

人眼 Tenon 囊成纤维细胞缝隙连接细胞间通讯的检测

王继兵¹, 黄旭东¹, 邹会会¹, 刘珊珊¹, 葛 坚²

基金项目: 中国山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2010HM015)
作者单位:¹(261041) 中国山东省潍坊市, 潍坊眼科医院;
²(510060) 中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心
作者简介: 王继兵, 男, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 青光眼防治。
通讯作者: 王继兵. wangjb918@163. com
收稿日期: 2011-05-30 修回日期: 2011-08-15

Detection of gap junctional intercellular communication in cultured human Tenon's capsule fibroblasts

Ji-Bing Wang¹, Xu-Dong Huang¹, Hui-Hui Zou¹,
Shan-Shan Liu¹, Jian Ge²

Foundation item: Shandong Provincial Natural Science Foundation Project, China (No. ZR2010HM015)

¹Weifang Eye Hospital, Weifang 261041, Shandong Province, China; ²Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Ji-Bing Wang, Weifang Eye Hospital, Weifang 261041, Shandong Province, China. wangjb918@163. com

Received: 2011-05-30 Accepted: 2011-08-15

Abstract

• **AIM:** To explore gap junctional intercellular communication (GJIC) in cultured human Tenon's capsule fibroblasts (HTFs) and detect the expression and distribution of connexin43(Cx43).

• **METHODS:** GJIC were demonstrated by scrape-loading and Lucifer yellow dye transfer methods. RT-PCR and Western blot were carried out to detect mRNA and protein expression of Cx43. Immunocytochemistry was performed to observe the distribution of Cx43.

• **RESULTS:** Cultured HTFs demonstrated functional GJIC in vitro. The transporting degree of Lucifer yellow dye was more than 6 grades. The mRNA and protein expression of Cx43 were also detected. Cx43 were located on cells' membrane by immunocytochemistry.

• **CONCLUSION:** Cultured HTFs have GJIC function which confer these cells the ability to establish and maintain intercellular communication mediated by Cx43. This property may be critical in maintaining function synchronization of fibroblasts during wound-healing process.

• **KEYWORDS:** human Tenon's capsule; fibroblasts; gap junctional intercellular communication; connexin 43

Wang JB, Huang XD, Zou HH, et al. Detection of gap junctional intercellular communication in cultured human Tenon's capsule

fibroblasts. *Guoji Yanke Zazhi(Int J Ophthalmol)* 2011; 11(10): 1707-1709

摘要

目的: 观察体外培养的人眼 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon's capsule fibroblasts, HTFs) 缝隙连接细胞间通讯 (gap junctional intercellular communication, GJIC) 功能及其构成蛋白 connexin 43 (Cx43) 的表达及分布。

方法: 锐刀划痕罗氏黄 (lucifer yellow) 荧光染料传输法观察 GJIC 功能; RT-PCR 及 Western blot 分别检测 Cx43 mRNA 及蛋白表达; 免疫细胞化学方法检测 Cx43 的分布。

结果: 荧光染料自划痕线向邻近未损伤细胞传输达 6 级细胞以上, 同时检测到 Cx43 mRNA 与蛋白的表达; 免疫细胞化学法观察到 Cx43 分布于细胞膜。

结论: 培养的 HTFs 具有较强的 GJIC 功能, 通过 Cx43 介导 GJIC 赋予细胞能够相互之间传递信息的能力, 提示在创伤愈合过程中 GJIC 对成纤维细胞功能同步化方面发挥重要作用。

关键词: 人眼 Tenon 囊; 成纤维细胞; 缝隙连接细胞间通讯; connexin 43

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 10. 006

王继兵, 黄旭东, 邹会会, 等. 人眼 Tenon 囊成纤维细胞缝隙连接细胞间通讯的检测. 国际眼科杂志 2011; 11(10): 1707-1709

0 引言

缝隙连接细胞间通讯 (gap junctional intercellular communication, GJIC) 负责细胞之间的通讯, 在胚胎学发育以及某些疾病的过程中发挥重要作用。在创伤愈合过程中发生的一系列细胞与结缔组织成分的多种变化必然需要一种有效的细胞间通讯协作方式, 有研究表明 GJIC 在这一过程中发挥重要协同作用^[1]。有关人眼 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon's capsule fibroblasts, HTFs) 中 GJIC 的研究, 目前尚未见报道, 故本研究采用划痕染料传输法观察 HTFs 的 GJIC 功能, 并检测 connexin 43 (Cx43) 的表达与分布, 以期对青光眼滤过术瘢痕化调控提供新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 DMED (Gibco), 胎牛血清 (杭州四季青), 罗氏黄 (Lucifer yellow, Sigma), 反转录试剂盒及 PCR 试剂盒 (Fermentas), 兔抗人 Cx43 抗体 (Lymed), 抗人 vimentin 抗体及免疫组织化学试剂盒 (福州迈新)。

1.2 方法

1.2.1 HTFs 体外培养 采用组织块培养法。取角膜移植术前新鲜人眼 Tenon 囊组织, 庆大霉素冲洗, 解剖显微镜下仔细分离, 将 Tenon 囊组织剪成大小约 1mm × 1mm × 1mm 组织块, 均匀置于培养瓶内, 先加少许培养液, 倒置于 37℃ 培养箱内, 4h 后见已贴壁, 补加培养液培养, 3~4d 换液 1 次, 待长满瓶底后, 1:3 传代, 实验用第 3~5 代细胞。vimentin 免疫细胞化学染色鉴定。

1.2.2 锐刀划痕罗氏黄荧光传输法检测 GJIC 功能 将 HTFs 接种于直径为 3.5cm 的塑料培养皿中,融合后,用锐刀在培养皿底部用力划痕,加入 3mL 罗氏黄 3min,洗去染液,立即于荧光显微镜下观察荧光划痕处细胞向邻近细胞传递的级数(划痕线外每一列细胞表示 1 级),表示细胞 GJIC 的能力。

1.2.3 RT-PCR 检测缝隙连结蛋白 Cx43 和 Cx40 的表达

提取 HTFs 的总 RNA,并将其反转录为 cDNA,操作按说明书进行。PCR 同时扩增 Cx43 和 Cx40 与内参照 GAPDH,引物序列为:Cx43 (274bp): Forward: 5'-AGGTTCAAGCCTACTCAACTG-3'; Backward: 5'-TCITCCTTTCGCATCAGATA-3'。Cx40 (371bp): Forward: 5'-ATTGGAGCTTCTCGGAAAT-3'; Backward: 5'-CGGCTACTCGTAAGAGCCAG-3'。GAPDH (376bp): Forward: 5'-TCCATGACAACCTTGGCATCGTGG-3'; Backward: 5'-GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC-3'。反应体系为:10 × PCR buffer 5.0 μL, MgCl₂ (25mmol/L) 3.0 μL, dNTP_{mix} (2mmol/L) 5.0 μL, Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 引物各 1 μL, 加去离子水至 50 μL, 反应程序:94℃ 预变性 5min, 94℃ 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 最后 72℃ 延伸 7min, 共 30 个循环,将 PCR 产物用 15g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 免疫细胞化学法检测 Cx43 表达 用 DAB 显色法检测 HTFs 中 Cx43 的分布。将成纤维细胞爬片于盖玻片,待细胞长成单层,浸入 PBS (pH7.4) 洗 2 次;丙酮固定 5 ~ 10min, PBS 冲洗 3 次,加 1 滴 30mL/L 过氧化氢溶液,室温下孵育 10min,以阻断内源性过氧化氢酶的活性,PBS 冲洗 3 次,每次 3min,除去 PBS 液,加 1 滴第一抗体(兔抗人 Cx43),对照组滴加 PBS,室温下孵育 60min,PBS 冲洗 3 次,加 1 滴聚合物增强剂(试剂 A),室温下孵育 20min,PBS 冲洗 3 次,每次 3min,除去 PBS 液,加 1 滴酶标抗鼠/兔聚合物(试剂 B),室温下孵育 30min,PBS 冲洗 3 次,加一滴新鲜配制的 DAB 或 AEC 溶液,显微镜下观察至显色适中,立即用自来水冲洗,苏木素复染,自来水冲洗,PBS 返蓝,中性树胶封片固定,显微镜下观察拍照。

1.2.5 Western blot 检测 Cx43 的蛋白表达 实验方法按文献[2]操作。细胞总蛋白的提取:每瓶细胞加 3mL 4℃ 预冷的 PBS 洗 3 次,按 1mL 裂解液加 10 μL PMSF (100mmol/L),摇匀置于冰上。每瓶细胞加 400 μL 含 PMSF 的裂解液,于冰上裂解 30min,用刮棒将细胞刮于培养瓶的一侧,将细胞碎片和裂解液移至 1.5mL 离心管中。于 4℃ 下 12000r/min 离心 5min。将离心后的上清分装转移倒于 0.5mL 的离心管中放于 -20℃ 保存。取出上样样品至 0.5mL 离心管中,加入 5 × SDS 上样缓冲液,上样前要将样品于沸水中煮 5min 使蛋白变性。SDS-PAGE 电泳:配 10% 分离胶与 4% 的浓缩胶,分别加入 TEMED 后立即摇匀灌胶。将加样器针头插至加样孔中缓慢加入样品。电泳时间 4h,电压为 40V,电泳至溴酚兰刚跑出即终止电泳。转膜恒流 1mA/cm²,转移 1.5h。取膜做免疫印迹:将膜室温下脱色封闭 1h,将一抗用 TBST 稀释至适当浓度与膜蛋白面室温下孵育 1h 后, TBST 室温下脱色洗两次,每次 10min,再用 TBS 洗一次,10min。二抗孵育方法同一抗,室温下孵育 1 ~ 2h。然后化学发光、显影、定影。

2 结果

2.1 HTF 细胞培养 培养 9d 组织块长出典型的长梭形成纤维细胞,vimentin 免疫细胞化学染色鉴定,见长梭形 HTFs 呈均匀褐色着色,细胞突起清晰,胞核呈蓝色,表明细胞纯度高,无上皮细胞污染(图 1)。

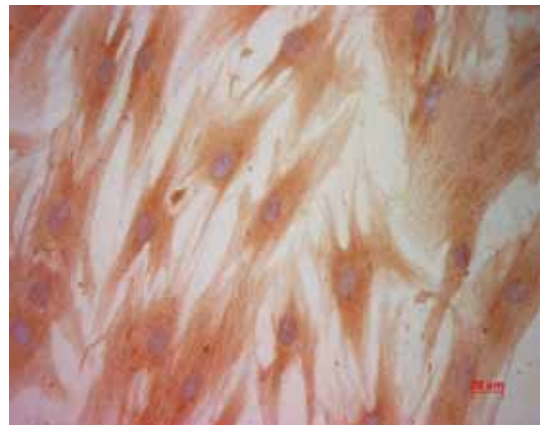


图 1 HTFs 中 vimentin 免疫细胞化学鉴定 (DAB × 400)。



图 2 锐刀划痕罗氏黄传输检测 HTFs 的 GJIC。

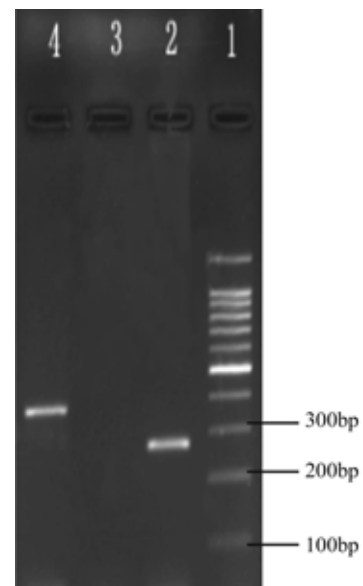


图 3 RT-PCR 检测 Cx43 和 Cx40 的表达 1: Marker; 2: Cx43 (274bp); 3: Cx40 未检测到表达; 4: 内参照 GAPDH (376bp)。

2.2 锐刀划痕罗氏黄荧光传输法检测 GJIC 功能的结果 结果显示:在划痕线以外,带荧光的 HTFs 清晰可见,染料可传输 6 级以上细胞(图 2)。

2.3 PCR 检测 Cx43 及 Cx40 的表达 扩增出 274bp 的 Cx43 与 376bp 的 GAPDH,未能扩增出 Cx40(图 3)。

2.4 免疫组织化学法检测 connexin43 表达 检测到 HTFs 中 Cx43 呈褐色颗粒状,分布于细胞膜,胞浆均匀淡染,胞核蓝染(图 4)。

2.5 Western blot 检测 Cx43 蛋白表达 经 Western-blot 检测,HTFs 中有 Cx43 蛋白的表达(图 5)。

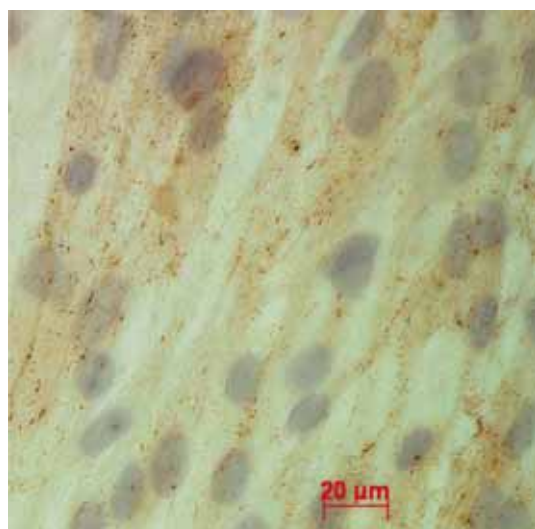


图4 HTFs 中 Cx43 免疫细胞化学检测 (DAB ×400)。

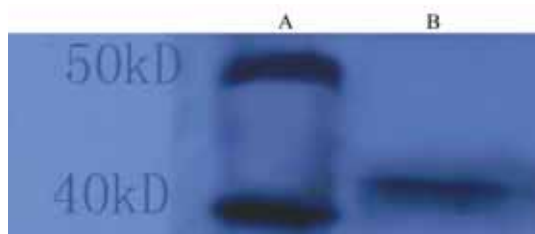


图5 Western blot 检测 HTFs 中 Cx43 的表达 A: Marker; B: HTFs 中 Cx43 表达。

3 讨论

缝隙连接在解剖上是细胞间的通道,它允许 1 000Da 或更小的分子通过,每个缝隙连接通道由两个细胞膜内被称为连接子(connexon)的由 6 个亚单位组成的六聚体构成,相临两个细胞各提供一个连接子,每个连接子由 6 个连接蛋白(connexins, Cx)组成,为结构蛋白家族成员。到目前为止,大约有 13 种不同的能够产生缝隙连接的 Cx 基因产物,其中 Cx43 是分布最广的连接蛋白^[3]。第二信使,如 cAMP, cGMP, Ca²⁺, 三磷酸肌醇(inositol triphosphate)以及某些营养物质,如葡萄糖、氨基酸、氧等在细胞间的流通均可通过缝隙连接通道实现^[4]。

缝隙连接是一门控通道,具有开放与关闭功能,酪氨酸磷酸化改变可影响通道构型并使缝隙连接通道开放,而外伤可使缝隙连接通道关闭以防止分子通过 GJIC 在细胞间传输,从而使未损伤细胞通过最大限度的减少与损伤细胞的耦联得以保持其完整性^[5], GJIC 通讯的终止使得未损伤细胞相对独立免受损伤、死亡细胞的影响,而且这一效应通过对 Cx43 在丝氨酸 368 的磷酸化而得以增强^[6]。鉴于在肉芽组织成熟过程中发生的细胞与结缔组织成分的多种变化,必然需要一种有效的细胞间通讯协作方式,一种可能的协同通讯方式就是 GJIC。然而,有关 GJIC 在创伤愈合中的协同作用报道甚少,而且研究的是皮肤愈合,在结膜下组织创伤愈合过程中起何作用目前尚未见报

道。以往的研究显示,缝隙连接存在于来源于创伤愈合的成纤维细胞,GJIC 能够优化成纤维细胞产生的胶原网的收缩。人皮肤瘢痕及瘢痕疙瘩的成纤维细胞间的 GJIC 明显减少,尤以后者显著。Moyer 等^[1]研究显示,GJIC 上调剂氯化锂(LiCl)能够使鼠皮下肉芽组织提前成熟,成纤维细胞密度明显低于对照组;相反 GJIC 解联剂(uncoupler),如庚醇(heptanol)、硫丹(endosulfan)注射到聚乙烯醇海绵植入体中,第 7d 囊腔内成纤维细胞密度增加,使穿入到海绵的细胞减少,肌成纤维细胞减少,偏振光下,发现解联剂减少了胶原的机化与沉积,进而打断了成纤维细胞在修复期间所呈现的协同表型变化,提出当肉芽组织成熟为瘢痕的过程中,GJIC 对于成纤维细胞从移行细胞到凋亡是非常重要的。另外有研究发现,体外培养的角膜基质成纤维细胞与肌成纤维细胞具有功能性的缝隙连接^[7],提示在创伤愈合过程中具有重要意义。

罗氏黄能够通过缝隙连接进行细胞间传输,因而被广泛用于 GJIC 的研究。本研究观察到 HTFs 有较强的 GJIC,荧光染料能够传输达 6 级细胞以上,并检测到其主要结构蛋白 Cx43 在 mRNA 与蛋白水平均有表达,同时免疫细胞化学还观察到 Cx43 呈颗粒状分布于细胞膜,以上研究提示 HTFs 具备较强的功能性 GJIC。至于在活体 HTFs 中 GJIC 功能、Cx43 的表达以及在结膜伤口愈合反应中起到什么样的作用,有待于进一步研究。青光眼滤过手术区成纤维细胞过度增殖导致的瘢痕化是手术失败的主要原因,通过 GJIC 调节剂对青光眼滤过术区成纤维细胞增殖进行干预,对于开辟调控瘢痕化新途径具有重要意义。

参考文献

- 1 Moyer KE, Davis A, Siggers GC, et al. Wound healing: the role of gap junctional communication in rat granulation tissue maturation. *Exp Mol Pathol* 2002;72(1):10-16
- 2 J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔(著), 黄培堂(译). 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社 2002:1723-1726
- 3 Oviedo-Orta E, Hoy T, Evans WH. Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood and tonsil human lymphocyte subpopulations. *Immunology* 2000; 99(4): 578-590
- 4 Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996;84(3):381-388
- 5 Parker SB, Hertzberg EL, Minkoff R. Modulation of gap junction mediated intercellular communication in embryonic chick mesenchyme during tissue remodeling *in vitro*. *Cell Tissue Res* 1994; 275(2): 215-224
- 6 Rhett JM, Ghatnekar GS, Palatinus JA, et al. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. *Trends Biotechnol* 2008;26(4):173-180
- 7 Spanakis SG, Petridou S, Masur SK. Functional gap junctions in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(8):1320-1328