

· 基础论著 ·

## Annexin V 法检测 HepG2 细胞凋亡

李娟 石英 吴亚松 吴昊 陈德喜 孟庆华

**【摘要】 目的** 应用 Annexin V-PITC/PI 技术检测化疗药物顺铂(CDDP)诱导肝癌细胞(HepG2)凋亡作用的特性。**方法** 将不同浓度的 CDDP 与肝癌细胞株 HepG2 共孵育 4 h、15 h、24 h、36 h 后,应用流式细胞术和 Annexin V-PITC/PI 双染免疫荧光法观察细胞凋亡情况。**结果** CDDP 可以诱导 HepG2 细胞发生凋亡,随着药物浓度的增加和作用时间的延长,发生凋亡和坏死细胞的比例增加。**结论** 化疗药物 CDDP 诱导肝肿瘤细胞凋亡呈时间和剂量依赖性。Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术可用于早期细胞凋亡的检测。

**【关键词】** 凋亡; Annexin V; HepG2

**Detection of apoptosis of the human hepatic carcinoma cells by Annexin V/PI double staining methods** *Li Juan, SHI Ying, WU Ya-song, WU Hao, CHEN De-xi, MENG Qing-hua. Beijing Youan Hospital affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China*

*Corresponding author: MENG Qing-hua, Email: meng\_qh@sohu.com; CHEN De-xi, Email: Dexi09@yahoo.com*

**【Abstract】 Objective** To investigate the property of apoptosis of HepG2 cell line induced by CDDP. **Methods** Liver cancer cell line HepG2 was incubated with CDDP of different concentrations for 4 h, 15 h, 24 h, 36 h, respectively. Apoptosis was measured by flow cytometry method and Annexin V and PI double staining. **Results** Apoptosis of HepG2 cell could be induced by CDDP, the percentage of Annexin V + PI cells increased along with the increase of CDDP concentration and incubation time. **Conclusions** Apoptosis of HepG2 cell induced by CDDP was time and dose dependent. Annexin V and PI double staining could be a specific method for analyzing apoptotic cells.

**【Key words】** Apoptosis; Annexin V; HepG2

细胞凋亡(apoptosis)又称细胞程序性死亡(programmed cell death),是有核细胞在一定条件下,通过启动其自身内部遗传机制,主要通过内源性 DNA 内切酶的激活而发生的细胞自然死亡过程,它不仅在胚胎发生、器官发育及保持机体自稳

作者单位:100069 北京市·首都医科大学附属北京佑安医院肝病四科

通讯作者:孟庆华 Email: meng\_qh@sohu.com;

陈德喜 Email: Dexi09@yahoo.com

等过程中至关重要,而且在控制细胞增殖、肿瘤的发生和生长中起重要作用。细胞凋亡的检测方法不断进步,经历了单纯形态学观察、形态学与免疫学相结合、免疫学与分子生物学相结合几个阶段。

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)正常位于细胞膜的内侧,但在细胞凋亡的早期,PS可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面,暴露在细胞外环境中。Annexin V是一种分子量为35~36 kD的 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖性磷脂结合蛋白,能与PS以高亲和力特异性结合。将Annexin V进行荧光素(FITC)标记,以标记了的Annexin V作为荧光探针,利用流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶(propidium iodide, PI)是一种核酸染料,它不能透过完整的细胞膜,但在凋亡中晚期的细胞和死细胞,PI能够透过细胞膜而使细胞核红染。因此将Annexin V与PI匹配使用,就可以将凋亡早晚期的细胞以及死细胞区分开来。

本研究应用Annexin V-FITC/PI双标记结合流式细胞术检测顺铂(CDDP)诱导的HepG2细胞凋亡,同时结合免疫荧光法观察凋亡形态学的变化。

## 材料与方法

### 一、主要材料与仪器

肝癌细胞株(HepG2)由本室保存,FACS Calibur流式细胞仪购自Becton Dickinson公司,Annexin V-FITC/PI双染试剂盒购自上海天翎生物有限公司,CD-DP购自Sigma公司。

### 二、方法

1. HepG2细胞处理:用含10%胎牛血清(GIBCO)的DMEM培养基在37℃,5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中培养至对数生长期。收集细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^4$ 个/ml,接种于6孔细胞培养板(Costar),每孔2 ml。细胞开始贴壁时,加药处理,药物终浓度分别为0.5 mg/L、10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L。

2. 流式细胞仪检测:根据Annexin V-FITC/PI双染试剂盒说明书,分别于加药4 h、15 h、24 h、36 h收集细胞,胰酶消化后,离心收集细胞,用PBS洗涤3次,加入500  $\mu\text{l}$ 结合缓冲液重新悬浮细胞,各加入5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC,10  $\mu\text{l}$  PI混匀,室温避光反应15 min后,用流式细胞仪分析,Cellquest软件分析结果。

3. Annexin V-FITC荧光染料染色:细胞按上述浓度接种于6孔细胞培养板中,孔中预先放入经1%多聚赖氨酸处理的灭菌小盖玻片,待细胞爬片后,加药处理(浓度同上),分别于加药后4 h、15 h、24 h、36 h收集细胞玻片,用PBS清洗孔中的细胞3次,每次2 min。向每孔中玻片上加入500  $\mu\text{l}$ 结合缓冲液(含5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC,10  $\mu\text{l}$  PI),避光染色10 min后,取出玻片,将玻片倒扣在载玻片上,于荧光显微镜下观察结果。

## 结 果

### 一、Annexin V-FITC/PI双标记流式细胞检测

细胞染色后用流式细胞仪分析,每样本收集10 000个细胞荧光信号,采用

Cellquest 软件分析结果。以 FITC 和 PI 荧光作双参数点图,细胞分为四个区,随着药物浓度的增加和用药时间的延长,细胞凋亡和坏死比例逐渐增多(图 1~2)。

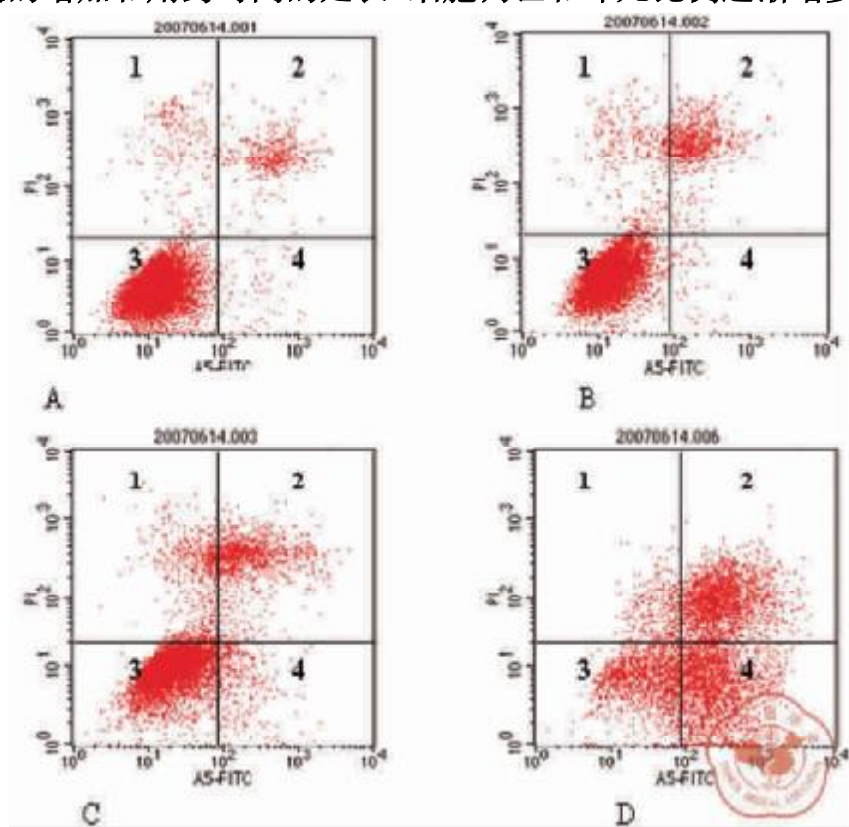


图 1 流式 Annexin V/PI 法检测 CDDP 诱导 HepG2 细胞的凋亡  
A. 未处理的 HepG2 细胞;B-D: 分别应用 CDDP 处理 15 h、24 h、36 h 后的 HepG2 细胞;1. Annexin V-/PI+ 机械损伤细胞;2. Annexin V+ / PI+ 坏死细胞;3. Annexin V- / PI- 正常细胞;4. Annexin V+ / PI- . 早期凋亡细胞

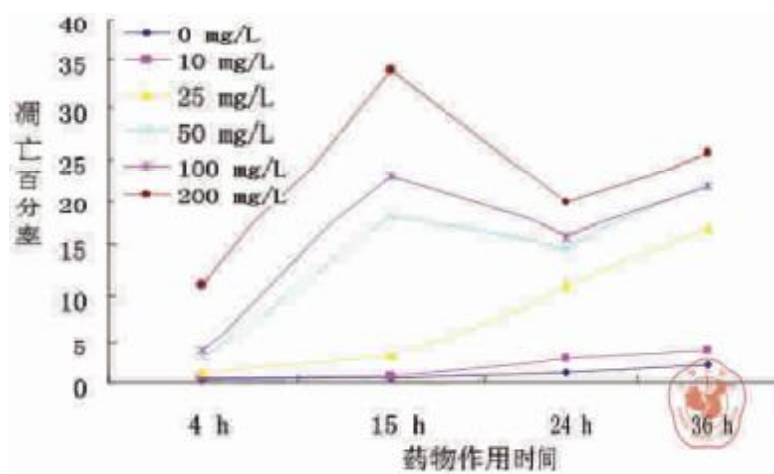


图 2 CDDP 诱导 HepG2 细胞凋亡时间、药物浓度曲线

## 二、Annexin V/PI 染色细胞形态学观察

应用细胞组织化学的方法,按培养不同时间取不同浓度药物,经 Annexin V/PI染色后,于荧光显微镜下观察结果。药物作用早期细胞形态没有变化,部分贴壁细胞已开始伸展,凋亡和坏死的细胞很少(图 3A);随着药物浓度的增加和作用时间的延长,一些细胞开始出现凋亡,Annexin V 细胞膜染色阳性,红色的 PI 染色说明细胞坏死也开始出现(图 3B);在药物的作用下细胞凋亡越来越多,坏死的比例也逐渐增加(图 3C);最后,大部分坏死的细胞已经脱落,剩下部分没有脱落的细胞也出现固缩,形态异常(图 3D)。

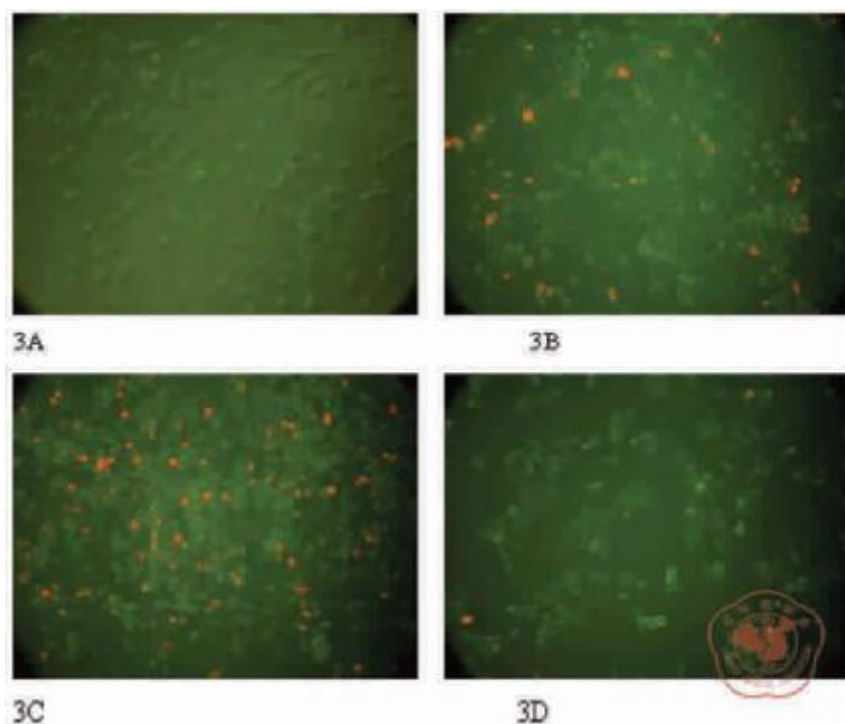


图3 Annexin V/PI 染色检测检测顺铂诱导 HepG2 细胞的凋亡

## 讨 论

顺铂(CDDP)是重要的化疗药物,可以通过诱导肿瘤细胞凋亡来抑制肿瘤生长<sup>[1]</sup>,本研究应用 Annexin V/PI 法检测了顺铂对肝肿瘤 HepG2 细胞株的作用,发现随着药物浓度和作用时间的增加,细胞发生凋亡和坏死的比例也增加。

细胞凋亡的检测方法主要有几种:形态学检测、磷脂酰丝氨酸外翻分析(Annexin V)法<sup>[2]</sup>、线粒体膜势能检测法、DNA 片段化检测<sup>[3]</sup>、TUNEL 法<sup>[4]</sup>、Caspase-3 活性检测法、凋亡相关蛋白的表达和细胞定位分析等。形态学检测通过显微镜观察凋亡细胞体积、形态、细胞核染色质形态学改变以及凋亡小体来判断细胞的凋亡情况;包括琼脂凝胶电泳法<sup>[5]</sup>。

Annexin V 检测细胞凋亡是目前应用较多的方法,这种方法不仅能够通过染

色直观地观察到细胞凋亡的程度还能够通过流式细胞术对凋亡的比率进行精确的定量,具有方便、快速、灵敏等特点,因此,可作为细胞凋亡检测的首选方法。

### 参 考 文 献

- 1 王昌俊,钱伯文,陈伟. 顺铂诱导人肝癌细胞凋亡机理研究. 中国肿瘤临床,2000,27:305-306.
- 2 焦志军,王文红,杨友. Annexin V2FITC /PI 双标记流式细胞术检测结直肠癌细胞凋亡. 江苏大学学报,2005,15:97-99.
- 3 Gorczyca W, Gong JP, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. Cancer Res,1993, 53:1945-1951.
- 4 薛丽香,刘建香,苏旭. TUNEL 与 PI 双染流式细胞术在细胞周期与细胞凋亡检测上的应用. 中华放射医学与防护杂志,2003,23:100-101.
- 5 Tilly JL, Hsueh AJ. Microscale autoradiographic method for the qualitative and quantitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. J Cell Physiol.1993,154:519-526.

(收稿日期:2008-05-21)

(本文编辑:王丹静)

李娟,石英,吴亚松,等. Annexin V 法检测 HepG2 细胞凋亡[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2008,2(4):277-281.