

细胞凋亡的几种检测方法

一、形态学观察方法

(一)、HE 染色、光镜观察：凋亡细胞呈圆形，胞核深染，胞质浓缩，染色质成团块状，细胞表面有“出芽”现象。

(二)、丫啶橙 (AO)染色，荧光显微镜观察：活细胞核呈黄绿色荧光，胞质呈红色荧光。凋亡细胞核染色质呈黄绿色浓聚在核膜内侧，可见细胞膜呈泡状膨出及凋亡小体。

(三)、台盼蓝染色：如果细胞膜不完整、破裂，台盼蓝染料进入细胞，细胞变蓝，即为坏死。如果细胞膜完整，细胞不为台盼蓝染色，则为正常细胞或凋亡细胞。此方法对反映细胞膜的完整性，区别坏死细胞有一定的帮助。

(四)、透射电镜观察：可见凋亡细胞表面微绒毛消失，核染色质固缩、边集，常呈新月形，核膜皱褶，胞质紧实，细胞器集中，胞膜起泡或出“芽”及凋亡小体和凋亡小体被临近巨噬细胞吞噬现象。

二、DNA 凝胶电泳

(一)、检测原理

细胞发生凋亡或坏死，其细胞 DNA 均发生断裂，细胞内小分子量 DNA 片断增加，高分子 DNA 减少，胞质内出现 DNA 片断。但凋亡细胞 DNA 断裂点均有规律的发生在核小体之间，出现 180—200bpDNA 片断，而坏死细胞的 DNA 断裂点为无特征的杂乱片断，利用此特征可以确定群体细胞的死亡，并可与坏死细胞区别。

(二) 结果判断

正常活细胞 DNA 电泳出现阶梯状 (LADDER)条带；坏死细胞 DNA 电泳类似血抹片时的连续性条带。

三、酶联免疫吸附法 (ELISA)核小体测定

凋亡细胞的 DNA 断裂使细胞质内出现核小体。核小体由组蛋白及其伴随的 DNA 片断组成，可由 ELISA 法检测。

(一) 检测步骤

1、将凋亡细胞裂解后高速离心，其上清液中含有核小体；

- 2、在微量板上吸附组蛋白体'
- 3、加上清夜使抗组蛋白抗体与核小体上的组蛋白结合'
- 4、加辣过氧化物酶标记的抗 DNA 抗体使之与核小体上的 DNA 结合'
- 5、加酶的底物，测光吸收制。

（二）用途

该法敏感性高，可检测 $5 \times 100/\text{ml}$ 个凋亡细胞。可用于人、大鼠、小鼠的凋亡检测。该法不需要特殊仪器，适合基层工作，但是不能精确测定凋亡细胞发生的绝对量。

四、流式细胞仪定量分析

（一）检测原理

细胞发生凋亡时，其细胞膜的通透性也增加，但是其程度介于正常细胞与坏死细胞之间。利用这一特点，被检测细胞悬液用荧光素染色，利用流式细胞仪测量细胞悬液中细胞荧光强度来区分正常细胞、坏死细胞核凋亡细胞。

（二）应用价值

流式细胞仪检测具有以下特点：

- 1、检测的细胞数量大，因此其反映群体细胞的凋亡状态比较准确
- 2、可以做许多相关性分析
- 3、结合被检测细胞的 DNA 含量的分析，可确定凋亡的细胞所处的细胞周期

■检测形态学及细胞膜完整性的 Hoechs-PI 双染色法

细胞发生凋亡时，其细胞膜的通透性增加，但其程度介于正常细胞和坏死细胞之间，利用这一特点，被检测细胞悬液用荧光素染色，利用流式细胞仪检测细胞悬液中细胞荧光强度来区分正常细胞、坏死细胞和凋亡细胞。

利用 Hoechs-PI 染色法，正常细胞对染料有抗拒性，荧光染色很浅，凋亡细胞主要摄取 Hoecha 染料，呈现强蓝色荧光，而坏死细胞主要摄取碘化丙啶 (PI)而呈强的红色荧光。

■DNA 片断原位标记法

凋亡细胞 DNA 片断原位末端检测技术是指在细胞（或组织）结构保持不变的情况下，用荧光素、地高辛或生物素标记的脱氧尿三磷酸（deoxyuridinetriphate, DUTP)和末端脱氧核

苷酸转移酶 (TdT) 相反应与凋亡细胞裂解后 3' 的羟基 (—OH) 端结合, 经显色反应后检测 DNA 裂解点的技术。

DNA 片段原位标记法有二种:

1、原位缺口转移 (in situ nick-translation, ISNT) 技术, 它是利用 DNA 多聚酶 I 将标记的核苷酸连接到断裂 DNA 的 3'-OH 端

2、原位缺口末端标记技术 (in situ end labelling technique, ISEL), 即 TUNEL 法, 它是利用 TdT 将标记的 DUPT 接到 3'-OH 端。研究证明, TUNEL 法的敏感性远高于 ISNT, 尤其对早期凋亡的检测, TUNEL 更为合适。

■检测细胞膜成分变化的 Annexin V 联合 PI 法

1、原理: 在细胞凋亡早期位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸 (PS) 迁移至细胞膜外侧。磷脂结合蛋白 V (Annexin V) 是一种钙依赖性的磷脂结合蛋白, 它与 PS 具有高度的结合力。因此, Annexin V 可以作为探针检测暴露在细胞外侧的磷脂酰丝氨酸。故利用对 PS 有高度亲和力的 Annexin V, 将 Annexin V 标记上荧光素 (如异硫氰酸荧光素 FITC), 同时结合使用 PI 拒染法 (因坏死细胞 PS 亦暴露于细胞膜外侧, 且对 PI 高染) 进行凋亡细胞双染法后用流式细胞仪即可检测凋亡细胞。

2、结果判断: 正常活细胞 Annexin V、PI 均低染; 凋亡细胞 Annexin V 高染、PI 低染; 坏死细胞 Annexin V/PI 均高染。

3、应用价值: 细胞发生凋亡时, 膜上的 PS 外露早于 DNA 断裂发生, 因此 Annexin V 联合 PI 染色法检测早期细胞凋亡较 TUNEL 法更为灵敏。又 Annexin V 联合 PI 染色不需固定细胞, 可避免 PI 染色因固定造成的细胞碎片过多及 TUNEL 法因固定出现的 DNA 片段丢失。因此, Annexin V 联合 PI 法更加省时, 结果更为可靠, 是目前最为理想的检测细胞凋亡的方法。