, *Cell Tissue Res*, 286(1):81-92.
- [10] Douglas RS, et al., 1995, *J Immunol Methods*, 188(2):219-228.
- [11] Kozopas KM, et al., 1990, *J Cellular Physiol*, 145:575-586.