论著

文章编号:1000-5404(2009)01-0082-03

肿瘤坏死因子对豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞纤维肌动蛋白的影响

李 琪,张学渊 (第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038)

摘 要:目的 观察肿瘤坏死因子(TNF-α)对豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞纤维肌动蛋白(F-actin)的影响,为研究豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞通透性改变的机制提供依据。**方法** 体外分离培养豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞,用0.05、0.1、0.2 ng/ml浓度的TNF-α作用90 min后,用免疫荧光激光共聚焦扫描显微镜法测定其中各组的F-actin含量变化,对照组为空白对照。**结果** TNF-α能使耳蜗血管纹微血管内皮细胞的F-actin含量明显减少($P<0.01$),且TNF-α的浓度越高F-actin的含量降低越明显。**结论** 通过TNF-α的作用能够改变豚鼠耳蜗微血管内皮细胞内F-actin密度及含量。

关键词:肿瘤坏死因子;纤维肌动蛋白;纹微血管内皮细胞

中图法分类号:R322.922; R329.24; R392.32 **文献标识码**:A

Effect of TNF-α on F-actin of from guinea pig cochlea

LI Qi, ZHANG Xue-yuan (Department of Otolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of F-actin of strial capillary endothelial cells from guinea pig cochlea after TNF-α treatment so as to further study the mechanism of permeability of those cells. Methods Strial capillary endothelial cells were dissociated from guinea pig cochlea and cultured respectively with 0.05, 0.1, 0.2 ng/ml TNF-α for 90 min, then detected by immunofluorescence laser confocal microscopy for F-actin concentrations. The blank control was set simultaneously. Results TNF-α decreased the content of F-actin in strial capillary endothelial cells ($P<0.01$), and with the increasing TNF-α concentration, the F-actin concentration declined. Conclusion TNF-α may change the density and content of F-actin in strial capillary endothelial cells of guinea pig cochlea.

Key words: TNF-α; F-actin; strial capillary endothelial cells

细胞骨架蛋白之一的肌动蛋白(actin)与细胞间粘附连接(adherence junction, AJ)、紧密连接(tight junction, TJ)是调节微血管内液体及各种大分子物质外渗屏障功能的重要因素。三者在结构和功能上密切相关。炎性因子如TNF-α等可通过信号传递或直接作用于actin、AJ和TJ,通过actin解聚和聚合的转换导致actin纤维断裂及其再分布,并引起AJ和TJ中粘附蛋白的结构和功能改变,导致微血管内皮屏障功能破坏、通透性增高[1]。本研究试图通过观察炎性因子TNF-α对豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞细胞骨架的主要构件纤维肌动蛋白(F-actin)分布密度的影响,为其通透性改变的研究提供依据。

作者简介:李 琪,男,重庆市人,硕士,医师,主要从事内耳血迷路屏障方面的研究。电话:(023)68773143

通信作者:张学渊,电话:(023)68765390, E-mail: yingsc@public.cta.cq.cn

收稿日期:2008-03-24;修回日期:2008-07-25

1 材料与方法

1.1 材料

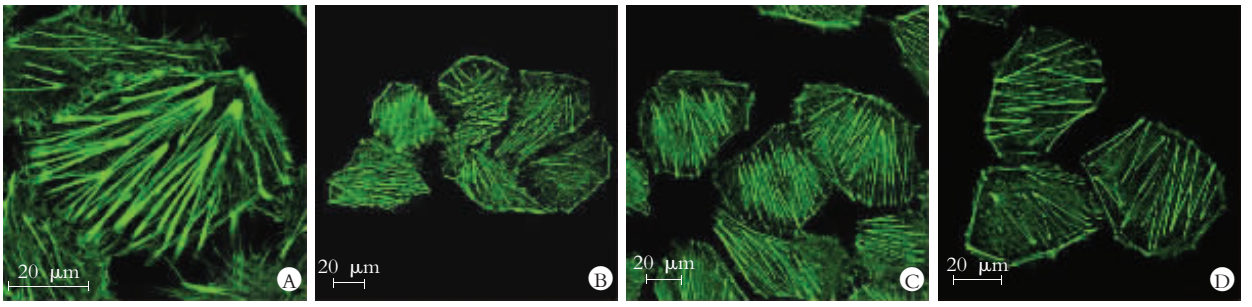
胎牛血清(Hyclone公司),DMEM培养基(Gibcobrl公司),胰蛋白酶、EDTA、Ⅰ型胶原酶、Ⅰ型胶原、phalloidin-FITC原液(Sigma公司),TNF-α原液(Peprotech EC)。兔抗人八因子相关抗原(Ⅷ-R Ag)多克隆抗体试剂盒(北京中山公司)。封闭群豚鼠2~3月龄,雌雄不拘,体质量250~300 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞的分离、培养及纯化

参考本实验室的方法[2],利用细胞培养技术培养出豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞,将培养的豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞分别接种于直径为35 mm的小培养皿中,皿底预先放入用明胶处理过的无菌盖玻片,待用。

1.2.2 实验分组 以不同浓度TNF-α(0.05、0.1、0.2 ng/ml,以不加TNF-α为对照组)作用于接种的豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞90 min后,分别观察并测定其F-actin分布。



A:对照组;B:0.05 ng/ml TNF-α 作用 90 min;C:0.1 ng/ml TNF-α 作用 90 min;D:0.2 ng/ml TNF-α 作用 90 min

图 1　4 组豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞 F-actin 激光扫描共聚焦显微镜扫描　(免疫荧光法)

1.2.3　Leica TCSP5 激光扫描共聚焦显微镜免疫荧光法观察豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞 F-actin 分布　　按上述实验分组分别加入不同浓度 TNF-α 后,置入 37 ℃、5% CO_2 恒温孵箱内孵育 90 min,取出,用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 2 次,之后用 -20 ℃丙酮液处理 3 ~ 5 min。取出玻片,待丙酮挥发完后,在黑暗中用含 10 μg/ml phalloidin-FITC 的 PBS 液,25 ℃条件下孵育 20 min,用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 2 次,制成观测样本。用激光共聚焦扫描显微镜观察并扫描玻片上不同视野的细胞,以供 F-actin 的定性及定量检测(以扫描点荧光强度值表示)。

1.3　统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件,组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 q 检验。

2　结果

2.1　TNF-α 作用下 F-actin 在豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞中的形态学改变

对照组内皮细胞的 F-actin 分布均匀,排列整齐。细胞间连接紧密,没有明显间隙形成。在经过不同浓度的 TNF-α 作用后,细胞内的 F-actin 纤维形态和分布发生明显的改变, F-actin 纤维逐渐减少,分布逐渐稀疏,细胞间的间隙逐渐形成并增大。见图 1。

2.2　TNF-α 作用下 F-actin 在豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞中的分布密度改变

在经过 90 min 不同浓度的 TNF-α 作用下,F-actin 在豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞中的分布有着明显的不同。与不加 TNF-α 的对照组比较,F-actin 的密度分布随着 TNF-α 浓度的提高而明显减少,各组内皮细胞中 F-actin 的含量存在显著差异,其中 TNF-α 浓度为 0.05 ng/ml 与 0.1 ng/ml 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其余各组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)(表 1)。

表 1　TNF-α 各组豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞 F-actin 荧光值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	F-actin 荧光值
对照组	85.78 ± 1.08
TNF 0.05 ng/ml	79.68 ± 1.28[a]
TNF 0.1 ng/ml	67.21 ± 1.97[ab]
TNF 0.2 ng/ml	61.53 ± 2.03[a]

a:$P < 0.01$,与对照组比较;b:$P < 0.05$,与 0.05 ng/ml TNF 组比较

3　讨论

细胞是人体结构和功能的基本单位,而细胞骨架是细胞结构和功能物质实现者之一。细胞骨架是位于细胞质和细胞核内由丝状蛋白质聚合物形成的三维网状结构[3],其基本结构单位是纤维状肌动蛋白(F-actin)。它由可溶性的球状肌动蛋白单体(G-actin)聚合而成,后者不断地加入或脱落,前者保持着聚合和解聚的动态平衡,维持细胞骨架的形态和功能。显微镜下的 F-actin 呈现出多种可变的形态,包括应力纤维(stress fiber)、细胞周边的致密外周带(dense peripheral band, DPB)和中央短纤维等,它们之间可以互相转化。由应力纤维所介导的中心张力和由 DPB 所介导的拴缚力是一对方向相反的作用力,这两种力量相互平衡时,内皮细胞间隙和内皮通透性维持正常;当内皮受到各种因素的刺激时,F-actin 骨架发生重组,中心张力增加使细胞间连接发生改变,结果细胞收缩变圆,细胞间裂隙产生,进而引起内皮屏障功能损害,血管通透性升高[4]。

本实验中我们观察到:浓度越高的 TNF-α 能够显著降低豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞中 F-actin 的分布密度,使 F-actin 纤维逐渐减少,分布逐渐稀疏,并且使细胞间出现了裂隙。由此可以知道:TNF-α 可以改变内皮细胞中 F-actin 的分布密度;通过 TNF-α 的作用可以使内皮细胞间的连接发生变化,继而出现裂隙。而细胞间的连接有紧密连接和粘附连接两种连接方式。TJ 是由跨膜的咬合素(occludin)与细胞质内的胞质紧密粘连蛋白 1(ZO-1)、ZO-2 等蛋白构成,它们形成 ZO-1/ZO-2 杂二聚体并与一相对分子质量为 130×10^3 的蛋白质结合,并通过扣带素蛋白等结合于 actin 上。粘附连接则由具有 Ca^{2+} 依赖的血管内皮钙粘着蛋白(VE-cadherin)和细胞质内的粘附蛋白形成的特异性复合体。VE-cadherin 的细胞质端与细胞内的 α、β、γ-catenin(连环蛋白)等相接,它们又通过结合素与

actin 相连。相邻内皮细胞的 VE-cadherin 胞外部分相互连接即构成了 AJ。细胞内 actin 与 AJ、TJ 的关系是复杂的,因此 TNF-α 作用与内皮细胞后,信号传递分子可能通过一系列的链条作用于 actin,从而引起它的力学改变或(和)直接作用于 AJ、TJ,引起它的聚合或解聚,最后引起其屏障功能改变[5,6]。在我们前期的研究中,观察到浓度越高的 TNF-α 对豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞作用时间越久,内皮细胞的通透性越大[7]。因此我们不难推测,豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞在受到炎症因子 TNF-α 的作用后,由于内皮细胞中 F-actin 的重组或再分布,使内皮细胞间的连接发生了变化,从而使内皮细胞屏障功能受损,继而改变其通透性。

参考文献:

[1] Paria B C, Vogel S M, Ahmmed G U, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha-induced TRPC1 expression amplifies store-operated Ca^{2+} influx and endothelial permeability[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(6): L1303 – L1313.

[2] 张学渊, 魏运军. 耳蜗微血管内皮细胞通透性体外模型的研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2001, 36(6): 409 – 411.

[3] Janmey P A. The cytoskeleton and cell signaling : component localization and mechanical coupling[J]. Physiol Rev, 1998, 78(3): 763 – 781.

[4] Petrache I, Birukova A, Ramirez S I, *et al*. The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 8(5): 574 – 581.

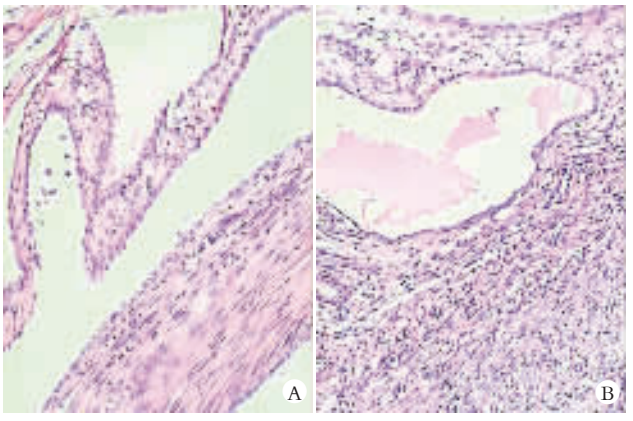
[5] Baldwin A L, Thurston G, al-Naemi H. Inhibition of nitric oxide synthesis increases venular permeability and alters endothelial actin cytoskeleton[J]. Am J Physiol, 1998, 274(54 Pt 2): H1776 – H1784.

[6] Dye J F, Leach L, Clark P, *et al*. Cyclic AMP and acidic fibroblast growth factor have opposing effects on tight and adherens junctions in microvascular endothelial cells *in vitro*[J]. Microvasc Res, 2001, 62(2): 94 – 113.

[7] 李 琪, 张学渊. TNF-α 对体外培养豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞通透性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(2): 174 – 175.

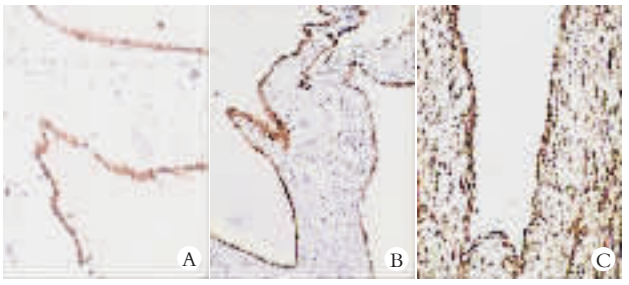
(编辑 龙 亮)

(上接 78 页)



A: 肿瘤囊壁内衬单层扁平或立方上皮,细胞分化良好,囊壁为成熟的纤维结缔组织,可见少量炎细胞浸润; B: 肿瘤组织向卵巢内浸润性生长

图 1 卵巢肿瘤形态学观察 (HE ×100)



A: Calretinin (×200); B: CK (×100); C: Vimentin (×100)

图 2 免疫组化染色结果 (S-P)

现异型改变[4];囊壁结缔组织厚薄不等,厚者含较多星形纤维母细胞和肥胖内皮细胞,薄者为成熟胶原纤维和毛细血管,并可见灶性炎细胞浸润。少数病例发生局灶性浸润性生长。免疫组化间皮细胞表达 Calretinin、细胞角蛋白、上皮膜抗原、Vimentin。

手术切除是目前唯一有效的治疗方法,尽可能的全部切除囊性病变,以保证治疗效果,避免复发。腹腔镜手术是一种可应用的新手术方式[5]。该肿瘤预后良好,复发者仅需再次手术切除。

关键词: 多囊性间皮瘤;卵巢

中图法分类号: R737.31 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] Duenas-Garcia O F, Kerckoff-Villanueva H, Rico-Olvera H, *et al*. Benign peritoneal cystic mesothelioma as differential diagnose of an ovarian dependant tumor. Case report and review of the literature[J]. Ginecol Obstet Mex, 2007, 75(2): 111 – 114.

[2] Safioleas M C, Constantinos K, Michael S, *et al*. Benign multicystic peritoneal mesothelioma: a case report and review of the literature[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(35): 5739 – 5742.

[3] 于 国, 李 冰, 孙玉芝, 等. 低度恶性腹膜囊性间皮瘤的临床病理学特点[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(5): 410 – 412.

[4] Baratti D, Kusamura S, Sironi A, *et al*. Multicystic peritoneal mesothelioma treated by surgical cytoreduction and hyperthermic intra-peritoneal chemotherapy (HIPEC)[J]. *In Vivo*, 2008, 22(1): 153 – 157.

[5] Saad S, Brockmann M, Maegele M. Benign peritoneal multicystic mesothelioma diagnosed and treated by laparoscopic surgery[J]. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2007, 17(5): 649 – 652.

(编辑 王 红)