文章编号:1000-5404(2008)07-0561-03

论著

豚鼠膀胱组织ICCs细胞间隙连接蛋白Connexin 43表达意义

鄢俊安,卢根生,李龙坤,宋 波 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨体外培养豚鼠膀胱组织ICCs细胞(interstitial cells of Cajal,ICCs)间隙连接蛋白Connexin 43的表达。方法 胶原酶消化法进行豚鼠膀胱组织ICCs细胞的原代培养,对照为原代培养膀胱平滑肌细胞,免疫荧光法进行两种细胞的特征性蛋白c-kit及平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin,SMA)染色观察,免疫荧光法及Western blot法进行培养细胞Connexin 43的检测。结果 豚鼠膀胱ICCs细胞特征性蛋白c-kit染色阳性,SMA染色阴性。豚鼠膀胱ICCs细胞间隙连接蛋白Connexin 43表达水平较高,显著高于膀胱平滑肌细胞。结论 豚鼠离体膀胱ICCs细胞间隙连接蛋白Connexin43高表达可能是其信号传递的重要物质基础。

关键词:Cajal间质细胞;间隙连接蛋白;膀胱
中图法分类号:R322.62;R329.26;R394.2 文献标识码:A

Connexin 43 expression in cultured interstitial cells of Cajal from guinea pigs

YAN Jun-an, LU Gen-sheng, LI Long-kun, SONG Bo (Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression of connexin 43 in the interstitial cells of Cajal (ICCs) from guinea pig bladder *in vitro*. Methods Bladder ICCs were primarily cultured from guinea pigs by collagenase digestion method. Primarily cultured bladder smooth muscle cells (SMCs) from guinea pig were taken as control. The expressions of c-kit and smooth muscle actin (SMA) were detected by immunofluorescent method. Immumofluorescent method and Western blotting were used to detect the expression of Connexin 43 in 2 groups of cells. Results The expression of c-kit was positive in ICCs but negative in the control group. On the contrary, the expression of SMA was negative in ICCs but positive in the control group. Connexin 43 expression was significantly higher in ICCs than that in the control group ($P<0.01$). Conclusion High expression of connexin 43 might be the important for the signal transmission in bladder ICCs of guinea pigs.

Key words: interstitial cells of Cajal; gap junction protein; bladder

Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal,ICCs)是一种首先在胃肠道组织中发现的特殊间质细胞[1],在豚鼠和人逼尿肌上同样存在与胃肠组织ICCs类似的膀胱间质细胞,对膀胱平滑肌细胞组织基本电节律形成、神经信号传导调控、信号整合等起重要作用[2]。膀胱ICCs细胞功能改变可能与某些膀胱动力障碍性疾病的发病有关,目前已成为国际尿动力方面研究的热点。间隙连接是相邻细胞形成的小孔或通道,可以让信号分子在细胞之间通过,是一种重要的细胞间信号传递结构[3]。Connexin 43是一种比较常见的细胞间隙连接蛋白,在多种组织中起重要的生物学信息传递作用。本研究通过胶原酶消化法获取膀胱ICCs细胞,观察膀胱离体ICCs细胞间隙连接蛋白Connexin 43的表达,为探讨ICCs细胞在膀胱功能中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

20只健康雌性豚鼠,体质量250~300 g,3~4月龄,购自第三军医大学实验动物中心。恒温细胞培养箱(Heraeus公司),荧光显微镜(Leica公司),胶原酶P(Roche公司),重组干细胞因子(SCF,R&D公司),羊抗鼠c-kit多克隆抗体(santa cruz公司),兔抗鼠SMA单克隆抗体(santa cruz公司),羊抗鼠Connexin 43抗体(santa cruz公司),高糖DMEM培养基(Gibco

基金项目:国家自然科学基金(30700270)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30700270)
作者简介:鄢俊安,男,湖北省黄石市人,博士研究生,主治医师,主要从事排尿功能障碍性疾病的基础及临床方面的研究。电话:(023)68753866
通信作者:宋 波,电话:(023)68754186,E-mail:songb-mr@sina.com
收稿日期:2007-12-05;修回日期:2008-02-04

公司),标准胎牛血清(HyClone 公司)。

1.2 细胞培养及鉴定方法

1.2.1 豚鼠膀胱 ICCs 细胞体外培养 断颈处死动物后,取出膀胱,解剖显微镜下剔除黏膜层和浆膜层,剪成 1 mm×1 mm×1 mm 的小块,0.2% 胶原酶 P 消化 30~45 min 制成细胞悬液,以 10^5/ml 的密度接种于培养皿中并按照 50 ng/ml 加入重组 SCF,37℃、5% CO_2 培养箱中静置培养。细胞培养第 2 天,可见胞体为梭形并有 2~3 个细胞突起的细胞贴壁,而平滑肌细胞并没有贴壁,将未贴壁的平滑肌细胞转移,余下的贴壁细胞继续培养至 3 d 后。

1.2.2 豚鼠膀胱平滑肌细胞体外培养 按文献[4]方法进行。

1.2.3 培养细胞 c-kit 及 SMA 免疫荧光染色鉴定 将培养于盖玻片上的两组细胞分别于贴壁后 3 d 用 4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,一抗(c-kit 及 SMA)4 ℃孵育过夜(1∶200),PBS 漂洗 3 次后加二抗(c-kit 用 FITC 标记的二抗,SMA 用 TRITC 标记的二抗)室温孵育 1 h(1∶200),PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,显微镜下观察。

1.3 Connexin 43 表达检测

1.3.1 培养细胞 Connexin 43 免疫荧光检测 将培养于盖玻片上的两组细胞分别于贴壁后 3 d 用 4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,Connexin 43 抗体(1∶200)4 ℃孵育过夜,PBS 漂洗 3 次后加二抗(FITC 标记,1∶200)室温孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,激光共聚焦显微镜下观察。

1.3.2 Western blot 检测 Connexin 43 水平 将培养于盖玻片上的两组细胞分别于贴壁后 3 d 常规方法提取培养细胞总蛋白,Lowry 法检测蛋白浓度,取 10 μg 的蛋白,用 10% 聚丙烯酰胺胶作 SDS-PAGE,常规的方法做免疫印迹分析,含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 缓冲液封闭,Connexin 43 抗体(1∶2 000)、二抗(1∶5 000)分别与膜孵育,发光法显色,扫描条带,用 Quantity One 软件测定目的条带积分光密度,将 5 次实验结果的平均值作为蛋白含量的相对值。

1.4 统计学方法

荧光强度数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 培养细胞 c-kit 及 SMA 免疫荧光染色结果

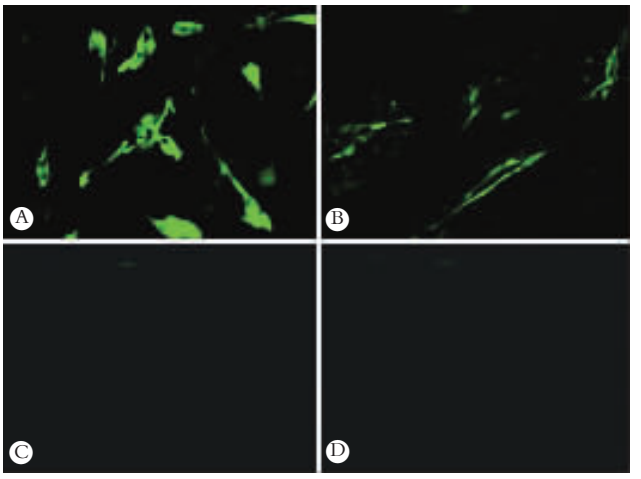
胶原酶消化后 ICCs 细胞于 1 d 内贴壁生长,细胞呈长梭形或纺锤形,可见分枝突起,排列不规则。豚鼠膀胱 ICCs 细胞 c-kit 染色阳性,SMA 染色阴性,膀胱平滑肌细胞 c-kit 染色阴性,SMA 染色阳性。

2.2 培养细胞 Connexin 43 免疫荧光检测

ICCs 组 Connexin 43 表达阳性,平滑肌细胞组可见少量细胞 Connexin 43 弱表达,见图 1。统计表明,ICCs 组 Connexin 43 表达积分光密度(54 789±6 548)显著高于平滑肌细胞组(4 256±369)($P<0.01$)。

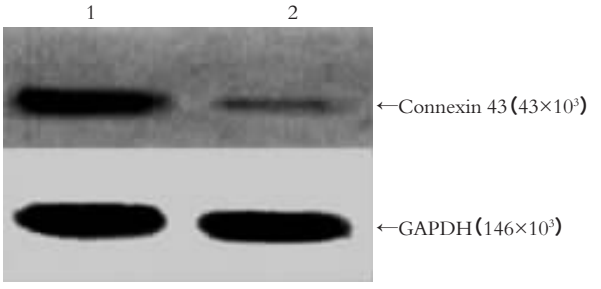
2.3 培养细胞 Connexin 43 蛋白水平 Western blot 检测结果

结果显示,ICCs 组细胞 Connexin 43 表达(Connexin 43/GAPDH=0.698)显著高于平滑肌细胞组(Connexin 43/GAPDH=0.098)($P<0.01$)。见图 2。



A:ICCs 组;B:平滑肌细胞组;C:ICCs 组阴性对照;D:平滑肌细胞组阴性对照

图 1 培养细胞 Connexin 43 免疫荧光检测结果 (激光共聚焦显微镜×400)



1:ICCs 组;2:平滑肌细胞组

图 2 培养细胞 Connexin 43 Western blot 检测结果

3 讨论

本研究结果表明,体外培养的膀胱 ICCs 细胞呈长梭形或纺锤形,可有分枝突起,排列不规则。c-kit 是位于质膜上的一种酪氨酸激酶生长因子受体,有研究表明,c-kit 是 ICCs 细胞特征性标志物[5]。本研究进行了豚鼠膀胱 ICCs 细胞的原代培养,为鉴定其获取 ICCs 细胞的准确性,避免混有膀胱平滑肌细胞,应用 c-kit 抗体和 SMA 进行免疫荧光染色,结果表明,获取的豚鼠膀胱 ICCs 细胞 c-kit 染色阳性,SMA 染色阴性,膀胱平滑肌细胞 c-kit 染色阴性,SMA 染色阳性。说明所获取的细胞是 ICCs 细胞,排除了膀胱平滑肌细胞的可能。

细胞与细胞之间的连接结构为细胞连接(cell junction),体积很小,只有在电镜下才能观察到[6]。细胞连接可分为 3 大类:封闭连接、锚定连接(anchoring junction)和通讯连接(communicating junction)。间隙连接(gap junction)是通讯连接的一种主要方式,其主要功能是介导细胞和细胞之间的信息传递,间隙连接由相邻细胞膜上 2 个连接子相连而成,而每个连接又

由 6 个蛋白亚单位-连接蛋白（connexin，Cx）构成。间隙连接负责细胞间功能和代谢的协调，离子、代谢产物以及一些第二信使（cAMP，Ca^{2+}，IP_3）及其他参与细胞生长分化的调节性物质可通过细胞间隙连接发挥作用[7,8]。本课题研究豚鼠膀胱 ICCs 细胞 Connexin43 的表达，结果表明，豚鼠膀胱 ICCs 细胞 Connexin 43 蛋白表达水平较高，而膀胱平滑肌细胞 Connexin 43 蛋白表达水平较低，说明豚鼠膀胱 ICCs 细胞具有参与神经信号传递的功能。

膀胱 ICCs 细胞具有重要的生理功能，分离培养及鉴定豚鼠膀胱 ICCs 细胞是本课题研究的第一步，Connexin43 表达研究为膀胱 ICCs 细胞膀胱功能调节研究积累了基础，Connexin 43 与 ICCs 细胞电生理特性之间的关系，在膀胱功能性障碍中的变化等还有待进一步的观察与探讨。

参考文献：

[1] Metzger R，Schuster T，Till H，*et al*. Cajal-like cells in the human upper urinary tract [J]. J Urol，2004，172(2)：769 - 772.

[2] Popescu L M，Gherghiceanu M，Cretoiu D，*et al*. The connective connection：interstitial cells of Cajal (ICCs) and ICC-like cells establish synapses with immunoreactive cells. Electron microscope study *in situ* [J]. J Cell Mol Med，2005，9(3)：714 - 730.

[3] Tong D，Li T Y，Naus KE，*et al*. *In vivo* analysis of undocked connexin43 gap junction hemichannels in ovarian granulosa cells[J]. J Cell Sci，2007，120(Pt 22)：4016 - 4024.

[4] 周逢海，王养民，宋　波，等. 膀胱逼尿肌细胞的培养及鉴定[J]. 西北国防医学杂志，2006，27(1)：5 - 7.

[5] Davidson R A，McCloskey K D. Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder：structural relationships with smooth muscle and neurons [J]. J Urol，2005，173(4)：1385 - 1390.

[6] Niessen C M. Tight junctions/adherens junctions：basic structure and function [J]. J Invest Dermatol，2007，127(11)：2525 - 2532.

[7] Eugenin E A，Berman J W. Gap junctions mediate human immunodeficiency virus-bystander killing in astrocytes[J]. J Neurosci，2007，27(47)：12844 - 12850.

[8] Cina C，Bechberger J F，Ozog M A，*et al*. Expression of connexins in embryonic mouse neocortical development[J]. J Comp Neurol，2007，504(3)：298 - 313.

（编辑　王　红）

（上接 557 页）

2.2　疾病进展时间（TTP）和生存期（OS）

C 组 TTP 1.9 ~ 12.6 个月，中位 TTP 8.1 个月，平均生存期为 18.6 个月。F 组 TTP 2.1 ~ 10.3 个月，中位 TTP 7.8 个月，平均生存期为 17.7 个月，2 组 TTP 和 OS 无显著差异。

2.3　毒性反应

2 组患者毒性反应主要有：可逆性胃肠道反应、骨髓功能抑制和周围神经毒性反应，此外还可见肝功能异常、乏力及短暂血压升高。2 组病例主要毒性反应相似，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

3　讨论

近年来 CapeOX 方案一线治疗转移性结直肠癌的临床试验结果均显示其在有效率及安全性方面的改善。CapeOX 方案治疗老年转移性结肠癌Ⅱ期临床研究证实，口服化疗药物卡培他滨在活性、毒性反应方面与 5-FU 静脉持续点滴均非常相似[2-4]，但可避免静脉导管的置入，消除静脉插管引起的并发症，从而改善患者的生活质量。Cassidy 等[5] 一组前瞻性的研究表明，CapeOX 方案作为一线方案治疗转移性结肠癌总有效率达 55%，中位 TTP 和中位 OS 分别为 7.7 个月和 19.5 个月，疗效及安全性方面与 FOLFOX 方案相似。卡培他滨联合奥沙利铂治疗转移性结直肠癌可取得与 FOLFOX4 方案相似的疗效，但无论从患者生存质量、不良反应、给药途径方面均优于 FOLFOX 方案[6]，CapeOX 方案对老年患者来说更温和。本研究结果显示，CapeOX 方案与 FOLFOX4 方案治疗老年转移性结直肠癌疗效相似，而未见与化疗相关的严重毒性反应，如严重感染、严重腹泻和呕吐。CapeOX 方案组 22 个病例无论在有效率、中位 OS、中位 TTP 均略优于 FOLFOX4 组，但未取得统计学差异。同时我们观察到 CapeOX 较 FOLFOX4 组周围神经毒性发生率略高（分别为 50%、40.7%），亦未取得统计学差异。总之，CapeOX 方案治疗老年性转移性结肠癌疗效好，不良反应小，给药简便，更适合于老年患者，值得临床推广应用。

关键词：CapeOX；FOLFOX4；老年患者；晚期结直肠癌
中图法分类号：R735.35　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Caussanel J P，Levi F，Brienza S，*et al*. Phase I trial of 5-day continuous venous infusion of oxaliplatin at circadian rhythm - modulated rate compared with constant rate[J]. J Natl Cancer Inst，1990，82(12)：1046 - 1050.

[2] Feliu J，Salud A，Escudero P，*et al*. XELOX (capecitabine plus oxaliplatin) as first-line treatment for elderly patients over 70 years of age with advanced colorectal cancer[J]. Br J Cancer，2006，94(7)：969 - 975.

[3] Comella P，Natale D，Farris A，*et al*. Capecitabine plus oxaliplatin for the first-line treatment of elderly patients with metastatic colorectal carcinoma：final results of the Southern Italy Cooperative Oncology Group Trial 0108[J]. Cancer，2005，104(2)：282 - 289.

[4] 梁君林，万德森，陈利生，等. Dukes B 期结直肠癌根治术后复发转移分析[J]. 消化外科，2006，5(6)：424 - 427.

[5] Cassidy J，Tabernero J，Twelves C，*et al*. XELOX (capecitabine plus oxaliplatin)：active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer[J]. J Clin Oncol，2004，22(11)：2084 - 2091.

[6] Twelves C J，Butts C A，Cassidy J，*et al*. Capecitabine/oxaliplatin，a safe and active first-line regimen for older patients with metastatic colorectal cancer：post hoc analysis of a large phase Ⅱ study[J]. Clin Colorectal Cancer，2005，5(2)：101 - 107.

（编辑　薛国文）