

流式细胞仪每秒进样细胞数对细胞周期分布的影响

唐国华¹, 贺修胜², 龙治峰³, 唐朝克¹

(1. 南华大学 生命科学研究中心, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学 肿瘤所; 3. 南华大学 医学院)

摘要: **目的** 探讨流式细胞仪每秒进样细胞数对被检测细胞的细胞周期影响。 **方法** 以鸡肝细胞为实验对象, 采用不同的每秒进样细胞数检定其 DNA 含量, 以 MultiCycle for Windows 分析软件分析 G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期比值的变化。 **结果** G_0/G_1 期细胞值方差分析显示, $F = 2.7, P > 0.05$; S 期细胞值方差分析, $F = 11.6, P < 0.05$, G_2/M 期细胞值方差分析, $F = 17.4, P < 0.05$ 。表明每秒进样细胞数不同, 其细胞的 S 期、 G_2/M 期比值之间的差异有显著性。 **结论** 每秒进样细胞数影响细胞的 S 期、 G_2/M 期比值, 每秒进样细胞数以 150 ~ 400 个为宜。

关键词: 流式细胞仪; 细胞周期; DNA

中图分类号: Q5-3

文献标识码: A

文章编号: 2095-1116(2011)01-0049-03

Effect of the Cell Number of Sample Injection Per Second on Cell Cycle Distribution

TANG Guo-hua, HE Xiu-sheng, LONG Zhi-feng, et al

(Department of Biology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of the cell number of sample injection per second on cell cycle.

Methods Fowl liver cells were prepared and their DNA content was assayed by different cell numbers of sample injection per second. MultiCycle for Windows software was used for analyzing cell rates of G_0/G_1 , S and G_2/M phrase. **Results**

The statistical analysis indicated that the cell rates of both S and G_2/M phrase had significant differences, but G_0/G_1 phrase cell rate had no statistical significance ($F = 11.6, P < 0.05$; $F = 17.4, P < 0.05$; $F = 2.7, P > 0.05$) among these groups' different cell numbers of sample injection per second. **Conclusion** The cell number of sample injection per second affects cell rates of S and G_2/M phrase and the range from 150 to 400 cells per second was suitable for cell cycle analysis.

Key words: FCM; cell cycle

在生物学研究中, 利用细胞内 DNA 双螺旋结构碱基对与某些核酸荧光染料有良好的亲和力, 荧光染料在激发光的激发下, 产生特定的荧光, 运用流式细胞仪检测、分析其荧光的变化, 了解细胞内 DNA 含量, 已成为科学分析细胞 DNA 含量及其所处周期状态的一种手段^[1,2]。然而, 流式细胞仪对操作者技术要求高, 同一样本不同实验室检测的结果不尽相同; 即使是同一实验室, 不同操作人员检测结果亦不一样。其原因, 既有各实验室评价指标的差

异^[2~4], 也有操作人员个人习惯; 亦有机器本身性能的差异, 选定技术参数不同等等。本文旨在探讨流式细胞仪每秒进样细胞数对待测细胞的周期分布的影响, 以寻求合适的每秒进样细胞数。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

20 只鸡的肝组织, 磷酸盐缓冲液 (pH7.2)、生

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 湖南省自然科学衡阳市联合基金项目 (10JJ9016); 湖南省教育基金项目 (09C834)。

通讯作者: 唐国华, 本科, 高级实验师, E-mail: tgh1@163.com.

理盐水、胃蛋白酶、酒精、碘化丙啶 (PI)、RNase、Triton X-100、过滤网、流式细胞仪(美国 Beckman Coulter company, 型号: Epics Altra HyperSort System)。

1.2 单细胞悬液制备方法

用眼科镊夹肝组织置于 100 目铜网上,轻轻搓揉,边搓揉边冲洗生理盐水,收集细胞悬液,300 目尼龙网过滤,1 500 r/min 离心过滤液 5 min。PBS 液漂洗 1 次,弃 PBS 液,加 70% 冰乙醇,4℃ 保存 48 h,去上清液,以 PBS 漂洗 1 次。再用 PBS 悬浮。

1.3 染色

1.3.1 染液配制 PI 0.2 mg、枸橼酸钠 100 mg、NaCl 156 mg,Triton X-100 1.0% ,RNase1 μg/mL,蒸馏水 100 mL,配制 20 μg/mL PI 去污染液。

1.3.2 细胞染色 将 PBS 悬浮的细胞浓度调制为 1 × 10⁶/mL,取细胞悬液 2 mL,以 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,轻轻摇动,加入浓度为 20 μg/mL PI 去污染液 2.0 mL,避光 20 min,上机。

1.4 机器调试与参数的设定

通过检测标准荧光微球的 CV 值来检查仪器调校情况,使 CV 值 ≤ 2%。采用线性放大,用标准荧光微球检查放大器的线性度。直方图标记荧光道数值至少为 512,细胞 G₀/G₁ 峰荧光道数为 100 以上。细胞 G₀/G₁ 峰荧光道数,通过调节 PMT(光电倍增管)的电压值获得。

1.5 采样方式

每一份样本进行 9 次采样,其采样速度分别是:A(50 ~ 100)、B(150 ~ 200)、C(350 ~ 400)、D(550 ~ 600)、E(750 ~ 800)、F(900 ~ 1 000)、G(1 800 ~ 2 000)、H(3 500 ~ 4 000)、I(5 000 ~ 6 000)细胞/s。

1.6 分析方法

用 MultiCycle for Windows 分析软件分析被采集资料,使用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析。

2 结 果

被采集到的每秒不同进样细胞数资料,经 MultiCycle for Windows 软件分析处理,获得细胞的 G₀/G₁期、S 期、G₂/M 期比值,数据经统计学分析显示:每秒进样细胞数不同,S 期细胞比值不同,其差异有显著性($F = 11.6, P < 0.05$),以 3 500 ~ 4 000 细胞/秒比值最大 24.8% ± 5.6%;G₂/M 期细胞比值亦随每秒进样细胞数不同亦不同,其差异有显著性($F = 17.4, P < 0.05$),以 100 ~ 150 细胞/秒比值

最大 25.6% ± 2.4%,5 000 ~ 6 000 比值最小(12.8 ± 10.7);而 G₀/G₁ 期比值经统计学分析发现差异无显著性($F = 2.7, P > 0.05$);随着每秒进样细胞数的增加,细胞的 S 期比值随之增加,G₂/M 期比值随之减少;细胞的 G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期比值的标准差均逐渐增大(见表 1)。

表 1 流式细胞仪每秒进样细胞数对细胞周期的影响(%)

每秒进样细胞数	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
A 50 ~ 100	67.4 ± 1.0	9.9 ± 0.3	25.6 ± 2.4
B 150 ~ 200	69.5 ± 1.2	7.9 ± 0.2	22.7 ± 2.3
C 350 ~ 400	68.8 ± 1.6	8.6 ± 0.7	22.6 ± 2.1
D 550 ~ 600	67.2 ± 1.8	11.5 ± 0.8	21.3 ± 2.6
E 750 ~ 800	68.7 ± 2.5	11.4 ± 1.0	20.0 ± 3.4
F 900 ~ 1 000	66.5 ± 6.0	14.8 ± 3.1	19.9 ± 5.8
G 1 800 ~ 2 000	71.8 ± 15.1	5.0 ± 2.4	23.2 ± 6.4
H 3 500 ~ 4 000	59.4 ± 12.4	24.8 ± 5.7	15.9 ± 9.8
I 5 000 ~ 6 000	73.7 ± 17.2	13.4 ± 7.3	12.8 ± 10.7
Total	68.8 ± 6.6	11.9 ± 2.8	21.5 ± 6.1

不同每秒进样细胞数所采集到的资料,经 MultiCycle for Windows 软件分析,获得 DNA 含量直方图,图中红色部分代表细胞 G₀/G₁ 期峰。比较不同每秒进样细胞数的 G₀/G₁ 期峰(图 1)所在的位置,结果显示:每秒进样 150 ~ 200 个细胞组的 G₀/G₁ 期峰的位置靠右侧,峰的底部狭窄;而每秒进样 5 000 ~ 6 000 个细胞组的 G₀/G₁ 期峰的位置靠左侧,峰的底部较宽。并且随着每秒进样细胞数的加快 G₀/G₁ 期峰的位置左移,峰的底部也随之变宽。

3 讨 论

核酸荧光染料 PI 可选择性定量嵌入核酸(DNA)双螺旋碱基对之间,在激光激发下,核酸荧光染料产生的荧光强度与 DNA 双螺旋碱基对结合核酸荧光染料的量有关;与核酸染料结合的量越多,表明 DNA 碱基对越多,产生的荧光强度也强。G₀/G₁期细胞是二倍体细胞,其 DNA 含量相同,DNA 碱基对与核酸染料结合的量应该相同,在激光激发下,产生的荧光强度也应相同。G₀/G₁ 期峰的底部的宽、窄是表示 G₀/G₁ 期细胞的异质程度^[1,4],同一份细胞悬液细胞异质程度是稳定的,以同样方式多次资料采集,其结果应基本相同。然而本实验改变每秒进样细胞数,发现反映细胞 DNA 含量的 G₀/G₁

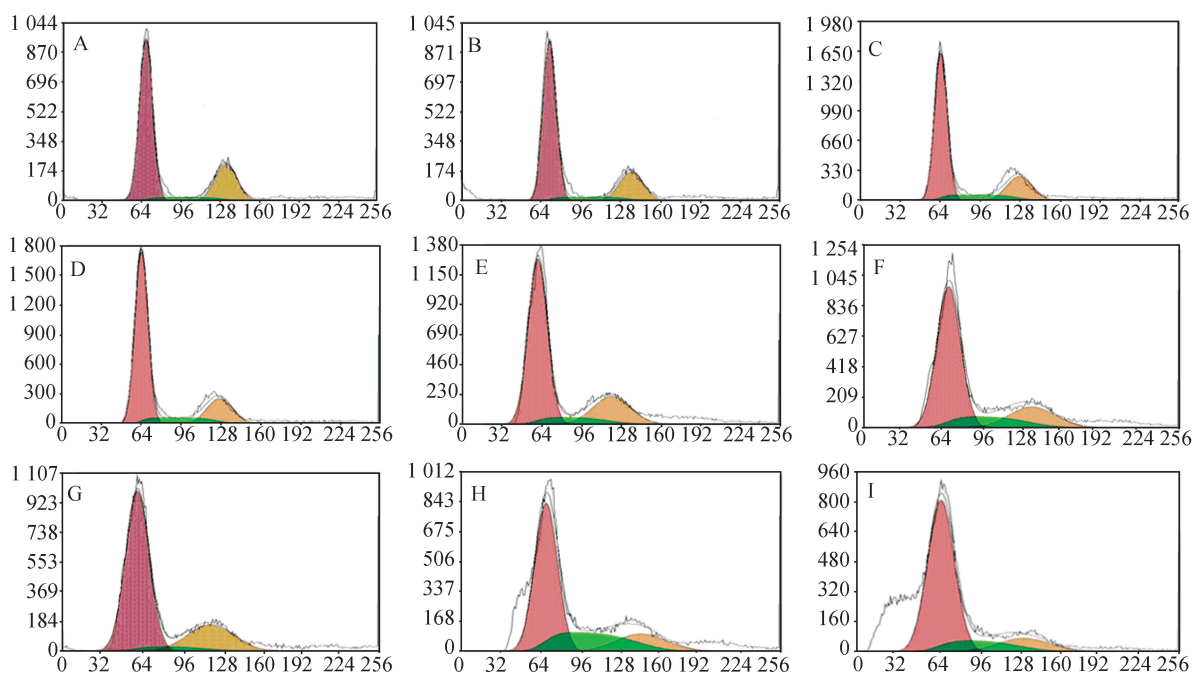


图1 流式细胞仪检测结果

A:每秒采集细胞数为50~100个;B:每秒采集细胞数为150~200个;C:每秒采集细胞数为350~400个;D:每秒采集细胞数为550~600个;E:每秒采集细胞数为750~800个;F:每秒采集细胞数为900~1000个;G:每秒采集细胞数为1800~2000个;H:每秒采集细胞数为3500~4000个;I:每秒采集细胞数为5000~6000个

期峰变化,随着每秒进样细胞数增加而左移;而反映细胞差异程度的 G_0/G_1 期峰的底部,其变化是随着每秒进样细胞数增加而加宽(见图1)。这种现象产生的原因有待进一步研究。

细胞周期是指细胞从上一次分裂结束开始生长到下一次分裂结束终止所经历的过程。在此过程中可分为:细胞分裂的过程(分裂期,M期),细胞生长过程(分裂间期),细胞生长过程包括:在一般情况下不分裂,但受到一定刺激后,可进入细胞周期的 G_0 期,与DNA合成前期(G_1)、DNA合成期(S)、和DNA合成后期(G_2)。由于 G_0 与 G_1 期细胞的DNA含量相同、 G_2 与M期细胞的DNA含量相同,以核酸荧光染料PI标记的流式细胞仪的图像,只能表达为 G_0/G_1 期、S期、 G_2/M 期。试验获得细胞 G_0/G_1 期、S期、 G_2/M 期比值,数据经统计学分析显示:随着每秒进样细胞数不同,其细胞 G_0/G_1 期、S期、 G_2/M 期的构成比亦不同,其S期与 G_2/M 期的差异有显著性;其变化规律是:随着每秒进样细胞数的增加,S期细胞比值随之增加, G_2/M 期比值随之减少(见表1)。因此流式细胞仪的每秒进样细胞数可影响细胞 G_0/G_1 期、S期、 G_2/M 期比值。

同一块组织,其细胞 G_0/G_1 期、S期、 G_2/M 期的构成比例是相对恒定,其表1中的S值(标准差)应接近,而细胞的 G_0/G_1 期、S期、 G_2/M 期比值的S值亦随进样速度增加而增大。本实验结果以每秒进样50~100个细胞组的 G_0/G_1 期、S期、 G_2/M 期比值的S值较小;考虑到检测速度等原因,本文认为,用流式细胞仪分析细胞DNA含量时,每秒进样细胞数以每秒进样150~400个细胞之间为宜。

参考文献:

- [1] 唐国华,何淑雅,贺修胜,等.流式细胞仪进样细胞数对细胞 G_0/G_1 期峰的荧光强度及变异系数的影响[J].中华病理学杂志,2005,34(12):816-817.
- [2] 陶德定,冷彦,覃吉超,等.新鲜肿瘤标本活细胞与固定细胞的DNA含量的分析比较[J].癌症,2001,20(5):502-504.
- [3] 崔巍,牛福玲,何丽云,等.流式细胞术检测细胞凋亡的分析软件比较[J].北京中医药大学学报,2001,24(6):45-47.
- [4] Rabinovich PS. Multicycle DNA content and cell cycle analysis software[J]. University of Washington,1998,18-52.

(此文编辑 蒋湘莲)