

# 原位细胞凋亡检测技术体会

王 敏,李蓓云

**摘 要:**目的 探讨 TUNEL 法检测细胞凋亡的最佳条件。方法 各取 20 例大肠癌组织和鼠脑组织,分成 A、B 两组,A 组按照宝灵曼公司推荐的条件操作,B 组按照本实验室改进后的条件操作。结果 A 组与 B 组细胞凋亡阳性率无区别( $P>0.05$ ),A 组背景着色明显高于 B 组( $P<0.01$ )。结论 改良后的 TUNEL 操作条件更准确地反映出细胞凋亡状态。

**关键词:**细胞凋亡;检测;方法

中图分类号:R361.3

文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2002)04-0276-02

## Experience of technique on terminal transferase deoxyuridine nick-end

WANG Min g, LI Bei -yun

Department of Pathology, Medical College, Wuhan University, Wuhan 430071, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the optimal conditions on apoptotic cells detected by terminal transferase deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL). **Methods** 20 human large intestine carcinomas and 20 rat cerebrum tissues were separated into two groups. Group A was constituted of 10 human large intestine carcinomas and 10 rat cerebrum tissues, the rest served as group B. Group A was treated according to conditions recommended by Boehringer Mannheim company, group B was treated according to our laboratory improved conditions. **Results** No significant differences of positive rate of apoptotic cells were observed between group A and group B ( $P>0.05$ ). Background staining was significantly higher in group A compared to group B ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Improved TUNEL method could detect apoptotic cells more correctly.

**Keywords:** Cell apoptosis; Detection; Methods

原位细胞凋亡检测技术是一种敏感、快捷的检测细胞凋亡技术,对于福尔马林固定的石蜡切片组织,在进行此项技术检测时,若处理不当,易形成假阳性,而影响结果判断,本文应用原位凋亡检测试剂盒辣根过氧化物酶(TUNEL)方法,对福尔马林固定的石蜡包埋组织切片用不同条件进行处理,通过摸索,获得较为理想的效果。

### 1 材料和方法

1.1 主要试剂及设备 原位细胞凋亡检测试剂盒(宝灵曼公司);微波炉(ywy781 医用型)

1.2 组织标本 人大肠癌组织 20 例;缺氧处理的 SD 大鼠脑组织 20 例;两种组织经 10% 福尔马林固定 24h,石蜡包埋,切片厚度为 4 $\mu$ m。

1.3 实验分组 A 组和 B 组均有 10 例大肠癌组织和 10 例鼠脑组织。

#### 1.4 操作步骤

(1)组织切片脱蜡入水,蒸馏水洗。(2)A 组经蛋白酶 K37 消化 15min。B 组将组织切片置入 0.01M

PH6.0 柠檬酸缓冲液中,微波处理 8min,温度达 75 $^{\circ}$ C,冷却 15min<sup>[1]</sup>。(3)1% 小牛血清,37 $^{\circ}$ C,15min。(4)A 组:加入末端脱氧核苷酸转移酶溶液(TdT),荧光素连接核苷酸混合液,均按 1:10 稀释。B 组:TdT 荧光素连接核苷酸混合液均按 1:15 稀释。(5)10% 小牛血清,37 $^{\circ}$ C,15min。(6)A 组:加入辣根过氧化物酶连接荧光素抗体(POD),0.01M,PH7.4PBS 缓冲液,均按 1:1 稀释。B 组:将 POD、PBS 均按 1:4 稀释加入切片上<sup>[2]</sup>。(7)DAB 显色,苏木素复染,脱水透明,封片。

1.5 阳性结果判断标准 凋亡细胞阳性率<5% 多(-),5%~25%(+),25%~50%(++),5%~75%(+++),>75%(++++ )。

1.6 统计学处理 数据经秩和检验处理, $P<0.05$ 为统计学有差异。

### 2 结果

A 组中组织切片的阳性率及背景无很高,B 组阳性率高,但无背景着色,见表 1 和表 2,经秩和检验,A 组中鼠脑和大肠癌细胞组织细胞凋亡阳性率与 B 组无差别( $P>0.05$ );A 组中鼠脑和大肠癌组织背景着色与 B 组有明显统计学差异( $P<0.01$ )。

收稿日期:2001-11-30;修回日期:2002-01-11

作者单位:430071 武汉大学医学院病理学教研室

表 1 不同条件下 TUNEL 法检测大肠癌细胞凋亡结果

	细胞凋亡阳性率						背景着色			
	++++	+++	++	+	-	(++++)	(+++)	(++)	(+)	(-)
A 组	8 例	2 例	0	0	0	2 例	7 例	1 例	0	0
B 组	1 例	9 例	0	0	0	0	0	0	1 例	9 例

表 2 不同条件下 TUNEL 法检测鼠脑组织凋亡结果

	细胞凋亡阳性率						背景着色			
	++++	+++	++	+	-	(++++)	(+++)	(++)	(+)	(-)
A 组	9 例	1 例	0	0	0	1 例	9 例	0	0	0
B 组	2 例	8 例	0	0	0	0	0	0	1 例	9 例

3 讨论

原位凋亡辣根过氧化物酶法 (TUNEL) 检测细胞凋亡, 容易出现假阳性, 其原因复杂<sup>[3]</sup>, 可能是标本中有处于分裂期细胞, 出现 DNA 自然断裂, 也可能是坏死细胞 DNA 断裂, 或是 TUNEL 法实验操作过程中试剂浓度选择不当造成。前两者造成的假阳性, 显色程度较浅, 可与真正细胞凋亡区别, 并可通过选择标本而得以排除, 后者造成假阳性特别强, 且背景深, 不易排除, 我们采用不同的实验条件, 取得满意效果。

我们将实验分成 A 组和 B 组, A 组按照宝灵曼

公司提供的试剂说明书实验操作步骤及试剂浓度操作, B 组按照我们摸索的条件操作。结果表明, A 组假阳性高, 且背景着色深, B 组阳性率高, 无背景着色。较准确的检测出凋亡细胞, 需选择合适的 TdT 及 POD 浓度, 不同的组织需要的浓度, 一般情况下 TdT 为 1:10 ~ 1:15 稀释, POD 为 1:2 ~ 1:4 稀释。

在鼠脑和大肠癌组织中 TdT 为 1:15 稀释, POD 为 1:4 稀释。宝灵曼公司推荐使用蛋白酶 K 消化, 结果则假阳性率高, 背景深。我们采用柠檬酸缓冲液 75 微波处理, 效果好。在实验操作中必须充分洗涤组织切片, 防止非特异性结合, 这也是实验成功的重要因素<sup>[4]</sup>。

参考文献:

[1] 洪涛, 张雷, 折小宁, 等. 培养细胞及石蜡切片中凋亡细胞的检测[J]. 中华病理学杂志, 1997, 25 (4): 124-125.

[2] Leveland JL, Ihle JN. Contenders in Fas/TNF deaths signaling[J]. Cell, 1995, 81 (4): 479-482.

[3] 彭黎明, 江虹. 细胞凋亡的检测[A]. 见: 彭黎明, 王曾礼主编. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 153-218.

[4] Ummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis[J]. Am J Pathol, 1997, 21 (1): 88-91.

(刘红武校对)

(上接第 272 页)

失<sup>[5]</sup>, 而 p16 的表达能诱导 Rb 基因转录下调<sup>[6]</sup>, 说明 p16 与 Rb 在 G1-S 期构成一个反馈调节环。我们发现 p21<sup>WAF1</sup> 与 pRb 的表达显著相关 ( $P < 0.005$ ), 而 p21<sup>WAF1</sup> 与 p16 同属 CKI 家族, 是否与 pRb 也存在反馈调节机制, 尚待进一步证实。

我们的研究显示 p21<sup>WAF1</sup> 与 cyclinD1 无相关性, 但 Liukkonen 等<sup>[7]</sup>对 207 例浅表性 BTCC 的研究表明两者的表达相关, 可能与样本较小有关。

本研究表明, p21<sup>WAF1</sup>/cyclinD1/pRb 通路异常与 BTCC 的发生、发展密切相关, 联合检测它们对于准确评价 BTCC 的生物学特性, 估计预后, 指导治疗具有重要意义。

参考文献:

[1] Hartwell LH, Kastau MB. Cell cycle control and cancer[J]. Science, 1994, 266: 1821-1828.

[2] Korkolopoulou P, Konstantinidou AE, Thomas - Tsagli E, et al. WAF1/P21 protein expression is an independent prognostic indicator in

transurethral invasive bladder cancer[J]. J. Urol, 1999, 161 (4): 1285-1292.

[3] Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, et al. Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM-2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma[J]. Histol Histopathol, 2000, 15 (3): 721-727.

[4] Osman I, Scher H, Zhang ZF, et al. Expression of cyclin D1, but not cyclin E and A, is related to progression in bladder cancer[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3: 2247-2253.

[5] Li Y, Nichols MA, Shady JW, et al. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by retinoblastoma susceptibility gene product pRb[J]. Cancer Res, 1994, 54: 6078-6082.

[6] Fang X, Jin X, Xu HJ, et al. Expression of p16 induces transcriptional down-regulation of Rb gene[J]. Oncogene, 1998, 16: 1-8.

[7] Liukkonen T, Liippo P, Raitanen M, et al. Evaluation of p21<sup>WAF1</sup>/CIP1 and cyclin D1 expression in the progression of superficial bladder cancer[J]. Urol Res, 2000, 28 (5): 285-292.

(刘红武校对)