

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.09.012

DAPI 染色法在流式细胞术中去除死细胞影响的探讨 *

许雅苹^{1,2,3} 郑晓辉^{1,2} 房纯正¹ 翁乐斌¹ 黄黎月¹

(1 厦门医学院基础医学部 福建 厦门 361023; 2 机能与临床转化福建省高等学校重点实验室 福建 厦门 361023;

3 厦门市中药生物工程重点实验室 福建 厦门 361023)

摘要 目的:探索利用 DAPI 染色法在流式细胞检测过程中去除死细胞,消除死细胞对流式结果的影响。**方法:**建立原位肝癌小鼠模型,流式检测其中死细胞对脾脏中骨髓来源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cell,MDSC)结果的影响,并以碘化丙啶(propidium iodide,PI)为对照,探索不同 DAPI 浓度、不同染色时间对死细胞比例的影响。**结果:**流式细胞术中去除死细胞影响时 DAPI 染色浓度低于 1 g/mL 时,其染色结果影响不大,浓度大于 1 g/mL,死细胞比例明显升高;当 DAPI 使用浓度为 0.2 g/mL 时,在 30 分钟内死细胞染色结果与 PI 相比差别无统计学差异,当染色时间大于 30 min 时,死细胞的比例显著升高。**结论:**DAPI 染色法应用于流式细胞术中去除死细胞是一种可靠的检测方法,且简单易行,推荐使用方法为 0.2 g/mL,染色时间 1-5 min。

关键词:DAPI;流式细胞术;死细胞

中图分类号:R-33;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)09-1660-05

A Methodology Study on Elimination the Influence of Dead Cells Stained with DAPI*

XU Ya-ping^{1,2,3}, ZHENG Xiao-hui^{1,2}, FANG Chun-zheng¹, WENG Le-bin¹, HUANG Li-yue¹

(1 Department of Basic Medicine, Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian, 361023, China;

2 Key laboratory of functional and clinical translational medicine, Fujian province university, Xiamen, Fujian, 361023, China;

3 Xiamen Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Bio-engineering, Xiamen, Fujian, 361023, China)

ABSTRACT Objective: To explore the method of DAPI staining in the process of flow cytometry to remove dead cells and eliminate the influence of dead cells on flow cytometry results. **Methods:** An orthotopic transplantation tumor model of hepatoma in mice was used to detect the dead cells effect on the result of MDSC in splenocyte by flow cytometry. PI was used as a positive control to contrast the influence of different DAPI concentration and staining time on the proportion of dead cells. **Results:** The data showed that while the DAPI concentration was less than 1 g/mL, there had a similar result of the proportion of dead cells compared with PI staining; however, if the concentration of DAPI was more than 1 g/mL, the proportion of dead cells was increased. Stained the cells with 0.2 g/mL of DAPI within 30 minutes had a little influence on the proportion of dead cells. But when the staining time exceed 30 minutes, the proportion of dead cells increased obviously. **Conclusion:** The DAPI staining method is a reliable and easy detection method applied to remove dead cells effect on the flow cytometry, 0.2 g/mL of DAPI stained 1-5 minutes was recommend.

Key words: DAPI; Flow cytometry; Dead cells

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)09-1660-05

前言

流式细胞技术(flow cytometry, FCM)对悬液中的单细胞或其他生物粒子,通过检测标记的荧光信号,实现高速、逐一的细胞定量分析和分选的技术^[1]。由于其强大的数据收集与分析功能,流式细胞术在临床医学诊断、细胞分子生物学、免疫学、血液学、病毒学、植物学、海洋微生物学、食品科学等学科得到了广泛的应用^[2-8]。

流式细胞采集信号的原理实质是根据细胞或颗粒上的荧

光信号强度分析分选^[9]。流式细胞分析的目标一般是活细胞,流式细胞分选的目标更要求是活细胞。而实际样品细胞中一般都会有死细胞,特别是组织制备成的单细胞悬液或是一些本身活性不高的样品,死细胞所占比例会更大。由于死细胞有非特异性荧光波长,因此在所有通道表达量相等,对流式结果有一定的影响。本文根据一些国外的文献及实际工作中提出了用低浓度的 DAPI 溶液去除死细胞的方法^[10]。DAPI 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,能够以非嵌入式的方式与 DNA 特异性结合,由 355 nm 激光激发时发射光谱为 400-500 nm。且 DAPI

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81602500);福建省卫计委中青年项目(2016-2-80);

2017 年福建省高校杰出青年科研人才培育计划项目;博士科研启动经费资助(K2016-07)

作者简介:许雅苹(1987-),理学博士,讲师,主要从事肿瘤免疫微环境方面的研究;E-mail: ypxu@xmmc.edu.cn

(收稿日期:2018-10-31 接受日期:2018-11-27)

使用时无需 RNase 对细胞进行处理,因为 DAPI 与双链的 DNA 结合时其荧光强度增强 20 倍,而与单链 DNA 结合时荧光强度不增强,与 RNA 结合不会形成强荧光^[11,12]。因此,DAPI 是一种理想的 DNA 染料。本文采用 DAPI 标记原位肝癌小鼠模型脾脏中的细胞,并与 PI 染色法进行比较,探索简便易行的 DAPI 去死细胞染色法,提高实验数据的准确性。

1 材料与方法

1.1 材料

流式细胞抗体大鼠抗小鼠的 APC CD11b, PE Gr-1 购自美国 BD 公司, PI 购于罗氏试剂公司, DAPI 购于碧云天公司, 红细胞裂解液购自 Hyclone 公司, CFSE 购于 invitrogen 公司。BALB/c 小鼠, 8-12 周龄, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。小鼠肝癌细胞 H22 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠肝癌细胞 H22 培养于 90% RPMI 1640、10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的完全培养基中,并于 37℃、5% CO₂、95%相对湿度的恒温培养箱中培养。H22 是悬浮培养,传代时轻轻将贴在壁上的细胞吹打下来,收集培养液至 10 mL 离心管,300×g 离心 5 min,弃掉上清液,加入新的培养液将细胞团吹打成单细胞悬液,传至新的培养板中培养。

1.2.2 动物模型建立 正常 BALB/c 小鼠,腹腔注射 10%水合氯醛(4 L/g)进行麻醉,仰卧位固定,消毒后在胸骨下缘 2 cm 处沿腹中线向上剪开 2 cm 左右,分离并剪开腹壁,挤出肝左外叶。用 1 mL 胰岛素注射器将 H22 肝癌细胞悬液($5 \times 10^5/25$ L)缓慢注入肝被膜下,见注射部位起一个小泡,证明注射成功。缓慢拔出针头,用电凝笔止血后将肝脏放回原位,缝合腹壁及皮肤切口。10 d 后处死,取脾脏用于后续流式检测^[13]。

1.2.3 脾细胞分离 取小鼠脾脏细胞于 300 目的尼龙布上,加入预冷的 2 mL RPMI-1640 基础培养基,用研磨棒轻轻按压研磨后收集细胞悬液,1500 r/min 4 度离心 5 min,去上清后用 2 mL 红细胞裂解液破红 3 min,用预冷的 2 mL RPMI-1640 全培终止,离心后预冷的 10 mL 0.5% FBS-PBS 洗 1 遍。

1.2.4 T 细胞增殖 分离得到的脾细胞经尼龙毛柱法分离提纯后得到 T 细胞,用 PBS 制备成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞悬液,用 CFSE (Invitrogen)染色(5 M, 20 min, 37 度,避光),再用 1640 全培终止,于 37℃,避光孵育 5 min。将细胞离心后用 1640 全培重悬,接种在 24 孔板, $1 \times 10^6/\text{孔}$, T 细胞活化用抗小鼠 CD3 单克隆抗体 0.1 mg/mL 和抗小鼠 CD28 单克隆抗体 0.1 mg/mL 激活。37℃、5% CO₂、95%相对湿度的恒温培养箱中培养 3 天后流式细胞仪检测。

1.2.5 流式细胞检测 将细胞悬液制备成 $5 \times 10^6/\text{mL}$, 取 100 L 细胞加入相应抗体,4 度避光孵育相应时间后上机检测。MDSC 检测使用抗体:APC CD11b, PE Gr-1。探讨 DAPI 染色时分别加入不同量的 DAIP,使之终浓度为 0.1 g/mL, 0.2 g/mL, 1 g/mL, 5 g/mL, 4℃避光孵育 5 min 后加入 300 L PBS 上机检测。探讨 DAPI 染色时间时,加入 DAPI,使 DAPI 终浓度为 0.2 g/mL,分别 4 度避光孵育 5 min, 10 min, 30 min, 1 h 后加入 300 L PBS 上机检测。流式细胞仪为 Beckmann Coulter Galios。

1.3 统计学分析方法

实验所得数据经 GraphPad Prism 5 软件处理,数据之间的差异用 Mean±SD 方法进行分析,组间比较采用 one-way ANOVA。P<0.05 表示差异具有统计学意义,P<0.01 表示差异具有显著性,P<0.001 表示差异具有非常显著性,P>0.05 则表示差异无统计学意义(no significance, ns)。

2 结果

2.1 死细胞对流式细胞结果的影响

在流式细胞的样品处理中难免会有死细胞产生,特别是组织样品。而死细胞对流式结果会有一定的影响。如图 1 所示,样品是小鼠原位肝癌模型中的脾脏细胞。我们将 A 中的目标细胞群圈出后分析其中骨髓来源抑制性细胞(MDSC)的量,结果如图 1B 所示,在 P1 门的位置会有一些对角线的细胞出现,进而影响 MDSC 的比例。在一些其他的实验中,死细胞对实验结果会有产生一定的影响,比如,T 细胞增殖的实验中会使 T 细胞增殖的比例产生显著性变化,图 1C 左边是没有去除死细胞的 T 细胞增殖 84.4%,而去除死细胞后,实际上 T 细胞增殖的比例是 94.8%。

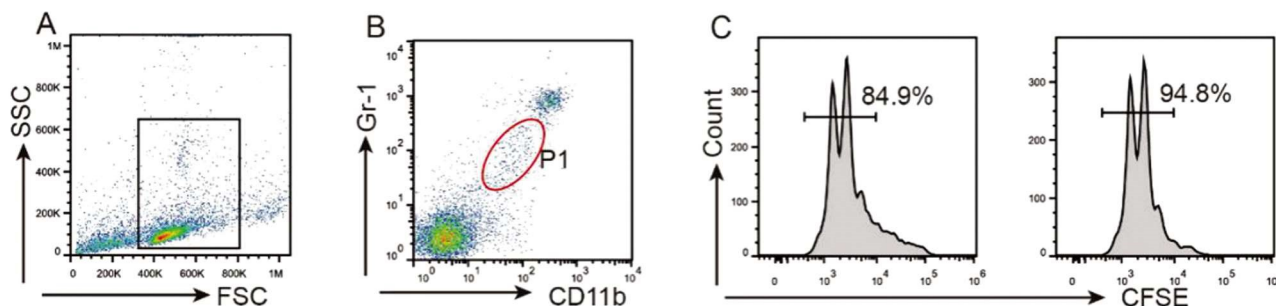


图 1 死细胞对流式细胞结果的影响。

A: 组织样品中的 FSC 和 SSC 的参数二维散点图; B: 组织样品中死细胞对 MDSC 的影响; C: T 细胞增殖实验中死细胞对 T 细胞增殖的影响。

Fig.1 The effect of dead cells on the result of flow cytometry

A. The parameters scatter plot of the tissue samples of FSC and SSC; B. The influence of dead cells in tissue samples of MDSC.

C. Cell death in T cell proliferation experiment effects on T cell proliferation.

2.2 组织样品中细胞的活性

我们将原位肝癌小鼠模型中脾脏制备成单细胞悬液后且

PI 染色,检测其中死细胞比例,结果如图 2 所示,此样品活性较好,样品中活细胞约有 95.5%。为后续摸索 DAPI 染色法的浓度

和时间提供了依据。

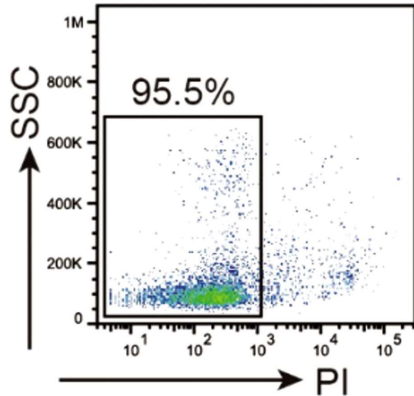


图2 PI染色法检测组织样品的细胞活性

Fig.2 The ability of tissue sample detect by PI satin

2.3 不同浓度 DAPI 染色的结果

取 100 L 4 份相同的脾脏样品,用不同浓度的 DAPI 浓度 4 度、避光染色,5 min 加入 300 LPBS 后上机检测。结果如图 3B 所示,随着 DAPI 使用浓度的增加,活细胞的比例有所降低,但当 DAPI 使用浓度为 0.2 g/mL 的时候,流式检测的活细胞为 95.1%,与使用 PI 染色的结果较为接近。而当 DAPI 的浓度为 0.1 g/mL 时,流式检测的活细胞为 96.4%,虽然比 PI 染色的结果略高,但与 PI 染色相比无统计学差异。但当 DAPI 浓度增加到 1 g/mL 时,活细胞比例比 PI 染色的结果略少,但无统计学差异。而 DAPI 浓度增加到 5 g/mL 时,活细胞比例下降到 92%,与 PI 染色相比降低有统计学差异。推荐 DAPI 使用浓度为 0.2 g/mL。

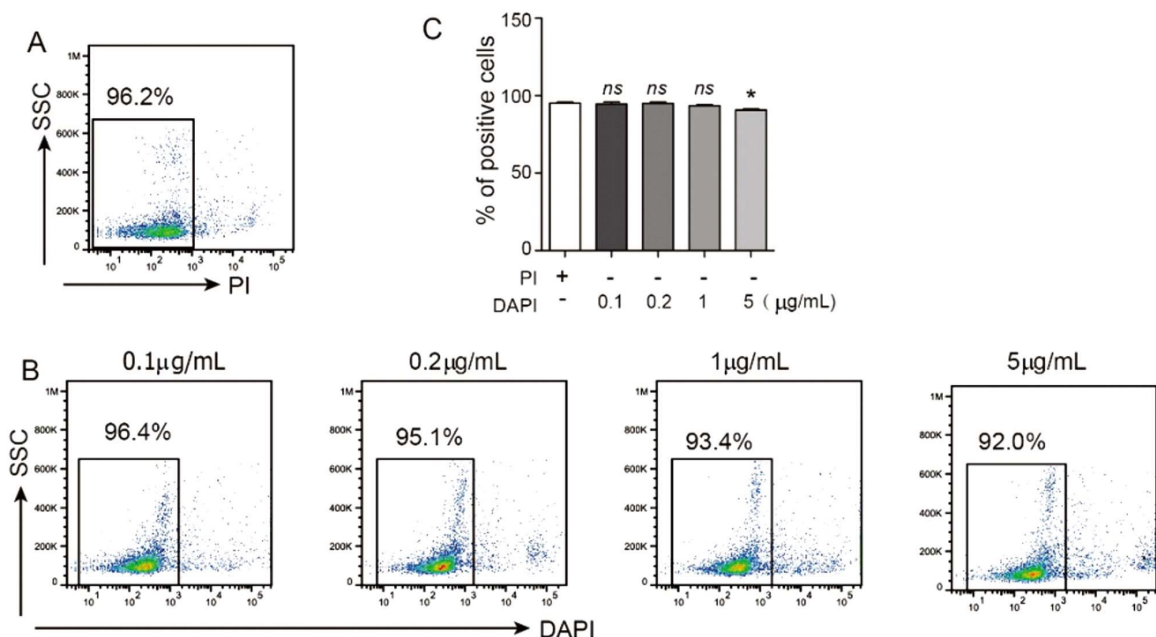


图3 不同 DAPI 浓度检测组织样品的细胞活性

A:PI 染色法活细胞的比例;B:不同浓度 DAPI 染色活细胞比例;C:PI 染色法与不同浓度 DAPI 染色活细胞比例的统计学分析。*P<0.05, ns P>0.05。

Fig.3 The cell activity of tissue samples were detected by different DAPI concentration

A: the ability of tissue sample detect by PI satin;; B: the ability of tissue sample detect by different concentration of DAPI; C: the statistical data of PI stained and DAPI stained. *P<0.05, ns P>0.05.

2.4 不同 DAPI 染色时间的结果

取 4 份相同的脾脏样品,用 0.2 g/mL 的 DAPI 染色 4 度、避光,分别于 5 min,10 min,30 min,60 min 后加入 300 L PBS 上机检测。结果如图 4B 所示,当 DAPI 染色时间为 1 min,5 min,10 min 和 30 min 的时候,流式检测的活细胞分别为 95.5%,94.9%,94.5%和 93.5%,与使用 PI 染色的结果接近。随着染色时间的增加,活细胞的比例有所降低,而当 DAPI 的染色时间为 60 min 时,流式检测的活细胞为 90.4%,与 PI 染色法相比有显著性降低。推荐 DAPI 使用浓度为 0.2 g/mL,染色时间不超过 30 min,最佳染色时间为 1-5 min。

2.5 去除死细胞后脾脏 MDSC 的结果

取一份样品,加入 APC CD11b,PE Gr-1 抗体 4 度避光孵

育 10 min 后加入 DAPI,DAPI 终浓度为 0.2 g/mL,继续 4 度避光孵育 5 min 后加入 300 L PBS,上机检测。结果如图 5 所示,没有去除死细胞的时,在 A 图上对角线上会有一团斜的细胞 P1,比例为 5.9%,而用 DAPI 去除死细胞后(B 图)这团细胞(P3)只有 1.1%,MDSC 的比例也由 7.8%(P2)变为 9.4%(P4)。

3 讨论

随着流式细胞术的迅猛发展,目前流式细胞仪最高可达 7 根激光,可实现多激光多参数的分析,同时获得细胞的多种信息,从而从多个角度对细胞的异质性进行研究。但实验过程中流式样品难免会有死细胞,特别是组织样品。因死细胞的具有非特异性荧光,且不具选择性,在每个荧光信号通道上的表达

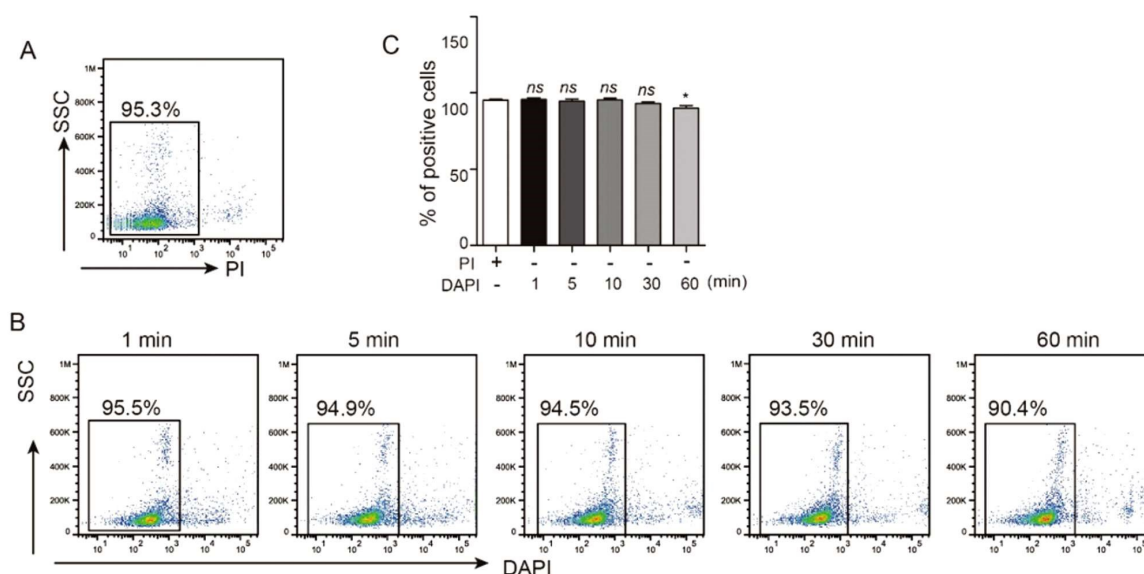


图4 不同的 DAPI 染色时间检测组织样品的细胞活性

A: PI 染色法活细胞的比例; B: 不同的 DAPI 染色下活细胞的比例; C: PI 染色法与不同 DAPI 染色时间活细胞比例的统计学分析。

* $P < 0.05$, ns $P > 0.05$ 。

Fig.4 Different DAPI staining time detection of the tissue samples activity

A: the ability of tissue sample detect by PI stain; B: the ability of tissue sample detect by different stained time of DAPI;

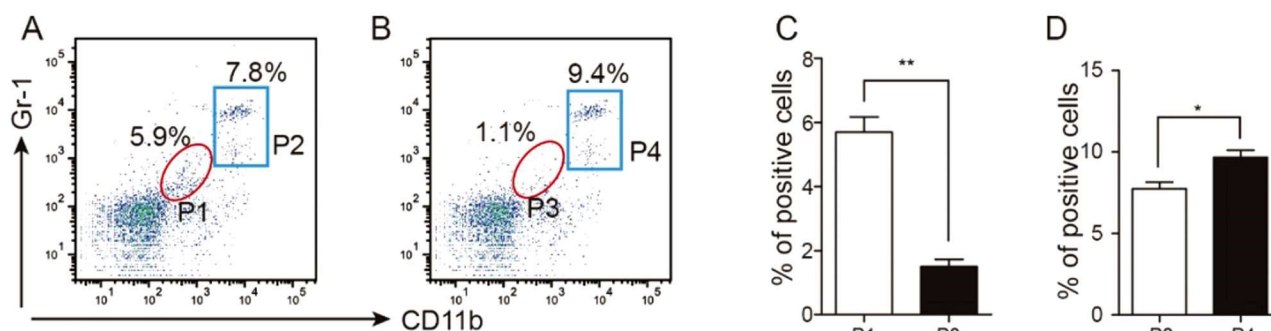
C: the statistical data of PI stained and DAPI stained. * $P < 0.05$, ns $P > 0.05$ 。

图5 去除死细胞前后 MDSC 表达量变化

A: 未去除死细胞 MDSC 的表达; B: 去除死细胞后 MDSC 的表达; C: P1 与 P3 细胞比例的统计分析; D: P2 与 P4 细胞比例的统计分析。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Fig.5 The expression MDSC with or without removed dead cells

A: the expression of MDSC before remove dead cells; B: the expression of MDSC after removed dead cells; C: the statistical of P1 and P3; D: the

statistical of P2 and P4. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

强度都相等,因此对流式结果产生一定的影响,特别是散点图的十字门或是一些弱表达或连续性表达的细胞信号结果影响较大。所以在流式细胞术中去除死细胞的影响非常有必要。

去除流式细胞术中死细胞的方法有多种,比如对于对角线死细胞,可以通过可以利用其他未使用通道来区分死细胞活细胞,但对角线细胞不一定全是死细胞,而且有些荧光会漏到其它通道上,所以单纯使用对角线去除死细胞并不十分合理。区分活死细胞还可以通过 PI 染色法^[14],7AAD 染色^[15]。PI 是一种可对 DNA 染色的细胞核染色试剂,它不能通过活细胞膜,但能穿过破损的细胞膜进入细胞而对核染色^[16]。PI 嵌入双链 DNA 后释放红色荧光,因此常用于细胞凋亡检测、细胞周期分析^[17-20],也常被用于对活细胞和死细胞染色^[21]。但 PI-DNA 复合物的激发和发射波长分别为 535 nm 和 615 nm,其激发光谱几乎与

PE 完全重叠,与 FITC、PerCP 等也有部分重叠,因此应用 PI 去除死细胞限制了多参数分析。此外,PI 具有一定的毒性,且粘性强,容易污染仪器,且在染色过程中需加入 RNase 处理^[22],不适用于分选的仪器。7AAD 发射波长为最大 670,与多种染料发射波长重叠严重,如 cy5,APC,PerCP 等,因此在多色分析时具有比较大的局限性。DAPI 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,常用于细胞周期分析,但低浓度的 DAPI 通过活细胞膜的能力较弱,因此本文提出且 DAPI 染色法进行去死细胞。DAPI 的激发光波长为 360 nm,一般为紫外光激发,但实际上 405 nm 的紫激光也能有效激发 DAPI。DAPI 与 DNA 结合后其发射波长为 460 nm,与应用较为普遍的绿色荧光、黄色荧光、红色荧光,如 FITC、PE、APC 等几乎无光谱重叠,这一优势恰好拓宽了流式细胞术多色、多参数分析的应用。而且,DAPI 是实验室常

备染料,常用于免疫荧光染核、细胞周期分析、细胞凋亡等^[23-25],价格便宜,配制方便、实验步骤简单。

实验过程中我们发现,此样品处理比较温和,但 PI 染色表明仍有 5% 的死细胞。我们以 PI 为对照,摸索 DAPI 的染色条件。DAPI 用于免疫荧光细胞核染色时浓度一般为 5-10 g/mL,染色时间也由 15 min 到 1h 不等,且一般需要将细胞固定,使 DAPI 更容易进入细胞。而我们在流式细胞检测区分活死细胞时用低浓度的 DAPI 溶液,浓度为 0.1 g/mL, 0.2 g/mL, 1 g/mL, 5 g/mL, 染色时间为 5 min, 结果表明,在低浓度 0.2 μg/mL 时, DAPI 的染色结果与 PI 的染色结果基本一致,随着 DAPI 浓度的增加,死细胞的阳性率增加。为了明确 DAPI 的染色时间,我们选用与 PI 染色结果最为接近的 0.2 g/mL, 染色不同时间, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min。结果表明染色时间 5 min 与 10 min 的结果差别不大,且与 PI 的染色结果一致。但当染色时间沿长到 30 min 后,死细胞的比例有略微升高,为 6.5%,而时间延长到 60 min 后死细胞的比例则明显增加,为 9.6%。这可能是因为 DAPI 虽然能透过活的细胞膜,但低浓度的 DAPI 溶液是半通透性的,不固定的话,染料进入细胞会比较少。上述结果表明,在低浓度的 DAPI 溶液 0.2 g/mL, 染色时间 5 min 时是可以作为流式分析中去除死细胞的方法。

本文以 MDSC 为例分析流式细胞术中 DAPI 染色法去除死细胞影响。MDSC 为一群不成熟的、未分化完全的骨髓源性异质性细胞群,在外伤、炎症、肿瘤等条件下生成增加,是近年来发现的继调节性 T 细胞之后的又一个重要的免疫细胞^[26]。小鼠 MDSC 的标志为 CD11b+Gr-1⁺^[27]。MDSC 能够抑制 T 细胞的增殖和功能,近年来大量的研究表明,MDSC 在体内蓄积是肿瘤发生免疫逃逸的主要原因之一,也是机体产生免疫耐受的原因^[28-31]。MDSC 在组织或外周血中的比例是 MDSC 研究的一个重要方面。而在组织细胞制备成单个细胞用于流式检测往往会有一些死细胞产生,从而影响 MDSC 在组织细胞中的比例,比如我们的实验中肝癌模型中脾脏中 MDSC 在未去除死细胞前为 7.8%,而去除死细胞影响后 MDSC 实际在脾脏中比例为 9.4%。因此在组织细胞的流式检测中去除死细胞的影响非常重要。

PI 染色法应用于流式细胞术中去除死细胞的方法在很早就已经被证实并使用^[32]。但随着流式细胞仪的发展,流式细胞术的应用越来越广,多参数的分析对染料的选择要求更多了。而 PI 对多个通道都有一定的影响,因此在目前作为流式细胞术中去除死细胞已不是最好的方法了。本文对比了在流式细胞术中去除死细胞的 PI 染色法和 DAPI 染色法,结果表明,在低浓度、短时间染色过程中,DAPI 染色法与 PI 染色法的结果相近,差异很小,说明 DAPI 与 PI 一样也是一种可靠的去除死细胞的方法,并且 DAPI 染色法对流式细胞仪的污染更小,适用于配有紫激光或紫外激光的流式细胞仪,而 PI 适用于普通的分析型流式细胞仪,没有紫激光或紫外激光的流式细胞仪。每种染色方法都各有优缺点,因此在使用过程中实验者可根据实际情况进行选择。本研究建立的 DAPI 染色法用 0.2 g/mL 的 DAPI,染色时间 5 min 应用于流式细胞术中去除死细胞简单易行,是一种适用于多参数分析的方法。

参考文献(References)

[1] 吴晓娜,蒋红兵.流式细胞术的工作原理及其临床应用[J].中国医疗

设备, 2011, 26(03): 91-93

- [2] 赵焯娟,袁粒星,童煜.流式细胞仪及其在医学研究中的应用[J].中外医学研究, 2016, 14(22): 160-162
- [3] 陈敏敏,周音,孙亿敬,等.秋水仙素诱导百合多倍体及流式细胞仪倍性鉴定研究[J].上海农业学报, 2018, 34(02): 81-87
- [4] Nolan J P, Jones J C. Detection of platelet vesicles by flow cytometry[J]. Platelets, 2017, 28(3): 256-262
- [5] Young Y K, Bolt A M, Ahn R, et al. Analyzing the Tumor Microenvironment by Flow Cytometry[J]. Methods in molecular biology, 2016, 1458: 95-110
- [6] Props R, Kerckhof FM, Rubbens P, et al. Absolute quantification of microbial taxon abundances [J]. The ISME journal, 2017, 11 (2): 584-587
- [7] Yang Y, Gu X, Te SH, et al. Occurrence and distribution of viruses and picoplankton in tropical freshwater bodies determined by flow cytometry[J]. Water research, 2018, 149: 342-350
- [8] Weng X, Neethirajan S. Ensuring food safety: quality monitoring using microfluidics [J]. Trends in Food Science & Technology. 2017, 65: 10-22
- [9] Nolan JP, Condello D. Spectral flow cytometry[J]. Current protocols in cytometry, 2013, Chapter 1: Unit1 27
- [10] Hu X, Barhn K, Paschall A V, et al. Deregulation of apoptotic factors Bcl-xL and Bax confers apoptotic resistance to myeloid-derived suppressor cells and contributes to their persistence in cancer [J]. The Journal of biological chemistry, 2013, 288(26): 19103-19115
- [11] Kapucinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe[J]. Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission, 1995, 70(5): 220-233
- [12] 刘锡娟,丁慧荣,张宏.用 DAPI 和 Hoechst33342 染色法检测 DNA 的流式细胞方法探讨 [J]. 北京大学学报(医学版), 2010, 42 (04): 480-484
- [13] Xu Y, Zhao W, Wu D, et al. Isolation of myeloid-derived suppressor cells subsets from spleens of orthotopic liver cancer-bearing mice by fluorescent-activated and magnetic-activated cell sorting: similarities and differences [J]. International journal of clinical and experimental pathology, 2014, 7(11): 7545-7553
- [14] Pieper I L, Radley G, Chan C H, et al. Quantification methods for human and large animal leukocytes using DNA dyes by flow cytometry [J]. Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology, 2016, 89(6): 565-574
- [15] Stacchini A, Aliberti L S, Demurtas A, et al. Flow cytometry identification of nonhemopoietic neoplasms during routine immunophenotyping[J]. International journal of laboratory hematology, 2018
- [16] 胡梦裳,张云艳,万建美,等.不同浓度的碘化丙啶染色对细胞周期分布的影响[J].激光杂志, 2015, 36(01): 144-147
- [17] 邓跃林,陈艳丽,吴华杰,等. Nuprl 调控非小细胞肺癌细胞迁移、凋亡机制的研究[J].现代生物医学进展, 2017, 17(19): 3636-3640
- [18] Crowley L C, Marell B J, Scott A P, et al. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry [J]. Cold Spring Harbor protocols, 2016, 2016(11): pdb prot087288
- [19] Desouza N, Zhou M, Shan Y. Cell Cycle Analysis of CML Stem Cells Using Hoechst 33342 and Propidium Iodide [J]. Methods in molecular biology, 2016, 1465: 47-57

(下转第 1674 页)

- [6] Madan K, Dhungana A, Mohan A, et al. Conventional Transbronchial Needle Aspiration Versus Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration, With or Without Rapid On-Site Evaluation, for the Diagnosis of Sarcoidosis: A Randomized Controlled Trial [J]. J Bronchology Interv Pulmonol, 2017, 24(1): 48-58
- [7] Mahajan AK, Ibrahim O, Shostak E, et al. EBUS-TBNA of pulmonary artery clot[J]. J Bronchology Interv Pulmonol, 2014, 21(4): 371-373
- [8] Li P, Zheng W, Zhao L. Convex probe endobronchial ultrasound: applications beyond conventional indications [J]. J Thorac Dis, 2015, 7(9): E289-297
- [9] Romero Frances L, Royo Prats JA. Pulmonary Artery Leiomyosarcoma Diagnosed by Magnetic Resonance, PET-CT and EBUS-TBNA [J]. Arch Bronconeumol, 2017, 53(9): 522-523
- [10] Montani D, Jais X, Sitbon O, et al. EBUS-TBNA in the differential diagnosis of pulmonary artery sarcoma and thromboembolism[J]. Eur Respir J, 2012, 39(6): 1549-1550
- [11] Fedi A, Thony F, Ferretti GR, et al. Mediastinal haematoma: A little known complication of ultrasound-guided trans-bronchial lymph node aspiration (EBUS-TBNA)[J]. Rev Mal Respir, 2019
- [12] Hanna A, Crutu A, Baldeyrou P. Needle Tip Fracture, an Unusual EBUS-TBNA Complication[J]. J Bronchology Interv Pulmonol, 2018, 25(2): e23-e24
- [13] Ozgul MA, Cetinkaya E, Tutar N, et al. An unusual complication of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA): the needle breakage [J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 20(Suppl): 567-569
- [14] Hardavella G, Navani N. EBUS-TBNA with ROSE-tinted spectacles? [J]. Respiration, 2013, 86(5): 439
- [15] Xiang Q, Wan T, Hu Q, et al. Value of C-ROSE During EBUS-TBNA to Obtain the Tissue Sample in the Diagnosis of Lung Cancer [J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2018, 21(11): 833-840
- [16] Gupta N, Klein M, Chau K, et al. Adequate at rapid on-site evaluation (ROSE), but inadequate on final cytologic diagnosis: Analysis of 606 cases of endobronchial ultrasound-guided trans bronchial needle aspirations (EBUS-TBNA)[J]. Diagn Cytopathol, 2018
- [17] Mallya V, Kumar SP, Meganathan P, et al. The utility of ROSE (rapid on-site evaluation) in endobronchial ultrasound (EBUS)-guided transbronchial needle aspiration (TBNA): Is the picture rosy?[J]. J Cytol, 2015, 32(4): 230-233
- [18] Kasamatsu N, Hashizume I, Hanzawa S, et al. Diff-Quik stain in immediate interpretation of cytopathology in bronchoscopy [J]. Nihon Rinsho, 2002, 60(Suppl 5): 195-198
- [19] Reyes CV. Diff-Quik cytologic recognition of Chlamydophila psittaci in orolabial lesions of Stevens-Johnson Syndrome [J]. Acta Cytol, 2010, 54(5): 692-694
- [20] Baram D, Garcia RB, Richman PS. Impact of rapid on-site cytologic evaluation during transbronchial needle aspiration [J]. Chest, 2005, 128(2): 869-875
- [21] Guo H, Liu S, Guo J, et al. Rapid on-site evaluation during endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for the diagnosis of hilar and mediastinal lymphadenopathy in patients with lung cancer[J]. Cancer Lett, 2016, 371(2): 182-186

(上接第 1664 页)

- [20] 林晓萌, 丁琪琼, 陈鹤汀, 等. 灵芝酸 A 对人炎性乳腺癌细胞体外增殖和凋亡的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, (1): 116-120
- [21] Crowley L C, Scott A P, Marfell B J, et al. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry [J]. Cold Spring Harbor protocols, 2016, 2016(7): pdb prot087163
- [22] 麦丽萍, 钟诗龙, 杨敏, 等. 两种不同染色法在流式细胞术中检测细胞周期的探讨[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(12): 1363-1366+1480
- [23] Yu P, Shi L, Song M, et al. Antitumor activity of paederoidic acid in human non-small cell lung cancer cells via inducing mitochondria-mediated apoptosis [J]. Chemico-biological interactions, 2017, 269: 33-40
- [24] Huang J, Chen S, Shi Y, et al. Epigallocatechin gallate from green tea exhibits potent anticancer effects in A-549 non-small lung cancer cells by inducing apoptosis, cell cycle arrest and inhibition of cell migration [J]. Journal of BUON: official journal of the Balkan Union of Oncology, 2017, 22(6): 1422-1427
- [25] Lu Y, Wang R H, Guo B B, et al. Quercetin inhibits angiotensin II induced apoptosis via mitochondrial pathway in human umbilical vein endothelial cells [J]. European review for medical and pharmacological sciences, 2016, 20(8): 1609-1616
- [26] Gabrilovich D I, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [J]. Nature reviews Immunology, 2009, 9(3): 162-174
- [27] Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, et al. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice[J]. Journal of immunology, 2008, 181(8): 5791-5802
- [28] Penalzoa HF, Alvarez D, Munoz-Durango N, et al. The role of myeloid-derived suppressor cells in chronic infectious diseases and the current methodology available for their study[J]. Journal of leukocyte biology, 2018
- [29] Ohl K, Tenbrock K. Reactive Oxygen Species as Regulators of MDSC-Mediated Immune Suppression[J]. Frontiers in immunology, 2018, 9: 2499
- [30] Groth C, Hu X, Weber R, et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression[J]. British journal of cancer, 2018
- [31] Deng Z, Rong Y, Teng Y, et al. Exosomes miR-126a released from MDSC induced by DOX treatment promotes lung metastasis [J]. Oncogene, 2017, 36: 639-51
- [32] 陶家平, 陈捷光. 流式细胞计在免疫荧光测量中去除死细胞影响的方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, (04): 298-301