

• 论 著 •

流式细胞术检测细胞亚群存活率的应用研究*

刘 阳¹, 赖 翼¹, 李敏惠¹, 杨淑霞¹, 郑 静¹, 阳 泰¹, 李丽梅¹, 邓 勇¹,
张 强¹, 任荣梅¹, 李钱梅¹, 张 帅¹, 李 华², 邹 强^{1△}

(1. 成都医学院科研中心 610083; 2. 成都军区总医院肿瘤科 610083)

摘 要:目的 采用流式细胞术直接检测小鼠脾细胞中 T 细胞与 Treg 细胞存活率, 探讨流式细胞术测定混合细胞中细胞亚群存活率的可行性。方法 荧光抗体及碘化丙锭联合使用, 测定小鼠脾细胞中 T 细胞与调节性 T 细胞的存活率。结果 使用流式细胞术测定脾细胞中 T 细胞存活率时, $r^2=0.992\ 5$, 斜率为 1.012; 测定调节性 T 细胞存活率时, $r^2=0.983\ 1$, 斜率为 0.982 3。结论 流式细胞术可以应用于测定混合细胞中细胞亚群的存活率, 为药物筛选提供新的选择。

关键词:流式细胞术; 存活率; 细胞; 细胞亚群

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)02-0130-02

Detection on survival rate of different cell subpopulations in mixed cell population by flow cytometry*

Liu Yang¹, Lai Yi¹, Li Minhui¹, Yang Shuxia¹, Zheng Jing¹, Yang Tai¹, Li Limei¹, Deng Yong¹,
Zhang Qiang¹, Ren Rongmei¹, Li Qianmei¹, Zhang Shuai¹, Li Hua², Zou Qiang¹

(1. Research Center, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China;

2. Cancer Center, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China)

Abstract: Objective To detect cell survival rate of T cell and Treg cell in spleen cells by flow cytometry for finding out whether flow cytometry could be used for the detection of cell subpopulation survival rate in mixed cell population. **Methods** Flow cytometry was used to detect cell survival rate of T cell and Treg cell in spleen cells of mouse with fluorescent antibody and propidium iodide. **Results** For the detection on cell survival rate of T cell, the r^2 and slope of flow cytometry were 0.992 5 and 1.012 respectively, and for Treg cell, were 0.983 1 and 0.982 3 respectively. **Conclusion** Flow cytometry could be utilized for detecting cell survival rate of subpopulation in mixed cell population and provide another choice of drug screening.

Key words: flow cytometry; survival rate; cells; cell subpopulation

流式细胞术测定细胞时, 细胞流速越快, 单位体积所含细胞数量越多, 且细胞流速与细胞数量呈正比。因此, 流式细胞术、MTT 比色法及台盼蓝染色排除法在药物筛选、细胞增殖测定及药物毒性测定时, 均可测定细胞存活率^[1-5]。但 MTT 比色法及台盼蓝染色排除法无法直接测定混合细胞中细胞亚群存活率^[6], 比如在脾细胞中测定 T 细胞、B 细胞以及调节性 T 细胞(Treg)等的存活率。需从混合细胞中纯化出细胞亚群再进行检测, 这无疑给药物筛选增加了操作步骤与实验成本。检测细胞亚群的荧光抗体以及区分死活细胞的荧光染料联合使用^[7], 流式细胞术能实现直接测定混合细胞中细胞亚群存活率。本文以检测小鼠脾细胞中 T 细胞与 Treg 细胞存活率为例, 探讨流式细胞术测定混合细胞中目的细胞亚群存活率的应用, 为相关实验中选择合适的检测方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM 培养基购自 GIBCO 公司, PI 购自 Sigma 公司, APC 标记小鼠 CD3 抗体与 APC 标记小鼠 CD4 抗体购自 BD Pharmingen 公司。

1.2 主要仪器 BD FACS Calibur 流式细胞仪, Thermo Forma 3100 CO₂ 细胞培养箱。

1.3 方法

1.3.1 流式细胞术测定小鼠脾细胞中 T 细胞的存活率 取 Balb/c 小鼠脾脏, 按照常规方法制备单个脾细胞悬液。然后置于 37℃, CO₂ 浓度为 5% 的条件下培养。24 h 后取出细胞, 将

每管 T 细胞数调整至 60×10^3 。将此细胞数下的活 T 细胞设定为理论活 T 细胞含量 100%, 并以此为基础进行稀释得到 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5% 的样品。然后, 每管样品均染色 APC 标记的小鼠 CD3 抗体 30 min, 再染色 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 PI 10 min, 使用流式细胞仪测定 PI 阴性、CD3 阳性的细胞流速。

1.3.2 流式细胞术测定小鼠脾细胞中 Treg 细胞存活率 取 Foxp3-EGFP 转基因小鼠脾脏, 按照常规方法制备单个脾细胞悬液。然后置于 37℃, CO₂ 浓度为 5% 的条件下培养。24 h 后取出细胞, 将 Treg 细胞数调整至 6×10^3 。将此细胞数下的活 Treg 细胞设定为理论活 Treg 细胞含量 100%, 并以此为基础进行稀释得到 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5% 的样品。然后, 每管样品均染色 APC 标记的小鼠 CD4 抗体 30 min, 再染色 5 $\mu\text{g/mL}$ PI 10 min, 使用流式细胞仪测定 PI 阴性、CD4 阳性 EGFP 阳性细胞流速。

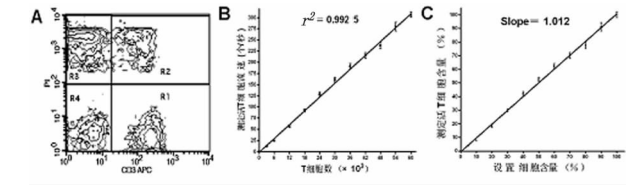
1.3.3 统计学处理 数据统计采用 SPSS14.0 统计软件。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。使用线性相关系数(r^2)与斜率(Slope)评价理论细胞含量与测定细胞存活率之间的线性相关关系。

2 结 果

2.1 流式细胞术测定小鼠脾细胞中 T 细胞与 Treg 细胞的存活率, 见图 1。首先在 FSC-H 与 SSC-H 的二维图中圈出脾细

* 基金项目: 教育部科学技术研究重点资助项目(209104); 四川省青年科技基金资助项目(2010A08-443); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-09-0888); 成都医学院科研基金资助项目(CYZ09-019)。△ 通讯作者: E-mail: qiangzou99@gmail.com。

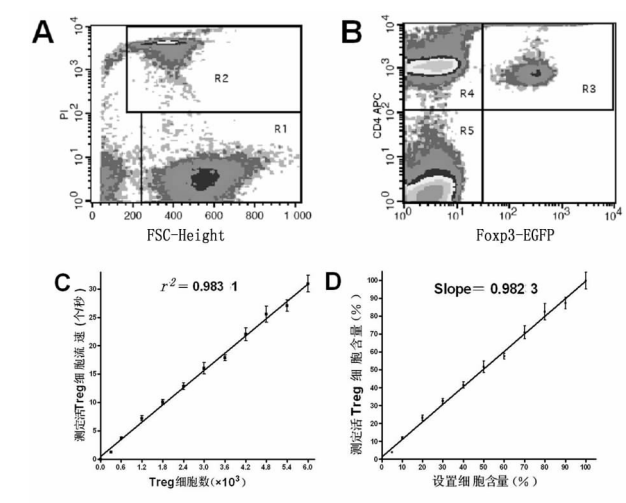
胞,在脾细胞中以 APC-CD3 荧光强度为横坐标,PI 荧光强度为纵坐标,圈出活 T 细胞($CD3^+PI^-$),如图 1A 中 R1,测定各种细胞数下 R1 内细胞流速, $r^2=0.992\ 5$ (图 1B),斜率为 1.012 (图 1C)。



A. R1($CD3^+PI^-$)为活 T 细胞,R2($CD3^+PI^+$)为死 T 细胞,R3($CD3^-PI^+$)与 R4($CD3^-PI^-$)为脾细胞中除 T 细胞外的其他细胞,其中 R3 为死细胞,R4 为活细胞。

图 1 流式细胞术测定小鼠脾细胞中 T 细胞的存活率

2.2 流式细胞术测定小鼠脾细胞中 Treg 细胞的存活率,见图 2。首先圈出 PI 阴性的脾细胞(图 2A),在此基础上,以 Foxp3-EGFP 荧光强度为横坐标,APC-CD4 荧光强度为纵坐标,圈出 Treg 细胞($PI^-EGFP^+CD4^+$),如图 2B 中 R3,测定各种细胞数下 R3 内细胞流速, $r^2=0.983\ 1$ (图 2C),斜率为 0.982 3(图 2D)。



A. R1(PI^-)代表活脾细胞,R2(PI^+)代表死脾细胞;B. R3($CD4^+EGFP^+$)代表 Treg 细胞,R4($CD4^+EGFP^-$)代表 $CD4^+$ 细胞中除 Treg 外的其他细胞,R5($CD4^-EGFP^-$)代表 $CD4^-$ 细胞。

图 2 流式细胞术测定小鼠脾细胞中 Treg 细胞的存活率

3 讨论

流式细胞术测定脾细胞中 T 细胞与 Treg 细胞存活率时,测定数据稳定,线性关系较好。因此,流式细胞术不仅可以用于单一细胞株存活率测定,应用于检测混合细胞中细胞亚群存活率时,更能体现出其优越性。

流式细胞术测定脾细胞中 Treg 细胞存活率时,线性关系($r^2=0.992\ 5$)不如测定 T 细胞($r^2=0.983\ 1$)好。其原因推测为 Treg 细胞含量较低,仅占 T 细胞的 1%~2%。因此,进样时,Treg 细胞的浓度较低。而低浓度的细胞进样时,流速的 CV 值高于高浓度的细胞。所以,测定脾细胞中 Treg 细胞存活率的线性关系比不上测定 T 细胞。

使用绝对计数管,流式细胞术可以进行细胞亚群的绝对计数,比如对骨髓中的干细胞进行绝对计数^[8]。但绝对计数管的高成本,限制其广泛应用于各种科研领域。而且,药物筛选时不需要进行活细胞的绝对计数,只需以不给药的细胞为对照,

检测给药后细胞的相对存活率即可^[9]。

MTT 比色法以及台盼蓝染色排除法常应用于细胞存活率测定,但均无法直接测定混合细胞中细胞亚群存活率^[10]。流式细胞术测定细胞时,流速与细胞数量呈正比,搭配不同的荧光抗体与区分活细胞与死细胞的荧光染料,可应用于测定混合细胞中细胞亚群存活率。但测定时有几点需要注意:抗体染色时,直接将抗体加入细胞培养基中,染色完成后直接检测,不能离心洗涤,这样会增加阴性细胞群信号,影响弱阳性样本的检测准确性;上样检测的初始 5 s,样品流速较快,不稳定,需要等待样品运行至少 5 s 后才能采集数据;检测速度比不上 CCK-8 比色法,但通过加配自动进样器直接检测 96 孔板,提高检测速度。希望以上经验对科研工作者在药物筛选时测定原代细胞存活率,选择合适的方法提供参考。

参考文献

- [1] Raut U, Narang P, Mendiratta D, et al. Evaluation of rapid MTT tube method for detection of drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to rifampicin and isoniazid[J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2008, 26(3): 222.
- [2] Correa GTB, Veranio GAC, Silva LE, et al. Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by Trypan Blue assay[J]. Journal of Applied Oral Science, 2009, 17(5): 457-461.
- [3] El Touny LH, Henderson F, Djakiew D. Biochanin a reduces drug-induced p75NTR expression and enhances cell survival; a new in vitro assay for screening inhibitors of p75NTR expression[J]. Rejuvenation Research, 2010, 13(5): 527-537.
- [4] Sen A, O'Malley K, Wang Z, et al. Paxillin regulates androgen- and epidermal growth factor-induced MAPK signaling and cell proliferation in prostate cancer cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(37): 28787-28795.
- [5] Zwolak P, Manivel JC, Jasinski P, et al. Cytotoxic effect of zole-dronic acid-loaded bone cement on giant cell tumor, multiple myeloma, and renal cell carcinoma cell lines[J]. The Journal of Bone and Joint Surgery, 2010, 92(1): 162.
- [6] Wang K, Yan J, Zhang B, et al. Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells[J]. Cancer Letters, 2009, 278(1): 65-72.
- [7] Golay J, Bologna L, André PA, et al. Possible misinterpretation of the mode of action of therapeutic antibodies in vitro: homotypic adhesion and flow cytometry result in artefactual direct cell death [J]. Blood, 2010, 116(17): 3372.
- [8] Okada S, Makino H, Nagumo A, et al. Circulating CD34-positive cell number is associated with brain natriuretic peptide level in type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Care, 2008, 31(1): 157.
- [9] Hosomi H, Akai S, Minami K, et al. An in vitro drug-induced hepatotoxicity screening system using CYP3A4-expressing and gamma-glutamylcysteine synthetase knockdown cells[J]. Toxicology in Vitro, 2010, 24(3): 1032-1038.
- [10] Sims JT, Plattner R. MTT assays cannot be utilized to study the effects of STI571/Gleevec on the viability of solid tumor cell lines [J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2009, 64(3): 629-633.