

# He-Ne 激光照射引起小鼠胸腺细胞 早期凋亡的实验研究\*

徐 清 刘炳荣 谭立军 史桂英 张蕙心 石熠慧 陈新宇

(上海第二医科大学生物物理学教研室 上海 200025)

**提要** 用 He-Ne 激光照射引起离体小鼠胸腺细胞凋亡, 利用流式细胞计定量检测 Annexin V-FITC 或 Rh123 和 PI 双标记早期凋亡的胸腺细胞, 利用透射电子显微镜对凋亡细胞作形态观察。发现激光照射 60 min(光剂量为 47.694~ 51.822 J/cm<sup>2</sup>), 细胞早期凋亡明显增加, 随着照射时间延长, 光剂量增加, 细胞早期凋亡百分率也随之增加, 表明胸腺细胞经激光照射后, 早期凋亡细胞膜上磷脂酰丝氨酸由质膜内侧外翻至质膜的外表面; 同时线粒体功能损失, 其跨膜电势下降。

**关键词** He-Ne 激光, 凋亡, Annexin V, 线粒体跨膜电势, 胸腺细胞

近年来, 国内外生物医学界对细胞凋亡过程和机理从不同层次开展探索, 随着细胞生物学、生物化学、免疫学和分子生物学技术的发展, 细胞凋亡的研究已获得重大突破, 对其本质有了更深入的认识<sup>[1-3]</sup>。活细胞质膜磷脂在质膜内表面与外表面的分布是不对称的, 脂质双层膜的外表面是磷脂酰胆碱和鞘磷脂, 内表面是磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS), 当凋亡的早期, 质膜磷脂的不对称损失, 导致 PS 暴露在质膜的外表面, Annexin V 优先同 PS 结合<sup>[3,4]</sup>。细胞早期凋亡还表现在细胞线粒体跨膜电势(mitochondrial transmembrane potential, MTP)减弱<sup>[5]</sup>。本实验利用 He-Ne 激光照射离体小鼠胸腺细胞发现部分胸腺细胞发生凋亡。用流式细胞术双参数检测方法和电镜技术方法检测不同照射剂量下的凋亡细胞发生的百分率, 并观察凋亡细胞的形态。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞样品制备

4 周龄雄性 ICR 中小白鼠(中国科学院动物所引种)6 只, 每次实验取 1 只, 用颈椎脱臼法处死, 70% 乙醇浸泡, 在无菌条件下取胸腺, 仔细剥离包膜, 漂洗剩余积血, 立刻用针状器械小心制备单细胞悬液, 350 目尼龙网过滤, 调整细胞浓度为 1~ 1.5×10<sup>6</sup> 个/mL, 温育 2 h 以上。

### 1.2 激光照射

He-Ne 激光经光纤传输至照射部位(培养皿), 光纤末端输出功率为 10.4~ 11.3 mW, 光斑直径为 10 mm, 波长为 632.8 nm。照射组分为 30、60 和 120 min 三组, 均在激光照射后进行

\* 国家自然科学基金会信息科学部资助项目。

收稿日期: 1998-02-06; 收到修改稿日期: 1998-05-14

荧光标记。对照组在相同环境下进行荧光染色,但不照射激光。

### 1.3 细胞荧光标记

由于活细胞膜的完整性,对阳离子染料如台盼蓝和碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)排斥,可选择性标记死细胞,台盼蓝用光学显微镜检查,PI 荧光染色用流式细胞计定量检测,Annexin V 是  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的磷脂结合蛋白,对 PS 有高度亲合力,用异硫氰酸荧光素(FITC)相结合的 Annexin V 与 PI 双标记<sup>[6]</sup>。细胞样品( $10^6$  个/mL)用 pH: 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,离心 5 min,转速为 1500 r/min,再悬浮于 100  $\mu\text{L}$  标记液: 20  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 原液,加 1000  $\mu\text{L}$  Hepes 缓冲液(Hepes/NaOH 0.01 mol/L, pH: 7.4, NaCl 0.14 mol/L,  $\text{CaCl}_2$  0.025 mol/L),再加 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PI 20  $\mu\text{L}$ , 室温( $28^\circ\text{C}$ ) 15 min,加 400  $\mu\text{L}$  Hepes 缓冲液,FCM 检测。

另一实验的荧光探针是亲脂性阳离子若丹明(Rhodamine 123, SIGMA 公司),线粒体内电势比细胞质为负,因此 Rh123 专对线粒体标记。早期凋亡细胞的 MTP 降低, Rh123 荧光减弱,用 Rh123 和 PI 双标记<sup>[7]</sup>, FCM 检测。用双蒸水配制 1 mg/mL Rh123 贮备液,在实验当天用 IMDM(Iscove's Medified Dulbecco's Medium, SIGMA 公司)配制工作液,细胞于激光照射后,用  $25 \times 10^{-6}$  mol/L 的 Rh123 工作液染色 30 min,离心漂洗两次,再在 PI 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的染液中悬浮染色 15 min, 350 目尼龙网过滤, FCM 检测。

### 1.4 流式细胞计分析

流式细胞计(FACSscan 型,美国 B. D 公司)的激发光源为风冷氩离子激光器,输出功率为 15 mW,波长为 488 nm。每个样品检测  $10^4$  个细胞,用 B. D 公司的 LYSIS- $\text{I}$  软件分析数据。Annexin V-FITC 和 Rh123 的荧光光谱为 530 nm,经第一通道收集荧光,PI 的荧光光谱为 610 nm,经第二通道收集荧光,以二维点阵图对数形式显示数据,点的密度代表细胞数的多少,纵坐标为 PI 荧光强度,横坐标为 Annexin V-FITC 或 Rh123 荧光强度(见图 1, 2)。

### 1.5 透射电子显微镜观察

透射电子显微镜为 H-500 型(日本 HITACHI 公司)。为了观察到阳性结果,仅用 He-Ne 激光照射 120 min,能量密度为  $103.643 \text{ J}/\text{cm}^2$ ,照射后立刻离心(1500 r/min) 5 min,弃上清液,沉淀物立即用 2% 戊二醛 PBS 固定液固定 2 h, PBS 冲洗两次,每次 10 min, 1% 锇酸 PBS 固定液作后固定 2 h,再用 PBS 冲洗两次,每次 10 min,以上步骤在  $4^\circ\text{C}$  下 30~ 100% 乙醇逐级脱水(其中 70% 乙醇含 3% 醋酸双氧铀),每步骤 10 min,环氧树脂包埋,超薄切片。

## 2 结 果

### 2.1 流式细胞计检测

激光照射时间为 30, 60, 120 min, Annexin V-FITC 组的照射光剂量(能量密度)分别为  $25.911 \text{ J}/\text{cm}^2$ ,  $51.822 \text{ J}/\text{cm}^2$  和  $103.643 \text{ J}/\text{cm}^2$ ; Rh123 组的照射光剂量分别为  $23.847 \text{ J}/\text{cm}^2$ ,  $47.694 \text{ J}/\text{cm}^2$  和  $95.389 \text{ J}/\text{cm}^2$ 。用流式细胞计检测经 Annexin V-FITC 和 PI 或 Rh123 和 PI 荧光素双标记的鼠胸腺细胞,可分为凋亡细胞、活细胞和坏死细胞三群,胸腺细胞凋亡百分率与 He-Ne 激光照射时间有关(表 1)。本文显示:凋亡细胞和坏死细胞随着激光照射时间的延长、光剂量的增加而增多,而活细胞相应减少(图 1, 图 2)。

### 2.2 电子显微镜观察

用 He-Ne 激光照射 120 min,照射光剂量为  $103.643 \text{ J}/\text{cm}^2$ ,透射电镜可见胸腺细胞形态改

表 1 凋亡细胞的百分率/%

Table 1 Percentage of the thymocyte apoptosis

	control	He-Ne laser irradiation/min		
		30	60	120
Annexin V	6.72	10.12	13.69	21.78
Rh123	16.75	15.95	21.24	34.76

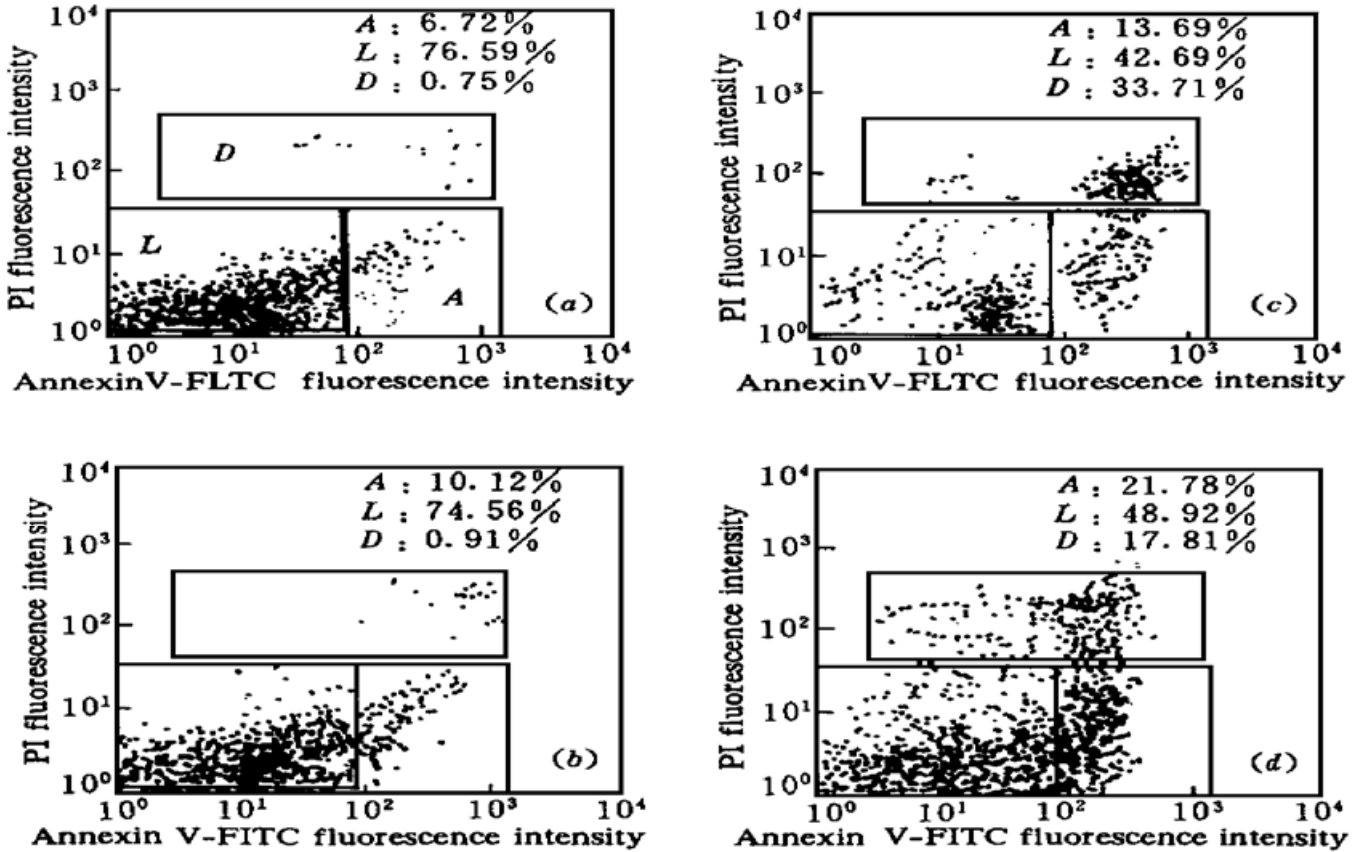


图 1 He-Ne 激光照射引起胸腺细胞质膜磷脂双层不对称性丢失, 产生细胞早期凋亡, 用 Annexin V-FITC (绿色荧光) 和 PI (红色荧光) 双参数分析的二维点阵图

(a) 对照; (b) 照射 30 min; (c) 照射 60 min; (d) 照射 120 min

A: 凋亡细胞群; D: 坏死细胞群; L: 活细胞群

Fig. 1 Loss of the plasma membrane phospholipid asymmetry of the thymocyte was induced by the He-Ne laser irradiation. Flow cytometric analysis of apoptosis of the thymocyte was detected with Annexin V/PI staining

(a) control; (b) irradiated 30 min; (c) irradiated 60 min; (d) irradiated 120 min

A: apoptotic cells; D: dead cells; L: living cells

变, 细胞核染色质浓缩, 分布在核的周围, 呈车轮状, 线粒体存在, 细胞核膜和胞质完整, 出现早期凋亡形态(图 3(b)), 有的细胞出现细胞核染色质分离成碎块, 有的呈现近似新月状, 由膜包裹(图 3(c))。

### 3 讨 论

1972年, Kerr 等详细描述了细胞死亡过程的超微结构特征变化, 并提出了凋亡(Apoptosis)

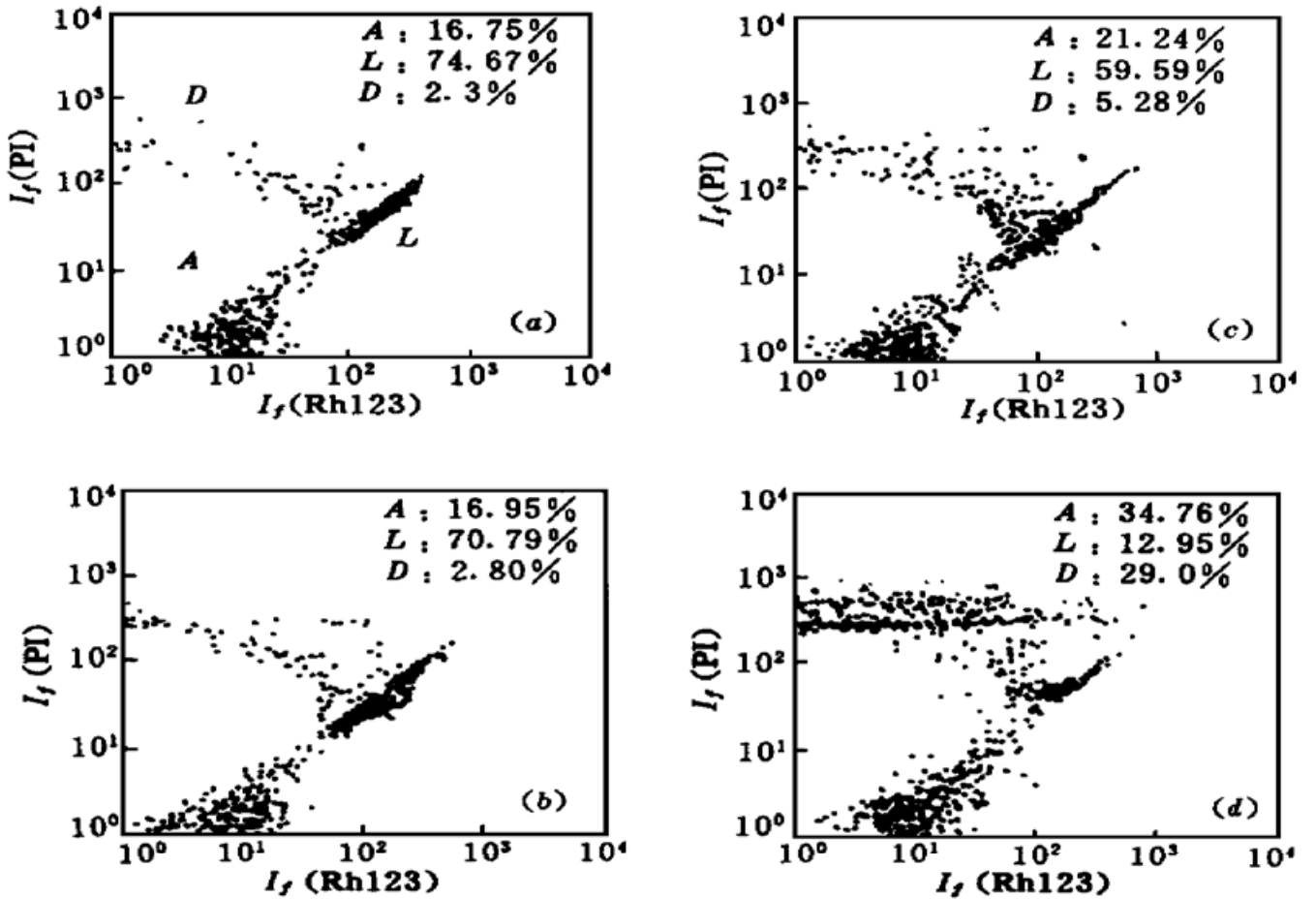


图 2 He-Ne 激光照射引起胸腺细胞线粒体跨膜电势下降, 线粒体功能丢失, 产生细胞早期凋亡, 用 Rh123(绿色荧光)和 PI(红色荧光)双参数分析的二维点阵图

(a) 对照; (b) 照射 30 min; (c) 照射 60 min; (d) 照射 120 min

Fig. 2 Loss of the mitochondrial function followed by TMP decrease of the thymocyte was induced by the He-Ne laser irradiation. Flow cytometric analysis of apoptosis of the thymocyte was detected with Rh123/PI staining

(a) control; (b) irradiated 30 min; (c) irradiated 60 min; (d) irradiated 120 min

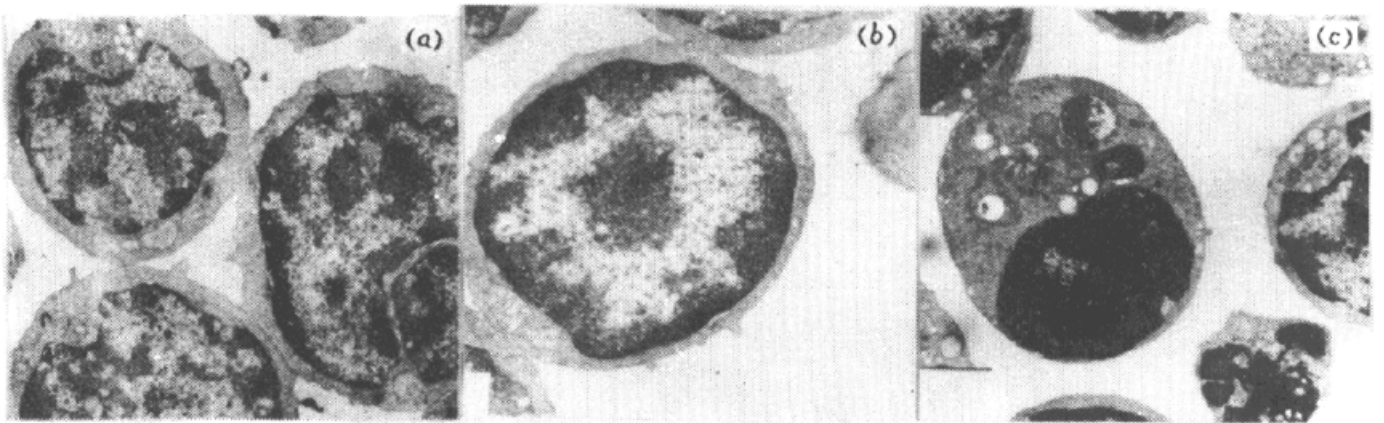


图 3 He-Ne 激光照射 120 min, 在同一标本中用电镜观察到的胸腺细胞(6000×)

(a) 正常细胞; (b) 早期凋亡; (c) 晚期凋亡

Fig. 3 The thymocytes after the He-Ne laser irradiation 120 min were detected by the transmission electron microscope for the same specimen

(a) normal cells; (b) early apoptotic cells; (c) late apoptotic cells

这一术语<sup>[8]</sup>, 他们强调细胞凋亡有特殊形态学特点。外界多种生理刺激可能首先引起细胞内

$\text{Ca}^{2+}$  动员, 胞浆  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  持续升高, 激活潜伏的酶引起细胞凋亡形态结构的变化, 这些酶包括  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的核酸内切酶、转谷氨酰胺酶和使细胞骨架蛋白降解的  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的蛋白酶 (Calpain)<sup>[1,3]</sup>。在细胞凋亡的初期, 膜结构完整, 线粒体和溶酶体等细胞器仍然保持, 但胞质浓缩<sup>[5,6]</sup>。细胞凋亡早期最显著的特点是染色质开始在核周围浓缩, 浓缩的染色质常发生凹形, 如半月形、马鞍形或镰刀形, 最后形成“凋亡小体”(凋亡晚期)<sup>[9]</sup>, 我们用透射电镜分别观察到胸腺细胞早期凋亡(图 3(b)) 和晚期凋亡改变(图 3(c))。

早期凋亡细胞质膜改变在细胞水平能用细胞荧光法定量。活细胞质膜磷脂在细胞质膜的里面和外面呈不对称分布, 鞘磷脂和卵磷脂在脂肪双层的外面, PS 位于内面, 近年来的研究, 早期凋亡细胞的磷脂不对称的丢失导致 PS 暴露在质膜的外面<sup>[6,10,11]</sup>。抗促凝剂 (Anticoagulant) Annexin V 优先结合到阴性电荷的 PS, 凋亡过程中, 染色质浓缩的初期, 质膜活性丢失之前, 质膜仍排除 PI, 使用 Annexin V-FITC 和 PI 对细胞双标记, 可用流式细胞计检测活细胞 (Annexin V 阴性/PI 阴性)、早期凋亡细胞 (Annexin 阳性/PI 阴性) 和晚期凋亡细胞 (PI 阳性)<sup>[5,6]</sup>。PS 残基的外翻可能与线粒体跨膜电势下降、过氧化物阴离子增加有关, PS 的变化允许吞噬细胞对凋亡细胞的识别和排除。

细胞活性检测是以细胞器功能状态试验为基础的, 例如带阳离子电荷的 Rh123 在活细胞线粒体内积累, 细胞与 Rh123 孵育, 活细胞标记, 死细胞不保留线粒体电荷, 具有对 Rh123 最小积累, 细胞与 Rh123 和 PI 双标记, 活细胞发绿色荧光, 死细胞发红色荧光。细胞凋亡早期, TMP 减少, 反映了细胞活性下降, 线粒体对 Rh123 或花青苷积累下降, 这与过氧化物阴离子产物增加和细胞谷胱甘肽还原成分增加相关<sup>[5-7]</sup>。本文用 Annexin V-FITC 和 PI 或 Rh123 和 PI 双标记, 采用流式细胞计检测 He-Ne 激光照射小鼠胸腺细胞发现 30 min 后出现早期细胞凋亡, 随照射光剂量的增加, 细胞凋亡数随之增加(见图 1, 2, 表 1)。表明低功率激光照射可能引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  动员, 胞浆  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  较长时间升高, 激活细胞内一系列酶, 使细胞产生凋亡。

低功率 He-Ne 激光目前在临床上的用途很多, 它的照射能触发小鼠胸腺细胞凋亡, 为扩大其临床医学应用提供了又一新线索。上述变化表明低功率激光照射可引起细胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  动员, 触发了细胞凋亡。如果能精确地找到低功率激光照射时间、强度和波长, 就能更进一步指导低功率激光的临床应用, 当然这还要做更多的实验研究。

## 参 考 文 献

- 1 D. A. Carson, M. R. Joao. Apoptosis and disease. *Lancet*, 1993, **341**: 1251~ 1254
- 2 Shi Yunbo, Wang Ruoxiang, Shi Yufang. Molecular mechanisms of apoptosis (programmed cell death). *Life Sciences* (生命科学), 1996, **8**(3): 8~ 12 (in Chinese)
- 3 Z. Darzynkiewicz, J. Gloria, L. Xun *et al.*. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 1997, **27**(1): 1~ 20
- 4 C. H. E. Homburg, H. de Masja, E. G. B. Albert *et al.*. Human neutrophils lose their surface FcγRII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*, 1995, **85**(2): 532~ 540
- 5 M. Castedo, H. Tamara, A. S. Santos *et al.*. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.*, 1996, **157**(4): 512~ 521
- 6 G. Koopman, C. P. M. Reutelingsperger, R. M. J. Kuijten *et al.*. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994, **84**(5): 1415~ 1420
- 7 S. Shimizu, Y. Eguchi, W. Kamiike *et al.*. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial transmembrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain in-

- hibitors. *Oncogene*, 1996, **13**(1): 21~ 30
- 8 J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Curie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972, **26**(2): 239~ 257
- 9 G. Majno, I. Joris. Apoptosis, oncosis, and necrosis, an overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 1995, **146**(1): 3~ 16
- 10 C. R. Knight, R. C. Rees, M. Griffin. Apoptosis: a potential role for cytosolic transglutaminase and its importance in tumour progression. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, **1096**(2): 312~ 318
- 11 V. A. Fadok, D. R. Voelker, P. A. Campbell *et al.*. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, 1992, **148**(8): 2207~ 2216

## Experimental Study of Early Apoptotic Phase of the Mice Thymocytes Induced by He-Ne Laser Irradiation in Vitro

Xu Qing Liu Bingrong Tan Lijun Shi Guiying  
Zhang Huixin Shi Yihui Chen Xinyu

(Department of Biophysics, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025)

**Abstract** The apoptosis of the mice thymocytes was induced with low power helium-neon laser irradiation in vitro. Flow cytometry analysis of the mice thymocytes was detected by staining cells with a combination of Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) or rhodamine 123 (Rh123) and PI to show the early event of the apoptosis. The cellular morphology of the staining cells was observed by the transmission electron microscope. The early phase apoptosis of the thymocytes increased obviously after 60 min He-Ne laser (light dose  $47.694 \sim 51.822 \text{ J/cm}^2$ ) irradiation. With the laser irradiation time prolonged and the light dose increased, the increase of the percentage of the early phase apoptosis of the thymocytes was observed. It shows that the thymocytes after the He-Ne laser irradiation show loss of asymmetry of the phospholipids on the plasma membrane, leading to exposure of phosphatidylserine on the outer surface, that is expressed with the Annexin V positive. The mitochondrial function of the thymocytes is lost, therefore mitochondrial transmembrane potential is markedly decreased. The Rh123 retention is decreased in the mitochondria, and fluorescence intensity is significantly decreased.

**Key words** He-Ne laser, apoptosis, Annexin V, mitochondrial transmembrane potential, thymocyte