



标记后转输的凋亡细胞流式细胞术体内示踪方法

凋亡是普遍发生于生物体任何组织细胞的一种基本现象。目前已知,许多正常的生长发育、生理过程以及病理状况都与组织细胞凋亡的发生有密切关系[1][2][3]。对于凋亡现象的实验观察目前常用的方法有:根据凋亡细胞表面细胞膜结构变化进行标记的方法,如Annexin V标记法;以及根据凋亡细胞内部出现一些特征性物质变化进行检测的方法,如Tunnel、PI、MTT[4]等方法。但以上方法学都是对凋亡现象进行验证和反映说明,均不适用于动态的凋亡细胞体内示踪观察。动态凋亡细胞示踪观察对于许多病理生理的研究均有重要价值,但国内目前对如何解决其中的技术问题尚未见研究报道。为此,本研究设计和探索了一种高效、稳定、方便的凋亡细胞标记与动态体内示踪技术,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物和材料

C57BL小鼠4~8周,雌性,BALB/C小鼠4周,雌性,均购自南方医科大学实验动物研究中心,SPF级饲养。标准饮食喂养。实验前观察1周。细胞培养基RPMI 1640、地塞米松、Collagenase IV、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒均购自Sigma公司。Vybrant™ CFSE Cell Tracer Kit购自Invitrogen Molecular Probes公司。胎牛血清购自杭州四季青公司。PBS购自武汉博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 分离并荧光标记脾淋巴细胞 颈椎脱臼法处死小鼠,无菌条件下取脾脏。以注射器芯轻轻研磨通过100目尼龙滤网。低渗裂解法除去其中红细胞,用含10%胎牛血清的完全培养基37℃孵育45 min贴壁法除去单核细胞后,获得脾淋巴细胞。将脾淋巴细胞 1×10^7 /ml用PBS洗两次后,以PBS重悬,加入终浓度为5 mol/L CFSE进行荧光标记。37℃避光孵育15 min后,4℃PBS洗2次。将此细胞以 1×10^6 /ml在完全培养基中37℃避光孵育30 min,后换成新鲜完全培养基。同时设立相同处理但未加入CFSE的对照处理组。

1.2.2 地塞米松诱导细胞凋亡 将 1×10^6 /ml脾淋巴细胞用含终浓度为1 mol/L地塞米松的完全培养基在37℃、50 ml/L CO₂条件下孵育培养3 h。

1.2.3 流式细胞仪检测 将诱导凋亡后的细胞用4℃PBS洗两次后,调整至 1×10^6 /ml,取500 μl凋亡细胞加入5 μl Annexin V-FITC和10 μl PI 避光室温孵育15 min后,置于冰上待测。流式细胞仪(EPICS ELITE, Coulter Electronics, USA)分别对CFSE标记比例、AnnexinV-FITC/PI标记情况进行检测。以每次至少10000个事件分析模式测定各样本内阳性标记细胞的比例。Coulter EPICS分析软件进行数据处理。

1.2.4 凋亡细胞输注 将标记细胞 2×10^7 /ml保存于pH 7.3、4℃PBS中,30 min内全部以500 μl/只经鼠尾静脉输注入受者小鼠,每个时间点每处理组3只小鼠。

1.2.5 细胞示踪检测 细胞输注后不同时间点,将每组小鼠以颈椎脱臼法处死并放血。取小鼠肝脏、脾脏置于0~4℃PBS中。切除小部分留作组织学检查荧光标记细胞分布,其余留作流式细胞仪检查分布比例。

1.2.6 流式细胞仪检测 将肝组织经0.02 % (w/v) Collagenase IV/DMEM 37 °C消化30 min后, 过100目滤网得到单个细胞悬液。脾细胞悬液获得方法见1.2.1。4 °C PBS洗2次后上流式细胞仪。CFSE标记淋巴细胞作为阳性对照, 未标记淋巴细胞为阴性对照。红细胞、细胞碎片通过forward和side散射分析设定门值排除。根据对照组情况, 设定适当门值。以每次至少10 000个事件分析模式测定各组织内CFSE阳性标记细胞的比例。Coulter EPICS分析软件进行数据处理。

1.2.7 组织学观察验证 将组织块以Jung Tissue Freezing Medium(Leica Instruments GmbH, Germany)包裹后投入液氮保存。进行检查时取出组织块, 逐步复温至-20 °C, 冰冻切片机(CM1850, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Germany)制成5 μm厚度冰冻切片, 空气干燥, 荧光显微镜(Leica DMIREZ, Germany)观察各组织内CFSE阳性细胞大致分布情况。

2 结果

2.1 CFSE标记比例

脾淋巴细胞经以上方法荧光染色标记后结果见图1。经流式细胞仪检测标记阳性细胞比例为(98.0 ± 1.9)% (图2)。

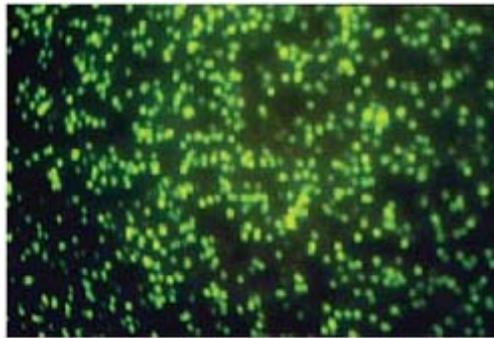


图1 CFSE荧光标记脾淋巴细胞

Fig.1 CFSE-stained spleen lymphocytes (Original magnification: ×100)

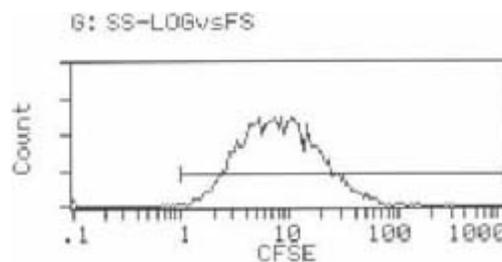


图2 流式细胞仪检测CFSE荧光阳性标记细胞比例

Fig.2 Flow cytometric analysis of the positive CFSE-labeled cell proportion in spleen lymphocytes

2.2 CFSE标记凋亡细胞的荧光衰减与外溢

为了保证以CFSE荧光标记测定示踪细胞方法的准确性, 我们又进行了以下实验: 将示踪脾淋巴细胞于CFSE荧光标记后30 min和12 h用流式细胞仪检测荧光强度的变化, 发现后者比前者仅下降了7.8%, 说明本实验采用的CFSE荧光标记方法不是可能会出现计数减少结果的根本原因; 将CFSE标记后淋巴细胞诱导凋亡, 与相同数量相同来源未标记未诱导凋亡淋巴细胞混合培养2 h, 以Annexin V-FITC/PI法测定凋亡, 流式细胞仪测定3组中CFSE荧光阳性与凋亡细胞的比例, 发现混合组中经换算CFSE荧光与凋亡双阳性细胞比例为34.5%, 与已测得的诱导凋亡组双阳性淋巴细胞比例32.3%基本一致, 说明CFSE荧光没有发生从凋亡细胞到其

他未标记细胞的外溢，进而可以认为CFSE荧光标记方法也不是可能出现的计数增多结果的根本原因。

2.3 CFSE标记对凋亡细胞诱导的影响

将CFSE标记组和空白标记对照组在预实验中得出的、相同的实验处理条件下诱导凋亡，再经Annexin V-FITC/PI 双染测定凋亡细胞的比例变化。我们发现CFSE标记对诱导凋亡的结果没有影响(图3)，同时还可以认为CFSE标记方法对凋亡细胞膜/核双标这种常用的检测方法也没有影响。

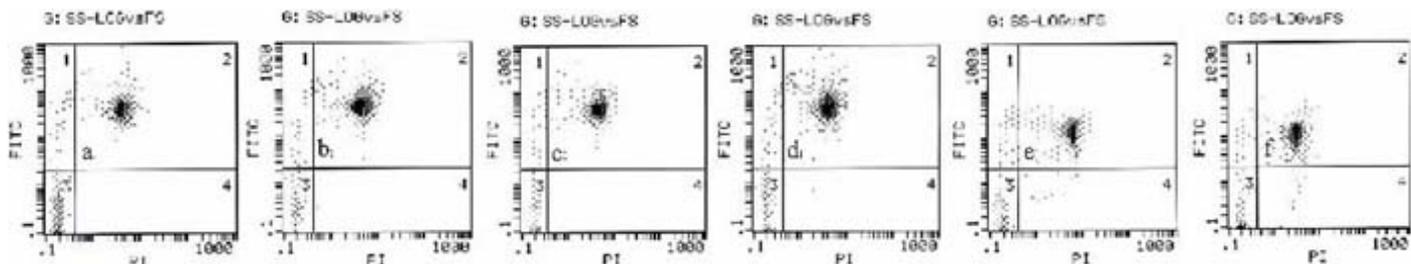


图3 CFSE对细胞凋亡诱导的影响

Fig.3 Effect of CFSE labeling on the induction of apoptosis

The former 3 figures show the flow cytometry results for cells with CFSE labeling, and the latter ones the results of the control cells.

2.4 流式细胞仪检测不同组织中CFSE标记凋亡细胞的动态分布

我们采取经尾静脉注射的方法将CFSE标记的凋亡细胞输入受体小鼠体内，分别于不同时间点，采集肝、脾组织样本，制成单个细胞悬液后进行流式细胞术检测CFSE阳性标记细胞的比例分布。30 min、90 min、12 h结果(其他数据未在文中显示)见图4~6。

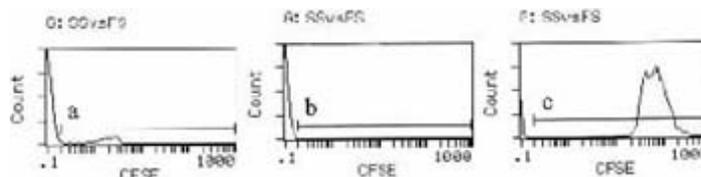


图4 供体凋亡细胞转输30 min后肝脏组织和脾脏组织中荧光细胞比例的流式细胞仪检查结果
Fig.4 FACS analysis of fluorescently labeled cell population in the liver and the spleen 30 min after adoptive transfer

a: The result by FACS in the liver is (17.3 5.9%); b: The result by FACS in the spleen is (0.1 0.2%); c: The fluorescent apoptotic lymphocytes are taken as the positive control (n=3)

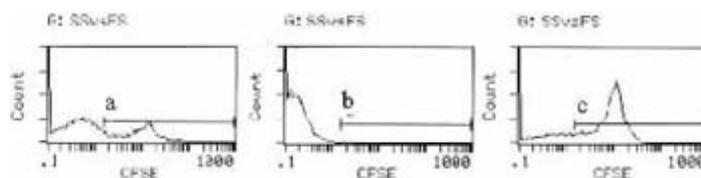


图5 供体凋亡细胞转输90 min后肝脏组织和脾脏组织中荧光细胞比例的流式细胞仪检查结果
Fig.5 FACS analysis of fluorescently labeled cell population in the liver and spleen 90 min after adoptive transfer

a: The result by FACS in the livers is (34.3 9.5%); b: The result by FACS in the spleen is (1.4 0.5%); c: The fluorescent apoptotic lymphocytes are taken as the positive control (n=3)

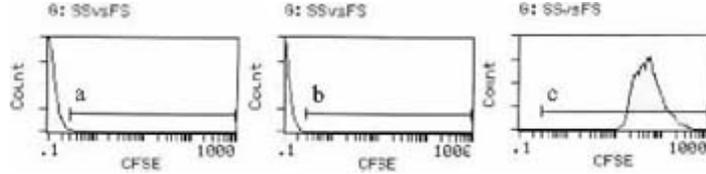


图6 供体凋亡细胞转输12 h后肝脏组织和脾脏组织中荧光细胞比例的流式细胞仪检查结果
Fig.6 FACS analysis of fluorescently labeled cell population in the liver and the spleen 12 h after adoptive transfer

a: The result by FACS in the liver is (1.4 0.5)%; b: The result by FACS in the spleen is (1.3 0.2)%; c: The fluorescent apoptotic lymphocytes are taken as the positive control (n=3)

2.5 组织学观察CFSE标记凋亡细胞的动态分布

为了验证流式细胞术检测结果的可靠性，我们同时采取组织样本进行组织学观察，发现组织学观察结果(图7、8)与流式细胞术检测结果有着良好的一致性。

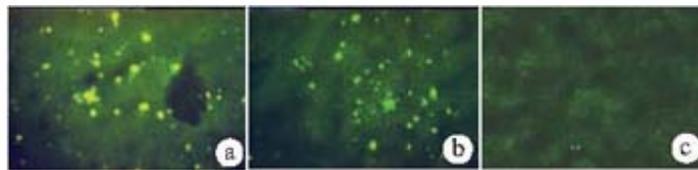


图7 荧光标记凋亡细胞转输后在肝脏组织中的分布
Fig.7 Distribution of fluorescent allogeneic apoptotic cells transferred at various time points in the liver (Original magnification: $\times 400$)
a: 30 min; b: 90 min; c: 12 h



图8 荧光标记凋亡细胞转输后在脾脏组织中的分布
Fig.8 Distribution of fluorescent allogeneic apoptotic cells transferred at various time points in the spleen (Original magnification: $\times 400$)
a: 30 min; b: 90 min; c: 12 h

3 讨论

关于细胞体内示踪的研究有不少，但绝大多数研究是针对于活细胞的研究，如干细胞[5]，[6]、淋巴细胞[7]、肿瘤细胞[8]，[9]等。其常采用的方法如荧光蛋白转染标记法[5]、菲力磁吞噬标记法[6]等不适用于“将死”的凋亡细胞示踪；细胞膜表型标记进入体内后会受到内环境的影响而变得不稳定；核素标记分析法采用放射性元素对细胞进行标记，其标记以及组织检测过程都必须在专门的同位素处理实验条件下进行[10]，在一般实验室中不常用；其他常见的方法还有性染色体原位杂交技术示踪法等。上述方法无论从标记方法还是从后期检测方法来讲都存在相当的复杂性，对经费方面的要求也较高。因此，既能稳定、高效地标记凋亡细胞，又能在示踪检测时采用可靠、高效、安全、相对较经济的检测方法，将对凋亡细胞体内示踪研究产生重要帮助和技术支持。关于凋亡细胞示踪的研究国内尚无文献报告。本实验尝试采用先细胞内部荧光标记，再诱

导细胞凋亡，然后用流式细胞术检测目标组织内凋亡细胞分布的情况。本实验选用CFSE染色作为凋亡细胞荧光标记方法。CFSE是一种双乙酸酯类荧光素，能够被动地透过细胞膜，进入细胞内部后被酯酶裂解由无色物质变成可以与胺类物质牢固结合的高荧光物质，并且结合后不易外漏。CFSE目前已被广泛用于活细胞分裂、传代和迁移的示踪研究。本实验中先在分离的活细胞中进行CFSE荧光染色后诱导已标记细胞凋亡。CFSE荧光染色方法较通常的抗体荧光染色简便易行，一般细胞培养实验室即可完成，并且染色效率高，这样可以保证凋亡细胞的阳性标示率。为了考察CFSE是否会迅速衰减，荧光减弱消失而造成细胞示踪检测的假阴性结果，我们对染色12 h后的细胞进行了流式细胞术检查，发现荧光变化很小。又将染色细胞与未染色细胞混合孵育观察，也未发现有荧光染色外溢现象。CFSE染色对凋亡细胞诱导结果也未产生影响。这些说明本实验采用的荧光染剂及其使用方法可以满足凋亡细胞体内标记示踪的要求。

我们选用流式细胞术对凋亡细胞的分布情况进行观察。已有的CFSE标记活细胞示踪研究发现CFSE可以在体内20余天后仍可以被检测到。根据凋亡细胞理论上会被迅速吞噬时间范围，涉及观察12 h内体内变化。观察组织选择了生物医学研究中经常会用到的肝脏和脾脏组织。流式细胞术检测后，又辅助以组织学冰冻切片进行观察。这样一方面验证了流式细胞术检测方法的有效性，另一方面对于需要用到不适于进行流式细胞术检测的组织也提供了一个研究方法。本实验体会，流式细胞术在检测组织内示踪细胞时有其独特的优越性，因为，可以通过将组织块分解成单个细胞悬液最后取样加于数个试管中就能够反映整个组织块中阳性细胞的分布，相对于大量的组织切片与观察，工作量较低，检测快，效率高，识别灵敏，并且可以进行较准确的相对定量比较。另外，本实验采用的示踪方法从染色到检测除了实现效率高，还具有费用经济的特点，实验条件容易满足。

参考文献：

- [1]Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response[J]. *Cell*, 2002, 111(7): 927-30.
- [2]Savill J, Fadok VA. Corpse clearance defines the meaning of cell death[J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 784-8.
- [3]Fadok VA, Bratton DL Henson PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(7): 957-62.
- [4]冯春琼, 马文丽, 宋艳斌, 等. 细胞凋亡的MTT染色法检测[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(3): 262-3.
- Feng CQ, Ma WL, Song YB, et al. Detection of cell apoptosis by MTT assay[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(3): 262-3.
- [5]Hennik P, Versteegen M, Bierhuizen M, et al. Highly efficient transduction of the green fluorescent protein gene in human umbilical cord blood stem cells capable of cobblestone formation in long-term cultures and multilineage engraftment of immunodeficient mice[J]. *Blood*, 1998, 92(1): 4013-22.
- [6]Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, et al. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2003, 107: 2290-3.
- [7]Graziano M, St-Pierre Y, Beauchemin C, et al. The fate of thymocytes labeled in vivo with CFSE[J]. *Exp Cell Res*, 1998, 240(1): 75-85.
- [8]Gao X, Cui YY, Levenson RM, et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(8): 969-76.
- [9]Moore A, Medarova Z, Potthast A, et al. In vivo targeting underglycosylated MUC-1 tumor antigen using a multimodal imaging probe[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 1821-7.
- [10]Kupiec-Weglinski JW, Austyn JM, Morris PJ. Migration Patterns of dendritic cells in the mouse[J]. *J Exp Med*, 1988, 167(2): 632-45.

