DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.018
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2208 2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)24-2208-04

荧光光漂白恢复技术在检测膀胱平滑肌细胞间通讯功能中的应用

周逢海[1],宋 波[1],金锡御[1],孙 玮[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院全军泌尿专科中心;[2]高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨膀胱平滑肌细胞间通讯的功能变化。方法 利用荧光光漂白恢复(FRAP)技术检测膀胱平滑肌细胞GJIC功能。结果 在相同的时间内,对实验组和对照组膀胱平滑肌细胞漂白后平均荧光恢复率相比较,实验组显著高于对照组($P<0.05$)。结论 FRAP技术可以从功能上研究缝隙连接介导的细胞间通讯。

关键词:荧光光漂白恢复技术;激光扫描共聚焦显微镜;膀胱平滑肌
中图法分类号:R322.62;R329.25;R446.8 文献标识码:A

Application of fluorescence recovery after photobleaching in the detection of gap junctional intercellular communication in bladder smooth muscle

ZHOU Feng-hai, SONG Bo, JIN Xi-yu, SUN Wei (Center for Urology of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the functional changes of gap junctional intercellular communication (GJIC) in bladder smooth muscle. Methods The functions of GJIC in bladder smooth muscle were detected by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). The mean fluorescence recovery rates of the bladder smooth muscle cells in the experimental group and the control group were compared. Results The mean fluorescence recovery rate of the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). Conclusion FRAP might be used to study the functions of gap junctional intercellular communication.

Key words: fluorescence recovery after photobleaching; laser scanning confocal microscope; bladder smooth muscle

缝隙连接(Gap junction)介导的细胞间通讯(Gap junctional intercellular communication, GJIC)是近来研究的热点,其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[1]。过去已有多种技术途径用于功能性GJIC的研究,但是,这些方法均存在不同程度的缺陷,使缝隙连接通讯的研究受到限制。目前,荧光光漂白恢复(Fluorescence redistribution after photobleaching, FRAP)技术能够借助高强度脉冲式激光照射细胞的某一区域,造成该区域荧光分子的光淬灭,再用低强度激光扫描,可通过检测该区域周围的非淬灭荧光分子向受照射区域扩散的速率[2],来研究细胞间缝隙连接通讯。从而,大大拓展了人们的研究手段,使细胞间通讯的研究更进一步深入[3]。本研究将大鼠膀胱平滑肌经组织消化培养后,采用FRAP技术方法,通过激光扫描共聚焦显微镜(Laser scanning confocal microscope, LSCM)进行细胞间通讯的研究,现将该方法的实验原理及条件进行介绍,并就其优缺点进行讨论。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 6-碳氧荧光素醋酸盐(6-carboxyfluorescein diacetate, 6-CFDA, Molecular Probe Inc. MW460.4)。6-CFDA很容易通过细胞膜,并在细胞内被多种非特异性酯酶分解成代谢产物6-碳氧荧光素(6-CF),带电荷的6-CF不能通过细胞膜,但很容易通过缝隙联结在细胞间扩散。6-CF激发光波长为490 nm,发射光波长为518 nm。6-CFDA溶于二甲亚砜(DMSO)中配成1 mg/ml储备液,-20 ℃贮存。负载时用PBS(含Ca^{2+}、Mg^{2+})或HEPES液稀释成10 μg/ml的应用液。DMEM、胎牛血清(Gibico life公司),分装后于-70 ℃保存备用。

1.1.2 主要仪器 激光扫描共聚焦显微成像仪(Leica TCS NT,德国)具备FRAP技术要求的所有硬件设备,包括:Ar-laser 488 nm、发射(阻挡)滤片513 nm、DSP(The digital signal processor)和AOTFs(The acousto-optic tunable filters)。AOTFs不仅提供激光强度的准确控制,而且可以以针点(Pin-point)精度,保证激

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30277992)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30277992)
作者简介:周逢海(1964-),男,甘肃省兰州市人,博士研究生,副主任医师,主要从事膀胱的生理及病理方面的研究。E-mail:zhoufengh@163.com,电话:(023)68773089
收稿日期:2003-04-04;修回日期:2003-07-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

光束在特定位点上的准确开(关)。因此, 在 FRAP 分析中, 可以准确控制感兴趣区域(Regions of interest, ROI)细胞的荧光漂白程度, 而对相邻区域细胞不产生任何程度的荧光淬灭。在 Image Browser 窗口, 由 Leica TCS Image Examiner (ROI mean 功能)完成 ROI (或选择的漂白细胞) 和相邻未漂白细胞, 在不同时间序列扫描中的荧光强度均值, 并得出相应的时间-强度变化趋势图。该仪器还可以对活细胞的荧光强度实时定量检测, 包括: 5 W 的氩离子激光器, 可以激发紫外光和可见光; 声光调制器 AOM, 用于控制激光的脉冲强度和时间; OLYMPUS 倒置显微镜; X—Y 轴扫描载物台; Z 轴步进马达控制器; 冷电耦合器件(cCCD)摄取荧光图成像; 光电倍增管 PMT 用于检测荧光信号; 专用的计算机用于处理数据; SONY 监视器用于显示图像。

1.1.3　动物材料　　建立膀胱出口梗阻 (BOO) 动物模型, 健康 Wistar 大鼠 46 只(第三军医大学实验动物中心), 雌性, 体质量 180~210 g, 结扎膀胱颈部导致不完全梗阻后 6 周, 行充盈性膀胱测压, 分出实验组 25 只, 同龄正常大鼠 15 只作为对照组(在模型制作过程中死亡 6 只), 在无菌条件下切取膀胱, 供细胞培养用。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　膀胱新鲜平滑肌组织块来源于建立的动物模型及正常大鼠, 用灭菌生理盐水冲洗膀胱血迹, 剔除浆膜和粘膜后, 剪成 2 mm× 2 mm, 在 4 ℃条件下胶原酶Ⅳ消化 12 h, 采用含 15%胎牛血清的 DMEM 培养液, 于 5% CO_2、37 ℃条件下常规培养。

1.2.2　FRAP 实验　　取出贴壁单层生长至 70%~80%细胞的盖玻片, 先用 PBS 液清洗 2 次, 再加入 10 μg/ml 6-CFDA 0.5~1.0 ml (直径 2 cm 培养皿中), 37 ℃、5% CO_2 孵箱中孵育 10~15 min。取出后用 PBS 或 HEPES 液洗掉细胞外多余的 6-CFDA, 然后再加入少量 NBS-free 培养液, 待测。实验步骤: 样品经染色后, 上机进行测量。首先选择 3 种细胞: 第 1 种是周围与其它细胞紧密连接, 需用激光去淬灭的细胞; 第 2 种是孤立于其它细胞, 也需用激光去淬灭的细胞; 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。显然第 1 种细胞存在缝隙连接通讯, 是我们实验数据的来源; 第 2 种由于它与其它细胞相分离, 根本不存在缝隙连接通讯, 用于实验对照; 第 3 种细胞选择的原因是: 荧光物质即使在无激光照射下, 也有自身的荧光光漂白作用, 选择此种细胞作为其它细胞的背景校正。在确定以上 3 种细胞后, 开始淬灭前的预扫描, 淬灭完成后, 监测 3 种细胞 4 min, 观察其荧光恢复情况。全部的 FRAP 实验应当在 30~40 min 内完成, 包括染料负载、漂洗、细胞选择、淬灭细胞及扫描。

1.2.3　仪器参数的设置　　按 Leica TCS NT 型 LSCM 中 FRAP 分析程序, 定义 ROI 或选择细胞列表, 设置相关的"Bleach/Time Series Scan"过程的一系列参数。设定激光能量 Laser Power 500 Mw, 光电倍增管强度 24%, 漂白脉冲时间 200 ms, 扫描步进 1.0 μm, 载物台移动速度 20 mm, 物镜 40 倍。其中漂白程度 30%~60%, 漂白强度 100%, 每点漂白时间 2.0 s, 扫描强度 20%, 漂白前(1 次)、后(9 次)共扫描 10 次, 间隔 30.0 s, 监测 4.0 min。通过 ROI 漂白后不同间隔时间的各次扫描图像(共 9 帧), 获取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, 计算荧光恢复率。

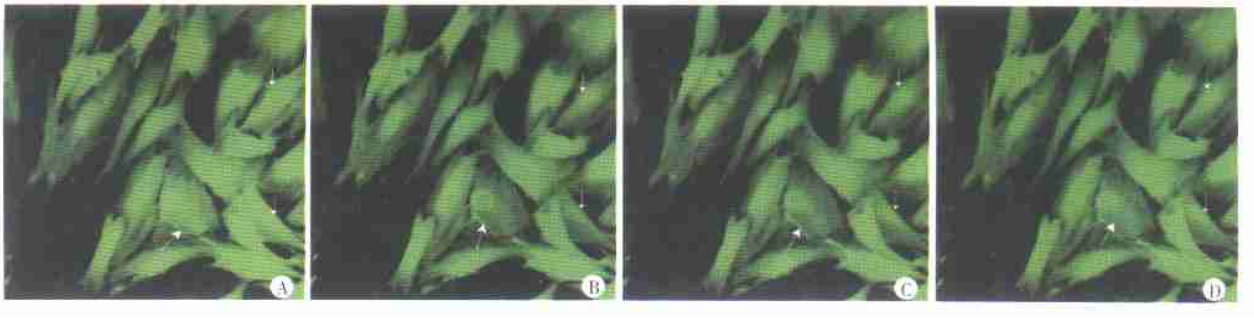
1.2.4　荧光漂白恢复率的计算　　$Kt=(Ib-Ib0)/(Iu-Iu0)\times 100\%$, 其中 Iu: 相邻未漂白细胞在 t 时间的荧光强度; Iu0: $t=0$ 时间背景荧光强度; Ib: 漂白细胞在 t 时间的荧光强度; Ib0: $t=0$ 时间的荧光强度; Kt: 在 t 时间细胞间的荧光恢复率[4, 5]。本实验中漂白后扫描 9 次, 共有 10 个数据位点用于曲线拟合。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

荧光标记染色膀胱平滑肌细胞呈单层贴壁生长。FRAP 方法测定大鼠正常膀胱(对照组)和异常膀胱平滑肌(实验组)细胞 GJIC 功能, 选择漂白细胞(箭头标记)荧光漂白前(A)及漂白后 0(B)、2(C)和 4(D)min 时的荧光恢复情况。在培养的实验组细胞, 经瞬间漂白后细胞内荧光强度明显变弱, 随着时间的推移, 荧光逐渐恢复, 至 4 min 时(D), 可见荧光强度明显恢复, 见图 1, 平均荧光恢复率为(35.791±0.836)%。相对而言, 培养的对照组正常细胞, 在相同的时间内, 漂白细胞荧光恢复很不明显, 平均荧光恢复率为(11.982±0.627)%。在漂白后 4 min, 两组平均荧光恢复率相比较, 实验组显著高于对照组($P<0.05$), 见表 1。



Bleaching of the cells (arrow). A: The images generated before bleaching; B: The recovery images of fluorescence after bleaching at 0 minute; C: At 2 minutes; D: At 4 minutes

图 1　FRAP 法测定膀胱平滑肌(实验组)细胞 GJIC 功能

Fig 1　The function of GJIC in bladder smooth muscle cells (experimental group) demonstrated by FRAP

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表1 膀胱平滑肌细胞平均荧光恢复率的比较

Tab 1 Comparison of the mean fluorescence recovery rates of bladder smooth muscle cells

Group	Number of cell	Mean fuorescence recovery rates (%/min, $\bar{x}\pm s$)
Experimental	23	35.791±0.836 *
Control	20	11.982±0.627

*: $P<0.05$ *vs* control

3 讨论

目前已有多种技术途径用于功能性GJIC的研究。已经报道的方法有: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。由于这些方法有的表现为操作复杂,难度大,所得结果欠精确;有的是在操作中对细胞膜造成了损伤,不是在生理状态下进行,影响了实验结果的准确性与可信性,因此,使缝隙连接细胞间通讯的研究受到限制。近年随着激光扫描共聚焦显微镜技术的问世,并与荧光光漂白恢复(FRAP)技术相结合,可以定量地检测细胞间通讯的功能,从而为研究缝隙连接介导的细胞间通讯提供了强有力的手段。

荧光光漂白恢复(FRAP)技术用于分析多种生物膜系统的分子迁移研究。它是将待测细胞从表面用荧光物标记,可以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[6,7]。由于光漂白过程是不可逆的,荧光恢复过程可完全准确地反映荧光标记物的运动。还可以用计算机精确控制淬灭激光脉冲强度的时间,对细胞内荧光强度进行定时定量监测。并且所用的荧光染料6-CFDA对细胞无毒性,并有较强的膜通透性,它本身不发荧光,进入细胞后被多种非特异性酯酶分解成代谢产物6-CF,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出来,即只有通过细胞间缝隙连接通道才能相互交换[8,9]。近年来,LSCM已广泛用于恶性肿瘤的细胞间通讯研究,有研究表明正常培养的胰腺癌细胞经荧光淬灭后4 min内荧光恢复率很缓慢,表明正常培养的胰腺癌细胞间通讯受到抑制。另有研究细胞间通讯功能在3种不同转移潜能的人体横纹肌肉瘤细胞系间及其与培养的正常人肌母细胞对比观察,利用LSCM技术结果显示横纹肌肉瘤细胞荧光漂白后恢复率下降,而且与横纹肌肉瘤细胞的转移潜能呈负相关。另外,采用荧光光漂白恢复(FRAP)技术还可对细胞膜流动性进行研究[10]。利用NBD-C6-HPC荧光探针标记细胞膜磷脂,然后用高强度的激光束照射活细胞膜表面的某一区域(1~2 μm),使该区域的荧光淬灭或漂白,再用较弱的激光束照射该区域。可检测到细胞膜上其它地方未被漂白的荧光探针流动到漂白区域时的荧光重新分布情况。荧光恢复的速率和程度可提供有关的信息,如用于观察细胞受体介导内吞过程中膜磷脂流动性的变化情况。NBD-C6-HPC在温度稍高时可能会进入细胞内,因此荧光染色和测量时应在低于常温的环境下进行。

本研究比较系统地介绍了通过激光共聚焦显微镜,采用FRAP技术,分别测定锚着生长的体外培养膀胱平滑肌细胞的GJIC功能。本实验在同一视野中,选择每组相互连接的2~3个淬灭区,分别将其中央的核心细胞作为漂白细胞进行光淬灭。另选择与漂白细胞相连接不需要激光淬灭的周围细胞作为背景校正细胞。实验结果显示,在漂白后的第4分钟时,实验组平均荧光恢复率为(35.791±0.836)%,对照组为(11.982±0.627)%,将两组平均荧光恢复率相比较,实验组显著高于对照组($P<0.05$)。根据测定结果,认为该方法可以较为准确地反映出膀胱平滑肌细胞间GJIC功能及实验组平滑肌细胞GJIC功能提高的变化。另外,FRAP分析GJIC功能时对细胞单层的要求相对较低,可以满足细胞融合在60%以上的所有锚定生长的细胞。FRAP不但可以测定融合单层的GJIC,而且可以测定单个细胞荧光的变化及2个、3个或3个以上相邻接触细胞间的荧光传递。而SLDT和MDTA方法对待检测细胞的贴壁能力和细胞体积的大小有较高的要求,仅适合于贴壁较好、体积较大的细胞。因此,对于贴壁能力较差或胞体较薄的上皮类细胞,操作难度更大,精准度也差,对细胞膜可造成不同程度的损伤,势必会影响实验结果的准确性与可信性。而利用LSCM进行FRAP技术分析,可以克服上述的缺点,不会对细胞产生损坏,且很容易操作。一般而言,细胞在离开培养状态或终止与测试因子的作用,暴露于室温下,30~40 min内GJIC是相对稳定的。因此在实际操作中,FRAP分析测定细胞GJIC功能都应当在细胞脱离培养条件后30~40 min内全部完成。还有FRAP可以同时淬灭多个细胞(图1),即能在同一显微视野下同时测定多个细胞间GJIC。其优点是可以克服不同的细胞接种、培养条件造成的组内误差,提高实验的精确性。以前,由于分析方法的局限性,使GJIC研究受到了限制。由于FRAP技术可以定量地检测和动态观察GJIC功能,尤其是LSCM技术及相应应用软件的发展,为研究GJIC提供了强有力的手段。

参考文献:

[1] Krutovskikh V A, Troyanovsky S M, Piccoli C, *et al*. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein con-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

nexin43 on tumor cell growth *in vivo*[J]. Oncogene, 2000, 19(14): 505—513.

[2] Wade M H, Trosko J E, Schindler M. A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells[J]. Science, 1986, 232(4749): 525—528.

[3] 李 楠, 尹 岭, 苏振伦, 等. 荧光标记共聚焦显微术[M]. 北京: 人民军医出版社, 1997. 1—11.

[4] Miller A G, Hall J E. Junctional permeability measurements in the embryonic chick lens[J]. Exp Eye Res, 1996, 62(4): 339—349.

[5] Reits E A, Neefies J J. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(6): E145—147.

[6] Jou Y S, Layhe B, Matesic D F, *et al*. Inhibition of gap junctional intercellular communication and malignant transformation of rat liver epithelial cells by neu oncogene[J]. Carcinogenesis, 1995, 16(2): 311—317.

[7] Schindler M, Trosko J E, Wade M H. Fluorescence photobleaching assay of tumor promoter 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate inhibition of cell-cell communication[J]. Methods Enzymol, 1987, 141(3): 439—447.

[8] 张 杰, 张红英, 步 宏, 等. 不同转移潜能的人体横纹肌肉瘤细胞系细胞间通讯的研究[J]. 中华病理学杂志, 2001, 30(6): 448—451.

[9] Carruba G, Webber M M, Bello Deocampo D, *et al*. Laserscanning analysis of cell-cell communication in cultured human prostate tumor cells[J]. Anal Quant Cytol Histol, 1999, 21(1): 54—58.

[10] Yguerabide J, Schmidt J A, Yguerabide E E. Lateral mobility in membranes as detected by fluorescence recovery after photobleaching[J]. Biophys J, 1982, 40(1): 69—75.

（编辑 张大春）

文章编号: 1000-5404(2003)24-2211-02

个案与短篇

颈动脉狭窄患者血管内支架置入术后并发症的观察及护理

Complications of carotid artery stenosis after cervical vertebral artery plasty with internal stent: observation and nursing

丁 宇, 陈贞 芳, 迟路湘, 陈康宁 （第三军医大学附属西南医院神经内科, 重庆 400038）

颈动脉支架内置术是近年来治疗颈动脉病变的新技术, 可有效地预防脑缺血发作及因动脉硬化斑块脱落引起的脑梗塞。然而, 此种治疗方法可发生某些并发症, 重者危及病人生命。我科自 2003 年 1 月以来, 采取血管内支架成形术治疗有症状颈动脉狭窄患者 27 例后发生 11 例并发症, 现就并发症发生的原因及相应的护理措施作一探讨。

1 临床资料

1.1 一般资料

27 例患者中, 男性 18 例, 女性 9 例, 年龄 38~62 岁, 平均(66.4±10.1)岁。其中脑梗死 23 例, TIA 4 例。均经 DSA 脑血管造影证实有不同程度的颈动脉狭窄。

1.2 病人的选择标准[1]

颈动脉系统血管狭窄程度超过 50% 或有症状虽然狭窄未超过 50%, 但狭窄的粥样斑块中有溃疡形成, 内膜撕裂、夹层形成, 血管造影示造影剂滞留; 无明显的心、肺功能障碍; 有缺血性脑神经功能损害的病史, 且经内科保守治疗无效。

1.3 治疗方法

1.3.1 术前准备 术前 3~5 d 给予口服肠溶阿司匹林 300 mg/d, 抵克力得 250 mg/d 或氯吡格雷 75 mg/d。术前 6 h 禁食, 脑血管造影常规准备, 造影前半小时鲁米那钠 0.1 g 肌注。

1.3.2 手术操作 局麻下行股动脉穿刺, 放置 9F 动脉鞘, 将 9F 指引导管送至颈动脉狭窄段附近, 行血管造影, 测量狭窄病变的长度及血管直径, 选取适合于病变的支架。将指引导丝通过颈动脉狭窄处, 在指引导管内沿指引导丝输送支架装置, 将自膨胀支架跨过狭窄部位, 支架 1/3 位于狭窄以上, 2/3 在狭窄近端。送至狭窄血管段后, 缓慢释放支架。对于有严重狭窄的患者先用球囊进行预扩张。最后行血管造影, 检查放置支架后的血管狭窄段和远侧段的血流情况。

2 结果

本组 27 例患者均成功置入血管内支架, 其中右侧颈动脉支架植入 20 例, 左侧 7 例。所有患者中有 4 例出现穿刺局部皮下血肿, 5 例出现术后低血压、心动过缓, 1 例出现术后高灌注综合征, 1 例血尿, 无 1 例发生脑梗塞。其余患者无手术并发症发生。全部患者无 1 例死亡。

3 讨论

3.1 皮下血肿

穿刺部位皮下血肿: 2 例术后 6 h 拔除鞘管在穿刺处附近出现皮肤圆形肿胀, 直径 4~5 cm, 为股动脉穿刺处出血、血肿形成。另 2 例术后 48 h 出现穿刺侧大腿根部皮下与阴囊大面积淤血。4 例发生的主要原因是穿刺插管操作过程不顺利致重复穿刺; 术后手法压迫股动脉穿刺处不适当; 术前宣教不到位, 病人肢体未能有效制动。通过此类病例提示术后应严密观察伤口敷料、穿刺部位皮肤颜色、温度及足背动脉搏动情况; 拔除

（下转 2215 页）

作者简介: 丁 宇(1965—), 女, 江苏省镇江市人, 主管护师, 主要从事神经系疾病康复护理方面的研究, 发表论文 14 篇。电话: (023)68754000-73070

收稿日期: 2003-06-26; 修回日期: 2003-10-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net