

电泳技术结合计算机凝胶图像系统检测细胞凋亡

赵清¹, 吴锦雅², 黄行许¹, 马晓冬¹, 鲍永耀¹, 周俊岭¹ (第一军医大学¹中心实验室, ²分子免疫研究所, 广东广州 510515)

摘要:目的 探讨检测细胞凋亡的新方法。方法 利用常规电泳技术结合计算机凝胶图像分析系统对经地塞米松处理的巨噬细胞做细胞凋亡的定性定量检测。结果 经地塞米松处理的巨噬细胞发生细胞凋亡, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳出现典型梯状条带, 同时用流式细胞术检测出现凋亡峰, 计算机凝胶图像光密度分析电泳结果, 地塞米松处理 0、0.5、1.0、2.0、4.0h 巨噬细胞的凋亡率分别为 0%、16.37%、30.72%、35.87%、56.60%, 与流式细胞术的检测结果基本一致。结论 琼脂糖凝胶电泳结合计算机凝胶图像分析系统是一种简便、低耗、准确的细胞凋亡定性定量检测新方法。

关键词: 细胞凋亡; 凝胶电泳; 计算机凝胶图像分析

中图分类号: R332 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2002)01-0045-02

Detection of apoptosis with gelelectrophoresis combined with computerized gelanalysis system
ZHAO Qing¹, WU Jin-ya², HUANG Xing-xu¹, MAXiao-dong¹, BAO Yong-yao¹, ZHOU Jun-ling¹
Central Laboratory¹, Institute of Molecular Immunity², First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore a new method for detecting cellular apoptosis. Methods Using routine electrophoresis assisted by computerized gel documentation analysis system (GDAS), apoptosis of the macrophage treated with dexamethasone was qualitatively and then quantitatively detected. Results Apoptosis occurred in the macrophage treated with dexamethasone, and DNA fragmentation of the apoptotic macrophage was visualized on 1% agarose gelelectrophoresis. The apoptosis rates as determined by computerized GDAS were consistent with the results obtained from flow cytometry that showed typical apoptosis peak. Conclusion Agarose gel electrophoresis assisted by computerized GDAS was relatively simple and less costly in qualitative and quantitative detection of apoptosis with precision.

Key words: apoptosis; gelelectrophoresis; computerized gel image analysis

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 18~20g 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; RPMI1640 购自德国 GIBCOBRL 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, 1ml/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 (台盼兰吞噬实验显示 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 RPMI1640 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^[8-10]。

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 计算机凝胶图像分析系统 GDS 7500 (UVP Ltd, 英国), 紫外光 (254 nm, 302 nm) / 可见光 / 背景

收稿日期: 2001-06-22

作者简介: 赵清 (1974-), 女, 河北衡水人, 2001 年毕业于第四军医大学, 本科, 在读硕士, 助理实验师, 电话: 020-85140114-89102

光光源 :8~48mm 黑 / 白变焦摄像头 ; 电耦合电子数字感应装置 (Charge coupled device, CCD), 敏感度 0.06Lux/pt, 象素分辨率 NTSC768×494 ; ImageStore 7500 快速影像模 / 数转换存储装置 ; 1024×768 逐行扫描监视器 ; 256 级灰阶感光热敏式视频打印机 (SonyLtd, 日本) ; PC486/66 微机 ; GelBase/GelBlot/Gel Excel 分析软件包 (UVPLtd, 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 0.5h 即可见到少量 DNA 条带, 处理 1.0h 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。

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

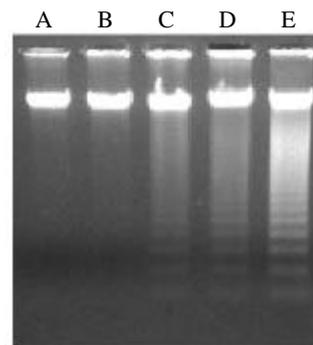


图 1 地塞米松诱导巨噬细胞 DNA 降解

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 4.0h respectively)

胶电泳结果见表 1, 地塞米松处理 0.5、1.0、2.0、4.0h 后巨噬细胞片段化 DNA 的比例分别为 16.37%、30.72%、35.87%、56.60%。

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	15645	15663	16574	15982	16398
DNA	/	2564.0	5091.5	5732.7	9281.3
Degradation of ratio (%)	0.00	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)。

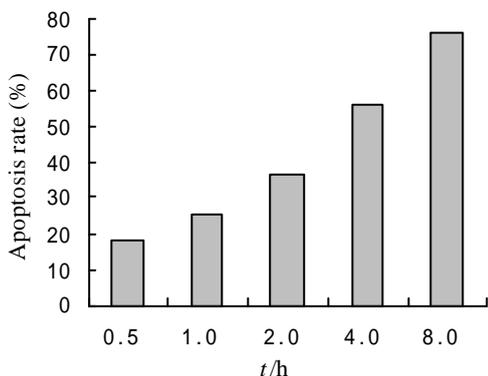


图 2 流式细胞仪检测经地塞米松处理不同时间后巨噬细胞 DNA 的降解

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 0.02ng。

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 (下转 50 页)

resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen [J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(4):70-9.

[2] 福田俊, 饭田治三·加龄に伴う雌雄ウツの骨代謝の変化と卵巣, 精巢摘除年齢による影響の差 [J]. *日骨形态志*, 1991, 1: 89-94.

[3] Chachra D, Lee JM, Kasra M, et al. Differential effects of ovariectomy on the mechanical properties of cortical and cancellous bones in rat femora and vertebrae [J]. *Biomed Sci Instrum*, 2000, 36: 123-8.

[4] 乔伟伟, 许兰文. 营养性骨质疏松动物模型的实验研究 [J]. *营养学报*, 1999, 21(2):240-1.

[5] Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1999, 68 (5-6):197-202.

[6] 刘浩宇, 刘锡仪. 新生期大鼠注射谷氨酸单钠后导致骨质疏松 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6(4):10-2.

Liu HY, Liu XY. Effects of mono-sodium glutamate administered neonatally on growth and development of bone in rat [J]. *Chin J Osteoporosis*, 2000, 6(4):10-2.

[7] Okawa A, Ikegawa S, Nakamura I, et al. Mapping of a gene responsible for twy (tip-toe walking Yoshimura), a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL) [J]. *Mamm Genome*, 1998, 9(2):155-6.

[8] Ohtsuki T, Furuya S, Yamada T, et al. Gene expression of non-collagenous bone matrix proteins in the limb joints and intervertebral disks of the twy mouse [J]. *Calcif Tissue Int*, 1998, 63(2): 167-72.

[9] Panula HE, Nieminen J, Parkkinen JJ, et al. Subchondral bone remodeling increases in early experimental osteoarthritis in young beagle dogs [J]. *Acta Orthop Scand*, 1998, 69(6):627-32.

[10] Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, et al. Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches [J]. *Biol Reprod*, 1999, 60(1):65-71.

[11] Akimoto M, Nagahata N, Fukushima K, et al. Gastric pH profiles of beagle dogs and their use as an alternative to human testing [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 49(2):99-102.

[12] Branemark R, Ohnell LO, Skalak R, et al. Biomechanical characterization of osteointegration: an experimental *in vivo* investigation in the beagle dog [J]. *J Orthop Res*, 1998, 16(1):61-9.

[13] Waters RV, Gamradt SC, Asnis P, et al. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model [J]. *Acta Orthop Scand*, 2000, 71(3):316-21.

[14] Bellino FL. Nonprimate animal models of menopause workshop report [J]. *Menopause*, 2000, 7(1):14-24.

[15] Kraeling RR, Barb CR, Rampacek GB, et al. Luteinizing hormone response to controlled-released estrone in estradiol benzoate primed ovariectomized gilts [J]. *Theriogenology*, 2000, 53(9): 1681-9.

[16] Reynolds LP, Kirsch JD, Kraft KC, et al. Time-course of the uterine response to estradiol-17beta in ovariectomized ewes: expression of angiogenic factors [J]. *Biol Reprod*, 1998, 59(3):613-20.

[17] Kimmel DB. Animal model for *in vivo* experimentation in osteoporosis research [C]. In: Marcus R, Feldman K, Kelsey J, eds. *Osteoporosis* [M]. New York: Academic Press, 1996. 671-96.

[18] 李良, 陈槐卿. 建立骨质疏松山羊模型初探 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4(2):82-95.

(上接 46 页)

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。

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 RAW264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds [J]. *Mol Phar-*

mocol, 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 Biochem*, 1996, 236(1):1-26.

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

[11] Gong JP, Tragano 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.

(责任编辑: 吴锦雅)