

研究工作

影响流式细胞术定量分析细胞 DNA 荧光强度的几个因素

左连富 刘洪祥 郭建文 林元珠

(河北省肿瘤研究所, 石家庄)

提 要

本文对影响流式细胞术定量分析细胞 DNA 荧光强度的四种因素进行了研究, 结果表明, (1) 醛类固定剂对细胞 DNA 荧光有显著影响, 乙醇是较好的固定剂。(2) 样品之间细胞数相差 3 倍以上对荧光测定有影响。(3) 细胞在乙醇中固定的时间长短对荧光影响不明显, 但 CV 值增大。(4) EB 为 $10-20 \mu\text{g/ml}$ 、PI 为 $50 \mu\text{g/ml}$ 是最佳荧光染色浓度。

流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 是一种快速定量分析细胞的新技术, 已广泛应用于生物医学领域的研究^[1], 该技术在测定细胞 DNA 荧光的过程中, 常受到一些非随机因素的影响, 而出现测定值的误差。为了避免错误测定, 本文将探讨细胞固定剂、每毫升染液中细胞总数、细胞在固定剂中的时间、荧光染色液浓度等因素对流式细胞术定量检测的影响。

材 料 和 方 法

一、内标准样品鸡红血球的制备 采用肝素抗凝的鸡全血, 以磷酸缓冲液 (pH7.4) 漂洗三次, 去上清后, 加入 1% 戊二醛缓冲液固定 (室温下) 48 小时, 去固定剂, 再以 PBS 液漂洗二次, 分装保存于 $0-4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

二、实验样品的制备 采用正常脾组织, 将脾组织剪为匀浆, 以人淋巴细胞分离液将淋巴细胞分离出来, 作为实验样品。为使实验样品细胞数精确, 采用等体积采样, 并进行严格的细胞计数, 使 $400 \mu\text{l}$ 悬液中含细胞数为 1×10^6 。

1. 测定固定剂对细胞 DNA 荧光强度影响的样品的制备 采用常用的三种固定剂: 即

70% 乙醇, 1% 戊二醛, 10% 甲醛, 并以新鲜不固定的细胞样品作对照, 每种固定剂制备 3 个样品 (细胞被固定 5 天上机分析), 每份样品细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

2. 每毫升荧光染液中细胞总数的影响 采用 5 种细胞浓度, 分别为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, $2 \times 10^6/\text{ml}$, $3 \times 10^6/\text{ml}$, $4 \times 10^6/\text{ml}$, $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。每种细胞浓度制备 3 个样品, 均为不固定的细胞样品。

3. 细胞在固定剂中的时间影响 以 70% 乙醇作为固定剂, 细胞在固定剂中的时间分别为 1, 5, 10, 20, 30 天, 样品被固定后放入 $0-4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。每个时间组制备 3 个样品, 每份样品的细胞数为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 并以不固定细胞样品作对照。

以上三种实验样品的细胞 DNA 荧光染色均采用碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI)。染液的配制为 PI $50 \mu\text{g/ml}$, RNaSe $10 \mu\text{g/ml}$, Triton-X-100 1.0%。

4. DNA 荧光染液浓度的影响: 采用常用的两种荧光染料 PI、EB (Ethidium Bromide), 分别用 6 种浓度, 即 $5 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $20 \mu\text{g/ml}$,

ml, 50 μ g/ml, 70 μ g/ml, 100 μ g/ml (各浓度染液中仍含有 RNase 10 μ g/ml、Triton-X-100 1.0%), 每种浓度各制备 3 个样品, 每份样品细胞数为 1×10^6 /ml, 采用不固定细胞样品。

三、细胞 DNA 荧光染色和 FCM 检测方法
染色前, 将实验样品的固定剂除去, 以生理盐水漂洗 2 次, 在每个样品中加入相同数量的鸡红血球作内参标准, 与实验样品同步染色, 加入染液 1.0ml, 在 0—4℃ 冰箱中染 30 分钟上机分析。使用美国 B. D 公司生产的流式细胞仪 (FACS420 型), 以氩离子激光器作光源, 功率为 300mW, 波长为 488nm, 光电倍增管电压为 650 伏, 电子信号线性放大为 4×0.5 , 细胞 DNA 发出的荧光信号经光电倍增管接收转换为电信号送到多道 (0—255 道) 脉冲分析器上显示, 所测数据由计算机记录并打印, 以备分析。每个样品检测 1.5—2.0 个细胞, 调流式细胞仪的 CV 值 (Coefficient of Variation) 在 5% 以内 (以

不固定的淋巴细胞为标准)。

四、流式检测资料的分析方法 均以每个样品 DNA 分布组方图的 $G_{0/1}$ 峰的均道值进行计算分析, 每组中的三个样品均计算出均值、标准差。以 T 检验作为统计学处理的方法。根据 CV 值 (5%), 变异大于或小于 5% 的荧光强度视为有差别, 均以每组中新鲜不固定细胞荧光强度为标准进行对比分析。

结果和讨论

一、固定剂影响细胞 DNA 荧光强度的分析结果 见表 1。

表 1 不同固定剂的细胞 DNA 荧光强度

固定剂	新鲜不固定	70%乙醇	1%戊二醛	10%甲醛
荧光强度(道数)	131 $\pm$ 0	131 $\pm$ 0.5	103 $\pm$ 0.7	67 $\pm$ 0.47

从表 1 显示, 各固定剂固定后的细胞 DNA 荧

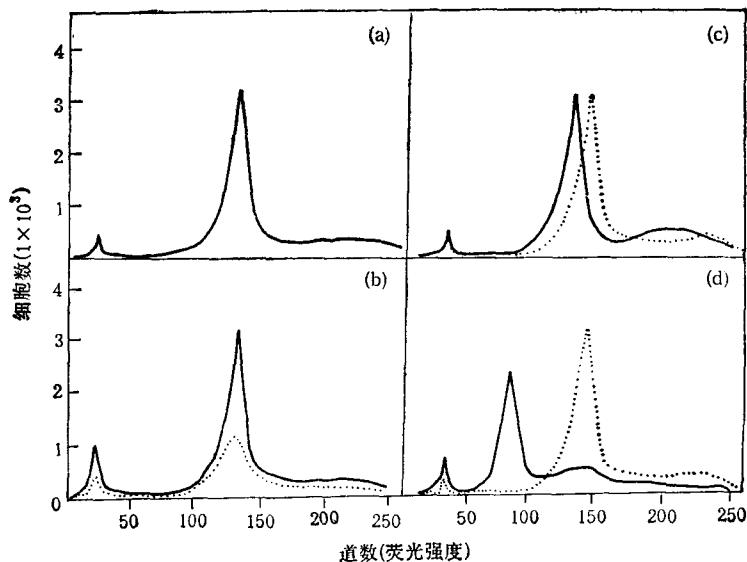


图 1

(a) 新鲜不固定淋巴细胞 DNA 荧光组方图 (b) 70%乙醇固定 5 天的淋巴细胞 DNA 荧光组方图 (实线)
(c) 1%戊二醛固定 5 天的淋巴细胞 DNA 荧光组方图 (实线) (d) 10%甲醛固定 5 天的淋巴细胞 DNA 荧光组方图 (实线) DNA 组方图中的第一个小峰为内标鸡红血球 (b)、(c)、(d) 中的虚线组方图为新鲜不固定淋巴细胞峰

光强度与不固定细胞相比, 乙醇固定细胞 DNA 荧光强度无明显差异, 戊二醛和甲醛固定细胞荧光强度有显著差异 ($P < 0.001$) (图 1a—d)。对于生物细胞的固定保存, 理想的固定剂是既

能预防细菌生长和细胞自溶, 保持完好的细胞形态和细胞内生物化学成分不发生改变, 又不干扰荧光染料分子与 DNA 分子的结合, 从本文结果证明, 70% 的冷乙醇固定细胞是较理想

时,既不影响细胞 DNA 荧光强度,且荧光分布也较稳定。Shapiro 等^[2]认为醇类固定剂优于醛类。虽然戊二醛、甲醛对细胞固定是极好的,但醛基分子与细胞内各种含氨基物质结合,干扰插入性荧光染料分子与核酸的结合,造成荧光发射强度减弱,但戊二醛比甲醛与核酸的结合要弱,本实验的结果已很好地证明了这一点(戊二醛固定细胞荧光强度相当于不固定细胞的 79%,而甲醛固定细胞荧光强度仅相当于不固定细胞的 50% 左右)。本结果与 Crissman 等^[3]报道是一致的。鉴于不同固定剂固定细胞 DNA 荧光强度不同,因此在流式细胞术定量分析细胞 DNA 含量时,须要求同一种实验样品采用同种固定剂,以免固定条件不一,造成定量分析的误差。另外发现,戊二醛、甲醛固定细胞的 $G_{0/1}$ 峰值变宽, CV 值增大(平均 6.4%)新鲜细胞和乙醇固定细胞 CV 值平均为 4.3%,这与 Crissman 等的结果相类似(醛类固定细胞的 CV 值相当于新鲜不固定细胞的 CV 1.5 倍)。

二、每毫升荧光染液中细胞总数影响荧光强度的分析结果 见表 2。

表 2 不同细胞总数/ml 的荧光强度

细胞总数/ml	1×10^6	2×10^6	3×10^6	4×10^6	5×10^6
荧光强度(道数)	131 ± 0.47	131 ± 0.47	128 ± 0.7	122 ± 0.5	118 ± 0.47

从表 2 看出,每毫升荧光染液中细胞总数的差异也会造成荧光测定的误差,细胞数为 $1-2 \cdot 10^6/\text{ml}$,荧光强度无明显差异,但 3×10^6 细胞/ml 其荧光强度有所变异,但与 1×10^6 细胞/ml 相比,在统计学上无显著差异 ($P > 0.05$)。 $4-5 \times 10^6$ 细胞/ml 其荧光强度与 1×10^6 细胞/ml 相比,有显著差异 ($P < 0.05$)。通过上述实验我们认为,在定量染色和定量分析细胞 DNA 荧光强度时,应注意细胞浓度与荧光强度的关系,以避免造成人为因素的误差。须在测定前,对每个实验样品的细胞数进行严格计数。在每毫升染液中的细胞总数为 $1-2$ 倍是较合适的。Clevenger^[4] 和 Schutte 等^[5]也提出使用 $1-3$ 倍

或 $2-3$ 倍的细胞浓度不造成荧光强度的变化。Darzynkiewicz 等^[6]指出,细胞总数/ml 为 $1-2$ 倍为最佳浓度,决不可超过 10 倍以上的细胞总数。

三、细胞在固定剂中不同时间的荧光强度分析结果 见表 3。

表 3 细胞在固定剂中不同时间的荧光强度

固定天数	新鲜不固定	1 天	5 天	10 天	20 天	30 天
荧光强度(道数)	131 ± 0	130 ± 0.47	130 ± 0.83	128 ± 0.94	128 ± 1.4	127 ± 0.94

从表 3 的结果证明,70% 乙醇固定细胞的 DNA 荧光强度与不固定细胞相比,固定 $1-30$ 天的细胞荧光强度均无显著差异,虽然固定 5 天后的细胞荧光强度有所减弱,但也无统计学上的意义。本文认为乙醇固定细胞不会明显影响细胞 DNA 荧光强度。但我们的经验表明,对于固定时间长的样品,要尽量多漂洗几次,以洗去残余的酒精,避免乙醇脱色而影响荧光强度。有作者^[2,3]认为乙醇具有猝灭荧光的作用,可能影响荧光强度的检测。但其光散射信号则比不固定细胞高得多,其光的折射率 (Refraction Index) 也增加,从不固定细胞的 1.35 到固定细胞的 1.54,虽然乙醇固定不明显影响荧光强度,但固定时间也不可过长。本实验发现,随着固定时间的延长,其 $G_{0/1}$ 细胞峰值变宽, CV 值增大(固定 $5-30$ 天 CV 值平均为 6.2%,新鲜不固定为 4.7%),其原因尚不明了,需深入探讨。细胞在 70% 乙醇中固定 5 天以内效果最

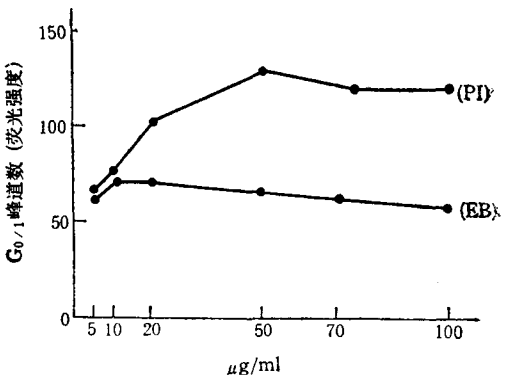


图 2 荧光染液 (PI, EB) 浓度与荧光强度的关系

好。

四、荧光染液浓度影响荧光强度的分析结果 由图2可看出, PI最佳的染色浓度为 $50\mu\text{g/ml}$, 其荧光强度最强(130道), $5-50\mu\text{g/ml}$ 的浓度, 荧光强度逐渐增强, 当浓度高于 $50\mu\text{g/ml}$ 时, 其荧光强度反而减弱。本结果与Schutte等^[5]报道一致。EB的最佳浓度在 $10-20\mu\text{g/ml}$ 的范围, 文献中多用 $10\mu\text{g/ml}$ 的浓度^[7]。从图2所示结果表明, 在用流式细胞术定量分析荧光强度时, 为了选择最佳的染色方案, 掌握好荧光染色剂的浓度是很重要的, 在样品染色过程中, 必须确定所用荧光染料的浓度是否与荧光强度有直接的比例关系。对选用的荧光染料, 要首先找出荧光发射最强的浓度。如盲目增加染料浓度, 不仅不会使荧光继续增强, 还会造成荧光猝灭, 这种现象称为浓度猝灭现象。

以上几种影响因素在流式细胞术定量分析生物细胞DNA荧光强度是较为重要的, 如在相同的仪器条件和同样的实验样品的情况下, 出现荧光分布不稳定, 就要追究其变异的原因,

(上接第441页)

的直接原因是高温破坏了膜结构的液晶态, 而引起膜表面物质脱落、移位和膜通透性改变, 这些继发性改变使癌细胞表面电荷下降而致电泳速度减慢。我们的实验亦显示HeLa细胞经 44°C , 30分钟处理后, 电泳速度减慢(减慢率 46.4%)。

先药后热与先热后药的热增敏机制不同, 前者是由于药物使细胞膜发生一系列生理生化改变而致其热敏感性增强, 后者则与药物对热损伤的固定有关。对细胞生长曲线、细胞存活率、细胞死亡率和形态学变化等项指标观察结果业已表明, 先给药后加温的治疗序贯可达最高热杀伤效应^[3]。本实验结果亦证实, BH组细胞电泳减慢率(79.2%)明显高于HB组(64.0%), 两组间有非常显著差异($P < 0.01$)。

细胞集落形成率结果可见, 先药后热序贯集落形成率最低, 先热后药序贯次之, 各实验组

应更多地考虑由于样品制备而引入的误差, 应特别注意各样品间的细胞数、固定剂以及固定时间等方面的影响, 以避免在检测中造成人为假象的测定值。本文结果表明, 新鲜不固定的细胞样品DNA荧光强度稳定, 其荧光发射强度、CV值均优于固定后的细胞。因此对于样品的保存采用不固定的保存方法(即低温保存细胞)作为流式细胞术的分析是理想的^[8]。

参 考 文 献

- [1] Ault, K. A. et al.: *Diagnostic Immunology*, 1983, 1, 2.
- [2] Shapiro, H. M. et al.: In *Parameters and Probes*, Alar R. Liss Inc. New York, 1985, 95.
- [3] Crissman, H. A. et al.: In *Flow Cytometry and Sorting*, McIlwain MR, et al. eds., John & Wiley Sons, New York, 1979, 243—258.
- [4] Clevenger, C. V. et al.: *Cytometry*, 1985, 6, 208.
- [5] Schutte, B. et al.: *Cytometry*, 1985, 6, 26.
- [6] Darzynkiewicz Z. et al.: *Cytometry*, 1984, 5, 355.
- [7] Fossa, S. D. et al.: *Path. Res. Pract.*, 1986, 181, 200.
- [8] Vindelov, L. L. et al.: *Cytometry*, 1983, 3, 317.

[本文于1987年10月31日收到]

集落形成率与细胞电泳速度之间均呈良好的相关性, 提示在高温合并热增敏剂及其不同序贯效应中, 细胞膜表面电荷密度变化与热杀伤效应有关。

参 考 文 献

- [1] Antonius W. T. Konings: *Cancer Research*, 1985, 45, 2016.
- [2] Robins, H. I. et al.: *Cancer Research*, 1983, 43, 3187.
- [3] 阎新文等: 《中国肿瘤临床》, 1988, 15(5), 259.
- [4] 梁子钧等: 《生物化学与生物物理进展》, 1976, (1), 54.
- [5] 孙玲: 《生物化学与生物物理进展》, 1985, (1), 68.
- [6] 杨藻宸: 《医用药理学》, 第二版, 人民卫生出版社, 北京, 1986, 105页.
- [7] 郑正炯等: 《生物化学与生物物理进展》, 1986, (6), 27.

[本文于1987年9月16日收到]