

使用成像细胞分析仪对悬浮细胞进行细胞凋亡分析

关键词：◎悬浮细胞 ◎Imaging Cytometer成像细胞分析仪 ◎细胞凋亡 ◎IN Cell Analyzer

前言

成像细胞分析仪对细胞成像，根据每个细胞的图像获得荧光强度、面积、长度、圆度等形态信息及蛋白质的定位信息。无论贴壁细胞还是组织切片，检测时都不需要进行剥离、分散这样的操作。根据图像所提供的信息，能够像传统流式细胞仪那样进行群体分析。因为每个细胞的图像与参数值是相互关联的，所以如果需要，还可以对群体分析中具有特定数值特征的细胞进行形态观察和数值确认。（图1）。

本文举例说明使用成像细胞分析仪IN Cell Analyzer 1000对悬浮细胞进行细胞凋亡分析。以前多使用流式细胞仪分析细胞凋亡。成像细胞分析仪不仅能够进行群体分析，而且能够结合细胞核片断化等形态变化进行检测。另外，对于难以对焦并获得其均匀图像的悬浮细胞，通过离心，也能进行分析。

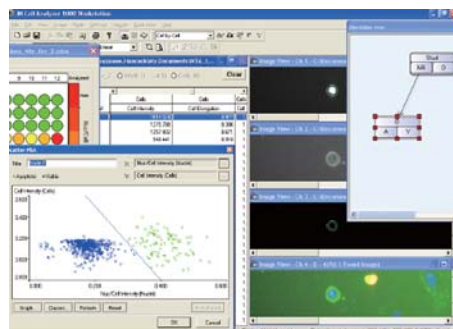


图1 细胞数据与细胞图像的关联

散点图①、数据②、细胞图像③相互关联，点击任何一个，其他两个会突出显示。

使用的产品

- IN Cell Analyzer 1000，用于获取细胞图像
- IN Cell Investigator Software，图像分析软件

样品及试剂

- Jurkat 细胞
- 喜树碱：细胞凋亡诱导剂
- Vybrant Apoptosis Assay Kit #2：Alexa Fluor 488标记 AnnexinV，PI（Invitrogen V13241）
- Hoechst 33342（Dojindo 346-07951）

※Annexin V、PI是细胞凋亡阶段标志。Annexin V将细胞凋亡早期以后的细胞全部染色。PI对死亡细胞的细胞核染色，细胞凋亡晚期以后的细胞核都会被PI染色。Hoechst 33342可以将所有细胞核染色，无论活细胞还是死细胞。

实验方法

采用下述三种方法对Jurkat细胞进行处理，诱导细胞死亡：用10 μM 喜树碱处理5小时，用50 μM 喜树碱处理5小时，在95°C下处理2分钟。然后，按照下述方法，用Annexin V、碘化丙啶（PI）、Hoechst 33342进行细胞的染色。

1. 处理过的Jurkat细胞（每管 5×10^4 个/100 μl ）400 $\times$ g离心5分钟。
2. 舍弃上清液，用100 μl PBS重悬，400 $\times$ g离心5分钟。
3. 舍弃上清液，100 μl 1 $\times$ Annexin缓冲液重悬细胞。
4. 添加15 μl Alexa Fluor 488-Annexin V，2 μl PI工作液、20 μl 600 $\times$ Hoechst 33342溶液和80 μl 1 $\times$ Annexin缓冲液，常温下孵育15分钟。
5. 400 $\times$ g离心5分钟，舍弃上清液，100 μl 1 $\times$ Annexin缓冲液重悬细胞。

6. 细胞转移到96孔板中，短暂离心使细胞沉降到孔的底部，用IN Cell Analyzer 1000进行观察和检测。

结果

10 μ M喜树碱处理过的细胞用IN Cell Analyzer 1000拍照，拍摄的图像如图2、3所示。图3显示了用图像分析软件IN Cell Investigator识别细胞的结果（图3），根据Hoechst33342染色的细胞核来识别细胞（图3D~F）。无核的细胞不计算在细胞内（图3中 $\triangle$ 标记），所以特定参数的设置可以排除指定特征的对象。

IN Cell Investigator软件分析经过不同处理的细胞群，横轴表示AnnexinV的强度，纵轴表示PI的强度，绘图的结果如图4所示。图5的饼图表明各阶段细胞的比例。图4和图5说明，喜树碱处理呈现剂量依赖性的活细胞（AnnexinV -、PI -）减少，早期凋亡细胞（AnnexinV +、PI -）增加；95 $^{\circ}$ C处理2分钟会诱导大量细胞死亡（AnnexinV +、PI +）。

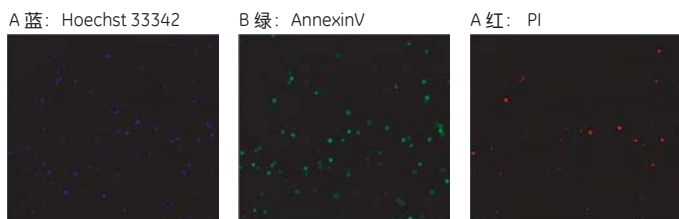


图2. 用10 μ M喜树碱处理5小时以后Jurkat细胞的情况（使用10倍物镜）

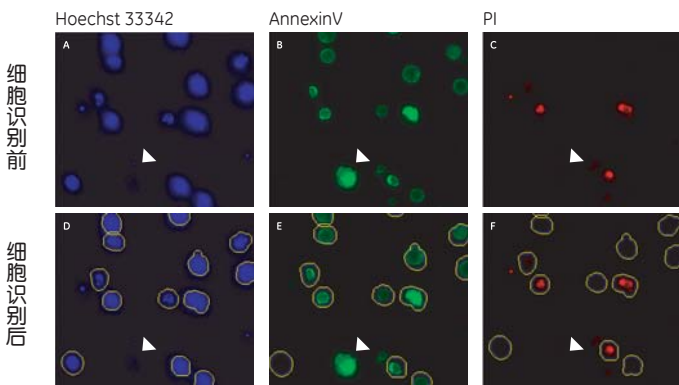


图3. 通过图像分析软件IN Cell Investigator进行图像识别

图A~C显示识别前的细胞图像，图D~F显示识别后的细胞图像。黄色圈选出的是细胞。没有被Hoechst 33342、PI染色、被AnnexinV染色的是无核细胞，不会被分析。（图中 $\triangle$ 标记）。

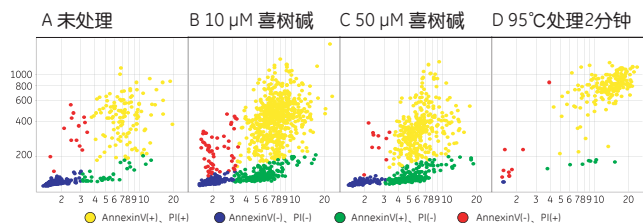


图4. AnnexinV 早期细胞凋亡试验分析结果的散点图

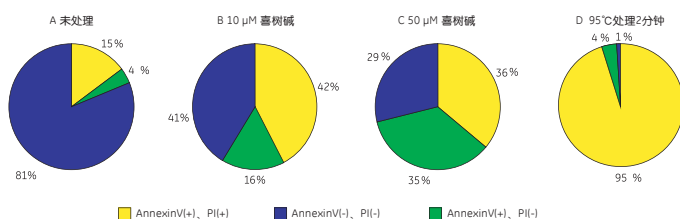
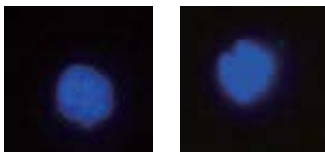


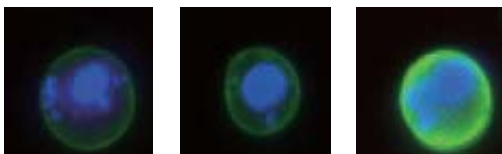
图5. AnnexinV 早期细胞凋亡试验分析结果的饼图

※细胞凋亡分析不需要Annexin V (-)、PI (+)，数据未显示。

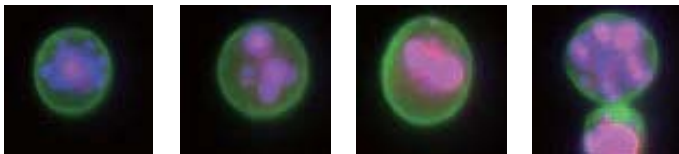
A 活细胞 Hoechst 33342 (+)、AnnexinV (-)、PI (-)



B 早期凋亡细胞Hoechst 33342 (+)、AnnexinV (+)、PI (-)



C 中期~晚期凋亡细胞Hoechst 33342 (+)、AnnexinV (+)、PI (+)



D 无核细胞Hoechst 33342 (-)、AnnexinV (+)、PI (-)

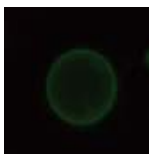


图6. 50 μ M喜树碱处理5小时后Jurkat细胞的情况（使用60倍物镜）

另外，通过使用60倍物镜，可以确认细胞内的形态变化。图6显示了50 μ M喜树碱处理后的细胞图像。A表示活细胞。细胞核只被Hoechst 33342 (蓝) 染色。B表示早期凋亡细胞，细胞全部被AnnexinV (绿色) 染色。C代表中期-晚期凋亡细胞，可以看到细胞核片段化，呈颗粒状，根据该细胞图像，可以获得细胞核颗粒的大小及数量等信息（数据未显示）。

总结

- 根据IN Cell Analyzer 1000获得的细胞图像，可以进行群体分析。
- 通过离心，使悬浮细胞沉降到培养孔底部，就可以对悬浮细胞进行观察和检测。
- 除用AnnexinV、PI染色外，Hoechst 33342染色，可以用于识别细胞，并排除无核的细胞。
- 在60倍物镜下，可以观察晚期凋亡细胞的细胞核的形态变化。