



电泳技术结合计算机凝胶图像系统检测细胞凋亡

细胞凋亡是当前细胞生物学的热点之一。凋亡细胞发生胞体皱缩、质膜起泡、染色质凝聚以及胞核呈半月形、DNA片断化,因此琼脂糖凝胶电泳呈梯状条带等特征性变化[1]。细胞凋亡检测方法有多种,如形态学观察[2]、DNA琼脂糖凝胶电泳[3]、流式细胞术[4]、TUNEL染色[5]等。不过上述方法仅适合细胞凋亡的定性及部分定量的检测,形态学方法虽然也可用来定量,但统计细胞数有限,且逐个计数细胞工作量非常大。因此,我们设计了本实验,拟利用琼脂糖凝胶电泳结合凝胶图像光密度分析系统(GDAS)[6]处理同时对凋亡细胞作定性和定量检测。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

1.1.1 实验动物 18~20 g雌性昆明小鼠,第一军医大学动物所提供。

1.1.2 实验试剂 碘化丙啶(propidium iodide, PI)、hepes液、巯基乙醇酸钠、地塞米松购自美国Sigma公司;RPMI 1640购自德国GIBCO BRL公司。TUNEL试剂盒、核糖核酸酶和蛋白酶K购自德国Boehringer Mannheim公司;牛血清购自杭州四季青生物材料厂。其他试剂均为进口试剂或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 按1次/d, 1 ml/次连续3 d于小鼠腹腔注射1%巯基乙醇酸钠,停1 d后,按鄂征等人的方法[7]取腹腔巨噬细胞(台酚兰吞噬实验显示99%为巨噬细胞),以 1×10^6 个/ml接种于6孔细胞培养板(Nunc, 丹麦),用含10%小牛血清的RPMI 1640培养于37℃,含5% CO₂孵箱(Quene System, 美国)内。12 h后加入大剂量地塞米松(1×10^{-4} mol/L)处理细胞[8][9][10]。

1.2.2 DNA琼脂糖凝胶电泳 按Messmer等[3]人的方法进行。电泳后的凝胶用GDAS作定量分析。

1.2.3 流式细胞术 按上述条件培养、处理的巨噬细胞,按每个样品 1×10^6 个,用细胞刮从培养板上刮下,离心收集。按Schmid方法[4]制样,PI染色,Elite流式细胞仪(COULTER, 美国)采集数据(激发光波长488 nm,发射光波长633 nm),并用Multicycle分析软件分析,通过计数凋亡区(亚二倍体区)细胞数量得出凋亡率。

1.2.4 计算机凝胶图象分析系统 GDS 7500 (UVP Ltd, 英国),紫外光(254 nm、302 nm)/可见光/背景光源;8~48 mm黑/白变焦摄像头;电耦合电子数字感应装置(Charge coupled device, CCD),灵敏度0.06 Lux/pt,象素分辨率NTSC 768×494;Image Store 7 500快速影像模/数转换存储装置;1 024×768逐行扫描监视器;256级灰阶感光热敏式视频打印机(Sony Ltd, 日本);PC486/66微机;GelBase/Gel Blot/Gel Excel分析软件包(UVP Ltd, 美国)。

2 结果

2.1 地塞米松诱导巨噬细胞DNA降解

DNA琼脂糖电泳结果如图1所示，大剂量地塞米松处理巨噬细胞0.5 h即可见到少量DNA条带，处理1.0 h后条带增多，呈现典型的梯状。随后，处理时间越长，梯状条带越明显。

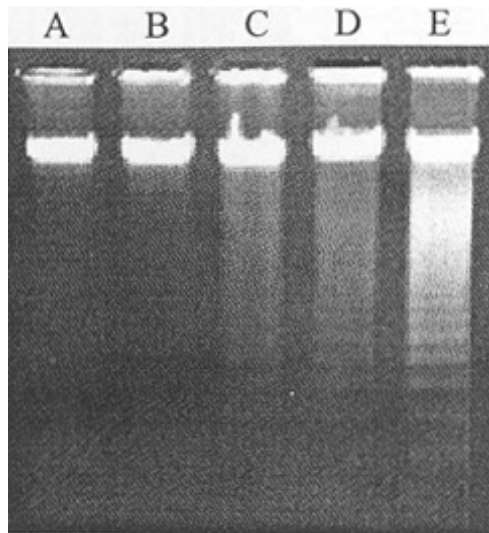


图1 地塞米松诱导巨噬细胞DNA降解

Fig.1 Dexamethasone induced a DNA ladder in macrophages

A: Control; B-E: The mouse peritoneal macrophages were incubated with dexamethasone for 0.5 , 1.0 , 2.0 and 4.0 h respectively)

2.2 地塞米松诱导巨噬细胞DNA降解的定量分析

凝胶图像光密度分析凋亡细胞DNA琼脂糖凝胶电泳结果见表1，地塞米松处理0.5、1.0、2.0、4.0 h后巨噬细胞片段化DNA的比例分别为16.37%、30.72%、35.87%、56.60%。

2.3 流式细胞仪检测巨噬细胞凋亡

用流式细胞仪分析经地塞米松处理的巨噬细胞，揭示生长周期出现典型的凋亡峰，地塞米松处理时间越长，凋亡峰越明显。统计分析得出地塞米松处理0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 h巨噬细胞的凋亡率分别为：18.0%、25.5%、36.3%、56.4%、76.1%(图2)。

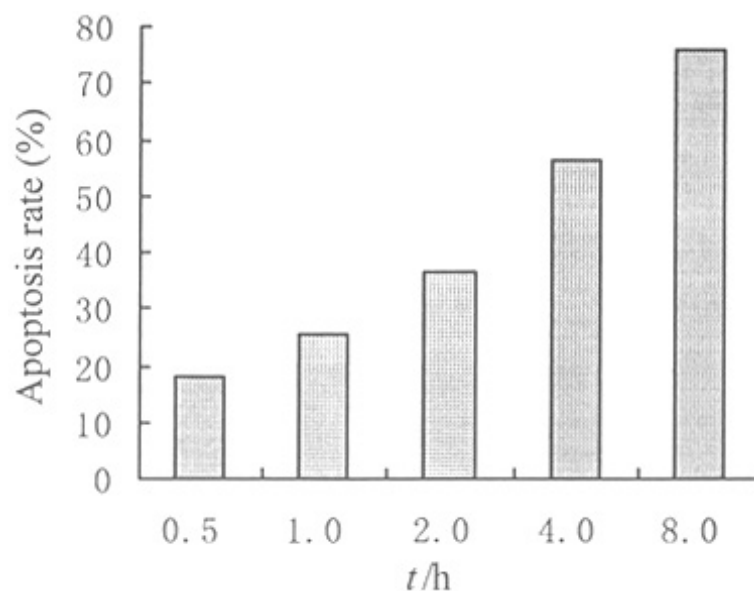


图2 流式细胞仪检测经地塞米松处理不同时间后巨噬细胞DNA的降解

Fig. 2 Time-dependent effects of dexamethasone on apoptosis rate of macrophages assayed by flow cytometry

3 讨论

本实验应用琼脂糖凝胶电泳结合GDAS法分析细胞凋亡发现GDAS检测的片段化DNA比例和流式细胞术得出的凋亡率基本一致,表明DNA琼脂糖凝胶电泳不仅是一种特异性的细胞凋亡生化定性研究方法,通过GDAS还可对细胞凋亡率作准确的定量分析。计算机凝胶图像定量分析细胞凋亡率是通过分析电泳后样品区带象素光密度,又将每一象素分成256个灰度级别,通过计算机对大量灰度值的累加计算比较而得到,其检测灵敏度可达0.02 ng。

表 1 GDAS 分析经地塞米松处理不同时间后巨噬细胞片段化比例

Tab.1 Time-dependent effects of dexamethasone on DNA fragmentation in macrophages

	Length of time of dexamethasone treatment (h)				
	0	0.5	1.0	2.0	4.0
Areas	15 645	15 663	16 574	15 982	16 398
DNA	/	2 564.0	5 091.5	5 732.7	9 281.3
Degradation of ratio (%)	0.00	16.37	30.72	35.87	56.60

常用的细胞凋亡检测方法仅适用于作定性或非准确定量检测。为实现同时对细胞凋亡作准确定量检测, Schmid[4]在原来用PI标记凋亡细胞DNA的基础上,根据凋亡细胞磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)由胞膜内层转移到胞膜外层这一特征性变化,同时对样品作PS标记后用流式细胞术检测。Gong等[11]先将凋亡细胞提取DNA用琼脂糖凝胶电泳作细胞凋亡定性检测,之后标记这些细胞的DNA作流式细胞术检测。两种方法都可实现同时对细胞凋亡作定性和定量检测,但前一种方法需对样品作双标,且PS标记用荧光Annexin-V费用大。后一种方法需对样品作电泳和流式细胞术两种检测,不但费时费力,且先将凋亡细胞提取DNA会影响流式细胞术检测结果。

采用琼脂糖凝胶电泳结合GDAS同时定性定量分析细胞凋亡机制,仅需将凋亡细胞提取DNA作常规电泳后对电泳凝胶作分析即可,方法简便且费用较低。由于只提取凋亡细胞样品DNA,所以对检测结果影响小,保证了结果的准确性和重复性。但在实验中我们也发现,电泳结果的好坏与凋亡率的准确性密切相关,所以须有好的电泳结果,电泳时间不足、太过或者凋亡率太低时,DNA梯状条带不明显,影响结果的准确。如果只用于定性检测细胞凋亡,则对电泳结果的要求较低,得出DNA的梯状条带即可。

综上所述,我们认为琼脂糖凝胶电泳结合GDAS是一种简便、低耗、准确易行的细胞凋亡定性定量检测方法。

(责任编辑:吴锦雅)

参考文献:

- [1] Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development[J]. Cell, 1997, 88(3): 347-54.
- [2] 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用研究方法[M]. 北京: 人民军医出版社. 1996. 172.
- [3] Messmer UK, Lapetina EG, Brune B, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds[J]. Mol Pharmacol, 1995, 47(4): 757-65.
- [4] Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, et al. A rapid method for measuring apoptosis

and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry[J]. J Immunol Methods, 1994, 170(2): 145-57.

[5] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992, 119(3): 493-502.

[6] 周俊岭, 杨德立, 方向东. 凝胶图像电密度分析系统在分子生物学研究中的应用[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18(1): 73-6.

[7] 鄂 征. 组织培养技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 185-9.

[8] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry[J]. J Immunol Methods, 1991, 139(2):271-9.

[9] Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. [J] Eur J Biolchem, 1996, 236(1): 1-26.

[10] Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes specific recognition and removal by macrophages[J]. J Immunol, 1992, 148(7): 2207-16.

[11] Gong JP, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry[J]. Anal Biochem, 1994, 218(2): 314-9.

参考文献:

[1] Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development[J]. Cell, 1997, 88(3): 347-54.

[2] 姜 泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用研究方法[M]. 北京: 人民军医出版社. 1996.172.

[3] Messmer UK, Lapetina EG, Brune B, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds[J]. Mol Pharmacol, 1995, 47(4): 757-65.

[4] Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, et al. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry[J]. J Immunol Methods, 1994, 170(2): 145-57.

[5] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992, 119(3): 493-502.

[6] 周俊岭, 杨德立, 方向东. 凝胶图像电密度分析系统在分子生物学研究中的应用[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18(1): 73-6.

[7] 鄂 征. 组织培养技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 185-9.

[8] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry[J]. J Immunol Methods, 1991, 139(2):271-9.

[9] Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. [J] Eur J Biolchem, 1996, 236(1): 1-26.

[10] Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes specific recognition and removal by macrophages[J]. J Immunol, 1992, 148(7): 2207-16.

[11] Gong JP, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry[J]. Anal

回结果列表