论著

文章编号:1000-5404(2005)16-1648-04

人骨髓间充质干细胞缝隙连接通讯功能的研究

宋晋刚[1],许建中[1],王序全[1],周 强[1],罗 飞[1],何清义[1],孙 玮[2] (第三军医大学:[1]西南医院骨科,全军矫形外科中心,[2]高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 研究人骨随间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)的细胞间缝隙连接通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)功能。**方法** 透射电镜观察细胞缝隙连接结构,应用荧光光漂白恢复(fluorescence redistribution after photobleaching, FRAP)技术,5,6-CFDA荧光负载hMSCs,激光淬灭细胞内荧光,通过激光共聚焦显微镜测定体外培养的hMSCs的GJIC功能。**结果** 细胞内荧光被淬灭后可通过缝隙连接通道恢复,hMSCs平均荧光漂白恢复率为(35.26±0.76)%。**结论** 缝隙连接是间充质干细胞间的重要通讯方式。

关键词: 细胞缝隙连接通讯;荧光光漂白恢复;间充质干细胞

中图法分类号: R322.71; R329.27 **文献标识码:** A

Study on gap junctional intercellular communication of human mesenchymal stem cells

SONG Jin-gang[1], XU Jian-zhong[1], WANG Xu-quan[1], ZHOU Qiang[1], LUO Fei[1], HE Qing-yi[1], SUN Wei[2] ([1]Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, [2]Department of Center Laboratory, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine the gap junctional intercellular communication (GJIC) of human mesenchymal stem cells (hMSCs). **Methods** The third generation human mesenchymal stem cells were used to observe the structure of gap junction by transmission electron microscope (TEM). The method of fluorescence redistribution after photobleaching (FRAP) was used to evaluate the functions of GJIC through a laser scanning confocal mircroscope. **Results** The cellular fluorescence could transport from neighboring hMSCs through gap junctions. The mean fluorescence recovery rate of hMSCs was (35.26±0.76)%. **Conclusion** Gap junctional intercellular communication was the important communication among human mesenchymal stem cells.

Key words: gap junction intercellular communication; fluorescence redistribution after photobleaching; mesenchymal stem cells

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是存在于骨髓基质系统中一种具有多向分化潜能的干细胞,可以向多种结缔组织及部分来源于外胚层的组织分化,形成骨、软骨、骨骼肌、肌腱、韧带、真皮、脂肪和骨髓基质,也可分化成神经系统的神经元和神经胶质细胞[1~3]。由于取材方便、来源充足、创伤小;并且细胞处于低分化状态、免疫原性低、增殖能力强、能够在体外大规模培养扩增,因此MSCs成为目前骨组织工程构建的重要种子细胞。我们实验室关于hMSCs的生物学特性已经做了较多研究[4,5],为了更全面地了解hMSCs的结构与功能,我们应用荧光漂白恢复(fluorescence redistribution after photobleaching, FRAP)技术检测体外培养的hMSCs的细胞间缝隙连接通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Percoll液(Sigma,美国),DMEM/F12(1:1)培养基(Hyclone美国),胎牛血清(Hyclone,美国),5,6-羟基荧光素乙酸乙酰盐(5,6-CFDA,Sigma,美国)。5,6-CFDA溶于二甲亚砜(DMSO)中配成1 g/L储备液,-20 ℃储存,负载时用PBS稀释成10 μg/ml。

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助重大攻关课题("863"计划)(2003-AA205020),西南医院科技创新基金资助项目(2002-15)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020) and the Research Funds for Innovaiton of Southwest Hospital of Third Military Medical University (2002-15)

作者简介: 宋晋刚(1976-),男,四川省西昌市人,硕士研究生,医师,主要从事骨组织工程和脊柱外科方面的研究。电话:(023)65398052,E-mail:sjgfelix@163.com

通讯作者: 许建中,电话:(023)68754164,E-mail:XJzsw@hotmail.com

收稿日期: 2005-01-30;**修回日期:** 2005-06-24

1.1.2　主要仪器　　激光共聚焦显微成像仪（Leica TCSNT，德国），TECNAI-10 透射电镜（PHLIP，荷兰）。

1.2　方法

1.2.1　hMSCs 的分离培养　　无菌抽取 20～30 岁健康自愿者两侧髂骨骨髓 5～10 ml，肝素抗凝。用 1.073 g/ml 的 Percoll 液梯度离心，以 $5\times10^5/cm^2$ 接种于培养瓶，加含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液，置 37 ℃，5% CO_2 饱和湿度培养箱内培养。待细胞融合成单层铺满瓶底 80%，以 0.25% 胰蛋白酶消化，按 1∶3 传代，用含 10% 胎牛血清的培养液继续培养。

1.2.2　缝隙连接超微结构观察　　收集第 3 代 hMSCs，消化离心，PBS 洗涤 2 次，2.5% 戊二醛固定。梯度丙酮脱水，环氧树脂包埋，常规超薄切片，醋酸双氧铀及枸橼酸铅双染色，在透射电镜下观察细胞超微结构，寻找缝隙连接。

1.2.3　荧光负载细胞　　将第 3 代 hMSCs 以 $1\times10^4/cm^2$ 接种于预先放置 20 mm×20 mm 玻片的 6 孔培养板中进行细胞爬片。取出贴壁单层生长至 70 %～80 % 融合的细胞玻片，PBS 漂洗 2 次，加入 10 μg/ml 的 5，6-CFDA，置于 37 ℃、5 % CO_2 培养箱中孵育 10～15 min。用 PBS 液洗掉细胞外多余的 5，6-CFDA，以保证背景纯净。将贴附有细胞的玻片放入直径 2 cm 的碟形小室中，加入少量不含血清的培养基，上机进行检测。

1.2.4　实验细胞的选择　　实验中选择 3 种细胞：第 1 种是与周围其他细胞紧密连接的细胞，需用激光去淬灭，他们之间存在缝隙连接通讯，是实验数据的来源，其荧光漂白恢复程度反映细胞间缝隙连接通讯功能的强弱；第 2 种是孤立的细胞，与周围其它细胞相分离，不存在缝隙连接通讯，用作实验自身对照；第 3 种是周围与其它细胞紧密连接的，但不需要激光淬灭的细胞，因为荧光物质即使在无激光照射下，也有自身的荧光漂白作用，选择作为背景校正。

1.2.5　激光淬灭荧光　　淬灭的激光能量为 500 mW，漂白脉冲时间 200 ms，计算机精确定位后，发射激光束对选定细胞内的荧光进行淬灭。激光漂白后每 20 秒扫描摄像 1 次，获取扫描图像共 12 帧，得到漂白细胞荧光的恢复及相邻接触的未漂白细胞荧光的变化情况，观测被激光淬灭的间充质干细胞内荧光强度动态恢复过程和最终恢复水平。

1.2.6　计算荧光恢复率　　荧光恢复率 Kt = (Ib - Ib0)/(Iu - Iu0) ×100 %，其中 Iu = 相邻未漂白细胞在 t 时间的荧光强度，Iu0 = 淬灭瞬间背景荧光强度，Ib = 漂白细胞在 t 时间的荧光强度，Ib0 = 淬灭瞬间的荧光强度[6]。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 1.0 统计软件行自身配对 t 检验。

2　结果

2.1　缝隙连接超微结构观察

透射电镜下观察到 hMSCs 核质比例较小，胞质内有丰富的细胞器，如线粒体、粗面内质网、高尔基体等，反应出 hMSCs 作为一种成体干细胞，生长功能旺盛，分化程度低的特性。相邻细胞间可以看见一些细胞膜局部电子密度增高的缝隙连接结构（图 1）。

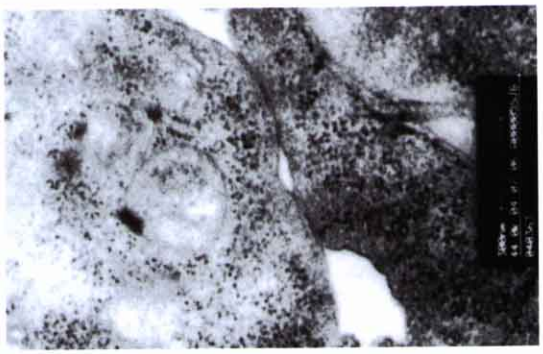


图 1　透射电镜下观察到的相邻细胞间缝隙连接　（TEM ×27 000）

Fig 1　The gap junction between the conjugated hMSCs　（TEM ×27 000）

2.2　荧光负载细胞形态观察

荧光显微镜下观察经 5，6-CFDA 标记的间充质干细胞呈单层贴壁生长，长梭形，细胞呈编织状排列，胞核与胞浆均匀负载绿色荧光，背景纯正，无绿色荧光（图 2A，3A）。

2.3　单个 hMSCs 荧光恢复情况

选择孤立存在的间充质细胞，经瞬间激光淬灭后，细胞内（箭头标记）荧光强度明显减弱（图 2B）。随着时间的推移，细胞内荧光强度几乎没有恢复（图 2C）。

2.4　相邻 hMSCs 荧光恢复情况

选择相邻的间充质细胞，经瞬间激光淬灭后，细胞内（箭头标记）荧光强度明显减弱（图 3B）。随着时间的推移，细胞内荧光强度逐渐恢复，至 4 min 时，可见荧光强度恢复到一定水平并趋于稳定（图 3C）。

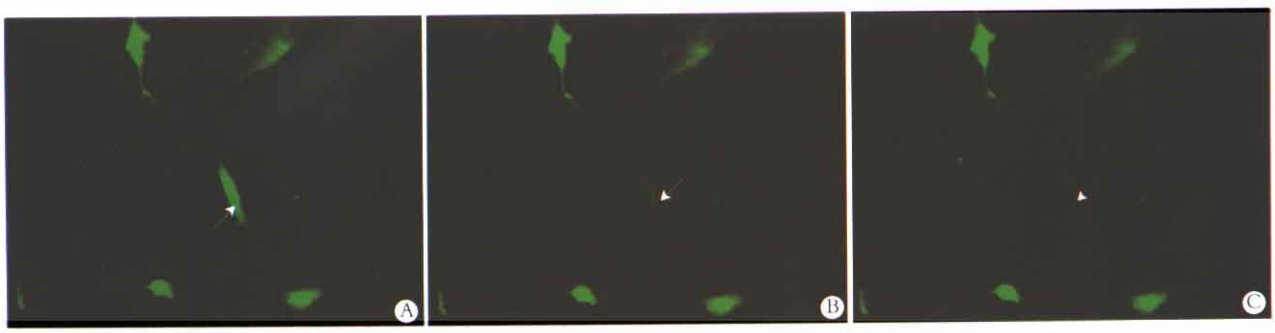


图 2　单个 hMSCs 荧光漂白前（A）及漂白后瞬间（B）和 4 min 时（C）的荧光恢复情况　（×200）

Fig 2　The fluorescence redistribution of the single hMSC before fluorescence bleaching (A), immediately (B) and in 4 min (C) after photobleaching　（×200）

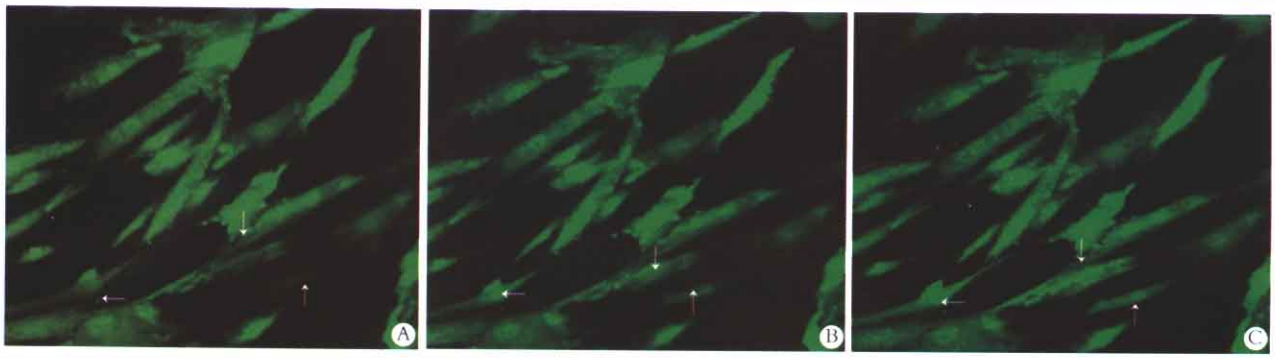


图3 相邻 hMSCs 荧光漂白前(A)及漂白后瞬间(B)和 4 min 时(C)的荧光恢复情况 (×200)

Fig 3 The fluorescence redistribution of conjugated hMSCs before fluorescence bleaching (A), immediately (B) and in 4 min (C) after photobleaching (×200)

2.5 荧光恢复率的计算

根据测定数据分析计算,孤立 hMSCs 平均荧光恢复率为(6.5 ± 0.63)%,相邻 hMSCs 平均荧光恢复率为(35.26 ± 0.76)%,二者比较有显著性差异($P<0.05$)(表1)。用分析软件作曲线拟合图,相邻 hMSCs 组荧光漂白恢复率显著高于孤立 hMSCs 组。

表1 孤立组与相邻组 hMSCs 平均荧光恢复率比较 ($\bar{x}\pm s$, %)

Tab 1 The mean fluorescence recovery rate in isolated hMSCs and conjugated hMSCs ($\bar{x}\pm s$, %)

Group	Number of cells	Mean fluorescence recovery rate
Isolated hMSCs	40	6.50 ± 0.63
Conjugated hMSCs	40	35.26 ± 0.76 *

*: $P<0.05$, *vs* Isolated hMSCs

3 讨论

缝隙连接(gap junction, GJ)是相邻细胞间的膜通道结构,可非选择性通过小于1 000 ~ 1 500的小分子如 cAMP、Ca^{2+}、三磷酸肌醇(IP_3)及核苷的磷酸化产物,但不允许蛋白和核酸通过,这些第二信使物质对于细胞的信号转导以及生理功能有重要影响。电镜下对 MSCs 进行超微结构观察,在相邻细胞间可见到一些细胞膜局部电子密度增高、细胞膜内颗粒相互融合的缝隙连接[7]。缝隙连接不仅是相邻细胞间的一种连接结构,更重要的是一种通讯结构,调控信息可以通过它在细胞间进行传递。缝隙连接细胞间通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)是相互接触的相邻细胞间的一种信息通讯,在维持细胞间信息的传递,调节细胞增殖、分化及维持组织内环境的稳态等过程中起着十分重要的作用[8,9]。在胚胎发育中,胚胎细胞这种连接较多,只有解除这种细胞耦联后,才能分别分化形成不同的细胞和组织,而分化成熟的细胞少有此种连接,因此 MSCs 间缝隙连接揭示 MSCs 有分泌生长因子的能力,其增殖能力旺盛,分化程度很低。

对于功能性 GJIC 的研究,有电耦合技术、细胞代谢协同作用实验、划痕标记染料示踪技术(scrape loading dye transfer assay, SLDT)及微注射荧光染料传递(microinjection and dye transfer assay, MDTA)等技术用于检测 GJIC 功能。但这些方法不仅操作繁琐,难度大,结果欠精确;而且会对细胞膜造成损伤,影响细胞活性,从而影响实验结果的准确性与可信性。荧光光漂白恢复技术(fluorescence redistribution after photobleaching, FRAP)与激光扫描共聚焦显微镜相结合,可以定量检测缝隙连接所介导的细胞间通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)功能[10]。FRAP 技术将待测细胞从表面用荧光物标记,根据被漂白细胞内荧光强度恢复程度对细胞间 GJIC 进行评估。荧光染料 5,6-CFDA 对细胞无毒性,有较强的膜通透性,本身不发荧光,进入细胞后被多种非特异性酯酶分解成代谢产物 5,6-CFDA。带电荷的水解产物可被 488 nm 的激光激发出黄绿色荧光,且无膜通透性,因此荧光物质进入细胞后无法通过细胞膜外溢,只有通过细胞间缝隙连接通道才能相互交换[11]。由于光漂白过程是不可逆的,荧光恢复过程可准确地反映荧光标记物的运动。对细胞内荧光强度进行定时定量监测,从而准确反应细胞的 GJIC 功能情况。

我们通过实验发现,相邻 hMSCs 平均荧光恢复率为(35.26 ± 0.76)%,GJIC 功能比较强,提示 hMSCs 作为一种成体干细胞,细胞间通讯功能活跃,有很强的增殖、分化潜能。

参考文献:

[1] Deng W, Obrocka M, Fischer I, *et al*. *In vitro* differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 282(1): 148 - 152.

[2] Minguell J J, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells[J]. Braz J Med Bol Res, 2000, 33(8): 881-887.
[3] Deng W, Obrocka M, Fischer I, *et al*. *In vitro* differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclica AMP[J]. Biochem Biophys Res commun, 2001, 282(1): 148-152.
[4] 朱 灏, 许建中, 周 强, 等. 不同年龄人骨髓间充质干细胞体外增殖成骨分化的研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2004, 12(10): 759-761.
[5] 宋晋刚, 许建中, 周 强, 等. 不同频率脉冲电磁场诱导人骨髓间充质干细胞成骨分化的研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(3): 134-137.
[6] Reits E A, Neefjes J J. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(6): E145-E147.
[7] 路艳蒙, 傅文玉, 朴英杰, 等. 人骨髓间充质干细胞的超微结构[J]. 电子显微学报, 2002, 21(4): 373-376.
[8] Gramsch B, Gabriel H D, Wiemann M, *et al*. Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line[J]. Exp Cell Res, 2001, 264 (2): 397-407.
[9] Krutovskikh V A, Troyanovsky S M, Piccoli C, *et al*. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth *in vivo*[J]. Oncogene, 2000, 19(14): 505-513.
[10] Schindler M, Trosko J E, Wade M H. Fluorescence photobleaching assay of tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate inhibition of cell-cell communication[J]. Methods Enzymol, 1987, 141 (3): 439-447.
[11] Carruba G, Webber M M, Bello Deocampo D, *et al*. Laser scanning analysis of cell-cell communication in cultured human prostate tumor cells[J]. Anal Quant Cytol Histol, 1999, 21(1): 54-58.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2005)16-1651-01

个案与短篇

一起麻疹暴发的调查报告

A survey of an outbreak of measles

郑永兰[1],何普英[2] ([1]江北区疾病预防控制中心,重庆 400020; [2]大渡口区疾病预防控制中心,重庆 400080)

2005年2月,J区W镇发生一起麻疹暴发疫情。自2月16日至3月25日,共确诊麻疹患者48例。接到报告后立即组织调查处理,现将调查结果报告如下。

1 调查方法

由流行病学专业技术人员为主组成调查组奔赴疫区,开展现场调查。对所有病人进行个案调查分析及其流行病学特征,对部分人员进行采血化验。

2 结果

2.1 一般情况

我区农村地区面积辽阔,农村人口约10万,主要集中在Y、F、W等3镇。W镇有1所中心小学、4所村小、1所中学,学生大约1 300名,散居儿童258名,共计1 528名。Y镇9所村小学、1所中学、1所职高和1所托幼园,学生大约3 160人。此次调查共发现49人患有麻疹,总体罹患率为1.05%,无死亡病例。

2.2 分布特征

2.2.1 时间分布 2月16日出现首例病例,末例在4月15日,在2月22日至3月14日出现第1个高峰期,3月14日至4月8日出现第2个发病高峰。至3月25日,共确诊麻疹患者49例。

2.2.2 地区分布 患者主要集中在J区W、Y两镇,分别是48例和1例,前者疾病罹患率为3.14%,后者为0.03%,有明显统计学差异($\chi^2=96.3$, $P<0.01$)。97.96%的患者集中在W镇。

2.2.3 人群分布 患者均为小学生,W镇48名病例中男性23名(47.9%),女性25名(52.1%),患者性别上无明显差异($P>0.05$)。各年龄发病情况见表1,10、12岁和13岁为高发年龄。

表1 W镇麻疹发病年龄、性别分布情况

年龄(岁)	发病数	构成比(%)	性别	
			男	女
8岁	1	2.1	1	0
10岁	13	27.0	8	5
11岁	4	8.3	2	2
12岁	14	29.2	4	10
13岁	14	29.2	7	7
14岁	1	2.0	1	0
15岁	1	2.0	0	1
合计	48	100.0	23	25

作者简介:郑永兰(1955-),女,重庆市人,硕士,副主任医师,主要从事传染性疾病的预防与治疗方面的研究。电话:(023)89186315

收稿日期:2005-06-03;修回日期:2005-07-25

(下转1655页)