1749—1753.
[20] Davidson, EH, et al., 1982, *Nature*, 297: 633—635.
[21] Young, MW, et al., 1981, in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology vol. 45 pt 2 p 629—640.
[22] Brulet, P, et al., 1983, *PNASUSA*, 80: 5641—5645.
[23] Herget, T, et al., 1986, *EMBO J.*, 5: 659-664.
[24] Glaichenhaus, N, et al., 1987, *Cell*, 50: 1081—1089.
[25] 张玉砚等, 1982, 实验生物学报, 15: 137—141.
[26] Xu YN. et al., 1989, Chinese J of Cancer Research, 1(5):7—14.
[27] Flores, SC, et al., 1988, *NAR* 16: 3889—3905.
[28] Sakamoto, K, et al., 1985., J Mol Evol., 22: 134—140.
[29] Lawrence, CR, et al., 1985, *NAR.*, 13: 4239—4252.
[30] Daniels, GR, et al., 1985, *Nature*, 317: 819—822.
[31] Deininger, PL, et al., 1986, *TIG.*, 2: 76—80.
[32] Achten, S, et al., 1986, J Mol Biol., 192: 489—502.
[33] Loeb, DD, et al., 1986, *Mol cell Biol.*, 6: 168—182.
[34] Hattori, M, et al., 1985, *NAR.*, 13: 7813—7827.

研究工作

小鼠胃粘膜细胞和人胃癌细胞间隙连接的超微结构研究与促癌变剂的影响*

高 燕 林仲翔 吕桂芝 周立新 韩亚玲
(北京市肿瘤防治研究所细胞生物学研究室)
鲁崎唔 吴莲英
(中国科学院生物物理研究所电镜室)

间隙连接介导的细胞连接通讯在调控细胞增殖和分化中有重要作用[1-4]。早期的研究[5,6]发现肿瘤细胞缺乏连接通讯功能。进一步的研究[7-10]表明肿瘤细胞连接通讯抑制的程度与细胞的恶性程度，特别是与细胞的锚着不依赖性增殖能力和转移能力呈正相关；许多促癌变剂有抑制细胞连接通讯的作用。由此提出的假说认为细胞连接通讯的抑制是癌变机理的一部分，很可能是癌变促进(Tumor Promotion)的关键因素，细胞连接通讯的抑制使癌变启动细胞(Initiated Cells)得以逃避周围细胞的调控而继续恶变和扩增最后形成癌肿[11,12]。日益增多的关于细胞连接通讯研究资料支持这一假说，指出细胞连接通讯功能在癌变促进的过程中逐渐丧失[11-13]。

细胞连接通讯依赖于相邻细胞膜上间隙连接的数目和/或其通透性的大小。冷冻蚀刻电镜技术能够提供间隙连接结构的基础资料，对于了解与细胞连接通讯变化有关的癌变机理是十分必要的，然而这样的研究报道还不多[14,15]。我们曾观察到人胃癌MGC-803细胞缺乏间隙连接通讯功能[16]，提示细胞连接通讯抑制也是胃癌癌变的机理之一。为了解细胞连接通讯抑制的超微结构基础以及与促癌变可能的连系，本工作应用冷冻蚀刻电镜技术比较观察胃癌MGC-803细胞与正常小鼠胃粘膜上

* 本工作由国家自然科学基金项目资助。

皮细胞间隙连接表达情况和在促癌变剂处理后胃粘膜细胞的变化并进行讨论。

材 料 与 方 法

一、细胞　人胃癌MGC-803细胞[16]，传代培养生长在RPMI 1640培养基(含15%小牛血清和抗生素)内。以EDTA(0.01%)液消化分散细胞，种植在培养瓶内，种植密度适于2—3日内达密度饱和。

小鼠正常胃粘膜细胞取自体重20克的昆明种小白鼠，停食1—3日。动物断脊椎后剖腹，暴露胃，自大弯部剖开，去净内容物，PBS洗数次，用钝刮匙分离腺胃体部粘膜，获得新鲜的胃粘膜上皮细胞，经相差显微镜印证。

二、促癌变剂　佛波酯[12,13](12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate,TPA)，美国Sigma厂产。黄芫花*[17]0.15 g/ml乙醇提取安瓿注射液，新华制药厂制。

三、促癌变剂处理胃粘膜细胞实验　1. 对照组：刮取的新鲜胃粘膜立即放入1640培养液，内不含任何药物；2. TPA组：胃粘膜放入含TPA(50 ng/ml)的1640培养液；3. 黄芫花组：胃粘膜放入含黄芫花(20 μg/ml)的1640培养液内。于37℃ CO_2孵育箱内孵育5小时。各组标本用冷冻蚀刻电镜技术处理，同时作常规固定石蜡切片。

四、冷冻蚀刻电镜技术　新鲜胃粘膜或经过孵育的胃粘膜，用PBS涮洗后放入2.5%戊二醛二甲砷酸钠缓冲液，室温固定40分钟，吸去固定液，用0.1 mol/L二甲砷酸钠缓冲液洗2次。取接种第三天生长达密度饱和的胃癌MGC-803细胞2瓶(～5×10^{6}个细胞)，用PBS洗3次，加入2.5%戊二醛二甲砷酸钠缓冲液，室温固定40分钟，刮取整层细胞，室温离心1000 rpm/5分钟，去固定液，用0.1 mol/L二甲砷酸钠缓冲液洗2次。将已固定的胃粘膜和胃癌细胞分别移入含30%甘油的0.1 mol/L二甲砷酸钠缓冲液内浸泡2小时后移上载物台，液氮冷冻，用BALZERS BAF-400 D冷冻蚀刻仪按常规法制备复型。JEM-100 cx电镜观察。

结　　果

一、正常小鼠胃粘膜上皮细胞

新鲜的或在1640培养液内孵育5小时后的胃粘膜，在常规固定石蜡切片H. E染色后光镜高倍下观察为胃腺上皮细胞的腺腔结构和少许间质。冷冻蚀刻复型显示胃粘膜细胞的间隙连接结构(图版图1—3)。以观察的细胞数为底数，间隙连接的出现率为9/10(表1)。常可见到在同一个细胞界面上有数个间隙连接存在，它们或孤立或相互靠近，连系甚至融合为大片状。这些间隙连接是由许多六角形小颗粒——连接子(Connexon)组合形成的特化的膜区。连接子直径为6—9 nm，中心—中心间距为～10 nm，排列为不规则多角形斑点状结构。在冷冻蚀刻复型的P面上，斑点为突起的颗粒；在相邻细胞膜的E面上，斑点表现为与颗粒互补的小凹(图版图1，2)。当冷冻蚀刻面恰恰跨出一个细胞的界膜，越过细胞间隙进入另一个细胞界膜时，在有间隙连接的膜区可见同一个间隙连接的P面和对应的E面结构，该处细胞膜间距离很狭窄(图版图1，2小箭头之间为狭窄区)，明显窄于附近无间隙连接的膜间距离。单个间隙连接的面积变动在0.01 μm^2—0.06 μm^{2}之间，小至含有的颗粒少于10个，大至含有数百个颗粒。在间隙连接附近的膜区有散在的膜内颗粒(Intramembrane particles)，其大小及形状与在间隙连接内的颗粒相近似[图版图1，2]。这些分散的膜内颗粒似像是位于膜(P面)的小凹之中。P面上颗粒较多。同时胃粘膜细胞膜上有发达的紧密连接结构(图版图3)，是由许多带状的紧密连接组成的条索结构，多呈环形分布。有小的间隙连接出现在紧密连接附近，与条索游离端相连或被条索包绕[图版图3箭头]。大的间隙连接距离紧密连接较远。

二、胃癌细胞

人胃癌MGC-803细胞生长达密度饱和后，在相差显微镜下可见细胞密切接触并呈叠层。在原位固定后检查，细胞仍密切接触。刮取的整层细胞片块，冷冻蚀刻复型可见许多细胞接触的界膜。与正常胃粘膜细胞明显不同的是胃癌细胞未见间隙连接。以观察的细胞数为

* 协和医院计划生育科何萃华教授惠赠。

表 1* 冷冻蚀刻电镜显示的细胞膜间隙连接

细胞	观察的细胞数	间隙连接出现总数	连接子颗粒中心一中心间距
小鼠胃粘膜上皮细胞	10	9	～10 nm
TPA(50 ng/ml)，处理5 hr 的小鼠胃粘膜上皮细胞	30	0	
黄芫花(20 μg/ml)处理 5 hr 的小鼠胃粘膜上皮细胞	30	0—1	～7.5 nm
人胃粘液腺癌 MGC—803 细胞	30	0	

* 两批实验可重复资料。

底数，间隙连接的出现率为 0/30(表 1)(图版图 4)，同时也未见到其他连接结构。膜上有散在的膜内颗粒，其形状和大小不甚一致。以上多次取材，结果一致。

三、促癌变剂处理的小鼠胃粘膜上皮细胞

光学显微镜检查，经 TPA 或黄芫花处理的胃粘膜石蜡切片 H. E 染色的组织结构与未经药物处理的对照组无明显差别。冷冻蚀刻复型显示胃粘膜细胞在促癌变剂处理后，间隙连接结构数目明显减少或消失。TPA 组胃粘膜细胞未见间隙连接，间隙连接出现率为 0/30(表 1)。黄芫花组胃粘膜细胞的间隙连接数目明显减少，其出现率为 0-1/30(表 1)(图版图 5，6)。两批实验仅见到一个间隙连接(图版图 6)，其连接子颗粒排列规则、紧密，中心一中心间距为～7.5 nm。与对照组正常胃粘膜细胞的间隙连接有差别。此外，两种促癌变剂处理的胃粘膜细胞膜上膜内颗粒形状和大小不规则，许多比较粗大的颗粒散在或密集成为形状不规则的小片区(图版图 5，6)，紧密连接罕见。

讨论

本工作的冷冻蚀刻电镜观察所见小鼠胃粘膜上皮细胞膜上的间隙连接与紧密连接和文献[19-20]记载大鼠胃粘膜上皮细胞相似，间隙连接颗粒的中心一中心间距均为～10 nm。紧密连接形态相似，比较发达。表明这两种连接结构是分化正常的胃粘膜上皮细胞的表型特征。间隙连接颗粒排列比较疏松和不规则代表细胞间隙连接通讯的功能状态[20]。早期电耦合研究已证明正常人胃粘膜细胞有连接通讯功能，癌变后的胃粘膜细胞连接通讯抑制[6]。我们曾证明培养的人胃癌 MGC-803 细胞连接通讯抑制[16]，本文的冷冻蚀刻电镜观察进一步证明间隙连接结构的消失是胃癌细胞连接通讯抑制的主要原因。

TPA 是皮肤癌促癌变剂[13]，黄芫花是实验性宫颈癌的促癌剂[17]。实验证明这两种药物对其他种细胞有促转化、刺激细胞增殖和抑制细胞连接通讯的作用[12,13,16,18,21]。两种促癌剂抑制小鼠胃粘膜上皮细胞间隙连接表达的现象提示间隙连接表达的抑制可能与胃癌癌变促进阶段有关，值得进一步阐明。

促癌变剂处理小鼠胃粘膜 5 小时后，胃粘膜细胞的间隙连接消失或明显减少。表明细胞膜上间隙连接结构的复现和消失在很短的时间内进行。对于间隙连接结构数量快速变化的细胞机理还了解很少，有关的假说[22-24]特别是与间隙连接蛋白基因转录，转译水平调节有关的机制及改变与肿瘤癌变的关系，值得进一步探索。

摘要

应用冷冻蚀刻电镜技术，我们观察到小鼠正常胃粘膜上皮细胞膜的间隙连接和紧密连接。人胃癌 MGC-803 细胞膜上未见到间隙连接和紧密连接，表明胃癌细胞间隙连接结构的

消失是细胞连接通讯抑制的主要原因。促癌变剂TPA和黄芫花分别处理胃粘膜导致膜上皮细胞的间隙连接消失或明显减少。本结果支持关于细胞连接通讯抑制是胃癌癌变机理之一，可能与癌变的促进有关的分析。本文对细胞间隙连接数目变化快的现象及可能的调节机理进行讨论。

图 版 说 明

1—3 小鼠胃粘膜细胞冷冻蚀刻复型。 标长0.1μm。

1. 示三个大小不等的间隙连接，最大的面积为0.017 μm^2。长箭头指示P面和E面的间隙连接。短箭头示相邻细胞在间隙连接区狭窄的膜间隙。

2. 示长片状间隙连接，面积0.06 μm^2。小箭头示间隙连接区相邻细胞膜间狭窄的间隙。E面颗粒区面积较小。

3. 示小的间隙连接被紧密连接条索包绕。（箭头）

4. 人胃癌MGC-803细胞冷冻蚀刻复型。标长0.1μm。未见间隙连接结构。膜内颗粒(Intramembrane Particles)散在。

5. 黄芫花(20μg/ml)处理5小时后的小鼠胃粘膜，细胞膜界面无间隙连接和紧密连接，只有散在分布的膜内颗粒。标长：0.1μm

6. 示黄芫花处理的小鼠胃粘膜细胞膜界面偶见的一个间隙连接，其颗粒排列紧密规则，附近和远处有散在或成簇的膜内颗粒，未见紧密连接。

参 考 文 献

[1] Loewenstein, W. R. 1979, *Biochim. Biophys, Acta.*, 560:1—65.
[2] Sheridan, J. D. 1987, Cell-to-cell communication., 187—222. New York Plenum Press.
[3] 曾弥白等，1988，中国科学，B辑，8:822.
[4] 王绳琦，1989，实验生物学报，22:189—203.
[5] Loewenstein, W. R. et al., 1966, *Nature* (Lond)., 209:1248—1249.
[6] Kanno, Y. et al., 1968, *Nature* (Lond)., 218:775—776.
[7] Yamasaki, H. T. et al., 1985, *Cancer Res.*, 45:637—641.
[8] Iijima, N. T. et al., 1969, *Jpn. J. Exp Med.*, 39:205—221.
[9] Nicolson, G. L. et al., 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 85:473—476.
[10] Hamada, J. N. et al., 1988, *Cancer Res.*, 48:5129—5132.
[11] Yamasaki, H. 1988, Theories of carcinogenesis., 143—157. Washington, D. C. Hemisphere Publishing Corp.
[12] Trosko, J. E., et al., 1988, Gap Junctions., 435—448. New York. Alan R Liss, Inc.
[13] Miki, H. I. et al., 1990, *Cancer Res.*, 50:1324—1329.
[14] Swift, J. G., et al., 1983, *J. Submicrose. Cytol.*, 15(3):799—810.
[15] Yancy, S. B. et al., 1982, *Exp. Cell Res.*, 139:329—340.
[16] 林仲翔等，1989，实验生物学报，22:157—167。
[17] 孙瑜等，1987，中华肿瘤杂志，9:345—347。
[18] 林仲翔等，1990，待发表。
[19] Peracchia, C., 1977, *J, Cell Biol.*, 72:628—641.
[20] Peracchia, C., et al., 1984, Is there a calmodulin involvement? *Federation Proc.*, 43:2681—2691.
[21] 曾毅等，1985，病毒学报，1(3):229—232。
[22] Zampighi, G. et al., 1988, Gap junctions. 151—162. New York: Alan R Liss, Inc.
[23] Garfield, R. E. et al., 1990, *In Vitro Toxicol.*, 3(1):41—59.
[24] Saez, J. C. et al., 1990, *In vitro Toxicol.*, 3(1):69—86.