

■ 概述

细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程，这个过程可以分为 DNA 合成前期（G1 期）、DNA 合成期（S 期）、DNA 合成后期（G2 期）和分裂期（M 期）。未进入周期循环的细胞处于静息期（G0 期），不同时期的细胞 DNA 含量不同。流式细胞术检测细胞周期各阶段的 DNA 分布状态，计算 G0/G1、S、G2/M 期细胞的比例，对分析肿瘤分化中及药物作用下的细胞周期变化起着重要作用。细胞 DNA 含量分析是流式细胞技术最早且目前仍然广泛使用的应用之一，对细胞生物学研究有重要意义。ACEA NovoCyte™ 系列流式细胞仪高灵敏度和高分辨率的特点在检测二倍体，染色体结构缺陷 / 或染色体数目异常变化的非二倍体的 DNA 含量方面呈现卓越的性能。

■ 各类型生物样本的细胞周期分析

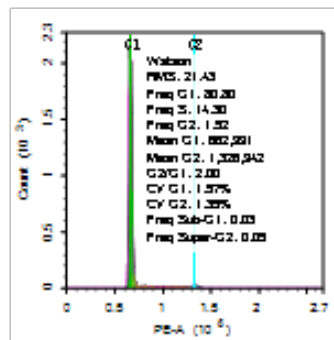
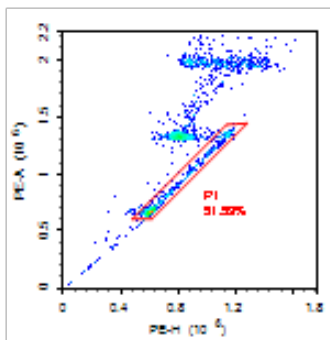
ACEA NovoCyte™ 系列流式细胞仪检测细胞周期，通过绘制荧光面积和荧光高度双参数图，画门圈出单个细胞，排除粘连细胞，确保 G2/M 期比值精确。配套 NovoExpress™ 软件提供细胞周期拟合分析功能，准确性高。

小牛胸腺细胞核（CTN）是流式周期检测的质控品。CTN 包含细胞周期各个时相的细胞核，大部分细胞核处于 G0/G1 期，小部分细胞核处于 S 期和 G2/M 期。如图 1.A，NovoCyte 检测 CTN (BD DNA QC Particle)，PE-H/PE-A 双参数散点图显示单个细胞核与双联体细胞核或其它聚集体区分明显，对 P1 门圈出的单个细胞核进行周期拟合，结果显示各期比例与靶值高度一致，G2/M 与 G0/G1 的平均荧光强度比值为 2.00，G0/G1 峰的 CV 为 1.57%（图 1.A）。ACEA NovoCyte 细胞周期检测也能精确区分 Jurkat 细胞、外周血单个核细胞（PBMC）、小鼠脾脏细胞等多种生物样本中单体及粘连细胞，对周期进行精确分析，得到可信结果（图 1.B、图 1.C、图 1.D）。

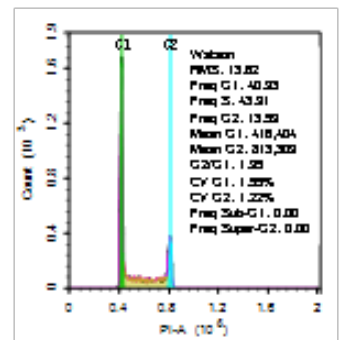
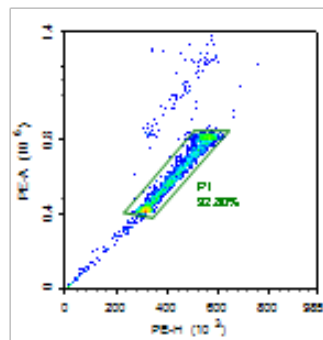
本篇应用资料使用 ACEA NovoCyte™ 系列流式细胞仪，进行了不同类型样本的细胞周期相关应用检测，内容包括：

- 各类型生物样本的细胞周期分析
- 基于不同流速的细胞周期分析
- 利用细胞周期分析研究药物作用机制
- 细胞周期分析检测药物药效
- 活细胞的细胞周期分析
- 荧光蛋白表达细胞的细胞周期分析
- 肿瘤异倍体分析

A



B



ACEA NovoCyte 流式细胞仪应用资料

—细胞周期分析

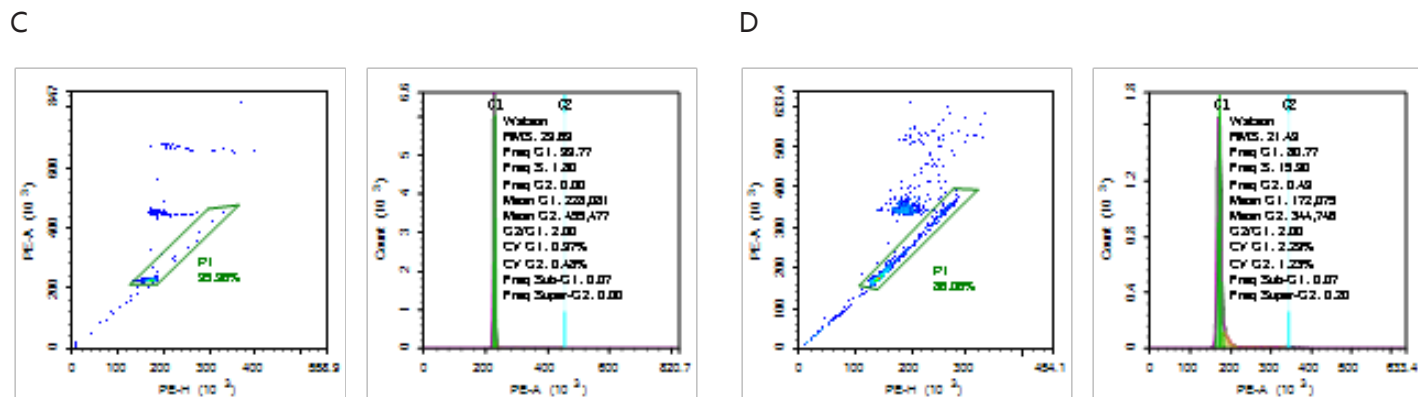
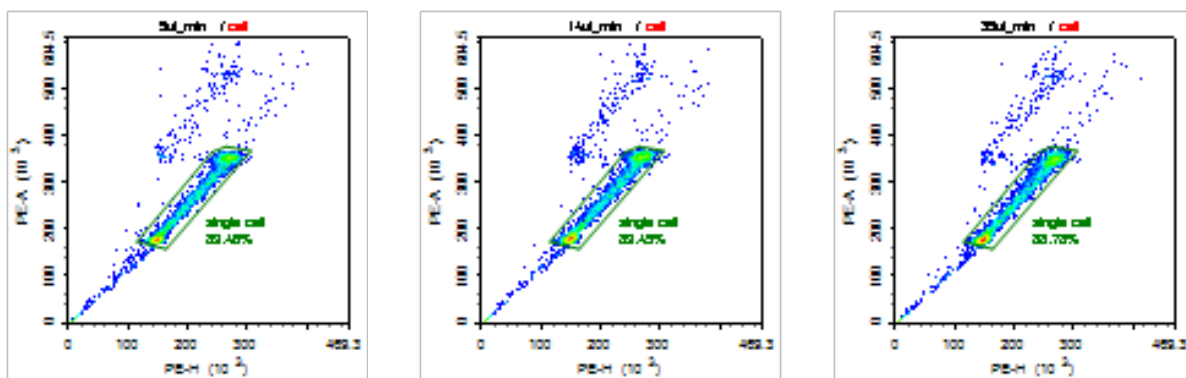


图 1. ACEA NovoCyte 检测分析各类生物样本细胞周期。在配置 405/488/640 三激光十三通道的 NovoCyte 流式细胞仪上低速采集各类生物样本 20,000 颗，单个细胞核与双联体细胞核或其它聚集体都能明显区分，G0/G1 期峰的 CV 普遍较小。A. CTN：样本制备参照 DNA QC Particle 试剂盒（BD，349523）说明书。B. Jurkat 细胞：70% 酒精固定，PI 法染色，G0/G1 峰 CV 为 1.55%。C. 外周血 PBMC：Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞，70% 酒精固定，PI 法染色，G0/G1 期峰的 CV 为 0.97%，大部分处于静息期。D. 小鼠脾脏细胞：取成年 C57BL/6 小鼠断颈处死，取出脾脏，生理盐水冲洗，机械法研磨，裂解红细胞，70% 酒精固定，PI 法染色，G0/G1 期峰的 CV 为 2.29%。

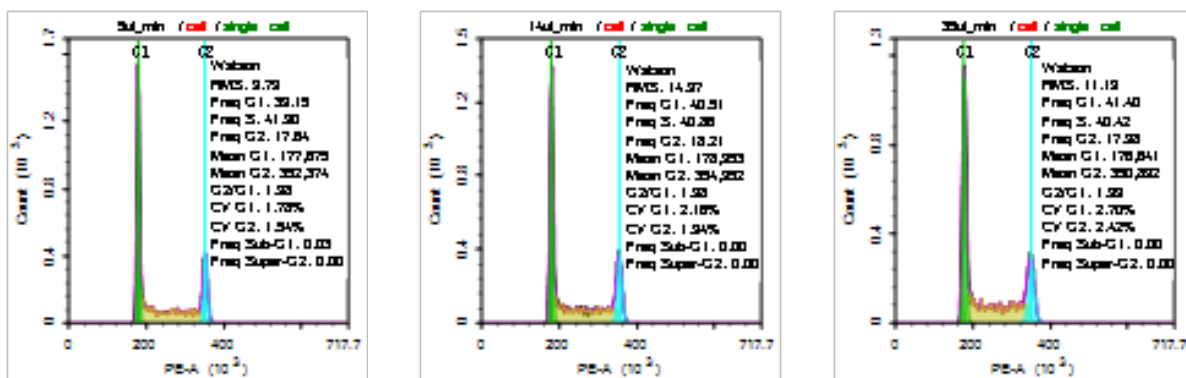
■ 基于不同流速的细胞周期分析

周期分析对 CV 要求颇高，传统流式细胞仪检测细胞周期时一般要求 - 在低速下进行，当样本量大而检测时间紧张时，效率往往不高。ACEA NovoCyte™ 系列流式细胞仪的高分辨率特点支持在周期分析时不局限于低速测试。中速（35ul/min），低速（14ul/min）及自定义流速（5ul/min）的周期分析结果显示，三种流速下，G0/G1 峰 CV 都小于 3%，PE-A/Count 柱状图基本重合（图 2.C）。同时，NovoExpress™ 软件操作简单便捷，除了预设低/中/高速外，还可在 5-120ul/min 区间任意设置。

A



B



C

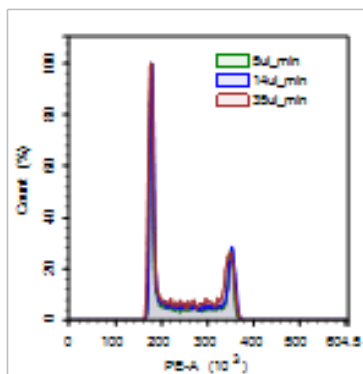


图2. 不同流速下的细胞周期分析, 结果基本一致。取对数生长期 Jurkat 细胞, 酒精固定破膜, PI 单染后, 在配置 488/640 两激光六通道的 NovoCyte 流式细胞仪上分别以预定流速各采集 20,000 颗。A. 测试流速为 5ul/min, 14ul/min 及 35ul/min, “single cell”门内细胞所占比例稳定, 单体细胞和双联体细胞区分不受影响; B. 三种不同流速下, 周期拟合 G0/G1 峰 CV 都小于 3%; C. PE-A/Count 柱状图上三种流速基本重合。

■ 利用细胞周期分析研究药物作用机制

细胞毒药物, 特别是抗肿瘤药物, 对细胞周期的作用显著。通过检测药物作用后的细胞周期变化, 可以对药物的作用机制进行分析及评估, 了解药物的抗癌效果。

紫杉醇 (Taxol, paclitaxel) 是治疗卵巢癌和乳腺癌药物; MG132 是一种蛋白酶体抑制剂, 通过抑制蛋白酶体介导的降解途径抑制蛋白降解, 导致细胞死亡; 5- 氟尿嘧啶 (Fluorouracil, 5-Fluoracil, 5-FU) 是 DNA/RNA 合成抑制剂, 在肿瘤细胞中通过抑制胸苷酸合成酶 (TS) 而干扰核苷酸合成。ACEA NovoCyte™ 系列流式细胞仪检测紫杉醇、MG132 和 5- 氟尿嘧啶作用下 A549 细胞的周期变化, 结果 (图 3) 显示紫杉醇阻断细胞周期到 G2/M 期; MG132 阻断细胞周期到 G2/M 期; 5- 氟尿嘧啶将细胞周期阻断到 G0/G1 期; 紫杉醇、MG132 和 5- 氟尿嘧啶均能发挥抗肿瘤作用, 抑制细胞周期, 表现为不同的作用机制。

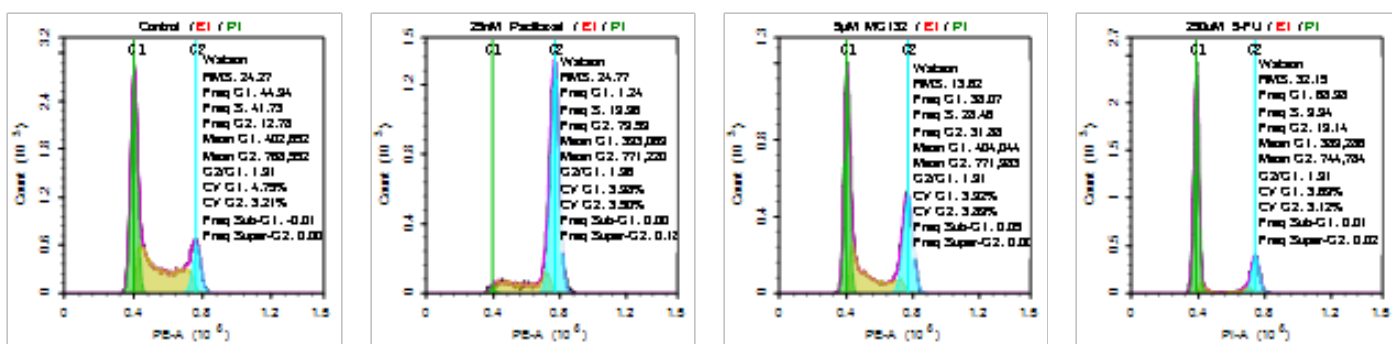


图3. 药物作用后的细胞周期分析。药物处理后的 A549 细胞经 70% 酒精固定、PI 染色, 在配置 488/640 两激光四通道的 NovoCyte 流式细胞仪上低速采集, 与不处理对照相比, A549 细胞周期发生了显著变化, 且不同药物作用导致细胞周期变化不同。25nM Paclitaxel 处理 A549 细胞 24h, G0/G1 比例从 44.94% 降低到 1.24%, G2/M 期比例从 12.78% 升高到 79.59%, 将 A549 细胞周期阻断到 G2/M 期; 5uM MG132 处理 A549 细胞 24h, G0/G1 期比例变化不大, S 期比例从 41.73% 降低到 28.46%, G2/M 期比例从 12.78% 上升到 31.88%, 将 A549 细胞周期阻断到 G2/M 期; 250uM 5-FU 处理 A549 细胞 24h, G0/G1 比例从 44.94% 上升到 68.98%, S 期比例从 41.73% 降低到 9.94%, G2/M 期比例变化不大, 将 A549 细胞周期阻断到 G0/G1 期。

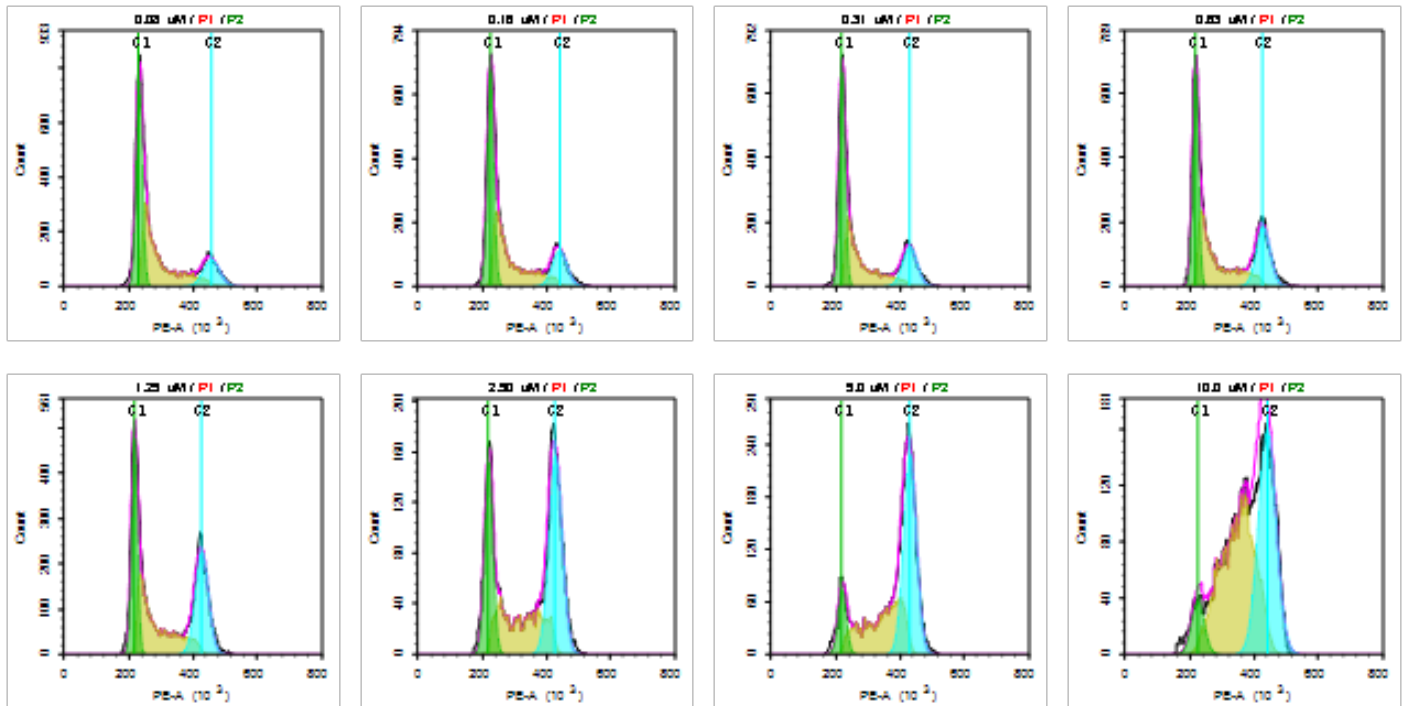
■ 细胞周期分析检测药物药效

以细胞周期做为检测指标, 分析梯度稀释药物作用后的细胞周期变化, 可以对药物的药效进行较好的评估、分析及比较。

依托泊甙 (Etoposide) 做为细胞周期特异性的抗肿瘤药, 主要抑制中期分裂细胞。ACEA NovoCyte™ 系列流式细胞仪检测依托泊甙对 Jurkat 细胞的作用, 结果显示依托泊甙将细胞周期阻断到 G2/M 期。同时, 依托泊甙作用下的周期变

化与药物剂量之间呈现显著的剂量依赖抑制效应 (图 4.A), IC_{50} 为 $1.17 \mu M$ (图 4.B)。

A



B

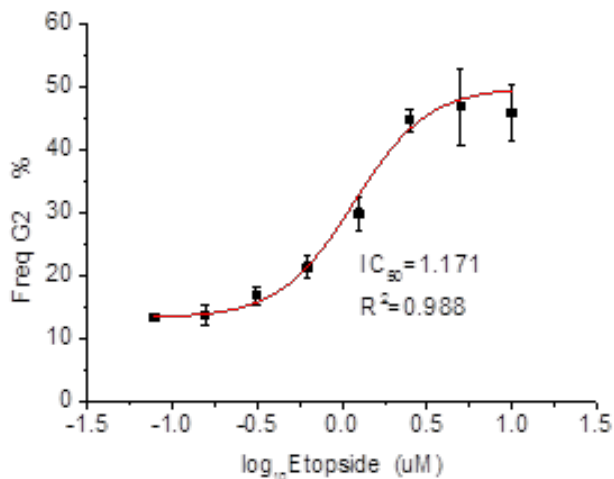


图 4. Etoposide 作用于 Jurkat 细胞, 呈现显著的剂量依赖细胞周期抑制效应。96 孔板接种 Jurkat 细胞, 加入浓度梯度 Etoposide 处理, 每个浓度三个复孔, 孵育 24h 后对细胞进行破膜固定, PI 法染色, 在配备有 NovoSampler™ Pro 自动上样器的 NovoCyte 流式细胞仪上自动采集。A. 浓度梯度 Etoposide 作用后 Jurkat 细胞周期分析图谱。B. Jurkat 细胞 G2/M 期比例与 Etoposide 呈现浓度依赖关系, IC_{50} 为 $1.17 \mu M$ 。

■ 活细胞的细胞周期分析

在无需进行样本固定的情况下, 对活细胞进行周期分析是研究细胞周期的另一种途径。特别是对于特殊样本, 在无法完成细胞固定后进行细胞周期检测的情况下, 利用活细胞染色可以保证维持样本的原始性状, 并完成周期分析。Hoechst 33342 是一种能够穿透活细胞膜的核酸染料, 无需固定破膜, 特别适用于活细胞周期分析。该染料进入细胞核后特异性结

ACEA NovoCyte 流式细胞仪应用资料

—细胞周期分析



合在 DNA 的 A-T 碱基上，Hoechst 33342-DNA 复合物的最大激发波长为 350nm，最大发射波长为 461nm。

绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein , GFP) 在 488nm 激光激发下发出绿色荧光，常用于建立瞬时或稳定表达细胞株，是研究基因功能的重要工具。尝试使用常规细胞周期分析染料如 PI、DAPI、7-AAD 对 GFP 表达细胞进行细胞周期分析，需要进行固定破膜处理，这一处理容易导致胞内可溶性的 GFP 漏出，从而使 GFP 荧光降低或缺失，对结果准确性造成很大影响 (图 5. A, 用 FITC 通道检测 GFP)。参照 Ingrid Schmid and Kathleen M. Sakamoto ①方法，对样本进行多聚甲醛固定，仍有明显的 GFP 荧光缺失的问题 (图 5. B)。此时，利用 Hoechst 33342 染料，使用 NovoCyte (405/488/640) 流式细胞仪，可以实现在 GFP 蛋白零损失的前提下，很好地完成 A549-GFP 细胞的细胞周期分析 (图 5. C)。

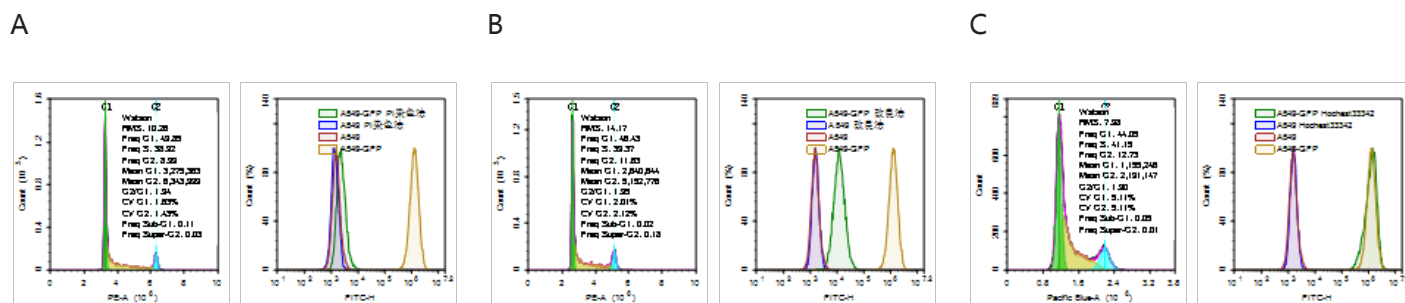


图 5. 活细胞周期分析。分别采用 PI 染色法、Ingrid Schmid and Kathleen M.Sakamoto 改良法及 Hoechst 33342 活细胞染色法处理 A549-GFP 稳转细胞株，在配置 405/488/640 三激光十三通道的 NovoCyte 流式细胞仪上低速采集。与同样方法处理或未做任何处理的 A549 及 A549-GFP 细胞相比，Hoechst 33342 活细胞染色法可在 GFP 蛋白零损失的前提下检测胞内 DNA 含量。A. PI 染色法。70% 酒精固定破膜后，RNase 酶处理后 PI 染色，GFP 几乎完全溢出；B. Ingrid Schmid and Kathleen M. Sakamoto 改良法。首先细胞用 1% 多聚甲醛固定，然后以 70% 乙醇破膜，RNase 酶处理后 PI 染色，GFP 部分保留；C. Hoechst 33342 活细胞染色法。直接加入终浓度为 20ug/ml 的 Hoechst 33342，37 度水浴 30min，GFP 完全保留。

■ 荧光蛋白表达细胞的细胞周期分析

对荧光蛋白表达细胞进行细胞周期是生物学研究中常规检测内容。流式细胞术的多参数检测及分析优势不但实现细胞周期的精确分析，同时还可以对与凋亡、信号通路等相关的目的荧光蛋白进行定量，这一优势在检测荧光蛋白表达细胞上尤为突出。

使用流式细胞术对荧光蛋白表达细胞进行包括周期检测在内的多参数分析，首先需要考虑荧光染料的选择。常用的 PI 染料在检测带有 GFP、EYFP 等绿色或者黄色系列荧光蛋白表达细胞的周期时，需做荧光补偿；PI 还与多数红色、深红色系列荧光蛋白如 mCherry、mKate 等光谱重叠，不能用于检测带有这些荧光表达的细胞周期。DAPI (DAPI dihydrochloride) 是一种蓝色荧光染料，适用于固定样本染色。DAPI 和双链 DNA 结合后可以产生比自身强 20 多倍的荧光，DAPI-DNA 复合物的最大吸收波长为 358nm，可被紫外激光激发，最大发射波长为 461nm。因 DAPI 与上述多种荧光蛋白的发射波长仅有少部分重叠，因此可以利用这项特性在单一的样品上进行多色荧光分析。同时，Hoechst 33342 也可以作为候选染料。如图 6，在 405nm 激光器配置的 NovoCyte 流式细胞仪上检测带有 Ds-Red 表达的 CHO 细胞周期，使用 DAPI 或 Hoechst 33342 染料对 DNA 进行染色，由 405nm 激光器激发，Ds-red 由 561nm 激光器激发，分别在 Pacific Blue 和 PE-Texas Red 通道采集荧光信号，无需补偿，即可轻松实现单个样本同时检测细胞周期与荧光蛋白。

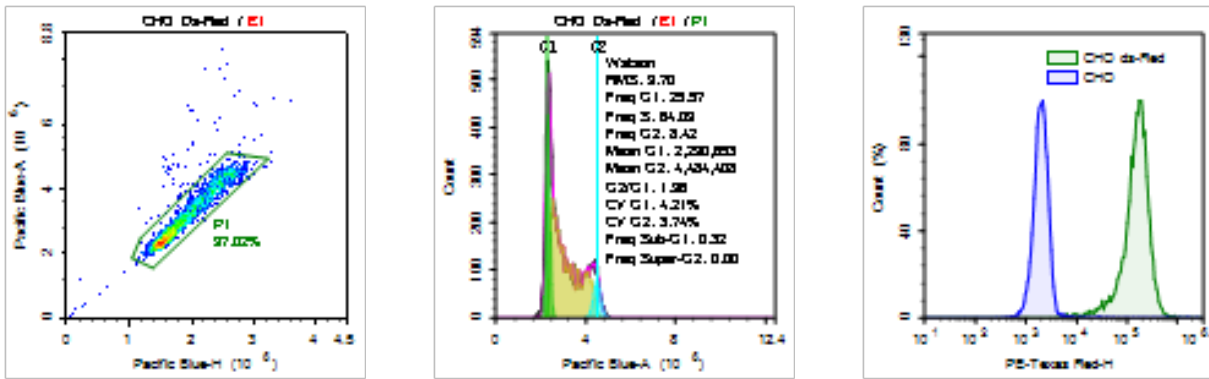


图 6. Ds-Red 表达 CHO 细胞的周期分析。收集对数生长期 CHO Ds-Red 稳转细胞系，70% 酒精固定破膜，加入 DAPI 至终浓度 5 μ g/ml，37 度水浴 30min，在配有 561/405nm 激光器的 NovoCyte 流式细胞仪上低速采集 20,000 颗。

■ 肿瘤异倍体分析

流式细胞术在临床上的应用日益广泛。通过 DNA 倍体分析，可以了解恶性肿瘤细胞群体中是否含有异倍体、多倍体、亚二倍体细胞，从而判断肿瘤细胞的异质性，给临床的诊断和疗效判断提供重要的佐证。DNA 倍体的判定是根据 DNA 指数 (DNA Index, DI) 来确定的，即所测细胞群的 G0/G1 期 DNA 含量与正常二倍体标准细胞 G0/G1 期 DNA 含量的比值。如图 7，NovoCyte 流式细胞仪检测肿瘤异倍体结果显示，除了正常的二倍体峰外，结肠癌石蜡包埋组织样本出现一个非整倍体峰 (黄色)，DI 为 0.70；乳腺癌石蜡包埋组织样本出现一个近二倍体、四倍体和多倍体峰，有明显的 S 期，DI 分别为 1.08、2.00 和 2.73。

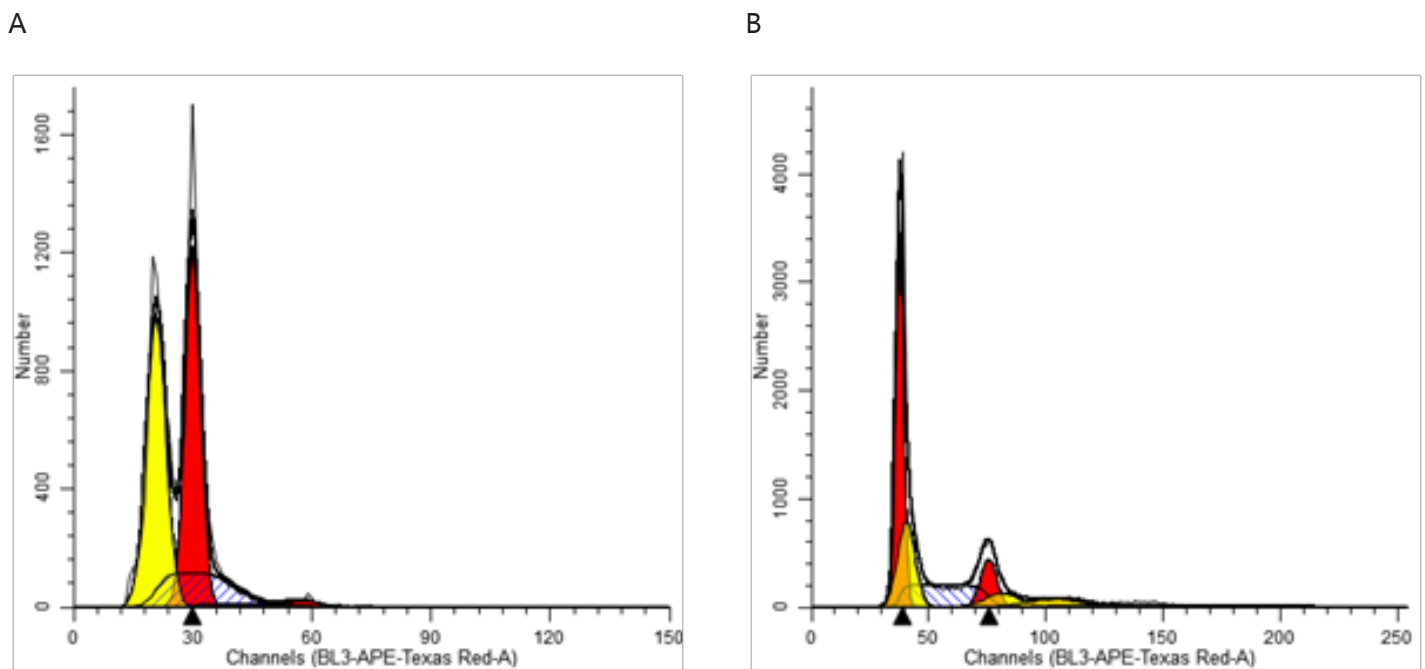


图 7. 肿瘤组织异倍体分析。从结肠癌、乳腺癌石蜡包埋组织上各切取 3-5 片 50 μ m 厚度的组织薄片，二甲苯脱蜡，待蜡脱净后，依次加入 100%、95%、70%、50% 梯度乙醇水化，0.5% 胃蛋白酶 (pH 1.5-2.0) 消化 30min，酒精固定，RNase 酶处理，PI 染色，在配置 405/488/640 三激光十三通道的 NovoCyte 流式细胞仪上低速测试，导出 FCS 文件在 ModFit LT 软件上分析拟合。A. 结肠癌石蜡包埋组织 DNA 倍体分析直方图。B. 乳腺癌石蜡包埋组织 DNA 倍体分析直方图。

参考文献：

© Ingrid Schmid and Kathleen M. Sakamoto. Current Protocols in Cytometry. (2001) 7.16.1

仅供研究，不用于临床诊断



艾森官网二维码

艾森生物 (杭州) 有限公司

地址：浙江省杭州市西湖区西园五路2号5幢

电话：+86 571-28908600

传真：+86 571-28901358

www.aceabio.com.cn