

小鼠胚胎发育中期肝细胞增殖与凋亡*

谢永芳, 梁亦龙, 王光利

(重庆邮电学院, 重庆 400065)

摘要:探讨小鼠胚胎中期肝发育过程细胞增殖与凋亡的变化规律、相关基因 P21 及 Ki-ras 在肝发育中的表达意义。在胚胎中期的小鼠肝组织中,采用免疫组织化学及切口末端标记法,可检测到小鼠肝发育过程中的细胞增殖与凋亡相伴存在,这与肝发育变化密切相关。用原位杂交的方法检测到 P21 时, Ki-ras 基因在胚胎肝发育中期并没有表达,说明这两个细胞周期调控基因可能在胚胎肝发育中期并不起作用,而与其他基因有关。

关键词:细胞增殖;细胞凋亡;P21; Ki-ras; 胎肝

中图分类号:O253 **文献标识码:**A

Cell Proliferation Apoptosis and the Expression of Related Genes in the Developing Liver of Mouse

XIE Yong-fang, LIANG Yi-long, WANG Guang-li

(College of Biology Information, CUPT, Chongqing 400065, P. R. China)

Abstract: This study is to explore the dynamic trends of cell proliferation, apoptosis and expression of the significance of involved genes as P21 and Ki-ras in developing livers of mouse. Lung tissues were taken from different developmental phases of kunming mouse. Immuno-histochemistry and TUNEL techniques were adopted to observe the variation of cell proliferation and apoptosis and the expression of characteristics of P21 and Ki-ras. Experiments show that cell proliferation is accompanied by apoptosis during the development of mouse livers. The dynamic changes of both ratios might be correlated to the different structures appearing in different developmental process.

Key words: cell proliferation; cell apoptosis; P21; Ki-ras; fetal liver

0 引言

胚胎发育是一个特殊的生理过程,既存在着细胞的不断增殖,又存在着细胞的不断凋亡。在胚胎发育中两者的关系受各种生长因子或相关基因的调节与控制,研究胚胎发育中的细胞增殖与凋亡的变化,相互关系及其相关基因的探讨,对胚胎正常发育过程的相关机制很有意义。本文研究小鼠肝发育中细胞增殖与凋亡变化趋势,探讨两者在肝细胞结构与

功能发育中具有重要的意义,并且用图分析 P21 及 Ki-ras 癌基因在肝发育中的表达趋势。

1 材料的选择

1.1 生物学材料——小鼠胚胎

昆明种小白鼠,雌雄(3:1)合笼过夜。见有阴栓日为0日计算胎龄,分别于第11d、第12d、第13d、第14d(以下分别简称 E11d, E12d, E13d, E14d)取孕鼠断颈处死,常规固定,石蜡切片。

* 收稿日期:2002-05-16

作者简介:谢永芳(1971-),女,湖南怀化市人,主要研究方向是生物化学及分子生物学。

1.2 重组质粒和试剂

P21 质粒和 Ki-ras 质粒均由华西医科大学生化实验室赠送, 凋亡试剂盒购自 Promega Company; 免疫组化试剂是 Vector 公司产品; DIG(地高辛) 标记、检测试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司; 其他试剂和药品均为国产 AR 级或进口分装。

2 实验方法

2.1 石蜡切片 PCNA 免疫组化染色程序

切片以二甲苯脱蜡及系列酒精入水。PBS(磷酸盐缓冲液)洗 3×5 min, 以封闭剂加切片, 并在 37°C 湿盒中温育 20 min, 吸去封闭剂, 勿洗。加以稀释液配制的生物素化二抗工作液, 37°C 30 min 湿盒中温育。与此同时以稀释液按标明稀释度来稀释试剂 A 和试剂 B, 然后取等量试剂和试剂工作液 B 在试管中混合, 37°C 30 min 湿盒中温育, 即成 ABC 工作液。PBS 洗 3×5 min。加 3 步中已预混合的 A 和 B(即 ABC), 37°C 30 min 湿盒中温育。PBS 洗 3×5 min。临用前又以 DAB 溶解液将 DAB(二氨基联苯胺盐酸盐)溶解成 0.5 mg/ml 浓度, 另加 3% 的 H_2O_2 至 0.03% 浓度后混匀, 显色。复染封片, 再做对照组实验, 用不加 PCNA 抗体的作阴性对照。

2.2 细胞凋亡检测方法

石蜡切片入甲苯脱蜡 3 次, 每次 5 min。入系列酒精逐级脱水。用 $1 \times$ PBS 室温洗 5 min。用 $20 \mu\text{g/ml}$ 的蛋白酶 K 室温消化 10-30 min。用 $1 \times$ PBS 洗 3 次, 每次 5 min。4% 的多聚甲醛室温固定 15 min。用 $1 \times$ PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用 buffer 液平衡, 室温 5-10 min。将 buffer 平衡液 $392 \mu\text{l}$ 生物素标记的多聚核苷酸的混合物 $4 \mu\text{l}$ TdT 酶 $4 \mu\text{l}$ 混匀, 加入载玻片上, 于 37°C 约 1 h。 $2 \times$ SSC 室温洗 10 min。用 $1 \times$ PBS 洗 3 次, 每次 5 min。0.3% 的 H_2O_2 室温封闭 5 min。用 $1 \times$ PBS 洗 5 min。将链酶亲和素与 PBS 按 1:500 配制, 进行抗体连接, 室温 1 h。用 $1 \times$ PBS 洗 3 次, 每次 5 min。DAB 显色约 10 min。再进行对照组实验, 即用不加末端转移酶的作阴性对照和用 DNase 预先消化的作阳性对照。

2.3 信号分析方法

在载玻片上随机抽取 5 张胚胎切片, 每张切片于肝上随机取 10 个视野。于高倍镜($400 \times$)分别数

总细胞数和有阳性信号的细胞数。将阳性信号细胞数除以总细胞数, 得阳性信号率, 再将其在 EXCEL 软件中进行平均数计算, 作方差及显著性差异分析。

2.4 质粒转化、扩增、抽提

质粒转化、扩增、抽提按文献[1]中所采用的 P21 及 Ki-ras 经“氯化钙法”转化, 氨苄(Amp)筛选, 常规扩增, “碱裂解法”抽提, “氯化钾、聚乙二醇法”纯化, 电泳鉴定后, -20°C 贮存备用。

2.5 探针制备和组织原位杂交

探针制备采用 PCR 法标记探针。组织原位杂交是每实验组均分别随机不同胎龄的切片用于原位杂交。具体杂交方法按文献[2], 并稍加修改进行。

(1) 预处理: 石蜡切片经二甲苯脱蜡 20 min, 用无水乙醇洗 2 次, 置换二甲苯(2×10 min), 置空气中干燥, $2 \times$ SSC 饱和 20 min。

(2) 预杂交: 消毒滤纸擦干玻片上组织周围水分, 但保持组织湿润。玻片置于 $4 \times$ SSC 饱和湿盒中, 组织材料上加 20-30 μl 预杂交液, 42°C 过夜。

(3) 杂交: 在预杂交液中加入适量的变性标记探针, 浓度为 $50 \mu\text{g/L}$, 每张玻片组织切片上滴加 20-40 μl , 42°C 温盒过夜。

(4) 免疫显色: 将杂交后的玻片置 $2 \times$ SSC 中洗 1 h, $1 \times$ SSC 中洗 1 h, $0.5 \times$ SSC 37°C 洗 30 min, 封闭剂(30%牛血清白蛋白, 0.3% TritonX-100) buffer1 稀释(buffer1: 100 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH7.5)中室温孵育 2 h, 以消除非特异性抗原。复合抗体(Dig)-AP, 1:500 buffer1 稀释, 室温孵育过夜。buffer1 洗 2 次, 每次 15 min, 显色液显色, 乙醇系列脱水, 二甲苯透明, 树胶封片。

对照组织实验是采用标记直链 PBR322 作阴性对照, 实验操作与基因探针相同并同时进行。

3 结果

(1) PCNA 表达结果。PCNA 是一个细胞增殖核抗原基因, 其表达对细胞 DNA 的合成有促进作用, 所以被作为细胞增殖的标志。用 PCNA 的免疫组织化学检查第 11 d 至第 14 d 的小鼠胚胎, 可以判断第 11 d 至第 14 d 小鼠胚胎的细胞增殖情况。胚胎在第 11 d, 其器官结构较为清楚, 肝细胞较小、排列疏松, PCNA 表达较强(见图 1a)。胚胎在第 12 d, 其

肝细胞排列较致密,阳性胞数多并且强度高(见图1b)。信号细胚胎在第13 d 肝细胞的阳性信号普遍,但强度不及胚胎第12 d 的情况(参见图1c)。胚胎在第14 d,其肝细胞的数目增多,有普遍的表达,且强度高,较胚胎第13 d 的强,但不及第12 d 阳性数目多(见图1d)。

(2) 细胞凋亡表达结果。胚胎在第11 d 肝组织存有散在不均匀的凋亡小体(见图2a);胚胎在第12 d 肝组织的凋亡小体开始增加,普遍分布,强度较小(见图2b);胚胎在第13 d 肝组织的凋亡小体多而普遍,但凋亡小体的颜色比第12 d 稍浅(见图2c);胚胎在第14 d 肝组织的凋亡小体多而普遍,但凋亡小体的颜色比第12 d 稍浅(见图2d)。

(3) 原位杂交结果。用P21与Ki-ras基因进行

杂交均在肝细胞处无明显的杂交信号,见图3、图4。

(4) 信号结果。将PCNA免疫组化结果与凋亡表达结果所得的原始数据经软件处理结果见表1。

表1 第11 d至14 d肝PCNA阳性细胞表达与凋亡的变化情况
Tab.1 The ratios of cells and apoptosis in different phases of fetal liver

天数	E11 d	E12 d	E13 d	E14 d
PCNA阳性率	0.286±0.032	0.407±0.032	0.324±0.003	0.368±0.023
凋亡率	0.113±0.032	0.244±0.025	0.302±0.014	0.336±0.041

注:经组与组之间卡方检验,各组PCNA阳性率相互之间均有显著性差异($P<0.01$)

为了较清楚地显示第11 d至第14 d胚胎发育过程中的细胞增殖和凋亡变化,对胚胎第11 d至14 d肝的增殖率和凋亡率比较图见图5。

图5给出了小鼠胚胎在第11 d至第14 d的心脏

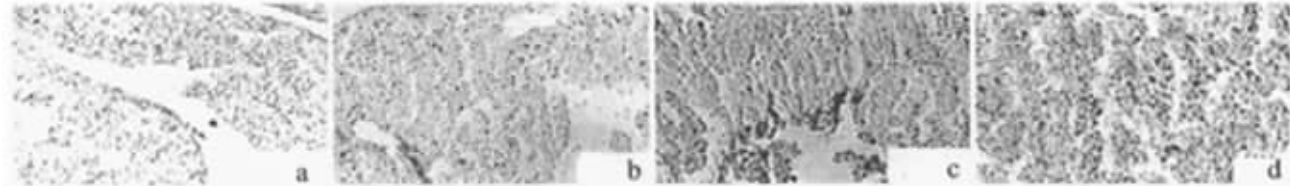


图1 胚胎11-14 d中PCNA在胎肝的表达×200
Fig.1 The expression of PCNA in different phases of fetal liver ×200

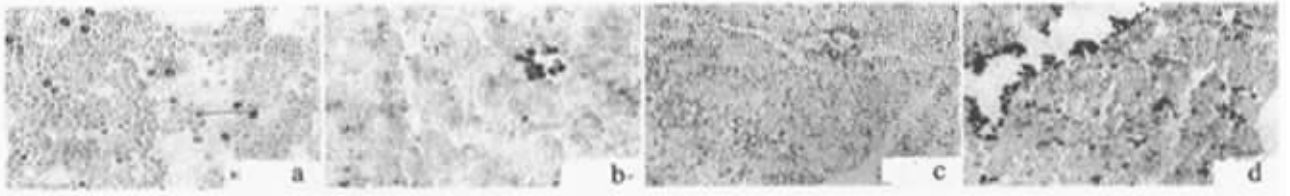


图2 胚胎11-14 d的凋亡细胞在胎肝的表达×200
Fig.2 The expression of apoptosis in different phases of fetal liver ×200

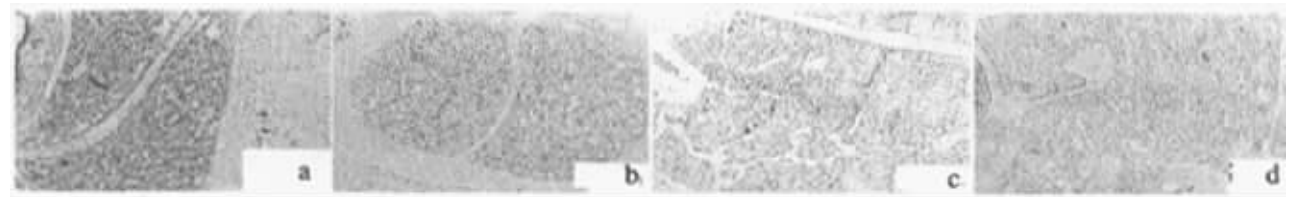


图3 胚胎11-14 d的P21基因在胎肝的表达×200
Fig.3 The expression of P21 gene in different phases of fetal liver ×200

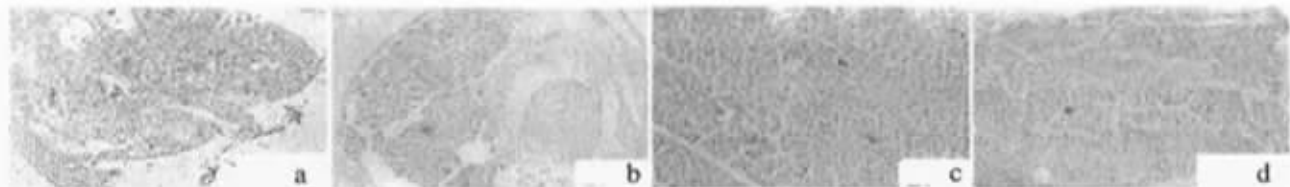


图4 胚胎11-14 d的Ki-ras基因在胎肝的表达×200
Fig.4 The expression of Ki-ras gene in different phase of fetal liver ×200

增殖率与凋亡率的比较。图5的比较结果表明肝的增长类似,在第12d的增殖率较凋亡率之差最大,其次是11d、第13d、第14d几乎无差别。这表明肝组织的生长也主要是在第11d和第12d,而第13d和第14d增长相对趋于平缓。

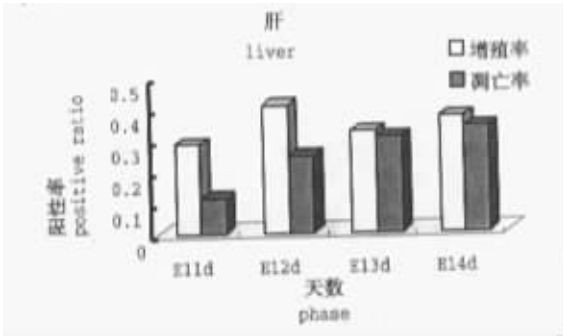


图5 肝的增殖率与凋亡率的比较

Fig. 5 The comparison of rates of PCNA and apoptosis in different developmental phases of liver

4 分析与讨论

PCNA 蛋白又称促细胞增殖核抗原(Proliferation Cell Nuclear Antigen),是哺乳类细胞中DNA聚合酶 δ 的附属蛋白,它和复制因子C(RFC)一起识别引物—模板复合物,以帮助聚合酶 δ 的定位。PCNA还具有促进DNA聚合酶 δ 的DNA延伸活性,在修复合成时,PCNA的主要作用是帮助聚合酶(δ 或 ϵ)定位在DNA的缺口处。PCNA蛋白是一个细胞周期相关的37 KD的酸性核蛋白,在进化上高度保守,广泛存在与高等真核生物细胞之中,是DNA复制所必需的成份。PCNA在细胞周期中有两种形式存在,其一是位于核基质中的PCNA,它低水平存在于静止期细胞中,能被有机溶剂抽提,因此不存在于经有机溶剂固定后的标本之中;其二是与染色质上的DNA复制位点相结合,此PCNA只存在于处于分裂周期的细胞之中,不能被有机溶剂提取。PCNA蛋白分布于整个细胞周期,但在S期有高度表达。故用PCNA抗体作为免疫组化中的第一抗体,可以精确、定量地检测细胞增殖情况^[3],而通过缺口末端标记法可检测胚胎中期的肝细胞凋亡的情况。实验结果表明:胚胎第11d至第14d肝细胞的生长处于一个旺盛时期,特别是第11d至12d几乎呈直线上升

趋势,在第13d和第14d时生长与凋亡趋于平衡,可能在为肝细胞的机能分化作准备,从而促使各种酶的产生^[4]。肝在发育的同时,还必须将过度增殖或不再需要的细胞以细胞凋亡的形式加以清除,通过本实验说明细胞凋亡时肝发育中的一个重要的事件。

P21基因几乎能抑制所有的Cdk-cyclin复合物的活性,与cdk, cyclin, PCNA形成稳定的四元复合体,导致细胞不能从G1期进入S期,属于细胞周期抑制基因^[5],而Ki-ras基因属癌基因,与细胞增殖有很密切的关系^[6]。P21基因与Ki-ras癌基因在胚胎第11d至14d肝细胞的发育中没有明显的表达,说明这两个基因并不参与该时期肝细胞的生长调控,但它们与细胞的增殖与凋亡有密切的关系。以上提示在胚胎肝形态发生过程中出现的凋亡不受P21基因的调控,其间发生的增殖也与Ki-ras基因的作用无明显的关系,可能是其他的基因在参与其中的增殖与凋亡的调控。

参 考 文 献

- [1] 孟玲. CaCl₂法转化最佳条件的探讨[J]. 云南大学学报(自然科学版), 1996, 16(2): 106-108.
- [2] 凯勒 G H. DNA 探针技术[M]. 孙士勇等译. 北京:科学出版社, 1989.
- [3] BOTON W E. Expression of PCNA and DNA polymerase delta in the cell cycle of synchronized mammalian cells [J]. Cell, 1998, 1(3): 193-197.
- [4] 愈慧珠. 小白鼠胚胎发生[M]. 北京:科学出版社, 1985.
- [5] 汪虹. 周期蛋白依赖激酶抑制因子 P21Cip1 的研究进展[J]. 生理科学进展 1998, 29: 339-341.
- [6] 沈羽非. 真核基因表达调控[M]. 北京:高等教育出版社, 1996.

(编辑:龙能芬)