

DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2013.05.007

原位末端标记法观察钉螺细胞凋亡的研究

顾文彪¹, 张 仪¹, 刘和香¹, 吴 缨¹, 朱 丹¹, 吕 山¹, 夏尚光², 王龙杰¹

摘要:目的 使用原位末端标记法观察钉螺细胞凋亡,探讨其在钉螺研究上使用效果和前景。方法 经苦楝叶浸提液处理的钉螺和对照钉螺去壳后连续冰冻切片,使用原位末端标记法(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay, TUNEL)和苏木素-伊红(Hematoxylin and eosin, HE)染色观察其细胞凋亡。结果 诱导组钉螺细胞凋亡发生在消化腺、足部表皮和足部肌肉纤维之间等部位,对照组凋亡则发生在消化腺和足部表皮部位,两组细胞凋亡值有显著差异($P < 0.05$); TUNEL法观察和HE染色观察钉螺细胞凋亡,两组凋亡值没有显著差异($P > 0.05$)。结论 TUNEL法可以运用于钉螺细胞凋亡原位检测。

关键词:钉螺;细胞凋亡;原位末端标记法

中图分类号:R383

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)02-0456-04

Observation on apoptosis in *Oncomelania hupensis* by TUNEL technique

GU Wen-biao¹, ZHANG Yi¹, LIU He-xiang¹, WU Ying¹, ZHU Dan¹,
LV Shan¹, XIA Shang-guang², WANG Long-jie¹

(1. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China;
2. Anhui Academy of Forestry, Hefei 230031, China)

ABSTRACT: Thirty snails were divided into two groups for exploring the potential benefit of terminal deoxynucleotide transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL) in research pertaining to *Oncomelania hupensis* by observing its effect in cellular apoptosis. Twenty snails in experimental group were immersed in the leaf extracts of *Melia azedarac* for 24 hours and soft tissues were separated for frozen section (6 μm). The cellular apoptosis of snails were observed by TUNEL technique and hematoxylin and eosin (HE) staining. Others served as control group. Results showed that there were clusters of positive signal in both experimental and control groups. Apoptotic cells were detected in digestive gland, foot tegument and muscle of experimental snails and in digestive gland and foot tegument of control group. It was found that apoptosis index of experimental group was significantly higher than that in the control ($P < 0.05$). There was no significant difference in apoptosis index between TUNEL technique and HE staining ($P > 0.05$). So we concluded that apoptotic cells and apoptosis index in *O. hupensis* can be detected using TUNEL technique, which indicates that the technique holds promise in relevant studies.

KEY WORDS: *Oncomelania hupensis*; apoptosis; TUNEL

Funded by the Planning Subject of 'the Twelfth Five-year-plan' in National Science and Technology for the rural development in China (No. 2011BAD38B070101)

Corresponding author: Zhang Yi, Email: zhang1972003@yahoo.com.cn

细胞凋亡(Apoptosis),是生命体为了维持自身内环境的稳定或者为了适应外界环境的变换,由自身基因主动调控的一种细胞死亡过程。许多化学、生物因素,以及辐射、温度变化等物理因素都能诱导

细胞发生凋亡^[1]。目前观察凋亡细胞的方法较多,如HE染色形态学观察法、电镜形态学观察法、流式细胞仪定量分析、琼脂凝胶电泳法以及Annexin V/PI检测等,而原位末端标记法(TUNEL)是当前公认的灵敏度和特异性都较高的一种方法^[2]。

钉螺是日本血吸虫的中间宿主,杀灭钉螺能够有效控制日本血吸虫病的流行,因此,国内外迄今已经有1 000多种植物被用于灭螺药物的研究开发^[3],其中苦楝树以其分布广泛、取材容易、无环境

国家“十二五”林业生态科技项目(2011BAD38B070101)资助

通讯作者:张仪,Email:zhang1972003@yahoo.com.cn

作者单位:1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,上海 200025;

2. 安徽省林业科学研究院,合肥 230031

污染等特点,近年来受到了较多关注。在灭螺药物开发的过程中,阐述该药物杀灭钉螺的机制必不可少。现在有许多研究通过钉螺酶组织化学变化和微观结构的变化来探明该药物的作用机制^[4-6],但对钉螺细胞凋亡的研究很少,而且未见使用高灵敏度的 TUNEL 法^[7]。

特以 TUNEL 法观察钉螺细胞凋亡,并以 HE 染色观察作为参照,以此探讨 TUNEL 法检测钉螺的效果和前景。

1 材料与方法

1.1 材料 本实验室饲养阴性成熟钉螺 30 只,分为诱导组 20 只和对照组 10 只。苦楝叶浸提液由安徽省林科院提供。TUNEL 试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。伊红、苏木素染液购自碧云天生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 实验处理 诱导组用苦楝叶浸提液浸泡处理,对照组用去氯水浸泡。25 °C 浸泡 24 h 后,取出钉螺,去氯水洗干净后用浸泡于清水中,根据钉螺活动状况判断死活。取出活螺后压碎,剔除螺壳,取软体,用于细胞凋亡检测。

1.2.2 切片处理 软体不经固定,直接置于冰冻切片机上,连续切片,厚度 6 μm。切片贴于经多聚赖氨酸处理的载玻片上。

1.2.3 染色方法

1.2.3.1 TUNEL 染色

(1)取上述切片,每张切片滴加 50 μL 内源性过氧化物酶阻断剂,室温下孵育 1 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性,用 TBS 冲洗 3 次,每次 3 min;(2)甩去 TBS,滴加 50 μL 蛋白酶 K,37 °C 孵育 10 min-15 min,再用 TBS 冲洗 3 次,每次 3 min;(3)甩去 TBS,滴加 20 μL 标记缓冲液,然后滴加 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 μL 于 18 μL 缓冲液中,滴在切片上,37 °C 孵育 2 h,TBS 冲洗 3 次,每次 3 min;(4)甩去 TBS 液,切片滴加 50 μL 的封闭液,37 °C 孵育 30 min;(5)甩去封闭液,滴加 50 μL 的生物素化抗地高辛抗体,37 °C 孵育 30 min,再用 TBS 冲洗 3 次,每次 3 min;(6)甩去 TBS 液,滴加 50 μL 链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液,37 °C 孵育 10 min,TBS 冲洗 3 次,每次 5 min;(7)除去 TBS 液,滴加几滴 DAB 溶液(现配),肉眼观察显色情况、显微镜下观察显色结果,待阳性部位出现特异性染色时,用自来水冲洗 3~5 min,中止显色;(7)改良型苏木素复染 10 s,流水冲洗 5 min,1% 盐酸酒精溶液分化 15 s,流水再冲洗 5 min;(8)切片经梯度酒精脱水干燥,

二甲苯透明,各 10 min,中性树胶封片,显微镜下观察结果。

1.2.3.2 HE 染色 常规 HE 染色后梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片后镜下观察。

1.2.4 分析判断方法 用小鼠胸腺切片作阳性对照,用 PBS 代替 TdT,作为阴性对照进行结果分析。细胞凋亡阳性信号位于细胞核内,以细胞核内出现褐色、棕色细微颗粒为凋亡细胞。细胞凋亡率以凋亡指数(apoptosis index, AI)表示。AI 值是指在随机选择 10 个高倍镜(×400)下视野,平均每个计数 100 个细胞,计算平均凋亡细胞百分率。

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析。AI 值用 $x \pm s$ 表示。两组数据比较使用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 TUNEL 法结果

2.1.1 对样品 阳性对照物中凋亡细胞中着色褐棕色颗粒,正常细胞核染成蓝色(见图 1),证明试剂酶活性正常。阴性对照物中没有黄色或棕色颗粒,均被染成蓝色(见图 2),证明操作过程正确。

2.1.2 定性结果 两组均有背景色,部分出现脱片,对观察有些干扰。凋亡细胞形态可见细胞完整,体积缩小,细胞核中着色棕褐色颗粒,表明其 DNA 已经发生降解,DNA 末端被标记。凋亡细胞在两组钉螺组织中均有不同程度表达,多为散在分布,部分呈局灶性。对照组消化腺和足部表皮观察到凋亡细胞(见图 3),诱导组消化腺、足部表皮和足部肌肉纤维之间观察到凋亡细胞(见图 4、5)。

2.1.3 定量结果 诱导组平均 AI 值为(10.6 ± 5.74)%,对照组平均 AI 值为(2.4 ± 1.84)%,两组凋亡值有显著差异($P < 0.05$)。两组各部位 AI 值比较见表 1。

表 1 两组钉螺不同组织的 AI 值比较

Tab. 1 Comparison of the apoptosis index in different tissue

组别 Group	组织 Tissue		
	足部表皮 Foot's tegument	足部肌肉 Foot's muscle	消化腺 Digestive gland
诱导组 Induced	23.8 ± 5.63▲	11.4 ± 2.98	24.5 ± 5.33△
对照组 Control	3.6 ± 0.61▲▲		9.4 ± 3.19△△

注:▲VS▲▲($P < 0.05$),△VS△△($P < 0.05$),▲▲VS△△($P < 0.05$)

2.2 HE 染色结果 凋亡细胞经 HE 染色后可见完整细胞,细胞核染色体断裂成碎片,形成膜包裹的凋亡小体(图 6)。HE 染色观察诱导组 AI 值为

$(8.8 \pm 3.61)\%$,与 TUNEL 观察诱导组的 AI 值 $(10.6 \pm 5.74)\%$ 相比较,两组凋亡值没有差异($P > 0.05$)。

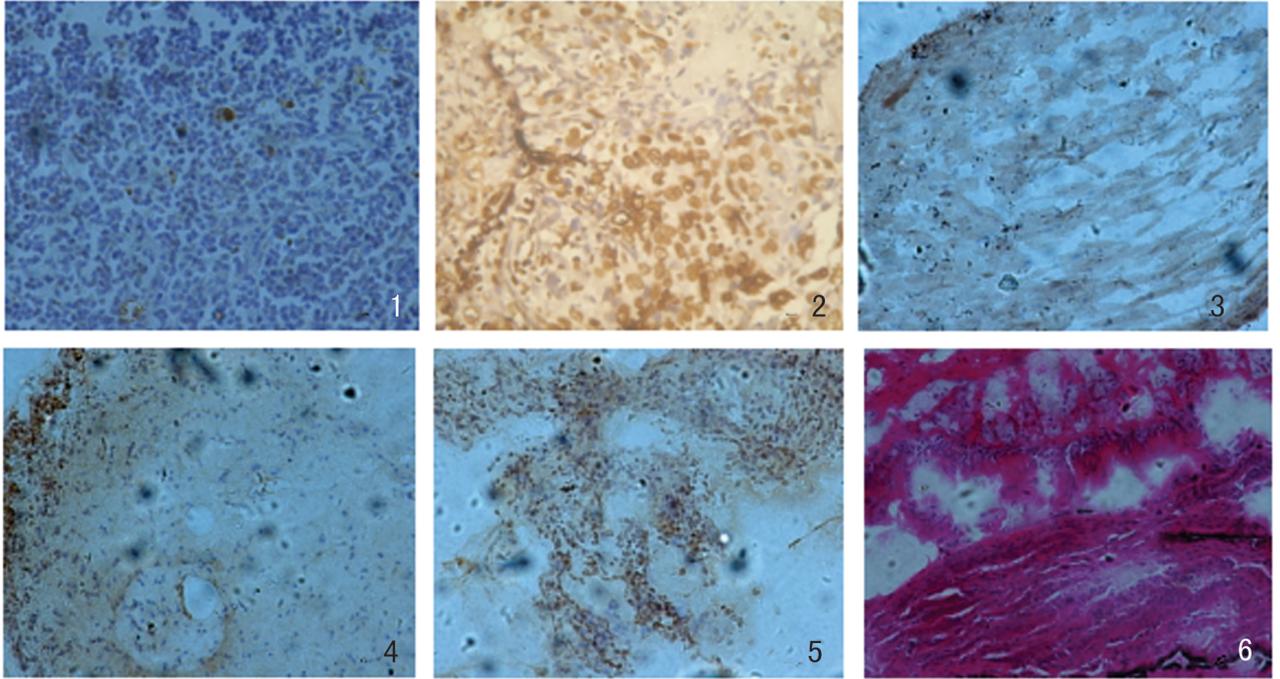


图 1 TUNEL 法检测阴性对照(X400)

Fig. 1 Negative control of detection (X400)

图 2 TUNEL 法检测阳性对照(X400)

Fig. 2 Positive control of detection (X400)

图 3 对照组足部细胞凋亡(X400)

Fig. 3 Apoptosis in foot of control group (X400)

图 4 诱导组足部细胞凋亡(X400)

Fig. 4 Apoptosis in foot of experimental group (X400)

图 5 诱导组消化腺细胞凋亡(X400)

Fig. 5 Apoptosis in digestive gland of experimental group (X400)

图 6 诱导组足部 HE 染色(X400)

Fig. 6 Detection in foot of experimental group using HE staining (X400)

3 讨论

细胞凋亡的研究在生物医学研究中起到越来越重要的作用^[8]。然而钉螺细胞凋亡研究起步较晚且内容较少,方正明等^[7]曾运用 Annexin V/PI 检测的方法首次观察到钉螺离体细胞的凋亡现象,但是并未确定凋亡细胞属于什么组织;方正明等和彭玲等^[7,9]尝试运用琼脂糖凝胶电泳观察钉螺细胞凋亡,但是效果均不理想。

TUNEL 法能够在组织切片上对凋亡细胞进行精确定位,而且敏感性极高,已经广泛运用到细胞凋亡的研究中^[10]。因此,运用 TUNEL 法观察钉螺细胞凋亡,不仅可以了解发生凋亡的细胞数量,更可以明确发生凋亡的组织部位,这样有利于进一步深入

揭示灭螺药物的作用机制。

苦楝树叶具有杀菌消毒的功效,近期研究发现苦楝叶浸提液能有效驱杀钉螺^[11],因此,本文使用苦楝叶浸提液浸泡钉螺诱导其细胞凋亡。结果显示,运用 TUNEL 准确定位观察了诱导组细胞凋亡发生在钉螺消化腺、足部表皮和足部肌肉纤维间等部位,对照组凋亡则发生在消化腺和足部表皮部位,说明 TUNEL 法可以确定钉螺具体发生凋亡的位置。同时,统计发现诱导组钉螺的细胞凋亡比率显著高于对照组,说明 TUNEL 法不仅能够定位,也能对凋亡细胞定量计数。夏尚光等^[11]运用苦楝等 6 种植物叶浸提液处理,发现苦楝叶浸提液驱杀钉螺效果最好,本实验结果能从细胞凋亡的角度对其杀

螺机理做出解释,这说明 TUNEL 法观察钉螺细胞凋亡能够对灭螺药物的杀螺机理提供新的手段。

本文在运用 TUNEL 法的同时,以传统的 HE 染色形态观察法作为对比,结果显示 TUNEL 法得到的细胞凋亡值稍高于 HE 染色法,但是两组间没有显著差异;另外,TUNEL 法阳性对照和阴性对照的结果都符合预期。这两点说明 TUNEL 法观察钉螺细胞凋亡的结果是可信的。

有报道^[12]称使用 H₂O₂ 可能会使 DNA 断裂,形成一些新片段,造成 TUNEL 检测结果假阳性,因此本文减少了 H₂O₂ 封闭的时间。但是,这使得背景色相对变高,影响了观察效果。所以,TUNEL 法和 HE 染色相比,敏感性稍高,且容易观察结果,但是过程较复杂,影响因素多。在日后钉螺细胞凋亡研究过程中,可以以 TUNEL 法为主,结合 HE 染色辅助观察。

综上所述,本文通过 TUNEL 法检测钉螺切片,有效解决了前人研究中无法对钉螺凋亡细胞定位的问题,丰富了钉螺学知识内容,为揭示灭螺药物及环境因素影响钉螺的作用机制提供了新的途径。

参考文献:

- [1]Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, et al. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26: 239-257.
- [2]Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94 (24): 12736-12737.
- [3]Barbosa FS. Determination and control of schistosomiasis[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1995, 90(2): 155-159.
- [4]Zhang Y, Zhu D, Li HJ, et al. Mechanism of action of a plant molluscicide HL on *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Zoonoses, 2007, 23(10): 978-981. (in Chinese)
- 张仪, 朱丹, 李洪军, 等. 新型植物灭螺剂 HL 对钉螺作用机制研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(10): 978-981.
- [5]Zhu D, Li HJ, Liu HX, et al. Enzyme histochemistry: the effect of META-Li on *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Parasitol Para-

sit Dis, 2007, 25(3): 198-201. (in Chinese)

朱丹, 李红军, 刘和香, 等. 密达利对湖北钉螺酶组织化学作用的观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(3): 198-201.

- [6]Sun H, Huang QY, Peng F, et al. Effect of *Eomecon chionantha* alkaloids on nervous system of *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Schisto Ctrl, 2009, 21(1): 50-51. (in Chinese)
- 孙慧, 黄琼瑶, 彭飞, 等. 血水草生物碱对钉螺神经系统超微结构的影响[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2009, 21(1): 50-51.
- [7]Fang ZM, Li YL. Studies on induction and detection of apoptosis in *Oncomelania hupensis* cells[J]. Chin J Schisto Ctrl, 2002, 14 (4): 256-257. (in Chinese)
- 方正明, 李雍龙. 钉螺细胞凋亡的诱导及检测研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14(4): 256-257.
- [8]Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1807(6): 735-745. DOI: 10.1016/j.bbabi. 2011.03.010
- [9]Peng L, Yuan SS, Yang SQ, et al. Injury mechanism of *Eomecon chionantha* alkaloids in liver of *Oncomelania hupensis* [J]. Chin Traditional Herbal Drugs, 2011, 42(1): 60-62. (in Chinese)
- 彭玲, 袁仕善, 杨盛清, 等. 血水草生物碱致钉螺肝脏损伤机制研究[J]. 中草药, 2011, 42(1): 60-62.
- [10]Zhou GY. Technology of tissue pathology[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2006:10. (in Chinese)
- 周庚寅. 组织病理学技术[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2006:10.
- [11]Xia SG, Zhang Y, Liu HX, et al. Expelling and killing effects of leaf extracts of 6 woody plant species on *Oncomelania hupensis* and the impact of the extracts on the anatomical structures of its reproductive organs[J]. Anhui Forestry Sci Tech, 2012, 38 (2): 26-29. (in Chinese)
- 夏尚光, 张仪, 刘和香, 等. 6 种木本植物叶浸液对钉螺驱杀作用及其生殖器官解剖结构的影响[J]. 安徽林业科技, 2012, 38 (2): 26-29.
- [12]Migheli A, Atanasio A, Schiffer D. Ultrastructural detection of DNA strand breaks neural cells by in situ end-labelling techniques[J]. J Pathol, 1995, 176(1): 27-35.

收稿日期:2012-12-26;修回日期:2013-01-17