

细胞凋亡检测方法研究进展

吕莹^{1,2}, 张德禄², 张宏^{1,2}, 王高鸿², 刘永定², 胡春香^{2*}

(1. 西北师范大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 中国科学院 水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要: 细胞凋亡是生命科学目前的一个研究热点, 检测细胞凋亡的方法和技术取得了很大的进步。从早期细胞内某些基因转录表达的变化、代谢生理的变化, 到晚期细胞形态的确诊、细胞内代谢物质的转变, 从定性、定量到原位定性定量等, 都发展了相对成熟的检测技术。根据检测时间的早晚, 从形态学、生化特性和分子调控等层次综合分析了检测细胞凋亡的主要方法, 并对相关研究进行了展望。

关键词: 细胞凋亡; 检测方法; 细胞坏死

中图分类号: Q 26

文献标识码: A

文章编号: 1001-988X(2007)02-0082-06

Progress on research method of cell apoptosis

LÜ Ying^{1,2}, ZHANG De-lu², ZHANG Hong^{1,2}, WANG Gao-hong²,
LIU Yong-ding², HU Chun-xiang²

(1. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, Gansu, China;

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China)

Abstract: The study of cell apoptosis has obtained much more development in present days as one of research focuses of life science, and the relative assay methods have also been obviously improved and developed. Now many methods can assay early change on cell apoptosis from genetic transcription and expression level and metabolic physiology level to late variation in cell morphologic structure, metabolite, and both in nature and ration of apoptotic cell in situ have been invented. The research development in morphology, biochemistry and molecular biology is reviwed minutely, and the relative researches of this realm in the future are made a prospect as well.

Key words: cell apoptosis; assay method; cell necrosis

细胞凋亡(cell apoptosis)是细胞的自主性死亡过程, 发生在生命个体生长发育的各个阶段, 是当代生命科学研究的热点内容之一。近年研究发现, 细胞凋亡的发生还与很多疾病的产生密切相关, 例如细胞凋亡不足引起的肿瘤、自身免疫性疾病、病毒感染; 细胞凋亡过度导致的艾滋病、再生障碍性贫血、局部缺血损伤等。因此, 防治这类疾病的相关研究也成为医学领域的热点之一, 而且已渗透到基础医学、临床治疗和药物筛选等多个层面。为了

快速准确、定性定量地了解凋亡的发生程度和发生几率, 不少检测技术被发现并逐渐完善。

1 早期细胞凋亡的检测方法

1.1 膜磷脂结合蛋白 V 的检测

目前认为细胞凋亡的早期发生主要在细胞膜上, 是磷脂对称性改变引起的磷脂酰丝氨酸(PS)暴露于细胞膜外所致。而 Annexin V 是一种(35~36 ku)钙依赖性的磷脂结合蛋白, 对 PS 具有较高

收稿日期: 2006-07-10; 修改稿收到日期: 2006-10-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170112); 中国科学院知识创新工程资助项目(KSCX2-SW-322); 国家载人航天工程资助项目

作者简介: 吕莹(1979—), 女, 甘肃西和人, 在读硕士研究生。主要研究方向为环境毒理学。

* 通讯联系人, E-mail: cxhu@ihb.ac.cn

亲和性^[1],它可作为敏感的探针检测细胞膜表面的PS位置,特异结合标记的异硫氰酸荧光素(FITC)而保持细胞膜的完整性,因此,可使变性染色质着色的荧光染料碘化丙啶(PI)不进入细胞质。然而,坏死细胞的细胞膜和细胞质可同时分别受Annexin V与PI的标记。在流式细胞仪得到的双变量散点图上,正常活细胞为Annexin⁻/PI⁻均低染,凋亡细胞Annexin⁺高染、PI⁻低染,继发性坏死细胞Annexin⁺/PI⁺均高染^[2]。该方法省时、可靠,是目前检测细胞凋亡较为理想的方法,但缺点是细胞膜的改变持续时间较短,选择检测的时机非常重要。

1.2 线粒体膜电位的检测

线粒体膜电位是由线粒体内膜两侧质子的不对称分布而形成的电化学梯度,在细胞凋亡过程中常因膜孔道大小的改变及转膜电位的降低来调节细胞凋亡^[3,4]。在凋亡早期,当线粒体形态学方面尚无变化时,其膜电位已经发生耗散。因此,其膜电位的耗散被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,早于核酸酶的激活,也早于磷脂酰丝氨酸暴露于细胞表面,而且一旦线粒体膜电位耗散,凋亡就不可逆转。但使用该方法时要始终保持平衡染液pH值的一致性。而且要注意,如果在染料达到平衡的细胞悬液中含有蛋白,它们将可能与部分染料结合,降低染料浓度,引起假去极化。

1.3 细胞内氧化还原状态的检测

细胞内氧化还原状态代表着细胞的生理状态,从电化学角度来讲,它可以影响许多生化反应的进行;从自由基化学角度来讲,它会破坏生物大分子生理功能的发挥。正常细胞内氧化还原电位在-240 mV左右,谷胱甘肽(GSH)作为氧化还原状态的缓冲剂维持其平衡。但当细胞内GSH的排除非常活跃时,细胞液就由还原环境转为氧化环境,导致线粒体膜电位降低,使细胞色素C从线粒体中转移到细胞液中,启动Caspase的级联反应,使细胞开始凋亡。因此,常用细胞质中GSH含量的变化检测凋亡细胞。但有些细胞(如HeLa细胞和3T3细胞)在凋亡时没有明显的GSH水平变化,故该方法对这类细胞不适宜。

1.4 细胞色素C的定位检测

细胞色素C(Cyt C)除参与细胞内电子传递外,在细胞凋亡中还起着信号物质的作用。正常情况下,它存在于线粒体内外膜之间的腔隙中,与内膜

松弛相连。当受到凋亡信号的刺激后,则从线粒体释放到细胞质,并与细胞质中的凋亡蛋白激活因子(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)结合,形成细胞色素C/Apaf-1复合物,再启动Caspase级联反应^[5-8],引起细胞凋亡。凋亡发生时线粒体内膜上膜蛋白Cyt C氧化酶亚单位IV(COX4)保留在线粒体内,作为线粒体富集部分的一个标志,从凋亡细胞和非凋亡细胞中分离出高度富集的线粒体部分,通过Western印迹,用Cyt C抗体和COX4抗体显示Cyt C和COX4的存在位置,从而判断凋亡细胞的发生。但用该方法分离时不能超离心,而且在实验过程中因影响线粒体呼吸链电子传递和能量代谢,ATP生成明显减少和氧自由基大量产生,最终使细胞发生慢性坏死。

1.5 Caspase-3的检测

在凋亡程序启动及执行过程中,被称为凋亡效应器的Caspases蛋白酶家族起着非常重要的作用,它们通过切断与周围细胞的联络、重组细胞骨架、关闭DNA复制、修复和破坏DNA及核结构直接参与凋亡的早期启动。其中Caspase-3作为关键执行分子,在凋亡信号传导的许多途径中发挥着重要作用。通常Caspase-3以酶原形式存在于细胞质中,在凋亡早期被激活,因此常被用作早期细胞凋亡的指标。活化的Caspase-3由2个大亚基(17 ku)和2个小亚基(12 ku)组成,可裂解相应的底物,尤其是特异性地水解DEVD-X肽类和D-X肽键的底物,导致细胞凋亡。但在凋亡晚期和死亡细胞中,其活性明显下降^[6],给使用者带来判断困难。

1.6 相关基因mRNA水平的检测

在细胞凋亡时有些基因表达异常,检测这些特异基因的表达水平也成为检测细胞凋亡的常用方法之一。Fas蛋白结合受体后形成死亡介导信号复合物(DISC,包括DD、FADD和Caspase 8),能诱导癌细胞中的细胞毒性T细胞(cytotoxic T cells)等靶细胞的凋亡。Bcl-2和Bcl-X作为抗凋亡的调节物质,其表达水平比例决定了细胞是凋亡还是存活。而近年发展起来的荧光定量PCR技术可定量检测PCR基因表达水平^[9,10],以判断细胞是否凋亡,而且该方法比Northern杂交更快更准确。

2 晚期细胞凋亡的检测方法

2.1 依据生化特征的检测

2.1.1 DNA片段检测 细胞凋亡时,由于内源性

核酸内切酶激活,胞内 DNA 被切成 50~300 kb 大小的片段,然后进一步分解成规则的约 180~200 bp 整数倍的寡核苷酸片段,将这些 DNA 片段进行电泳分析可判断细胞凋亡。目前常用的有脉冲场凝胶电泳(即大分子染色体 DNA 片段测定)、聚丙烯酰胺凝胶电泳、DNA 凝胶电泳、二苯胺法、单细胞凝胶电泳、Southern 印迹等方法。

1) 脉冲场凝胶电泳(PFGE)。细胞凋亡早期, DNA 先断裂成高分子量($\geq 50\sim 300$ kb)的片段,而超过一定分子量的双链 DNA 分子在琼脂糖凝胶电泳中分不开,因此,细胞凋亡早期产生的 50~300 kb 以上的 DNA 片段不能用普通琼脂糖凝胶电泳来分离。脉冲场凝胶电泳技术是在凝胶上外加正交的交变脉冲电场,每当电场方向改变后,大的 DNA 分子便滞留在爬行管中,直至新的电场轴向重新定向后,才能继续向前移动。DNA 分子越大,这种重排所需时间越长^[11,12],当 DNA 分子变换方向的时间小于电脉冲周期时, DNA 就可以按其相对分子量大小分开。因此,一般正常细胞的 DNA 滞留在加样孔,凋亡早期形成的 50~300 kb DNA 片段靠近加样孔, 10~40 kb 的 DNA 片段远离加样孔,但不出现典型的“梯带”。该方法的优点在于可分辨大于 5 000 kb 的 DNA 分子,检测的灵敏度较高,但费时,需大量细胞,易造成核素污染。

2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳。聚丙烯酰胺凝胶电泳是依据分子量大小将蛋白质混合物区分开的一种手段,一般用于分离小于 1 kb 的 DNA 片段,也可原位检测核酸内切酶的活性。根据凋亡细胞的核酸内切酶活化这一生化特征,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳,使核酸内切酶作用于预先标记的 DNA,从降解的 DNA 量反映出的酶活性判断细胞凋亡。该法灵敏度高,但是降解的 DNA 不能回收再利用。

3) DNA 凝胶电泳(DNA ladder)。琼脂糖凝胶电泳法是分离、纯化和鉴定 DNA 的经典方法。正常细胞的 DNA 凝胶电泳结果是一条离加样孔很近的整体带,而凋亡细胞由于内源性核酸酶的激活, DNA 链被切割成基数约 180 bp 的大小不等的片段,这些 DNA 片段电泳后呈现特征性的“阶梯状”条带,而坏死细胞的 DNA 是随机破坏的,电泳后是模糊的连续带,不成“阶梯状”。该方法简便有效,适合于群体细胞的凋亡分析,但敏感性不高,需要标本细胞数较多(在 10^6 以上)^[13],而且只能定性,不能定位。

4) 二苯胺法。细胞受到氧化损伤后, DNA 双链可发生断裂,断裂的小片段在低张力溶液环境下可游离释放出来,而完整的 DNA 则留在细胞核内。通过高速离心可将两者分开(但离心力和离心时间要正确),再利用二苯胺与 DNA 反应的颜色深浅对其进行定量,可计算出 DNA 断裂的百分比。该方法方便快捷,但只能定量,不能定性。

5) 单细胞凝胶电泳(SCGE)。当 DNA 受到损伤并发生断裂后,在凝胶电泳时会全面伸展开。一般将受到损伤的细胞在琼脂糖凝胶上裂解并电泳,在 pH 9.5 条件下,有分离的 DNA 条带出现,而细胞 DNA 用荧光染料标记后,在荧光显微镜下观察呈现“彗星”状,并随着损伤程度的加剧,有更多 DNA 从彗星头尾移出^[14]。通过检测彗星头、尾的相对荧光强度,可对细胞 DNA 损伤的程度进行定量分析。该方法灵敏、准确、简便,既可定性又可定量,但易受钙、镁离子的污染。

6) Southern 印迹。该方法首先通过电泳技术分离细胞核基因组 DNA,然后将它们转移至硝酸纤维素膜上,再用带有目的片段的探针与其杂交,利用放射自显影技术观察结果。该方法能确定特异 DNA 片段的大小和位置,具有较高的灵敏度。

2.1.2 酶联免疫吸附法(ELISA 法) 酶联免疫法是定量检测细胞凋亡的免疫化学方法。在细胞发生凋亡时,由于钙镁依赖性内源核酸内切酶进入核小体内,将双链 DNA 从各核小体间连接处裂开,形成单个或寡核苷酸 DNA 片段,而各核小体内的 DNA 与组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 形成紧密复合物,不被核酸酶裂解^[15,16]。因此,在吸附有组蛋白抗体的微孔板上加入核小体上清液(裂解液裂解)后,核小体组蛋白与包被的抗组蛋白抗体结合。当加入过氧化物酶标记的 DNA 抗体后,它们与核小体上的 DNA 结合,并对过氧化物酶底物产生显色反应,这样可以用酶标仪对凋亡细胞进行定量分析。该方法敏感性高,可检测 5×10^2 /mL 凋亡细胞,但不能精确测定凋亡发生的绝对量,不能提供单个细胞或相关细胞的组织学定位。

2.1.3 染色后的流式细胞仪检测法(flow cytometry assay, FCA) 流式细胞分析法可对单个细胞或其它生物微粒进行快速定量分析与分选,是定量检测细胞凋亡的重要方法之一。当细胞发生凋亡时,在细胞学上发生一系列特征性变化,如细胞周期停滞、细胞 DNA 和蛋白质含量降低、细胞

膜通透性改变以及细胞膜皱缩等。但在其程度介于正常细胞与坏死细胞之间, 其它检测方法较难区分时, 通过荧光素染色, 利用流式细胞仪即可解决以下问题: 第一, 细胞凋亡时 DNA 断裂成小片段, 而小分子 DNA 可透出细胞外, 凋亡小体也可带走一部分, 使细胞内 DNA 含量低于正常细胞, 导致 DNA 染色能力下降。用 DNA 染料 PI 染色后, 流式细胞仪上可呈现出亚二倍体核型峰。据亚二倍体峰的高低可计算出凋亡细胞百分率, 同时还可检测细胞表面的标志以确定凋亡细胞种类。该方法简单, 但敏感性较差, 特异性也较差, 漏检率和错检率较高。同时, 凋亡峰形成受到细胞碎片的干扰, 定性有困难。第二, 若根据凋亡细胞膜结构、通透性及转运功能变化, 利用 DNA 特异活性染料 Hoechst 和非特异性 PI 染料, 对细胞进行染色, 在流式细胞仪下测定其荧光强度和分布位置, 可区分凋亡细胞和坏死细胞。一般 Hoechst 被活细胞摄取, 与 DNA 结合, 在紫外光下呈蓝色荧光^[17]。PI 使死细胞着染呈现红色荧光。在细胞二维直方图上, 正常活细胞对染料有拒染性, 蓝色和红色荧光均较少; 凋亡细胞由于膜通透性的改变, 主要摄取 Hoechst 染料, 表现为强蓝色荧光, 弱红色荧光; 死细胞由于很强的 PI 嗜染性并可覆盖 Hoechst 染色, 故呈弱蓝色强红色荧光^[18]。因此, 流式细胞仪检测法是目前较为理想的凋亡定量检测方法。

2.1.4 组织原位标记检测 组织原位标记检测适用于被固定的细胞或组织切片, 有特异性高、敏感性强的特点, 并具有可辨别细胞类型、计数凋亡细胞百分数的优势, 现常用的方法有原位缺口末端标记法和原位缺口平移法。

1) 原位缺口末端标记法 (TUNEL)。脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的原位缺口末端标记法 (TUNEL) 实际上是分子生物学与形态学相结合的研究方法, 对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色, 能准确反映凋亡细胞的生物化学和形态特征, 可用于石蜡包埋切片、冰冻切片、培养细胞和从组织中分离细胞等多种形式的细胞凋亡检测, 而且灵敏度较高。目前被广泛采用的有过氧化酶标记测定法、荧光素标记测定法和简易末端标记测定法等。① 过氧化酶标记测定法。地高辛在 TdT 酶的作用下, 可以掺入到凋亡细胞双链或单链 DNA 的 3'-OH 末端, 与 dATP 形成异多聚体,

并与连接了报告酶(过氧化物或碱性磷酸酶)的抗地高辛抗体结合。在适合底物存在下, 过氧化物酶可产生很强的颜色反应, 特异准确定位出正在凋亡的细胞。在光学显微镜下可观察到正常细胞核着绿色, 凋亡细胞核着棕黄色, 部分细胞质也因核 DNA 碎片的逸出呈阳性着染^[17-19]。② 荧光素标记测定法。凋亡细胞由于内源性核酸内切酶激活, 核 DNA 被切割成许多双链 DNA 片段以及高分子量 DNA 单链断裂点(缺口), 暴露出大量 3'-OH 末端。地高辛 (Dig-dUTP) 在 TdT 酶作用下, 可以掺入到凋亡细胞双链或单链 DNA 的 3'-OH 末端与 dATP 形成异多聚体, 并与荧光连接的抗地高辛抗体在反应部位结合。在 494 nm 激发光下, 从荧光显微镜下可原位特异地显示出凋亡细胞, 并进行计数, 也可使用流式细胞仪进行定量测定。但若选用蓝色激发光, 所有的细胞核均被 PI 着色, 显出红色荧光, 而凋亡细胞被特异地标记上 FITC 显出黄绿色荧光^[18, 20]。该方法可以测定在细胞周期中 DNA 发生断裂的具体时相, 而且灵敏度高。③ 简易末端标记检测法。利用凋亡细胞在核酸内切酶作用下产生粘性末端 DNA 碎片的特征, 根据 Klenow 聚合酶补平的原理, 采用 ³²P 标记的核苷酸对纯化的 DNA 进行末端标记, 便可检测梯状条带中的核苷酸碎片。该法速度较快, 尤其适合微量核苷酸碎片的检出^[21]。

2) 原位缺口平移 (ISNT)。利用 DNA 多聚合酶将核苷酸整合到凋亡细胞内断裂的 DNA 的 3' 末端, 在此同时水解 5' 末端, 利用 Klenow 大片断的 5'-3' 聚合的特性, 将外源掺入的带有生物素标记的游离核苷酸从 3'-OH 末端(起始 5'-3' 方向)连接到断片上, 以修复 DNA。若同时使用已标记的核苷酸, 可显示出有断裂 DNA 的细胞。该方法可以用于细胞悬液中细胞凋亡的观察, 但阳性率较低。

2.1.5 连接介导的 PCR 检测 (LM-PCR) 当凋亡细胞数量少或检测样品量很小(如活体组织切片)时, 琼脂糖电泳很难观察到核 DNA 变化, 而 LM-PCR 梯带检测试剂盒可借助特异性接头, 通过 LM-PCR 专一性地扩增核小体的梯度片段, 从而灵敏地检测凋亡产生的梯度片段。此外, LM-PCR 检测是半定量的, 因此相同凋亡程度的不同样品可进行比较。如果细胞量很少, 还可在分离提纯 DNA 后, 用 ³²P-ATP 和脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 使 DNA 标记, 然后进行电泳和放射自显

影, 观察凋亡细胞中 DNA 梯带的形成. 但该方法特异性不高, 容易受细胞凋亡发生时间的限制^[22], 对于细胞组成不纯的组织, 不能确定与凋亡相关基因的 mRNA 来源于哪类细胞, 所以还应当进行蛋白表达的研究.

2.1.6 端粒酶检测(telomerase detection) 端粒酶是由 RNA 和蛋白组成的一种特殊的核糖核蛋白多聚酶, 它能以自身的 RNA 为模板逆转录合成端粒区重复序列, 以弥补复制造成的端粒缩短. 肿瘤细胞由于端粒酶的激活维持了端粒的长度而获得永生, 而大部分正常体细胞由于缺乏端粒酶活性, 每分裂一次, 染色体的端粒会缩短一些. 利用反义核酸技术, 有效地封闭或抑制肿瘤细胞的端粒酶活性促进肿瘤细胞凋亡, 从而对其进行检测. 但该方法特异性较差.

2.2 依据形态特征的检测

光学显微镜、电子显微镜及流式细胞仪下的细胞形态结构的观察仍然是目前鉴定细胞凋亡的最可靠方法, 而且随着染色技术的不断涌现, 产生了很多检测方法.

2.2.1 光学显微镜检测 细胞涂片或组织切片经过多种染色后, 即可直接在光学显微镜下观察凋亡. 如果同时结合细胞免疫组化方面的手段, 还可判别凋亡细胞的种类. 细胞涂片或组织切片经苏木精-伊红染色后, 细胞核呈蓝黑色, 细胞质呈淡红色; 凋亡细胞在组织中常单个散在分布, 细胞核浓缩、染色致密、有破碎; 而坏死组织则呈均质红染的无结构状态. 经姬姆萨染色后, 凋亡细胞的染色质浓缩, 靠近核膜和核边有聚集现象、核膜有裂解、染色质分割成块和有凋亡小体产生等典型的细胞形态结构变化. 经甲基绿-派若宁染色后, 凋亡细胞的细胞核呈绿色或绿蓝色, 胞质呈红紫色; 而坏死细胞的细胞核染成绿色. 总体来说, 该方法简便易行, 只是检出时期较晚, 主观性较大, 判断标准不易掌握.

2.2.2 倒置显微镜检测 将含有细胞的多孔培养板置倒置显微镜下直接观察、照相, 可发现凋亡细胞一般体积小、有变形, 细胞膜完整但有发泡, 在晚期有凋亡小体. 而坏死细胞的体积肿胀, 细胞膜损坏或裂解成碎片, 有时染色质呈网状. 该方法适用于凋亡过程的动态观察.

2.2.3 荧光显微镜检测 对体外培养的活细胞经荧光素处理后, 可在荧光显微镜下直接观察细胞形

态的改变. 用吖啶橙染色后正常细胞核 DNA 呈黄色或黄绿色的均匀荧光, 细胞质和核仁的 RNA 呈桔黄或桔红色荧光; 凋亡细胞的细胞核或细胞质内有致密浓染的黄绿色荧光, 甚至有黄绿色碎片; 坏死细胞的细胞质内的荧光较弱或无. 而用 Hoechst 33258 染色后活细胞核呈弥散均匀的荧光, 凋亡细胞内可见浓染致密的颗粒状荧光或块状荧光. 该方法方便易行, 应用较多, 但定量和定性方面较差, 故在实际应用中极少被单独使用.

2.2.4 透射电子显微镜检测 电镜下细胞超微结构的观察是迄今为止判断凋亡最经典、最可靠的方法, 被认为是确定细胞凋亡的“金标准”. 在凋亡早期可观察到细胞核染色体发生边聚集, 在核膜周边聚集成新月形, 并随染色体固缩的发生电子密度逐渐增强, 核形不规整, 破裂成碎片, 细胞体积变小, 胞质浓缩, 空泡增多, 细胞膜丫生出泡; 在凋亡晚期还可观察到膜内包裹有较完整细胞器和细胞核碎片的凋亡小体. 但缺点是样品制作过程较复杂, 仪器、设备费用昂贵, 较难广泛大量开展, 而且观察的细胞数量有限, 不适于大批标本的检测, 只能定性, 不能定量.

2.2.5 流式细胞仪下的形态学检测 凋亡细胞体积小、密度大、细胞膜发泡、细胞核破碎, 对激光的反射性与坏死细胞及活细胞不同, 在流式细胞仪上分别表现为前向角散射光(PSC)下降, 侧向角散射光(SSC)增加. 而 PSC 反映细胞大小, SSC 反映细胞的均质性^[23], 因此, 在光散射图谱上, 凋亡细胞的 PSC 低于正常, 而坏死细胞的 PSC 高于正常. 但由于凋亡和坏死细胞内均有较多碎片, 它们的 SSC 均高于正常^[18,24], 因此, 这样不仅可以区分它们, 还可检出凋亡细胞的百分率. 但是 PSC 的下降并非凋亡细胞的特异标志, 机械性损伤和坏死细胞的 PSC 也会下降. 再加上凋亡所造成的形态变化本是一系列形态特征的组合, 凋亡继发的细胞坏死及发生于 G2/M 期的凋亡细胞在这种方法下不易区分, 且定量分析偏差较大.

3 展望

尽管目前已经有不少方法可以检测细胞的凋亡, 象透射电镜、荧光显微镜及流式细胞仪等可大致检测出细胞凋亡的早、中、晚期, 而且能区分凋亡细胞和坏死细胞; PI 染色后用流式细胞仪检测可对大量标本进行检测, Hoechst 结合 PI 染色区

分凋亡细胞和坏死细胞, AnnexinV 联合 PI 检测膜完整性等都是较为理想的方法;尤其是 TUNEL 法既确定细胞凋亡,又显示细胞表面抗原,定性定量的检测更具优势。但它们仍然是在形态学上进行的鉴定,对早期细胞凋亡的发生、信号传导及其机理的研究和诊断还很不够。在生化特征检测方法中,由于取材标本和病变的特点,目前检测的敏感性和特异性均较差,例如 ELISA 法和 Caspases 法能检测凋亡的早、中、晚进程,原位末端标记法能检测中、晚期,琼脂糖凝胶电泳能检测晚期,但它们都不能区分凋亡和坏死。因此,要揭示细胞凋亡与疾病发生之间的内在关系,筛选凋亡相关基因,精确地探究各种基因在凋亡早、中、晚期所发挥的作用和作用机理,进行病理组织分析,指导治疗药物和治疗方法的选择,还有很长的路要走,对更先进的早期检测方法的摸索和完善仍然是今后相关研究的主要方向。

参考文献:

- [1] WALSH G M, DEWSON G, WARDLAW A, et al. A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1998, **217**: 153-163.
- [2] WANG F, HE X W, YAN H L, et al. Non-fusion expression in *Escherichia coli*: single - step purification of recombinant human annexin A5 for detection of apoptosis[J]. *Protein Expression and Purification*, 2006, **45**: 80-87.
- [3] 刘杜先, 张 慧. 细胞凋亡及其研究进展[J]. *高血压专业杂志*, 2002, **8**(11): 627-628.
- [4] 徐 静. 细胞凋亡与线粒体[J]. *中国血液流变学杂志*, 2004, **14**(2): 274-276.
- [5] 庞 涛, 陈婉蓉. 线粒体与细胞凋亡的研究进展[J]. *卫生毒理学杂志*, 2003, **17**(2): 122-123.
- [6] SKULACHEV V P. Cytochrome C in the apoptotic and antioxidant cascades[J]. *FEBS Letters*, 1998, **423**: 275-280.
- [7] LI C X, FAN T J, HU G B, et al. Apoptosis-inducing factor and apoptosis[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, **35**(10): 881-885.
- [8] SCHMIDT - KASTNER R, TRUETTNER J, ZHAO W Z, et al. Differential changes of bax, caspases-3 and p21 mRNA expression after transient focal brain ischemia in the rat[J]. *Molecular Brain Research*, 2000, **79**: 88-101.
- [9] 司少艳, 李新元. 免疫系统与细胞凋亡[J]. *总装备部医学学报*, 1999, **6**(1): 103-104.
- [10] 李 玲. 细胞凋亡的分子机制及其调控因子[J]. *国外医学免疫学分册*, 2002, **25**(6): 317-320.
- [11] WALKER P R, LEBLANC J, SMITH B, et al. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis [J]. *A Companion to Methods in Enzymology*, 1999, **17**: 329-338.
- [12] 郑骏年. 细胞凋亡检测方法研究进展[J]. *国外医学临床生物化学与检测学分册*, 2003, **20**(3): 124-126.
- [13] 彭宗生, 张丽杰, 赵振军. 细胞凋亡检测方法的应用体会[J]. *中国疗养医学报*, 2003, **12**(6): 455.
- [14] O'CALLAGHAN Y C, WOODS J A, O'BRIEN N M. Limitation of the single-cell gel electrophoresis assay to monitor apoptosis in U937 and HepG2 cells exposed to 7β -hydroxycholesterol[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2001, **61**: 1217-1226.
- [15] FRANKFURT O S, KRISHAN A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the specific detection of apoptotic cells and its application to rapid drug screening [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2001, **253**: 133-144.
- [16] 矫毓娟, 刘江红. 细胞凋亡的检测方法[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2004, **11**(1): 53-56.
- [17] 吴 燕. 一种新的细胞凋亡检测方法[J]. *肾脏病与透析移植杂志*, 1996, **5**(4): 93-95.
- [18] 刘建文, 季 光, 魏东芝. *药理实验方法学*[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 60-74.
- [19] TAKASHI E, ASHRAF M. Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers[J]. *Academic Press*, 2000, **32**: 209-224.
- [20] EHERMANN V, SYJORA J, Vera-Delgado J, et al. Flow cytometric detection of spontaneous apoptosis in human breast cancer using the TUNEL-technique[J]. *Cancer Letter*, 2003, **194**: 125-131.
- [21] 彭黎明. 六种细胞凋亡检测方法的比较[J]. *中国病理学杂志*, 1999, **28**(1): 55-56.
- [22] 王嘉宁, 郭 宁. 细胞凋亡的检测技术与方法[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2005, **19**(6): 466-470.
- [23] 苏安英. 细胞凋亡与肿瘤[J]. *邯郸医学专学报*, 1997, **10**(4): 281-284.
- [24] 李 莉, 孔宪涛. 细胞凋亡检测方法评价[J]. *上海医学检验杂志*, 2000, **15**(1): 57-59.