

一种检测早期凋亡细胞的方法*

胡庆柳 朴英杰 周美娟

(第一军医大学中心实验室 广州 510515)

检测细胞凋亡的方法包括光镜、电镜观察细胞形态的改变或用 Giemsa (或荧光染料) 对细胞核染色、进行流式细胞术 (flow cytometry) 测定^[1]。传统的用流式细胞术检测凋亡的方法有以下几种: Hoechst-PI 染色法、乙醇抽提法、吖啶橙 (AO) 染色法、选择性光解法、末端标记法、缺口平移法^[2]。

这几种方法的原理都是基于内源性核酸酶的激活引起 DNA 的损伤。而细胞凋亡并不总是伴随 DNA 的断裂, 至少在凋亡的早期阶段不会出现^[3,4], 因此, 这几种方法不能检测处于凋亡早期阶段的细胞。而光镜和电镜检测凋亡不仅麻烦, 而且不准确。

现介绍一种检测早期凋亡细胞的新方法: Annexin V-PI 双染色法。

材料与 方法

1. 主要试剂

PI 为 sigma 公司产品。Annexin V 为 BOEHRINGER MANNHEIM (宝灵曼) 公司产品。

2. 液体配制 (参考宝灵曼公司)

Hepes 缓冲液 100mmol/L Hepes, 140mmol/L NaCl, 5mmol/L CaCl₂ pH7.4。

PI 储存液用 Hepes 缓冲液将 PI 稀释成 100μg/ml (宝灵曼公司为 50μg/ml), 避光保存。

染色液 20μl Annexin V + 500μl Hepes 缓冲液 (宝灵曼公司为 1000μl) + 500μl PI 储存液 (宝灵曼公司为 20μl)。

3. 染色步骤

细胞经处理 (用 0.25% 的胰蛋白酶将细胞消化下来后收集) 后用 D-Hank's 液 (NaCl 8.0, KCl 0.4, Na₂HPO₄ · H₂O 0.06, KH₂PO₄ 0.06, NaHCO₃ 0.35, g/L) 洗涤; 用 100μl 染色液重悬细胞, 室温避光温育 10-15min; D-Hank's 液洗涤; 加入 0.4ml Hepes 缓冲液;

500 目筛网过滤; 上机测试。

4. 样品准备

样品 1 生长良好的正常 NIH3T3 细胞, 按上述染色步骤进行染色

样品 2 生长良好的正常 NIH3T3 细胞, 染色过程中缺 [3] 步

样品 3 UVB 照射 10min 后培养 9 小时的 NIH3T3 细胞, 按上述染色步骤进行染色

结 果

图中分为四个象限 (B1、B2、B3、B4), B1 代表细胞碎屑; B2 代表坏死细胞; B3 代表正常活细胞; B4 代表凋亡细胞。样品 1: 正常细胞占 97.3%、坏死细胞占 0.5%、凋亡细胞占 1.2% (见图 1); 样品 2: 正常细胞占 84.5%、坏死细胞占 4.7%、凋亡细胞占 10.2% (见图 2); 样品 3: 正常细胞占 84.8%、坏死细胞占 1.0%、凋亡细胞占 12.4% (见图 3)。

讨 论

该方法的原理是: 在凋亡的早期阶段, 变化发生在细胞膜^[5,6,7]。其中的一个变化就是磷脂酰丝氨酸 (PS) 从细胞膜内层转移到细胞膜外层, 这样, PS 就暴露在细胞膜外表面^[9]。Fadok 等^[6]研究表明, 在淋巴细胞的凋亡过程中, 巨噬细胞特异地识别暴露在细胞表面的 PS。

Annexin V 是一种依赖于 Ca²⁺ 的磷脂蛋白, 对 PS 有高度的亲和力。这种蛋白可用来作为探测暴露在细胞表面的 PS 的一种敏感的探

本文 1998 年 9 月 22 日收到, 1999 年 11 月 1 日接受。

* 国家自然科学基金资助项目, No 39670192。

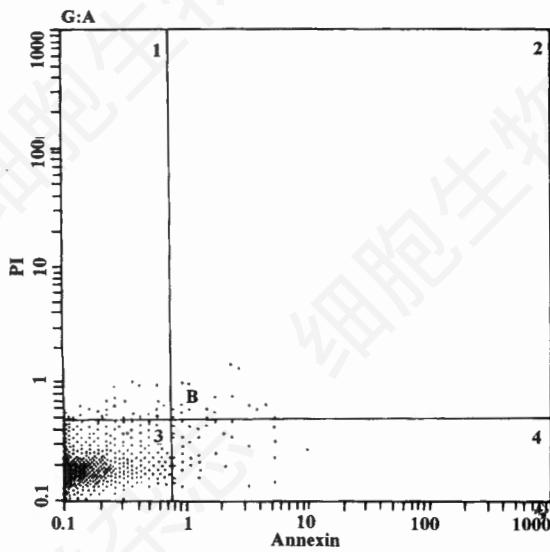


图1 生长良好的正常NIH3T3细胞,按上述染色步骤进行染色

B1. 0.9; B2. 0.5; B3. 97.3; B4. 1.20

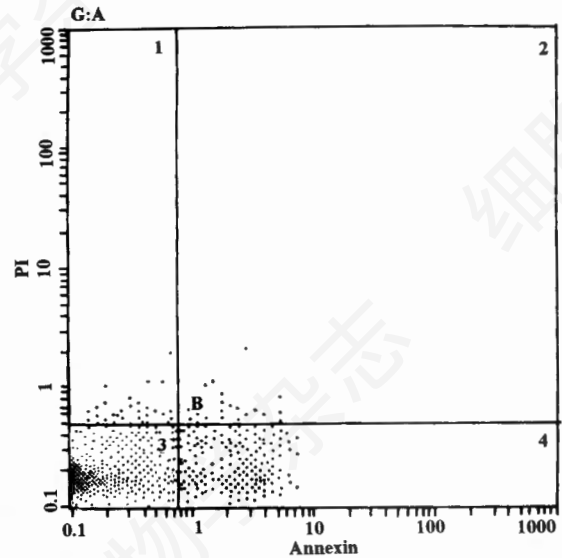


图3 UVB照射10min后培养9小时的NIH3T3细胞,按上述染色步骤进行染色

B1. 1.7; B2. 1.0; B3. 84.8; B4. 12.4

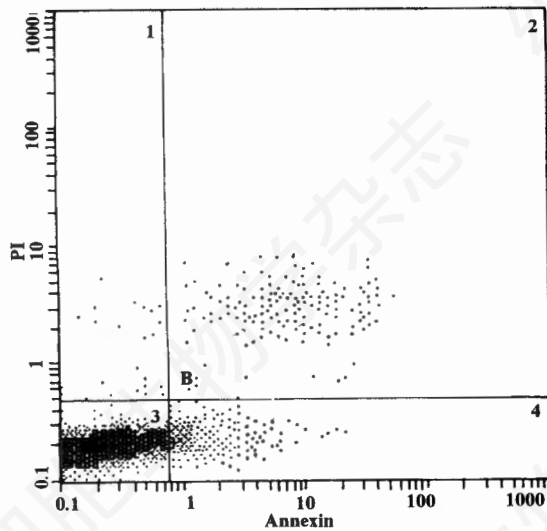


图2 生长良好的正常NIH3T3细胞,染色过程中缺[3]步

B1. 0.6; B2. 4.7; B3. 84.5; B4. 10.20

就可以区分坏死和凋亡,因为凋亡细胞膜完整,PI染色阴性,而坏死细胞PI染色阳性。这样,Annexin V和PI染色均为阴性的为正常活细胞;Annexin V阳性而PI阴性的为凋亡细胞;Annexin V和PI染色均为阳性的为坏死细胞。

样品1的实验结果与镜下观察一致;样品2的实验结果是染色后未经洗涤造成的假象;样品3的实验结果与以前所作实验^[11]具有良好的的一致性。因此,笔者认为,染色过程的[3]步(D-Hank's液洗涤)是极为重要的一步,在实验过程不应省略该步。另外,笔者在实验中采用宝灵曼公司提供的PI浓度对细胞染色,细胞均不染,加大浓度后PI才能染上。在实验中应采用的最适PI浓度是多少还有待于进一步探索,可能是不同的细胞株适用不同的PI浓度。

摘 要

本文介绍了一种定量检测早期凋亡细胞的流式细胞术——Annexin V-PI双染色法,并作了一些改进。

针,并用来检测凋亡细胞^[1,9,10]。由于坏死细胞失去了膜的完整性,PS也可以暴露在细胞表面,Annexin V染色也是阳性的。结合PI染色

关键词: 细胞凋亡 流式细胞术 Annexin V PI

参 考 文 献

- [1] Koopman G., et al., 1994, *Blood*, **84**(5): 1415-1420.
 [2] 胡庆柳等, 1997, 细胞生物学杂志, **19**(3): 119-123.
 [3] Roy Walker P., et al. 1994, *Exp Cell Res*, **213**(1): 100-106.
 [4] 胡庆柳等, 1998, 生物化学与生物物理进展, **25**(1): 53-56.
 [5] Andree H. A. M., et al. 1990, *J. Biol.*

Chem., **265**(9): 4923-4928.

- [6] Fadok V., et al. 1992, *J Immunology*, **148**(7): 2207-2216.
 [7] Creutz C. E. 1992, *Science*, **258**(5084): 924-931.
 [8] Vermes I., et al. 1995, *J Immunol Methods*, **184**: 39-51.
 [9] Homburg C. H. E. 1995, *Blood*, **85**(2): 532-540.
 [10] Verhoven B., et al. 1995, *J. Exp. Med.*, **182**(5): 1597-1601.
 [11] 胡庆柳等. 1998, 第一军医大学学报, **18**(1): 11.

A METHOD TO DETECT EARLY APOPTIC CELLS

HU Qing Liu PIAO Ying Jil ZHOU Mei Juan

(Central Laboratory, The First Military Medical University, Cuangzhou 510515, China)

ABSTRACT

A flow cytometry to detect early apoptosis is introduced and improved in this thesis.

Key words: Apoptosis Flow cytometry Annexin V PI

(上接插页3)

延长细胞的G₁期或迫使细胞处于G₀期而使较长时间地维持细胞高密度培养, 高效地生产目的产物; 还可以避免衰老死亡细胞释放的蛋白酶降解目的产物。应用CHO细胞无血清悬浮培养技术, 使活细胞密度达到1×10⁷cell/ml水平以上, 与传统的批式培养相比产物浓度提高5-10倍, 相对应的培养基成本明显下降。

参 考 文 献:

- [1] 陈昭烈, 肖成祖, 生物工程进展, 1994, **14**(5): 23-27.
 [2] 徐宏武, 生物工程进展, 1997, **17**(2): 48-50.
 [3] Palermo D P, Degraaf M E, Maroti K R et al., 1991, *J Biotech.*, **19**: 35-48.

- [4] 刘小萍等, 生物工程学报, 1997, **13**(3): 269-272.
 [5] Nienke Vriexen, Bastiaan Romein et al., 1997, *Biotechnology and Bioengineering.*, **54**: 273-286.
 [6] Broad D, Boraston R, Rhodes M et al., 1991, *Cytotechnology.*, **5**: 47-55.
 [7] Kelvin H. Lee, Adriana Sburiati et al., 1996, *Biotechnology and Bioengineering.*, **50**: 273-279.
 [8] Martin Schroder, Peter Friedl., 1997, *Biotechnology and Bioengineering.*, **53**: 547-559.
 [9] 邓继先等, 军事医学科学院院刊, 1997, **121**(4): 244-250.
 [10] 邓继先等, 生物工程学报, 1997, **13**(4): 375-379.
 [11] 陈昭烈等, 生物工程学报, 1996, **12**(3): 289-294.