

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.018

三种简易形态观察法检测肝癌细胞凋亡的比较

Comparison of three simple methods for detecting apoptosis of hepatocellular carcinoma cells

杨连君¹, 司晓辉¹, 王文亮², 刘艳琳¹, 张雪¹, 吕晶¹ (1. 煤炭总医院 病理科, 北京 100028; 2. 第四军医大学 病理学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的: 比较3种简易形态观察法检测肝癌细胞凋亡的效果。方法: 用6%的乙醇作用人肝细胞癌 HCC-9204 细胞 6 h, 诱导其凋亡, 进行未固定细胞的吖啶橙/溴化乙啶(AO/EB)双染色、细胞固定后的 H-E 染色, 以及 TUNEL 法检测肝癌细胞凋亡的形态学特征。结果: 用6%乙醇诱导肝癌细胞凋亡后, AO/EB、H-E 染色法以及 TUNEL 法均能够不同程度地显示细胞变圆、细胞核深染和染色质边集、呈环状、团块或新月体状, 以及细胞质浓缩和“出泡”现象等细胞凋亡的典型形态学特征。AO/EB 双染色法能够显示呈致密浓染的黄绿色染色或出现黄绿色碎片的早期凋亡细胞, 还能显示呈致密红染或出现红色碎片的晚期凋亡细胞, 也能显示呈红色膨大状的坏死细胞。结论: AO/EB 双染色、细胞固定后的 H-E 染色, 以及 TUNEL 法等3种方法均可不同程度地观察到凋亡细胞的形态学变化, 其中的 AO/EB 双染色法还可以区分早期凋亡、晚期凋亡和坏死细胞, 具有较大的实用价值。

[关键词] 细胞凋亡; 形态学; 肝细胞癌

[中图分类号] R735.7; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)05-0568-03

细胞凋亡又称为程序性细胞死亡, 在正常细胞的死亡与更新、胚胎组织的生长和发育、肿瘤细胞的发生和发展, 以及机体的免疫耐受等许多生理和病理过程中具有重要的意义^[1-2]。虽然目前有多种检测细胞凋亡的方法, 但是尚缺乏简便易行的形态学检测方法^[3-4]。本研究以低浓度乙醇诱导人原发性肝细胞癌 HCC-9204 细胞凋亡, 进行未固定凋亡细胞的吖啶橙/溴化乙啶(acridine orange/ethidium bromide, AO/EB)染色、细胞固定后的 H-E 染色, 以及末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)法检测, 以探讨细胞凋亡的简便易行的形态学观察检测方法。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人肝癌细胞系 HCC-9204 为第四军医大学病理学教研室建立, 用含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 (美国 Gibco 公司产品)培养液, 在饱和湿度和 5% CO₂ 条件下培养^[5]。EB 为美国 Sigma 公司产品, AO 为美国 Amresco 公司产品。TUNEL 试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。

1.2 AO/EB 染色荧光显微镜观察未固定凋亡细胞

把处于对数生长期的 HCC-9204 细胞换为含 6% 乙醇的培养液培养 6 h (以正常生长的和经含

10% 乙醇培养液培养 6 h 后的 HCC-9204 细胞作为正常和坏死细胞对照), 然后将 25 μ l 离壁漂浮的细胞悬液与 2 μ l AO 染液(100 μ g/ml)和 2 μ l EB 染液(100 μ g/ml)混合后滴片, 立即用荧光显微镜观察。

1.3 H-E 染色光镜观察固定后的凋亡细胞

将生长于盖玻片上的对数期 HCC-9204 细胞换为含 6% 乙醇的培养液培养 6 h (以正常生长的和经含 10% 乙醇培养液培养 6 h 后的 HCC-9204 细胞作为正常和坏死细胞对照), 然后用 95% 的乙醇固定后进行常规 H-E 染色, 光镜观察。

1.4 TUNEL 法检测凋亡细胞

将生长于盖玻片上的对数期 HCC-9204 细胞换为含 6% 乙醇的培养液培养 6 h 后, 晾干, 以 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 置 4 $^{\circ}$ C 的穿透液(含 1 g/L Triton X-100 的 1 g/L 枸橼酸钠)中 2 min, 用 FITC 标记的核苷酸和脱氧核苷酸末端转移酶组成的 TUNEL 反应液(以 PBS 为阴性对照), 于 37 $^{\circ}$ C 染色 60 min, 立即用荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 AO/EB 双染色观察 HCC-9204 细胞凋亡的形

[作者简介] 杨连君(1968 -), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 科主任, 博士后, 主要从事肿瘤病理学方面的研究

[通信作者] 杨连君(Yang Lian-jun, Corresponding author), E-mail: yangandsi@vip.qq.com

态学特征

大部分细胞主要呈致密浓染的黄绿色染色或黄绿色碎片(早期凋亡细胞);部分细胞呈致密浓染的红色染色或红色碎片(晚期凋亡细胞);小部分为红色的膨大细胞。正常对照细胞核黄绿色染色,细胞质呈淡染的黄绿或桔黄色。坏死对照大部分为红色的膨大细胞(图1)。

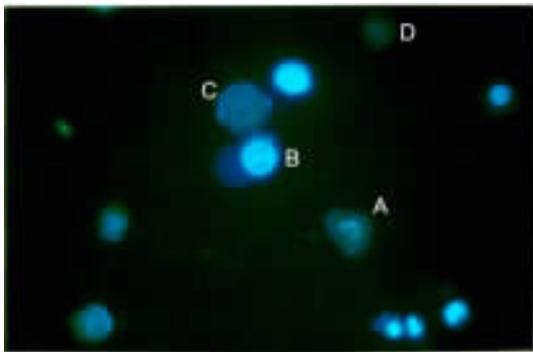


图1 AO/EB 双染色观察 6%乙醇作用 6 h 后 HCC-9204 细胞凋亡的形态学特征 (×400)

A:早期凋亡细胞,B:晚期凋亡细胞,C:坏死细胞,D:未凋亡的细胞

2.2 H-E 染色观察 HCC-9204 细胞凋亡的形态学特征

H-E 染色后可见典型的细胞变圆、细胞核深染,染色质边集、呈环状、团块或新月体状,以及细胞质浓缩和"出泡"现象等变化。而对照组未见上述变化(图2)。

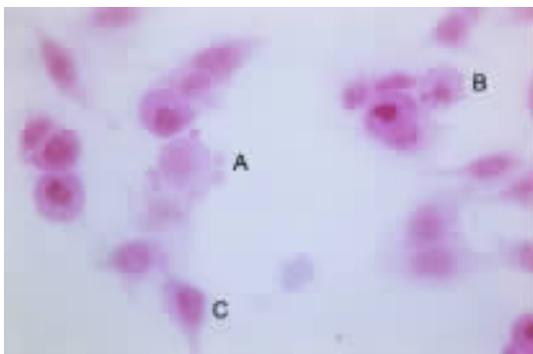


图2 H-E 染色观察 6%乙醇作用 6 h 后 HCC-9204 细胞凋亡的形态学特征 (H-E 染色, ×400)

A:凋亡细胞,B:坏死细胞,C:未凋亡的细胞

2.3 TUNEL 法观察 HCC-9204 细胞凋亡的形态学特征

阳性信号为黄绿色或黄色荧光,局限于细胞核内,呈圆形、椭圆形、新月体形或环形。实验组的大

部分细胞为阳性着色。阴性对照中未见阳性信号(图3)。

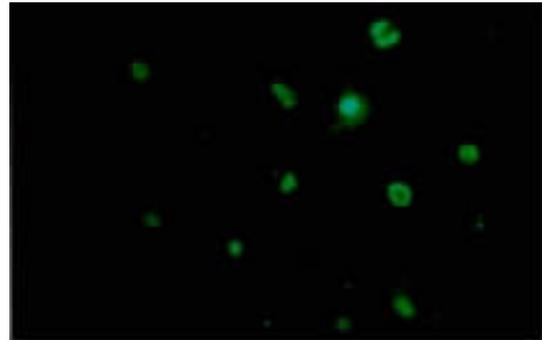


图3 TUNEL 法检测 HCC-9204 细胞凋亡的形态学特征 (×200)

3 讨论

低浓度乙醇主要对细胞产生两方面的损伤作用:(1)破坏细胞的线粒体和微粒体电子传递系统,损伤细胞合成 ATP 和激发脂质过氧化的功能,使细胞生物膜流动性改变;(2)导致细胞基因组 DNA 断裂,抑制 DNA 修复酶的功能^[6]。本研究以往用透射电子显微镜观察发现,低浓度乙醇能够使 HCC-9204 细胞发生细胞核和细胞质深染,染色质呈边集变化。细胞经碘化丙啶染色后用流式细胞仪检测到凋亡细胞的特征性亚二倍体峰^[7-8]。因此,本实验用低浓度乙醇诱导 HCC-9204 细胞凋亡作为凋亡细胞模型。

本实验采用 AO/EB、H-E 和 TUNEL 染色 3 种细胞凋亡检测方法,从多个角度观察了低乙醇诱导肝癌细胞凋亡的形态学变化。这三种观察方法基本上概括了凋亡细胞的形态学特征,即细胞固缩、变圆,细胞核和细胞质浓染,细胞核呈颗粒状、环形或新月体状,细胞质可见"出泡"等现象。说明上述方法对通过形态学观察来检测细胞凋亡都具有一定的意义。TUNEL 法的原理是利用 TdT 对断裂的双链 DNA 进行末端标记。在细胞凋亡早期对凋亡细胞和坏死细胞的鉴别上,它优于以往采用的 DNA 聚合酶 I 或 Klenow 酶催化的原位末端标记技术^[9-10]。本实验结果显示,大部分 TUNEL 染色阳性的细胞同时具有明显的细胞核颗粒状、环形或新月体状等凋亡细胞形态学特征,说明 TUNEL 技术可原位同时显示凋亡细胞的形态和分布。部分 TUNEL 阳性的细胞呈圆形或椭圆形,未见明显的凋亡细胞形态学变化,说明这些细胞可能是处于凋亡早期的细胞, TUNEL 法能够检测到早期的凋亡细胞。H-E 法是

最常用的病理染色方法,能够在形态学上对凋亡细胞进行初步筛选,但是其敏感性和特异性都较低,也不能有效地区分不同阶段的凋亡细胞。AO 能够透过细胞膜,把细胞核内的 DNA 染成绿色,细胞质内的 RNA 呈桔红色。早期凋亡细胞的细胞膜尚完整,细胞质发生固缩,细胞核固缩或碎裂,因此呈致密浓染的黄绿色,有的还可见碎块状。晚期凋亡细胞的细胞膜通透性增加,EB 能够通过,使其呈红色固缩体或碎块。坏死细胞不仅细胞膜不完整,而且线粒体肿胀,为红色的膨大细胞^[11]。本实验的结果表明,AO/EB 染色法对区分早期凋亡、晚期凋亡和坏死细胞具有一定的意义。

总之,本文讨论的三种简易形态观察细胞凋亡的方法中,TUNEL 法的敏感性和特异性较强,H-E 法最为简便易行,AO/EB 染色法对区分不同阶段的凋亡细胞最有意义。

[参 考 文 献]

[1] Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis [J]. Science, 2009, 325 (5938): 332-336.

[2] Chew SK, Chen P, Link N, Chew SK, Chen P, Link N, et al. Genome-wide silencing in drosophila captures conserved apoptotic effectors [J]. Nature, 2009, 460(7251): 123-127.

[3] 杨连君, 王文亮. 单克隆抗体检测法研究细胞凋亡的进展

[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1999, 15 (Suppl 1): 101-103.

[4] Chandra D, Tang DG. Detection of apoptosis in cell-free systems [J]. Methods Mol Biol, 2009, 559(1): 65-75.

[5] Hu CM, Liu YF, Sui YF, Xu LQ, Zhang SZ. Establishment of the hepatocellular carcinoma cell line HCC-9204 and its characteristics [J]. J Med Coll PLA, 1995, 10(1): 1-4.

[6] 杨连君, 王文亮. 乙醇诱导肝细胞凋亡与酒精性肝病 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2001, 17(1): 66-68.

[7] Yang LJ, Wang WL. Ethanol-induced apoptosis of HCC-9204 hepatoma cells [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(Suppl): 142.

[8] 杨连君, 王文亮, 司晓辉. 乙醇诱导肝癌细胞凋亡的形态学观察 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(16): 1460-1462.

[9] Mori I, Ozaki T, Tabuse K, Mori I, Ozaki T, Tabuse K, et al. Microwave cell death: Molecular analysis using DNA electrophoresis, PCR amplification and TUNEL [J]. Pathol Int, 2009, 59 (5): 294-299.

[10] Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay [J]. Methods, 2008, 44(3): 250-254.

[11] Gherghi ICh, Girousi ST, Voulgaropoulos AN, Gherghi ICh, Girousi ST, Voulgaropoulos AN, et al. Study of interactions between DNA-ethidium bromide (EB) and DNA-acridine orange (AO), in solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE) [J]. Talanta, 2003, 61(2): 103-112.

[收稿日期] 2010 - 05 - 28 [修回日期] 2010 - 07 - 12
[本文编辑] 韩 丹

· 编者 · 作者 · 读者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》关于抵制学术不端行为的声明

中国广大科技工作者坚持严谨求实、刻苦钻研、勇于创新的科学精神,取得了举世瞩目的科技成果,代表了中国科技工作者的主流。然而,近年来少数科技人员出现了抄袭剽窃、伪造数据、篡改数据、虚假署名、一稿多投等学术不端行为,影响了科技期刊的正常出版工作,给作者及其所在单位甚至全国带来非常负面的影响。《中国肿瘤生物治疗杂志》是中国肿瘤生物治疗领域惟一的高级学术刊物,一贯坚持“学术至上,质量第一”的原则,坚决抵制学术不端行为,努力维护学术纯洁性。为维护学术道德、保证期刊质量和学术声誉,本刊特作以下声明:

1. 作者投稿时须作出稿件无学术不端行为的声明。
2. 稿件审查过程中,本刊编辑部将采用“学术不端文献检测系统”,通过大量国内外学术文献的全文比对,对稿件进行学术不端行为的检查。
3. 本刊已加入“《中国学术文献网络出版总库》删除学术不端文献系统”,该系统协助本刊对已发表论文的学术不端行为进行全面复核。
4. 已发表的论文一经查实有学术不端行为,本刊将立即删除,第一时间刊登撤销声明,终止该论文在各相关数据库、文摘库中的传播,尽快消除不良影响。同时,视情节轻重给作者以下处理:书面警告、通知作者所在单位、在本领域相关期间通报、2年内本刊不刊登有其署名的稿件、相关学术责任人(通讯作者)署名的其他稿件延缓审稿等。

(本刊编辑部)