

一种应用流式细胞术快速分选活的衰老细胞的方法

阳 晶 黄岚珍 黄希仕 杨飞城 沈 珂 蒋晓山*

(桂林医学院科学实验中心, 桂林 541004)

摘要 衰老细胞是细胞老化研究的重要模型, 目前还缺乏从混合细胞群中分选活的衰老细胞的有效方法。该研究以 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂诱导的人鼻咽癌 CNE 2 细胞衰老为研究模型, 根据细胞大小和自发荧光(脂褐素积累)两项物理特征, 采用 FACS Aria III 流式细胞仪在 Purity 模式下设门分选活的衰老细胞 (SEN) 和增殖细胞 (PROL), 收集细胞, 再分别进行回测分析和衰老相关 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 染色验证。结果从 SEN 门控获得分选纯度为 74.7% 的活的衰老细胞, 分选出的细胞可重新贴壁; 其中, 72.1% 的细胞呈 SA- β -gal 染色阳性, 与 PROL 门控分选获得的细胞 (8.01%) 相比较有显著差异 ($P < 0.01$)。该研究提供了一种基于流式细胞仪快速分选活的衰老细胞的方法。

关键词 衰老细胞; 流式细胞术; 细胞分选; 衰老相关 β -半乳糖苷酶; CNE 2 细胞

A Rapid Flow Cytometric Method for Sorting of Living Senescent Cells

Yang Jing, Huang Lanzhen, Huang Xishi, Yang Feicheng, Shen Ke, Jiang Xiaoshan*

(The Center for Science Research, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

Abstract Senescent cells provide an important model for the study of aging. However, there is lack of effective methods to isolate living senescent cells from a mixed population of cells. The purpose of this study was to explore a rapid flow cytometric method for high-throughput sorting of living senescent cells. In a cellular senescence model of cisplatin-induced human nasopharyngeal carcinoma CNE 2 cells senescence, we used a FACS Aria III flow cytometry to sort living senescent cells (SEN) and proliferating cells (PROL) based on two physical characteristics of the cell size and autofluorescence (lipofuscin accumulation). A sorting purity of 74.7% of living senescent cells was obtained from the SEN gate in the Purity model by this method. The sorted cells could adhere to growth and 72.1% of cells sorted from the SEN gate were positive for the senescence-associated β -galactosidase staining, while only 8.01% from the PROL gate ($P < 0.01$). Our study provides a rapid method for sorting of living senescent cells based on the flow cytometric technology.

Keywords senescent cells; flow cytometry; cell sorting; senescence-associated β -galactosidase; CNE 2 cells

细胞衰老是指细胞从活跃增殖进入不可逆转的生长停滞状态的过程。衰老的细胞在一段时间内仍然维持代谢活动, 但失去了对有丝分裂原刺激的反应和合成 DNA 的能力, 细胞周期停滞, 出现体积变

大、扁平、核膜内陷、细胞器变形、脂褐素 (lipofuscin) 沉积等形态学改变, 并表达在 pH 6.0 时有高酶活性的 β -半乳糖苷酶^[1]。衰老细胞是细胞老化研究的重要模型, 目前还缺乏从混合细胞群中分选活的衰老细胞的有效方法。本研究基于 BD FACS Aria III 流式细胞仪检测技术平台, 以细胞形态大小和胞浆脂褐素相结合作为分选参数, 在顺铂 (cisplatin) 诱导的人鼻咽癌 CNE 2 细胞衰老模型中成功地分选出高纯度的活的衰老细胞, 为开展衰老活细胞分选与定量分析提供了一种新的高通量的简便方法。

收稿日期: 2014-05-27 接受日期: 2014-10-21

广西医学科学实验中心开放基金(批准号: KFJJ2011-13)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0773-2232025, E-mail: jiangxs@glmc.edu.cn

Received: May 27, 2014 Accepted: October 21, 2014

This work was supported by the Guangxi Medical Science Research Center Foundation (Grant No. KFJJ2011-13)

*Corresponding author. Tel: +86-773-2232025, E-mail: jiangxs@glmc.edu.cn

网络出版时间: 2014-12-30 16:56

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20141230.1656.001.html>

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

X-gal(美国Sigma公司)溶于二甲基甲酰胺(美国Amresco公司),贮存液浓度为40 mg/mL, -20 °C避光保存;顺铂(美国Sigma公司)溶于去离子水,贮存液浓度为100 µg/mL;RNA酶和碘化丙锭(PI)(美国Sigma公司);戊二醛(成都科龙化工试剂厂)。BD FACS Aria III流式细胞仪和流式细胞分选管(美国Becton-Dickinson公司),OLYMPUS IX51型倒置显微镜(日本Olympus公司),CO₂细胞培养箱(美国NBS公司),恒温培养箱(LRH-150B,广东医疗器械厂)。

1.2 细胞株与细胞培养

人鼻咽癌细胞株CNE 2购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库,常规培养于含体积分数10%的胎牛血清(美国HyClone公司)+1%青霉素/链霉素的RPMI1640(HyClone)培养基中,5% CO₂、37 °C的培养箱中培养,每3~4 d换液传代。

1.3 衰老细胞的诱导与收集

采用顺铂诱导的鼻咽癌CNE 2衰老细胞为研究模型。细胞分别接种于直径10 cm培养皿(流式细胞术分析与分选检测用)和6孔培养板(β-半乳糖苷酶活性检测用)。先用1.0 µg/mL顺铂处理细胞48 h,然后PBS洗2次、更换正常培养基继续培养6 d;以等体积PBS作为顺铂对照。处理组和对照组细胞用胰蛋白酶-EDTA消化,4 °C下收集于含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中,细胞计数,将细胞浓度调整到2.0×10⁶/mL,置冰上备用。

1.4 细胞周期分析

取0.5 mL上述细胞悬液,加1.0 mL PBS,200 ×g离心5 min, PBS重悬细胞,70%乙醇固定,100 µg/mL RNA酶处理,50 µg/mL PI染色后上流式细胞仪(激发波长488 nm,发射波长618 nm)检测细胞周期分布(DNA含量)情况。

1.5 流式细胞仪分选活的衰老细胞

未固定细胞的自发荧光在FITC-FL1下测量(对数型),细胞大小在FSC下取线性刻度测量。首先在FSC/SSC散点图中设门圈活细胞群,排除凋亡细胞和碎片。然后根据衰老细胞具有体积较大和胞浆脂褐素(自发荧光)沉积两项特征,在FSC/FITC-FL1散点图中分别设置衰老细胞(senescent cells, SEN)和增殖细胞(proliferating cells, PROL)分选门控,其中FITC-FL1和FSC值都最大的细胞群为衰老细胞,

FITC-FL1和FSC值都最小的细胞群为增殖细胞。取70 µm的喷嘴,震荡频率87 kHz,鞘液压力为70 psi。选择Purity分选模式,以每秒低于100个细胞的速度分选,分选细胞直接流入装有含10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素的RPMI1640培养基的分选管,置冰上备用。

1.6 分选前后细胞的衰老相关β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)活性检测

分选前:顺铂及PBS对照处理CNE 2细胞(6孔培养板)8 d,吸弃上清,PBS洗2次,室温下用0.2%戊二醛固定5 min, PBS洗2次,每孔加入1.0 mL染色液(1 mg/mL X-gal, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L K₃Fe(CN)₆, 5 mmol/L K₄Fe(CN)₆, 40 mmol/L NaPi, pH6.0),置37 °C恒温培养箱中避光染色6~24 h^[1-2]。光镜下随机取20个视野(200×),计数蓝染的细胞。分选后:分选获得的衰老细胞和增殖细胞经低速离心(200×g, 5 min)后用含10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素的RPMI1640培养基重悬,种于6孔板培养,24 h后行SA-β-gal染色,步骤同上。

1.7 统计学分析

采用SPSS 20.0统计学软件,结果以均数±标准差表示,Student's *t*-test分析其统计学意义,当 $P < 0.05$ 时,判定具有显著性差异。

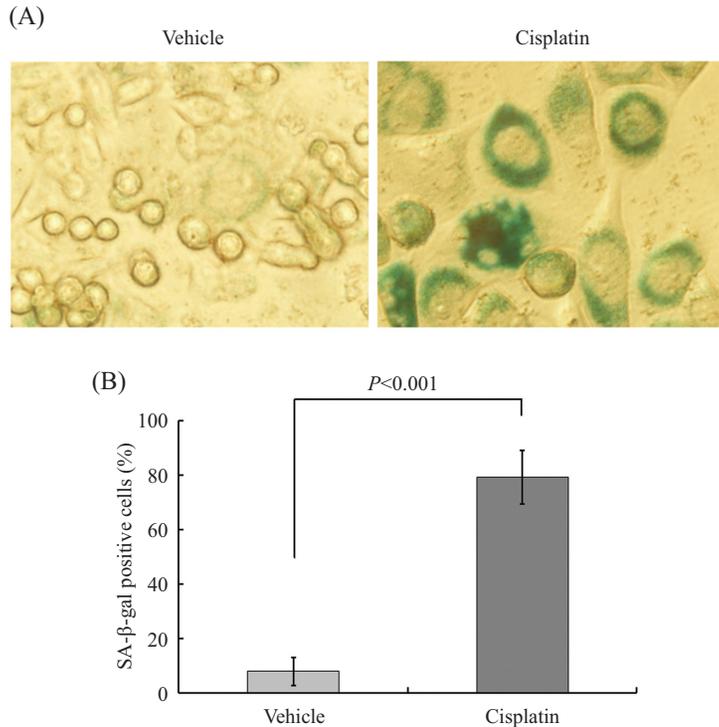
2 结果

2.1 分选前细胞衰老标志验证及周期检测

经1.0 µg/mL顺铂处理48 h、后续培养6 d, CNE 2细胞明显变大、变扁平,细胞内颗粒增加,约79.31%的细胞呈SA-β-gal染色阳性(图1),提示细胞内β-半乳糖苷酶活性增加,进入衰老状态。细胞周期的分布也发生变化,与对照组相比,顺铂处理后S期和G₂/M期细胞分别增加了30.68%和71.61%,差异有统计学意义,而G₀/G₁期细胞相应减少(表1)。

2.2 设置门控分选活的衰老细胞

根据衰老细胞具有体积较大和因脂褐素沉积而自发荧光两项特征,且自发荧光在各个荧光通道接收到的荧光强度位于同一等级为依据,在SSC/FITC-FL1散点图中设置门控分选衰老细胞(SEN)和增殖细胞(PROL),采用Purity分选模式,分选速率<100 evt/s。结果在顺铂处理的CNE 2细胞中,从SEN和PROL门控分别分选到占活细胞群总数20.9%的衰老细胞和73.3%的增殖细胞(图2A);对SEN门

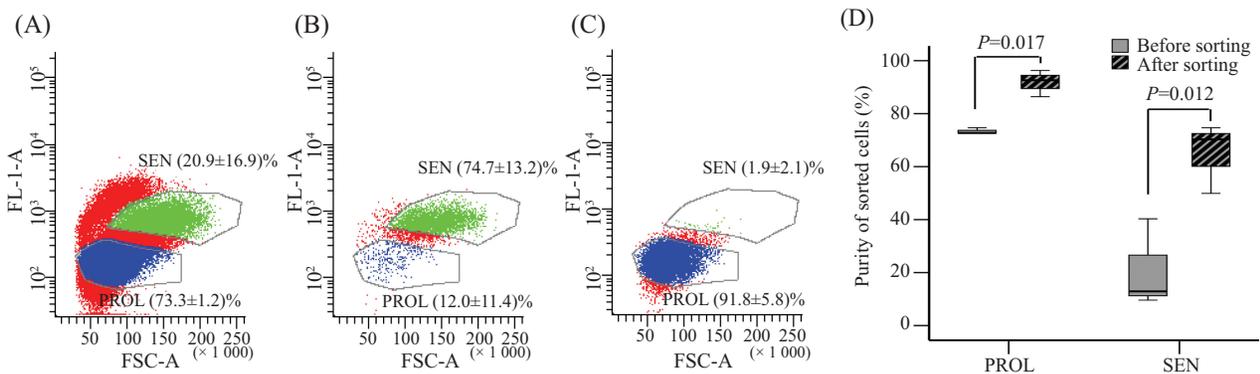


A: CNE 2细胞经1.0 mg/L顺铂处理48 h后换液继续培养6 d, 行衰老相关 β -半乳糖苷酶染色, 相差显微镜观察(200 \times)细胞衰老情况, PBS为空白对照; B: 20个随机视野计数的SA- β -gal染色的阳性细胞数的统计学分析, 图示3次独立实验的均数 \pm 标准差分析结果。

A: SA- β -gal staining for CNE 2 cells at day 8 after 48 h treatment with 1.0 mg/L of cisplatin. Senescent cells were examined by a phase-contrast microscopy (200 \times). PBS was used as the vehicle control; B: statistical analysis of positive cells of SA- β -gal staining from A. The results represented the mean \pm S.D. of 3 independent experiments.

图1 顺铂诱导CNE 2细胞衰老

Fig.1 Cisplatin induced senescence of CNE 2 cells



A: 设置门控分选顺铂诱导的CNE 2衰老细胞(SEN)和增殖细胞(PROL); B: 回测SEN门控中分选出的细胞; C: 回测PROL门控中分选出的细胞; D: 衰老细胞和增殖细胞的分选纯度的统计学分析结果, 图示3次独立实验的均数 \pm 标准差分析结果。

A: the gates to sort senescent cells (SEN) and proliferating cells (PROL) were defined; B: reanalysis of CNE 2 cells sorted in the SEN gate; C: reanalysis of CNE 2 cells sorted in the PROL gate; D: statistical analysis of purity of sorted senescent and proliferating cells. The results represented the mean \pm S.D. of 3 independent experiments.

图2 根据细胞大小(FSC)和脂褐素含量(FL-1)分选衰老细胞和增殖细胞

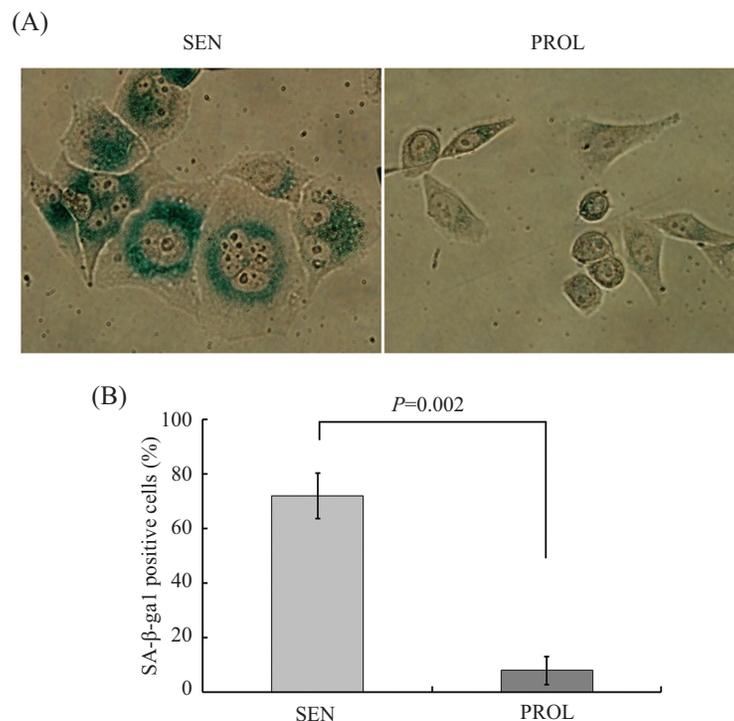
Fig.2 Cell sorting of senescent and proliferating cells according to size (FSC) and lipofuscin content (FL-1)

表1 顺铂对CNE 2细胞周期的影响(% , mean \pm S.D., n=3)

Table 1 Effect of cisplatin on cell cycle progression in CNE 2 cells (% , mean \pm S.D., n=3)

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Vehicle	73.78 \pm 6.13	18.50 \pm 3.94	7.72 \pm 2.43
Cisplatin (1.0 μ g/mL)	59.24 \pm 3.06	27.01 \pm 0.99*	13.74 \pm 3.40*

* $P < 0.05$ vs vehicle group.



A: SEN门控和PROL门控分选的CNE 2细胞分别种于6孔培养板, 24 h后行SA-β-gal染色检测(200×); B: 20个随机视野计数的SA-β-gal染色阳性细胞数的统计学分析, 图示3次独立实验的均数±标准差分析结果。

A: SA-β-gal staining of CNE 2 cells respectively sorted from the SEN and PROL gates (200×); B: statistical analysis of positive cells of SA-β-gal staining from 20 randomized fields. The results represented the mean±S.D. of 3 independent experiments.

图3 SA-β-gal染色验证分选获得的衰老细胞

Fig.3 SA-β-gal staining verified the sorted senescent cells

控和PROL门控分选出的细胞再经流式细胞仪回测分析, 纯度分别达到74.7%和91.8%(图2B和图2C), 表明通过设门分选, 各门控内细胞均得到有效分离($P < 0.05$, 图2D)。

2.3 分选细胞的衰老标志检测

衰老细胞的重要特征之一是表达在pH6.0时有高酶活性的β-半乳糖苷酶, 催化底物X-gal生成深蓝色沉积产物。为检测分选细胞的活力及验证其衰老相关的β-半乳糖苷酶活性, 我们将SEN门控和PROL门控分选获得的细胞接种于6孔培养板, 24 h后检查发现, 细胞能够贴壁生长良好; 进一步行SA-β-gal染色, 结果显示, SEN门控分选获得的细胞蓝染率为72.1%, 而PROL门控分选获得的细胞蓝染率仅8.0%, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图3)。

3 讨论

细胞衰老在生物个体老化、肿瘤生长抑制等过程中起重要作用。1961年, Hayflick和Moorhead^[3]首先描述体外培养中的衰老细胞不可逆地失去增殖潜能并伴随体积变大、扁平、核膜内陷、细胞器变形

以及脂褐素沉积等表型变化。衰老细胞是研究细胞衰老的理想模型, 但是目前还缺乏从活细胞群中有效分选衰老细胞的方法。本研究采用BD FACS Aria III流式细胞仪检测平台, 以细胞大小和脂褐素相结合作为分选参数, 对顺铂诱导的CNE 2衰老细胞的分选技术进行了探索。

顺铂, 化学名为顺式二氨基二氯络铂, 系临床常用的细胞周期非特异性广谱抗肿瘤药物, 能够通过P53依赖或非依赖途径在体外诱导人乳腺癌、肺癌、鼻咽癌等多种肿瘤细胞发生衰老^[4]。衰老细胞在一段时间内仍然维持代谢活动, 但失去了对有丝分裂原刺激反应的能力, 细胞周期停滞, 表达在pH6.0时有高酶活性的β-半乳糖苷酶^[1]。Yang等^[5]研究发现, 在DNA受损前, p53基因在鼻咽癌细胞CNE 2中已有高表达, 因此不能发生G₁期阻滞, 而G₂期阻滞则不受影响。本实验采用顺铂处理8 d的鼻咽癌CNE 2细胞为模型, 经顺铂诱导后, CNE 2细胞发生上述典型的衰老表型改变, 细胞周期阻滞在G₂/M期。

细胞分选是根据细胞不同的物理特征, 采用流式细胞仪对单个细胞进行分离检测。衰老细胞体积

变大、扁平, 脂褐素沉积。脂褐素系溶酶体作用后未消化物质所形成的细胞内沉积物, 具有自发荧光特性, 发射波长介于 500~565 nm^[6]。由于未经修饰的衰老细胞不存在二元标志物, 其细胞大小和脂褐素含量与增殖细胞间呈现明显的渐进性差异^[7]。因此, 这些细胞在FSC(测量细胞大小)/FITC FL-1(检测自发荧光, 检测波长515~545 nm)散点图上显示的是一群非独立细胞群体, 分选过程中需要人为设置和选择衰老细胞 (SEN) 和增殖细胞 (PROL) 分选门的位置。FSC测量可以使用线性或对数刻度, 但我们发现用线性刻度可以获得更好的分辨率。值得注意的是, 喷嘴尺寸直接决定分选液滴的大小, 一般要求喷嘴直径为样本细胞直径的3~6倍, 直径太小液滴包裹不全细胞, 导致细胞受损; 太大则一个液滴包裹两个以上细胞, 在Purity分选模式下, 会影响得率。另外, 分选时的震荡频率和鞘液压力对分选具有相当的影响: 高频易产生不含细胞的空液滴, 低频会导致一个液滴中包含阴性和阳性的细胞, 影响得率; 鞘液压力值越大对细胞的损伤也越大。本研究选取 70 μm 的喷嘴, 相对应的震荡频率为 87 kHz、鞘压为 70 psi, 获得较理想的分选纯度和细胞活性。

对于非独立细胞群体, 由于分选结果通常只能使目的细胞富集, 并不能产生一个纯的细胞群体, 为获得高纯度衰老细胞, 选择Purity分选模式, 它仅在只含目的细胞的情况下才进行分选, 掺有非目的细胞的液滴不能得到分选。此外, 从概率分布角度分析, 流式图上的信息是以细胞真实数据为中心的正

态分布, 与实际数据有一定差距。本研究设置SEN门控, 衰老细胞分析率约为 20.9%(SEN门控内的细胞数/活细胞群门中的细胞总数), 分选出的细胞再经流式细胞仪回测分析, 纯度达到 74.7%, 与SA- β -gal染色阳性率 72.1%基本一致。分选细胞能够贴壁生长, 证明活力良好, 可以作为进一步开展衰老细胞的生物学行为研究的细胞模型。

综上所述, 本研究采用流式细胞分选技术, 通过设置适宜的分选参数分析细胞的形态和自发荧光, 获得高纯度的CNE 2衰老细胞, 方法可靠易行。

参考文献 (References)

- 1 Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(20): 9363-7.
- 2 Martin-Ruiz C, Saretzki G, Petrie J, Ladhoff J, Jeyapalan J, Wei W, *et al.* Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative life span. *J Biol Chem* 2004; 279(17): 17826-33.
- 3 Hayflick L, Morehead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.
- 4 Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(20): 1536-46.
- 5 Yang HL, Zhao RY, Lee MH. 14-3-3 σ , a p53-regulator, suppresses tumor growth of nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(2): 253-60.
- 6 Cho S, Park J, Hwang ES. Lipofuscin: Detection and quantification by microscopic techniques. *Mol Cells* 2011; 31(6): 539-46.
- 7 Tollefsbol TO. *Biological Aging: Methods and Protocols*, 2nd ed. New York: Humana Press, 2007, 32-3.