TUNEL 法检测抑郁模型大鼠海马细胞凋亡的改进及应用 *

王发渭[1] 黄泉智[1] 许成勇[1] 孙志高[1] 陈利平[1] 胡亚卓[2] 韩志涛[2△]

(1 解放军总医院中医科 北京 100853；2 解放军总医院老年医学研究所病理生理研究室 北京 100853)

摘要 目的：探讨 TUNEL 法检测抑郁模型大鼠海马神经元细胞凋亡的改良方法。方法：20 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组。复制孤养加慢性轻度不可预见性的应激抑郁模型（21 天）。分别采用 TUNEL 试剂盒标准法和改良法观察大鼠海马区凋亡细胞的变化。结果：改良法与试剂盒标准法比较，非特异性染色明显减轻，背景清晰，差异明显。结论：改良的 TUNEL 法检测海马神经元细胞凋亡结果更真实可靠。

关键词：抑郁模型；海马；细胞凋亡；TUNEL

中图分类号：Q95-3，R749 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273（2012）17-3221-03

Application Experience of TUNEL in Detecting Hippocampus Apoptosis of Depression Rats*

WANG Fa-wei[1], HUANG Quan-zhi[1], XU Cheng-yong[1], SUN Zhi-gao[1], CHEN Li-ping[1], HU Ya-zhuo[2], HAN Zhi-tao[2△]

(1 Department of Traditional Chinese Medicine, Chinese PLA General Hospital Beijing,100853, China;

2 Institute of Geriatrics，Chinese PLA General Hospital Beijing, 100853, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the method to detect the hippocampus apoptosis of chronic stress depression rats. Methods: 20 SD rats were randomly divided into control group and model group. The model group was given the chronic unpredicted mild stress for 21 days to induce depression. The hippocampus apoptosis was detected by the TUNEL kit method and the improvement method. Results: Compared with TUNEL kit method, the improvement method avoided false positive reactivity, and a clear background was observed. Conclusion: The improvement TUNEL method is a better way to detect the hippocampus apoptosis of chronic stress depression rats.

Key words: Depression model; Hippocampus; Apoptosis; TUNEL

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R749 Document code: A

Article ID:1673-6273（2012）17-3221-03

前言

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) 又称脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法是目前应用广泛的检测细胞凋亡的技术，是 Gavriel[1]等于 1992 年提出来标记 DNA 断裂末端，进而在单细胞水平上显现凋亡细胞的方法。实际应用中本方法却容易发生非特异性染色严重、背景着色深等问题，严重影响实验结果的准确性[2]。试验中应用该方法检测慢性应激抑郁模型大鼠海马经元细胞凋亡时发现应用试剂盒说明书的标准方法结果不理想，非特异性染色严重，后经过多次试验并借鉴一些免疫组化技术[3]反复摸索改进取得了满意的结果，现将应用体会介绍如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只，体重 200± 20 g，解放军总医院实验动物中心提供，许可证编号：SLXK 京 2009-0007。DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System 试剂盒 美国 Promega Corporation 产品（lot：320684）。全自动真空脱水机（LEICA ASP300）、组织包埋机（L EICA EG1140H）、石蜡切片机（LEICA RM2135）、展片机（LEICA HI1210）均为德国 LEICA 公司产品。光学显微镜为日本 OLYMPUS BX60 系统显微镜。APES 防脱玻片、PBS 缓冲液、3% H_2O_2 为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及模型建立 动物饲喂于解放军总医院实验动物中心 SPF 级啮齿类动物实验室，温度 20-24℃，噪声≤60dB，相对湿度 40～70%，昼夜节律 12 / 12 h。20 只 SD 大鼠随机分为 4 组：正常对照组Ⅰ和Ⅱ、模型组Ⅲ和Ⅳ，每组 5 只。其中Ⅰ、Ⅲ组采用试剂盒标准说明书方法，Ⅱ、Ⅳ组采用改良的方法，设不加 TdT 酶反应液的阴性对照。造模方法：采用孤养加慢性轻度不可预见性的应激（chronic unpredictable mild stress, CUMS）抑郁模型[4]。

1.2.2 TUNEL 方法 标本预处理：造模成功后将所有大鼠用 10%水合氯醛(3 mL / kg)腹腔注射麻醉，暴露心脏，以 0.9% 生理盐水(37℃)约 250 mL 经升主动脉灌注冲洗后，灌注 4 %多聚甲醛溶液(4℃，pH=7.4)200 mL，直至动物四肢僵硬[5]。断头取脑，脑组织置于 10%中性福尔马林溶液中固定 24 小时[6]，参照

* 基金项目：北京市科技计划基金课题（Z090507017709030）

作者简介：王发渭，男，主任医师，老年病、心脑血管病，Tel：15210929303，E-mail: hqz81@126.com

△通讯作者：韩志涛

（收稿日期：2011-12-08 接受日期：2011-12-31）

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

大鼠脑立体定位图谱[7]对大鼠海马组织取材，常规脱水，浸蜡包埋，切片捞于 APES 防脱玻片上（片厚 4μm），60℃烤箱 2 小时。

TUNEL 步骤：根据试剂盒说明书改良：(1) 石蜡组织切片常规脱蜡至水过梯度酒精 100%、95%、85%、70%、50%的乙醇各浸洗 1 次，每次 3min；PBS 浸洗 5min× 3；(2) 20ug/ml 蛋白酶 K 溶液室温 10min 后 PBS 浸洗 5min× 3；(3) 3%BSA 溶液 37℃湿盒中封闭 15min；(4) Equilibration Buffer（平衡缓冲液）湿盒中室温平衡 10min；(5) TdT 酶反应液 37℃湿盒中孵育 60min（在反应区域盖上塑料盖玻片）；(6) 2× SSC 溶液室温浸泡 15min 终止反应后 PBS 浸洗 5min× 3；(7) 3% H_2O_2 浸泡 15min 后 PBS 浸洗 5min× 3；(8) 3%BSA 和 0.1%TritonX-100 混合液浸洗 5min× 3；(9) 抗生物素蛋白链菌素辣根过氧化物酶溶液室温反应 30min 后 PBS 浸洗 5min× 3；(10) 镜下控制 DAB 显色，显色后自来水流水冲洗 5min 终止反应；(11) 苏木素复染 2min，自来水冲洗 2min；(12) 盐酸酒精分化 2 秒，自来水冲洗 5min；(13) 脱水室温下依次用 50%、70%、85%、95%、100%的乙醇各浸洗 1 次，每次 2min；(14) 二甲苯透明，中性树胶封片，显微镜下观察。

1.3 图像分析

光镜下观察各组切片，采用 Image pro-plus5.1 图像分析系统分析每张照片，计数凋亡细胞个数，每张切片取五个不同的视野观察。

1.4 统计学方法

使用 SPSS13.0 统计软件。所有计量数据以均数± 标准差($\bar{x}$± s)表示，进行正态性检验，组间比较采用 t 检验。P＜0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

TUNEL 法染色后，正常神经元细胞经苏木素复染后核应呈蓝黑色，TUNEL 阳性细胞形态学上表现为胞体缩小，核固缩，染色质凝聚，呈棕黄色或黄褐色颗粒，表现出凋亡的特征[8]。采用试剂盒标准法的Ⅰ组、Ⅲ组切片海马神经元细胞核几乎均呈棕黄色，非特异性染色严重，模型组和正常组无比较意义。采用改良法的切片Ⅱ组可见少量阳性凋亡神经元细胞（7.07± 1.74），Ⅳ组可见一定数量棕黄色核染的凋亡细胞（13.66± 3.79），周围见大量蓝黑色核染的正常神经元细胞，对比明显，结构清晰，定位明确。经改良后 TUNEL 法测定的阳性细胞凋亡数正常组和模型组比较差异有统计学意义（P <0.01）。（见图 1、图 2）

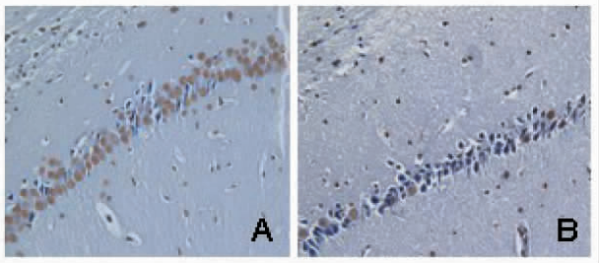

图 1 正常组 TUNEL 法检测凋亡结果

Fig.1 Results of TUNEL in control group

A 采用标准法 B 采用改良法（× 400）

A. method of standard B. method of improvement（× 400）

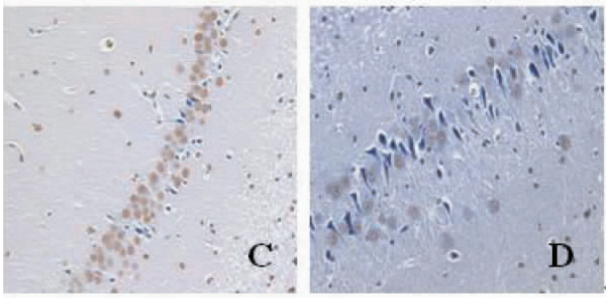

图 2 模型组 TUNEL 法检测凋亡结果

Fig.2 Results of TUNEL in model group

C 采用标准法 D 采用改良法（× 400）

C. method of standard D. method of improvement（× 400）

3 讨论

细胞凋亡(apoptosis)又称程序性细胞死亡(programmed cell death，PCD)，是细胞在一定生理或病理条件下，按照自身程序生理性的死亡过程[9]。现代研究显示，许多疾病的发生与细胞异常凋亡有关，如 Alzheimer 氏综合征、Hodgkin 氏综合征、移植排斥、自身免疫性疾病、肿瘤、ADIS 等，因此对细胞凋亡的研究成为研究疾病机制和药物开发的热点之一[10-12]。据报道慢性应激增加海马神经元细胞凋亡，引起海马结构和功能的变化，参与抑郁症的发病[13-15]。随着凋亡研究的不断深入，各种各样检测凋亡的新技术和新方法相继建立，其中不少检测试剂已经商品化，从而有力推动了该领域研究的进展。迄今为止，透射电镜仍然为最经典、可靠的判定细胞凋亡的方法，被认为是鉴定细胞凋亡的金标准，但是电镜观察只能定性，不能定量，且由于标本处理过程复杂，需要昂贵的设备因而较难推广应用[16]。TUNEL 技术较其它方法，由于其技术成熟、操作简捷、结果特异性强、能准确的反应细胞凋亡形态特征、染色定位及其在组织中的分布，可检测出极少量的凋亡细胞，在细胞凋亡的研究中被广泛采用[17]。但是在某些情况下(如固定、石蜡包埋操作不慎，细胞受到机械损伤或受到紫外线照射、化学物质刺激时)，TUNEL 法可能产生高达 20% 的假阳性[18]，严重影响实验结果的可靠性。试验中我们发现 TUNEL 试剂盒价格较贵，可测标本数较少，完全按照说明书操作步骤较多，操作过程耗时较长，实验结果并不理想。通过反复摸索对实验操作步骤进行了改进：1、减去了两步 4%多聚甲醛固定，这两次固定是为了减少在频繁的冲洗切片时造成切片脱落、破裂，经过对比我们发现去掉这两次固定对实验结果没有影响。2、将 0.3%H_2O_2 改为 3%H_2O_2 提高封闭非特异性抗原的效果。3、在蛋白酶 K 通透组织后，用 3% BSA 溶液封闭 15min，减少非特异性染色[19]。4、在滴加 HRP 前再用 3%BSA 和 0.1%TritonX-100 浸洗三次，进一步加强封闭，减少非特异性染色和背景着色。5、将 TUNEL 反应液从说明书的 1:100 浓度稀释为 1:300，不仅能避免染色过强而且减少了试剂用量。通过这些改进，我们的实验结果较为满意，我们的整个研究过程更加科学研究结果更加真实可信。慢性轻度不可预见性的应激抑郁模型主要模拟了人类抑郁的快感缺乏、运动能力及社会交往能力下降、探索行为能力下降、侵犯攻击能力缺陷、性行为能力下降等症状，是国际上公认的抑郁症模型，文献

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

报道这种慢性应激引起的抑郁状态及行为异常可保持数月[20]，在抑郁症的研究中被广泛应用。

综上所述，本研究通过对 TUNEL 试剂盒技术的改良在检测慢性轻度不可预见性的应激抑郁模型大鼠海马神经元细胞凋亡时取得了满意的效果，增加了实验结果分析的准确性，减少了可能对实验结果产生影响的干扰因素，可能对采用相同模型检测海马细胞凋亡的其他研究者有一定的借鉴意义。

参考文献(References)

[1] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation [J]. The Journal of Cell Biology,1992,119(3):493-501

[2] 朱汉华, 李浪, 汪熠, 等. TUNEL 检测心肌细胞凋亡的影响因素探讨[J].广西医科大学学报, 2009, 26(1):24-26
Zhu Han-hua, Li Lang,Wang Yi, et al. Study on the influential factors of cardiomyocyte apoptosis detected by TUNEL method[J]. Journal of Guangxi Medical University, 2009, 26(1):24-26

[3] 陈勤, 周君, 胡冠宇.石蜡切片免疫组化过程中存在的问题及解决方法[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2009, 33(2):85-88
Chen Qin, Zhou Jun, Hu Guan-yu. Problems and solving methods of immunohistochemistry method on paraffin section [J]. Journal of Anhui University Natural Science Ed, 2009, 33(2):85-88

[4] Winner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant[J]. Psychopharmacology, 1987, 93:358-364

[5] 黄泉智, 孙志高, 许成勇, 等. 舒郁宁心汤对抑郁模型大鼠行为及海马形态结构的影响[J]. 中国中医急症, 2011, 20(8): 1250-1251
Huang Quan-zhi, Sun Zhi-gao, Xu Cheng-yong, et al. Influence of shuyuningxin decoction on behavior and morphology and structure of hippocampal of rats with depression model[J]. Journal of Emergency Syndromes in Chinese Medicine, 2011, 20(8): 1250-1251

[6] 孟群.免疫组织化学染色要求及注意事项[J].肿瘤学杂志, 2011,17(3):239-240
Meng Qun. The Requirements and considerations of immunohistochemistry stainning[J]. Journal of Chinese Oncology, 2011,17(3):239-240

[7] 包新民, 舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M] .北京：人民卫生出版社，1991：48-51
Bao Xin-min, Shu Si-yun. The stereotaxic atlas of the rat brain[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991：48-51

[8] 唐璇, 张智博, 陈本阳.参芎注射液对脑缺血再灌注大鼠的神经元保护作用[J]. 现代生物医学进展, 2009, 4(9):648-651
Tang Xuan, Zhang Zhi-bo, Chen Ben-yan. The neuron protective effects of shenxiong injection on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 4(9):648-651

[9] 高超, 华子春. 细胞凋亡检测方法新进展[J].中国细胞生物学学报，2011, 33(5) :564-569
Gao Chao, Hua Zi-chun. Progress on Detection of Apoptosis[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2011, 33(5) :564-569

[10] 崔巍,唐炳华,王硕仁.细胞凋亡检测方法探讨[J].细胞生物学杂志, 2007,1(29):777-782
Cui Wei, Tang Bing-hua, Wang Shuo-ren. Investigate on the methodology of detecting apoptosis [J]. Chinese Journal of Cell Biolog, 2007,1(29):777-782

[11] Mattson MP, Guo Q, Furnkawa K, et al. Presnillins, the endoplasmic reticulum and neuronal apoptosis in Alzheimer' s disease [J]. Journal of Neurochemistry, 1998, 70(1):1-14

[12] Deveraux Q L, Reed J C. IAP family proteins suppressors of apoptosis[J]. Genes Dev, 1999, 13(3):239- 252

[13] 谢守付,马慧,刘伟,等. 抑郁症模型鼠海马神经元细胞凋亡的初步研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2004, 30(5):342-345
Xie Shou-fu, Ma Hui, Liu Wei, et al. Studying apoptosis in the hippocampus of the depression model of rats [J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2004, 30(5):342-345

[14] Jayatissa M N, Bisgaard C F, West M J, et al. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment[J]. Neuropharmacology, 2008, 54(3):530-541

[15] Coe C L，Kramer M, Czeh B, et al. Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys [J]. Biological Psychiatry, 2003, 54(10):1025-1034

[16] 王嘉宁,郭宁.细胞凋亡的检测技术与方法[J].中国药理学与毒理学杂志, 2005, 19(6):466-470
Wang Jia-ning, Guo Ning. Techniques and methods of identifying apoptosis[J]. Chinese Journal of Pharmacol Toxicol, 2005,19(6):466-470

[17] Hewitson TD, Bisucci T, Darby LA. Histochemical localization of apoptosis with in situ labeling of fragmented DNA [J]. Methods Mol Biol, 2006, 326:227-234

[18] Pavlovsky Z, Vagunda V. Apoptosis-selected methods of detection of apoptosis and associated regulatory factors on tissue sections of tumors[J]. Cesk Patol, 2003, 39(1):6-10

[19] 王云,冯震博,陈罡. 改进 dUTP 缺口末端标记技术法的操作体会[J]. 实用医技杂志, 2007, l4(1):108-109
Wang Yun, Feng Zhen-bo, Chen Gang. Experience of dUPT method in Detecting Apoptosis[J]. JPMT, 2007, l4(1):108-109

[20] Vry LD, Schreiber R. The chronic mild stress depression model: future developments from a drug discovery perspective1[J]. Journal of Practical Medical Techniques, 1997, 134:349-350

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net