

细胞凋亡，又称细胞程序性死亡，是细胞自发性的死亡过程，细胞通过触发特定的信号途径导致细胞萎缩，最终被吞噬，细胞凋亡是维持体内细胞数量动态平衡的基本措施。这与细胞坏死不同，细胞坏死是非程序性的由于外界环境因素或有毒物质刺激引起的细胞死亡过程，通常会引起免疫反应。

细胞凋亡是一个时间性和多步骤的过程，可以在不同的阶段进行分析。在凋亡早期，线粒体膜电位降低无法正常行使功能，导致细胞色素 C 的释放和激活。在细胞凋亡早期阶段另一个事件还包括磷脂酰丝氨酸 (PS) 从膜内外翻到膜外，暴露于胞外环境中。细胞凋亡后期，膜通透性改变，膜完整性及选择性运输功能破坏。

为评估 NovoCyte 系统检测细胞凋亡的灵活性和稳定性，我们展示了三个不同的由 Staurosporine 诱导的细胞凋亡实验，Staurosporine 是一类常用的激酶抑制剂，可诱导多种类型细胞凋亡。第一个实验用 Annexin V 及 7-AAD 分别鉴定早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞，Annexin V 与外翻的 PS 结合，7-AAD 为核染料。该实验表明：Staurosporine 在 Jurkat T 细胞和 HeLa 细胞中均能引起细胞凋亡，通过染料可区分早期凋亡和晚期凋亡细胞群。第二个实验用荧光染料 JC-1 来测定早期凋亡细胞膜电位降低。在正常膜电位下，JC-1 以多聚体形式聚集在线粒体内，被 PE 通道检测。当膜电位去极化时，JC-1 从线粒体内释放，以单体形式存在于胞内，被 FITC 通道检测。因此 PE 与 FITC 荧光比例可代表线粒体膜电位变化。如 Figure2 所示，与未处理的对照组相比，Staurosporine 处理细胞 6 小时后，随着时间的推移，Jurkat T 细胞线粒体膜电位逐渐降低。该反应类似于常用线粒体膜电位去极化试剂 FCCP 的作用。第三个实验是观察细胞凋亡蛋白酶 Caspase 3/7 的活化。包含有细胞凋亡蛋白酶 Caspase 3/7 的特异性裂解位点的探针标记到细胞上，在细胞凋亡早期，这些探针分子别活化的细胞凋亡蛋白酶裂解后，进入到细胞核内，与 DNA 结合，发出荧光。胞内活化的酶能被直接读出。如 Figure3 所示，与未处理的对照组相比，经 Staurosporine 处理的 Jurkat T 细胞具有更高的酶活性。

这三类方法均能定量、有效的分析不同凋亡阶段的细胞群。NovoCyte 因具有自动补偿、高荧光动态范围从而免除电压调节等优势，很容易即可完成这些检测。

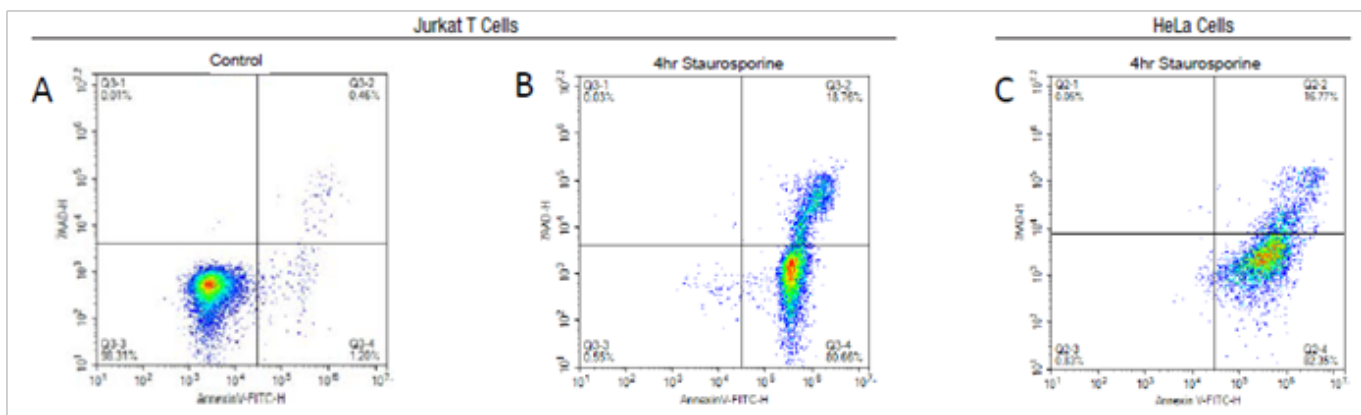


Figure1. Staurosporine 处理细胞用 Annexin V/7-AAD 染色，检测细胞早期凋亡。A. Jurkat T 细胞未处理对照组；B. Jurkat T 细胞经 2uM Staurosporine 处理 4h；C. HeLa 细胞经 2uM Staurosporine 处理 4h。药物处理后的细胞用 Annexin V-FITC/7-AAD 染色，流式细胞仪检测细胞早期凋亡和晚期凋亡，Annexin V+ 单阳性细胞群为早期凋亡细胞，Annexin V+/7-AAD+ 双阳性细胞群为晚期凋亡或死细胞。

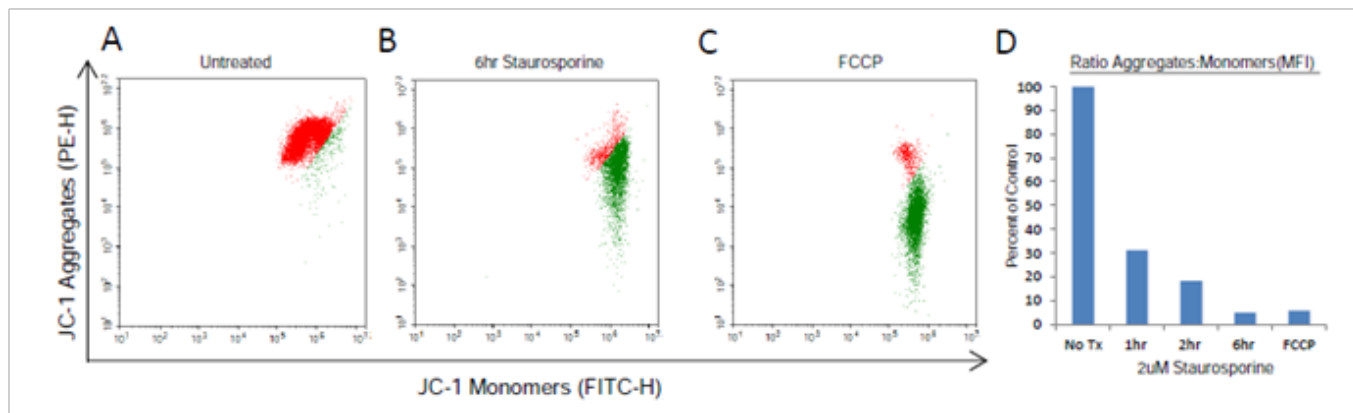


Figure 2. Staurosporine 破坏 Jurkat T 细胞线粒体膜电位。A. Jurkat T 细胞未处理对照组；B. 2uM Staurosporine 处理 Jurkat T 细胞 6h；C. FCCP 处理组。JC-1 (Life Technologies) 染色，流式细胞仪检测线粒体膜电位。正常细胞中，染料聚集在线粒体内部以多聚体形式存在，发射荧光在 PE 通道。线粒体膜电位破坏后，染料聚集在胞质内，以单体形式存在，发射荧光在 FITC 通道。药物对细胞的作用可通过 PE/FITC 的荧光比例来评估。条形图表示，药物处理后，Jurkat T 细胞在不同时间段的凋亡比例，所有经处理的细胞包括 FCCP 阳性对照组，与未处理组相比，均表现出较低的比例。

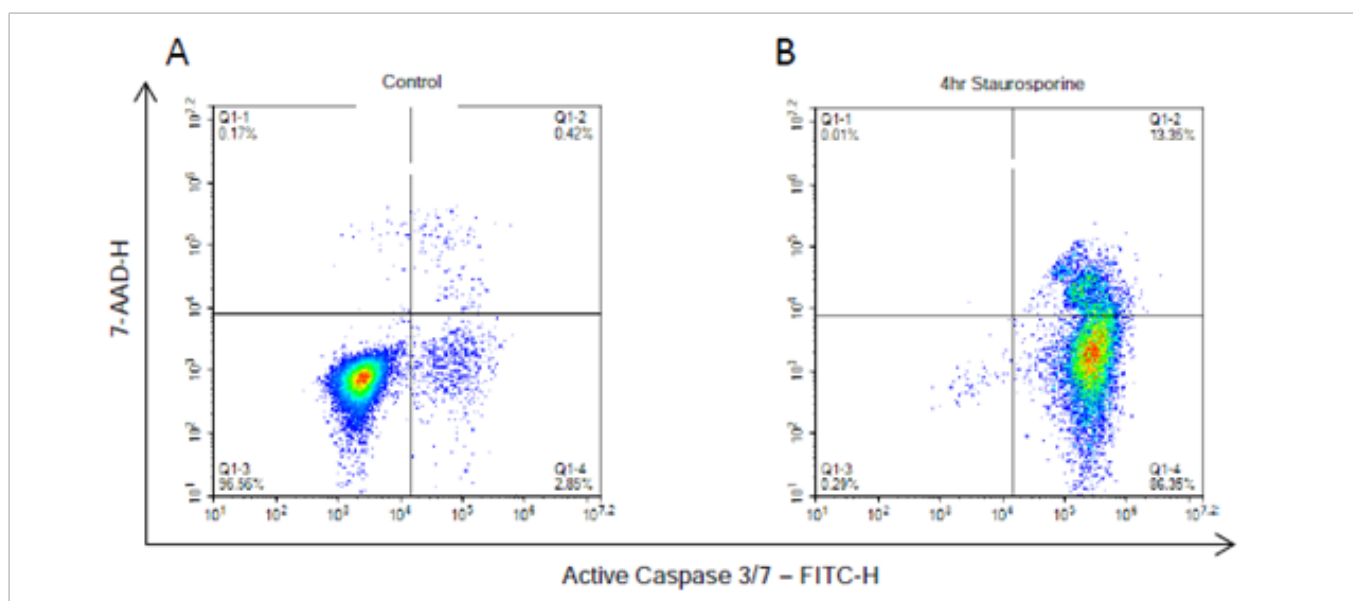


Figure 3. Staurosporine 处理 Jurkat T 细胞，检测 Caspase 3/7 活性。2uM Staurosporine 分别处理 Jurkat T 细胞 0h(A) 和 4h(B)。DEVD 荧光绑定核酸染料 (Life Technologies) 和 7-AAD 染料 (BioLegend) 染色。未处理的对照组细胞显示较低的酶活性，Staurosporine 处理 4h 后，Caspase 3/7 酶活性显著提高 (99.7%)。

References

1. Kepp O, et al. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Mar; 10(3):221-37.
2. Susan Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.

