

## 内皮缝隙连接在介导细胞间交联和 损伤血管内皮修复中的作用

宋明宝, 黄 岚, 于学军, 朱光旭, 张 坡, 康华利

(中国人民解放军第三军医大学新桥医院全军心血管病研究所, 重庆市 400037)

[关键词] 内科学; 内皮缝隙连接; 内皮细胞; 18 $\alpha$ 甘草次酸; 荧光恢复率; 内皮划痕宽度; 大鼠

[摘要] 目的 探讨内皮缝隙连接在介导细胞间通讯及在损伤血管内皮修复中的作用。方法 采用植块法培养大鼠主动脉内皮细胞, 细胞免疫荧光染色法检测大鼠主动脉内皮细胞缝隙连接蛋白 37、40 及 47 的表达, 荧光漂白后恢复技术检测缝隙连接介导的细胞间通讯。机械划痕建立内皮损伤模型, 每 24 h 摄像一次以定量分析内皮损伤修复速度, 并观察缝隙连接特异性阻断剂 18 $\alpha$ 甘草次酸对内皮损伤后修复的影响。结果 缝隙连接蛋白 37、40 及 47 在内皮细胞中均有表达。荧光物质能够通过缝隙连接在相邻细胞间进行传递, 孤立细胞荧光恢复率显著低于相邻细胞(5.70%  $\pm$  0.63% 比 82.26%  $\pm$  1.68%,  $P < 0.01$ ); 而 18 $\alpha$ 甘草次酸能够抑制缝隙连接介导的细胞间通讯, 18 $\alpha$ 甘草次酸干预组荧光恢复率显著低于对照组(53.58%  $\pm$  1.73% 比 82.26%  $\pm$  1.68%,  $P < 0.05$ )。内皮划痕宽度在对照组与 18 $\alpha$ 甘草次酸干预组之间无显著性差异(396.57  $\pm$  25.32  $\mu$ m 比 370.12  $\pm$  19.40  $\mu$ m,  $P > 0.05$ ), 内皮损伤 24 h 后, 18 $\alpha$ 甘草次酸干预组划痕宽度显著大于对照组(237.38  $\pm$  20.40  $\mu$ m 比 126.29  $\pm$  21.40  $\mu$ m,  $P < 0.05$ )。18 $\alpha$ 甘草次酸干预组内皮损伤完全愈合时间显著多于对照组(4.2  $\pm$  0.2 天比 2.6  $\pm$  0.3 天,  $P < 0.05$ )。结论 内皮细胞间存在缝隙连接介导的细胞间通讯, 而 18 $\alpha$ 甘草次酸能抑制这种细胞间通讯并减慢内皮损伤修复速度及延长其愈合时间。提示内皮细胞缝隙连接在内皮损伤后修复过程中起重要作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Role of Endothelial Gap Junctions in Intercellular Communication and Wound Vascular Endothelial Repair

SONG Ming-Bao, HUANG Lan, YU Xue-Yun, ZHU Guang-Xu, ZHANG Po, and KANG Hua-Li

(Research Institute of Cardiovascular Disease of People's Liberation Army, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Endothelial Gap Junctions; Endothelial Cell; 18 $\alpha$ -Glycyrrhetic Acid; Fluorescence Recovery Rate; Scrape Widths; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of endothelial gap junctions in intercellular communication and vascular endothelial wound repair. **Methods** Rat aortic endothelial cells (RAEC) were cultured by explanted rat aortic wall tissue. Cell immunofluorescence staining was applied to detect the expressions of connexin (Cx) 37, Cx40 and Cx47 in RAEC. Fluorescence redistribution after photobleaching (FRAP) was used to measure the communications between cells via gap junctions. The monolayer of cultured RAEC was scraped by a mechanical method and the endothelial wound healing rate was quantified by an analysis of the photographs taken every 24 h after endothelial cell layers were wounded. Meanwhile, 18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid (18 $\alpha$ -GA), a specific blocker of gap junction, was administered to observe its effect on endothelial wound repair. **Results** Cx37, Cx40 and Cx47 were all expressed in RAEC. Fluorescent dye could only be transferred between conjugated cells, and mean fluorescence recovery rate in isolated cells were significantly lower compared with that in conjugated cells (5.70%  $\pm$  0.63% vs 82.26%  $\pm$  1.68%,  $P < 0.01$ ). Compared with control group, mean fluorescence recovery rate in 18 $\alpha$ -GA group were significant lower (53.58%  $\pm$  1.73% vs 82.26%  $\pm$  1.68%,  $P < 0.05$ ). Therefore, 18 $\alpha$ -GA could inhibit dye transfer between conjugated cells. The scrape width of endothelium were similar in two groups at the time of wound. However, at 24 h after endothelial wound, the scrape width in 18 $\alpha$ -GA group were significantly bigger than those in control group (237.38  $\pm$  20.40  $\mu$ m vs 126.29  $\pm$  21.40  $\mu$ m,  $P < 0.05$ ). The complete recover time of the wound in 18 $\alpha$ -GA group were significantly more than those in control group (4.2  $\pm$  0.2 d vs 2.6  $\pm$  0.3 d,  $P < 0.05$ ). **Conclusions** There are intercellular communications via gap junctions among conjugated RAEC and 18 $\alpha$ -GA could inhibit the intercellular communication via gap junctions, slow down endothelial wound repair speed and prolong the complete recover time of endothelial wound. Hence, endothelial gap junctions might play a vital

[收稿日期] 2007-04-20 [修回日期] 2007-08-15

[基金项目] 国家自然科学基金(30570765)资助

[作者简介] 宋明宝, 博士研究生, 讲师, E-mail 为 smb0939@163.com。通信作者黄岚, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血管损伤性疾病的防治, E-mail 为 huanglan260@yahoo.com.cn。于学军, 副教授, 研究方向为冠心病的防治。

role in the process of endothelial wound repair.

在正常条件下,血管内皮分泌多种物质影响血管张力、保护血管壁免受炎性细胞粘附、血栓形成及血管平滑肌细胞增殖。内皮完整性受损将导致炎性细胞浸入及平滑肌细胞过度增殖是冠心病、血管成形后再狭窄等血管疾病发生的重要环节。血管内膜损伤后内皮修复过程中,损伤血管内膜边缘的内皮细胞(endothelial cells, EC)增殖、迁移,参与血管内膜再生。因此,研究影响这些过程的因素以促进损伤血管内皮的修复是防治血管性疾病的重要手段。缝隙连接是相邻细胞间的膜通道结构,可非选择性通过小分子如 cAMP、Ca<sup>2+</sup>、三磷酸肌醇(IP3)及核苷的磷酸化产物,但不允许蛋白和核酸通过。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<sup>[1]</sup>。但内皮细胞缝隙连接在内皮损伤血管修复过程中的作用目前尚不十分清楚。本研究拟探讨内皮缝隙连接在内皮损伤修复中的作用,旨在为内皮损伤所引发的血管损伤性疾病的防治提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SPF 级 SD 大鼠 4 只,体重 150~180 g,由第三军医大学实验动物中心提供。DMEM/F12 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于美国 Gibco BRL 公司,内皮细胞生长添加剂(endothelial cell growth supplement, ECGS)购于美国 BD 公司,羊抗大鼠缝隙连接蛋白(connexin, CX)37、40 及 43 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司,兔抗人(11)因子相关抗原抗体、羊抗兔及兔抗羊-FITC IgM 购于北京中杉公司,6-羧基荧光素乙酸乙酰盐(6-carboxyfluorescein diacetate, 6-CFDA)、18 $\alpha$ -甘草次酸(18 $\alpha$ -glycyrrhetinic acid, 18 $\alpha$ -GA)购于美国 Sigma 公司。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 mg/L。18 $\alpha$ -GA 溶于 DMSO 中后用 DMEM/F12 培养基稀释至 50  $\mu$ mol/L,过滤除菌备用。激光共聚焦显微成像仪(Leica TCSNT, 德国)。

### 1.2 大鼠主动脉内皮细胞的培养与鉴定

参考文献[2, 3]进行。用颈椎脱臼法处死动物,在无菌条件下取大鼠胸腹主动脉,仔细清除血管外膜及脂肪组织,将血管纵向剖开,0.01 mol/L PBS 漂洗干净,放入 50 mL 培养瓶中,在瓶口用眼科剪剪成

约 1.5 mm  $\times$  1.5 mm 大小的组织块,用吸管将组织块随机铺于瓶底,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中贴壁 4 h,加入含 20% FBS、100 mg/L ECGS、100 mg/L 肝素及双抗的 DMEM/F12 培养基继续培养。3 天后去除组织块并换液继续培养。以后每 3 天更换培养液。2~5 代用于实验。细胞免疫荧光染色检查(11)因子相关抗原鉴定大鼠主动脉内皮细胞(rat aortic endothelial cells, RAEC)。

### 1.3 细胞免疫荧光染色

将细胞接种至 96 孔培养板中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h,吸弃培养液,用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次,加入 4% 多聚甲醛室温孵育 20 min,用 PBS 洗涤 3 min  $\times$  3 次,加入 0.3% Triton-X100 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 5 min  $\times$  3 次,加入 10% 正常封闭液置于 37℃ 孵育 30 min,吸弃封闭液,加入 1:100 稀释的羊抗 CX 37、40 及 43 多克隆抗体 4℃ 过夜, PBS 洗涤 5 min  $\times$  3 次,加入 1:200 稀释的 FITC 标记的兔抗羊 IgG 抗体, 37℃ 孵育 60 min, PBS 洗涤后置于荧光显微镜检测。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

### 1.4 荧光漂白后恢复实验

参照文献[4],将第 3 代内皮细胞以  $1 \times 10^4/\text{cm}^2$  接种于预先放置 20 mm  $\times$  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% 汇合的细胞玻片, PBS 漂洗 2 次,加入 10 mg/L 6-CFDA,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 10~15 min。用 PBS 液洗掉细胞外多余的 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。18 $\alpha$ -GA 组加入 50  $\mu$ mol/L 18 $\alpha$ -GA。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,存在缝隙连接通讯,用激光淬灭,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,不需要激光淬灭,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。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 15 s 扫描摄像一次,获取扫描图像共 20 帧,得到漂白细胞和未漂白细胞荧光的变化,观测被激光淬灭的内皮细胞荧光强度动态恢复过程和

最终恢复水平。计算荧光恢复率。每组随机选取 20 个细胞进行检测。

### 1.5 内皮损伤修复实验

将细胞接种至 6 孔培养板中,待细胞生长至 90% 汇合后用手术刀柄划一痕迹并用 PBS 反复冲洗,加入完全培养基,干预组另外加入 50  $\mu\text{mol/L}$  18 $\alpha$ -GA,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,每 2~3 天换液一次。每 24 h 在倒置显微镜(200 $\times$ )下观察并用 Leica QWin 图像分析软件测量划痕愈合情况。每一划痕随机取 5 个视野,每一视野等分为 20 个点,测量每个点的划痕宽度,取平均值。并计数划痕完全愈合时间。

### 1.6 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组比较采用独立样本  $t$  检验。采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 内皮细胞缝隙连接蛋白的表达

细胞免疫荧光阳性表现为在胞质或细胞膜边缘可见绿色荧光分布。内皮细胞 CX37、CX40 及 CX43 免疫荧光染色均为阳性,对照组免疫荧光染色也为阴性(图 1)。

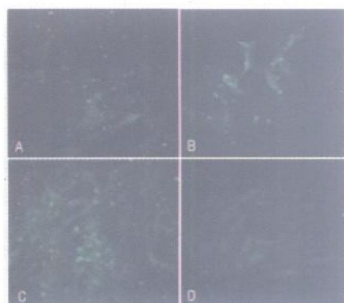


图 1. 免疫荧光染色检测内皮细胞表达缝隙连接蛋白 37、40 及 43 (200 $\times$ ) A 为缝隙连接蛋白 37, B 为缝隙连接蛋白 40, C 为缝隙连接蛋白 43, D 为阴性对照。

### 2.2 荧光漂白后恢复实验

荧光显微镜下,经 6-CFDA 标记的内皮细胞胞核与胞质均匀负载绿色荧光,而背景纯正,无绿色荧光。孤立的内皮细胞经瞬间激光淬灭后,细胞内荧光强度明显减弱,随着时间的推移,细胞内荧光强度几乎没有恢复;相邻的内皮细胞经瞬间激光淬灭后,细胞内荧光强度明显减弱,随着时间的推移,细胞内荧光强度逐渐恢复,4 min 时可见荧光强度恢复到一定水平并趋于稳定,荧光恢复率为 82.26%  $\pm$  1.68%。而给予 18 $\alpha$ -GA 干预后,荧光恢复时间显著

延迟,且荧光恢复率(53.58%  $\pm$  1.73%)显著低于对照组( $P < 0.05$ )。孤立的内皮细胞平均荧光恢复率为 5.70%  $\pm$  0.63%,相邻的内皮细胞荧光漂白恢复率显著高于孤立的内皮细胞( $P < 0.01$ ;图 2)。

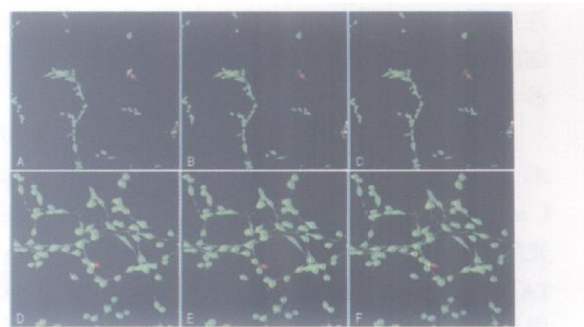


图 2. 内皮细胞荧光漂白后恢复情况 (100 $\times$ ) A 为孤立的内皮细胞荧光漂白前, B 为孤立的内皮细胞荧光漂白后, C 为孤立的内皮细胞荧光漂白恢复 300 s 后, D 为相邻的内皮细胞荧光漂白前, E 为相邻的内皮细胞荧光漂白后, F 为相邻的内皮细胞荧光漂白恢复 300 s 后。

### 2.3 内皮损伤修复

对照组与 18 $\alpha$ -GA 组划痕距离差异无显著性(396.57  $\pm$  25.32  $\mu\text{m}$  比 370.12  $\pm$  19.40  $\mu\text{m}$ )。24 h 后对照组损伤愈合速度显著快于 18 $\alpha$ -GA 组(126.29  $\pm$  21.40  $\mu\text{m}$  比 237.38  $\pm$  20.40  $\mu\text{m}$ ,  $P < 0.05$ )。对照组伤痕完全愈合时间为 2.6  $\pm$  0.3 天,而 18 $\alpha$ -GA 组愈合时间为 4.2  $\pm$  0.3 天,两者比较差异显著( $P < 0.05$ ;图 3)。

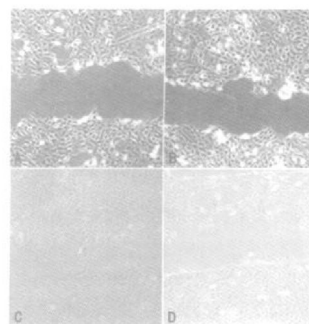


图 3. 内皮损伤后修复情况 (100 $\times$ ) A 为对照组内皮损伤后即刻, B 为 18 $\alpha$ -甘草次酸组内皮损伤后即刻, C 为对照组内皮损伤后 24 h, D 为 18 $\alpha$ -甘草次酸组内皮损伤后 24 h。

## 3 讨论

缝隙连接是相邻细胞间的膜通道结构,它由细胞膜上的连接子相互衔接而成。每个连接子包含六个相同哑铃形蛋白质亚单位—缝隙连接蛋白,连接子的六聚体所形成的跨膜蛋白通道。它在质膜上常成簇出现,形成缝隙连接斑,一个斑块内包含几对甚



至成千对连接子,其数量直接影响 GJIC 功能。目前已发现在哺乳动物中共用 20 余种缝隙连接蛋白亚型,不同组织的缝隙连接由不同的缝隙连接蛋白组成,而同种组织不同的部位,其缝隙连接表达的缝隙连接蛋白也不同<sup>[5]</sup>。本研究表明,大鼠主动脉内皮细胞含有丰富的缝隙连接,而 CX37、CX40 及 CX43 参与了缝隙连接的组成。

对于细胞间缝隙连接功能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, MD-TA) 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。荧光漂白后恢复技术 ( 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功能<sup>[6]</sup>。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 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<sup>[7]</sup>。由于荧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。本试验研究发现,相邻内皮细胞平均荧光恢复率为  $82.26\% \pm 1.68\%$ ,而孤立内皮细胞几乎无荧光恢复,提示内皮细胞间存在丰富的缝隙连接,且其细胞间的通讯活跃,而缝隙连接特异性阻断剂 18 $\alpha$ -GA 能够阻断内皮细胞间的这种通讯。

血管内皮损伤在动脉粥样硬化及经皮冠状动脉介入术后再狭窄的发生中起重要作用。内皮结构及功能的完整可在一定程度抑制血管不良重构,从而可防止血管狭窄的发生<sup>[8-10]</sup>。本研究结果发现,内皮损伤后,18 $\alpha$ -GA 能够显著延缓甚至抑制内皮损伤后的愈合过程,提示缝隙连接介导细胞间通讯在内皮损伤修复过程扮演重要角色,其可能与参与细胞移行、增殖及分化功能的小分子物质如生长因子、第

二信使的传递有关。最近研究发现,血管细胞的通讯功能障碍在心血管疾病的发病过程中起重要作用。Isakson 等<sup>[11]</sup>研究发现,动脉粥样硬化过程中血管细胞的缝隙连接蛋白表达紊乱,内皮细胞中 CX43 上调, CX37 下调,而 CX40 表达不变;平滑肌细胞中 CX43 和 CX37 均上调。氧化的磷脂可能在血管细胞缝隙连接蛋白表达异常中起重要作用。Chadjichristos 等<sup>[12]</sup>研究发现,在高胆固醇小鼠中,减少 CX43 的表达可抑制急性血管损伤所致的新生内膜形成,减轻血管狭窄,其作用机制可能与减轻炎症反应及减少平滑肌细胞移行及增殖有关。但目前对于缝隙连接确切的生物学功能及其所传递的信号分子仍不完全清楚,因此,进一步探讨缝隙连接及其介导的细胞通讯,将为心血管疾病防治提供新的策略。

#### [参考文献]

- [1] Contreras JE, Sánchez HA, Véliz LP, Bukauskas FF, Bennett MV, Sánchez JC. Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue [J]. *Brain Res Rev*, 2004, **47** (1-3): 290-303.
- [2] 周茹,郑婕,徐清斌,戴贵东. 大鼠主动脉内皮细胞的贴壁法培养 [J]. *宁夏医学院学报*, 2007, **29** (1): 99-100.
- [3] Brant EJ, Brian RD. Heterocellular contact at the myoendothelial junction influences gap junction organization [J]. *Circ Res*, 2005, **97** (1): 44-51.
- [4] Reits EA, Neefjes JJ. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, **3** (6): E145-E147.
- [5] Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, **62** (2): 228-232.
- [6] Schindler M, Trosko JE, Wade MH. Fluorescence photobleaching assay of tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate inhibition of cell-cell communication [J]. *Methods Enzymol*, 1987, **141** (3): 439-447.
- [7] Carruba G, Webber MM, BellorDeocampo D, Amodio R, Notarbartolo M, Deocampo ND, 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.
- [8] Melo LG, Gnechi M, Pachori AS, Kong D, Wang K, Liu X, et al. Endothelium-targeted gene and cell-based therapies for cardiovascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (10): 1761-1774.
- [9] Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M, et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, **44** (4): 733-739.
- [10] 陈冰,宋剑南. 缝隙连接和连接蛋白 43 与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (1): 74-76.
- [11] Isakson BE, Kronke G, Kadl A, Leitinger N, Duling BR. Oxidized phospholipids alter vascular connexin expression, phosphorylation, and heterocellular communication [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (10): 2216-2221.
- [12] Chadjichristos CE, Matter CM, Roth I, Sutter E, Pelli G, Lüscher TF, et al. Reduced connexin 43 expression limits neointima formation after balloon distension injury in hypercholesterolemic mice [J]. *Circulation*, 2006, **113** (24): 2835-2843.

(此文编辑 文玉珊)