

instructive suggestions to the mechanisms of replication initiation in eukaryotic systems and maneuvers with which the initiation are concerted with cell cycle. Many functions of protein factors involved in initiation of replication in eukaryotic cells are being clarified. And the cycle-dependent regulatory pattern is gaining experimental supports. Two regulation points in

cell cycle for DNA replication initiation and the roles played by cyclins are mainly introduced. The relationship between carcinogenesis and the disturbance of replication-cycle is also discussed at appropriate point, which hints at the significance of initiation regulation.

Key words replication initiation, SV40, cyclin, chromatin state

流式细胞术在细胞凋亡检测中的应用

张群洲 周克元 凌光鑫

(广东医学院医用生化研究所, 湛江 524023)

摘要 凋亡是细胞受一些生理或病理信号刺激时所发生的一种程序性死亡过程。近年来, 有关肿瘤细胞凋亡的研究已成为一个新的研究热点。围绕凋亡细胞出现的典型的形态变化及生化改变, 建立了一些检测分析凋亡细胞的方法。文章着重概述了流式细胞术 (FCM) 在细胞凋亡研究中的应用, 尤其是 NT 法、TdT 法及 SBIP 法等新方法的价值。

关键词 细胞凋亡, 流式细胞术, 末端脱氧核苷酰转移酶法, 缺口平移法

多细胞生物的细胞死亡有两种不同的方式: 凋亡 (apoptosis) 和坏死 (necrosis)。细胞凋亡不同于坏死, 是细胞在受一定生理或病理信号刺激后主动参与并遵循一定程序的细胞自杀机制。近年来的研究发现, 细胞这种主动死亡过程是受基因调控的, 其中与细胞凋亡关系密切的基因主要有 bcl-2 基因, P₅₃ 基因, c-myc 基因^[1]。既然细胞凋亡是由基因控制的一种程序性细胞死亡过程, 它与细胞坏死在形态及生化改变方面都存在显著差别。主要表现在: a. 在凋亡的早期阶段有染色质浓缩及片段化现象, 同时伴有明显的细胞体积减小, 内质网松弛及细胞器聚集等。b. 尔后, 凋亡细胞内形成由完整胞浆膜包绕的致密小体, 即所谓的凋亡小体, 该结构中含有一些细胞器及片段化的染色质。c. 胞浆膜结构依然完整, 与活细胞一样, 台盼蓝试验拒染。这些典型的形态改变是由一系列特殊的生化事件所致。其中

生化改变的核心是细胞内源性内切酶被激活, 引起寡核小体片段的形成^[2]。另外在多数凋亡细胞的早期生化事件中还包括细胞内 Ca²⁺、Na⁺、K⁺、H⁺ 浓度及线粒体跨膜电位的变化等^[3,4]。

针对凋亡细胞特殊的形态及生化改变特点已建立了许多检测分析凋亡细胞的方法^[5]。这些方法包括: a. 利用各种显微镜技术如光学显微镜、电子显微镜、相差显微镜、共焦显微镜等以观察凋亡细胞的典型形态变化^[6,7]。b. 检测凋亡细胞中 DNA 断裂或 DNA 片段的方法如琼脂糖凝胶电泳^[6]; 同位素标记法测定 DNA 次级片段^[8,9]; 碱洗脱法测定 DNA 单链断裂等^[8]。c. 测定凋亡发生中起重要作用的内源性内切酶活性的方法^[10]。d. 测定凋亡细胞的多聚 ADP 核糖化酶活性的方法^[6,11]。近年来随着流式细胞术 (flow cytometry,

FCM) 的应用领域的扩展, 给检测凋亡细胞提供了一种更加有效的手段^[12]. 它不仅快速、简便, 还具有如下优点: 检测所需细胞少, 能直接客观地反映细胞内外的变化. 现已有许多荧光探针可用于分析凋亡细胞的生理、增殖与分化等的变化. 另外, FCM 对同一样品可同时进行多参数分析, 快速而详尽地对细胞群体进行测定, 把活细胞, 凋亡细胞及坏死细胞很容易地区别开来^[13]. 现在在 FCM 基础上建立的检测分析凋亡细胞的有关方法概述如下:

1 凋亡细胞 DNA 含量的 FCM 分析

取凋亡诱导剂处理一定时间后的细胞 (1×10^6), 经 70% 乙醇固定后, 用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色 (50 mg/L). 用 FCM 测定细胞 DNA 结合 PI 的荧光强度^[14]. 在 DNA 的荧光直方图中, 凋亡细胞表现为 G_1/G_0 峰前的低宽的亚二倍体峰, 并可得到凋亡细胞的百分比. 此法具有快速简便的特点, 目前在凋亡的研究及检测中应用最为广泛^[15]. 最近国内学者用此研究了乐伯诱导 HL-60 细胞产生凋亡的情况. 结果发现, 该药 (< 20 mg/L) 作用 12 h 后开始有凋亡细胞出现, 约 $(5.46 \pm 0.26)\%$, 到 24 h 凋亡细胞百分数达到高峰 $(43.32 \pm 1.41)\%$ ^[16].

2 凋亡细胞的 FCM 多参数分析

发生凋亡的细胞因体积减小, 胞浆及染色质浓缩等, FCM 测定时表现为前向角散射光 (forward light scatter, FSC) 强度的减弱及侧向散射光 (side light scatter, SSC) 强度的增加, 这样在 FCM 的 MapContour 图上, 表现为凋亡细胞离开正常细胞所处的区域. 另外, 许多研究表明, 细胞发生凋亡有赖于某些大分子物质尤其是蛋白质的合成, 用蛋白质合成抑制剂放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 可阻止凋亡的发生. 用 FCM 可同时测定凋亡细胞的 FSC/SSC 及 DNA/蛋白质, 进行双参数或多参数分析, 以研究不同凋亡诱导剂的作用机制^[3, 15].

3 NT 分析法

NT 即缺口平移 (nick translation) 的简称, 其基本原理是: 凋亡细胞产生 DNA 断裂后, 加入外源性的 dATP、dGTP、dCTP 和生物素标记的 dUTP (biotin-dUTP), 在外源性 DNA 聚合酶的作用下沿 DNA 断裂末端掺入. 据掺入的 b-dUTP, 用 FCM 即可检测出凋亡细胞^[17].

4 原位 TdT 检测法

其全称是原位末端脱氧核糖苷酰转移酶分析法 (terminal deoxynucleotidyl transferase assay *in situ*), 基本原理是: 经甲醛固定后的细胞中加入外源性的 TdT 和 b-dUTP 孵育一定时间, DNA 断裂处的 3'-OH 末端作为 b-dUTP 掺入的引物而被 b-dUTP 所标记. 由于凋亡细胞中含大量这样的 DNA 断裂末端, 可获得很强的 b-dUTP 标记, 故用 FCM 很轻易就能将凋亡细胞区分出来. 此方法非常灵敏, 可在凋亡的很早时期细胞出现典型的形态变化前就检测到 DNA 断裂^[15, 18].

NT 法和 TdT 法检测凋亡有几个优点: a. 反应是直接标记 DNA 断裂的 3'-OH 末端, 从而可在分子水平上鉴别 DNA 断裂. b. 两种方法检测凋亡细胞均有较高的特异性. 坏死细胞在 NT 或 TdT 反应中被 b-dUTP 标记的程度较凋亡细胞至少要低一个数量级. c. TdT 或 NT 法可早期反映凋亡细胞中 DNA 断裂, 即在 DNA 含量明显减少或核出现明显的片段化之前就可检测到 DNA 断裂. 如放射诱导凋亡后 2 h 就可检测到 2% ~ 10% 的缺口染色阳性细胞, 而此时用 DNA 琼脂糖凝胶电泳尚不能显示 DNA 片段化现象^[17]. d. 除了检测 DNA 断裂外, 两法还可同时测定 DNA 的含量, 从而把凋亡与细胞周期或 DNA 倍体分析结合起来分析, 以确定凋亡发生的周期时相. 快速的 FCM 可在短时间内获得每个样品中成千上万个细胞的信息. e. TdT 和 NT 反应可在固定细胞上进行, 在乙醇中放置时间的长短对分析毫

无影响. 因此可收集大量的临床标本来分析肿瘤细胞对不同药物诱导凋亡的反应程度, 便于在临床研究中应用. 但是, 两种方法相比较, TdT 法又优于 NT 法. TdT 法反应快, 最大标记出现早, 且荧光强度衰减的程度小, 检测时 TdT 的信噪比较 NT 法强. 总之, TdT 法的灵敏度较 NT 法高出约 10 倍^[18].

5 SBIP 法

SBIP 即光解诱导链断裂 (strand breaks induced by photolysis) 的简称, 基本原理是: DNA 复制细胞即增殖细胞可摄取 BrdUrd (5-bromide-2'-deoxyuridine) 或 IdUrd (5-iodo-2'-deoxyuridine) 掺入到 DNA 中. 在紫外光的照射下则选择性引起 BrdUrd 或 IdUrd 掺入部位的断裂. 再在外源性的末端脱氧核苷转移酶的作用下, 用地高辛或生物素标记的 dUTP 就可对光解作用所形成的 DNA 单链断裂处 3'-OH 末端进行标记. 在前述 TdT 法中, 这一反应也用于特异性地识别凋亡细胞中因内切酶活化所形成的 DNA 断裂. 那么怎样才能把两类 DNA 断裂区别开来呢? 凋亡细胞中的 DNA 断裂多属双链断裂, 形成的片段分子质量小, 易于从细胞中提取出来^[19]; 光解作用引起 DNA 断裂则以单链断裂为主, 这样的高分子质量 DNA 组分不易被提出. 通过用不同浓度的甲醛 (0.1% ~ 1.0%) 实验, 发现用 0.25% ~ 0.3% 的甲醛处理细胞 15 min, 最适合提取凋亡细胞中低分子质量的 DNA 组分, 同时又可把细胞碎片区别开来. 在此条件下, 光分解的 DNA 保持稳定. 从而用 FCM 就很容易把增殖性细胞 (BrdUrd 掺入, 然后发生光解) 和凋亡细胞区分开来. 用此法可检测到一个细胞的基因组中不到 1% 的复制^[20].

以往已建立了许多分析细胞增殖情况的方法, 要么直接测定 DNA 复制细胞的比例, 要么通过测定一种或更多种与细胞增殖有关的蛋白质 (如 Ki-67, PACN) 来间接反映细胞的增殖情况. 这些方法在实验研究及临床研究中已较常用, 并确定了许多有价值的增殖性标记

物. 但是却忽略了对肿瘤组织中细胞死亡的研究. 至今用于鉴定凋亡细胞的方法仍然寥寥无几^[12]. 传统分析 DNA 复制的方法, 主要是用抗体来检测胸苷类似物 BrdUrd 掺入到 DNA 中的情况. 这种方法事先需要用热或酸对 DNA 进行变性处理, 以使 BrdUrd 表位易于和其抗体结合. 此法不宜于凋亡细胞的检测, 因热或酸处理可引起部分正常细胞的 DNA 断裂而干扰检查结果. SBIP 法则将细胞增殖性标记和死亡标记结合起来, 即可在一次性测定中同时测定 DNA 复制细胞 (S 期细胞)、非复制性细胞和凋亡细胞. 因此该法可用于肿瘤的预后分析, DNA 复制细胞与非复制细胞对不同凋亡诱导剂应答反应差异的分析; 还可用于研究药物的细胞毒作用及其与细胞周期的关系. 更为重要的是, 用此法检测 DNA 复制细胞时, 不必事先对 DNA 进行变性处理, 从而可以同时检测那些易受 DNA 变性条件影响的细胞表面标志及其他细胞特性. SBIP 法的灵敏度不亚于传统的 BrdUrd 掺入单抗法^[20].

用流式细胞术检测细胞凋亡除上述方法外, 还可用于测定凋亡细胞内 Ca^{2+} 、 H^{+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 及线粒体跨膜电位的变化, 以及与细胞凋亡有关的基因产物如 p53 蛋白的检测.

总之, 凋亡作为细胞的一种程序性的自杀机制, 已越来越引起人们的兴趣和关注. 它不仅参与肿瘤细胞增殖和死亡的调节, 而且也有可能是肿瘤细胞产生耐药性的机制之一^[10]; 许多抗癌药物也是通过诱导肿瘤细胞发生凋亡而产生抗癌作用的, 因此凋亡细胞的检测对判断药物疗效及肿瘤的预后具有很大的价值. 这样寻找一种简便, 快速而又有效的检测肿瘤细胞凋亡的方法就显得非常重要. 流式细胞仪作为一种新兴的手段, 正好满足了此种要求, 因此它在肿瘤细胞凋亡的实验研究及临床研究中都具有广阔的应用前景.

参 考 文 献

- 1 Jean M. Science, 1993; 259: 760
- 2 Wyllie A H, Morris R E, Smith A L *et al.* J Pathol, 1984;

- 142: 67
- 3 Giuseppe B, Federica D, Gabriella B *et al.* Exp Cell Res, 1995; **217**: 410
 - 4 Jiang S, Chow S C, Nicotera P *et al.* Exp Cell Res, 1994; **212**: 84
 - 5 Deckers C L P, Lyons A B, Samuel K *et al.* Exp Cell Res, 1993; **208**: 362
 - 6 Tanaka Y, Koichiro Y, Motokatsu T *et al.* Exp Cell Res, 1994; **213**: 242
 - 7 Tounekti O, Belehradek J, Mir JR L M *et al.* Exp Cell Res, 1995; **217**: 506
 - 8 Bertrand R, Solary E, Jenkins J *et al.* Exp Cell Res, 1993; **207**: 388
 - 9 Xu H M, Tepper C G, Jones J B *et al.* Exp Cell Res, 1993; **209**: 367
 - 10 Evelyne S B J, Sablon A J. Exp Cell Res, 1995; **218**: 201
 - 11 Yoshihama K, Itaya A, Hironaka T *et al.* Exp Cell Res, 1992; **200**: 126
 - 12 Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del B G *et al.* Cytometry, 1992; **13**: 795
 - 13 Lyons A B, Samuel K, Sanderson A *et al.* Cytometry, 1992; **13**: 809
 - 14 Nicoletti I, Miglirati G, Pagliacci M *et al.* J Immunol Methods, 1991; **139**: 271
 - 15 Wjciech G, Gong J, Ardelt B *et al.* Cancer Res, 1993; **53**: 3186
 - 16 殷玉志, 陈姗姗. 北京医科大学学报, 1995; **27**: 173
 - 17 Li Z, Chen W, Richard G M *et al.* J Immunol Methods, 1995; **181**: 17

- 18 Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z *et al.* Cancer Res, 1993; **52**: 1945
- 19 Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z *et al.* Anal Biochem, 1994; **218**: 314
- 20 Xun Li, Traganos F, Darzynkiewicz Z *et al.* Cancer Res, 1994; **54**: 4289

Application of Flow Cytometry in the Study of Cell Apoptosis. Zhang Qunzhou, Zhou Keyuan, Ling Guangxin (*Institute of Medical Biochemistry of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*).

Abstract Apoptosis is a programmed cell death which can be triggered off by cells in response to various physiological and pathological stimuli. Recently, studies on apoptosis of tumour cells have attracted much attention. Some methods to detect apoptotic cells have been developed on bases of the typical morphological and biochemical changes during apoptosis. The application of flow cytometry (FCM) in the study of cell apoptosis, especially the value of some new methods based on FCM is described in detail.

Key words apoptosis, flow cytometry, nick translation, terminal deoxynucleotidyl transferase

基因打靶及其应用

王向东 童坦君¹⁾

(北京医科大学生物化学及分子生物学系, 北京 100083)

摘要 用活细胞染色体 DNA 可与外源性 DNA 同源序列发生同源重组的性质, 达到定点修饰改造染色体某基因的目的, 此法称基因打靶. 基因的同源重组是较普遍的生物现象, 其分子机理尚未阐明, 但活细胞内确有一酶系可使 DNA 的同源序列在细胞内发生重组, 这一事实已无可争辩. 此事实为基因打靶的理论基础. 基因打靶技术操作的关键是建立一含筛选基因的重组载体, 并有效地把它转入细胞核内. 基因打靶命中的细胞可稳定遗传. 基因打靶在改造生物品种, 一些复杂生命现象 (如发育的分子机制等) 及临床理论研究均有广阔的前景.

¹⁾通讯联系人. 收稿日期: 1995-11-27, 修回日期: 1996-03-11