

水牛有腔卵泡颗粒细胞凋亡的生物形态学特征

何宝祥¹, 郑喜邦¹, 杜玉兰¹, 余四九^{2*}, 李恭贺¹, 李彩萍¹

(1. 广西大学动物科技学院, 南宁 530005; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

摘要: 为了解水牛有腔卵泡闭锁的起因和有腔卵泡中是否存在卵泡颗粒细胞凋亡, 本研究选择青春期前水牛和成年(发情间期和发情期)水牛的卵巢, 采用石蜡组织切片、HE 染色技术进行光镜观察, 并采用 DNA 原位末端标记(TUNEL)技术和透射电镜观察研究了卵泡颗粒细胞凋亡的特征。结果表明: 青春期前水牛的健康有腔卵泡上无或仅有极个别凋亡的卵泡颗粒细胞(GCs), 而闭锁有腔卵泡上存在有多量凋亡的 GCs, 凋亡的形式: GCs 层内出现单个或多个凋亡细胞, 卵泡腔内出现凋亡小体群。在成年水牛发情间期的闭锁大卵泡上, GCs 层弯曲皱折, 存在多量凋亡的 GCs。发情期水牛成熟卵泡的 GCs 层也存在 GCs 凋亡, 排卵前的 GCs 层细胞全部脱落到卵泡腔内。本研究首次在同一组织切片上先后分别应用 HE 染色和 TUNEL 检查细胞凋亡, 且证实了水牛有腔卵泡 GCs 凋亡的存在。超微结构显示了 GCs 凋亡的核边集化、核浓缩及凋亡小体的形态。上述结果提示: 在水牛闭锁有腔卵泡中存在着 GCs 凋亡, GCs 凋亡是启动水牛有腔卵泡闭锁的潜在机理。

关键词: 水牛; 细胞凋亡; 透射电镜; 卵泡颗粒细胞; TUNEL

中图分类号: S852.16

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)11-1209-08

The Biological Characteristics of Granulosa Cells Apoptosis of Antritic Follicle in Buffalo Ovary

HE Bao-xiang¹, ZHENG Xi-bang¹, DU Yu-lan¹, YU Si-jiu^{2*}, LI Gong-he¹, LI Cai-ping¹

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Animal Medicine College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to reveal the origination of antral follicular atresia, and to understand if the apoptosis of granulosa cells (GCs) of antrum follicle exists in buffalo ovarian, the buffaloes before puberty and adult buffaloes (at oestrus & dioestrus) were chosen in this study, the apoptotic characteristics of follicular GCs was studied by paraffin section, HE staining, light microscope, DNA *in situ* end labeling (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) and transmit electronic microscope (TEM) technology. The results showed that the healthy antrum follicle had not or only had infrequent apoptotic GCs, while atretic antrum follicle had plentiful apoptotic GCs in buffalo before puberty, the representative forms were apoptosis of single or more GCs in GCs layer, and flock of apoptotic bodies in follicular cavity. There were many apoptotic GCs and the GCs layer was curving and crinkling in the big atretic follicle of adult buffalo at dioestrus. GCs apoptosis also exists in Graafian follicle of buffalo at estrus, all GCs in GCs layer fallen into follicular cavity in the big follicle before ovulation. A apoptosis-examining method of the same tissue slice being respectively stained by HE staining and TUNEL has been invented, GCs apoptosis existed in buffalo antral follicles are confirmed by the above method. The GCs nuclear condensed and tended marginization in morphology, as well as apoptot-

收稿日期: 2005-04-20

基金项目: 广西科学基金项目(桂基科 0144009); 广西“新世纪百百千人才工程”专项资金(2001210 号)

作者简介: 何宝祥(1958-), 男, 甘肃秦安人, 博士, 教授, 主要从事临床兽医学动物生殖生理研究, E-mail: hebaox5817@163.com

* 通讯作者: 余四九, E-mail: sjyu@163.com

ic bodies was observed by TEM. Above results suggested that the GCs apoptosis of atretic antral follicles exists in buffalo and the GCs apoptosis are the potential mechanism of arising antral follicles atresia in buffalo.

Key words: buffalo; apoptosis; transmit electronic microscope; follicular granulosa cells; TUNEL

在哺乳动物的繁殖生涯中,根据动物种类的不同,约 70%~99.9%的卵泡将经历闭锁,只有极少数卵泡才能发育成熟、排卵^[1]。近年来在小鼠、大鼠、鸡、绵羊、猪、牛、人类以及多种动物的研究表明,卵泡闭锁是卵泡细胞凋亡的结果^[2~8],卵巢卵泡颗粒细胞(GCs)凋亡是动物卵泡闭锁的细胞机理^[9~12]。然而关于水牛卵泡GCs凋亡的形态学变化目前在国内外尚未见报道。笔者开展了水牛卵泡细胞和卵母细胞凋亡的研究工作,在完成水牛胎儿卵泡细胞和卵母细胞凋亡研究之后^[13],本研究试图探讨在水牛的有腔卵泡上是否存在卵泡颗粒细胞凋亡,如果存在细胞凋亡,它们有何形态学特征?为认识水牛卵泡颗粒细胞凋亡的DNA原位末端标记、显微结构和超微结构特征,揭示水牛卵泡闭锁的潜在机理积累科学资料。

1 材料与方法

试验设计:选取青春期前水牛和成年繁殖期水牛的卵巢,制作石蜡组织切片、HE染色,进行水牛卵泡GCs凋亡的组织学观察。同时取相邻组织,应用细胞凋亡原位检测技术TUNEL检查GCs凋亡所产生的DNA片段及其特征。

对同一组织先后分别应用HE染色和TUNEL检查,进一步确认卵泡GCs发生的凋亡。

选取成年间情期母水牛闭锁卵泡的卵巢,制备透射电镜标本,进行卵泡颗粒细胞凋亡的超微结构观察。

1.1 供试水牛及卵巢的获取

在南宁市某屠宰场,在临床检疫确认健康的待宰本地母水牛中,根据屠宰场记录、临床初步观察与检查、结合直肠检查,选取年龄在3~8岁间的成年发情母水牛5头,发情间期母水牛5头。在南宁地区当地选取青春期前(1岁龄以下)母水牛2头。

在上述被选牛屠宰后,立即摘取卵巢,放置在事先准备好的盛有Bouin's固定液的试剂瓶内,待做组织学检查。对发情间期水牛的卵巢,放入事先准备好的冷PBS(pH7.2,含双抗)液中,立即送至实验

室,按照石蜡组织切片和透射电镜标本要求分别取材固定。

1.2 光镜组织切片制作与检查

按照常规石蜡组织切片制作要求,取材、Bouin's固定液固定12~24h、水洗、脱水、透明、石蜡包埋、连续切片(6 μ m)、HE染色、封片,最后在光学显微镜下观察各种卵泡(健康与闭锁)中GCs的凋亡情况。

凋亡细胞类型的判定:参考有关细胞凋亡资料^[1,2,14],对凋亡细胞进行观察、描述并拍照。

1.3 DNA原位末端标记(TUNEL)

TUNEL方法按照细胞凋亡原位检测试剂盒说明并参考文献^[13]进行。

1.4 凋亡细胞的确认

在同一组织切片先后分别应用HE染色与TUNEL方法,判定HE染色认为是凋亡的细胞是否在DNA原位末端标记中显示阳性。试验选用HE染色的石蜡切片,在观察、确认卵泡GCs凋亡部位和照相之后,先采用脱色技术脱掉HE染色,然后再进行DNA的TUNEL检查,找准曾用HE染色检查相同的部位进行观察照相,然后对比结果。

1.5 水牛闭锁卵泡GCs凋亡的超微结构特征

被检卵巢:取间情期水牛有闭锁卵泡(卵巢切面可见黄褐色斑点)的卵巢,在闭锁卵泡的卵泡腔边缘区取材。

JEM-1200EX透射电镜,由广西大学生物实验中心提供。电镜标本的制作按照常规方法进行取材,然后经多聚甲醛与饿酸固定、脱水、包埋、超薄切片、柠檬酸铅染色,最后用透射电镜观察被检样品,记录观察结果并拍照。

2 结果

2.1 水牛卵泡GCs凋亡的显微结构特征

2.1.1 初情期前水牛卵泡GCs凋亡的HE染色特征 初情期前水牛卵巢皮质部可见到多种卵泡,包括腔前卵泡和有腔卵泡,但有腔卵泡均小于3mm以下。在健康有腔卵泡中,很难见到GCs凋亡,多

数无凋亡细胞,个别卵泡偶尔可见 1~2 个,健康卵泡颗粒细胞层中个别 GCs 凋亡见图 1。

在早期闭锁有腔卵泡的 GCs 层中,凋亡的 GCs 弥漫性地散布在健康 GCs 之间,细胞核显著浓染,有的在卵泡的 GCs 层中出现凋亡小体(见图 2);高倍镜下可见浓染的染色质沿核膜周边集结边聚,或呈新月型;或碎裂成轮廓清晰的单一均质团块。

在某些闭锁卵泡,在 GCs 层的卵泡腔内缘出现多量的凋亡小体,形成凋亡小体群;有些体积大的凋亡小体显然不全是来自单一细胞,它们明显来自多个细胞,是凋亡产物的集合体,染色浓黑。凋亡小体呈球形,有的处在细胞轮廓中,也有不少独立存在。其表现为单个分散存在、或成群分布于颗粒细胞层附近的卵泡腔内(见图 3)。

2.1.2 成年水牛卵泡 GCs 凋亡的 HE 染色特征

发情间期:卵巢切片见卵巢皮质层有大小不一、或健康、或闭锁的卵泡,也有原始、初级、次级卵泡。腔前卵泡中的凋亡细胞与在胎牛的研究结果相似^[13]。在有腔卵泡中,小的有腔卵泡的 GCs 凋亡,包括 GCs 层内的单个 GCs 凋亡和卵泡腔内出现的凋亡小体,都与初情期前的年轻牛的相似。在闭锁大卵泡,颗粒细胞层中出现的单个凋亡细胞的情况与上述初情期前闭锁卵泡的相似,而在大卵泡闭锁后期出现显著的形态变化,如卵泡膜弯曲变形(图 4)与初情期前的年轻牛明显不同,而 GCs 层中的细胞凋亡情况相似。

发情期:卵巢体积大,表面有一较大且即将排卵的优势卵泡(DF),卵泡直径 1.5 cm 左右,还有数个体积较小的次级卵泡,DF 的卵泡壁上有血管分布且血管内含有新鲜血液。在除 DF 以外的其它卵泡中,颗粒细胞和卵泡膜细胞的凋亡情况与间情期水牛相同。排卵前 DF 的 GCs 层变薄,GCs 层中也有较多的 GCs 凋亡,卵泡腔内存在嗜伊红的絮状物,卵泡外膜纤维化,如图 5 所示。在即将排卵的 DF 中,GCs 层的 GCs 全部脱落于卵泡腔内,只剩基膜,卵泡液中混有大量 GCs,GCs 凋亡特征不明显,卵泡外膜发生纤维化,见图 6。

2.1.3 水牛有腔卵泡 GCs 凋亡的 TUNEL 特征

早期闭锁卵泡:从初情期前到繁殖期的母水牛卵巢上均存在着有腔卵泡,选择一个有腔卵泡进行观察(图 7),根据 HE 染色特征和组织学标准^[15],判定该卵泡为早期闭锁卵泡。对该卵泡 HE 染色的石蜡切片相邻组织切片采用 TUNEL 检查,发现被检

卵泡的颗粒细胞层中存在着较多的染成黑色的 DNA 碎片,其数量与 HE 染色切片上浓染的 GCs 数量基本相符(见图 8)。

为了证实本试验中 TUNEL 方法的特异性和可靠性,本试验设有阳性和阴性对照,分别见图 9 和图 10。阳性对照由于在标记前使用了 DNA 酶 I 处理,使部分细胞的 DNA 链发生断裂,DNA 碎片增多,因而被标记的 DNA 片段增多。阴性对照由于反应中未使用 DNA 3'末端转移酶(TdT),因而凋亡细胞的 DNA 碎片就未能被标记。

闭锁晚期卵泡:在闭锁中、晚期卵泡的细胞凋亡 TUNEL 检查中,其卵泡颗粒细胞层、卵泡内膜和卵泡间质中的 DNA 碎片分布与 HE 染色的情况相似,被标记的阳性 DNA 碎片散布于组织中。此外,在颗粒细胞层附近的卵泡腔边缘,部分卵泡可见 TUNEL 标记为阳性的凋亡小体,此类凋亡小体的大小、形态以及分布区域均与其相邻组织的石蜡切片 HE 染色下的结构相似(图 11)。

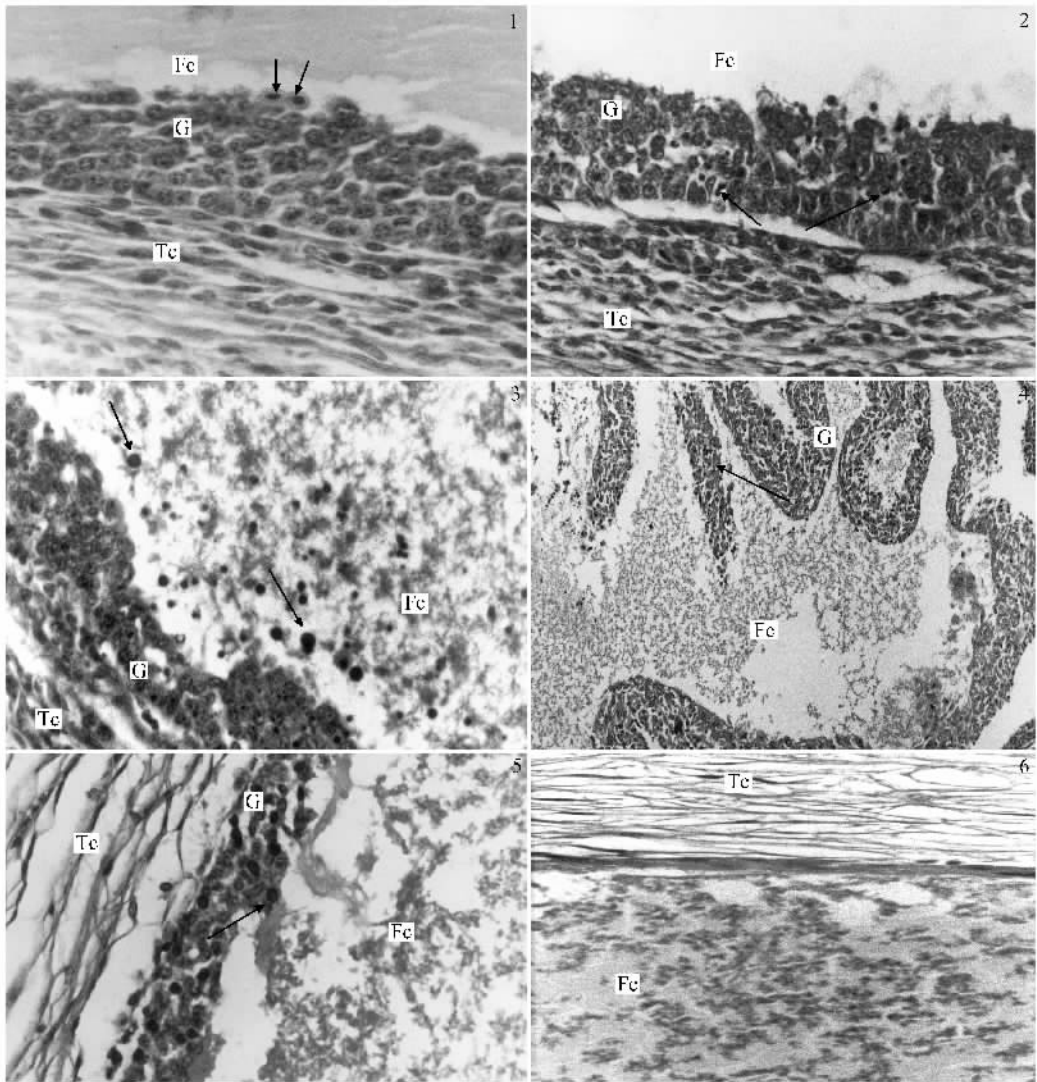
观察发现在这些凋亡小体中,有的体积较小,有些体积较大,最大的体积大于健康 GC 的体积。此外,凋亡小体在 TUNEL 标记中的染色最深。从它们的分布看,大多在卵泡腔边缘,贴近颗粒细胞层,但也有的远离颗粒细胞层,此时常见到凋亡小体位于凋亡细胞痕迹内(见图 12)。在油镜下观察,这些凋亡小体的染色深浅不同,大小不一,多数呈球形(图 13)。

2.2 石蜡切片中 GCs 凋亡的确认

为了进一步寻找石蜡切片的 HE 染色与 TUNEL 之间的联系,证实 HE 染色认为凋亡的 GCs 是否可被 TUNEL 检验为阳性,本试验对 HE 染色切片进行脱色处理,然后直接进行 TUNEL 检查,结果见图 14。在同一张石蜡切片上,HE 染色判定为凋亡的 GCs(即细胞核异常浓染,体积缩小的细胞)及凋亡小体,TUNEL 检查也显示阳性。在凋亡 GCs 的形状、大小、色泽深浅、定位都存在极大的相似性,两种方法的比较与补充,直接证实了被检水牛卵巢上发生的卵泡颗粒细胞凋亡的真实性与准确性。

2.3 水牛 GCs 凋亡的超微结构特征

间情期水牛卵巢卵泡 GCs 凋亡的超微结构,在透射电镜下的表现有以下几种形式:第一种如图 15 所示,细胞核常染色质的超微结构消失,缺乏弥漫性分布形式,核染色质固缩呈块状,类似异染色质,但



G. GCs 层;Fc. 卵泡腔;Tc. 卵泡膜细胞层

G. Granulosa cell layer; Fc. Follicular cavity; Tc. Theca layer

图 1 初情期前水牛健康有腔卵泡的 GCs 凋亡(HE 染色,400×),颗粒细胞层中偶尔可见 GCs 凋亡(↑);图 2 初情期前水牛早期闭锁卵泡,箭头示 GCs 层中的凋亡小体(HE 染色,400×);图 3 多个凋亡小体(↑)出现在初情期前水牛闭锁卵泡腔内缘附近(HE 染色,400×);图 4 成年水牛间情期闭锁后期大卵泡(HE 染色,200×),在皱缩的 GCs 层中存在 GCs 凋亡;图 5 成年发情期水牛优势卵泡颗粒细胞层中的 GCs 凋亡(HE 染色,400×),黑染的细胞为凋亡细胞(↑);图 6 发情期水牛排卵前优势卵泡 GCs 落入卵泡腔,卵泡颗粒层消失(HE 染色,400×)

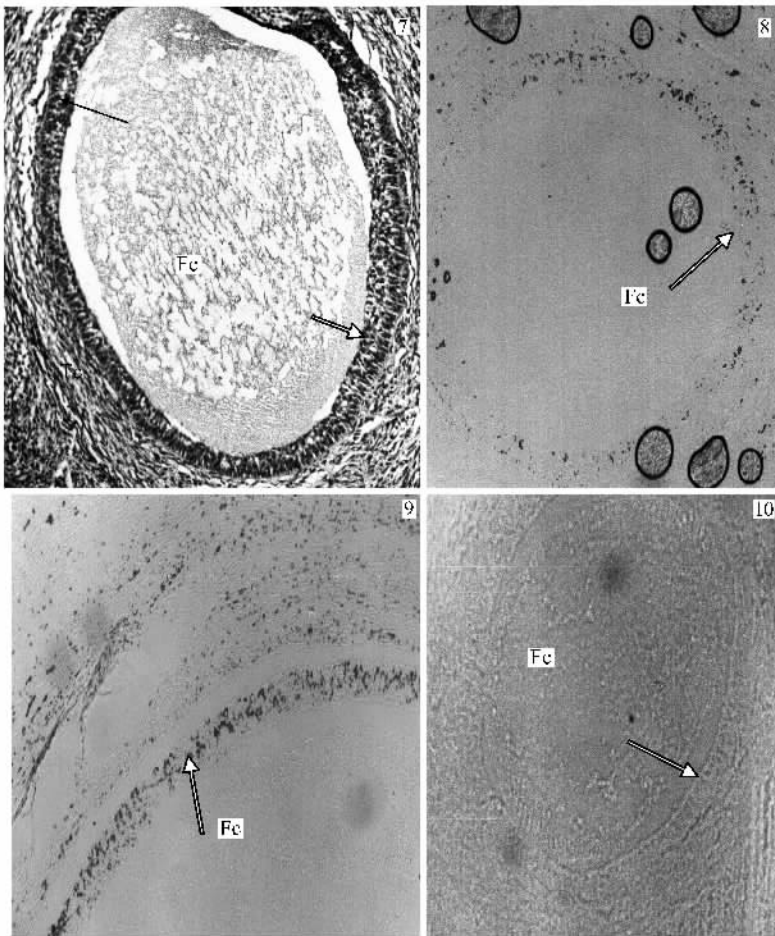
Fig. 1 GCs apoptosis(arrows) occur in healthy antral follicle of buffalo before puberty (HE staining, 400×); Fig. 2 The apoptotic bodies (arrows) occur in early atretic follicle of buffalo before puberty (HE staining, 400×); Fig. 3 More apoptotic bodies occur in follicular cavity of buffalo before puberty (HE staining, 400×); Fig. 4 Apoptotic GCs (arrows) appear in the curving GCs layer of late big atretic follicle of adult buffalo at dioestrus (HE staining, 200×); Fig. 5 Apoptotic GCs appear in the GCs layer of dominant follicle of adult buffalo at oestrus, deep-staining GCs are apoptotic GCs (arrows) (HE staining, 400×); Fig. 6 GCs fall into the dominant follicular cavity in adult buffalo before ovulation, GCs layer disappeared (HE staining, 400×)

电子密度比异染色质的高得多,染色质向核膜下集结。核膜清晰、完整,核仁结构尚清晰,细胞质中细胞器形态明显改变,线粒体内嵴结构可见,膜结构完

整,内质网等膜结构内电子密度增高。第二种 GCs 凋亡的表现:整个细胞质及细胞核的体积都缩小;核染色质电子密度增高,并聚集于核膜下,即发生“边

集化”,呈现“圆环状”、“马蹄状”等形状,见图 16 箭头所示。第三种 GCs 凋亡表现为凋亡小体的形成,即 GCs 在 GCs 层原位发生凋亡,出现电子密度极高的多形小体,这些小体就是凋亡小体,它们的数量多,如图 17,一个凋亡的 GC 形成了多达 23 个凋亡小体;凋亡小体的形态虽然各异,但多数呈圆形或椭圆形;凋亡小体的体积大小也不等,有的较大,有的很小,但每个凋亡小体的边缘都整齐;凋亡小体存在于原细胞所处的位置;认真观察凋亡细胞的细胞膜,该细胞膜已不存在,与之相邻的另一细胞的细胞膜也不清晰,似乎这两个细胞已经融合在一起,这可能

与相邻细胞融合或被相邻细胞吞噬,外观上形成了一个细胞。第四种形式是凋亡小体离开凋亡细胞,出现在凋亡细胞附近。发生凋亡的 GCs 近旁出现许多电子密度较高的圆形小体,大多数存在于凋亡和健康的 GCs 附近。这些凋亡小体中有的体积较小,有的体积较大;凋亡小体的形态与在凋亡细胞原位出现的相似。这种凋亡小体多出现在颗粒细胞层的卵泡腔边缘,离开凋亡细胞后随即进入卵泡腔(见图 18),这种现象在水牛卵泡体外培养的另一试验中以及 HE 染色组织切片显微结构中都得到了验证。



↑示 GCs 层或凋亡的 GC; Tc. 卵泡膜层; Fc. 卵泡腔

Thick arrow denote granulosa cell layer or apoptotic GC; Tc. Theca layer; Fc. Follicular cavity

图 7 初情期前母牛早期闭锁有腔卵泡的凋亡, ↑示浓染 GCs(HE 染色, 40×); 图 8 与图 7 相同卵泡的 GCs 层 TUNEL 检出的阳性 GCs(TUNEL, 40×); 图 9 阳性对照(TUNEL, 100×); 图 10 阴性对照(TUNEL, 40×)

Fig. 7 GCs apoptosis (deep-staining GCs as thin arrows denoted) occur in early atretic antral follicle of buffalo before puberty (HE staining, 40×); Fig. 8 TUNEL positive GCs exist on the GCs layer of the same follicle as Fig. 7 (40×); Fig. 9 TUNEL positive control (TUNEL, 100×); Fig. 10 TUNEL negative control (TUNEL, 40×)

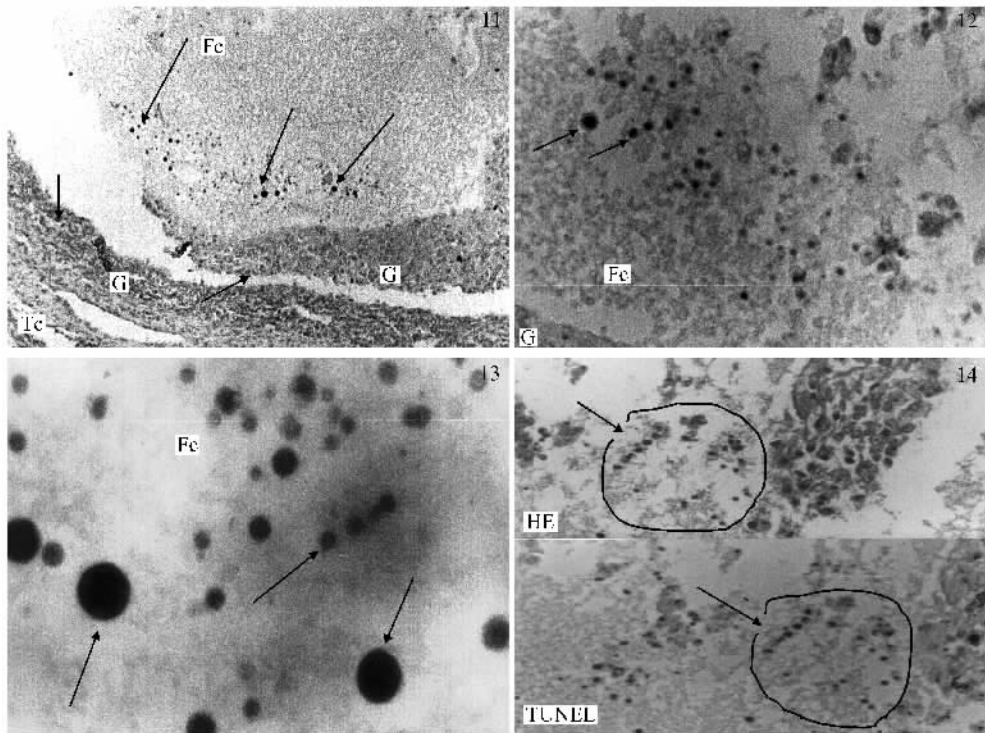


图 11 水牛晚期闭锁卵泡 GCs 层中的 GCs(短箭头所示)和卵泡腔内的凋亡小体(长箭头所示)显示 TUNEL 阳性(TUNEL,40 \times);图 12 水牛闭锁卵泡腔内的凋亡小体(箭头所示)显示 TUNEL 阳性(TUNEL 400 \times);图 13 凋亡小体(箭头所示)的放大特征(TUNEL,1 000 \times);图 14 凋亡细胞的 HE 染色与 TUNEL 效果的对比与确认(400 \times),上半部显示 HE 染色,下半部显示 TUNEL,HE 浓染的 GCs 在 TUNEL 中也显示阳性,如箭头所示

Fig. 11 Apoptotic bodies (longer arrows) in follicular cavity and apoptotic GCs in the GCs layer (shorter arrow) appeared TUNEL positive in the atretic follicular cavity of buffalo (TUNEL ,40 \times);Fig. 12 There are some TUNEL positive apoptotic bodies in the atretic follicular cavity of buffalo (TUNEL 400 \times);Fig. 13 Magnified picture of apoptotic bodies in the follicular cavity (TUNEL ,1000 \times);Fig. 14 The apoptotic GCs are affirmed by HE staining and TUNEL method,the same tissue slice is respectively stained by HE and TUNEL, upper panel is stained by HE (400 \times), lower panel is stained by TUNEL(400 \times). Apoptotic GCs are strongly stained by both methods(as arrows denoted)

3 讨论

3.1 水牛有腔卵泡细胞凋亡的显微结构特征

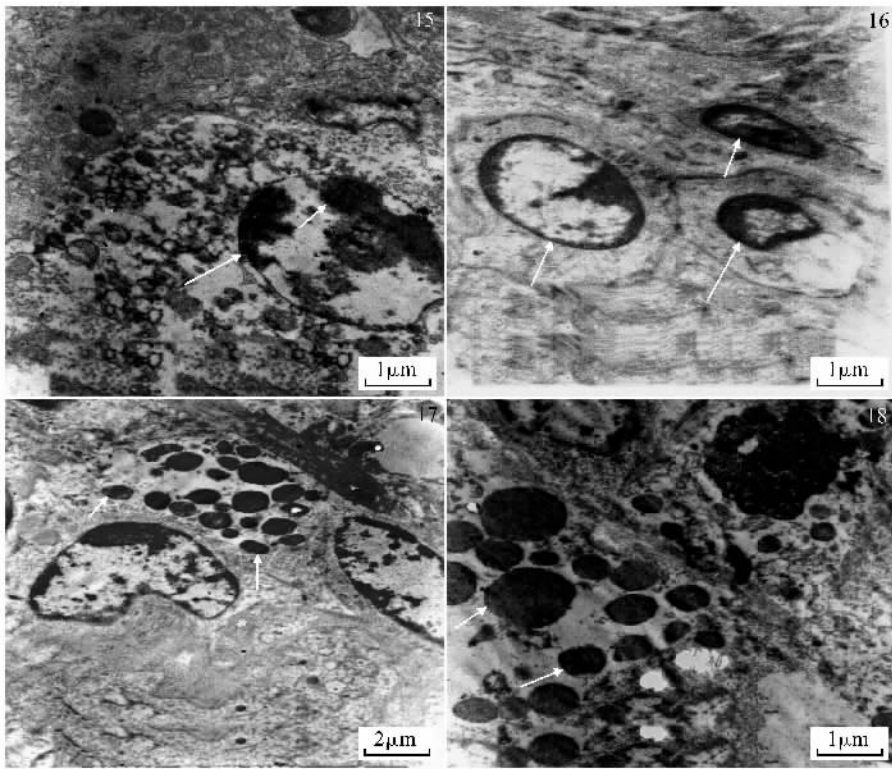
在本研究中,笔者通过 HE 染色和 TUNEL 检查首次证实,在水牛的闭锁有腔卵泡中确实存在着凋亡的卵泡 GCs,凋亡细胞数量多,而健康有腔卵泡几乎无或仅有极个别 GCs 凋亡。初情期前水牛有腔卵泡中细胞凋亡的情况和成年水牛的基本一致。

水牛有腔卵泡 GCs 凋亡有两种类型,第一种类型是位于正常活细胞之间的细胞凋亡,细胞在原位发生凋亡。如卵泡颗粒层内的 GCs,这些细胞凋亡的变化与水牛胎儿卵巢上所发生的细胞凋亡相似^[13]。第二种类型是在卵泡腔内缘出现较多的 GCs 凋亡或较多的 GCs 脱落到卵泡腔后发生凋亡,这种类型的凋亡似乎较为剧烈,常常形成凋亡小体

群。个别凋亡小体的体积较大,甚至超过了单个 GC 的体积。和人 GCs 凋亡的报道^[8]相似,只是独立于细胞轮廓的凋亡小体比人的多一些。因此我们推测,在水牛有腔卵泡闭锁初期,只有少量散在 GCs 发生凋亡,随着体内促进卵泡闭锁的激素水平脉冲式变化,GCs 层中的细胞突然大量凋亡(图 2),很多细胞核在核酸内切酶作用下发生凋亡性降解,DNA 碎片涌入卵泡腔形成所见到的凋亡小体群(图 3),有时整片 GCs 脱落于卵泡腔,然后形成凋亡小体群(图 12)。Inoue 等^[16]也曾小鼠报道了随有腔卵泡闭锁过程的推进,大规模凋亡小体进入卵泡腔的情况。Jolly 等^[14]在绵羊卵巢卵泡闭锁的研究报道中用 DNA 原位末端标记和苏木精染色展示了与本试验结果类似的图片,认为这不仅反映了闭锁卵泡 GCs 凋亡的高发率,也可能反映它们来自卵泡腔内

缘细胞凋亡碎片渐进性积聚所致,这与本试验结果相似。然而,在本研究的许多闭锁卵泡中,这种凋亡

类型只有在闭锁卵泡的某一阶段才能看到,并非能在各个时期见到。



间情期水牛卵巢卵泡 GCs 凋亡的超微结构。图 15 示核染色质固缩成块状,电子密度异常增高(↑),线粒体、内质网等细胞器形态明显改变;图 16 示凋亡的 GCs 皱缩,体积缩小、核染色质浓缩、集结于核膜下,即“边集化”,呈“圆环状”(↑);图 17 示单个 GCs 凋亡在原位形成许多凋亡小体(↑);图 18 示许多“凋亡小体”(↑)离开凋亡细胞,出现在凋亡细胞附近

The ultrastructure of GCs apoptosis in buffalo at dioestrus. Fig. 15 Nuclear chromatin condensed into agglomerate, electron density increased(arrows), the structure of organelle such as mitochondria and endoplasmic reiculum was abnormal; Fig. 16 The apoptotic GCs shrunked, their sizes becomed smaller, nuclear chromatin condensed and congregated under nuclear membrane(arrows); Fig. 17 Many apoptotic bodies(arrows) from a apoptotic GC lay at original place; Fig. 18 Many apoptotic bodies(arrows) left off from GC's original place

3.2 水牛闭锁卵泡 GCs 凋亡的超微结构变化

超微结构改变仍为确定细胞凋亡的最可靠的方法之一^[17]。Wyllie 等^[18]报道了大鼠卵泡颗粒细胞凋亡的超微结构特征。David 等^[19]报道了用抗 eCG 抗体诱导大鼠卵巢卵泡颗粒细胞、卵泡膜细胞凋亡的超微结构变化,在抗 eCG 抗体处理 24 h 后见到大鼠卵泡颗粒细胞核碎裂成多个核碎片(1 个颗粒细胞中出现 4 个核碎片),细胞核染色质浓缩。本试验对发情间期水牛的自然闭锁卵泡进行了超微结构检查,看到了本文结果中所描述的卵泡 GCs 凋亡的 4 种典型特征性变化,与 David 等的报道有许多相似之处。

3.3 水牛闭锁卵泡 GCs 凋亡的 HE 染色检查与 DNA 原位末端标记的综合判定

在 HE 染色的显微结构观察中,可将细胞的凋

亡与坏死分开。凋亡细胞的形态表现为细胞皱缩,体积变小,细胞核浓缩;而坏死细胞体积变大,表现肿胀,细胞破裂,细胞质外溢^[20]。但 HE 染色不能准确反映细胞 DNA 发生的损伤。

DNA 的原位末端标记(*in situ* end labeling, ISEL)是分子生物学与形态学相结合的研究方法,能对细胞群中单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色,能准确地反映细胞凋亡最典型的生物化学和形态学特征^[20]。TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记)法是 ISEL 方法中的一种,其敏感性高于 ISEL 的其它方法^[20]。尽管 TUNEL 法具有许多优点,但它仍然不能单独用于凋亡诊断,采用它不能鉴别细

胞坏死和细胞凋亡。因为只要是 DNA 发生断裂, TUNEL 法就可检出, 因此应结合形态学特征加以判断^[17]。

在验证 HE 染色中认为凋亡的细胞是否与 TUNEL 法检查结果相吻合时, 国内外沿用的办法就是使用与 HE 染色切片相邻的石蜡切片进行 TUNEL 法检查。在本研究中, 我们首先对 HE 染色的切片进行观察, 检查凋亡细胞的形态特征并进行照相。然后对该组织切片进行脱色处理, 然后对其进行 ISEL, 待 TUNEL 完成后观察拍照, 与原 HE 染色照片对比, 比较两种方法对同一组织染色的效果, 综合两种检查结果对细胞凋亡作出诊断。就我们所知, 这一方法目前在国内外尚未见报道。

参考文献:

- [1] Byskov A G. Follicular atresia. [M]. New York: Plenum Press, 1978.
- [2] Palumbo A, Yeh J. *In situ* localization of apoptosis in the rat ovary during follicle atresia[J]. Biol Reprod, 1994, 51: 887~895.
- [3] Rodolfo R, Tao X J, Alexander M, *et al.* Localization, regulation and possible consequences of apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) expression in granulosa cells of the mouse ovary[J]. endocrinology, 1999, 140(6): 2 641~2 644.
- [4] Huet C, Monget P, Pisselet C, *et al.* Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep[J]. Biol reprod 1997, 56: 1025 ~ 1 034.
- [5] Johnson A L, Bridgham J T, Witty J P, *et al.* Susceptibility of avian ovarian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicle development and is related to endogenous levels of bcl-xlong gene expression[J]. Endocrinology, 1996, 137(5): 2 059~2 065.
- [6] Jolly P D, Tisdall D J, Heath D A, *et al.* Apoptosis in bovine granulosa cell in relation to steroid synthesis cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia[J]. Biol Reprod, 1994, 51(5): 934 ~ 944.
- [7] Liu Z H, Yue K Z, Ma S F, *et al.* Effects of pregnant mare serum gonadotropin (eCG) on follicle development and granulosa-cell apoptosis in the pig[J]. Theriogenology, 2003, 59(3-4): 775~785.
- [8] Violeta G, Katarina V, Mirna S B, *et al.* Apoptosis and active caspase-3 expression in human Granulosa cells[J]. Fertility and stability, 2005, 83(2): 426 ~ 431.
- [9] Tilly J L, Kowalski K I, Johnson A L, *et al.* Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression [J]. Endocrinology, 1991, 129(5): 2 799~2 801.
- [10] Tilly J L. Apoptosis and ovarian function[J]. Rev Reprod, 1996, 1: 162~172.
- [11] Palumbo A, Yeh J. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression[J]. J Soc Gynecol Invest, 1995, 2: 565~571.
- [12] Hughes F M J R, Gorospe W C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia[J]. Endocrinology, 1991, 129(5): 2 415~2 422.
- [13] 何宝祥, 郑喜邦, 杜玉兰, 等. 水牛胎儿卵泡细胞和卵母细胞凋亡的特征[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(1): 23~27.
- [14] Jolly P D, Smith P R, Heath D A, *et al.* Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes[J]. Biol Reprod, 1997, 56: 837~846.
- [15] Hay M F, Cran D G, Moor R M. Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles[J]. Cell Tissue Res, 1976, 169: 515~529.
- [16] Inoue S, Watanabe H, Saito H, *et al.* Elimination of atretic follicles from the mouse ovary: a TEM and immunohistochemical study[J]. J Anat, 2000, 196: 103~110.
- [17] 胡野, 凌志强, 单小云. 细胞凋亡的分子医学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002. 27~28, 489~493.
- [18] Wyllie A H, Kerr J F R, Currie A R. Cell death: the significance of apoptosis[J]. Int Rev Cytol, 1980, 68: 251~256.
- [19] Boone D L, Carnegie J A, Rippstein P U, *et al.* Induction of apoptosis in Equine chorionic gonadotropin (eCG)-primed rat ovaries by anti-eCG antibody[J]. Biol Reprod, 1997, 57(2): 420~427.
- [20] 彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 16~20, 153~157, 188.