

一种快速诱导大鼠脾脏淋巴细胞凋亡的方法

陈学清 张亚历 宋于刚 谭晓华 张万岱 周殿元

(第一军医大学南方医院消化内科 广州 510515)

凋亡(apoptosis)是基因控制下的细胞自我死亡方式。普遍存在于组织和器官,维持组织器官正常的生理功能及细胞数量的稳定^[1,2]。淋巴细胞与免疫功能密切相关,淋巴细胞凋亡的活跃或不当的抑制可能引发机体疾病和免疫系统的功能异常^[1,2]。研究各种因素与淋巴细胞凋亡的关系有着重要意义。目前,诱导淋巴细胞凋亡的方法很多,但大都为体外实验方法。这里我们介绍一种在体快速诱导淋巴细胞凋亡的方法。

材料和方法

1. 动物模型

200 g左右雌性SD大鼠禁食24小时,用乙醚麻醉后,从腹腔或静脉注射一定剂量(0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0和10.0 mg/kg)的放线菌酮(Serva),在注射1.0、2.0、3.0和4.0小时处死动物。取出脾脏。将脾脏剪成0.5 cm×0.5 cm大小固定于4%中性多聚甲醛(pH 7.2)中,常规脱水,石蜡包埋。

2. 组织病理学检查

将脾脏组织切成4 μm大小,HE染色,光镜下作凋亡细胞的形态学鉴别:即典型的核染色质凝集、核碎裂和凋亡小体形成。并做凋亡细胞(小体)计数。

3. 原位3'-末端标记方法

4 μm的脾脏组织切片常规脱蜡并逐级水化,置于0.1 mol/L PBS(pH 7.4)中。参考文献方法进行原位标记^[3],DAB显色,甲基绿衬染,光普通学显微镜检查。

结 果

1. 脾脏淋巴细胞的形态学改变

正常的脾脏生发中心罕见有凋亡的淋巴细胞(图版图1)。注射放线菌酮后,可诱导大量的淋巴细胞出现凋亡(图版图2,3),形态上

可见典型的核固缩、浓染、核碎裂及凋亡小体形成。且无炎症细胞浸润。凋亡的淋巴细胞主要集中于脾脏的生发中心,在皮质区其他地方也可见到凋亡细胞。

2. 原位3'-末端标记凋亡淋巴细胞

图版图4示原位3'-末端标记方法标记脾脏淋巴细胞。被标记细胞经DAB显色后为棕黄色,集中分布于细胞核,用甲基绿衬染后被覆盖部分呈黑色。DAB显色阳性细胞的分布与光镜下呈凋亡形态的细胞分布是一致的。

3. 放线菌酮的剂量和给药时间与细胞凋亡的关系

为便于计数,将凋亡的细胞和凋亡小体一并计数。由于凋亡细胞(小体)主要集中在脾脏的生发中心,我们选择脾脏生发中心做凋亡细胞(小体)计数。每组标本分别作3张组织切片,随机计数(带网格目镜),每张切片上200个细胞,然后相加取其百分数。结果见附表。我们分别给大鼠注射不同剂量的放线菌酮,发现在1.0 mg/kg以下剂量在6小时内脾脏淋巴细胞无明显的形态学改变。2.0 mg/kg以上在2小时后脾脏淋巴细胞便可出现明显的凋亡细胞,并呈剂量依赖关系。3小时以上细胞凋亡

表 放线菌酮剂量和给药时间与细胞凋亡的关系

剂 量	凋亡细胞(小体)计数(%)			
	第1小时	第2小时	第3小时	第4小时
对照组	1.0	2.0	1.0	1.0
0.5 mg/kg	2.0	5.0	7.0	9.0
1.0 mg/kg	5.0	10.0	18.0	30.0
2.0 mg/kg	22.0	33.0	37.0	48.0
3.0 mg/kg	20.0	36.0	40.0	50.0
4.0 mg/kg	21.0	37.0	56.0	69.0
5.0 mg/kg	22.0	39.0	58.0	83.0
10.0 mg/kg	26.0	38.0	66.0	84.0

计数无明显增加。5.0 mg/kg 以上可增加大鼠的死亡率。注射放线菌酮 18 小时后, 5.0 mg/kg 剂量大鼠死亡率为 33.3% (2/6); 10 mg/kg 剂量为 83.3% (5/6)。

讨 论

细胞死亡有两种方式: 坏死和凋亡。一般认为, 细胞凋亡区别于细胞坏死, 在于前者是一种主动过程, 常需合成一些新的蛋白并在核酸内切酶存在的条件下使染色体 DNA 发生降解^[1]。因此, 用蛋白质合成抑制剂(如放线菌酮)及 RNA 酶抑制剂(如放线菌素 D)可抑制细胞发生凋亡^[2]。但近来研究认为, 放线菌酮并不对各类型的细胞凋亡有抑制作用。因此, 并非各类细胞的凋亡均需蛋白质的合成^[4-6]。

本研究的结果表明, 放线菌酮可诱导大鼠脾脏的淋巴细胞发生凋亡: 凋亡细胞呈现典型的核固缩凝集、核碎裂和凋亡小体形成。在实验期间未见到炎性细胞浸润。用 3'-末端标记方法检测凋亡细胞, 结果表明, 3'-末端标记阳性细胞与光镜下观察的呈凋亡细胞形态变化的细胞是一致的。这更进一步肯定了放线菌酮对脾脏淋巴细胞凋亡的诱导作用。由于凋亡的淋巴细胞主要集中于脾脏的生发中心, 这提示放线菌酮所诱导的凋亡细胞大多为 B 系淋巴细胞^[7]。

放线菌酮诱导大鼠脾脏淋巴细胞的凋亡发生非常迅速, 较大剂量(>2.0 mg/kg)在 2 小时内即可出现, 而且剂量与凋亡细胞比率在一定范围内呈依赖关系, 但过大剂量可增加大鼠的死亡率。注射放线菌酮 18 小时后, 5.0 mg/kg 剂量大鼠死亡率为 33.3%, 10 mg/kg 剂量为 83.3%。文献报道 1.5 mg/kg 剂量(非致死剂量)的放线菌酮在 1—5 小时内可抑制细胞约 90%—98% 的蛋白质合成^[4]。由于 4 小时后凋亡细胞出现率无明显增加, 因此, 我们认为, 诱导淋巴细胞凋亡, 可将放线菌酮的剂量控制在 2—5 mg/kg 之间, 时间控制在注射后 4 小时左右。

对于放线菌酮诱导脾脏淋巴细胞凋亡的机制目前不清楚。Ledda-Columbano 等^[4]曾观察到用放线菌酮可诱导大鼠肝细胞的凋亡, 并使前列腺信息 2 (TRPM-2) mRNA 的表达升高。Ijiri 等^[6]的研究也表明, 用 RNA 或蛋白质合成抑制剂可诱导小鼠肠腺增殖细胞的凋亡。由于脾脏的生发中心细胞大多处于增殖期, 提示这些增殖期的细胞可能需要合成一些蛋白维持正常的细胞代谢功能。中止增殖期细胞蛋白合成便可诱发细胞的自发死亡。

总之, 我们首次观察到可用放线菌酮诱导大鼠脾脏淋巴细胞凋亡。这将为进一步研究细胞凋亡和免疫细胞自身代谢的机制, 提供一个良好的模型。

摘 要

本文探讨了利用放线菌酮建立的大鼠脾脏淋巴细胞凋亡的方法。从静脉或腹腔给予雌性 SD 大鼠注射一定剂量的放线菌酮, 于注射后 1.0、2.0、3.0、4.0 小时取出脾脏, 光镜下结合原位 3'-末端标记方法观察脾脏淋巴细胞的形态学变化, 并做凋亡细胞计数。结果, 正常大鼠脾脏生发中心有少量凋亡细胞。注射较大剂量(>2.0 mg/kg)的放线菌酮在注射后 2 小时即可诱导脾脏形成大量凋亡形态的淋巴细胞, 主要集中在皮质区的生发中心, 而且与原位 3'-末端标记阳性细胞分布一致。结果表明, 较大剂量放线菌酮可快速诱导大鼠脾脏淋巴细胞凋亡。

关键词: 脾脏/病理学 细胞凋亡 淋巴细胞 放线菌酮/药理学

参 考 文 献

- [1] Gersghenson, L. E. and R. J. Rotello., 1992, *FASEB J.*, 6: 2450—2455.
- [2] 刘军喜, 刘士廉, 1995, *中华内科杂志*, 34: 712—715.
- [3] Wijsman, J. H., et al., 1993, *J. Histochem. Cytochem.*, 41: 7—12.

- [16] 李原达, 1992, 实验动物学, 农业出版社, p. 116.
 [17] 张锁炼等, 1989, 细胞生物学杂志, 11, 165—167.
 [18] Stephen, A. W., et al., 1993, *Nature*, 365: 87—89.
 [19] Stephen, A. W., et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 4582—4585.

ESTABLISHMENT AND CHARACTERISTICS OF ES CELL LINES DERIVED FROM C57BL/6J MICE

CHAI Gui Xuan HAN Rong SHANG Ke Gang

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

ABSTRACT

Three embryonic stem cell lines, designated MESPU 17, MESPU 18 and MESPU 19 were established from C57BL/6J blastocysts. The stem cell pattern of the new lines was demonstrated by cytological observations and strong AKP activity. All of the ES lines were XY type karyotype with normal diploid composition of 70%, 88% and 59% respectively. They were able to grow and differentiate to form simple embryoid bodies in vitro and to form teratocarcinoma tumors in vivo. Comparing these cells with CCE and MESPU 13 derived from 129/ter, the cells were comparatively large, the rate of growth of the cells was relatively slow in vitro, and the cells were considerably sticky and easier to adhere to microinjection pipet. No chimera of MESPU 17 or MESPU 18 was got by the method of the blastocyst injection of BALB/c or KMW (Kun Ming White), but by the method of injection of ES cells of MESPU 17 or MESPU 18 into 8-cell embryos of KMW and co-culture with KMW embryos, the chimeras had been obtained.

Key words: ES cell lines C₅₇BL/6J mouse Chimeras

(上接封三)

- [4] Ledda-Columbano, G. M., et al., 1992, *Am. J. Pathol.*, 140: 545—549.
 [5] Ijiri, K., and S. Potten, 1987, *Br. J. Cancer.*, 55: 113—123.
 [6] Martin, S. J., et al., 1990, *J. Immunol.*, 145: 1859—1867.
 [7] Raviola, E., 1994, In Bloom and Fawcett, a text book of histology, ed. by Fawcett D. W., PP 460—417, Chapman & Hall, New York.

A METHOD FOR RAPID INDUCTION OF APOPTOSIS IN RAT SPLEEN BY CYCLOHEXIMIDE

CHEN Xue Qing et al.

(PLA Institute for Digestive Diseases, and Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515)

ABSTRACT

The present study was designed to establish a method for rapid induction of apoptosis in rat spleen by the inhibitor of protein synthesis, cycloheximide. Female SD rats were given cycloheximide via i. v. or i. p. and scarified in 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 h. Apoptotic cells were recognized morphologically in tissues with H&E staining and with in situ end-labeling (ISEL) procedure. The results showed that a single administration of cycloheximide (>2.0 mg/kg) results in the occurrence of apoptosis in rat spleen, particularly in germinal centers of spleen in 2 h later. Detected by ISEL, the apoptotic cells were positive. Our results for the first time provide evidences that cycloheximide is able to induce cell apoptosis, especially B-lymphocytes in germinal centers of rat spleen. It will be a useful model for the investigation of immune cell's function.

Key words: Cycloheximide/pharmacology Spleen/pathology Apoptosis Lymphocytes