

• 论 著 •

流式细胞术检测细胞存活率的方法学建立^{*}

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, 邹 强¹, 李 华^{2△}

(1. 成都医学院科研中心 610083; 2. 中国人民解放军成都军区总医院肿瘤科, 成都 610083)

摘 要:目的 探讨流式细胞术测定细胞存活率的可行性及准确性, 为药物筛选、细胞增殖测定、药物毒性检测等提供新的选择。**方法** 使用流式细胞术、CCK-8 比色法以及台盼蓝染色排除法测定 Jurkat 细胞存活率。**结果** 使用流式细胞术, 细胞浓度大于 10^5 /mL 时, CV 值小于 5%; 细胞浓度小于 10^4 /mL 时, CV 值为 5%~10%。使用流式细胞术 r^2 为 0.993 5, 斜率为 0.999 4; 使用 CCK-8 比色法 r^2 为 0.991 2, 斜率为 1.011; 使用台盼蓝染色排除法 r^2 为 0.969 8, 斜率为 1.057。**结论** 流式细胞术进样流速稳定, 且与活细胞数量成正比, 可用于测定细胞存活率。

关键词: 流式细胞术; 辛卡利特; 台盼蓝染色排除法; 细胞流速

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)15-1663-02

Development of an assay for the detection of the survival rates of cells 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, Zou Qiang¹, Li Hua^{2△}

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

2. Department of Oncology, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China)

Abstract: **Objective** To investigate the feasibility and accuracy of flow cytometry (FCM) for the detection of the survival rates of cells to provide another choice of drug screen, cell proliferation assay and drug toxicity assay. **Methods** Flow cytometry, CCK-8 and trypan blue staining technique was performed for the detection of the survival rates of Jurkat cells. **Results** The coefficient of variation (CV) of FCM was less than 5%, when the cell concentration exceed 10^5 /mL and was 5%—10%, when the cell concentration was below 10^5 /mL. The r^2 and slope of FCM were 0.993 5 and 0.999 4 respectively, those of CCK-8 were 0.991 2 and 1.011 respectively and those of trypan blue staining technique were 0.969 8 and 1.057 respectively. **Conclusion** The flow rate of sample introduction of FCM could be stable and with direct proportion with the amount of viable cells. FCM could be used for the detection of the survival rate of cells.

Key words: flow cytometry; sincalide; trypan blue technique; cell detection speed

细胞存活率检测被广泛应用于多个科研领域, 如药物筛选^[1]、细胞增殖测定^[2]、药物毒性测定^[3]、肿瘤药敏实验^[4]等。目前常用检测细胞存活率的方法有 MTT 比色法^[5]、CCK-8 (cell counting kit-8) 比色法^[6]、台盼蓝染色排除法^[7]等。这些方法的检测对象仅适用于单一细胞群, 若检测对象为混合细胞群, 需要从混合细胞中纯化目的细胞亚群, 不仅增加步骤及成本, 也观察不到多种细胞相互作用下目的细胞亚群的变化。

利用流式细胞术, 通过荧光抗体与微球, 可检测混合细胞中目的细胞亚群, 比如对骨髓中的干细胞进行绝对计数^[8]。但含微球的绝对计数管成本高, 且药物筛选时不需要进行活细胞的绝对计数, 只需测定给药后细胞的相对存活率。由于流式细胞仪测定细胞时, 单位时间内采集目的细胞的数量即细胞流速相对稳定。样品中细胞浓度越高, 检测时流速越快。因此, 联合使用区分活细胞与死细胞染料, 比如碘化丙啶 (PI)、7-氨基放线菌素 D 或 eFluor 660 等, 以及检测细胞亚群的荧光抗体, 可测定混合细胞群中目的细胞亚群的活细胞流速, 以不给药时活细胞流速为对照, 计算细胞存活率。

目前尚无利用流式细胞术测定活细胞流速以评价细胞存活率的文献报道。本文使用流式细胞术测定人 T 淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat 存活率, 并与常规 CCK-8 比色法以及台盼蓝染色排除法相比较, 评价新方法的可行性及准确性, 为应用于检测混合细胞中目的细胞亚群存活率奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人 T 淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat 细胞购自美国模式培养物集存库 (ATCC)。

1.2 仪器与试剂 BD FACS Calibur 流式细胞仪、Biotek Powerwave 全波长酶标仪、尼康 TS100 倒置显微镜、RPMI-1640 培养基购自 GIBCO 公司、CCK-8 购自 Dojindo 公司、PI 与台盼蓝购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 流式细胞仪细胞进样流速的稳定性 Jurkat 细胞使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基并置于 37 ℃, 5% CO₂ 条件下培养。调整细胞浓度至 10^6 /mL、 10^5 /mL、 10^4 /mL 及 10^3 /mL。5 μg/mL PI 染色 10 min 后, 使用流式细胞仪测定 PI

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81072455); 教育部科学技术研究重点项目资助 (No. 209104); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助 (NCET-09-0888)。△ 通讯作者, E-mail: huali99@gmail.com。

阴性 Jurkat 细胞流速。

1.3.2 流式细胞术、CCK-8 比色法及台盼蓝染色排除法测定 Jurkat 细胞存活率 将 Jurkat 细胞浓度调整至 $1.25 \times 10^6/\text{mL}$, 体积 $200 \mu\text{L}$, 细胞数 250×10^3 。将此细胞数下的活细胞设定为理论活细胞含量 100%, 并以此为基础稀释得到理论活细胞含量分别为 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1% 的样品, 其对应的活细胞分别为 225×10^3 、 200×10^3 、 175×10^3 、 150×10^3 、 125×10^3 、 100×10^3 、 75×10^3 、 50×10^3 、 25×10^3 、 12.5×10^3 、 2.5×10^3 。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI 染色 10 min 后, 使用流式细胞仪测定 PI 阴性 Jurkat 细胞流速; 将上述样品加入 96 孔平底板, 每孔体积 $200 \mu\text{L}$, 加入 CCK-8 约 3 h 后, 使用酶标仪测定 450 nm 的光吸收值(OD); 使用台盼蓝染色上述样品后, 使用血细胞计数板在倒置显微镜下进行活细胞计数。

1.4 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。使用变异系数(CV)评价各种方法所得测定值的离散程度, 使用线性相关系数(r^2)与斜率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 4 种细胞浓度下测定流式细胞仪细胞进样流速的稳定性 4 种细胞浓度下, CV 值均小于 10%, 浓度大于 $10^5/\text{mL}$ 时, CV 可小于 5%。因此, 流式细胞仪进样流速稳定。

2.2 流式细胞术测定 Jurkat 细胞存活率 以 FSC-H 为横坐标, PI 荧光强度为纵坐标, 圈出活 Jurkat 细胞后, 测定活细胞流速, 再以细胞数为横坐标, 12 种细胞数下测得的活细胞流速为纵坐标, 得到 r^2 为 0.993 5, 以理论活细胞含量为横坐标, 测定的相对活细胞流速为纵坐标, 得到斜率为 0.999 4。

2.3 CCK-8 比色法测定 Jurkat 细胞存活率 以细胞数为横坐标, 12 种细胞数下测得的 OD(450 nm) 为纵坐标, r^2 为 0.991 2。以理论活细胞含量为横坐标, 扣除检测背景的相对 OD 值为纵坐标, 斜率为 1.011。

2.4 台盼蓝染色排除法测定 Jurkat 细胞存活率 以细胞数为横坐标, 12 种细胞数下测得的活细胞数为纵坐标, r^2 为 0.969 8。以理论活细胞含量为横坐标, 测定的相对活细胞数为纵坐标, 斜率为 1.057。

2.5 比较 3 种测定细胞存活率的方法 上述 3 种方法测定 Jurkat 细胞存活率, 流式细胞术 CV 值为 $(5.355 \pm 1.275)\%$, r^2 为 $0.992 3 \pm 0.001 2$, 斜率为 $0.998 1 \pm 0.001 8$; CCK-8 比色法 CV 值为 $(5.466 \pm 1.741)\%$, r^2 为 $0.990 8 \pm 0.000 7$, 斜率为 1.009 ± 0.004 ; 台盼蓝染色排除法的 CV 值为 $(12.750 \pm 5.246)\%$, r^2 为 $0.964 6 \pm 0.004 6$, 斜率为 1.060 ± 0.005 。因此, 流式细胞术与 CCK-8 比色法测定细胞株存活率时稳定性与线性关系良好。台盼蓝染色排除法的稳定性与线性关系不如前 2 种方法。

3 讨 论

流式细胞术与 CCK-8 比色法数据稳定、线性关系良好。台盼蓝染色排除法测定时稳定性与线性关系不如前 2 种方法。这可能与台盼蓝染色时间、血细胞计数板的操作、细胞沉降时间以及镜下计数等因素有关。

MTT 比色法是最早使用的测定细胞存活率的比色法^[9],

CCK-8 比色法在 MTT 比色法的基础上进行了技术改良, 克服了 MTT 还原的蓝紫色甲臞不溶于水的缺点, 具有更高的检测稳定性及灵敏度^[10]。台盼蓝染色排除法也广泛应用于测定细胞存活率, 但使用时多种操作因素影响其检测稳定性。细胞存活率分析仪可减少因人为因素造成的检测波动。它基于台盼蓝染色排除法, 以流动的细胞作为样品室, 对每份样品都作 100 等份连续的拍照取图, 采集足够的数据使每个样品的检验准确度得到最大的保障^[7]。但这两类方法均无法直接测定混合细胞中的细胞亚群存活率。

流式细胞术测定细胞时, 以细胞流速评价细胞数量。流速越快, 其单位体积所含细胞数量越多, 且流速与细胞数量成正比。联合使用区分活细胞与死细胞的染料, 可以用于细胞存活率测定。而且, 结合不同的荧光抗体还可测定混合细胞中细胞亚群存活率, 可为药物筛选、细胞增殖测定、药物毒性测定中进行细胞存活率测定选择合适的方法提供参考。

参考文献

- [1] Li Q, Maddox C, Rasmussen L, et al. Assay development and high-throughput antiviral drug screening against Bluetongue virus[J]. Antiviral Res, 2009, 83(3): 267-273.
- [2] Ye YW, Wu JH, Wang CM, et al. Sox17 regulates proliferation and cell cycle during gastric cancer progression[J]. Cancer Lett, 2011, 307(2): 124-131.
- [3] Yan F, Zhang C, Zheng Y, et al. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity[J]. Nanomedicine, 2010, 6(1): 170-178.
- [4] Wang CX, Huang LS, Hou LB, et al. Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain tumor model[J]. Brain Res, 2009, 1261: 91-99.
- [5] Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, et al. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis[J]. Biomaterials, 2003, 24(7): 1121-1131.
- [6] Chen CL, Lin CF, Chang WT, et al. Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway[J]. Blood, 2008, 111(8): 4365-4374.
- [7] Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods[J]. Methods Mol, 2011, 740: 7-12.
- [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): 157-158.
- [9] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [10] Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay[J]. Anal Commun, 1999, 36(2): 47-50.

(收稿日期: 2011-06-10)