

- ture, 372: 100—103.
- [6] Collins, M.K.L. and A. R. L. Rivas, 1993, *Trends Biochem. Sci.*, 18: 307—309.
- [7] Orrenius, S., 1993, In *Free Radicals, From Basic Science to Medicine*, ed. by Poli, G. et al., pp. 47—64, Birkhauser Verlag, Basel.
- [8] Buttke, T. M. and P. A. Sandstrom, 1994, *Immunol. Today*, 15: 7—10.
- [9] Lennon, S. V. et al., 1991, *Cell Prolif.*, 24: 203—214.
- [10] Dypbubt, J. M., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 30553—30560.
- [11] Escargueil-Blang, I. et al., 1994, *FA-SEB J.*, 8: 1075—1080.
- [12] Mukherjee, S. K. et al., 1995, *Brain Res. Bulletin*, 38: 595—604.
- [13] Sandstrom, P. A. et al., 1995, *FEBS Letters*, 365: 66—70.
- [14] Salgo, M. G. et al., 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215: 1111—1118.
- [15] Ramakrishnan, N. and G. N. Catravas, 1992, *J. Immunol.*, 148: 1817—1821.
- [16] Mayer, M. and M. Noble, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7496—7500.
- [17] Matsuda, M. et al., 1991, *J. Immunol.*, 147: 3837—3841.
- [18] Bustamante, J. et al., 1995, *Free Rad. Biol. & Med.*, 19: 339—347.
- [19] Korsmeyer, S. J., 1992, *Blood*, 80: 879—886.
- [20] Hockenbery, D. et al., 1990, *Nature*, 348: 334—336.
- [21] Hemet, T. et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 1456—1460.
- [22] Kane, D. J. et al., 1993, *Science*, 262: 1274—1277.
- [23] Lam, M. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 6569—6573.
- [24] Elliott, S. J. et al., 1992, *Free Rad. Biol. & Med.*, 13: 635—650.
- [25] Walfe, J. T. et al., 1994, *FEBS Lett.*, 352: 58—62.
- [26] Slater, A. F. G. et al., 1995, *Biochem. J.*, 306: 771—778.
- [27] Slater, A. F. G. et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1271: 59—62.
- [28] Hennes, T. et al., 1993, *Biochem. J.*, 289: 587—592.
- [29] Bellomo, G. et al., 1992, *Cancer Res.*, 52: 1342—1346.
- [30] Sandstrom, P. A. et al., 1994, *J. Leukoc. Biol.*, 55: 221—226.
- [31] Wong, G. H. W. and D. V. Goeddel, 1988, *Science*, 242: 941—944.
- [32] Hirose, K. et al., 1993, *FASEB J.*, 7: 361—368.
- [33] Murgia, M. et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 10939—10941.
- [34] Richter, C. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6465—6467.
- [35] Jacobson, M. D. et al., 1993, *Nature*, 361: 365—369.
- [36] Rathstein, J. D. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 4155—4159.
- [37] Kaufmann, S. H. et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 3976—3985.
- [38] Zhivotovsky, B. et al., 1993, *Exp. Cell Res.*, 207: 163—170.
- [39] Weaver, V. M. et al., 1993, *Biochem. Cell Biol.*, 71: 488—500.
- [40] Abate, C. et al., 1990, *Science*, 249: 1157—1161.
- [41] Brown, K. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2532—2536.

流式细胞术在细胞凋亡研究中的应用

胡庆柳 丁振华

(第一军医大学基础部放射医学教研室 广州 510515)

细胞凋亡(apoptosis)也称为细胞程序性死亡(programmed cell death)、细胞编程死亡,早期称为细胞间期死亡。细胞凋亡与细胞的另

一种死亡方式——坏死(necrosis)有着本质的区别。从形态上看,凋亡细胞会出现胞核及胞浆的浓缩,随后是染色质的断裂,凋亡小体的形

成。凋亡小体被邻近细胞吞噬，因此，凋亡过程一般不伴有炎症。各种分析细胞凋亡的方法正是利用了细胞凋亡的上述某些特征。

传统的光镜和电镜技术为研究正在死亡和已经死亡的细胞以及区分凋亡和坏死提供了很好的分析方法，但不能进行定量。生物化学方法如 DNA 片段的测定，虽然能定量，但测定的是凋亡细胞的平均比例。流式细胞术 (Flow Cytometry) 通过荧光激发分选细胞，可以大量快速地测定单个细胞。到目前为此，国外已经研究出至少六种利用流式细胞术分析细胞凋亡的方法，即 Hoechst-PI 染色法、选择性光解法、乙醇抽提法、吖啶橙(AO)染色法、末端标记法、缺口平移法。其中吖啶橙染色法利用凋亡细胞 DNA 对变性敏感性的增强，Hoechst-PI 染色法利用凋亡细胞膜通透性的增强，DNA 可染性的降低。其他主要是利用凋亡细胞发生 DNA 断裂这一特性。

一、Hoechst-PI 染色法

用 Hoechst 33342 (Ho 342) 将细胞染色 7 分钟，区分活细胞和凋亡细胞，另加碘化丙啶 (PI) 或 7-氨基放线菌素 D(7-AAD) 以区分失去了细胞膜的细胞和凋亡细胞。Ho 342 染色

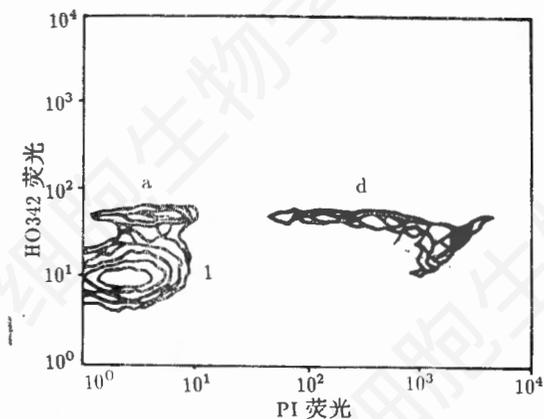


图 1 活细胞占 81% (1)，死细胞占 12% (d)，凋亡细胞占 7% (a)。

(引自 Schmid I et al., 1994, Cytometry, 15: 12-20)

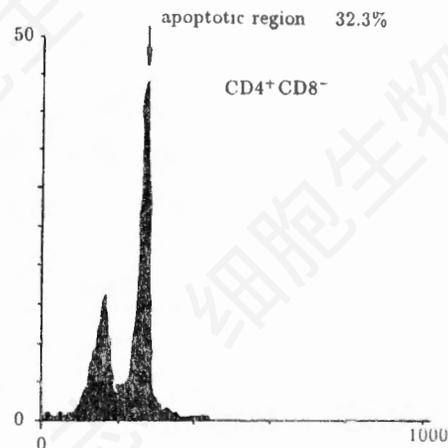
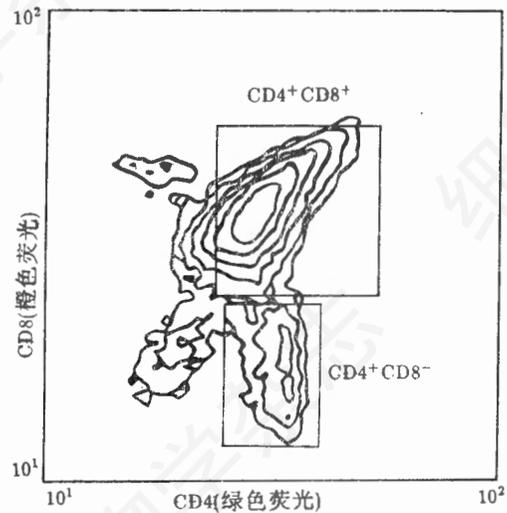


图 2 箭头所指为凋亡细胞峰，凋亡细胞占 32.3%。

(引自 Telford WG et al., 1994, Journal of Immunological Methods, 172: 1-16)

弱的细胞为活细胞；Ho 342 染色亮，而 PI 或 7-AAD 染色为阴性的细胞是凋亡细胞；Ho 342 染色亮，PI 或 7-AAD 染色为阳性的细胞是失去了细胞膜的细胞。流式细胞仪可以区分这三种细胞，并用软件分析各种细胞所占的比例^[1] (见图 1)。

这种方法尤其适用于 DNA 可染性降低，很难观察 DNA 断片的凋亡细胞。

二、乙醇抽提法

先用乙醇固定细胞,再用碘化丙啶(PI)染色,用流式细胞仪分析DNA荧光含量。由于凋亡细胞中的DNA断片在乙醇固定过程中部分地被抽提,凋亡细胞的荧光明显减弱。还可以用连接异硫氰酸盐荧光素(FITC)的抗CD4抗体(绿色荧光)和连结藻红蛋白(PE)的抗CD8抗体(橙色荧光)进行免疫表型标记。(图2为流式细胞仪图像示例)

细胞固定方法最大的优点是能把荧光免疫表型与DNA染色结合起来。甲醛一般作为荧光免疫表型的固定液,因为它能使细胞膜上的蛋白质交联,很少损伤细胞膜。乙醇不能使细胞膜上的蛋白质交联,损坏细胞膜,同时使联接在重要标志上的抗体丧失。可是,一部分凋亡细胞用甲醛固定不显现。轻微的乙醇固定方法解决了荧光免疫表型与细胞凋亡分析结合的问题,同时保持了膜的结构。

这一方法分析的是完整细胞的凋亡,比分析细胞裂解产物的DNA断片或从凝胶电泳获得的DNA断片相对量更能反映凋亡细胞的实际百分数,更有相关价值^[3]。

三、吖啶橙(AO)染色法

吖啶橙掺入双链DNA呈绿色荧光,与单链DNA(变性DNA)连接则呈红色荧光,红色与绿色荧光(或总荧光)的比率反应每一细胞中变性DNA的比率。由于凋亡细胞对变性的敏感性增强,因此细胞中红色荧光的比率高。

细胞作变性处理,然后用AO染色,再用流式细胞仪分析细胞的荧光,用适当的软件处理,即可得出凋亡细胞的百分比(见图3)。该法和末端标记法有良好的直线相关性^[2]。

四、选择性光解法

这一方法的原理是:5-Br-2'-脱氧腺苷或5-I-2'-脱氧腺苷能掺入正在复制的DNA中,随后在掺入的部位发生光解。用外源末端脱氧

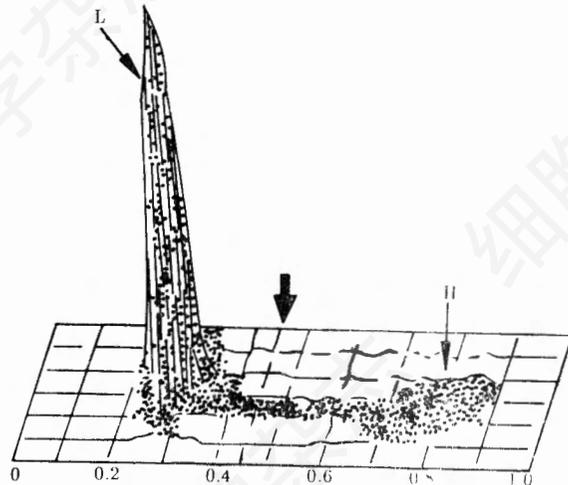


图3 H所指为凋亡细胞峰

(引自Gorczyca W et al., 1993, EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, 207: 202-205)

核苷酸转移酶催化,光解后的单链缺口被地高辛或生物素连结的dUTP标记。凋亡细胞中的双链DNA片段也可以被标记,然而与光解后的DNA不同,凋亡细胞中的低分子量DNA可以从细胞中抽提出来,洗脱的程度可由甲醛来调节。这样,凋亡细胞可通过片段DNA的

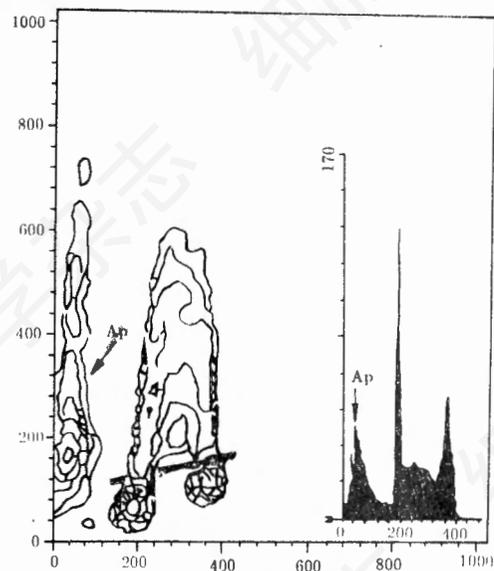


图4 Ap所指分别为凋亡细胞区域和凋亡细胞峰

(引自Xun L et al., 1994, CANCER RESEARCH, 54: 4289-4293)

量来区分和定量。用这种选择性光解的方法可以探测到细胞中低于百分之一基因组的复制。

传统的分析 DNA 复制的方法是用抗体探测胸腺嘧啶类似物 5-Br-脱氧尿苷(BrdUrd)的掺入。这要求加热或用酸变性 DNA, 以使抗原决定簇(BrdUrd)能接受抗体。这一步骤与凋亡细胞的探测是不相容的, 因为凋亡细胞 DNA 在加热或用酸处理过程中被完全抽提。而用选择性光解法不需 DNA 的变性, 是根据掺入了 BrdUrd 的 DNA 在紫外线下会发生降解的特性。

从流式细胞仪分析的结果看, 处于 G1 和 G2+M 期的细胞中不能掺入 BrdUrd 或 IdUrd, 其绿色荧光与未经紫外线照射的细胞一致。相反, S 期细胞表现强的绿色荧光。

该方法可用于研究人肿瘤细胞增殖和死亡的预后, DNA 复制和未复制细胞对不同处理的凋亡反应^[4](图 4 为流式细胞仪图像示例)。

五、末端标记法(TdT 法)

即用末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)介导的 dUTP-生物素(或 FITC-12-dUTP)缺口末端标记(TUNEL)DNA 断片。这种方法可与表面免疫荧光染色相结合。所用表面免疫荧光染色剂是 R-藻红蛋白(PE)连着的抗 CD 4 抗体(黄色)和连有生物素的抗 CD 8 抗体、链霉素抗生

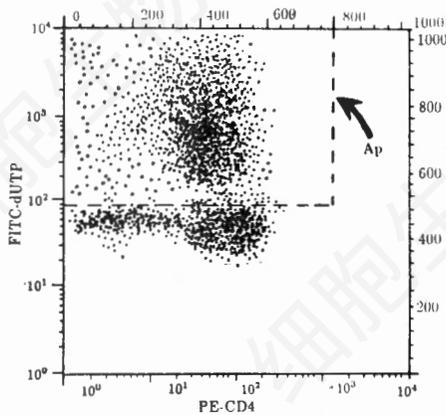


图 5 Ap 所指为凋亡细胞区域 (引自 Sgonc R et al., 1994, TIG, 10(2))

物素蛋白(Cy, Cy-CD 8 染色阳性为红色)。流式细胞仪图像见图 5。

结果是凋亡细胞 FITC-dUTP 染色为阳性(亮绿色), PE-CD 4 和 Cy-CD 8 染色至少有一种为阳性(作者用本法研究 BALB/C 鼠胸腺细胞的凋亡)^[5]。

六、缺口平移法(NT 法)

缺口平移法(Nick Translation)是利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 5'-3' 的核酸连接酶活性以及 5'-3' 的核酸外切酶活性, 一方面在切口处以碱基互补的原则在 3'-羟基位结合上新的 dNTP(包括 dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 其中一种是被标记的), 另一方面又将 5' 末端的单核苷酸移除, 其结果使切口沿着 DNA 平移, 在平移的过程中就形成了结合有标记核苷酸的 DNA 片段(图像示例见图 6)。

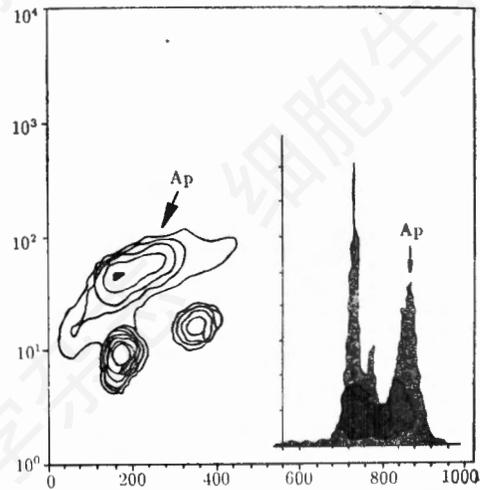


图 6 Ap 所指分别为凋亡细胞区域和凋亡细胞峰

(引自 Gorczyca W et al., 1993, CANCER RESEARCH, 53: 1945-1951)

用 60% 或 70% 乙醇固定细胞后再用缓冲液洗涤, 凋亡细胞中的低分子量 DNA 会流失, 高分子量 DNA 或与核质相连的 DNA 仍保留在细胞中。凋亡细胞在流式细胞仪直方图中以 DNA 含量减低为标志。

用 TdT 法和 NT 法研究细胞凋亡与其他方法相比有以下几个优点: ① 标记反应直接在 DNA 断片的 3'-末端发生, 因而是从分子水平研究凋亡细胞的裂解; ② DNA 断裂是在凋亡的极早期发生, 因而可用来研究凋亡的早期事件; ③ 因为除了测 DNA 断裂还可以测 DNA 含量, 所以测凋亡可以与细胞在循环周期中的位置或染色体的倍数联系起来; ④ 反应可以在固定的细胞上发生, 细胞在乙醇中固定的时间可以变动, 对 DNA 断裂的探测没有影响。这为积累和运送临床标本提供了可能。

TdT 法与 NT 法相比, TdT 更优越: ① TdT 法标记凋亡细胞 DNA, 荧光更强, 因而更敏感; ② 从标记反应的动力学看, TdT 更快, 30 分钟的孵育时间就足够了, 而 NT 法则须几个小时^[6]。

凋亡早期阶段细胞的分离和它们早期裂解的探测有助于弄清凋亡过程的早期步骤。从形态上看, 染色质结构的早期变化很重要, 早期变化形成 300-50 kbp 的 DNA 片段, 用原位缺口平移法和流式细胞术可以探测到。这有助于我们发现启动染色体断裂的因子。

凋亡所涉及基因的蛋白产物的抗体已经获得, 用流式细胞术研究细胞周期循环和诱发凋亡基因的表达将是一个富有成果的研究领域^[7]。

摘 要

本文综述了目前使用流式细胞术研究细胞凋亡的几种方法。即 Hoechst-PI 染色法、选择性光解法、乙醇抽提法、吖啶橙(AO)染色法、末端标记法、缺口平移法。简要介绍了这几种方法的原理和优缺点。

参 考 文 献

- [1] Schmid, I. et al., 1994, *Cytometry*, 15, 12-20.
- [2] Gorczyca, W. et al., 1993, *Exp. Cell Res.*, 1993, 207: 202-205.
- [3] Telford, W. G. et al., 1994, *J. Immuno. Meth.*, 172: 1-16.
- [4] Xun, L. et al., 1994, *Cancer Res.*, 54, 4289-4293.
- [5] Sgonc, R. et al., 1994, *TIG*, 10 (2).
- [6] Gorczyca, W. et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 1945-1951.
- [7] Ormerod, W G., 1994, *CMB*, 1: 35-43.

突触小泡膜蛋白—SB 蛋白的若干研究进展

徐晓虹* 吴馥梅

(南京大学生物科学与技术系神经生物学研究室 210093)

突触是神经信息传递的关键结构, 化学突触的信息传递通过突触小泡释放神经递质而完成。神经冲动到达突触前末梢引起 Ca^{2+} 快速内流, Ca^{2+} 触发突触小泡沿突触前膜贴靠并与其融合, 经胞吐作用向突触间隙释放递质, 然后小泡膜进入再循环(recycling)而重新被利用。鉴于突触在信息传递中的重要性, 人们从形态学、生理学、药理学及生物化学多种途径对突触结构和功能进行了大量研究。目前, 已

从突触的亚微结构层次向分子水平深化, 其中关于突触前末梢内各种蛋白质的分离纯化、鉴定以及对其作用机理的研究引起了广泛的重视, 取得了令人瞩目的进展。尤其在突触小泡向突触前膜移动、接近(approach)、停靠(docking)、融合(fusion)及胞吐作用等一系列步骤的动态过程中, 各种类型的突触蛋白究竟

* 吴馥梅教授实验室的访问学者, 工作单位为浙江师范大学生物学系。