

以被降解、崩溃后随尿液排出^[29]。

四、结束语

Keer 等^[2]在 1972 年首先描述了动物细胞凋亡的形态学特点,后来对动植物细胞凋亡的进一步研究均表明其形态特征与 Keer 等早年对凋亡细胞的描述相似^[26,30],细胞核膜的肿胀、解体,核仁裂解,核内染色质的分解及凝聚并沿细胞核周边分布,细胞核的固缩,细胞器(内质网、高尔基体、线粒体、质体、液泡)膜结构的变化、集中分布以及凋亡小体的形成,都是作为细胞凋亡的亚显微结构特征。不同生物细胞凋亡的形态学改变特别是超微结构特征所具有的这种相似性,使我们能从形态学上检测细胞是否发生凋亡。

当然,不同细胞在细胞凋亡过程中所体现的形态特征虽然已证实基本相似,但我们在前面也提到不同学者对不同生物细胞凋亡超微结构的观察结果还存在一些差异,特别对凋亡过程中线粒体形态结构变化的观察还有较大差别,因此还需要对其进行进一步的比较观察,建立系统的形态学变化标准,使超微结构的变化特征能真正成为鉴定细胞凋亡的有力而且可靠的依据。

参 考 文 献

- [1] Kerr JFR, et al., 1994, *Cancer*, 73:2013-2016.
- [2] Kerr JF, et al., 1972, *Br J Cancer*, 26:239-257.
- [3] Pennell RI, Lamb C, 1997, *Plant cell*, 9:1157-1168.
- [4] Jones A, 2000, *Trands Plant Sci*, 5:225-230.
- [5] 苏金为等, 2002, 植物生理与分子生物学学报, 28(4): 292-298.
- [6] Bleecker AB, Patterson SE, 1997, *Plant Cell*, 9:1169-1179.
- [7] Ecker JR, 1995, *Science*, 268:667-675.
- [8] Moon WS, et al., 2000, *Yonsei Med J*, 41(2):195.
- [9] Wyllie AH, et al., 1980, *Int Rev Cytol*, 68:251-306.
- [10] 吴波等, 2000, 电子显微镜学报, 19(6):792-798.
- [11] Biggiogera M, et al., 1997, *Histochem Cell Biol*, 107: 331-336.
- [12] 韦长元等, 2000, 中华肝病杂志, 8(2):89-90.
- [13] 梁卫江等, 1997, 第一军医大学学报, 17(4):339.
- [14] 郭敏等, 2001, 锦州医学院学报, 22(2):1-3.
- [15] Darzynkiewicz Z, et al., 1997, *Cytometry*, 27:1-20.
- [16] Wang H, et al., 1996, *Plant cell*, 8:375-391.
- [17] Le PT, et al., 1995, *J Immunol*, 154:4371.
- [18] Bursch W, et al., 1992, *TIPS*, 13:245.
- [19] Duvall E, Wyllie AH, 1986, *Immunol Today*, 7:115.
- [20] Cummings MC, et al., 1987, *Am J Surg. Pathol.*, 21(1):88-101.
- [21] Gunawardena AHLAN, et al., 2001, *Planta*, 212:205-214.
- [22] Li D-H, et al., 2003, *Acta Bot Sin*, 45(1):53-63.
- [23] 祝建等, 2001, 同济大学学报, 22(5):10-13.
- [24] 周鹤同等, 2001, 实用癌症杂志, 16(3):236-239.
- [25] 乐美兆等, 2001, 电子显微学报, 20(6):735-738.
- [26] Eric L, et al., 1999, *Curr Opin Plant Biol*, 2:502-507.
- [27] 姜泊, 细胞凋亡基础与临床[M], 北京:人民军医出版社, 1999, 9.
- [28] Wang XW, et al., 1995, *Cancer Res.*, 55:6012-6016.
- [29] Camp V, Martin P, 1996, *Anatomy and Embryology*, 194(4):341.
- [30] Li WC, et al., 1995, *J Cell Biol*, 130:169-181.

激光扫描共聚焦显微镜在细胞间隙连接研究中的应用

周逢海* 宋 波 金锡御

(第三军医大学西南医院全军泌尿中心 重庆 400038)

摘 要 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)是当今世界上最先进的分子细胞生物学分析仪器之一。旨就 LSCM 在细胞间隙连接蛋白的定位、定量、分布及细胞间分子迁移、胞间通讯等方面的应用进行综述,并对其在 GJIC 的研究进行展望。

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)是近代生物医学图像分析仪器最重要的发展之一,它是在荧光成像基础上加装激光扫描装置,利用计算机进行图像处理,使用紫外线或可见光激发荧光探针,从而得到细胞内部微细结构的荧

光图像,在亚细胞水平上观察诸如细胞内 Ca^{2+} 、pH 值、膜电位、细胞间通讯等生理信号及细胞形态的变化,已成为形态学、分子细胞生物学、神经科学、药理

* 通讯作者。E-mail: zhoulengh@163.com

学、遗传学等领域中新一代强有力的工具^[1]。

一、LSCM 原理概述

LSCM 采用了点光源代替场光源,使探测点与照明点共轭,有效抑制了同一焦平面上的杂散荧光,抑制了来自非焦平面的荧光,提高了图像的信噪比,使图像的清晰度和纵向分辨率比普通光学显微镜明显升高,对细胞进行无损伤光学切片。由于以上特征使其具备了普通显微镜和荧光显微镜的功能,并配有电子摄像和微机图像数字分析系统,结合特异的荧光抗体进行一系列亚细胞水平的结构和功能的研究,是目前先进的细胞形态、功能研究的手段^[1]。

LSCM 使用的激光器通常是氩-氦离子混合激光管。而近年来问世的双光子激光器具有更明显的优势。“双光子”具有更强的穿透力,更为重要的是其比普通型 LSCM 的激光能量低,因此对活细胞的损伤更小,同时减少高能量激光对荧光染料的漂白效应,从而使观察活细胞的实验过程延长。因此,它必将广泛地应用于医学研究。

二、细胞间隙连接

细胞间通讯可分为间接与直接方式。以体循环远程分泌、旁分泌或自分泌方式经第二信使途径完成一系列生理、生化功能的调节方式称为间接通讯;而以间隙连接(gap junction, GJ)为途径进行的细胞间兴奋传递称为细胞间隙连接直接通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)。因此,细胞通过细胞间 GJ 进行信息和能量物质交换,对细胞的新陈代谢、增殖和分化起重要调控作用。现已成为当今生命科学领域研究的新热点^[2]。

间隙连接介导的细胞间通讯主要有两种方式:①离子偶联(ionic coupling),实验资料表明离子很容易通过间隙连接的管道,离子带有电荷,因而离子流动伴有电位变化,所以又叫电偶联(electrical coupling);②代谢偶联(metabolic coupling),相对分子质量低于 1000Da 的分子容易通过亲水管道,因而氨基酸、葡萄糖、核苷酸、维生素、激素及其他小分子物质借助间隙连接的通透而为相邻细胞所共有,使相邻细胞处于代谢偶联中。

迄今为止,已有多种技术途径用于功能性间隙连接通讯的研究。已经报道的技术有:电偶联,经过放射活性代谢物转移的代谢协同,基因突变所致的

代谢协同,刮除负载(scrape loading),微注射和荧光染料转移测定(microinjection and dye transfer assay, MDTA)。这些技术操作复杂、难度大,且都对细胞膜造成了损伤,影响了实验结果的准确性和可行性,使间隙连接细胞间通讯的研究受到限制。随着激光扫描共聚焦显微镜技术的诞生,可以对细胞间隙连接的物质交换进行较为精确的测量,从而为研究细胞间隙连接通讯提供了强有力的手段。

三、LSCM 在细胞间隙连接蛋白定位、定量研究中的应用

激光扫描共聚焦显微镜具有“光学切片”性能,能对组织或细胞进行光学切片,可清楚地观察到不同层次抗原存在的部位,可对贴壁的单个细胞或细胞群的胞内、胞外荧光做定位、定性、定量及实时分析,并可对胞内成分的分布、含量等进行测定。

间隙连接是相邻细胞间的膜通道结构,是由围绕中央孔对称排列的膜蛋白六聚体相互衔接而成。该膜蛋白即间隙连接蛋白(connexin, Cx),六聚体为连接子(connexon)。每个连接子包含六个相同哑铃形 Cx,它在质膜上常成簇出现,形成间隙连接斑(gap junction plaques),一个斑块内包含几对甚至成千对连接子,其数量直接影响细胞间通讯功能^[3]。间隙连接只允许分子量小于 1kD 的代谢物质、无机盐和其他相邻细胞的亲水性小分子通过。次级信使 cAMP、无机盐(K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+})和三磷酸肌醇也能通过间隙连接低电阻位点通道,使细胞间的带电离子和小分子不用暴露在胞外空间而直接进行转运,从而使细胞间的电偶联和细胞偶联加强^[4]。

Cx 的表达具有组织特异性,但不同种的 Cx 可以在同一器官甚至同一细胞中表达(表 1)。在人类心脏组织中,窦房结及房室结主要以 Cx45 为主, Cx40 则主要位于传导束、房室结及窦房结内, Cx43 存在与心室及心房肌间^[5]。Yamanaka 等^[6]利用 LSCM 对大鼠乳腺组织进行双标免疫荧光观察,发现 Cx26、Cx32 共同定位表达于同一个间隙连接斑。Wincenty 等^[7]发现人类在临产和分娩期间 GJ 增多,并证实 Cx43、Cx40、Cx45 三种连接蛋白作为混合体可同时位于一个 GJ 斑内,说明分娩期间子宫平滑肌 GJIC 调节的内在多样性。同样,在大鼠脑组织和脊髓中,几种不同的 Cx 也可以共同位于 GJ 斑内^[8]。因此, Cx 在各种组织中的表达既有交叉性,又有组织特异性。

表1 各种组织连接蛋白表达情况

组 织	主要连接蛋白
心脏	Cx43, Cx40, Cx45
肝	Cx32, Cx26
肺	Cx40, Cx37
肾	Cx26, Cx37, Cx40
脑	Cx43, Cx30, Cx26
膀胱	Cx43, Cx45, Cx26
子宫	Cx43, Cx45, Cx40
乳腺	Cx26, Cx32

另外, Hashitani 等^[9]对豚鼠膀胱逼尿肌自发性兴奋传递研究发现, 由于逼尿肌不稳定 (detrusor instability, DI) 中间隙连接增多, 自发性动作电位很容易通过间隙连接传播到邻近细胞引起兴奋; 还通过免疫荧光及激光扫描共聚焦显微镜检查发现在平滑肌细胞膜上有大量的 Cx43 点状染色存在。Smith 等^[10]用抗 Cx43131-142 残基抗体及抗 Cx40、Cx37、Cx45 的抗体与间隙连接特异性结合, 通过 LSCM 在细胞水平上观察到心肌细胞每个间隙连接由两个位于相邻细胞膜上的半通道, 即连接小体 (connexon) 构成, 每个连接小体由 6 个连接蛋白 (connexin, Cx) 环形排列围成 1 个通道而形成。有作者应用 LSCM 对荧光免疫组织化学双重标记的犬心肌细胞进行观察, 发现 Cx43 分布于细胞与细胞之间的端对端和侧对侧连接处, 细胞浆和细胞核部位均未见 Cx43 表达。同时可通过计算机图像分析系统对 Cx43 进行定量分析^[11]。Donahue 等^[12]采用 LSCM 对正常人肌母细胞及多种成骨肉瘤细胞系间隙连接结构及功能进行研究, 证实 Cx43 表达主要定位于胞膜, 部分区域胞质阳性。成骨肉瘤细胞内 Cx43 含量明显降低, 且与肿瘤的转移潜能呈负相关。Van der Velden 等^[13]在研究持续性房颤中 Cx40 表达的变化时, 分别在窦性心律和起搏器诱导的持续性房颤的羊心房中取得标本, 在蛋白水平上用 PCR、Western-blotting 技术分析 Cx40 和 Cx43mRNA, 结果没有发现明显变化。而用 LSCM 在细胞水平上研究发现: 在持续性心房纤颤后 Cx43 分布呈均一性, 而 Cx40 分布则呈非均一性, 在大片正常区域中散在一些低密度区 (直径 0.15-0.6 μ m)。由于 LSCM 分辨率、灵敏度均远远高于普通的荧光显微镜, 因此在细胞的间隙连接定位、定量研究中可提供更为精确的信息。

四、LSCM 在细胞间隙连接分子迁移研究中的应用

LSCM 通过测量细胞间隙连接介导的分子迁移, 观察相邻细胞间的胞间通讯。荧光光淬灭后的恢复技术 (fluorescence redistribution after photobleaching, FRAP) 可用于分析多种生物膜系统的分子迁移研究。FRAP 分析最初由 Wade 等^[14]描述, 它是将待测细胞从表面用荧光物标记, 借助高强度脉冲式激光照射细胞区域, 从而造成该区域荧光分子的光漂白, 而该区域周围的非淬灭荧光分子将以一定速率向漂白区扩散, 可以对扩散速率进行定时测定^[15,16]。由于光漂白过程是不可逆的, 荧光恢复过程可明显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, 能对细胞内荧光强度定时定量监测。近年来, LSCM 已广泛用于恶性肿瘤的细胞间通讯研究, 有研究发现正常培养的胰腺癌细胞经荧光淬灭后 4min 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^[17]。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。并且所用的荧光染料 6-碳氧荧光素醋酸盐 (6-carboxy fluorescein diacetate, 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-碳氧荧光素 (6-CF), 带电荷的水解产物可被 488nm 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, 即只有通过细胞间隙连接通道才能相互交换^[18,19]。Hashitani 等^[20]报道, 利用激光扫描共聚焦显微镜观察豚鼠膀胱逼尿肌兴奋传递变化, 通过微电极将荧光神经素注入到肌细胞, 发现神经素很容易传递到邻近细胞; 当加入 18 β -GA (40 μ mol/L) 后, 显示神经素传递被明显抑制。Neuhaus 等^[21]通过微注射荧光染料传递 (microinjection and dye transfer assay, MDTA) 向豚鼠膀胱逼尿肌细胞注射荧光黄, 可观察到细胞间的染偶联合胞体。Hae-fliger 等^[22]利用划痕标记染料示踪技术 (scrape loading dye transfer assay, SLDT) 研究急性梗阻大鼠膀胱上皮细胞, 发现细胞间染料传递增加。我们也采用 FRAP 技术, 对大鼠膀胱出口梗阻所致 DI 的体外培养逼尿肌细胞, 从功能上动态实时研究其细

胞间的兴奋传递功能,结果表明在膀胱出口梗阻所致的逼尿肌不稳定(DI)肌细胞间有大量的间隙连接。另外,采用荧光漂白恢复(FRAP)技术还可对细胞膜流动性进行研究^[23]。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 μ m),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他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低于常温的环境下进行。从研究方法上来讲,FRAP 分析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,对细胞膜可造成了不同程度的损伤,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,30-40min 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 30-40min 内全部完成。而 FRAP 可以同时淬灭多个细胞,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。因此,可以认为荧光漂白恢复(FRAP)技术应用于研究细胞间隙连接功能比其他方法无法比拟的。

五、展 望

随着 LSCM 技术的不断发展和完善,人们对 GJIC 功能及其在细胞生长、发育、增殖、分化和维持

组织器官内细胞间协调稳定中的调控作用,将会日益受到重视和研究。目前,运用 FRAP 技术评价药物对细胞间通讯的作用,已成为 LSCM 实验检测的重要手段。当然,LSCM 在细胞间隙连接研究中存在价格昂贵,对荧光试剂要求高以及 GJIC 受到多种机制的影响等缺点。因此,有关 GJIC 通用有效的分析方法,还需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 李楠等主编,1997,人民军医出版社.,北京,1-11.
- [2] Krutovskikh, V A. et al., 2000, *J. Oncogen.*, **19**(14): 505-513.
- [3] Falk, M. M., 2000, *Eur J Cell Biol*, **79**:564-569.
- [4] Jongsma, H J, et al., 2000, *Circ Res.*, **86**:1193-1197.
- [5] Dhein, S., 1998, *Trends Pharmacol Sci.*, **19**(2):229-241.
- [6] Yamanaka, I. et al., 2001, *Histochem Cell Biol.*, **115**(4):277-284.
- [7] Wincenty, M K. et al., 2001, *Micro Res and Tech.*, **54**(2):114-122.
- [8] Rash, J E. et al., 2001, *Cell Commun Adhes.*, **8**:315-320.
- [9] Hashitani, H. et al., 2001, *J of Physiology.*, **530**(2): 273-286.
- [10] Smith, J H. et al., 1991, *Am J Pathol.*, **139**(4):801-822.
- [11] 林吉进等, 2001, 汕头大学医学院学报, **14**(3):177-179.
- [12] Donahue, H J. et al., 1995, *J Bone Miner Res.*, **10**:881-889.
- [13] van der Velden, H M. et al., 1998, *J Cardiovasc Electrophysiol.*, **9**(6):596-607.
- [14] Wade, M H. et al., 1986, *Science.*, **232**:525-528.
- [15] Jou, Y S. et al., 1995, *Carcinogenesis.*, **16**:311-317.
- [16] Schindler, M. et al., 1987, *Methods Enzymol.*, **141**:439-447.
- [17] 李楠等, 1997, 中国电视学与图像分析, **2**:57-59.
- [18] 张杰等, 2001, 中华病理学杂志, **30**(6):448-451.
- [19] Carruba, G. et al., 1999, *Anal Quant Cytol Histol.*, **21**(1):54-62.
- [20] Hashitani, H. et al., 2001, *J of Physiology.*, **530**(2): 273-286.
- [21] Neuhaus, J. et al., 2002, *Cell Tissue Res.*, **309**:301-311.
- [22] Haefliger, J A. et al., 2002, *Exp Cell Res.*, **274**(2):216-225.
- [23] Yguerabide, J. et al., 1982, *Biophys J.*, **36**:69.