

流动式显微荧光光度术及其在生物医学中的应用

林 波 海

(中国科学院生物物理研究所)

流动式显微荧光光度术又称为流式细胞光度术或细胞分类术。是一种快速的细胞定量分析和分类的新技术。一秒钟可测定数千个细胞,能同时测定细胞的多种参数如 DNA, RNA, 及蛋白质含量、细胞体积和核质比等,与此同时还可按照不同参数对细胞进行分类,把不同类型的细胞分别收集于不同的容器,以供进一步的分析研究。这种技术极大地改变了显微分光度术的面貌,促进了生物学和医学研究。通过对细胞进行快速定量分析,识别正常细胞与癌细胞,为肿瘤的早期诊断提供手段。它可测定细胞表面抗体,新的病毒蛋白,研究细胞周期动力学,细胞核的代谢作用,酶的活性,细胞膜抗原(及其受体部位),进行染色体分析及血球的分类和自动计数等。该技术的最大特色是在细胞整体上进行分子水平的工作。它在肿瘤生物学、细胞生物学,免疫学,血液学和细胞遗传学等研究中是一个十分有用的工具。

流动式显微荧光光度术是七十年代发展起来的新技术,1975 年以来已召开过五次国际会议,发表了大量文章,是一个十分活跃和有发展前途的领域。在国外有越来越多的单位使用该技术。但在我国目前还是个空白。为了促进生物和医学研究工作的进展和赶超世界先进水平,我们应加速这方面的工作。下面把流动式显微荧光光度计的工作原理,主要部件及仪器的应用作一简要介绍。

一、工作原理与主要部件

流动式显微荧光光度计主要由流动室及供样系统、激光光源、信号检测、细胞分类和信号

处理及显示等单元组成。图 1 是仪器的原理图。

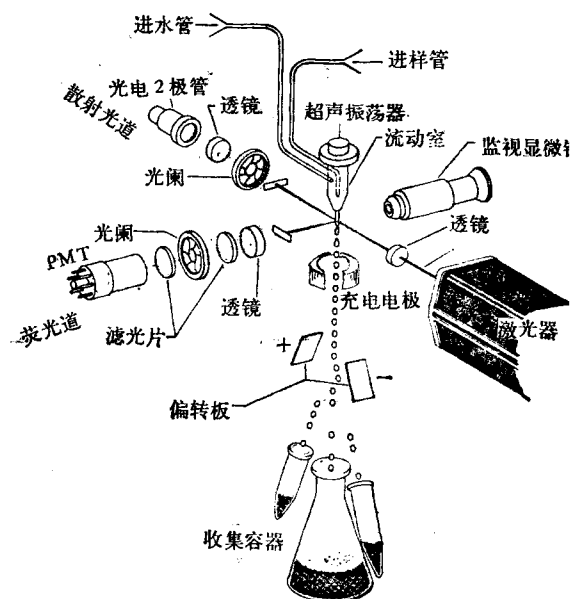


图 1 仪器的原理图

1. 流动室及供样系统

样品容器里的细胞悬浮液(用荧光探针标记了的细胞漂浮在适当的介质里)在泵或压缩气体的作用下以 10—12 米/秒的速度通过进样管进入流动室,同时储液容器里的生理盐水在压力作用下由进水管流进流动室,并在流动室(喷嘴)形成包围细胞悬液的鞘液。根据流体动力学原理,当进样管和进水管的内径和材料选择适当,并调节好液体的流动速度就能使细胞悬浮液和鞘液两者分层流动而不互相扰动。由于鞘液的作用,细胞被限制在流束的中心,以相同的速度顺序由流动室喷射出来。为了测定不

同大小的细胞,喷嘴直径可做成各种不同的尺寸,常用的为 50—200 微米。

2. 激光光源

由于单个细胞产生的荧光信号很弱,所以需要一个很强的激发光源,一般采用激光器作激发光源。其中氩离子激光器输出功率大,波长范围较适宜(主要有 488 和 514.5 毫微米谱线,大功率时紫外部分的 351.1 和 363.8 毫微米也有一定的强度),用得最多。为了保证仪器的测量精度,要求激光输出光能稳定。目前通过光反馈控制可使光能输出稳定度达到 0.2—1%。为了提高仪器的分辨率和激发光强度,激光光束由柱面透镜聚焦成椭圆形截面。

3. 信号的检测

流动式显微荧光光度计通过测定细胞的荧光,散射光和 Coulter 信号可同时获得细胞的几个参数。

荧光信号 由流动室喷出的细胞在激发光束的照射下产生荧光。荧光强度与细胞内各种组分如 DNA, RNA 和蛋白质等的含量成正比。所以通过测定荧光强度即可知道细胞内各种组分的含量。测定方式与普通荧光分光光度计一样,即在与激发光束成直角的方向上安装聚光镜收集荧光。荧光的波长比激发光的长,在荧光光路中安置适当的截止滤光片可阻挡激发光而只让荧光通过。为了同时得到细胞的两种荧光信号(可同时测定细胞的两种组分),在荧光光路中安装双色分光滤光片。这种滤光片采用多层介质膜系,通过控制膜层的厚度与层数,对某些波长的光有很强的反射能力,而另一些波长的光则能通过。根据样品的荧光特性选择不同的分光滤光片。实验时按照样品的激发光和荧光特性,选择两种合适的染料进行染色,两种染料应有相似的激发光谱而不同的发射光谱,用二个光电倍增管分别测定两种不同波长的荧光,用双参数多道分析器进行双参数分析,图 2 为白血细胞的双参数测定。荧光测定的灵敏度很高,有的仪器只要一个细胞中含有 10 个荧光素分子就能测出来。分辨率可达 5%,即两个细胞发出的荧光强度相差 5% 就能鉴别。

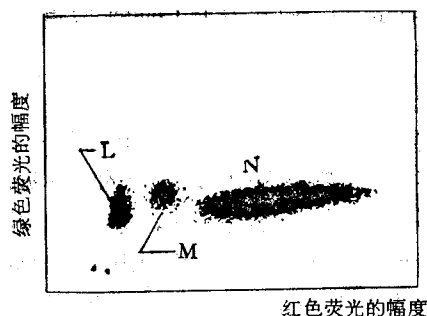


图 2 白细胞的双参数测定

染色溶液是 $4 \mu\text{g/ml}$ 吖啶橙,由左到右分别是淋巴细胞、单核白细胞和粒性白细胞,红细胞用这种染料染色不产生荧光。每个点代表一个白细胞

散射光信号 在流动式显微荧光光度计中散射光信号与荧光信号同样重要,测定细胞的散射光,可以获得有关细胞形态方面的许多信息,如测定细胞的小角光散射(小于 5°)就能知道细胞的大小,而从小角到宽角(0° — 30°)的光散射则能提供有关细胞的内部结构和表面情况的信息。散射光的波长与激发光的波长一样,通过适当的截止滤光片可滤除荧光信号而只测定散射光信号。散射光强度与细胞的大小有一定的关系。通过测定散射光强度可以测定细胞的体积,实验表明此种方法的测定结果与用 Coulter 体积测量法或用光学显微镜直接测定的结果是一致的。小角光散射信号较强,用光电二极管检测即可,在光电二极管前安装椭圆形光阑用以阻挡激发光束,防止激发光直接照到光电二极管而引起饱和。

Coulter 信号 1953 年 Coulter 发表了关于“流体中颗粒的计数法”一文,他介绍了一种计数和测量细胞大小的自动而可靠的方法。他让悬浮在导电溶液中的颗粒或细胞通过一个小孔(小孔直径与待测定的细胞同数量级)。颗粒或细胞的电阻必须与溶液不同,在小孔的二端安装两个电极并通以直流电,当一个细胞通过小孔时,二个电极间的导电截面发生变化,于是电极间的电阻也发生变化,产生一个电流脉冲,再把电流脉冲转换成电压脉冲,这种脉冲信号称之为 Coulter 信号,这些信号经过放大最后显示出细胞的数目和大小。有些流动式显微荧光

光度计的流动室中安装了 Coulter 装置,也可用来测定细胞的数目和大小。

4. 细胞分类

十九世纪物理学家 F. Savart 指出:一股小的液体射流,如果其喷嘴以适当的频率振动,该射流即被打断成连续的液滴,这些液滴非常均匀而有规则。细胞分类就是利用这一原理和静电偏转技术做成的。安装在流动室上的超声振荡器以 40—50 千赫的频率作轴向振动,把喷嘴射出的液流打断成均匀的小水滴,细胞悬浮液中的细胞也同时被分散在这些小水滴中。液流射出喷嘴后,在形成液滴之前,测量细胞的荧光和散射光信号,这些信号经过放大后进行比较,如果信号的幅度达到某个预先选定的阈值(阈值的选择根据所要分离细胞的种类和特性而定),即对应于所要收集的细胞,电路就产生一个电脉冲,该脉冲经过适当的延迟后(延迟时间要准确计算以确保所充电的细胞就是刚测定过的那个细胞),在这个被测定过的细胞刚要形成液滴时,通过充电电极对液流充电。此时含有细胞的液滴就带有电荷,根据不同的分选要求可以分别充以正电和负电,充了电的细胞通过一对偏转板(偏转板上加了数千伏的高压)产生偏转,于是带正电的细胞在静电场的作用下落入右边的容器,带负电的细胞则落入左边的。那些不满足预选标准的(如不含有细胞或含有不需要的细胞碎片,重叠或间隔太近不能分开的细胞等)液滴不被充电,按照原来的方向落入中间的容器,分类纯度可达 90—99%。

5. 信号的处理及显示

把细胞的荧光、散射光和 Coulter 信号输入到多参数信号处理单元。该单元的作用是以各种形式处理上述那些信号,根据实验要求可以分别选择单参数、参数比或双参数(如荧光-散射光,双色荧光, Coulter-荧光, Coulter-散射光等)。这些被处理的信号用多道脉冲幅度分析器显示成脉冲幅度频数分布,或用双参数脉冲幅度分析器同时对二种参数进行分析,得到双参数频数分布图,也可以用电子计算机进行信号处理。仪器最后以曲线或数字的形式在示

波器、记录仪、数字打印机或数码管上显示出细胞的各种参数。

二、在医学和生物学中的应用

流动式显微荧光光度术由于具有前面已讲过的许多优点而受到人们越来越多的注意,其应用范围也逐渐扩大。

1. 在肿瘤学中的应用

临床肿瘤细胞样品的检测 流动式显微荧光光度术,可作为某些肿瘤的诊断手段。目前通常是用传统的人工脱落细胞巴氏染色法涂片检查肿瘤,如宫颈的先兆损伤,发育异常和癌肿的鳞状细胞的妇科细胞学检查。利用流动式显微荧光光度计可以作宫颈癌细胞的自动甄别。另外还可用于分析痰样品作为肺的恶性和预恶性肿瘤诊断,用于分析尿样品,检查膀胱表皮细胞的癌肿。这方面的技术已取得部分的成功,然而样品的制备仍是一个困难的问题。目前用这种技术进行诊断还不完全成熟,但是其前景是令人鼓舞的。

白血病的诊断与治疗:目前诊断白血病的办法是抽骨髓化验,病人很痛苦。利用流动式显微荧光光度术只需要少量的血液试样就可很快辨别各种类型的白血病。其方法是将血液试样与荧光探针结合后,测定早期治疗前、早期治疗期间或恶化时的白血细胞的相对 DNA 含量。这与用 ^3H -胸腺嘧啶核苷标记细胞然后用放射自显影法所得到的结果是类似的。而流动式显微荧光光度术的优点在于它的分析速度快以及它能把含有 G_1 期 DNA 含量的细胞和 G_2 或 M 期的细胞区分开。由于这个方法迅速简便,医生可以每隔一定时间观察白血细胞的变化情况,从而帮助选择药物和观察其疗效。所以使用流动式显微荧光光度术对白血病的诊断与治疗作实质性的改进是很有希望的。

研究辐射和化学治疗剂的效应:流动式显微荧光光度术在研究辐射和化学治疗剂对细胞周期动力学的效应中是个很有用的手段。因为它是利用 DNA 含量的测定而不是细胞的穿越能力来说明细胞在细胞周期中的位置。辐射和

某些化学治疗剂能对细胞周期的进程起作用而引起细胞周期的再分配,使细胞阻断在细胞周期的不同时期,这种使细胞在某一时期积聚的现象称为细胞的同步。根据这种同步效应和肿瘤细胞对药物的周期敏感性可制订肿瘤治疗方案以达到最佳治疗效果。用流动式显微荧光光度术可以准确地快速地测定细胞同步的阶段和程度,这对于细胞周期动力学研究和肿瘤的治疗是很有意义的。

2. 在细胞生物学中的应用

定量的细胞周期分析 流动式显微荧光光度术的最广泛应用之一是细胞周期的动力学分析。细胞周期动力学是生物学的基本动力学过程之一,是细胞生物学的一个重要课题。大家知道,细胞周期可分为 G_1 (DNA 合成前期), S (DNA 合成期), G_2 (DNA 合成后期)和 M (有丝分裂期)。细胞群体典型的 DNA 分布如图 3 所示,它有两个峰,大峰是 G_1 期的细胞,小峰是 G_2 M 时期细胞 (G_2 与 M 期含有相同的 DNA,它们的 DNA 含量是 G_1 的二倍),两者之间是 S 时期细胞。过去用放射自显影测定标记指数,用细胞光度计测定单个细胞 DNA 含量,由于

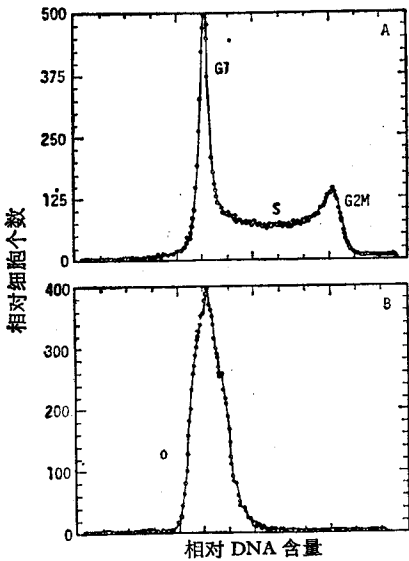


图 3 上图为非同步指数生长的 CHO 细胞株细胞群体的 DNA 分布。下图为晚 G_1 和早 S 期

测定的细胞数量少,统计学精度不高,测定周期长,不能及时监视病情的发展。现在利用流动式显微荧光光度术可以很快测定细胞群体中每个细胞的 DNA 含量,画出细胞群体中 DNA 含量的直方图,算出细胞周期中各时期细胞的比例。该技术对细胞动力学分析是一个很大的促进,它第一次快速而准确地把动力学分析扩展到日常的实验室研究和临床工作中去。

3. 在免疫学中的应用

研究免疫反应中各种淋巴细胞之间的相互作用及淋巴肿瘤细胞的遗传学和生物学,需要一种分离各类淋巴细胞的工具。大家知道,淋巴细胞存在于脾脏,淋巴结、骨髓、胸腺和血液中,它是人体防止感染的主要保卫者,也与器官移植的排斥性有关。淋巴细胞可分为几个明显的亚群(主要有 T 细胞和 B 细胞),但构造十分相似,只有表面微小的差异,而它们的功能却不一样。利用流动式显微荧光光度术可以识别 T 细胞与 B 细胞并把它们分离开,并直接检测其表面的某些特性。分离后的细胞仍然是活的,适于研究它的生物功能。利用该技术可以测定免疫反应细胞的细胞化学性质,研究不同类型的淋巴细胞在免疫反应中的作用。

利用流动式显微荧光光度术也可研究病毒对细胞产生的深奥而有趣的作用。这种现象的研究对细胞生物学,致癌作用,临床诊断和治疗是十分重要的。

流动式显微荧光光度术在生物学和医学中的应用目前仅仅是个开端,今后凡是能分离的细胞都可用它进行分析和分离。它是一个很有发展潜力的新技术。

参 考 文 献

[1] Myron, R. et al.: *Flow Cytometry and Sorting*, Wiley Medical 1979.
[2] Steinkamp, J. A. et al.: *Rev. Sci. Instrum.*, 44, 1301, 1973.
[3] Leonard A.: *Sci. Am.*, 234, 108, 1976.
[4] Richard, T. et al.: *Biophys. J.*, 23, 1, 1978.

[本文于 1981 年 7 月 26 日收到]