

# 地塞咪松诱导乳鼠胸腺细胞凋亡的研究

梁福佑 陈哲生\* 李金蕾\* 赵俊萍\*

(首都医科大学细胞生物学教研室 北京 100054)

**摘 要** 本文用透射电镜的方法,研究了地塞咪松诱导乳鼠胸腺细胞的凋亡,并确立了乳鼠胸腺细胞中凋亡细胞形态学特征;含溴化乙锭的琼脂多糖(1.5%)电泳检测乳鼠胸腺细胞中凋亡细胞的断裂DNA;末端标记法(TUNEL法)直接、特异的标记乳鼠胸腺细胞中凋亡细胞断裂DNA。获得地塞咪松诱导乳鼠胸腺细胞中凋亡细胞,以及透射电镜下可见凋亡细胞的典型形态学特征;DNA琼脂糖电泳呈典型梯状条带;TUNEL法中凋亡细胞着色,褐色颗粒沉着。提示不同浓度的地塞咪松可诱导乳鼠胸腺细胞凋亡,稍加改进TUNEL法后,显示结果比较好。

**关键词** 地塞咪松 细胞凋亡 TUNEL法

细胞凋亡(Apoptosis)这一概念由Kerr和他的同事于1972年提出<sup>[1]</sup>。细胞凋亡是多细胞生物体中,单个细胞受其内在基因的编码调节,通过主动生化过程使细胞自杀(Cell suicide),又称程序性细胞死亡(Programmed cell death,PCD),其形态学改变为染色质固缩,聚集成块状,或在核膜边缘呈现新月形核体,细胞体积缩小,胞质浓缩,随之胞膜皱折,核裂解成质膜包裹的碎片,细胞膜突出形成质膜小泡(细胞“发泡”blebbing现象),脱落后成凋亡小体,保留完整的细胞器和聚集的染色质,体内凋亡小体很快被邻近细胞(或巨噬细胞)通过配基和受体介导被吞噬消化,没有胞内酶的漏出,不引起局部炎症和炎症反应。

Wyllie<sup>[2]</sup>等报道皮质激素诱导鼠胸腺细胞凋亡,伴随核小体之间的连接部双股螺旋断裂形成多个180~200b.p的寡核苷酸碎片,在溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳上呈现典型的梯状带(Ladder),即为细胞凋亡提供实验室基础。

本文采用地塞咪松(DEX)诱导乳鼠胸腺细胞凋亡的研究,并探讨其与剂量的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材 料** 实验动物:昆明种小鼠,雌雄不限,首都医科大学实验动物部提供;主要试剂:地塞咪松,无锡市第七制药厂;L-多聚赖氨酸

SIGMA公司;淋巴细胞分离液,上海试剂二厂;DNA Marker,华美生物工程公司;DAB,日本东京化成工业株式会社;DNA快速提取试剂盒,华美生物工程公司;程序性死亡检测试剂盒,华美生物工程公司。

**1.2 方 法** 乳鼠细胞悬液制备 将5只乳鼠处死,浸泡在75%乙醇中5分钟,无菌操作下取出胸腺,置放在无菌盛有细胞培养液1640(RPMI-1640)平皿中,去除脂肪和结缔组织,用RPMI-1640洗三次,经180目细胞筛,收获细胞悬液,用淋巴细胞分离液分离细胞,洗三次,台盼蓝检测细胞活性(95%),细胞计数( $\sim 10^7$ /ml)分管备用。

透射电镜法 将备用小鼠胸腺细胞悬液分组(每组3管)分别加入不同浓度DEX RPMI-1640稀释液0.2ml,对照组(3管)分别加入相应RPMI-1640液,37℃温育12小时,离心洗三次,2.5%戊二醛固定2小时,PBS洗两次,2%锇酸固定2小时,洗三次,70%、90%、100%丙酮液依次脱水,每次15分钟,100%丙酮再脱水20分钟,包埋剂(丙酮:618=1:1)1小时浸透,包埋,超薄切片,醋酸铀染色20分钟,双蒸水洗

\* 均为免疫学教研室;

第一作者介绍:梁福佑,女,55岁,学士,副教授;

收稿日期:1997-11-06,修回日期:1997-12-20

三次,硝酸铅染色 20 分钟,双蒸水洗三次,透射电镜下观察,摄片。

**小片段 DNA 的提取** 将 1ml 小鼠胸腺细胞悬液置于 1.5ml 微型管(Eppendorf)管中,4℃离心,弃上清,每管(共 4 管)各加入 300 $\mu$ l 裂解液,50 $\mu$ l 蛋白酶 K,混匀,50~60℃水浴 2 小时。100℃煮沸 10 分钟,加入等体积的重蒸酚,振荡 5 分钟,离心,取水相,重复一次。每管加入 1/10 体积预冷的 3mol/LNaAc(醋酸钠),混匀,再加入 2 倍体积预冷的乙醇,振荡后,-20℃过夜,离心,弃上清,加 0.75ml,70%预冷乙醇,离心、弃上清。每管加入 20 $\mu$ l Tris-EDTA(三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液)使 DNA 充分溶解,测 DNA 浓度(OD 60/OD 280),置 4℃冰箱备用。

**DNA 琼脂糖电泳法** 用含 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l 溴化乙锭(EB)的 1.5%琼脂糖铺板。将 DNA 样品 10 $\mu$ l 与载样液 2 $\mu$ l 混合,上样,恒压电泳 3~4 小时,至溴酚蓝距板边缘 2~3cm 时,断电,在紫外灯下观察照像。

**末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的 dUTP(脱氧三磷酸尿苷),切口末端标记(简称 TUNEL)法。** 洗净载玻片(5 张)涂上一层 0.01%L-多聚赖氨酸,风干备用。将 DEX 处理过的乳鼠胸腺细胞涂片,室温下晾干。4%甲醛固定,风干。0.01mol/L PBS 洗二次,浸入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(新配制)中 30 分钟,双蒸水洗两次,加上标记缓冲液 10 $\mu$ l(每片),室温 1 分钟,甩干,取脱氧三磷酸尿苷缓冲液(Biotin-dUTP)9 $\mu$ l 和 TdT(末端脱氧核糖核苷酸转移酶)1 $\mu$ l 混匀后,取 10 $\mu$ l 混合液加至载玻片,置 37℃温箱在湿盒中 60 分钟,PBS 洗两次,每片加终止液 50 $\mu$ l,室温 15 分钟后,双蒸水洗 2 次,加封闭液 50 $\mu$ l(每片),室温 10 分钟,甩干,加用封闭液 1:50 稀释的链亲和素(Streptavidin),每片 50 $\mu$ l,37℃温箱湿盒中 30 分钟,PBS 洗 3 次,加新配制 DAB 显色液,10 分钟后冲洗,显微镜下观察。

## 2 结果

**2.1 透射电镜观察** 透射电镜下可见乳鼠胸

腺细胞经 DEX 诱导后,细胞体积缩小,细胞膜起皱,核固缩,染色质成为致密的斑块,靠近核膜形成新月形核、线粒体未见形态学改变(见图 1)。

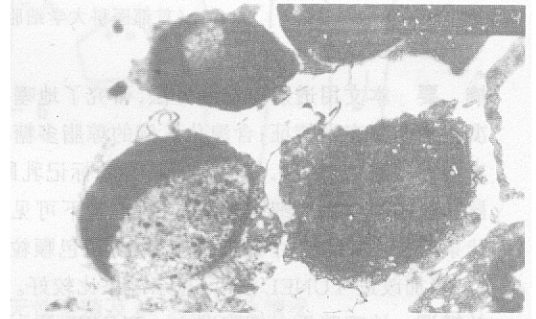
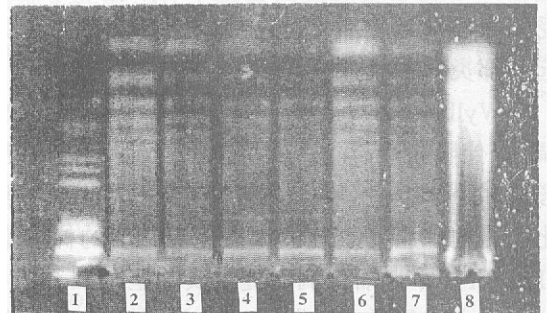


图 1 DEX 诱导乳鼠胸腺细胞凋亡的形态学特征(透射电镜  $\times 10\ 000$ ) [Morphologic characterization of DEX-induced apoptosis in immature mouse thymocytes(Transmission electron microscope  $\times 10\ 000$ )]

**2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳** 不同浓度 DEX 诱导乳鼠胸腺细胞 18 小时后,DNA 提取液在含 0.5 $\mu$ g/ml 溴化乙锭 1.5%琼脂糖中电泳,紫外灯下观察,照像。与标准 Marker 比较,可见对照组呈一个模糊的条带,实验组则呈梯状 DNA 条带。而不同浓度 DEX 处理乳鼠胸腺细胞,电泳条带数目及位置无差异(见图 2)。



mol/L DEX(地塞米松)

图 2 DEX 诱导乳鼠胸腺细胞凋亡的 DNA 琼脂糖电泳(DNA agarose gel electrophoresis of DEX-induced apoptosis in immature mouse thymocytes)

1. DNA 标准参照物(DNA marker); 2.  $10^{-5}$ ; 3.  $10^{-6}$ ; 4.  $10^{-7}$ ; 5.  $10^{-8}$ ; 6.  $10^{-9}$ ; 7.  $10^{-10}$ ; 8. 正常胸腺细胞(Cultured normal thymocyte)

2.3 TUNEL 法 光镜观察下,可见经 DEX 诱导后的乳鼠胸腺细胞中凋亡细胞着色,可见褐色颗粒沉着(见图 3)。

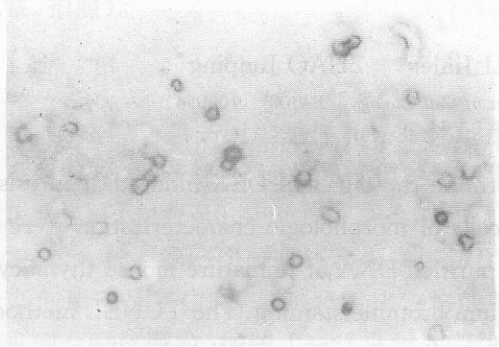


图 3 DNA 诱导乳鼠胸腺细胞凋亡 TUNEL 法着色细胞(TUNEL-stained cell of DEX-induced apoptosis in immature mouse thymocytes)

### 3 讨论

目前有关细胞凋亡形态学实验室检测方法甚多,有石蜡切片 HE 染色,甲基绿-派诺宁染色, Giemsa 染色,吖啶橙染色法, Hoechst33258 染色法,及透射电镜观察法。其中透射电镜法,观察凋亡细胞最为清晰,故本文采用此法。

自 Wyllie<sup>[2]</sup>报道皮质激素引起鼠胸腺细胞凋亡、伴有染色体梯度断裂的特征,为研究细胞凋亡的经典实验。本文采用快速提取 DNA 法,用不同浓度 DEX 处理乳鼠胸腺细胞后,得到典型梯状条带。现已经许多学者证明,这一过程是由激活的钙离子依赖的核酸内切酶介导,致使核小体之间的连接部双股螺旋断裂成为 180 碱基对(b.p)最小 DNA 片段及 180b.p DNA 倍数片段<sup>[3-5]</sup>。

TUNEL 法是运用生化原理结合形态学特征对凋亡细胞进行检测的一种方法。凋亡细胞的核染色体被钙镁离子依赖内源性核酸酶,从核小体间断裂成 180~200b.p 的核苷酸倍数片段,断链产生一粘性末端,一条含有游离的 3'

羟基末端,另一条有伸出的 5'末端。利用 TdT 可将外源性带有生物标记的核苷酸(dUTP)掺入到粘性末端,通过带有辣根过氧化物酶的亲和素与之结合,经 DAB 显色,便可观察到细胞是否存在有核苷酸掺入的 DNA 断端<sup>[4-7]</sup>。本文报道的 TUNEL 法对其中阻断剂稍加改良,取得良好结果。

DEX 诱导鼠胸腺细胞凋亡,其机理尚待探讨。目前一般认为 DEX 与胞浆中特异性受体结合形成复合物,进入核内,与染色质的 DNA 相互作用,合成 mRNA,由核内入胞浆,影响代谢和酶活性,致使细胞凋亡。

最近 Wisniewska, N. 等报道活化 T 细胞的核因子(NFAT)可能是地塞米松诱导凋亡的靶子<sup>[8]</sup>。

### 参 考 文 献

- 1 Kerr, J. E. R., A. H. wyllie, A. R. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-rangying implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972, **26**:239.
- 2 Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980, **284**:555.
- 3 Huang, P., Wa. Plunkett. A quantitative assay for fragmented DNA in apoptotic cells. *Anal. Biochem.*, 1992, **207**:163.
- 4 Wijman, J. H., R. R. Jonker, R. Keijzer, A new method to detect apoptosis in paraffin section: in situ end labeling of fragmented DNA. *J. Histochem cytochem*, 1993, **41**:7.
- 5 倪红刚. 细胞凋亡 DNA 检测技术概况. 国外医学临床生物化学与检测学分册, 1997, **18**(1):12.
- 6 张亚历, 姜 泊, 周殿元. 编程性细胞死亡研究方法. 细胞生物学杂志, 1995, **17**(3):127.
- 7 潭晓华, 张亚历, 姜 泊. 常规组织切片凋亡细胞原位末端标记方法. 细胞生物学杂志, 1997, **19**(1):48.
- 8 Wisniewska, N., M. Stanczyk. Grzelakowska-Sztabert B, and KaMiNska B. Nuclear Factor of activated T cell(NFAT) is a Possible Target for Dexamethosone in thymocyte Apoptosis. *Cell Biology International*, 1997, **21**(3):127.

## THE STUDY ON DEX-INDUCED APOPTOSIS OF IMMATURE MOUSE THYMOCYTES

LIANG Fuyou CHEN Zhesheng\* LI Jinlei\* ZHAO Junping\*

(Capital University of Medical Sciences, Department of Cell Biology Beijing 100054)

**ABSTRACT** Objective · the aim of the study is to determine the effect of DEX-induced apoptosis of immature mouse thymocytes. Methods · The apoptotic cells of morphologic characterization were established by the Transmission Electron Microscope. The purified DNA of immature mouse thymocytes was electrophoresed using a 1.5% agarose gel with ethidium bromide staining. The TUNEL method is based on direct, specific, labeling of DNA breaks in nuclei, in situ. Results · DEX-induced apoptosis of immature mouse thymocytes, showed a typical character of morphology, laddering pattern of DNA, and TUNEL-stained cell. Conclusion · We thought that the different concentration of DEX is able to induce apoptosis of immature thymocytes, and the slightly modified method of TUNEL is better.

**KEY WORDS** Dexamethasone (DEX) Apoptosis Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Dntp-Biotin Nick 'end Labeling (TUNEL)

---

\* Department of Immunology