

流式细胞光度术 (Flow Cytometry)

一种快速单细胞定量分析和分类的新技术

薛 绍 白

(北京师范大学生物系)

流式细胞光度术又称流式显微荧光光度术 (Flow Microfluorometry 缩称FMF), 脉冲细胞光度术 (Pulse Cytophotometry) 或荧光激活细胞分类术 (Fluorescence-activated Cell Sorting 缩称FACS)。它可对单个细胞逐个的进行高速的定量分析和分类, 每秒钟可测定5000个细胞, 从一个细胞中同时测得多种参量如DNA、蛋白质、细胞体积以及核与细胞直径的比例等。在无菌条件下, 按每小时一亿八千万个细胞的速度对活细胞进行分类收集, 其纯度可达到90—99%。这种高速, 多信息分析和高纯度分类的新技术不仅为细胞生物学提供了一种研究细胞周期动力学强有力的手段, 而且很快的推广到免疫生物学、体细胞遗传学、生物化学、肿瘤学和放射生物学中去。其发展速度很快, 近年来 (1975—1977), 每年就召开一次国际性的脉冲细胞光度术会议。流式细胞光度术中的新仪器技术和新的应用层出不穷, 都说明了这种技术是一种很有发展前途的新技术。

从30年代Caspersson引入了显微光度术以后, 虽然在显微荧光光度术和自动扫描显微分光光度术方面有一些进展外, 但从速度和准确性 (指统计学方面) 都进展不大。60年代末和70年代初由于利用了流体喷射技术、激光技术、空气计数, γ -射线能谱术和电子计算机等技术, 使静态细胞光度术一跃而成为高速的流式细胞光度技术。以下仅对流式细胞光度术的方法、原理和应用作一简略介绍。

流式细胞光度计和分类计

目前使用的流式细胞光度计基本上有二种类型: 一种是用汞灯作光源, 在落射光照明条件下, 激发在流动室中以水平方向流动着的细胞悬液, 测量细胞发出荧光脉冲的强度, 这种系统灵敏度高, 但不能测量前向散射光 (用于测定细胞体积), 也不能对细胞进行分类处理。第二种是用激光激发, 细胞按重力方向流动的系统, 如图1所示, 这种仪器目前得到广泛的应用。

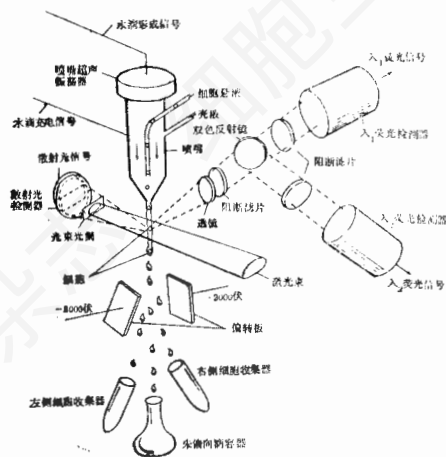


图1 流式细胞光度分析及分类计示意图

细胞悬液通过样品进入管被压进喷嘴的中央, 同时无细胞液体通过另一进入管也被压入喷嘴, 形成了包围细胞悬液的壳液, 由于这种同轴流动的设计使得细胞能够保持在流束的中央。壳液的直径一般为50—100微米 (对于细胞

分类计)和250微米(对细胞分析计)。通过调节壳液和细胞悬液的压力,使样品束的直径保持在10—30微米左右,通过喷嘴的圆孔喷射出来。

因为激光的高强度和单色性能好,一般都利用激光作为荧光和散射光测量的光源,最常用的是氩离子激光器。通过适宜的光学系统使激光形成50微米宽的光束。当同轴流动的细胞和壳液与激光束相遇时,已被荧光染料处理过的细胞被激光束激发而产生荧光,在与激发光束呈 90° 角的方向收集荧光,用阻断滤片阻止照明的激发光通过,而使荧光滤过,再用一个双色反射镜和另外二种阻断滤片选择所要测定的荧光波长,这样二个光电倍增管就可以同时测定二种不同波长的荧光。因为本底低,所以荧光测量有很高的灵敏度,一个细胞带有3000个荧光分子就能被测定出来,二个细胞发射的荧光有5%的差别就能鉴别出来。

流动的细胞与激光束相遇时产生散射光,大多数仪器测定细胞体积都是收集 $0.5-2^\circ$ 范围的前向小角度散射光(有些仪器扩展到 15° 角),这种测量叫“近前向角散射”。在这种情况下所产生的散射光信号基本上与细胞的体积有关。散射光检测器一般用光电二极管。

上述的激光束和照射截面积大于流束中的细胞,因而这种系统不能提供关于细胞形态学方面的信息,所以称这种系统为零分辨力系统。如果用一种线状聚集的激光束或“缝”(5微米宽)来照射流动的细胞,在细胞通过激光束缝的不同时间间隔测定细胞的荧光,就可得到一维的细胞轮廓,如图2所示,计算机分析细胞轮廓可算出细胞直径、核的直径、核与细胞直径的比例、胞质荧光、核荧光以及一些其他的低分辨的形态学信息,如双核和细胞重叠等。

细胞分类的原理是通过形成含有细胞的带电小水滴而实现的,喷嘴上的超声振荡器以每秒4万次频率振荡,使喷射束每秒钟破碎成4万个均匀的小水滴,通过喷嘴后流动的细胞就

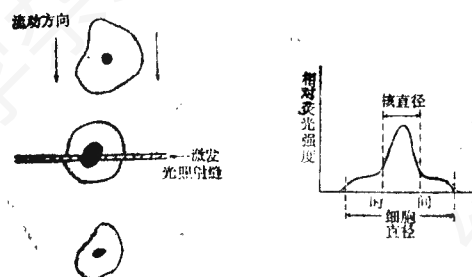


图2 一维缝扫描

当流动的细胞通过激光照射缝时(左图)在不同的时间间隔,测定荧光强度,就可得一维缝扫描轮廓图(右图)。分析荧光轮廓可测出细胞直径、核直径、核与细胞直径比例、核荧光强度和胞质荧光强度。

被分散在这些小水滴中。由于小水滴是在荧光和散射光测量之后形成的,当某一个细胞的荧光和散射光信号被处理(比较),延迟和联合以后产生一个充电脉冲信号,当这个被测量过的细胞刚要形成小滴时,充电脉冲信号通过喷嘴对整个流束充电。这样刚形成的含有细胞的小水滴就带上了电荷,当充电的小水滴通过一对带有恒定静电场的偏转板时,带电的小水滴根据自身所带的电荷性质产生偏移,至于小水滴被充以正或负电荷,则是根据被测定的细胞的荧光和散射光信号与预先选定的标准(脉冲高度)进行比较来决定的,对于分类无意义的,如不含有细胞的小水滴和不需要的细胞,细胞碎片以及与预定值相当接近很难准确分类的细胞不进行充电,这样带正电荷的水滴(内含细胞),在静电场作用下,落入左方细胞收集器,而带负电荷的水滴落入右方收集器,不带电荷的落入中间容器。

荧光和散射光的信号输入到多道脉冲高度分析仪进行分析,分析的结果在示波器和X-Y记录仪中按组方图形式表示,或通过数字打印机打印出每道的细胞数,或通过穿孔机作成穿孔纸带以便进入计算机进一步分析,或者可以与计算机联机操作直接把结果输入到计算机。计算机能快速而精确的计算出 G_1/G_0 、S和 G_2+M 细胞在细胞群体中所占的百分比。计算机分析细胞群体DNA含量组方图的基本原理是假设 G_1/G_0 DNA含量和 G_2+M DNA含量的分布

都是正态分布, S期的分布是按非线性最小二乘法计算出的二价多项式分布的, 根据这些假设, 计算机算出的S期细胞所占百分数与 ^3H -胸腺嘧啶核苷掺入的标记指数是一致的。如用双参量多道脉冲高度分析仪, 就可同时对二种参数, 如DNA和蛋白质进行分析, 以点矩阵方式处理和显示。

细胞制备技术看来是成功地使用流式光度术的关键, 在固定、染色和测量过程中一定要保证细胞处于单个分散状态, 而不要使细胞成团, 并尽量减少处理过程中的细胞丢失。

荧光染色的方法: 测定DNA含量最常用的是雪夫型染料如吡黄素(Acriflavin)、插入型染料如溴化乙锭(EB)和碘化丙锭(PI), 还有光神霉素(Mithramycin), 色霉素和Hoechst 33258。测定蛋白质含量一般用异硫氰酸荧光黄(FITC), 同时测定DNA和RNA含量用吡啶橙。

流式细胞光度计的应用

1. 在细胞动力学方面的应用:

过去分析细胞周期的组成大多用生物化学方法测定细胞群中DNA的平均含量; 用 ^3H -胸腺嘧啶核苷掺入的自显影的方法测定细胞周期的参数; 用静态细胞光度计测定大数量细胞DNA含量作出DNA含量分布的组方图进行细胞周期分析, 由于测定的细胞数量少, 常达不到统计学的精确度。自从引入高速的流式细胞光度术以后, 实现了细胞周期分析的快速化、准确化和简单化。

①测定细胞周期各时相细胞的比例 流式细胞光度计测定细胞群体中每个细胞的DNA含量, 然后得出DNA含量分布的组方图, 如图3所示, 图中第一个DNA频率分布的峰是含有2C DNA含量的 G_1/G_0 (DNA合成前期/静止期) 峰, 含有4C DNA含量的为 G_2+M (DNA合成后期+有丝分裂期) 峰, 2C到4C DNA含量为S期(DNA合成期)的区域, 用电子计算机按编定的程序就能很快算出 G_1/G_0 、

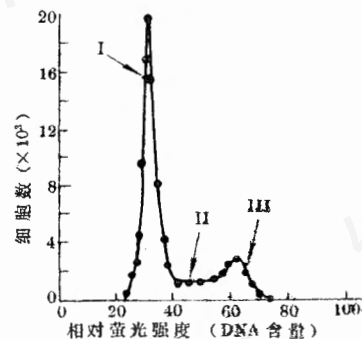


图3 HeLa 细胞的 DNA 分布组方图

光神霉素染色根据计算机切合(Fit)分析得出各时相的细胞百分比。

S和 G_2+M 各时相细胞比例。电离辐射和化疗药物通常对于细胞周期的进行发生干扰作用, 一定剂量的X射线引起细胞在 G_2 期积聚, 不同化疗剂干扰肿瘤细胞周期的不同时期, 如博来霉素和阿霉素使肿瘤细胞阻止在 G_2 期, 羟基尿和阿糖胞苷阻止在 G_1 到S期的界限上。对于化疗剂作用于细胞周期的了解和肿瘤临床有密切关系, 它可为设计治疗方案和联合化疗提供理论依据。对于人的白血病的诊断和治疗, 流式细胞光度术可用少量血液样品代替骨髓样品, 很快的测定出S期细胞的百分数, 因为治疗后的白血病人的S期细胞增多, 一般表示白血病细胞对药物的敏感性高, 杀伤白血病细胞的数量多, 因而缓解率高, 过去用 ^3H -胸腺嘧啶核苷放射自显影方法测定标记指数需要一周的时间。用流式细胞光度术就能及时监视病情变化, 根据每个病人对药物的反应不同, 设计不同的治疗方案, 就有可能作到“对症下药”。

流式分类术是细胞周期分析的一种新方法, 这种方法是以前S期为观察窗口, 监视 ^3H -胸腺嘧啶核苷脉冲标记的细胞群体通过这个窗口的情况来测定细胞周期参数, 此法比标记有丝分裂方法快而且不需要显微放射自显影。但流式细胞光度术目前还不能测定细胞周期的动态特性如转移时间。由于周期外细胞即 G_0 期细胞和肿瘤中尤其是实体瘤中存在不同的形态学和细胞动力学的细胞混合群体, 使得解释测定

结果遇到困难。此外流式细胞光度计对被测定细胞形态学方面的信息获得太少。但许多人正在努力克服这些不足之处,如把细胞同步方法与流式细胞光度术结合起来就可测定细胞周期的动态特性,也有人用染色的方法鉴别 G_0 和 G_1 期细胞,用电视摄像管的“缝扫描形像”流动相关系统可同时得出一维的胞核和细胞的轮廓和二维的细胞电视影像。此外,如用超短脉冲激光器(锁模激光器)为光源,则测定荧光寿命的方法就可用于流式细胞光度术中,这也是一个很有发展前途的方面。

②研究细胞群体中细胞同步的位置和程度

许多因素和化疗剂可使细胞阻止在细胞周期的不同时期,造成不同程度的同步化。如双次给以过量的胸腺嘧啶核苷,可使细胞积累在早 S 期。培养在缺少亮氨酸培养基中的中国地鼠卵细胞阻断在 G_1 期。用机械收获的方法能选择性地得到大量的有丝分裂细胞。采用流式细胞光度术可以准确地测定同步的位置和程度,如图 4 所示。肿瘤治疗的联合化疗的方案就是根据化疗剂的同步作用和肿瘤细胞对药物的周期敏感性而设计的。

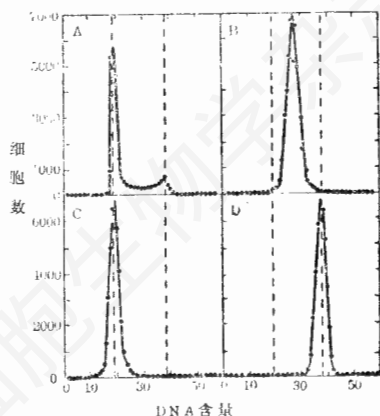


图4 吖黄素染色的中国地鼠卵细胞

(A)指数生长的 CHO, (B)双胸腺嘧啶核苷阻断的 CHO, (C)在缺少亮氨酸培养基中 30 分钟, (D)有丝分裂选择的同步细胞

虚线代表 G_1 和 G_2+M 期的相对位置

③多参数分析 对细胞群体的 DNA、蛋白质、细胞体积和核与细胞的比例同时测定分析

的方法对研究细胞周期中特殊周期时相的生化过程是很有用途的。

蛋白质含量和细胞体积是细胞的重要性质,因为这些参数大致上反映了细胞群体中生物合成的能力。RNA 的分析对于区别最低转录水平的 G_0 细胞和较高转录活性的周期细胞 (G_1 , S, G_2+M) 以及比较不同的转录活性都是有意义的。

用二种荧光染料对所测定的细胞进行双染色,首先用 PI 染色(对 DNA 染色),然后用 FITC 染蛋白质。因为 PI 和 FITC 都有相似的激发光谱,但二者发射光谱不同,PI 发桔红色荧光, FITC 发绿黄色荧光。用二种不同阻断滤片和二个光电倍增管分别测定 DNA 和蛋白质的含量。用双参量多道脉冲高度分析仪可进行完全的双参数分析(三维频率分布等量图和二维的轮廓图)。如图 5 所示。对其他双参量的联合,如 DNA/蛋白质对蛋白质。DNA 或细胞体积也是可行的。

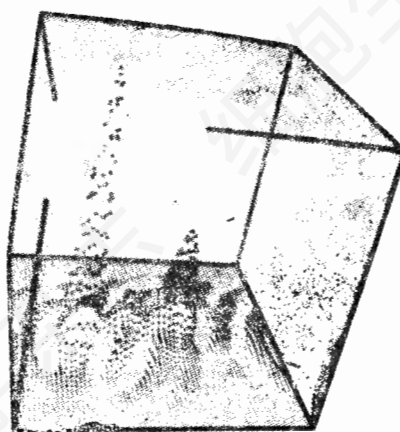


图5 HeLa 细胞的 DNA-蛋白质双参数频率分布图

X 轴为 DNA 含量, Y 轴为蛋白质含量,

Z 轴为细胞数目

由于仅从核 DNA 荧光分析很难对恶性细胞进行诊断。如结合其他参数如核直径(N)与细胞直径(C)的比例进行分析,就能对肿瘤细胞作出鉴别诊断。如图 6 所示,子宫颈的样品中的正常鳞状细胞,核的荧光弱,并且 N/C 小,形成靠近原点的一团。淋巴细胞 N/C 高,但荧

光弱, 增生(异常)细胞荧光强, 并且N/C高。这种方法就有希望达到肿瘤普查的要求。

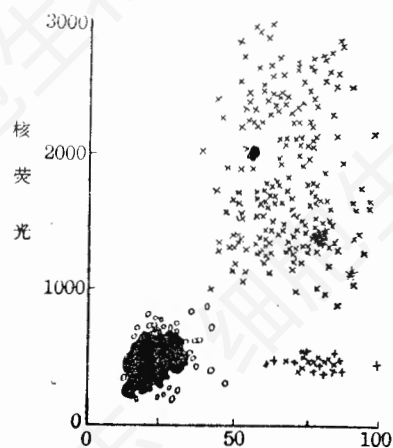


图6 人宫颈样品, 核荧光和 N/C 直径比

○ 正常鳞状上皮细胞
+ 淋巴细胞
x 增生、转移型细胞(异常)

用吡啶橙染白细胞, 核染成绿色, 胞质(RNA和酸性多糖)染成红色, 对核和胞质的荧光进行双参数分析, 就可对白细胞进行分类。

2. 在体细胞遗传学上的应用

利用流式细胞光度计分析单个染色体DNA含量。首先制备单个的染色体, 用荧光染料进行染色。用零分辨力流式细胞光度计对每个染色体进行测定。如图7所示, 每一种类型的染色体产生一个峰, 峰的道数代表某种类型的染色体数目。

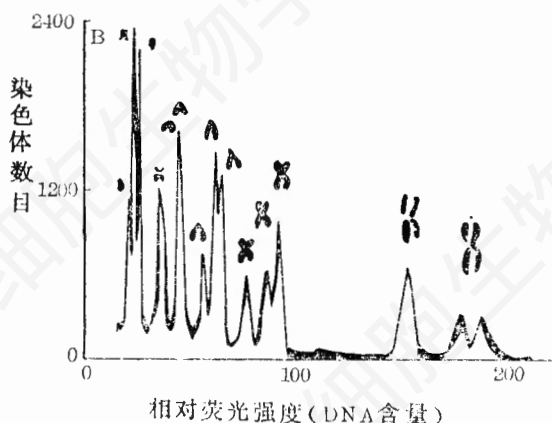


图7 用流式光度计分析中国地鼠M3-1细胞的核组型

的染色体, 峰的面积代表这种类型染色体的数目。目前这种分析还遇到一些困难, 一旦技术问题解决以后, 用流式细胞光度术, 对早期妊娠母亲血液中的胎儿细胞核组型的分析, 就有可能检查出先天性遗传病的胎儿。

3. 在免疫生物学中的应用

单色荧光分析和活细胞分类在免疫生物学中得到广泛的应用。用直接或间接荧光的方法对细胞染色。例如, 用猪的霍乱病毒(HCV)感染猪的 PK-15 细胞后, 再用荧光素标记的猪霍乱抗体与感染以及未感染的细胞相互作用, 则带有霍乱抗原的感染细胞与抗体起反应, 这种细胞发绿色的荧光, 其荧光强度的众数值比对照细胞亮3倍。见图8, 感染细胞荧光分布较宽可能反应了PK-15细胞对HCV感染的敏感性不同。利用这种荧光差别可对感染和未感染细胞进行分类收集, 以研究特殊类型细胞的抗原结合特性。

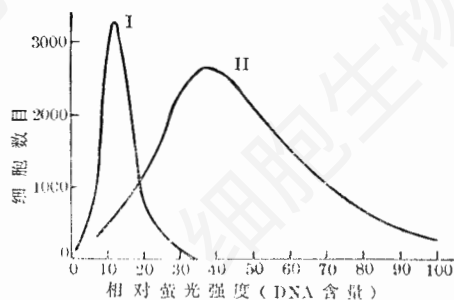


图8 用流式细胞光度术分析猪霍乱病毒(HCV)感染的和对照的 PK-15 细胞与荧光素结合的 HCV 抗体的反应

这种分析能应用于任何表面抗原。例如, 钥孔蠔血兰素 (KLH)、啮齿类T细胞的表面 θ 抗原、胸腺细胞上的Ia同种异体抗原 (Ia alloantigens) 和表面膜免疫球蛋白 (Sm Ig) 等。同时也可对病毒抗原和神经抗原进行定量研究。

关于其他方面的应用, 如研究细胞表面结合位点(受体)的分布; 用含有高浓度荧光染料的脂质体, 把不能进入质膜的荧光染料引入到细胞内, 以观察细胞中的生物化学变化, 以及

(下转第38页)

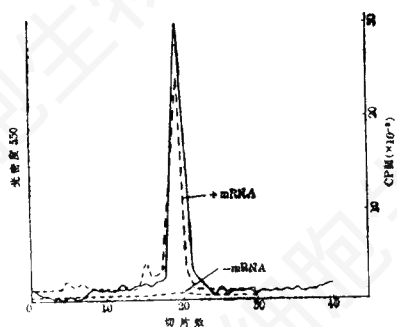


图9 胶柱扫描(550mm)和同位素测定图

小 结

1. 本实验采用自己化学合成的Oligo(dT)-纤维素树脂, 结合升温 and 降低离子强度的方法, 分离得到呈单一电泳带的珠蛋白mRNA。

2. 在体外麦胚无细胞蛋白合成系统中, 此珠蛋白的mRNA高效率地促进标记氨基酸参

入, 最适温度23℃而非37℃, 并发现参入活力曲线与麦胚提取液浓度不一致的现象。

3. 对体外合成的蛋白质进行分析鉴定表明, 珠蛋白被忠实地翻译出来了。

参 考 文 献

- (1) B. E. Roberts et al. 1974. The cell-free synthesis and assembly of viral specific polypeptides into TMV particles Virology 59, 307—313
- (2) A. W. Nienhuis et al. 1974 Preparation of Globin messenger RNA Methods in Enzymology XXX(F), 621—630
- (3) 实生所三室等, 1977 Oligo dT-纤维素与 OligoU-纤维素的合成及其应用 生物化学与生物物理进展 4, 8—11
- (4) 微生物所病毒复制组 1976 小麦胚无细胞体系中 TMV-RNA 指导的氨基酸参入 生物化学与生物物理学报 8(2), 179—186

(上接第43页)

定量估价自身免疫的机能障碍等。

综上所述, 定量多参数流式细胞分析和分类技术作为一种崭新的技术进入生物学、生物医学和临床医学的领域。它以高速率对单个细胞进行分析, 获得多参数的信息, 并且进行高纯度的分类为特点, 引起人们对它的极大注意。这种技术的进一步改进和应用需要生物学家、临床工作者、工程技术人员和生物物理学家的进一步协作, 这就要求进一步改进样品制备的技术, 扩大应用的范畴和仪器的改进。有人预言, 在本世纪末流式细胞光度术, 在研究和临床医学中将象液体闪烁仪和自动分析

仪一样重要, 看来这种估计并不夸大。

参 考 文 献

- (1) Crissman, H. A., Mullaney, P. F. and Steinkamp, J. A., 1975 In "Methods in Cell Biology" Vol IX ed. by prescott, D. M., Academic press, New York, p. 179—246.
- (2) Horan, P. K. and Wheelless, L. L., Quantitative Single Cell Analysis and Sorting, Science, 1977, 198, P. 149—157.
- (3) Herzenberg, L. A., Sweet, R. G. and Herzenberg L. A., Fluorescence-activated Cell Sorting, Scientific American, 1976, 234, P. 108—116.