

PI 法和 Annexin V/PI 法检测蓝舌病毒 HbC₃ 诱导 人肝癌细胞的凋亡*

汪 艳¹, 刘春新¹, 易有荣¹, 崔冶建¹, 朱 珺², 董长垣^{2**}

(1. 武汉大学医学结构生物学研究中心, 湖北武汉 430071; 2. 武汉大学医学院病毒研究所分子病毒与癌研究室, 湖北武汉 430071)

Detection of Apoptosis of the Human Hepatic Carcinoma Cells

Induced by Bluetongue Virus by PI and Annexin V/PI Staining Methods

WANG Yan¹, LIU Chun-xin¹, YI You-rong¹, CUI Ye-jian¹, ZHU Jun², DONG Chang-yuan^{2**}

(1. Center of Medical Structural Biology, Wuhan University School of Medicine Wuhan University, wuhan 430071, China;

2. Laboratory of Virus and Cancer, Institute of Virology, Medical College, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Flow cytometry was used to quantify the percentage of apoptotic hepatic Caracimoma cells infected with bluetongue virus HbC₃ and stained with propidium iodide (PI) and Annexin V/PI. The percentages of the apoptotic cells measured by PI at 24h, 36h and 48h were 10.8 ±3.05, 21.7±6.28, 28.3±10.6, respectively, and those by Annexin V-PI were 20.42±3.70, 49.3±8.11, 79.6±11.5, respectively. The two staining methods and the rate of apoptotic cells infected by bluetengue virus hours were significantly different ($P<0.01$). The early apoptotic cells and secondary necrosis could be detected by AnnexinV/PI assay with good sensitivity and specificity. The apoptotic cells induced by bluetengue virus was one of the important forms in the pathological changes and cell necrosis.

Key words: Propidium iodide (PI); Annexin V-PI; Apoptosis; Flow cytometry

摘要: 利用流式细胞仪比较 PI 法和 Annexin V/PI 法检测不同时间人肝癌细胞感染蓝舌病毒 HbC₃ 的凋亡率分析。结果: PI 法在 24h、36h、48h 的凋亡率分别为 10.8 ±3.05、21.7±6.28、28.3±10.6; Annexin V/PI 法的凋亡率分别为 20.42±3.70、49.3±8.11、79.6±11.5。二种方法及不同时间感染病毒细胞的凋亡率之间有显著差异 ($P<0.01$)。证明了 Annexin V/PI 法能特异地、准确地检出早期凋亡的细胞、继发性坏死的细胞, BTV-HbC₃ 诱导 Hep-3B 细胞凋亡是致肿瘤细胞病变、死亡的重要表现形式之一。

关键词: Propidium iodide (PI); Annexin V/PI; 凋亡; 流式细胞仪

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0253-04

细胞凋亡在个体系统发育、分化, 特别是个体在多种外界刺激时所形成的特定生物学效应方面具有重要的意义。引起人们重视凋亡与肿瘤的研究的原因主要有两个。第一, 诱导癌细胞的凋亡才能使癌缩小或消失; 第二凋亡是机体防止、清除体内受损伤而不予以修复的细胞、癌前病变、基因发生改变的细胞^[1,2]。对肿瘤治疗, 大多数化疗和放疗手段均通过诱导肿瘤细胞凋亡机制进

行。目前, 很多病毒能诱导肿瘤细胞的凋亡而达到治疗肿瘤的目的^[3]。蓝舌病毒是 dsRNA 病毒, 属于呼肠孤病毒科环状病毒属的代表种, 主要危害绵羊及野生反刍动物, 导致这类被感染动物高死亡率的致病性病毒^[6]。本文拟探讨不感染人正常细胞, 不引起人任何疾病的动物蓝舌病毒 HbC₃ (Bluetongue Virus HbC₃ strain, BTV- HbC₃) 是否诱导人肿瘤细胞凋亡的能力; 比较两种不同

收稿日期: 2005-11-30, 修回日期: 2006-02-16

* 基金项目: 国家自然科学基金 (3027147)

作者简介: 汪 艳 (1970-), 女, 湖北省籍, 医学硕士, 从事分子病毒学与癌研究。

** 通讯作者: 董长垣 (1949-), 男, 湖北省籍, 教授, 从事分子病毒学与癌研究。Corresponding author. E-mail: dchangyuan @163.com

染色方法经流式细胞仪检测蓝舌病毒 HbC₃ 株诱导人肝癌细胞 Hep-3B 的凋亡情况。

1 材料和方法

1.1 病毒与细胞

蓝舌病毒 HbC₃ 株、人肝癌细胞 Hep-3B 由武汉大学医学院病毒所肿瘤病毒研究室所提供, Vero 细胞由本室常规保存。

1.2 试剂与仪器

PI (sigma) 染液的配制: 将 PI 溶于 PBS (pH7.4) 中, 终浓度为 100 μ g/mL, 含 RNase 100 μ g/mL、0.1% Triton X-100; Annexin V/PI 试剂盒 (Bender Medsystem, USA); EPICS ALTRA II 流式细胞仪 (Beckman, USA)。

1.3 BTV- HbC₃ 接种 Hep-3B 细胞实验

Hep-3B 细胞采用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养, 常规法培养传代 Hep-3B 细胞分别于 25mL 八个培养瓶里。设不接种病毒对照组与接种病毒感染组。以 0.1mL 病毒悬液 (10⁴TCTD₅₀) 分别接种 BTV- HbC₃ 于 6 瓶 Hep-3B 细胞; BTV-HbC₃ 吸附细胞 1h 后, 弃病毒液, 用 PBS 洗细胞三次, 然后加入含 2% 小牛血清的 DMEM 培养基维持培养, 第 3 天收集所有细胞。

1.4 流式 PI 染色法

收集培养液和消化下来的细胞离心, 调整细胞浓度为 1 \times 10⁶, 加入 75% 冰乙醇固定, 放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 离心、洗细胞出去乙醇后, 加入事先配好 1mL PI 染液, 4 $^{\circ}$ C 避光 30 min, 上流式细胞仪检测。

1.5 流式 Annexin V/PI 法

以 1: 4 稀释 binding buffer (50mL buffer + 150mL 蒸馏水), 在稀释的 buffer 重悬细胞, 并调整细胞浓度 2 \times 10⁵/mL, 取 195 μ L 细胞悬液加入 5 μ L Annexin V-FITC, 室温孵育 10 min, 洗细胞 n 次后, 再重悬细胞于 190 μ L binding buffer, 加入 10 μ L PI, 室温孵育 10 min, 上流式细胞仪检测。

1.6 流式细胞仪分析

PI 法、Annexin V/PI 法以氩离子激光器 488nm 为激发波, 单染 PI 法使用单通道 620nm 绿色荧光检测细胞, 双染 Annexin V/PI 法分别以 525nm、620nm 红色荧光和绿色荧光检测细胞, 经流式细胞仪 EXPO32 MultiCOMP 测量软件检测每个样品 10 000 个细胞。测量结果分别用不同软件处理, 单染 PI 法采用 Multicycle 软件分析 10 000 个细胞中凋亡细胞所占的比率。双染 Annexin V/PI 法可直接测得每个样本 10 000 个细胞中正常细胞、早期凋亡、晚期凋亡、死亡细胞所占的比例。

2 结果

2.1 流式 PI 法检测结果

流式细胞仪 PI 法检测肝癌细胞感染 BTV-HbC₃ 在 24h、36h、48h 的凋亡百分率。结果显示, 随着 BTV-HbC₃ 感染时间延长, G₀G₁ 前亚二倍体峰即凋亡峰增高 (见图 1)。

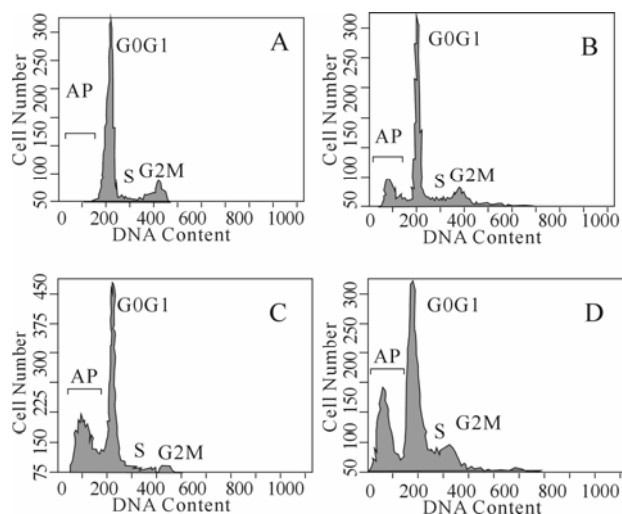


图 1 PI 法检测 BTV-HbC₃ 诱导 Hep-3B 细胞的凋亡
Fig. 1 Detection of apoptosis of the human hepatic carcinoma 3B cells induced by Bluetongue Virus HbC₃ with PI staining method

A: Hep-3B cells untreated, AP-apoptosis, G₀G₁DNA-G₀G₁ synthetic static prophase, S-DNA synthetic phase, G₂M-DNA synthetic anaphase and mitosis. B-D: Hep-3B cells infected BTV- HbC₃ in the post 24h, 36h, 48h time, respectively.

2.2 流式 Annexin V/PI 法检测结果

流式细胞仪 Annexin V/PI 法检测肝癌细胞感染 BTV-HbC₃ 在 24h、36h、48h 的凋亡百分率。结果

显示随着 BTV-HbC₃ 感染时间延长, 早期 Annexin V⁺/PI⁻ (B4 区)、晚期凋亡 Annexin V⁺/PI⁺ (B2 区) 的细胞明显增加 (见图 2)。

2.3 流式 PI 法与 Annexin V/PI 法结果比较

采用流式两种染色方法、不同作用时间的检测 BTV-HbC₃ 感染 Hep-3B 细胞结果有显著性差异 ($P < 0.01$, 见表 1)。Annexin V/PI 法检测细胞感染病毒 48h, 早期、晚期凋亡细胞显著性高于其它时间实验组。PI 法检测的凋亡率明显低于 Annexin V/PI 法, 人肝癌细胞的凋亡率与作用时间呈正相关 (见图 3)。

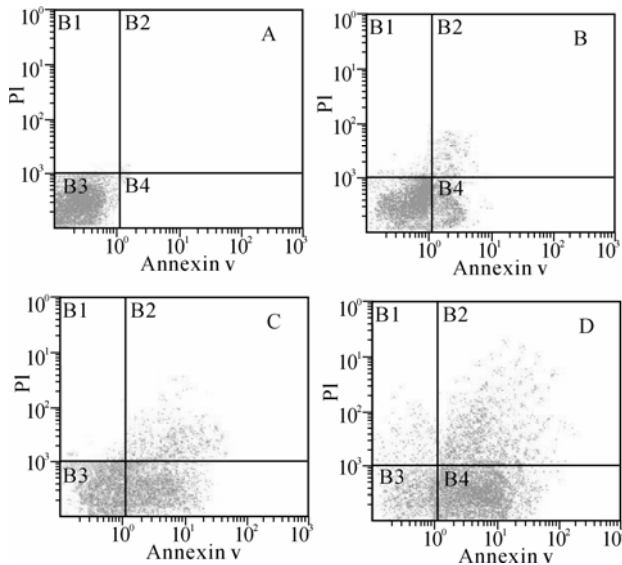


图2 Annexin V/PI法检测 BTV-HbC₃ 诱导 hep-3B 细胞的凋亡

Fig. 2 Detection of apoptosis of the human hepatic carcinoma 3B cells induced by Bluetongue virus HbC₃ with Annexin V/PI staining method

A: Hep-3B cells untreated. B1 area-mechanical damage Annexin V⁻/PI⁺, B2 area -secondary necrosis Annexin V⁺/PI⁺. B3 area-normal cell Annexin V⁻/PI⁻, B4 area-early apoptosis Annexin V⁺/PI⁻. B-D: Hep-3B cells infected BTV- HbC₃ in the post 24h, 36h, 48h, respectively.

表1 流式 PI 法、Annexin V/PI 法检测人肝癌细胞凋亡百分率 ($\bar{X} \pm SS$)

Table 1 Apoptosis rate of the human hepatic carcinoma 3B cells was detected by cytometer with Annexin V/PI and PI staining methods.

Method	PI (%)	Annexin V/PI (%)		
		Early apoptosis	Secondary necrosis	Total apoptosis
Control	0	0.12±0.01	0.05±0.03	0.17±0.02*
24h	10.8 ± 3.05	15.0±4.62	5.42±2.35	20.42±3.70*
36h	21.7±6.28	36.5±8.36	12.8±3.17	49.3±8.11*
48h	28.3±10.6	58.2±10.49	21.4±8.6	79.6±11.5*

t: P<0.01

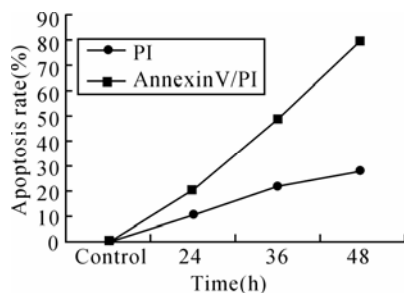


图3 流式 PI 法与 Annexin V/PI 法检测肝癌细胞感染 BTV-HbC₃ 比较

Fig. 3 Comparison of apoptosis of the hepatic Carcinoma cells induced by Bluetongue Virus with Annexin V/PI and PI staining methods

3 讨论

本实验利用流式细胞仪检测蓝舌病毒 HbC₃ 株诱导人肝癌细胞 Hep-3B 的凋亡, 发现随病毒感染时间的延长, BTV-HbC₃ 诱导 Hep-3B 的凋亡率增加。实验结果显示蓝舌病毒具有抗肿瘤细胞作用, 凋亡可能是抗肿瘤的机制之一。目前国际上蓝舌病毒未用于溶癌研究, 该病毒诱导肿瘤细胞的凋亡机制得以参考呼肠孤病毒, 蓝舌病毒是呼肠孤病毒代表种, 都是 dsRNA, 呼肠孤病毒在激活 Ras 信号途径的细胞中, PKR 磷酸化和活性被破坏, 病毒蛋白翻译继续, 裂解周期继续, 病毒颗粒聚集, 最终导致转化细胞死亡^[4,5]。蓝舌病毒在肝癌细胞复制增殖, 靶向性裂解癌细胞进入程序性细胞死亡 (PCD)^[8], BTV 可望成为溶癌病毒 (oncolytic virus)。该病毒感染某些肿瘤细胞, 激活了肿瘤细胞的凋亡系统, 从而诱导肿瘤细胞进入凋亡。这就是特异性诱导肿瘤细胞可能通过凋亡途径实现抗肿瘤效应的靶向性治疗, 同时该病毒含的 dsRNA 基因序列核酸, 是最好的干扰素诱导剂, 正常细胞中干扰素的信息传导途径抑制了病毒在正常细胞内复制, 不引起人传染性疾病, 无肿瘤原性^[6]。呼肠孤病毒和蓝舌病毒是否具有完全一样靶向性溶癌机制及扩大该病毒溶癌谱有待进一步研究。

细胞凋亡应从定性和定量来评价, 定性分析通过形态学研究方法, 如荧光显微镜和电子显微镜等观察细胞形态、数量及染色质变化。凝胶电泳及 DNA 碎片观察法不能测出凋亡细胞占所测总细胞的百分含量。流式细胞术可方便、快速、灵敏、准确地定量分析凋亡率, 特别是非固定细胞的双染法如 Annexin V/PI 法、Hoechst 33342/PI 法^[7]。Hoechst 33342/PI 法需紫外和 488nm 氩离子同时激发, 光路和仪器调节较繁琐, 因此较少被采用。Annexin V/PI 法利用细胞凋亡早期细胞膜的磷脂对称性改变使磷脂酰丝氨酸 (PS) 暴露于细胞外, Annexin V 对 PS 高度的亲和性来高度检测细胞凋亡, 正常细胞表现 Annexin V⁻/PI⁻, 继发性坏死细胞 Annexin V⁺/PI⁺, 凋亡细胞 Annexin V⁺/PI⁻, 机械性损伤细胞 Annexin V⁻/PI⁺。PI 法常用于细胞周期检测, 而用于细胞凋亡检测时存在许多缺陷, G₀G₁ 前亚二倍峰位置受样本处理缓冲液中离子成分和浓度, 处理时间的长短以及温度的密切相关^[4], 检测到亚二倍峰仅是 G₀G₁ 期的细胞凋亡率, 细胞凋亡率是通过周期分析软件确定亚二倍峰位置来拟合的, 人为因素很多。本实验 PI 法和 Annexin V/PI 法检测细胞凋亡率有显著性的差异, Annexin V/PI 法可精确的定量分析细胞凋亡。

随着对肿瘤形成机制研究的深入, 人们已认识到, 通过特异性诱导肿瘤细胞凋亡, 可能是治疗肿瘤的重要方法, 而流式细胞术是定量检测细胞凋亡必不可少的现代分析技术。

References

- [1] Kerr J F R. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy [J]. *Cancer*, 1994, 73: 2013-2026.
- [2] Peng L M, Wang Z L, (彭黎明, 王曾礼) *et al.* Basic and Clinic study of cell apoptosis (细胞凋亡的基础与临床) [M]. Beijing : People's Medical Publishing House. 2000, 1-15.
- [3] Kerr J F R. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy [J]. *Cancer*, 1994, 73 : 2013-2026.
- [4] Wilcox M E, Yang W, Senger D, *et al.* Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas [J]. *Natl Cancer Inst*, 2001, 93 : 903-912.
- [5] Jiang X L, (姜秀丽). Viral Oncolysis: Popular Biological therapy Study on Tumor Virology [J]. *Chin J Virol (病毒学报)*, 2003, 19 (1) : 91-95.
- [6] Xiao A T, Dong C Y, (肖安涛, 董长垣) *et al.* Studies on the Infectivity of Bluetongue Virus Strain HbC₃ to several Human and Animal Tumor Cells [J]. *Virologica Sinica (中国病毒学)*, 2004, 19 (4) : 349-352.
- [7] Hu Y, (胡 野). Molecular Medicine of cell apoptosis (细胞凋亡的分子医学) [M]. BeiJing: Military'a Medical Science Publishing House, 2002, 449-503.
- [8] Carson D A, Franceschi C. Programmed cell death in tumors and tissue [J]. *Lancet*, 1993, 341 : 1254.