论著

文章编号:1000-5404(2005)01-0012-04

体外培养的人脐静脉内皮细胞之间直接通讯的实验研究

刘运来,蔡文琴,姚忠祥,杨 忠,孙 榆 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 寻找人脐静脉内皮细胞之间的直接通讯的形态学证据。**方法** 本研究采用RT-PCR、免疫荧光染色、划痕负载染料迁移法等方法来研究培养的人脐静脉内皮细胞缝隙连接蛋白Cx43的表达情况以及染料负载迁移情况。**结果** RT-PCR方法证实体外原代培养的人脐静脉内皮细胞有缝隙连接蛋白Cx43的mRNA的表达,免疫荧光染色发现Cx43蛋白质主要位于胞膜上,少量位于胞浆中。用划痕负载染料迁移法发现,小分子量的荧光黄染料能在培养的人脐静脉内皮细胞之间互相传递,而大分子量的罗丹明染料则不能在细胞间自由扩散,荧光黄染料的传递是通过细胞间的缝隙连接来实现的。**结论** 该研究为人脐静脉内皮细胞之间直接通讯提供了新的形态学证据。

关键词: 人脐静脉内皮细胞;缝隙连接;直接通讯;划痕负载染料迁移

中图法分类号: R322.123; R329-33; R329.25 **文献标识码:** A

Direct communication between human umbilical vascular endothelial cells cultured *in vitro*

LIU Yun-lai, CAI Wen-qin, YAO Zhong-xiang, YANG Zhong, SUN Yu (Department of Histology & Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To find the morphological proof of direct communication between human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs). **Methods** mRNA and protein of connexin Cx43 in cultured HUVECs were detected by RT-PCR and immunofluorescence staining. Scrape-loading dye transfer method was used to display the direct communication between HUVECs. **Results** Cx43 mRNA was approved to express in cultured HUVECs by RT-PCR. Protein of Cx43, located mainly on the membrane of HUVECs, but a little in the cell plasma, was also revealed by immunofluorescence staining. In the Scrape-loading dye transfer experiment, a small molecular dye, Lucifer Yellow CH, was observed to migrate between HUVECs. However, the large molecular dye of Rhodamine could not migrate to any other none loaded HUVECs. Lucifer Yellow CH could not freely transverse cell membrane except *via* gap junction direct communication. **Conclusion** The results have provided the new morphological proof for direct communication between cultured HUVECs.

Key words: human umbilical vascular endothelial cell; gap junction; direct communication; Scrape-loading dye transfer

血管内皮细胞对血管各种功能的调控作用是通过内皮细胞之间以及内皮细胞与其它靶细胞之间复杂的细胞间通讯来完成的。内皮细胞的胞间通讯分为两种:一种是无特殊结构的胞间通讯,即内皮细胞通过自分泌和旁分泌内皮源性血管舒张因子、血管活性肽(vasoactive peptides, VPs)、生长因子等多种活性物质,作用于内皮细胞本身或邻近的其它靶细胞[1,2];另一种为有特殊结构的胞间通讯,也称为直接通讯,即内皮细胞通过细胞连接在内皮细胞之间及内皮细胞与血管平滑肌细胞、周细胞等之间传递信息,从而实现对血管的调控作用。内皮细胞之间存在紧密连接、缝隙连接、中间连接等多种细胞连接,其中缝隙连接能在相邻的细胞之间传递cAMP、Ca^{2+}、IP_3以及一些小分子肽等多种细胞内重要的信使分子,是实现细胞间直接通讯的主要结构,由缝隙连接介导的细胞间通讯称为缝隙连接细胞通讯。内皮细胞之间可能通过缝隙连接细胞通讯,构成一个功能上的整体,在血管张力、通透性、血管生成等多方面的调控中起重要作用,而且缝隙连接的损伤可能和动脉粥样硬化、缺氧再灌注损伤、内毒素损伤等相关[3,4]。内皮细胞的缝隙连接主要由Cx37、Cx40、Cx43 3种缝隙连接蛋白构成,用免疫电镜技术发现83%的缝隙连接由3种Cx共同组成[5]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670382)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39670382)
作者简介:刘运来(1971-),男,湖南省涟源市人,博士,讲师,主要从事神经发育、损伤以及无神经支配血管的调控机制方面的研究。电话:(023)68752229
通讯作者:蔡文琴,电话:(023)68752232
收稿日期:2004-11-15;修回日期:2004-12-06

有关无神经支配的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cell，HUVEC)之间的缝隙连接的研究报道较少，RT-PCR 方法证实 HUVEC 中有 Cx37、Cx40、Cx43 mRNA 的表达[6]，但鲜有文献报道 HUVEC 之间存在缝隙连接的解剖学证据，也鲜有 HUVEC 之间通过缝隙连接进行直接通讯的形态学证据的报道。本研究拟用免疫荧光、RT-PCR 方法检测缝隙连接蛋白 Cx43 在 HUVEC 中的表达情况，并用划痕负载染料迁移法检测培养的 HUVEC 能否通过缝隙连接进行直接通讯，为研究内皮细胞对无神经支配的脐血管的调控机制提供新的线索。

1　材料与方法

1.1　免疫荧光染色检测原代培养的 HUVEC 中 Cx43 蛋白质的表达

Cx43 单克隆抗体购自 Sigma 公司(美国)，染色采用间接免疫荧光法。

1.2　RT-PCR 检测原代培养的 HUVEC 中 Cx43 的 mRNA 表达

1.2.1　培养的 HUVEC 总 RNA 的提取　　HUVEC 原代培养于 50 ml 的培养瓶中，接种密度为 5×10^6/瓶。待细胞基本长满瓶底时终止培养。采用宝灵曼公司的总 RNA 纯化试剂盒提取细胞的总 RNA，操作方法参照其说明书。

1.2.2　逆转录　　采用 Promega 公司(美国)的 M-MLV 逆转录试剂盒，操作方法按照产品说明书进行。

1.2.3　PCR 扩增　　根据检索的文献并结合基因文库的检索结果，设计的 Cx43 引物序列为：正义 TAC CAC GCC ACC ACT GGC CCA，反义 ATT CTG GTT GTC GTC GGG GAA ATC。同时设计 β-Actin 作为 RT-PCR 的参照，β-Actin 引物序列为：正义 CAC CTT CAA GAA CCT CCA CTT CGG，反义 CGG CAG TGG CTG TAG TAG TAA. 上述引物均由上海 Sangon 公司合成，预计 Cx43 扩增片段长度为 292 bp，β-Actin 扩增片段为 546 bp。

PCR 反应：25 μl 反应体系中含 cDNA 2 μl，10 × buffer、15 mmol/L $MgCl_2$、4 种 dNTP 各 2.5 μmol/L，1 U 的 *Taq* DNA 多聚酶。每反应管中同时加入两对 Cx43 的引物和 β-Actin 的引物。反应在 PCR 仪中进行，95 ℃预变性 5 min，然后 95 ℃变性 1 min －56 ℃ 退火 50 s，－72 ℃延伸 50 s，共 35 个循环后在 72 ℃继续延伸 10 min，电泳鉴定 PCR 产物。

1.3　用划痕负载染料迁移法检测 HUVEC 之间能否通过缝隙连接进行直接通讯

HUVEC 原代培养于 20 mm × 20 mm 的盖玻片上，待细胞基本长满整个玻片后 3 d，取出玻片。用 37 ℃预热 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗去培养液，把盖玻片移入含罗丹明(Sigma 公司)、荧光黄(Lucifer Yellow CH，Sigma 公司)各 1 mg/ml 的复合染液中，用硬度合适的橡皮尖在玻片上横向和纵向各划 3 条线，37 ℃孵育 5 min，0.01 mol/L PBS 漂洗 1 min，然后在激光共聚焦显微镜下用双通道同时扫描，观察两种荧光染料的负载情况，来判断培养的 HUVEC 间能否通过缝隙连接来传递小分子物质。正常的细胞膜是选择性的半通透性膜，这两种荧光物质均不能通过正常细胞的细胞膜，只能在划伤的瞬间进入被划伤细胞内。细胞膜上的缝隙连接的孔径约 2 nm，允许分子量小于 $(1 \sim 1.5) \times 10^3$ 的小分子物质通过。荧光黄的分子量为 457，能通过缝隙连接传递给相邻的正常细胞，而罗丹明的分子量为 10×10^3，不能通过缝隙连接。故在激光共聚焦显微镜下观察，有罗丹明负载的细胞代表划伤的细胞，而那些没有罗丹明负载、只有荧光黄负载的细胞则代表由缝隙连接传递来的荧光黄负载细胞。

2　结果

2.1　免疫荧光染色检测培养的 HUVEC 中 Cx43 蛋白的表达

HUVEC 的 Cx43 染色结果，细胞膜上有较强的阳性着色，其在细胞膜的分布不均匀，可见斑块状的强阳性着色，胞浆中也有较弱的着色(图 1)。

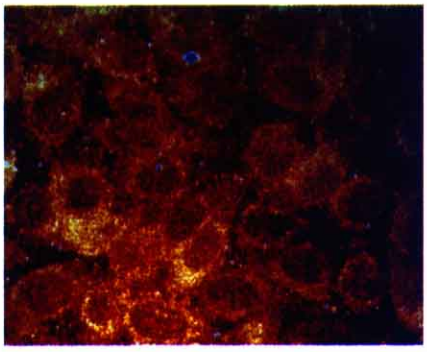


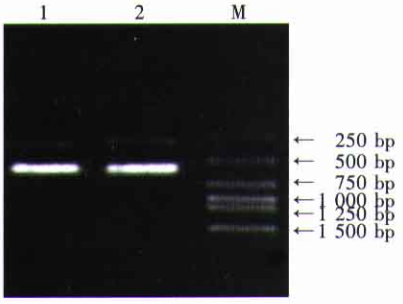
图 1　HUVEC 的 Cx43 免疫荧光染色，激光共聚焦显微镜分层扫描

Fig 1. Cx43 immunofluorescence staining in HUVECs (laser confocal microscope)

2.2　RT-PCR 检测 HUVEC 中 Cx43 mRNA 的表达

从原代培养的 HUVEC 中提取的总 RNA，经紫外分光光度计检测，其 OD 值大于 1.8，能满足逆转录的需求。

RT-PCR 的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后，在紫外下观察及照相。结果如图 2 所示，扩增产物中主要有两种片段，这两个片段的大小分别约为 300、550 bp，与设计引物时预计的 Cx43、β-Actin 的片段大小相符合，可见 RT-PCR 扩增是特异性的，HUVEC 中有 Cx43 的 mRNA 的表达。



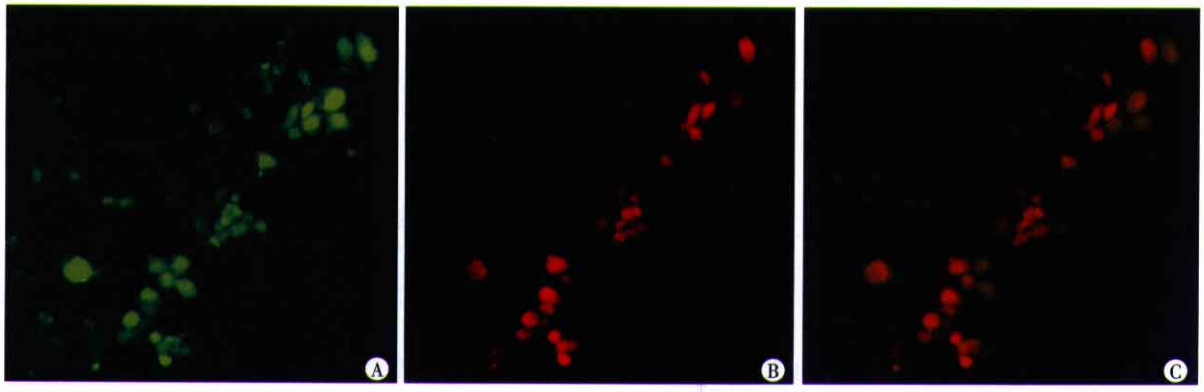
1,2: RT-PCR products of Cx43; M: Markers

图 2　Cx43 的 RT-PCR 电泳结果

Fig 2　Electrophoretic digram of RT-PCR

2.3 划痕负载染料迁移实验结果

划痕负载后5 min时，在激光共聚焦显微镜下同时扫描这两种荧光物质的分布，结果如图3所示，罗丹明负载阳性的细胞位于划痕中心，其细胞数量代表该视野中擦伤细胞的总数，这些细胞也大多数同时具有荧光黄负载。在划痕中心以外，有许多荧光黄负载阳性而罗丹明负载阴性的细胞，这些细胞中的荧光黄染料是由划伤细胞经缝隙连接传递来的。



A and B: Lucifer Yellow CH and Rhodamine positive cells; C: Overlapping figure of A and B

图3 划痕负载5 min时划痕中心HUVECs的染料负载情况

Fig 3 Diagrams of dye loaded HUVECs at 5 min after Scrape-loading dye transfer

在划痕负载15 min后观察，两种染料的分布模式和5 min时不同，如图4所示，擦伤中心的细胞可以分成3类：罗丹明负载、荧光黄负载、两者同时负载细胞。这些只有罗丹明负载的细胞的出现，可能是由于这些细胞中荧光黄染料已经全部转移给了其它细胞。

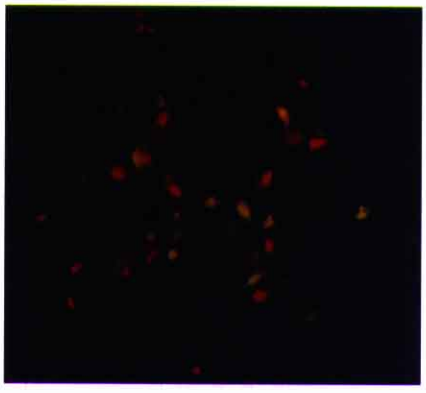


图4 划痕负载15 min后的两种染料负载情况

Fig 4 Diagram of dye loaded HUVECs at 15 min after Scrape-loading dye transfer

3 讨论

缝隙连接是一种特殊的细胞连接，相邻的细胞膜间通过连接子相互锚定，形成一个贯通两个细胞的水相通道，该通道能选择性开放或关闭，开放时允许分子量小于$(1\sim1.5)\times10^3$的物质通过，是细胞间直接通讯的结构基础，这种通过缝隙连接来实现的细胞间的直接通讯称为缝隙连接细胞通讯，这种通讯具有传导快、阻抗低、延搁时间短等特点。血管内皮细胞的缝隙连接不仅存在于内皮细胞与内皮细胞之间，而且存在于内皮细胞与平滑肌细胞、周细胞间。由于cAMP、Ca^{2+}、IP_3及一些小分子肽等多种细胞内的重要信使物质都能通过缝隙连接来传递，由缝隙连接介导的细胞间直接通讯在协调相邻内皮细胞的功能、调节细胞增殖和血管生成以及调节血管的张力等方面发挥着重要的作用。已经有文献报道，无神经支配的人脐血管的HUVEC中有Cx37、Cx40、Cx43的mRNA的表达，但鲜有文献报道HUVEC之间存在缝隙连接的解剖学证据，也鲜有HUVEC之间通过缝隙连接进行直接通讯的形态学证据的报道。

本研究中首先用免疫荧光染色检测HUVEC中Cx43蛋白的表达情况，结果显示在细胞膜上有较深的阳性着色，其在细胞膜的分布不均匀，可见斑块状的强阳性着色，胞浆中也有着色，说明HUVEC中有Cx43蛋白的表达，其分布主要在细胞膜上，其散在的斑块状的强阳性着色和缝隙连接的分布相符合，少数分布于胞浆中。然后提取HUVEC的总RNA，用采用RT-PCT方法检测HUVEC中Cx43 mRNA的表达，结果发现用Cx43的特异性引物确实可以扩增到其对应的片段，片段的大小和设计引物时估计的大小相符合，证实HUVEC中有Cx43的mRNA表达。

细胞间经缝隙连接的直接通讯虽然早已得到人们的普遍认同，但由于受到研究手段有限的限制，这种直接通讯的形态学研究往往难以进行。El等(1987)报道了一种简单快速的研究经缝隙连接的细胞间通讯的方法：首先采用划痕负载的方法使两种荧光染料进入划

痕细胞，一种是分子量为 457.2 的小分子物质荧光黄（Lucifer Yellow CH），另一种是分子量为 10×10^3 的大分子物质罗丹明，这两种物质都不能自由通过细胞膜进入正常细胞中去，只有在划痕瞬间由于细胞膜的通透性增加才能进入被划伤的细胞。荧光黄由于分子较小能通过缝隙连接中央的水相通道进入邻近的细胞中去，而罗丹明由于分子较大而只能停留在划伤负载的细胞中，故在划痕后不同时相观察两种荧光染料的分布情况，就可以判断细胞间经缝隙连接进行直接通讯的情况，这一方法用于缝隙连接的研究很快得到大家的认同[7,8]。

本研究中我们采用划痕负载染料迁移的方法观察培养的 HUVEC 间直接通讯情况，伤后 5 min 时观察两种荧光物质的分布，发现位于划痕中心的细胞，罗丹明和荧光黄负载均为阳性，这些细胞的数量代表该视野中划伤细胞的总数。在划痕中心以外，有许多荧光黄负载阳性而罗丹明负载阴性的细胞。我们知道，荧光黄由于其分子量小，能通过缝隙连接传递到相邻的细胞中去，而罗丹明则相反，故这部分细胞中的荧光黄染料只能是由划伤细胞经缝隙连接传递来的。伤后 15 min 时观察，荧光染料的分布和 5 min 相比，出现许多罗丹明负载阳性而荧光黄负载阴性的细胞，说明这些细胞中的荧光黄已经全部转移到其它细胞中。该结果为 HUVEC 通过缝隙连接进行细胞间直接通讯提供了重要的形态学的证据，也为内皮细胞对无神经支配血管的调控机制的研究提供了新的线索。

参考文献：

[1] LeCouter J, Ferrara N. EG-VEGF and Bv8, a novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function[J]. Trends Cardiovasc Med, 2003, 13(7): 276 - 282.
[2] Tilly N, Schneider J G, Leidig B G, *et al*. Endothelin-1 levels in patients with disorders of the thyroid gland[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2003, 111(2): 80 - 84.
[3] Li A F, Sato T, Haimovici R, *et al*. High glucose alters connexin 43 expression and gap junction intercellular communication activity in retinal pericytes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(12): 5376 - 5382.
[4] Gabriels J E, Paul D L. Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed[J]. Circ Res, 1998, 83(6): 636 - 43.
[5] Ko Y S, Yeh H I, Rothery S, *et al*. Connexin make-up of endothelial gap junctions in the rat pulmonary artery as revealed by immunoconfocal microscopy and triple-label immunogold electron microscopy[J]. J Histochem Cytochem, 1999, 47(5): 683 - 692.
[6] Van R H, Van K M, Analbers L J, *et al*. Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins[J]. Am J Physiol, 1997, 272(1 Pt 1): C117 - 130.
[7] Zhang X, Ren Z, Zuo J, *et al*. The effect of all-trans retinoic acid on gap junctional intercellular communication and connexin 43 gene expression in glioma cells[J]. Chin Med Sci J, 2002, 17(1): 22 - 26.
[8] Fernandes R, Girao H, Pereira P, *et al*. High glucose down-regulates intercellular communication in retinal endothelial cells by enhancing degradation of connexin 43 by a proteasome-dependent mechanism[J]. J Biol Chem, 2004, 279(26): 27219 - 27224.

（编辑 张大春）

文章编号：1000-5404(2005)01-0015-01

个案与短篇

双侧同时患 Bell 麻痹 1 例

Bilateral Bell palsy at the same time: a case report

桂 莉，李露斯，程先义 （第三军医大学西南医院神经内科，重庆 400038）

患者，男，14 岁，因双眼闭合不能 7 d 入院。表现为双眼闭目不能，双侧面颊滞食，饮水时双侧口角漏水。无面部麻木，视物成双，不伴饮水呛咳、声音嘶哑、吞咽困难。无发热、头痛、肢体活动障碍。入院查体：血压 105/66 mmHg，一般情况良好。神经系统体征：皱额、皱眉不能，双眼闭合不能，有 Bell 现象。双侧鼻唇沟消失，双侧口角松弛下垂，不能露齿、鼓腮、吹口哨。伸舌居中，张口时下颌无偏斜。双耳廓无疱疹，粗测听力正常，双侧软腭动度正常，咽反射存在。四肢肌肉无萎缩，四肢运动、感觉、反射未见异常，病例反射未引出。疲劳试验及新斯的明试验均为阴性。头颅 MRI：未见异常；脑电监测：儿童正常脑电图；听觉诱发电位：双侧听通路正常；瞬目反射：双侧面神经损害；脑脊液压力为 120 mmH_2O，常规及生化结果正常；血常规、肝肾功能均正常，五官科排除了中耳炎。入院后诊断为双侧 Bell 麻痹。经血管扩张剂、激素、维生素、神经营养药物等治疗，并配合局部理疗及针灸治疗 2 周后，患者双侧面瘫逐渐恢复，右侧额纹、鼻唇沟可见，左侧浅见，右眼能完全闭合，双面颊滞食消失，露齿时口角向右侧歪斜，面肌功能不同程度好转出院。第 4 周门诊随访，双侧额纹可见，双眼均能闭合，但左眼闭合力弱，双侧鼻唇沟可见，鼓腮无漏气。面瘫症状基本消失，面肌功能基本恢复。

（下转 19 页）

作者简介：桂 莉（1975 - ），女，重庆市人，硕士，主治医师，主要从事神经内科临床方面的研究。电话：(023)68754114-73070

收稿日期：2004-07-16；修回日期：2004-11-21