

快速诱导细胞凋亡方法探讨

朱雪梅,李艳梅,卫林

(苏州大学 生物医学研究院,江苏 苏州 215123)

摘要:[目的] 利用流式细胞仪检测细胞凋亡在基础研究、疾病诊断及预后预测及评价中具有重要的应用价值.补偿调节所需的单阳染色管的制备,是流式细胞术检测凋亡过程的一个重要步骤.探讨了快速诱导不同细胞系和原代细胞凋亡的方法,优化用于检测细胞凋亡的流式单阳染色管快速制备.[方法] (1)分别用 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 、体积分数 4%多聚甲醛、75%乙醇和反复冻融的方法处理 293T 细胞 15 min、30 min、1 h,Annexin V-PE/7-AAD 双标记流式检测 293T 细胞凋亡率.(2)体积分数 1%乙醇、5%乙醇、10%乙醇和 20%乙醇处理 293T 细胞、RAW264.7 细胞、HeLa 细胞、T 细胞和 B 细胞 1 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况.[结果] (1)293T 细胞经 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 、体积分数 4%多聚甲醛、75%乙醇和反复冻融法处理后,几乎所有细胞均处于凋亡状态.(2)293T 细胞、RAW264.7 细胞、T 细胞和 B 细胞用 1%乙醇处理 1 min,HeLa 细胞用 20%乙醇处理 1 min,可出现较明显的凋亡现象.[结论] 细胞凋亡实验时,根据细胞的生长特性,可选择体积分数 1%~20%的乙醇诱导 1 min,作为制备单阳染色管的最佳方案.

关键词:细胞凋亡;流式细胞术;Annexin V-PE/7-AAD

中图分类号:R3923

文献标志码:A

细胞凋亡一直是生物医学领域的研究热点^[1].凋亡可发生在任何部位,对个体发育和维持内环境稳定有着不可或缺的作用^[2].凋亡的检测,不仅被广泛应用于器官发育及药物评估等基础研究中,在疾病的发展及预后分析中的应用也已显示出重要的价值^[3-5].目前流式细胞术是检测凋亡比较常用的方法之一. Annexin V(膜联蛋白 V)与 7-AAD(7-氨基放线菌素)常用于流式细胞检测.然而利用流式细胞术通过 Annexin V/7-AAD 标记进行凋亡检测时,如果 Annexin V 的标记荧光素和 7-AAD 发射光谱存在光谱重叠现象,就需对这一现象进行补偿调节,光谱重叠补偿算法在流式数据分析中越来越重要,该算法不仅影响定性分析检测结果的正确性,而且直接决定定量分析检测结果的准确性.所以补偿调节所需的单阳染色管的制备,已成为流式凋亡实验的重要步骤之一.

目前,常用的细胞凋亡流式单阳染色管的制备方法有反复冻融以及不同体积分数的乙醇、 H_2O_2 、多聚甲醛处理,但是几种处理方法需要的时间以及效果目前尚未有报道,本研究利用免疫学实验常用的几种细胞系和原代细胞对这一问题进行了探讨,并找出不同细胞凋亡流式单阳染色管制备的最佳方案.

1 材料与方法

1.1 材料

BD FACSCantoTMII 流式细胞分析仪;BD FACSAriaTMIII 流式细胞分选仪;凋亡试剂盒购自 Invitrogen 公司;CD3 抗体、CD19 抗体购自 Biolegend 公司;SPF(无特定病原体动物)级 C57 小鼠,体质量 20 g,8 周龄,由苏州大学动物实验中心提供;红细胞裂解液购自康为世纪公司;30% H_2O_2 购自上海凌峰化学试剂公司;无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司;4%多聚甲醛购自 Biosharp 公司.

收稿日期:2020-05-08;修回日期:2020-11-20.

基金项目:国家自然科学基金(31870868);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD).

作者简介:朱雪梅(1985-),女,山东济南人,苏州大学助理研究员,研究方向为流式细胞术与感染免疫,E-mail: xzmzhu@suda.edu.cn.

通信作者:卫林,苏州大学副教授,博士,E-mail: weilin1005@126.com.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 293T 细胞、RAW264.7 细胞、HeLa 细胞置于含体积分数 10% 胎牛血清、质量浓度 100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基中,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,胰酶消化传代,继续培养,待细胞状态良好,进入后续实验。

1.2.2 细胞分选

取 C57 小鼠脾脏,研磨,离心弃上清,红细胞裂解液裂解红细胞,PBS(磷酸盐缓冲液)终止后,离心弃上清,1 mL 1PBS 重悬,加入 CD3 抗体、CD19 抗体染色 30 min,离心弃上清,用含 2% FBS 的 1×PBS 重悬细胞,过滤后上机分选。

1.2.3 细胞凋亡诱导

用不含 EDTA(乙二胺四乙酸)胰酶消化 293T 细胞,分别用 100 μmol/L H₂O₂、体积分数 4% 多聚甲醛、体积分数 75% 乙醇处理 15 min、30 min、1 h,反复冻融的样本分别在 -20 °C 条件下冷冻 15 min、30 min、1 h 后室温融化,进行细胞凋亡检测;

用不含 EDTA 胰酶消化 293T 细胞、RAW264.7 细胞、HeLa 细胞、分选原代鼠源 T 细胞和 B 细胞,分别用体积分数 1% 乙醇、5% 乙醇、10% 乙醇和 20% 乙醇处理 1 min 后进行细胞凋亡检测。

1.2.4 细胞凋亡检测

用不含 EDTA 胰酶消化 293T、RAW264.7、HeLa 细胞,用 1×PBS 洗涤细胞二次,2 000 r/min 离心 5 min,PBS 重悬计数;分选出的 T、B 细胞 2 000 r/min 离心 5 min,1×PBS 重悬计数,每个处理组 5×10⁵ 个细胞,加入 300 μL Binding Buffer 混悬细胞,加入 Annexin V-PE 和 7-AAD 混匀。室温、避光反应 15 min,流式细胞仪定量分析细胞凋亡水平。

1.2.5 凋亡检测试剂剂量优化

凋亡诱导的 293T 细胞,离心重悬后,分别用 1 μL、2 μL、3 μL、4 μL、5 μL 的 Annexin V-PE 和 7-AAD 进行染色 15 min,流式检测凋亡。

2 结果

2.1 凋亡检测试剂 Annexin V-PE 和 7-AAD 用量确定

为了确定凋亡检测试剂 Annexin V-PE 和 7-AAD 的使用剂量,将凋亡细胞分别用 1 μL、2 μL、3 μL、4 μL、5 μL 的 Annexin V-PE 和 7-AAD 进行染色 15 min,流式检测凋亡。如图 1 所示,4 μL Annexin V-PE 和 7-AAD 即可检测到凋亡的饱和状态。

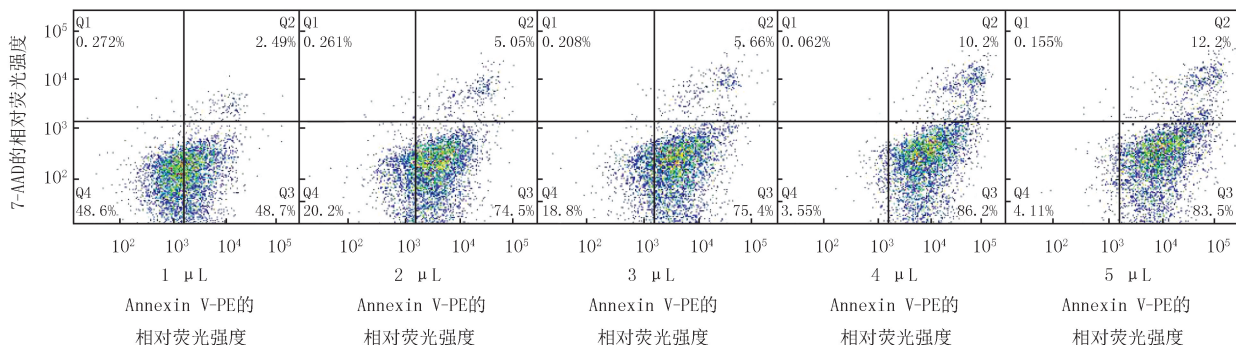
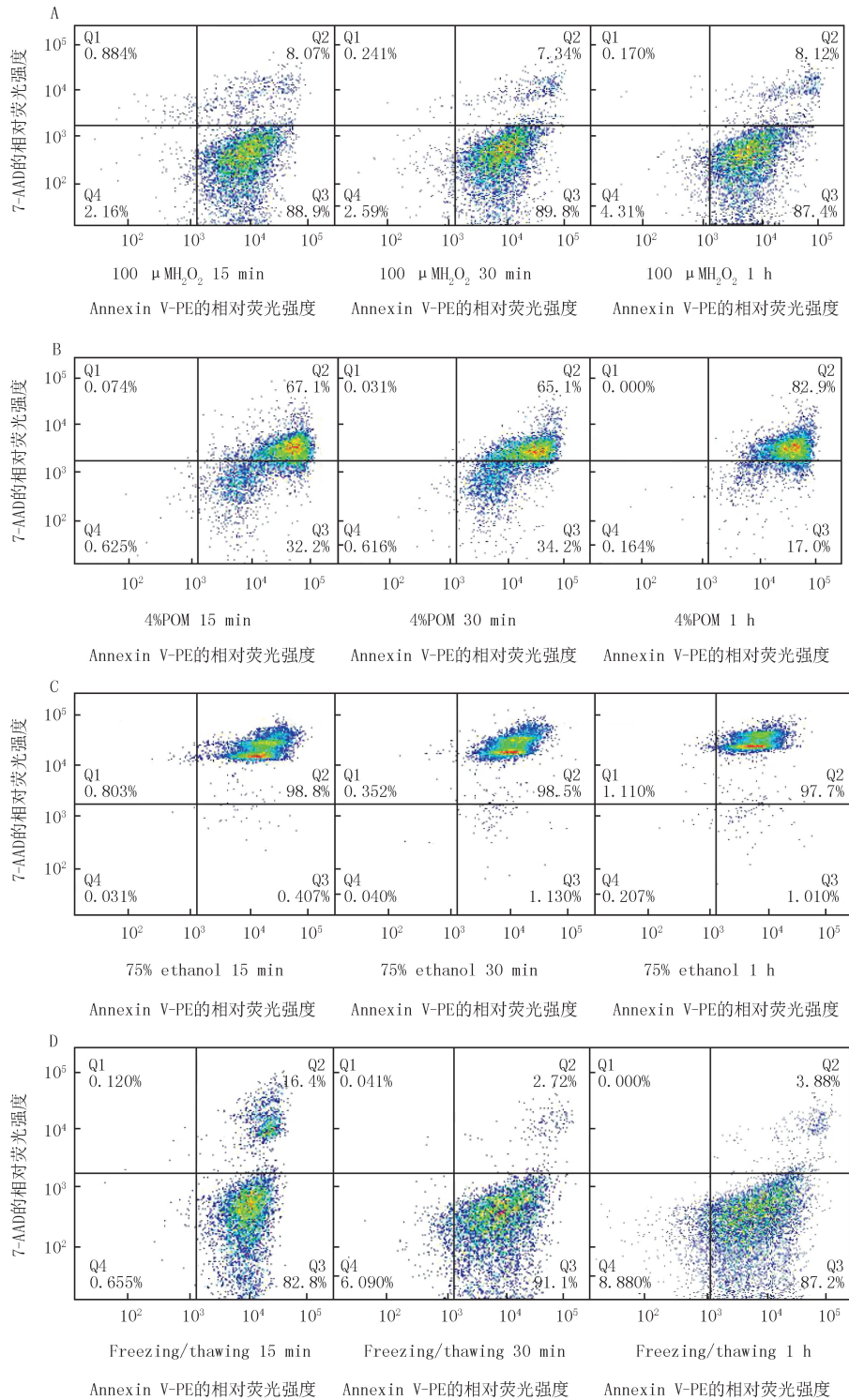


图1 Annexin V和7-AAD的使用剂量对凋亡细胞检测效果的影响

Fig.1 The effect of Annexin V-PE and 7-AAD dose on the detection of apoptosis cells

2.2 不同的方法对 293T 细胞凋亡的影响

流式检测细胞凋亡如图 2 所示。



A: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理293T细胞15 min、30 min、1 h, 流式检测细胞凋亡; B: 体积分数4%多聚甲醛处理293T细胞15 min、30 min、1 h, 细胞凋亡检测; C: 体积分数75%乙醇处理293T细胞15 min、30 min、1 h, 细胞凋亡检测; D: 反复冻融法处理293T细胞15 min、30 min、1 h, 检测细胞凋亡。

图2 不同诱导剂对293T细胞凋亡的影响

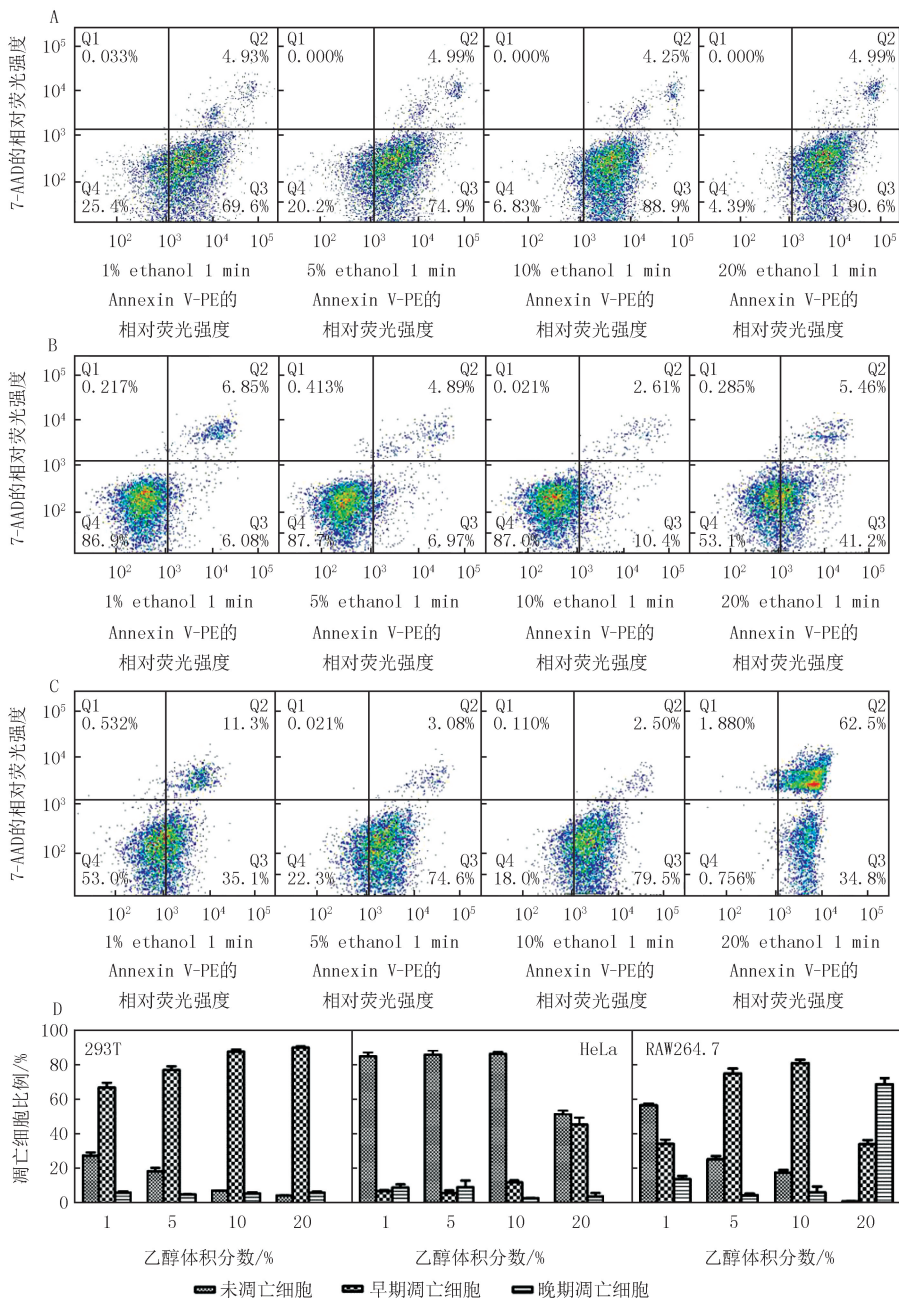
Fig. 2 The effects of different inducers on apoptosis of 293T cells

100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 293T 细胞 15 min、30 min、1 h, 各时间点均有 95% 以上的细胞发生凋亡(图

2A);体积分数 4%多聚甲醛处理 293T 细胞 15 min、30 min、1 h,各时间点均有 99%细胞发生凋亡(图 2B);体积分数 75%乙醇处理 293T 细胞 15 min、30 min、1 h,各个时刻 98%以上的细胞均处于凋亡晚期(图 2C);反复冻融法处理 293T 细胞 15 min、30 min、1 h,所有时间点 90%以上细胞处于凋亡状态(图 2D).这几种方法处理后,凋亡率较高,不适用于细胞凋亡实验单阳染色管的制备条件.

2.3 不同体积分数的乙醇对几种细胞系凋亡的影响

不同体积分数的乙醇对细胞系凋亡的影响见图 3.



A: 体积分数1%、5%、10%、20%乙醇处理293T细胞,流式检测凋亡情况;B: 体积分数1%、5%、10%、20%乙醇处理HeLa细胞,对细胞凋亡的影响;C: 体积分数1%、5%、10%、20%乙醇处理RAW264.7细胞,流式检测细胞凋亡;D: 不同体积分数的乙醇诱导293T, HeLa, RAW264.7细胞的凋亡比例的均方差.

图3 不同体积分数的乙醇对细胞系凋亡的影响

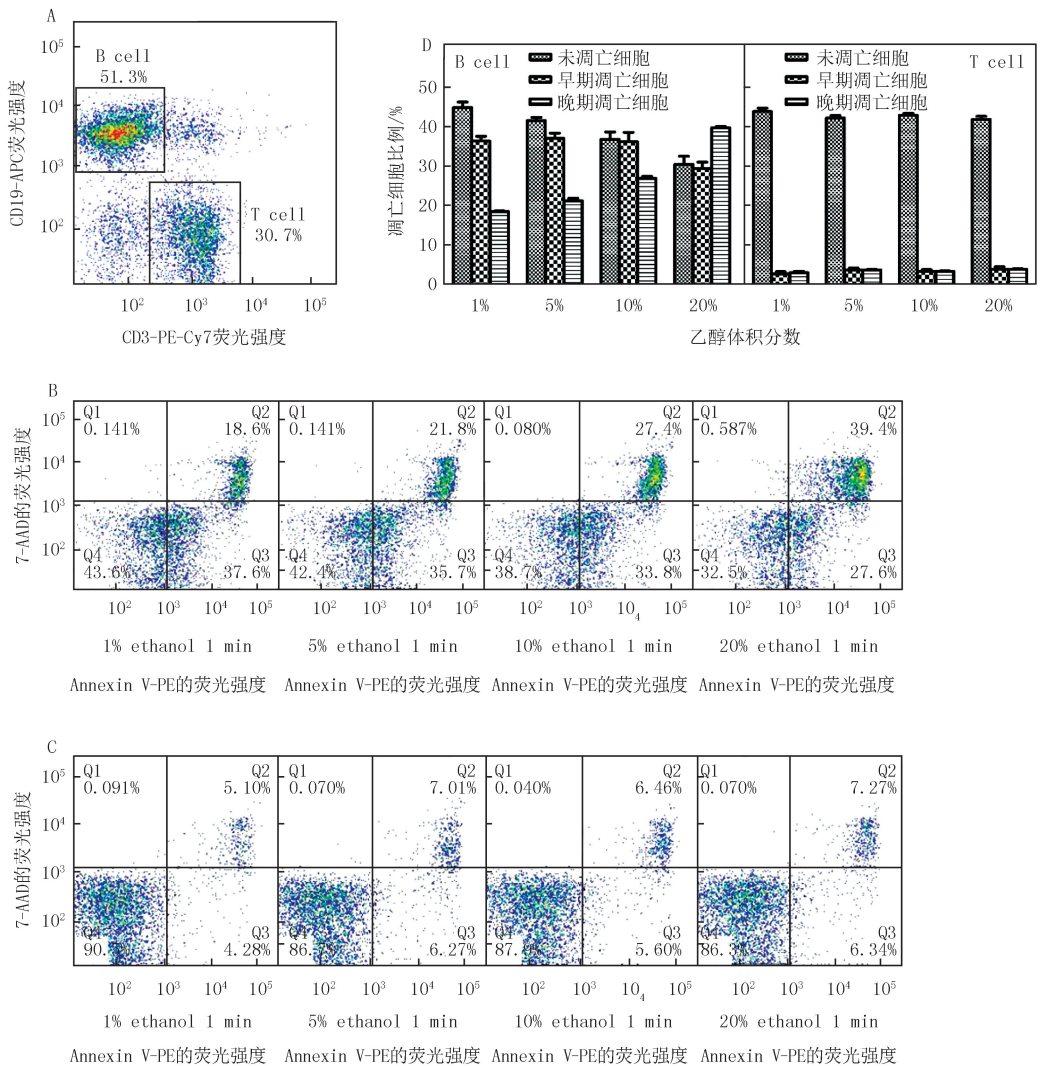
Fig.3 Effects of different concentrations of ethanol on cell apoptosis

体积分数 1%乙醇处理 293T 细胞 1 min,早期凋亡为 69.6%,晚期凋亡为 4.93%,其他体积分数处理后

凋亡发生率均较高(图 3A);体积分数 1%乙醇处理 RAW264.7 细胞 1 min,早期凋亡为 35.1%,晚期凋亡为 11.3%,其他体积分数处理 RAW264.7 细胞,凋亡发生率较高(图 3C);体积分数 20%乙醇处理 HeLa 细胞 1 min,早期凋亡在 41.2%,晚期凋亡为 5.46%,其他体积分数处理 HeLa 细胞后,凋亡不明显(图 3B).如图 3D 所示,对于 293T、RAW264.7 细胞,1%乙醇处理 1 min,凋亡效果较明显;对于 HeLa 细胞,需要在 20%乙醇处理 1 min 条件下,凋亡效果明显.1%乙醇可作为 293T 细胞、RAW264.7 细胞凋亡检测单阳染色管的制备条件;20%乙醇可作为 HeLa 细胞凋亡检测单阳染色管的制备条件.

2.4 不同体积分数的乙醇对原代细胞凋亡的影响

经过处理的 C57 小鼠脾脏细胞中含有 51.3%的 B 细胞和 30.7%的 T 细胞(如图 4A),通过流式分选技术将原代细胞中的 B 细胞和 T 细胞纯化后,用不同体积分数的乙醇处理.1%乙醇处理 B 细胞 1 min,早期凋亡为 37.6%,晚期凋亡为 18.6%,其他体积分数处理后,晚期凋亡会相应增加(图 4B);不同体积分数的乙醇处理 T 细胞,早期凋亡在 6%左右,晚期凋亡在 7%左右(图 4C).如图 4D 所示,1%乙醇处理原代细胞 1 min,可作为凋亡检测单阳染色管的制备条件.



A:原代细胞B,T cell的分选;B:不同体积分数乙醇处理B cell的凋亡检测;C:不同体积分数乙醇处理T cell的凋亡检测;D:不同体积分数的乙醇诱导原代细胞的凋亡比例的均方差.

图4 不同体积分数的乙醇对原代细胞凋亡的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of ethanol on apoptosis of primary cells

3 结论与讨论

细胞凋亡是一种基本生物学现象,指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主地有序死亡,是调控生物体发育、进化、细胞更新和维持细胞内环境稳定的一种重要机制^[6-7]。凋亡过程的紊乱可能与许多疾病的发生有直接或间接的关系,如肿瘤、自身免疫性疾病等。

1992年FADOD报道在凋亡早期位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserin, PS)迁移至细胞外侧。Annexin V是一种具有很强的抗凝血特性的血管蛋白,与带负电荷的磷脂具高亲和力,利用其特性可以检测细胞早期凋亡^[8-9]。但坏死细胞PS亦暴露于外表并与Annexin V结合,因此使用Annexin V不能区分坏死或凋亡^[10-12]。7-AAD是一种非渗透性染料,可以通过坏死细胞的细胞膜与DNA结合,将坏死或者凋亡晚期细胞区分开来。Annexin V/7-AAD法检测细胞凋亡比较省时,结果可靠,是目前较理想的凋亡定量检测方法之一^[13]。

本文以细胞系和原代细胞为研究对象,用100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 、体积分数为4%多聚甲醛、75%乙醇和反复冻融方法处理后,发现细胞凋亡百分比达到95%左右,不适合单染管的制备。 H_2O_2 是一种强氧化剂,被世界卫生组织列为3类致癌物清单;多聚甲醛对呼吸道有强烈刺激性,可引起鼻炎、咽喉炎、肺炎和肺水肿;反复冻融时间长,操作烦琐。选取相对安全的乙醇进行不同体积分数刺激细胞凋亡。使用体积分数1%、5%、10%和20%乙醇处理后,发现293T细胞、RAW264.7细胞及原代细胞T和B细胞使用1%乙醇处理1 min,即可发生比较明显的凋亡效果;HeLa细胞需在20%乙醇处理1 min条件下,发生比较明显的凋亡效果,可能由于HeLa细胞是癌细胞,其细胞内的生理生化环境与正常细胞不同导致其对外部环境的敏感度与正常细胞不同,那么20%乙醇是否可以作为癌细胞的凋亡刺激条件有待进一步研究。

本研究发现,体积分数1%乙醇处理1 min和20%乙醇处理1 min分别为正常细胞和HeLa细胞刺激凋亡的最佳方案,为细胞凋亡流式单阳染色管的制备提供参考。

作者贡献:朱雪梅和李艳梅为共同第一作者。

参 考 文 献

- [1] THOMPSON C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. *Science*, 1995, 267(5203): 1456-1462.
- [2] 郭茜茜, 于广, 吴丹丹, 等. 细胞凋亡率检测方法的探索[J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(5): 425-429.
GUO Q Q, YU G, WU D D, et al. Exploration of techniques for comprehensive assessment of cell apoptosis rate[J]. *Immunological Journal*, 2015, 31(5): 425-429.
- [3] LEDRU E, LECOEUR H, GARCIA S, et al. Differential susceptibility to activation-induced apoptosis among peripheral Th1 subsets: correlation with Bcl-2 expression and consequences for AIDS pathogenesis[J]. *Immunol*, 1998, 160(7): 3194-3206.
- [4] MORI M, HATAKE K, TANAKA M, et al. CAM-cytarabine, aclarubicin plus macrophage colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukemia with trilineage dysplasia: usefulness of in vitro apoptosis in leukemic cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 42(3): 387-391.
- [5] ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4): 495-516.
- [6] 伊萍, 龚惠红, 明莹, 等. 地塞米松诱导小鼠脾淋巴细胞凋亡实验研究[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2015, 29(4): 277-279.
YI P, GONG H H, HU X, et al. Experimental Study on Apoptosis of Mouse Lymphocytes Induced by Dexamethasone[J]. *Journal of Hubei University of Science and Technology(Medical Sciences)*, 2015, 29(4): 277-279.
- [7] 刘童婷, 沈咏梅, 刘姝, 等. 美洲大蠊提取物诱导 Hct116 细胞凋亡的实验研究[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(1): 90-94.
LIU T T, SHEN Y M, LIU S, et al. Study of the apoptosis of Hct116 cell induced by *Periplaneta americana* extract[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2019, 35(1): 90-94.
- [8] 高超, 华子春. 细胞凋亡检测方法新进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(5): 564-569.
GAO C, HUA Z C. Progress on detection of apoptosis[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2011, 33(5): 564-569.
- [9] HUERTA S, GOULET E J, HUERTA-YEPEZ S, et al. Screening and detection of apoptosis[J]. *J Surg Res*, 2007, 139(1): 143-156.
- [10] 马云青, 李晓梅, 刘雪萍, 等. 槲皮素通过 G4 调控癌基因表达影响肿瘤细胞增殖与凋亡[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(12): 2319-2331.
MA Y Q, LI X M, LIU X P, et al. Quercetin regulates the expression of oncogenes through G-quadruplex and affects the proliferation and apoptosis of tumor cells[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2019, 41(12): 2319-2331.

- [11] MAECKER H T, TROTTER J. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity[J]. *Cytometry A*, 2006, 69(9):1037-42.
- [12] BANFALVI G. Methods to detect apoptotic cell death[J]. *Apoptosis*, 2017, 22(2):306-323.
- [13] RIEGER A M, NELSON K L, KONOWALCHUK J D, et al. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death[J]. *J Vis Exp*, 2011, 24(50):2597.

The methods of inducing apoptosis rapidly

Zhu Xuemei, Li Yanmei, Wei Lin

(Institute of Biology and Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: [Objective] Flow cytometry has the important application value to basic research, disease diagnosis, prognosis prediction and evaluation. The preparation of single positive staining tubes for compensation is a crucial step in the detection of apoptosis by flow cytometry. In this paper, the method of fast inducing apoptosis of different cell lines and primary cells was discussed. [Methods] (1) 293T cells were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 4% paraformaldehyde, 75% ethanol, and freezing/thawing for 15 minutes, 30 minutes and 1 hour, respectively. Annexin V-PE/7-AAD dual-label was used to detect the rate of apoptosis by flow cytometry. (2) 293T cells, RAW264.7 cells, HeLa cells, T cells and B cells were treated with 1% ethanol, 5% ethanol, 10% ethanol and 20% ethanol for one minute, and the apoptosis was detected by flow cytometry. [Results] (1) After treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 4% Polyformaldehyde, 75% ethanol and freezing/thawing, 293T cells were all apoptotic almostly. (2) 293T cells, RAW264.7 cells, T cells, B cells were treated with 1% ethanol for one minute, HeLa cells were treated with 20% ethanol for one minute, which resulted in significant apoptosis. [Conclusion] According to the growth characteristics of cells, 1%-20% of ethanol can be used to induce apoptosis, which is the best method to prepare single positive staining tube for detecting apoptosis by flow cytometry.

Keywords: apoptosis; flow cytometry; Annexin V-PE/7-AAD

[责任编辑 刘洋 杨浦]