

· 论著 ·

单一检测体系内外周血白细胞凋亡相关指标 Annexin-V、PI 的时相变化特征

张立新 陈亚宝 叶军 陆桃红 林梅 栾正云 刘玲 李林 黄俊星 吴正东

【摘要】 目的 综合分析外周血白细胞凋亡相关检测指标 Annexin-V、PI 的时相变化特征。**方法** 采用直接沉降-CD45/Annexin-V/PI 法在单一检测体系内同时检测体外不同时相外周血粒细胞、单核细胞、淋巴细胞凋亡,分析其凋亡特征。**结果** (1)体外 0.5 h 时,三类细胞 Annexin-V 阳性率从高到低依次为单核细胞、粒细胞、淋巴细胞,其差异具有统计学意义($H = 25.055, P < 0.001$); PI 阳性率依次为粒细胞、单核细胞、淋巴细胞,其差异具有统计学意义($H = 18.762, P < 0.001$)。(2)随着时间的延长,各类细胞的 Annexin-V 阳性率均逐渐上升,特别是单核细胞、粒细胞在 6 h 检测结果显示大多数细胞 Annexin-V 阳性($> 60%$); PI 阳性率随着时间的延长也呈升高态势,粒细胞、单核细胞 PI 阳性率在 3 h 内上升缓慢,但 6 h 时,变化增大;(3)无论 0.5 h,还是 6 h,三类细胞 Annexin-V 阳性率均明显高于 PI 阳性率,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。**结论** 外周血粒细胞、单核细胞、淋巴细胞凋亡各有其特点,在设计外周血白细胞凋亡相关研究方案时应考虑其不同凋亡特点,以得到准确、敏感的结果。

【关键词】 细胞凋亡; 膜联蛋白质类; 粒细胞; 淋巴细胞; 单核细胞; 流式细胞术; 碘化丙啶

Phase variation features of apoptosis correlated indicator Annexin-V, PI of peripheral blood leucocytes in single detected system ZHANG Li-xin, CHEN Ya-bao, YE Jun, LU Tao-hong, LIN Mei, LUAN Zheng-yun, LIU Ling, LI Lin, HUANG Jun-xing, WU Zheng-dong. Institute of Clinical Medicine, Taizhou People's Hospital Affiliated to Medical College of Nantong University, Taizhou 225300, China
Corresponding author: ZHANG Li-xin, Email: zhanglixinyisheng@163.com

【Abstract】 Objective To analyze phase variation features of apoptosis correlated indicator Annexin-V, PI of peripheral blood leucocytes generally. **Methods** Apoptosis of leukocytes, monocytes, lymphocytes in peripheral blood were detected simultaneously by direct sagging -CD45/annexin-V and propidium iodide (PI) staining and at different phase (half an hour, 3 hours, 6 hours) *in vitro* single detected system. **Results** (1) Decrement sequence about annexin-V positive proportion of the three kind cells was monocytes, leukocytes, lymphocytes at half hour in turn, and the statistical difference was significant ($H = 25.055, P < 0.001$). Decrement sequence about PI positive proportion of the three kind cells was monocytes, leukocytes, lymphocytes at half hour in turn, and the difference was statistically significant ($H = 18.762, P < 0.001$). (2) Annexin-V positive proportion of the three kind cells were increased gradually following prolong time *in vitro*, and majority of monocytes and leukocytes were annexin-V positive response at six hours especially ($> 60%$). PI positive proportion of the three kind cells were increased gradually following prolong time, PI positive proportion of monocytes and leukocytes were increased slowly during 3 hours, but increased sharply at 6 hours. (3) In half an hour or 6 hours, the positive proportion of Annexin-V of the three kind cells were all higher than those of PI, and the difference was statistically significant ($P <$

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.22.025

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2010357)

作者单位:225300 江苏省泰州市人民医院(南通大学医学院附属医院)临床医学研究所(张立新、陈亚宝、叶军、陆桃红、林梅、栾正云、刘玲、李林),肿瘤科(黄俊星、吴正东)

通讯作者:张立新,Email:zhanglixinyisheng@163.com

0.001). **Conclusions** There are various apoptosis features about leukocytes, monocytes and lymphocytes in peripheral blood, and the various apoptosis features have significant value on designing plan about studying apoptosis of peripheral blood leucocytes.

【Key words】 Apoptosis; Annexins; Granulocytes; Lymphocytes; Monocytes; Flow cytometry; Propidium iodide

外周血白细胞在人体免疫功能中发挥巨大作用,包括粒细胞、单核细胞和淋巴细胞,它们的生长、储存、释放、效应作用与正常生理功能的维持关系密切。临床很多疾病的发病机制和治疗机制的研究均需要检测这些细胞的凋亡^[1-4]。由于外周血白细胞凋亡时间长短不一,因此了解正常人外周血白细胞凋亡特征有助于对研究结果进行正确评估。目前,流式细胞仪被广泛应用于细胞凋亡检测^[5]。配合细胞凋亡的不同阶段,检测细胞凋亡的方法很多,其中 Annexin-V 联合 PI 法较为常用。笔者注意到一些文献^[1,2,6-7]显示白细胞 Annexin-V/PI 凋亡检测正常值相差较大。本室自己建立的直接沉降-CD45/Annexin-V/PI 法可以在一试管中同时检测外周血粒细胞、单核细胞和淋巴细胞的凋亡,在此,笔者对使用该法所测的正常人外周血白细胞的凋亡特征作一综合分析描述。

对象与方法

1. 对象:选取2010年4月泰州市人民医院体检中心健康体检人员10例,其中男5例,女5例,年龄28~48岁,中位年龄35.5岁,均无白细胞减少疾病史。
2. 仪器与试剂:FACSCalibur 流式细胞仪为美国BD公司产品。Sysmex-3000 血细胞计数仪为日本希森美康公司产品。CD45-Per-CP 单抗(Cat No 377434)由美国BD公司提供,Annexin-V-FITC/PI(碘化丙啶)试剂为美国罗氏公司产品。
3. 标本采集和处理:抽取清晨空腹静脉血各3 ml,将抗凝血在37℃水浴箱自然沉降30 min(倾斜15°),吸取上层富白细胞血浆,混匀,先吸取100 μl 进行凋亡检测,然后剩余富白细胞血浆再分别静置3 h、6 h 时分别取出100 μl 即时进行检测。
4. 凋亡检测:(1)将处理后所得的富白细胞血浆(10^6 个白细胞/管)与缓冲液1 ml 混匀,500 g 离心5 min后,去除上清液,使用检测专用缓冲液重悬(5×10^5 个白细胞/100 μl)。在试管中,加入2 μl CD45 和2 μl Annexin-V、3 μl PI,与100 μl 重悬后的标本混匀,室温避光静置15 min 后加入0.4 ml 缓冲液混匀,使用流式细胞仪检测。
5. 仪器设置及数据分析:用FACSComp 调整FSC、SSC、FL1、FL2 和 FL3 电压。激发光波长为488 nm,发射波长 Annexin-V:518 nm;PI:617 nm。用CELLQuest 软件获取20 000 个有核细胞(R1)进行分析。以FL3 作为X轴,对数SSC 作为Y轴,选取粒细胞圈门R2;选取单核细胞圈门R3,选取淋巴细胞圈门R4。在同等的实验条件下,以对照管确定阳性界限,分析测定管 Annexin-V 和 PI 的阳性率(图1A,1B)。Annexin-V 阳性代表凋亡细胞,Annexin-V、PI 双阳性代表凋亡晚期、坏死细胞。
6. 统计学分析:采用Sigmastat 3.1 软件进行统计学分析。文中正态性数据描述采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$),正态分布两组均数比较采用t 检验,非正态分布或方差不齐资料采用Mann-Whitney 秩和检验;多组正态分布方差齐性资料采用单因素方差分析,两两比较采用Holm-Sidak 检验分析;多组非正态分布或方差不齐资料采用Kruskal-Wallis 秩和检验,两两比较采用Tukey 检验分析。采用Origin 7.5 统计画图软件作图。

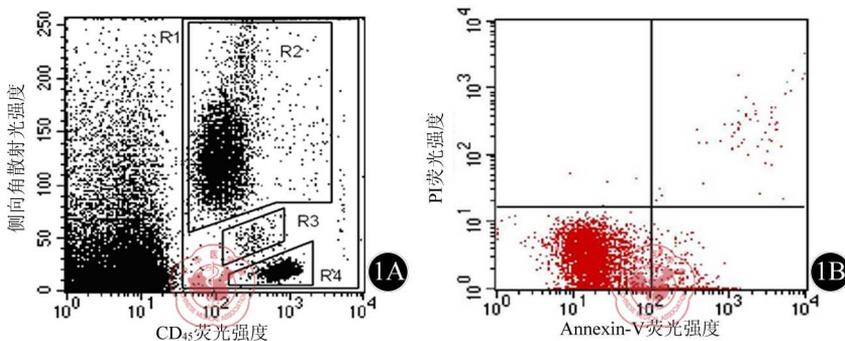
结 果

1. 白细胞 Annexin-V、PI 阳性率检测结果:体外0.5 h 时 Annexin-V 阳性率依次为单核细胞、粒细胞、淋巴细胞,其差异具有统计学意义;静置0.5 h 时三类细胞 PI 阳性率依次为粒细胞、单核细胞、淋巴细胞,其差异具有统计学意义,粒细胞和单核细胞之间差异未见统计学意义,见表1。

表1 体外不同时相外周血白细胞 Annexin-V/PI 检测结果(%, $\bar{x} \pm s$)

项目	例数	Annexin-V 阳性率			PI 阳性率		
		30 min	3 h	6 h	30 min	3 h	6 h
粒细胞	10	18.0 ± 3.25	43.8 ± 7.69	71.0 ± 10.2	2.54 ± 0.70	2.54 ± 0.43	4.37 ± 1.26
单核细胞	10	31.2 ± 6.13 ^a	73.7 ± 8.49 ^d	88.9 ± 7.11	1.71 ± 0.86	2.08 ± 0.80	7.14 ± 3.21
淋巴细胞	10	2.45 ± 0.74 ^{bc}	6.20 ± 1.25 ^{ef}	10.7 ± 3.38 ^{gh}	0.42 ± 0.26 ^{ij}	0.69 ± 0.14 ^{kl}	0.94 ± 0.51 ^{mn}
H 值		25.055	25.806	23.484	18.762	16.664	20.986
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与粒细胞比较,^a $q=3.377$,^d $q=3.592$, P 均<0.05;^b $q=3.700$,^e $q=3.592$,^g $q=3.951$,ⁱ $q=6.089$,^k $q=5.496$,^m $q=4.490$, P 均<0.05;与单核细胞比较,^c $q=7.076$,^f $q=7.184$,^h $q=6.825$,^j $q=3.610$,^l $q=4.257$,ⁿ $q=6.286$, P 均<0.05



1A: CD45/SSC白细胞分类示意图; 1B: Annexin-V/PI检测示意图。图1A中左侧细胞群为红细胞, 右侧R1为总白细胞群, R2为粒细胞群, R3为单核细胞群, R4为淋巴细胞群。图1B中右侧为Annexin-V阳性, 右上为Annexin-V、PI双阳性

图1 直接沉降法外周血白细胞Annexin-V/PI检测

2. 白细胞 Annexin-V、PI 阳性率体外时相性变化:随着时间的延长,各类细胞的 Annexin-V 阳性率均逐渐上升,其高低顺序一直保持到 6 h;特别是单核细胞、粒细胞在 6 h 检测结果显示大多数细胞 Annexin-V 阳性(>60%)。三类细胞的 PI 阳性率随着时间的延长均呈升高态势,粒细胞、单核细胞 PI 阳性率在 3 h 内上升缓慢,但 6 h 时,变化增大;单核细胞 PI 阳性率逐渐上升至第一,但其与粒细胞之间差异未见统计学意义(图 2,3)。

3. 白细胞 Annexin-V 与 PI 检测结果的比较:三类细胞在 0.5 h 时 PI 阳性率均远远低于 Annexin-V 阳性率(图 4),即使在 6 h 时间点,PI 阳性率升至最高,但仍然明显低于 Annexin-V 阳性率,差异具有统计学意义(图 5)。

讨 论

细胞凋亡(apoptosis),又称细胞程序性死亡(programmed cell death,PCD),是细胞在一定的生理或病理条件下,遵循自身程序,主动地结束其生命的过程。它被认为是维持机体内环境稳定,清除衰老和无能细胞的重要机制^[8],很多细胞生物学研究均需要检测细胞的凋亡^[9]。细胞凋亡早期,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)从细胞膜内侧转移到外侧,成为免疫系统的识别标志。Annexin-V 能与 PS 高亲和力特异性结合,利用流式细胞仪可检测细胞早期凋亡的发生^[10];而 PI 作为 DNA 染料,因其只能进入胞膜通透性增加(凋亡晚期/坏死)的细胞,所以也可以作为识别凋亡晚期细胞的方法;两者联合检测,可以标记出凋亡的发展阶段。

本室建立的直接沉降-CD45/Annexin-V/PI 法,采用 CD45 设门,可以同时检测外周血粒细胞、单核细胞和淋巴细胞的凋亡,不需密度离心分离各个细胞组分,操作简单,易于控制实验时间,适于个体分别检测,结果准确^[11],而以往文献报道的进行外周血白细胞 Annexin-V/PI 凋亡检测所采用的方法均是密度离心

法^[1-2,6-7],由于该方法需多次离心,检测粒细胞、淋巴细胞、单核细胞需不同密度的分离液,因此,除了无法在同一试管内进行三类细胞的检测分析,时间难以控制统一外,分离液也可能影响细胞表面 Annexin-V 的检测,从而可能导致无法全面、真实、低干扰因素地观察三类细胞的凋亡的时间特征。因此,直接沉降-CD45/Annexin-V/PI 法更适合全面地评估外周血白细胞的凋亡特征。

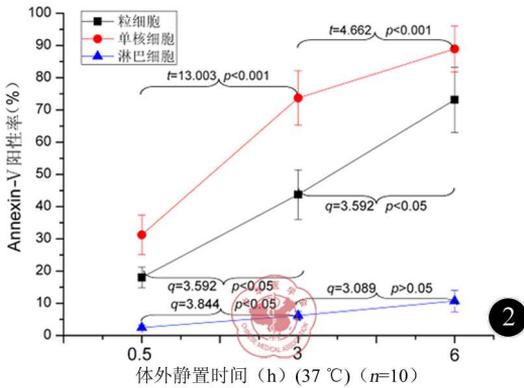


图2 外周血白细胞Annexin-V 体外时相性变化图

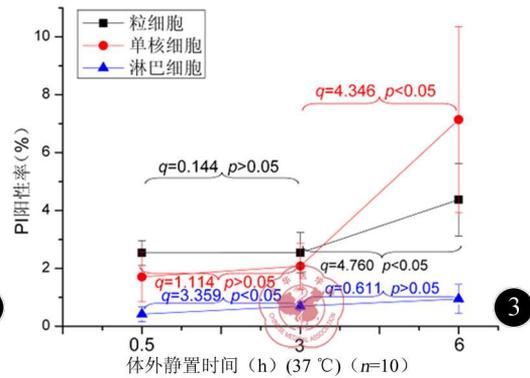


图3 外周血白细胞PI体外时相性变化图

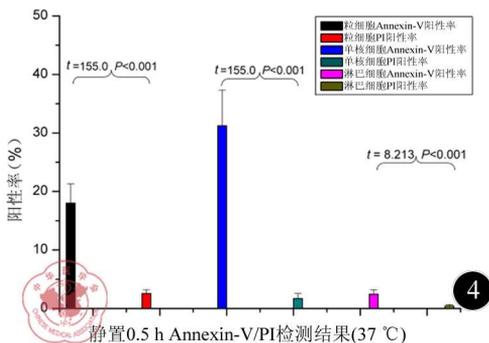


图4 静置0.5 h Annexin-V 与PI阳性率比较图

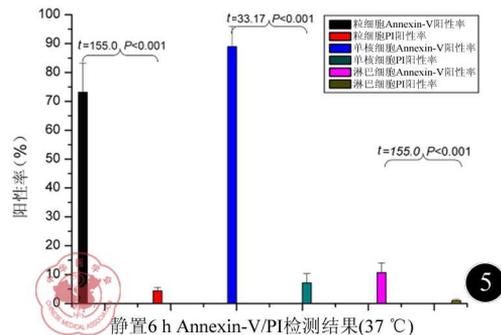


图5 静置6 h Annexin-V 与PI阳性率比较图

体外0.5 h 的 Annexin-V/PI 检测结果基本可以代表体内外周血白细胞凋亡状况,笔者的结果显示0.5 h时 Annexin-V 阳性率由高到低顺序为单核细胞、粒细胞、淋巴细胞,这一点与 Tait 等^[12]的研究结果相符,说明单核细胞、粒细胞凋亡比淋巴细胞更迅速,淋巴细胞寿命较长,凋亡较慢,这点与有关白细胞体内寿命的报道也相吻合^[13];而晚期凋亡指标 PI 阳性率很低(均 <3%),高低顺序为粒细胞、单核细胞、淋巴细胞,与 Annexin-V 阳性率差距很大,这也证实了体内凋亡细胞在膜的完整性被破坏之前就被巨噬细胞吞噬,以有效阻止胞内颗粒内容物的释放^[14]。

笔者体外不同时相 Annexin-V/PI 检测结果显示在体外白细胞凋亡率是不断上升的,直到6 h 时 Annexin-V、PI 阳性率由高到低顺序为单核细胞、粒细胞、淋巴细胞,它们各自的 Annexin-V 与 PI 阳性率相差仍然很大,说明即使在体外,白细胞凋亡依然遵循着各自的规律。

鉴于这些特点,笔者认为如要研究体外粒、单核细胞6 h 内凋亡变化,则以观察 Annexin-V 阳性率变化为宜;如需研究它们在体外更长时间的凋亡变化,则以观察晚期指标 PI 阳性率为宜,因为时间延长后,Annexin-V 阳性率自发性增高严重,对实验结果的评价会趋于不敏感。而如需研究粒、单核细胞体外生物学功能则应尽快完成实验,体外时间越短越好。研究淋巴细胞体外凋亡及生物学功能时,Annexin-V 阳性率应该是一个较好的指标,时间亦可适当延长。另外,由于粒细胞、单核细胞 Annexin-V 阳性率随时间变化迅速,因此,在非批量检测的情况下,应使检查个体严格遵守实验规程中的时间同一设置,减小此类误差。

总之,三类白细胞体内、体外凋亡各有其特点,在设计外周血白细胞凋亡相关研究方案时应考虑其不同凋亡特点,科学设计步骤、方法,以得出准确、敏感的结果。同时,直接沉降-CD45/Annexin-V/PI 法有望成为

外周血白细胞凋亡检测的标准化方法,并且,由于 CD45 可以直接圈出白血病细胞,也可直接应用于外周血或骨髓中白血病细胞的凋亡检测,可能可以用于患者白血病细胞的直接药物敏感分析。

参 考 文 献

- [1] 宋传旺,唐洁,刘琦,等. 结核分枝杆菌抗原激活核因子 κ B 延迟中性粒细胞自发凋亡的作用. 中华检验医学杂志,2007,30:306-309.
- [2] 陈雯,许国根,陈颖,等. 急性肺损伤患者中性粒细胞凋亡变化的研究. 中国急救医学,2007,27:196-198.
- [3] 顾艳英,廖可育. 慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞中 FasL 表达. 中国当代医药,2009,16:57-58.
- [4] 邬伟明,洪国斌,徐晓华. 抗 CD3 单克隆抗体对人 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞凋亡和自噬的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2009,3:1157-1163.
- [5] 吴建勇,赵德璋. 流式细胞仪检测细胞凋亡的几种方法的比较. 重庆医科大学学报,2010,35:1386-1389.
- [6] 李富荣,叶志中,戴勇,等. SLE 患者淋巴细胞 Caspase-3 和 Annexin V/PI 的定量检测. 上海免疫学杂志,2003,23:45-46.
- [7] 徐娟,王慧娟,姚婷,等. 系统性红斑狼疮患者淋巴细胞亚群早期凋亡的初步研究. 南京医科大学学报:自然科学版,2003,23:231-234.
- [8] Cohen JJ. Apoptosis. Immunol Today,1993,14:126-130.
- [9] 廖洪映,谷力加,翁毅敏,等. 缺氧诱导因子 1 α 小干扰 RNA 联合顺铂抑制人食管鳞癌 TE-1 细胞裸鼠移植瘤的生长. 中华生物医学工程杂志,2009,15:354-359.
- [10] Vermes I,Haanen C,Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods,1995,184:39-51.
- [11] 张立新,陈亚宝,叶军,等. 直接沉降法同时检测外周血粒细胞与单核细胞、淋巴细胞凋亡. 中华检验医学杂志,2011,34:350-352.
- [12] Tait JF, Smith C, Wood BL. Measurement of phosphatidylserine exposure in leukocytes and platelets by whole-blood flow cytometry with annexin V. Blood Cells Mol Dis,1999,25:271-278.
- [13] 王凤计. 现代血液细胞诊断学. 天津:天津科技翻译出版公司,2004:122,135.
- [14] El Kebir D,Filep JG. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. Scientific World Journal,2010,1:1731-1748.

(收稿日期:2011-07-13)

(本文编辑:戚红丹)

张立新,陈亚宝,叶军,等. 单一检测体系内外周血白细胞凋亡相关指标 Annexin-V、PI 的时相变化特征[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5(22):6637-6641.