

本文作者：吴思涵

转自知乎专栏：老司机的生物学课堂

地址：<https://zhuanlan.zhihu.com/bioandchill?topic=%E7%94%9F%E7%89%A9%E5%AD%A6>

本文未作改动

凋亡（Apoptosis），或者说程序性细胞死亡（Programmed cell death），是细胞内建的防御机制之一，在生物的正常发育及疾病抵御中起到重要的作用。凋亡过程与通路的异常，会导致多种疾病，包括肿瘤。

目前至少有十数种检测细胞凋亡的方法，从大框架上讲，可以划分为基于细胞形态、生物学功能和生化标记三大类。然而，每一种方法都有其优缺点，且并非所有的方法对每一位实验人员来说都是实用的。本文试图用最简单的语言来讲解每一种方法的特点与适用范围。

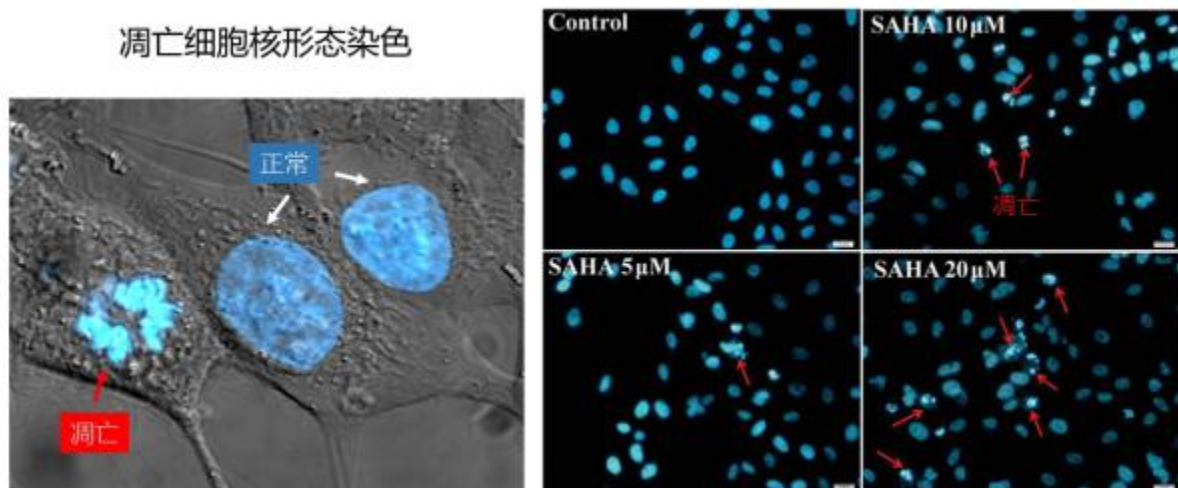
## 一、基于形态学的方法

### 1.1 电子显微镜检查

“凋亡”最早是一个细胞形态学概念。因此，鉴定凋亡的金指标，往往是基于形态学的。

凋亡和另外一种主要的细胞死亡类型“坏死”（Necrosis）有着显著的亚细胞形态差异。简而言之，在透射电镜下，凋亡细胞染色质浓聚，通常沿核膜分布；整体细胞形态发生变化，如细胞表面微绒毛状突起消失，细胞间接触消失，细胞质浓聚，形成具有膜结构的包裹着胞浆内容物和核物质的凋亡小体；相比坏死，凋亡细胞的核结构直到晚期才会解体。典型图片如下图：





一般而言，核形态染色采用的是 DAPI 和 Hoechst 系列荧光染料。因为这些染料特异性强，荧光性能好。其中，Hoechst 33342 是最为方便的染料。它可自由穿透细胞膜，直接对核染色，而不需要固定、破膜步骤。因此，Hoechst 33342 还能结合形态学的相差图像，以及其他活细胞染料（如用 7-AAD 等染细胞膜破裂的细胞），同时对多个指标进行定量。

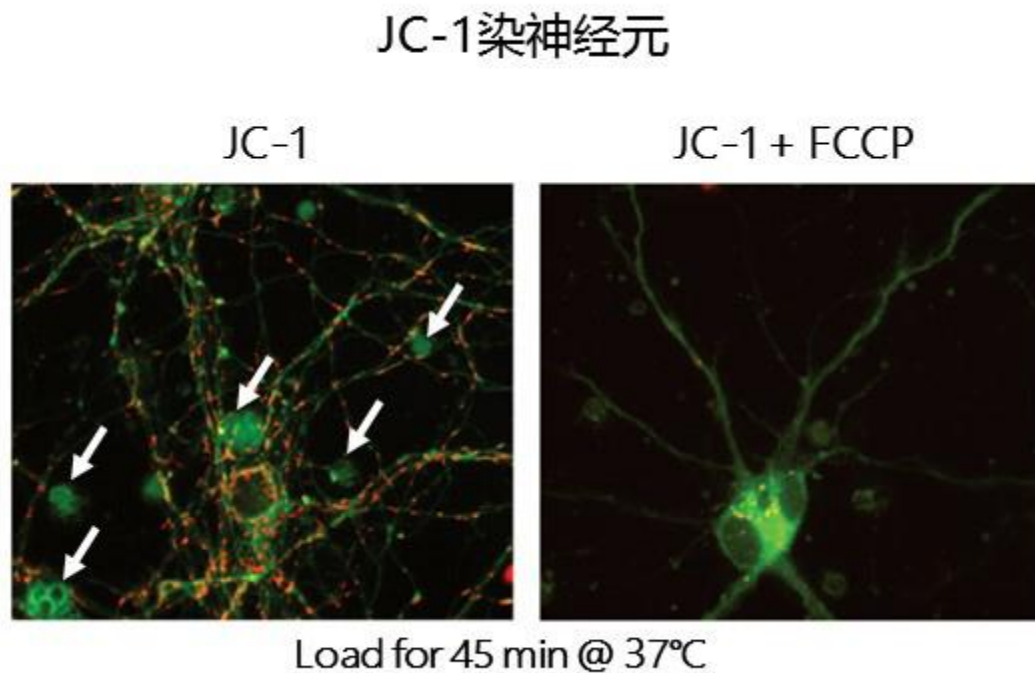
除了实验操作简单、成本低廉之外，核形态染色的优势还在于它是一个定量指标。因此，这也是我最常用的凋亡检测指标之一。不过，定量依赖于拍摄照片后对多个视野的不同核形态手动计数。数细胞费劲，算得上是这项技术的最大缺陷。（注：善用图片处理软件，调整照片的灰阶，有助于获得高质量的核形态图像。这里的定量是对数量的定量，而不是灰阶的定量，因此可以大胆调整。）

## 二、基于细胞功能的方法

### 2.1 线粒体膜电位检测

不少凋亡过程，都会涉及线粒体功能的失调，包括线粒体膜电位差（ $\Delta\psi$ ）的降低甚至丢失。而提起线粒体膜电位检测，估计很多人的第一反应是用 JC-1 染料。这是一种对电位敏感的染料，在低浓度或低线粒体膜电位差的情况下，JC-1 以单体存在，488 nm 激光激发后呈绿色荧光；在高浓度（水相中  $>0.1 \mu\text{M}$ ）或高线粒体膜电位差的情况下，JC-1 形成 J-聚集物，488 nm 激发后呈红橙色荧光。

如下图所示，这是用 JC-1 染神经元的图像，于 37°C 加载 45 min。正常神经元在线粒体处会出现红橙色荧光，而用 FCCP 将线粒体膜电位差去除后，红橙色信号消失。



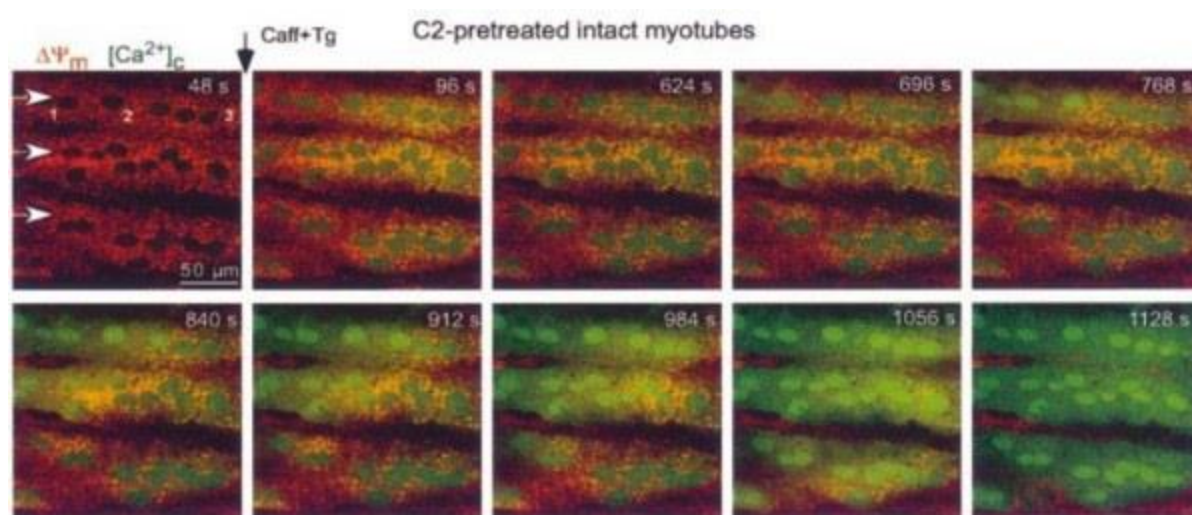
然而，JC-1 染料的缺陷确是非常显著的，甚至有不少文献错误地解读了实验数据。

首先要强调的是，JC-1 只能用于定性研究。这里的“定性”指的是，染色结果只能用来判断线粒体膜电位是否丢失，而不能解释丢失多少。换句话说，许多文献或实验指南提到的计算红绿荧光比值，实际上和  $\Delta\psi$  未必具有线性对应关系。从来就没有人严格地证明过这一点。这也同时得出一个推论，JC-1 仅仅适合细胞成像，而非流式检测。

第二，JC-1 的加载浓度和加载时间会影响红绿荧光比值，原因是 J-聚集物的平衡时间远超单体。最后，J-聚集物的加载平衡时间受到细胞表面积-体积比的影响。

我们也不难看出，如上图白色箭头所示，正常组也存在没有红橙色信号的神经元，而这很可能是染料没有加载充分导致的，而非正常组的本底凋亡较高。

不过，这些缺陷都是 JC-1 染料的锅，而不是检测  $\Delta\psi$  这个指标不靠谱。这里本司机推荐实用 TMRM 或者 TMRE（四甲基罗丹明甲酯或乙酯）来检测线粒体膜电位差。如下图的钙超载引起  $\Delta\psi$  丢失实验：

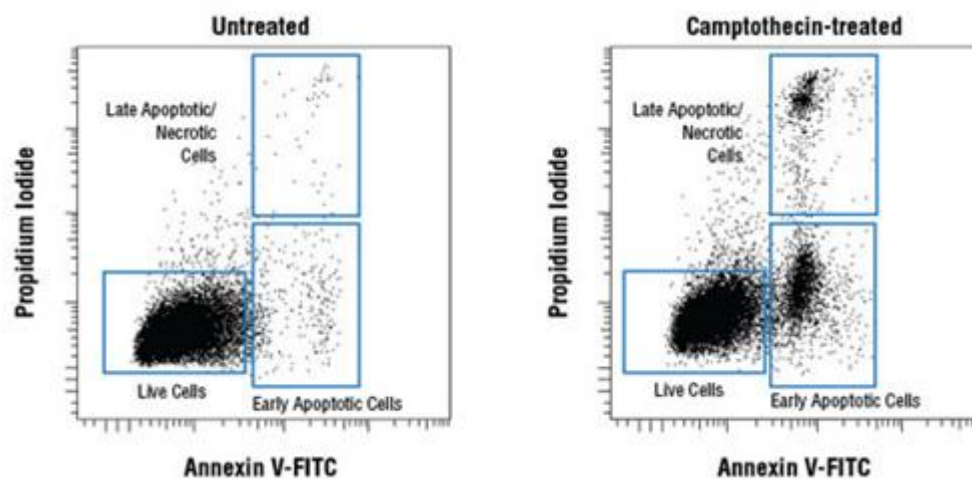


TMRM 或 TMRE 可被 488 nm 激发，呈红橙色荧光，其荧光强度和  $\Delta\psi$  具有一定线性关系。相比 JC-1，这两种染料非常容易溶解，且加载时间短（15-20 min）。此外，相比许多线粒体染料，它们的毒性极低，需要到微摩尔级才会抑制线粒体功能，而染色浓度只在 0.5-30 nM 范围。它们既适合成像，也适合流式细胞术定量。不过在流式定量研究中，需要用 MitoTracker Green FM 这种非线粒体膜电位依赖的染料的信号来校正数据。因为在染料充分加载的情况下，细胞线粒体数量越多，TMRM 或 TMRE 的信号就会越高，反之亦然。

## 2.2 细胞膜表面磷脂酰丝氨酸检测

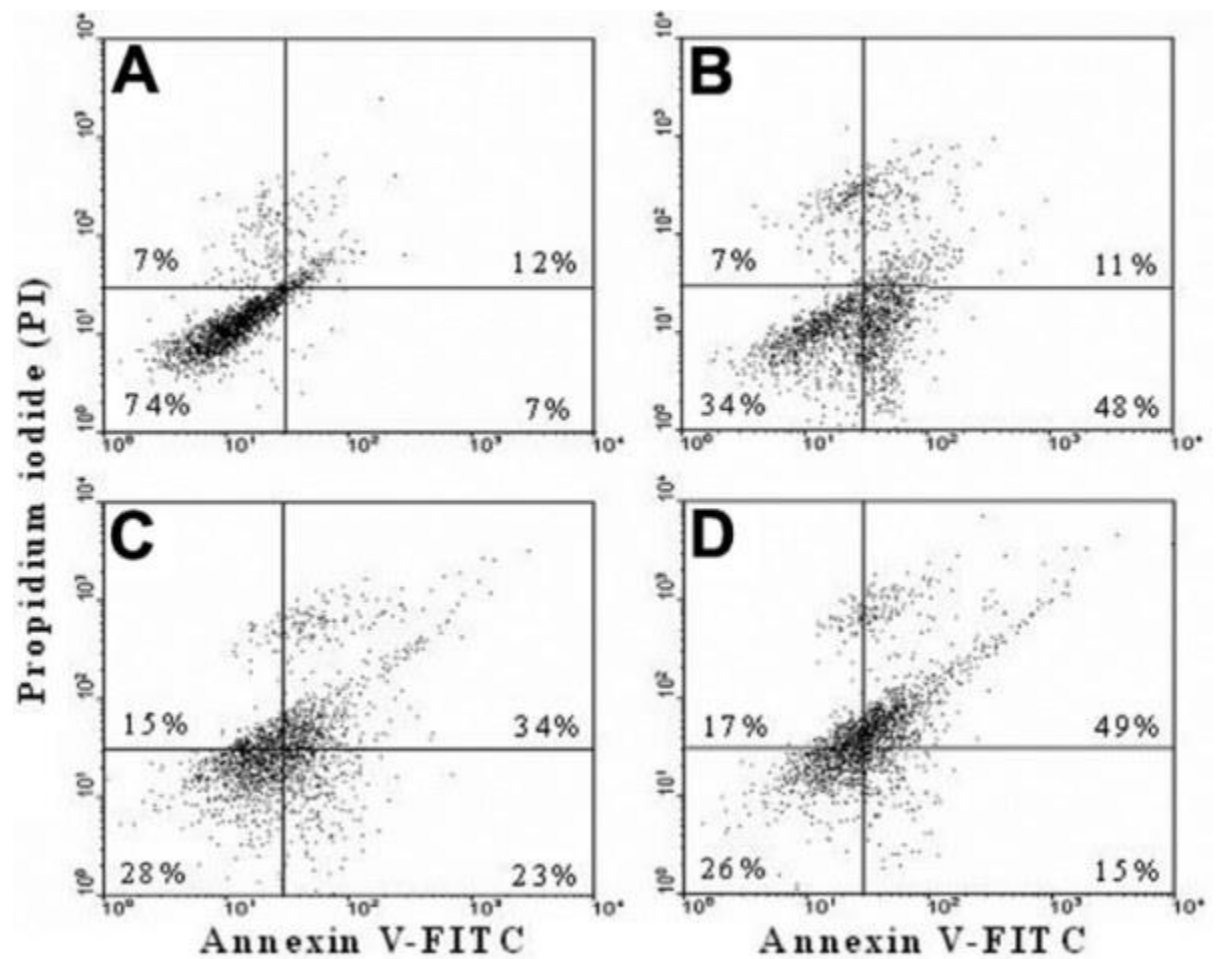
用大白话来说，就是大名鼎鼎的 Annexin V/PI 双染法了。在正常细胞中，细胞膜上的磷脂酰丝氨酸（PS）位于胞浆侧。细胞凋亡中期，PS 外翻。Annexin V 是一种  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的对 PS 具有高度亲和力的磷脂结合蛋白，因此可以用荧光标记的 Annexin V 检测 PS 的外翻。凋亡末期，细胞膜结构受损，原本不透膜的核酸染料

（如 PI、7-AAD 等）也能进入细胞，从而产生信号。分别检测 Annexin V 和不透膜核酸染料的信号，可对凋亡中期和末期细胞的比例进行定量。



虽然目测这是最受欢迎的凋亡检测手段，本司机却不大喜欢用。这是一项针对细胞膜的检测，为了上流式，我们必须制备单细胞悬液。然而，受到凋亡刺激的细胞，细胞膜通常比较脆弱。因此在制备贴壁细胞样品时，很容易在消化和吹打时带来额外的损伤，夸大了实验结果，增加了数据变异度。此外，在实际实验中经常可以发现，凋亡细胞的本底荧光或非特异染色的特性会增强，导致荧光飘移，导致定量不准。

如下图这张随便搜索出来的实验图片，便是很典型的荧光飘移，左下象限的“正常”细胞群一直在往右移动（受到凋亡刺激因素的压迫）。这样子的数据，很难具有严格的“定量”意义。



当然，这些缺陷也不是不可克服的。比如提高样品制备的质量，用密度图而非点图展示数据，双指数坐标部分解决荧光飘移带来的画门障碍等。此外，许多试剂盒用的是 FITC 这种廉价但不稳定的荧光素来标记 Annexin V，有条件的话可购买用稳定荧光素如 Alexa Fluor 标记的试剂盒。不过对我来说，我是直接不用这个方法，改用其他省事又具有说服力的指标。

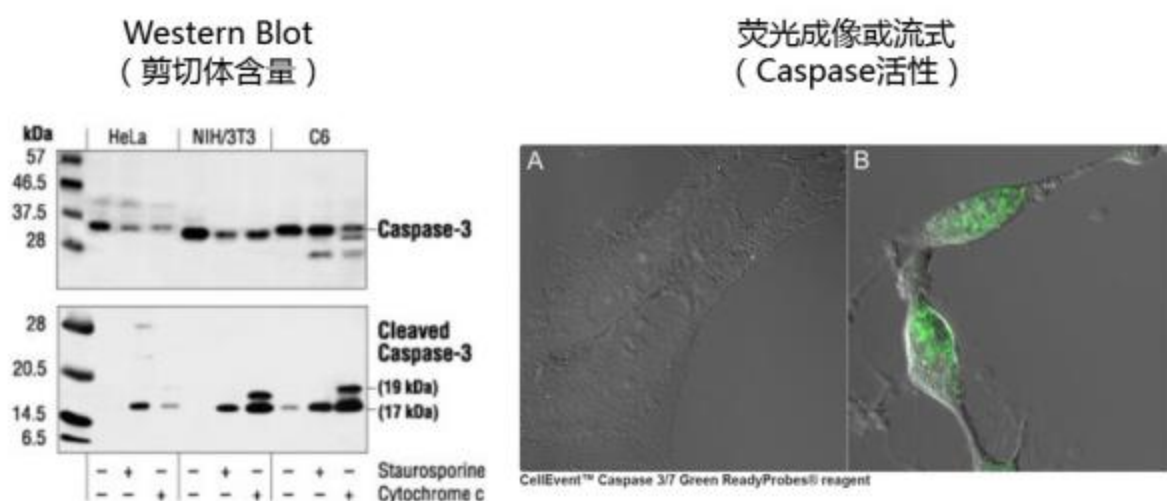
### 三、基于生化标记的方法

#### 3.1 凋亡分子标记检测

细胞凋亡途径，是由一套明确的信号通路层层调控的。在绝大多数情况下，所有的凋亡信号都会汇集到凋亡的最终执行者 **Caspase-3** 之上。上游的凋亡信号通过切割 **Caspase-3**，使其具备酶活，并执行最后的凋亡程序。

许多试剂公司围绕 Caspase 分子的检测推出了许多产品，其主要原理可以分为两大类：检测 Caspase 剪切体的含量，以及检测 Caspase 的活性。

检测含量就不多讲，无非就是用抗体去做 Western blot，免疫组化或免疫荧光，进行定性或相对定量。而由于激活的 Caspase 是一种蛋白酶，因此许多公司也设计出了能够被 Caspase 特异识别的短肽，并在切割后产生信号，从而指示酶活。比如 Promega 公司的 Caspase-glo 系列试剂盒，是将荧光素酶的底物偶联到 Caspase 识别短肽上，并在被切割后释放出来，与荧光素酶和 ATP 反应，产生荧光。而 Molecular Probes 的 CellEvent Caspase-3/7 系列产品，则是将细胞核荧光染料偶联到短肽上，并在被切割后染细胞核。



我个人比较喜欢使用检测 Caspase 活性的荧光探针，既可成像，又可做流式定量。隔壁小分子药物研发组，还使用这种荧光探针在微孔板中做高通量筛选。由此可见，这一类试剂的灵活性是最大的。然而，Caspase 检测也不是万能的，比如某些罕见的情况下，细胞凋亡并不依赖于 Caspase 通路。

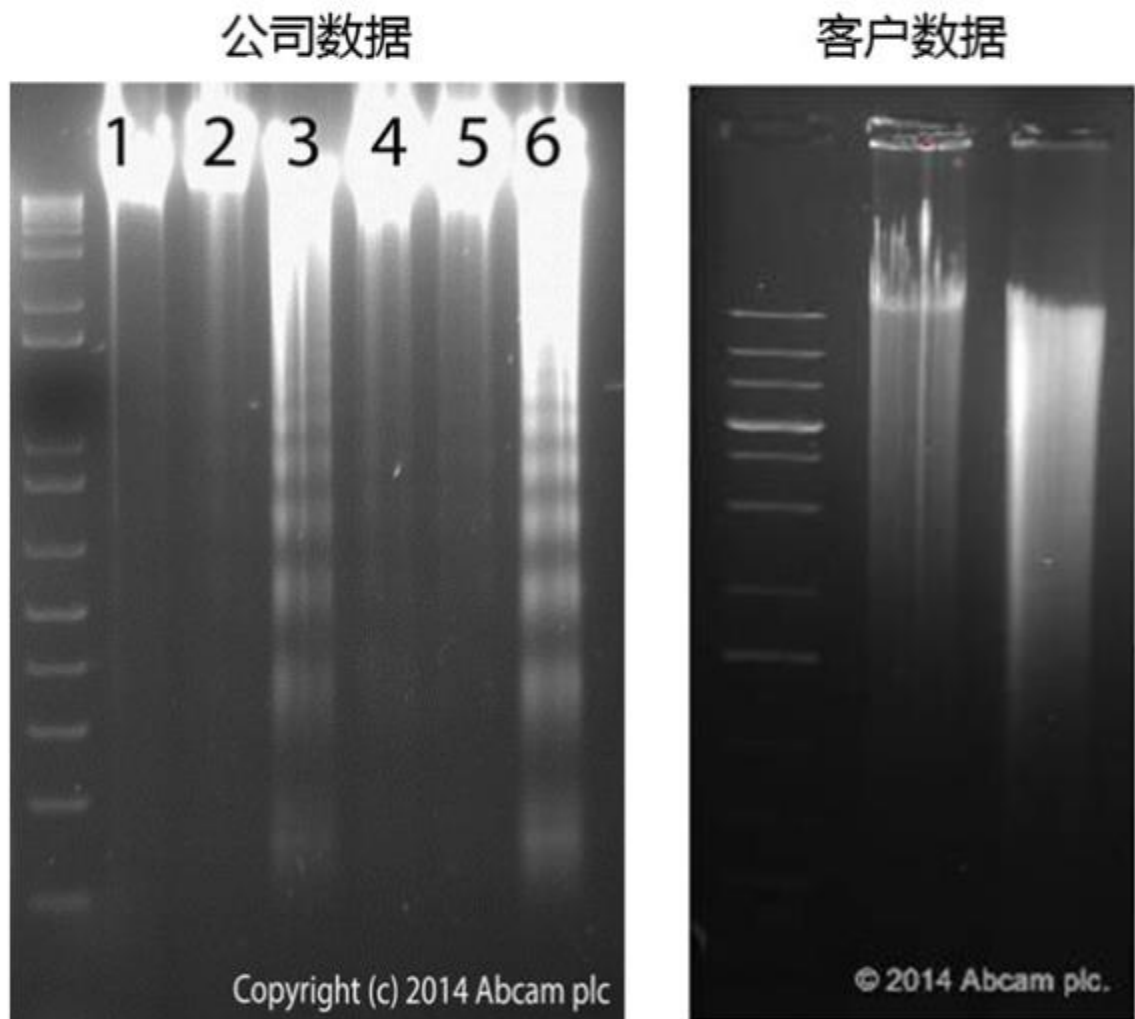
另外一个常用的凋亡分子标记是 PARP 蛋白剪切体，因为它是 Caspase-3 的底物之一。同样地，我们也可以用 Western Blot 等方法去检测其剪切体。

### 3.2 DNA 损伤检测

在细胞凋亡的后期，Caspase 会激活 Caspase-Activated DNase（CAD），切割核小体之间的 DNA，形成以 180-200 bp 为单位的 DNA 片段，经琼脂糖电泳后形成 DNA ladder。

曾几何时，这也是凋亡检测的金标准之一，这种 DNA 切割方式，是凋亡独有的。但放到今天，却越来越少人用。主要原因是耗时，无法定量，以及结果不稳定。比如在我们的脑海中，总会认为 DNA ladder 跑出来就是下面左图的样子（清晰梯状条带），然而实际上，得到右边的结果才是占多数（涂抹带）。具体影响实验结果的因素有很多，比如收集样品的时机，每一个细胞是否同步发生凋亡等等。因此，从定性的角度而言，它不如同样要折腾的电镜来得准确。而这种方法是无法用于定量的。

## 凋亡细胞DNA Ladder



另外一种基于 DNA 损伤的检测方法是 TUNEL 法。细胞死亡（凋亡或坏死）时，DNA 发生断裂。此时利用末端脱氧核苷转移酶（TdT），将核苷酸类似物掺入 DNA 链中，就可用抗体、点击化学（Click chemistry）等方法进行检测。

TUNEL 一般只用于组织切片样本的研究，甚至要尽量避免使用。理由其实很简单：它检测的是 DNA 裸露的 3'-OH 末端。因此，无论凋亡还是坏死的细胞，只要 DNA 受损并暴露出 3'末端，就会产生 TUNEL 信号。对于活细胞来说，我们可以使用前述多种凋亡检测方法。而对于组织样本来说，即使样品已被固定甚至包埋，我们依然能够采用诸如检测 Caspase-3 剪切体的方案。因此，TUNEL 染色是不得已才使用的方法。

## 结语

这篇文章并未罗列所有的凋亡检测方法，仅把目前主流的方案梳理了一番。其中，我个人比较常用的是细胞核形态染色以及 **Caspase-3** 活性检测两种方法。前者观察了形态，又可进行定量；后者则适合大样本和多通量。每个人都可以根据实验室的条件和个人习惯，选择凋亡检测方案。但值得注意的是，最好使用两种在原理上不互相重叠的方法，相互印证，这样才能互相弥补各自的缺陷。比如在观察到明显的凋亡细胞形态的基础上、却发现 **Caspase-3** 无论如何都做不出来时，就要考虑，是否该凋亡现象不依赖于 **Caspase-3**，甚至根本不依赖于 **Caspase** 信号通路。