

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 deroxyuridine nick-end labeling (TUNEL)

WANG Min, LIBei-yun

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

Abstract: Objective To investigate the optimal conditions for the detection of apoptosis by TUNEL. Methods 20 human intestinal carcinomas and 20 rat cerebrum tissues were divided into two groups. Group A was constituted of 10 human intestinal carcinomas and 10 rat cerebrum tissues, the rest served as group B. Group A was treated according to the recommended conditions of Boehringer Mannheim company, group B was treated according to our laboratory conditions. No significant differences of positive rate of apoptotic cells were observed between group A and group B ($P > 0.05$). Background stain in group A was significantly higher than that in 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 μ 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^[1]。(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, PH7.4 PBS 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^[2]。(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^[3], 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 μl 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^[4]。

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 death 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. A poptosis [J]. Am J Pathol, 1997, 21 (1): 88 - 91.

(刘红武校对)

(上接第 272 页)

失^[5], 而 p16 的表达能诱导 Rb 基因转录下调^[6], 说明 p16 与 Rb 在 G1-S 期构成一个反馈调节环。我们发现 p21^{WAF1} 与 pRb 的表达显著相关 ($P < 0.005$), 而 p21^{WAF1} 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^{WAF1} 与 cyclinD1 无相关性, 但 Liukkonen 等^[7] 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^{WAF1}/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, Kastan 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

- [3] Ioachim E, Charchanti A, Stavro - poulos 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, Zhan - gZF, et al. Expression of cyclin D1, but not cyclin E and A, is related to progression in billharzial bladder cancer [J]. Clin Cancer Res, 1997, 3: 2247 - 2253.
- [5] Li Y, Nichols MA, Sha - y JW, et al. Transcriptional regulation of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{INK4a} by the retinoblastoma gene product pRb [J]. Cancer Res, 1994, 54: 6078-6082.
- [6] Fang X, Jin X, Xu HJ, et al. Expression of p16^{INK4a} in breast cancer: a potential prognostic marker [J]. Clin Cancer Res, 1998, 16: 1 - 8.
- [7] Liukkonen T, Li - ppoen P, Raitanen M, et al. Evaluation of p21^{WAF1}/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)