

流式细胞术研究细胞增殖的方法与技术

户乃丽

(首都医科大学中心实验室, 北京 100069)

摘要:流式细胞术是检测细胞增殖的一种重要手段,较以往的检测方法,流式细胞仪的优点在于能够实现多荧光指标同时检测,并且可以对混合样品中的特定细胞进行增殖分析,本文就目前常用细胞增殖检测染料的检测原理,应用范围及染色方法进行阐述。

关键词:细胞增殖;流式细胞;DNA 染色;示踪染料

中图分类号:R392

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2019.01.016

文章编号:1006-1959(2019)01-0047-03

Method and Technique for Cell Proliferation by Flow Cytometry

HU Nai-Li

(Central Laboratory, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract:Flow cytometry is an important means to detect cell proliferation. Compared with previous detection methods, flow cytometry has the advantages of simultaneous detection of multiple fluorescence indicators, and can perform proliferation analysis on specific cells in mixed samples. At present, the detection principle, application range and dyeing method of cell proliferation detection dyes are commonly used.

Key words:Cell proliferation;Flow cytometry;DNA staining;Tracer dye

细胞增殖是生物体的重要生命特征,细胞以分裂的方式进行增殖,增殖是生物体生长、发育、繁殖以及遗传的基础,增殖检测技术广泛应用于分子生物学、遗传学、肿瘤生物学、免疫学、药理和药代动力学等研究领域。流式细胞术是一门集现代激光技术、电子技术、生物学技术为一体的高通量细胞检测技术。近年来,得益于激光技术的发展和荧光染料的开发,流式细胞术在已成为检测细胞增殖的一种重要手段,能够快速实现多参数多荧光指标的检测。本文就目前流式细胞检测增殖常用的方法与技术进行阐述。

1 基于 DNA 含量的细胞增殖分析方法

1.1 原理 利用某些荧光染料具有与 DNA 发生特异性结合,且被 DNA 结合的荧光染料的量与 DNA 的含量成正比,即荧光强度与荧光直方图的通道数成正比的原理,运用流式细胞仪检测出处于 G₀/G₁ 期, S 期和 G₂/M 期的细胞的比例。根据仪器的不同激光配置及实验需求,有多种荧光染料可供选择。

1.2 常用检测法 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色法:单细胞悬液经通透处理后,加入能够与 DNA 结合的荧光染料,此时被染荧光物质的量与 DNA 含量成正比,检测到荧光信号的强度即可代表 DNA 含量,处于 G₀/G₁ 期的细胞 DNA 含量为二倍体,处于 G₂/M 期的细胞 DNA 含量为四倍体, S 期细胞染色体含量介于二倍或四倍之间,所检测的样品中,处于 S 和 G₂/M 期的细胞越多,说明细胞增殖越活跃。PI 可由 488 nm 或 561 nm 激发光激发,发射光谱为 610~620 nm,由于 PI 也与双链 RNA 结合,所以在 DNA 含量检测前应对样本进行 RNase 消化处理,排除 RNA 对 DNA 荧光定量的影响。目前实验室绝大多

数流式细胞仪配备有 PI 的检测通道,因此 PI 的应用十分广泛^[1-3]。其染色优点为操作简单,可通过一步染色法实现^[4],且 CV 值小,荧光稳定,抗光漂白性良好。PI 在使用过程中最大的限制就其光谱与其它染料的干扰问题,PI 与常用染料藻红蛋白(P-phycoerythrin, PE)及 PE 检测通道的染料光谱几乎是重叠的,因此 PI 检测周期的样品中不能同时利用 PE 标记其他指标。若使用 488 nm 激光器激发 PI, PI 与异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC), 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)等染料也存在部分光谱重叠。

7-氨基-放线菌素 D(7-Aminoactinomycin D, 7-AAD)也是标记 DNA 的染料,主要以插入方式与 DNA 链的 G-C 碱基对结合,激发波长约为 580 nm,最大发射波长为 640 nm。利用流式细胞仪 488 nm 或 561 nm 激光器激发均可得到良好的检测效果^[5]。7-AAD 属细胞膜非通透性染料,不能通过完整的细胞膜,在进行 DNA 染色前需对细胞进行 75%冷乙醇固定处理,由于 7-AAD 是与 DNA 特异性结合,因此在染色过程中无需对样品进行 RNase 处理。7-AAD 的发射波长较长,可与 PE、FITC 等常用流式染料同时使用较少发生光谱重叠。

DAPI 和 Hoechst33342 是常用的 DNA 标记染料,可以非嵌入方式与 DNA 链上的 A-T 碱基对特异性结合,二者光谱较为接近,激发光为 355 nm,最大发射光为 461 nm,利用流式细胞仪的 351 nm 紫外激光器激发效果最佳,对于未配备紫外激光器的仪器,405 nm 激光器激发也可得到良好的效果^[6]。DAPI 和 Hoechst33342 属膜通透性染料,细胞染色 DNA 无需乙醇固定,活细胞即可,推荐染色工作液浓度均为 5~10 mg/ml,避光孵育 30 min 后上机检测。对于配备有 355 nm 或 405 nm 激光器的流式细

作者简介:户乃丽(1982.8-),女,北京人,硕士,主管技师,主要从事流式细胞检验的研究

胞仪而言,利用 DAPI 和 Hoechst33342 染色细胞 DNA 是良好的选择。首先,二者均使用紫外或紫色激光器激发,与 488 nm、561 nm、633 nm 检测通道上的荧光染料不存在或较少存在光谱重叠,容易实现细胞的多指标同时检测;其次,由于 DAPI 和 Hoechst33342 对细胞膜具有通透性,可以标记活细胞的 DNA,因此是两种可应用于活细胞分选的手机周期染料。

DRAQ5 是可发射远红外荧光的蒽醌类染料,激发光谱在很宽范围内,流式细胞仪配备的 488 nm、561 nm、633 nm 激光器均可对其有效激发,但以 633 nm 激发效果最佳,DRAQ5 具有膜通透,可对活细胞和固定的细胞进行 DNA 染色分析^[7],由于它主要和 DNA 双链结合,和 RNA 的亲合力小,因此染色过程中样本无需 RNase 消化,利用 633 nm 激发光,670 nm 发射光检测 DRAQ5 标记细胞周期时,可与 FITC、PE、GFP 等荧光素同时标记较少发生光谱重叠。

1.3 染色的结果分析 以上所介绍的几种染料,激发和发射光谱不同,但染色原理大致相同,都是根据染料的荧光道数与 DNA 含量成正比这一单一变量检测,因此,只能根据 DNA 含量区分出 G_0/G_1 期、S 期和 G_2/M 期,而无法进一步区分出 DNA 含量相同的 G_0 和 G_1 期、 G_2 和 M 期。由于处于不同时相的细胞对药物或处理会有不同的反应,因此体外培养的细胞在进行干预前应进行同步化处理,否则会影响实验的重复性。细胞同步化的方法包括、短时间饥饿、照射、低温法、药物抑制等物理或化学方法,血清饥饿法因对细胞本身的干扰小且能够获得大量的 G_0/G_1 期细胞因此而最为常用^[8-10]。此外,在检测样品的过程中还应注意粘连体细胞的排除,两个 2C 细胞粘连在一起,在流式细胞仪上检测到的 DNA 的含量为 4C,但由于两个粘连细胞比单个细胞通过激光束的时间长,因此脉冲的宽度是大于单个细胞的,可以利用荧光通道的脉冲宽度信号 W 的差异进行排除。

对于分析癌变细胞或肿瘤活检组织的 DNA 含量时,通常引入 DNA 指数(DI)的概念,即(样品 G_0/G_1 期细胞峰的平均荧光道数)/(正常二倍体细胞样品 G_0/G_1 期细胞峰的平均荧光道数),理论上正常二倍体细胞 DI=1,由于实际检测存在变异系数,实际检测到二倍体 DI 值为 0.9~1.0,四倍体 DI 值为 1.9~2.1,DI 值对于临床上肿瘤的诊断具有一定的参考价值。可以使用鸡红细胞或正常人的淋巴细胞作对照来确定二倍体细胞^[11],市面上也有商品化的小鸡红细胞核(CEN)用于调节二倍体峰的位置。DNA 含量的检测结果通常利用周期分析软件进行 S 期划定,一般 2C 峰和 4C 峰比较对称,且变异系数 CV 较小

结果比较准确,若 $CV>8$,则无法正确分析出各期细胞比例,目前市面上常用的周期分析软件有 Muti-cycle、ModitLT 和 Flowjo 等,同样样品结果利用不同软件分析各期比例无显著性差异^[12]。

2 示踪染料标记法

2.1 BrdU 和 EdU 掺入法 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU),是人工合成的胸腺嘧啶类似物,在 DNA 合成期(S 期),BrdU 能够代替胸腺嘧啶而渗入正在复制的 DNA 分子中,用荧光标记的 BrdU 抗体进行染色,就可以标记出处于增殖期的细胞,同时结合 7-AAD 进行 DNA 染色,可清晰的将细胞区分出 G_0/G_1 期、S 期和 G_2/M 期^[13]。BrdU/7-AAD 双参数法的优势在于 S 期的判定,实验结果无需利用软件分析即可区分各期细胞。在这个方案中,根据所用仪器的激光配置,可选择 BrdU 与 FITC 或 APC 等不同荧光素连接的抗体,7-AAD 也可被 PI 替代。目前 BrdU 有一大缺点,BrdU 抗体分子较大,双链 DNA 中的碱基对阻碍 BrdU 与抗体的结合,因此需将 DNA 双链打开后,若 DNA 结构打开不充分,BrdU 与荧光抗体结合不佳,导致检测到的荧光信号不能真实准确的反映 BrdU 的含量,为了能够暴露 BrdU 的抗原表位,通常用高浓度的盐酸,乙酸或酶解使得 DNA 变性,但这就破坏了 DNA 双链结构,影响了其他染料的结合染色,导致染色弥散,准确性降低等问题。5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)也是一种胸腺嘧啶核苷类似物,在细胞增殖时能够插入正在复制的 DNA 分子中,EdU 只有 BrdU 抗体大小的 1/500,它与荧光素的结合一种被称作“click”化学作用的 Cu^+ 催化的环加成作用,而非抗原抗体反应。与传统的免疫荧光染色比较,EdU 反应非常快速,且无需对 DNA 双链变性,有效地避免了样品损伤,检测细胞增殖具有更高的灵敏度和更快的检测速度,能在组织和细胞水平反映细胞增殖情况^[14,15]。

2.2 CFSE 标记法 羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(carboxy fluorescein succinimidyl ester, CFSE)是目前应用广泛的一种检测细胞增殖的染料,CFSE 的前体羧基荧光二乙酸盐素琥珀酰亚胺酯(carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE-SE)是没有荧光的,但可自由透过细胞膜进入细胞,进入细胞后,其乙酸基团被胞内酯酶切除后,可产生具有荧光的 CFSE,CFSE 不可逆地细胞内的氨基结合偶联到细胞蛋白质上并且长时间存在于细胞内。当细胞进行分裂增殖时,具有荧光的胞质蛋白平均分配到两个第二代细胞中,这样与第一代细胞相比,其荧光强度便会减弱至一半,再次分裂后,第三代细胞的荧光强度会比第二代再减弱一半,以此类推,细胞增殖代数

越多,得到细胞的平均荧光强度相比第一代减弱更明显,利用流式细胞仪 488 nm 激光激发,520 nm 接收可检测到细胞 CFSE 染色荧光,从而反映细胞的增殖情况。

CFSE 探针多用于各种干细胞,淋巴细胞的增殖研究中^[16,17],可用于体外培养细胞分裂跟踪,也可用于注入动物器官内观测细胞体内增殖。由于 CFSE 对细胞是有一定毒性作用的,因此,染色浓度及时间对细胞增殖、分化存在着影响。有研究指出,CFSE 对细胞进行染色时呈现浓度依赖型^[18],细胞的荧光随着 CFSE 染色终浓度升高而增强,但随着染色浓度的增大,CFSE 的细胞毒性也逐渐体现出来,在一定程度上可引起细胞的凋亡,不同种类的细胞 CFSE 的最佳标记浓度有所区别,最佳的染色浓度是使父代细胞荧光强度比未染色细胞高 3~3.5 个数量级^[19]。CFSE 染色的持续时间也很重要,孵育时间过长,可增加细胞毒性^[20],体外培养细胞孵育时间一般控制在 10 min 内,而后用 40% 体积的冷小牛血清终止标记 10 min 后重悬细胞。此外,培养体系或缓冲液中若存在游离氨基酸,会与 CFSE 结合而影响其染色效果,因此推荐用 PBS 配制工作液。对于检测结果的分析,可利用 ModitLT 软件进行增值代数的划定或直接进行细胞平均荧光强度的比较。

3 总结

细胞增殖的检测时评估细胞功能的重要实验,相对常用的比色法 MTT, CCK-8 等,流式细胞术最大的优势在于多色,多参数的检测,可以实现增殖和其他指标的同时检测,或混合样品中特定细胞群体的增殖检测。本文介绍的几种增殖检测试剂,染色原理不同,使用的激光检测通道也有所差异,实验者可根据流式细胞仪激光配置及实验的具体方案进行选择。随着多色流式检测技术的不断发展,从同一份样本获取更多的生物学信息是今后的必然趋势。

参考文献:

- [1] Zeng YT, Jiang JM, Lao HY, et al. Antitumor and apoptotic activities of the chemical constituents from the ethyl acetate extract of *Artemisia indica* [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 11(3): 2234-2240.
- [2] Dapena C, Bravo I, Cuadrado A, et al. Nuclear and Cell Morphological Changes during the Cell Cycle and Growth of the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium minutum* [J]. *Protist*, 2015, 66(1): 146-160.
- [3] Uzlikova M, Nohynkova E. The effect of metronidazole on the cell cycle and DNA in metronidazole-susceptible and resistant *Giardia* cell lines [J]. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2014, 198(2): 75-81.
- [4] 柏春玲, 廖泽容, 张巧, 等. 应用流式细胞术快速测定细胞周期的 DNA 一步法[J]. *昆明医科大学学报*, 2017, 38(2): 10-13.
- [5] Carbonari M. New use for an old reagent: Cell cycle analysis

of DNA content using flow cytometry in formamide treated cells[J]. *Cytometry*, 2016, 89(5): 498-503.

[6] 户乃丽, 徐晓雪, 邹林樾, 等. 利用 405nm 激光激发 Hoechst33342 染色细胞 DNA 的流式细胞技术 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(33): 6406-6409.

[7] Buzina AR, Pinto FE, Nieschke K, et al. Replacement of specific markers for apoptosis and necrosis by nuclear morphology for affordable cytometry [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2015, 420(3): 24-30.

[8] 申雪沂, 郭佳倩, 牛长敏, 等. Stra8 过表达精原细胞的细胞周期同步化方法的建立[J]. *中国男科杂志*, 2017, 31(6): 3-7.

[9] Medina-Reyes EI, Bucio-López L, Freyre-Fonseca V, et al. Cell cycle synchronization reveals greater G₂/M-phase accumulation of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles[J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2015, 22(9): 3976-3982.

[10] Tong J, Sun D, Yang C, et al. Serum starvation and thymidine double blocking achieved efficient cell cycle synchronization and altered the expression of p27, p53, bcl-2 in canine breast cancer cells[J]. *Research in Veterinary Science*, 2016(4): 10-14.

[11] 邹林樾, 徐晓雪, 户乃丽. 鸡红细胞标准品在胶质瘤细胞 DNA 周期检测中的意义[J]. *继续医学教育*, 2015, 29(10): 152-153.

[12] Massey AJ. Multiparametric Cell Cycle Analysis Using the Operetta High-Content Imager and Harmony Software with Phenologic[J]. *PLOS ONE*, 2015, 10(7): e0134306.

[13] Zhao P, Fu JL, Yao BY, et al. S phase cell percentage normalized BrdU incorporation rate, a new parameter for determining S arrest[J]. *Biomed Environ Sci*, 2014, 27(3): 215-219.

[14] Harris L, Zalucki O, Piper M. BrdU/EdU dual labeling to determine the cell-cycle dynamics of defined cellular subpopulations[J]. *Journal of Molecular Histology*, 2018, 49(3): 229-234.

[15] Pereira PD, Serra-Caetano A, Cabrita M, et al. Quantification of cell cycle kinetics by EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)-coupled-fluorescence-intensity analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 40514-40532.

[16] Bocharov G, Luzyanina T, Cupovic J, et al. Asymmetry of cell division in CFSE-based lymphocyte proliferation analysis [J]. *Front Immunol*, 2013, 4(9): 264.

[17] Rodríguez-Pardo VM, Vernot JP. Mesenchymal stem cells promote a primitive phenotype CD34⁺c-kit in human cord blood-derived hematopoietic stem cells during ex vivo expansion[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2013, 18(1): 11-33.

[18] 杜振兰, 陈鹏, 封志纯. 比较不同浓度 CFSE 荧光标记脐血细胞后存活率的实验研究[J]. *中华临床医师杂志*, 2016, 10(3): 368-372.

[19] Lyons AB, Blake SJ, Doherty KV. Flow Cytometric Analysis of Cell Division by Dilution of CFSE and Related Dyes[J]. *Current Protocols in Cytometry*, 2013(9): 64.

[20] Luzyanina T, Cupovic J, Ludewig B, et al. Mathematical models for CFSE labelled lymphocyte dynamics: asymmetry and time-lag in division[J]. *Journal of Mathematical Biology*, 2014, 69(6-7): 1547-1583.

收稿日期: 2018-9-13; 修回日期: 2018-9-21

编辑/张建婷