

不同固定方式对流式细胞术检测细胞周期的影响

张常芬¹, 吴帮勇², 龙平² (1. 黔南布依族苗族自治州中医医院消化内科, 贵州都匀 558000; 2. 黔南布依族苗族自治州人民医院医学检验科, 贵州都匀 558000)

摘要: **目的** 探讨不同固定方式对流式细胞术检测细胞周期的影响。**方法** 经逐滴添加70%(v/v)冰乙醇或加PBS吹散再加冰无水乙醇固定染色后流式细胞仪检测Hela细胞周期, 平行比较两种固定方式制备样品的碎片比例、粘连细胞比例、计数时间、进样速度、CV值和细胞周期结果差异。**结果** 两种固定方法制备的样品镜下均未见明显的细胞聚集; 与传统的“逐滴添加70%冰乙醇”方法比较, “先PBS混匀后添加冰无水乙醇”固定方式制备的样本, 其进样速度快而均匀[(98±12.33)个/s vs (891.33±28.02)个/s], 差异具有统计学意义($t=14.16$, $P<0.001$); 细胞碎片[(35.27±0.74)% vs (31.80±0.54)%]和粘连细胞[(11.43±0.33)% vs (5.53±0.19)%]少, 差异具有统计学意义($t=-2.34$, -15.65 , 均 $P<0.01$); 同时S期的比例无差异[(29.08±0.29)% vs (28.79±0.18)%], $t=-0.83$, $P>0.05$]; G0/G1期比例升高[(59.9±0.66)% vs (62.65±0.27)%], G2/M期比例降低[(11.02±0.43)% vs (8.56±0.10)%], CV值降低[(6.56±0.04)% vs (6.29±0.07)%], 差异具有统计学意义($t=5.12$, -12.01 , -2.05 , 均 $P<0.01$)。**结论** 流式细胞术检测细胞周期时, 先加PBS吹散细胞再加冰无水乙醇固定制备的样品较传统逐滴添加70%(v/v)冰乙醇固定方法检测效果更佳。

关键词: 细胞周期; 流式细胞术; 无水乙醇; 细胞固定

中图分类号: R-331; R446 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)05-155-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2026.05.026

Effects of Different Fixation Methods on Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry

ZHANG Changfen¹, WU Bangyong², LONG Ping² (1. Department of Gastroenterology, Qiannan Buyi and Miao Autonomous Prefecture Traditional Chinese Medicine Hospital, Guizhou Duiyun 558000, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Qiannan Buyi and Miao Autonomous Prefecture People's Hospital, Guizhou Duiyun 558000, China)

Abstract **Objective** To investigate the effects of different fixation methods on cell cycle analysis by flow cytometry. **Methods** HeLa cells were fixed either by the traditional dropwise addition of 70% ice-cold ethanol or by resuspension in PBS followed by the addition of ice-cold absolute ethanol. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. The two methods were compared in parallel for the proportions of debris and cell aggregates, counting time, injection speed, coefficient of variation (CV), and cell cycle phase distribution. **Result** No obvious cell aggregation was observed under microscopy for samples prepared by either method. Compared with the traditional dropwise addition of 70% ice-cold ethanol, the method using PBS resuspension followed by ice-cold absolute ethanol resulted in a significantly faster and more uniform injection speed (98 ± 12.33 cells/s vs 891.33 ± 28.02 cells/s, $t=14.16$, $P<0.0001$), significantly lower proportions of debris [(31.80±0.54)% vs (35.27±0.74)%], $t=-2.34$, $P<0.01$] and cell aggregates [(5.53±0.19)% vs (11.43±0.33)%], $t=-15.65$, $P<0.01$]. No significant difference was observed in the proportion of S-phase cells [(29.08±0.29)% vs (28.79±0.18)%], $t=-0.83$, $P>0.05$]. The proportion of G0/G1-phase cells was significantly increased [(59.9±0.66)% vs (62.65±0.27)%], $t=5.12$, $P<0.01$], the proportion of G2/M-phase cells [(11.02±0.43)% vs (8.56±0.10)%], $t=-12.01$, $P<0.01$] and CV [(6.56±0.04)% vs (6.29±0.07)%], $t=-2.05$, $P<0.01$] were significantly decreased with the PBS/absolute ethanol method. **Conclusions** For cell cycle analysis by flow cytometry, fixation using PBS resuspension followed by ice-cold absolute ethanol yields superior sample quality and more reliable results compared with the traditional dropwise addition of 70% ice-cold ethanol.

Keywords: cell cycle; flow cytometry; absolute ethanol; cell fixation

细胞周期是指有丝分裂的细胞从亲本分裂结束到子细胞分裂结束时DNA含量由二倍体逐渐增加到四倍体的过程, 可分为细胞间期和有丝分裂期(M phase, M期), 细胞间期又分为G1期(Firstgap, DNA合成前期)、S期(Synthesis, DNA合成期)和G2期

(Second gap, DNA合成后期)^[1-2]。通过检测分析细胞分裂过程中DNA含量的变化, 可反应细胞周期的各时期的状况, 即细胞增殖状况^[3]。目前, 流式细胞术(flow cytometry, FCM)是细胞周期分析应用最广、最成熟的实验技术。但在实际操作中, 经常因样品处理

基金项目: 贵州省基础研究计划项目(黔科合基础[2023]一般456), 贵州省卫生健康委员会科学技术基金项目(gzwmj2024-352、gzwmj2022-067)。

作者简介: 张常芬(1990-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 消化系统疾病, E-mail: 2903315481@qq.com。

通讯作者: 龙平(1989-), 男, 本科, 助理研究员, 研究方向: 遗传病和干细胞研究, E-mail: 1071545806@qq.com。

方式不当,导致细胞碎片增多、细胞粘度增大、进样速度变慢、变异系数(CV)值增大等问题,从而对研究结果的准确性产生一定影响^[4]。已有大量文献对细胞周期的固定方式、细胞数量、固定温度、固定时间、染色时间等实验条件进行了充分的研究^[4-6],但未见文献报道固定方式对细胞周期流式分析参数的影响进行评估。因此,本文研究了“逐滴添加70%(v/v)冰乙醇”和“先PBS混匀后添加冰无水乙醇”两种固定方式对细胞周期碎片比例、粘连细胞比例、计数时间、进样速度、CV值以及检测结果的影响,以期获得最佳的固定方式,提高实验结果的准确性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 人宫颈癌细胞系Hela购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪(BD FACSCanto II), CO₂培养箱(Thermo 3111),倒置荧光显微镜(Leica DMLL LED)。胎牛血清、0.25g/dl EDTA-胰蛋白酶及DMEM(Gibco公司),磷酸盐缓冲液PBS及细胞周期检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞准备: Hela细胞培养至密度约为70%的旺盛生长期,用0.25g/dl EDTA-胰蛋白酶消化细胞1min,含血清的培养基终止消化,移液器吸取培养基轻轻吹打皿底使细胞脱落下来,收集至离心管中,1 380 r/min离心5min,弃上清液。加入适当PBS稀释,细胞计数后按每份 1×10^6 个细胞取样本至离心管, PBS洗1次,1 380 r/min离心5min,吸弃上清液待用。

1.3.2 细胞分组和固定: 按下列2种方式进行固定: ①缓慢逐滴添加1ml 70%(v/v)冰乙醇,每次滴添加时涡旋振荡5~10s混匀; ②先加300 μ l PBS吹散细胞成悬液,再加700 μ l冰无水乙醇混匀。取1滴细胞悬液至载玻片上于显微镜下观察细胞是否有聚集成团情况,剩下细胞-20℃固定过夜。

1.3.3 细胞染色: 固定好的细胞经1 380 r/min离心5min,弃吸上清,用1ml的PBS洗涤1次,1 380 r/min离心5min,吸弃上清,收集细胞沉淀;加入500 μ l的PI/RNase染液,室温避光孵育15min;取1滴细胞悬液至载玻片上于显微镜下观察细胞是否有聚集成团情况,余下细胞用Falcon试管过滤器过滤。染色后2h之内完成检测。

1.3.4 上机检测: BD FACSCanto II流式细胞仪488nm激光器通道检测PI荧光强度,用仪器自带软件BD FACSDiva做FSC/SSC散点图排除细胞碎片,PI-H/PI-A散点图排除粘连细胞,PI-A直方图代表DNA含量。调节FSC/SSC和PI通道电压,选择最低上样速度,计数20 000个细胞,记录计数完成时的进样速度和时间。

1.3.5 细胞周期分析: 用FACSDiva分析细胞碎片百

分比和粘连细胞百分比,细胞周期拟合软件ModFit分析PI-A面积直方图,得出各个细胞周期DNA含量的百分比和CV值。

1.4 统计学分析 数据用Excel和SPSS 21.0 软件进行计算和统计分析,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较行 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析(总体有差异时,两两比较采用SNK- q 检验)。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同方式固定和染色后细胞悬液的聚集情况

为评估不同固定方式是否会促进细胞再聚集,在样本固定后和染色后分别取1滴细胞悬液至载玻片上,于显微镜下观察细胞是否有聚集成团情况。结果如图1所示,“逐滴添加70%冰乙醇”组和“先PBS混匀后添加冰无水乙醇”组在镜下未见明显成团聚集现象,说明这两种固定方法都不会促进细胞的聚集。

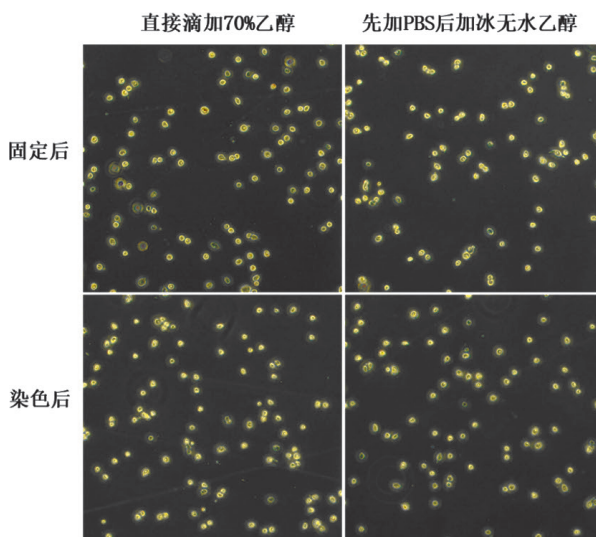
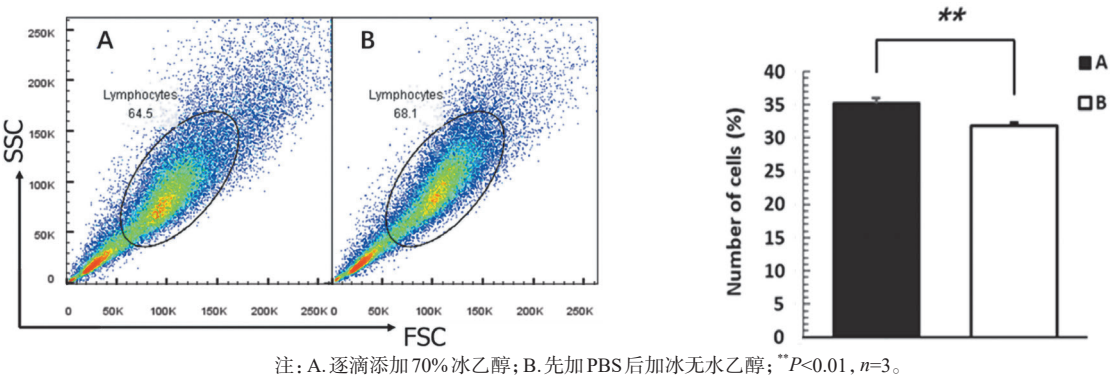


图1 不同方式固定和染色后细胞悬液镜下形态(40 $\times$)

2.2 不同固定方式对进样速度和计数时间的影响 在试验过程中观察到两种固定方式制备的样本进样速度有明显的差异,通过记录分析计数20 000个细胞所需的时间和完成计数时的进样速度。结果发现,“逐滴添加70%冰乙醇”组与“先PBS混匀后添加冰无水乙醇”组相比,进样速度慢、计数时间长,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表1。

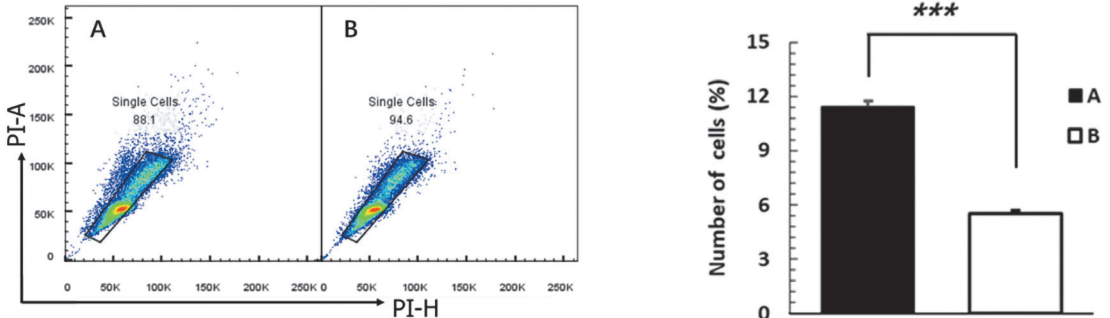
2.3 不同固定方式对细胞碎片和粘连细胞的影响 在流式细胞分析中,细胞碎片和粘连细胞增多会对细胞周期检测结果的准确性产生影响。通过对细胞碎片和粘连细胞的统计分析,如图2和图3所示,“先PBS混匀后添加冰无水乙醇”组的固定效果最好,细胞群最为集中,细胞碎片比例和粘连细胞比例明显减少,差异具有统计学意义($t = -2.34, -15.65$, 均 $P < 0.01$)。

表 1 两种固定方法对进样速度和计数时间影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)				
项目	逐滴添加 70% 冰乙醇	先加 PBS 后加冰无水乙醇	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
计数时间 (s)	47.00 ± 2.45	36.67 ± 2.49	-2.07	0.014
进样速度 (个/s)	98.00 ± 12.33	891.33 ± 28.02	14.16	<0.001



注: A. 逐滴添加 70% 冰乙醇; B. 先加 PBS 后加冰无水乙醇; ***P*<0.01, *n*=3。

图 2 不同固定方式的样本 FSC/SSC 散点图和细胞碎片比例



注: A. 逐滴添加 70% 冰乙醇; B. 先加 PBS 后加冰无水乙醇; ****P*<0.001, *n*=3。

图 3 不同固定方式的样本 PI-H/PI-A 散点图和粘连细胞比例

2.4 不同固定方式对细胞周期及 CV 值的影响 Hela 细胞经乙醇固定,用流式细胞仪检测 DNA 含量,比较两种固定方式对实验结果的影响,结果见表 2。“逐滴添加 70% 冰乙醇”组与“先加 PBS 混匀后添加冰无水乙醇”组相比,S 期的比例差异无统计学意义 (*P*>0.05); G0/G1 期的比例降低, G2/M 期的比例升高, CV 值增大,差异具有统计学意义(均 *P*<0.05)。

表 2 不同固定方式对细胞周期及 CV 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)				
细胞周期	逐滴添加 70% 冰乙醇	先加 PBS 后加冰无水乙醇	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
G0/G1 期	59.90 ± 0.66	62.65 ± 0.27	5.12	0.005
G2/M 期	11.02 ± 0.43	8.56 ± 0.10	-12.01	0.002
S 期	29.08 ± 0.29	28.79 ± 0.18	-0.83	0.294
CV	6.56 ± 0.04	6.29 ± 0.07	-2.05	0.007

3 讨论

流式细胞术是一种基于激光衍生的细胞分析技术,通过测定单细胞或其他微粒经激光光束照射产生的光电信号的变化,可快速测量细胞体积、DNA 含量、蛋白质含量、细胞膜受体和表面抗原等重要的生物学参数^[2,7],在医学研究和临床诊断领域中得到广泛应用^[8-9]。采用流式细胞术对细胞 DNA 含量进行定量分析,可判断细胞群体所处周期时相的比例和变化,了解细胞的生长增殖状态^[4-6]。例如,在癌症研究中,通过流式细胞术分析肿瘤细胞的增殖状态,以评

估药物治疗效果^[10];在免疫学中,研究不同免疫细胞所处周期时相的变化,从而了解免疫反应的机制^[11]。在流式分析前,必须对样本进行适当的固定、染色等处理,这一过程可能影响细胞的生物学特性。所以,细胞的固定、染料的选择及染色条件的优化对实验结果的准确性至关重要。特别是细胞的固定过程,其作用本是保持细胞的结构和功能^[12],但如果固定剂种类、固定剂量及固定方式选择不当,也可能会导致细胞形态和功能的改变,从而造成分析误差,甚至试验失败。流式细胞术中常用的固定剂是多聚甲醛

和乙醇。多聚甲醛通过亚甲基桥的交联来固定蛋白质^[13],保持蛋白质三维结构的完整性,是许多抗体标记的最佳固定剂。但多聚甲醛的交联作用会降低细胞的通透性,因此在胞内或核内抗原抗体染色前,须用合适的通透剂对胞膜或核膜进行打孔。乙醇能使蛋白质和DNA凝固^[13-14],溶解胞膜和核膜上的脂类,同时完成细胞固定和细胞膜通透,无需再对细胞膜进行通透处理,但乙醇会破坏蛋白质的构象影响抗体的结合,不宜用于依赖特定构象或表位结合抗体的固定,所以常用于细胞周期分析。

目前,细胞周期样品制备最常用的方法是通过70%乙醇固定透膜后进行PI染色,这也是许多商品化检测试剂盒推荐的固定方法。然而,在实际操作中,是直接添加70%乙醇固定,还是先加300 μ l PBS吹散细胞后再加700 μ l冰无水乙醇固定,许多初学者尚不知如何选择。虽然乙醇的最终浓度都是70%,但两种方法在周期分析中仍有差异。细胞直接添加70%冰乙醇进行固定后染色上机,常出现细胞粘性大、上样速度慢等问题,严重的甚至堵塞进样针,导致仪器故障。而细胞先经PBS吹散再加冰无水乙醇进行固定后染色上机,并未出现粘连细胞多、上样速度慢和堵针等状况,既往研究^[5-6]也有类似的报道。其原因可能是细胞经PBS吹打成单细胞悬液,再加冰无水乙醇后被充分固定,细胞不易发生脱水和破裂,碎片和DNA的释放减少,细胞间粘性减弱,进样速度变均匀而流畅。所以,流式细胞术检测细胞周期时,推荐先加PBS吹散细胞再加冰无水乙醇进行样品固定。

参考文献:

- [1] 方涵书,郎明非,孙晶.细胞周期分析新方法[J].分析化学,2019,47(9):1293-1301.
FANG H S, LANG M F, SUN J. New methods for cell cycle analysis[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2019, 47(9): 1293-1301.
- [2] RIEGER A M. Flow cytometry and cell cycle analysis: an overview[J]. Methods in Molecular Biology, 2022, 2579: 47-57.
- [3] POZAROWSKI P, DARZYNKIEWICZ Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry[J]. Methods in Molecular Biology, 2004, 281: 301-311.
- [4] 王晓波,刘珍清,崔巍,等.流式细胞术检测细胞周期实验样品制备条件的研究[J].现代检验医学杂志,2013,28(1):95-97.
WANG X B, LIU Z Q, CUI W, et al. Study on sample preparation conditions in flow cytometric cell cycle analysis experiment[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(1): 95-97.
- [5] 沈链链,钟义红,熊建平,等.流式细胞术检测细胞周期实验条件的影响因素分析[J].江苏大学学报:医学版,2020,30(1):76-79.
SHEN L L, ZHONG Y H, XIONG J P, et al. Analysis of influencing factors of experimental conditions for flow cytometry detection of cell cycle[J]. Journal of Jiangsu University(Medicine Edition), 2020, 30(1): 76-79.
- [6] 秦建兵,李雯,衣昕,等.不同实验条件对流式细胞术细胞周期分析结果的影响[J].南通大学学报:医学版,2020,40(6):508-511.
QIN J B, LI W, YI X, et al. Effects of different experimental conditions on cell cycle analysis by flow cytometry[J]. Journal of Nantong University(Medical Sciences), 2020, 40(6): 508-511.
- [7] 黄诚,陆碧玉,代元平,等.精液样本保存方式对精子DNA碎片率检测影响的实验研究[J].现代检验医学杂志,2023,38(3):180-183.
HUANG C, LU B Y, DAI Y P, et al. Experimental study on the effect of semen sample preservation on sperm DNA fragmentation index test[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(3): 180-183.
- [8] 沈立松.流式细胞术的研究进展及临床应用前景[J].中华检验医学杂志,2009,32(3):260-262.
SHEN L S. The current practice and future development of flow cytometry technology[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2009, 32(3): 260-262.
- [9] 国家医学检验临床医学研究中心(中国医科大学附属第一医院),中华医学会检验医学分会,国家卫生健康委临床检验中心,等.流式细胞术的临床应用专家共识[J].中华检验医学杂志,2023,46(8):792-801.
National Clinical Research Center for Laboratory Medicine (the First Hospital of China Medical University), Chinese Society of Laboratory Medicine, National Center for Clinical Laboratories, et al. Consensus on the clinical application of flow cytometry[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2023, 46(8): 792-801.
- [10] 黄洁,陈实,石奕,等.拉帕替尼对A549人肺癌细胞增殖抑制和凋亡机制的实验研究[J].现代检验医学杂志,2022,37(1):154-158.
HUANG J, CHEN S, SHI Y, et al. Experimental study of lapatinib on proliferation inhibition and apoptosis of A549 human lung cancer cells[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(1): 154-158.
- [11] 王芳. mTOR/HIF1 α /PLD2介导的T细胞免疫代谢在口腔扁平苔藓中的作用及机制研究[D].武汉:武汉大学,2020.
WANG F. mTOR/HIF1 α /PLD2-mediated T-cell immunometabolism in oral lichen planus[D]. Wuhan: Wuhan University, 2020.
- [12] BETTERS D M. Use of flow cytometry in clinical practice[J]. Journal of the Advanced Practitioner in Oncology, 2015, 6(5): 435-440.
- [13] 张杰,陆仲夏,李欣宇,等.固定与透膜方法对免疫荧光检测肝脏冷冻切片中胰岛素的影响[J].中国病理生理杂志,2023,39(9):1716-1723.
ZHANG J, LU Z X, LI X Y, et al. Effects of fixation and permeabilization protocols on immunofluorescence detection of insulin in liver frozen sections[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2023, 39(9): 1716-1723.
- [14] JAMUR M C, OLIVER C. Permeabilization of cell membranes[J]. Methods in Molecular Biology, 2010, 588: 63-66.

收稿日期: 2024-08-04

修回日期: 2025-09-16