鱼藤酮对星形胶质细胞缝隙连接耦联功能的影响

刘辉，尹芳秋，郭魁亮，许崇亮，贾庆军

（中国人民解放军白求恩军医学院卫勤教研室，河北 石家庄 050081）

摘要：目的 观察鱼藤酮对星形胶质细胞缝隙连接耦联功能的影响。方法 建立星形胶质细胞与常用的神经细胞株 PC12细胞共培养鱼藤酮染毒模型，应用划痕染料标记示踪技术观察染毒星形胶质细胞缝隙连接耦联功能的变化，采用 RT-PCR法检测 CX43 mRNA的表达，Western Blot技术观察 CX43蛋白活性变化。结果 随着染毒剂量的增加，鱼藤酮对星形胶质细胞缝隙连接耦联功能的抑制作用愈发明显；与正常对照组比较，0.5、1.0 μmol/L鱼藤酮染毒组 CX43 mRNA和蛋白表达均显著降低（P<0.01）。结论 鱼藤酮可引起星形胶质细胞 CX43表达水平降低，显著抑制细胞缝隙连接耦联功能，这可能是其诱导神经细胞损伤的原因之一。

关键词：鱼藤酮；星形胶质细胞；缝隙连接功能；划痕染料标记示踪技术

中图分类号：R114 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2009)03－0168－03

Effect of rotenone on intercellular gap junction function of astrocytes

LU Hui, YIN Fang-qiu, GUO Kui-liang, XU Chong-liang, JIA Qing-jun

(Department of Health Service, Norman Bethune Military Medical College, Shijiazhuang 050081, China)

Abstract: Objective To study the effects of rotenone on intercellular gap junction function of astrocytes. Methods Astrocytes isolated from newborn rats were cocultured with rotenone and a common cell strain-PC12 cells; the intercellular gap junction function of rotenone-exposed astrocytes was observed by scrape-loading and dye transfer technique (SLDT), and the expression of CX43 mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western Blot. Results The results showed that the the intercellular gap junction function of astrocytes got obviously inhibited by rotenone with a dose-dependent manner, and the expressions of CX43 mRNA and protein were also decreased significantly in 0.5 and 1.0 μmol/L rotenone exposed group (P<0.01). Conclusions The results suggested that rotenone could reduce the express of CX43 and inhibite the intercellular gap junction function of astrocytes, which might be one of the important mechanisms of the neurotoxicity of rotenone.

Key words: Rotenone; Astrocyte; Gap junction function; Scrape-loading and dye transfer technique (SLDT)

星形胶质细胞含有异常丰富的细胞缝隙连接，形成一个功能上耦联的合胞体，将细胞外转运进来的神经递质（如谷氨酸）和代谢产物（如钾离子、过氧化阴离子等）迅速稀释到这个巨大的缓冲池中[1]，从而及时清除神经元周围聚集的有毒代谢产物。缝隙连接蛋白 43（connexin43，CX43）是星形胶质细胞缝隙连接的结构基础，其表达亦受神经元的调控，进而影响缝隙连接耦联功能[2]。本实验建立了星形胶质细胞与神经元 PC12细胞共同孵育体系，模拟脑内微环境，观察鱼藤酮对星形胶质细胞缝隙连接耦联功能的影响，为探讨农药鱼藤酮的神经损伤机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

鱼藤酮、荧光黄（lucifer yellow）购自 Sigma公司，Tripure购自 Roche公司，CX43抗体购自 Santa Cruz公司，DMEM/F12培养基购自 Gibco公司，Millicell插入式培养皿（millicell culture cell insert）为 Millipore公司产品；Mastercycler PCR仪购自 Eppendorf公司，UFX-II荧光显微镜购自 Nikon公司。

1.2 星形胶质细胞与 PC12细胞共培养染毒模型的建立

取生后 3 d SD新生大鼠，断头取中脑组织，按照 McCarthy[3]所述方法分离和纯化星形胶质细胞；用含 20%胎牛血清的 DMEM/F12培养基培养，经 3次传代后免疫组化 GFAP染色鉴定。将高分化的 PC12细胞按 1.0×10^5/ml密度接种于 6孔板中，将星形胶质细胞按 1.0×10^5/ml密度接种于 Millicell插入式培养皿（PET膜，3.0 μm/24 mm），并与 PC12细胞建立共孵育体系。待细胞基本长满孔壁后，换成含 0.0、0.1、0.5和 1.0 μmol/L鱼藤酮的培养液，培养 24 h后用于实验。

1.3 星形胶质细胞缝隙连接耦联功能的测定

采用划痕染料标记示踪技术（scrape-loading dye transfer，SLDT）测定[4]，孵育细胞染毒 24 h

收稿日期：2008－12－26

基金项目：白求恩军医学院院级课题（200706）

作者简介：刘辉（1974－），男，博士，讲师，研究方向：环境毒物神经毒理机制研究。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后弃去培养液，漂洗后加入适量 0.05%荧光黄染料，用外科手术刀将培养的星形胶质细胞划线 2～3条，让细胞在 37 ℃接触荧光染料 10 min，然后弃去染液，再用 PBS漂洗 3次后加入 4%甲醛磷酸缓冲液固定。细胞间荧光染料的扩散情况用荧光显微镜观察并拍照（加标尺）。各剂量组设 3个平行样，实验重复 2次。用 Leica Qwin软件分析图像，用标尺换算距离，统计划痕两侧荧光染料扩散的面积，两侧取平均值作为该剂量组荧光扩散面积，进行半定量分析。

1.4 Western Blot检测星形胶质细胞 CX43蛋白活性

提取各实验组星形胶质细胞膜蛋白，采用考马斯亮蓝试剂盒进行蛋白定量。经 11% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳后，采用半干电转移法转移蛋白至 PVDF膜；PVDF膜用含 5%脱脂奶粉的 PBST封闭，4℃过夜；而后加入 1∶500稀释的兔抗 CX43抗体，37 ℃孵育 1 h，再与 1∶1 500稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 3 h，同时加入 1∶5 000稀释的内参照 GAPDH；最后 DAB溶液显色并用图像分析软件进行分析。

1.5 RT-PCR检测星形胶质细胞 CX43 mRNA的表达

CX43和内参照 GAPDH引物序列如下：CX43上游片段 5′-TAC CAC GCC ACC ACT GGC CCA-3′和下游片段 5′-CAT TCT GGT TGT CGT CGG GGA A-3′；GAPDH上游片段 5′-GAC CTG ACT GAC TAC CTC AT-3′和下游片段 5′-TCG TCA TAC TCC TGC TTG CT-3′。PCR循环参数为：95 ℃预变性 5 min后进入循环，95 ℃变性 30 s，60 ℃复性 30 s，72 ℃延伸 45 s，循环 28次，最后 72 ℃额外延伸 10 min。各实验组采用 3管平行扩增，并且重复 1次。

1.6 统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$表示，采用 SPSS11.0软件进行方差分析和 t检验。

2 结果

2.1 鱼藤酮对星形胶质细胞缝隙连接耦联的影响

荧光显微镜观察发现，鱼藤酮处理 PC12细胞共培养的星形胶质细胞 24 h后，随着染毒剂量的增加，细胞划痕两侧荧光扩散逐渐减少，见图 1（封三）。对荧光扩散面积进行半定量分析的结果表明，0.5、1.0 μmol/L鱼藤酮染毒组划痕两侧荧光扩散面积与对照组比较，差异有统计学意义（$P<0.01$）（见表 1）。

2.2 鱼藤酮对星形胶质细胞 CX43蛋白的影响

表 1 鱼藤酮对星形胶质细胞缝隙连接耦联的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	样本数	荧光扩散面积（μm²）
正常对照组	3	3 980.85±850.74
0.1 μmol/L鱼藤酮组	3	3 205.89±945.12
0.5 μmol/L鱼藤酮组	3	2 180.56±780.45**
1.0 μmol/L鱼藤酮组	3	1 534.00±458.80**

与正常对照组比较，** $P<0.01$

蛋白表达量以各组蛋白的灰度值与内参照 GAPDH的灰度值比值（RV=ODx/ODGAPDH）表示。与正常对照组比较，0.1 μmol/L鱼藤酮染毒组 CX43蛋白表达未见明显变化，0.5、1.0 μmol/L鱼藤酮染毒组 CX43蛋白表达却明显降低（$P<0.01$），见图 2（封三）。

2.3 鱼藤酮对星形胶质细胞 CX43 mRNA表达的影响

由图 3可见（封三），与正常对照组比较，0.1 μmol/L鱼藤酮染毒组 CX43 mRNA表达未见显著改变，但随着染毒剂量的增加，0.5、1.0 μmol/L鱼藤酮染毒组 CX43 mRNA表达明显下调（$P<0.05$）。

3 讨论

帕金森病（parkinson's disease，PD）是一种多发于中老年人的进展缓慢的神经退行性疾病，发病机制与多种因素有关，具体病因目前并不十分清楚。但近年研究发现，环境因素在 PD发病中可能起着十分重要的作用[5]；流行病学调查显示，农药厂或化工厂的暴露人群 PD发病率明显增加[6]。鱼藤酮是从豆属植物毛鱼藤中提取的一种天然杀虫剂，是细胞线粒体复合酶 I高亲和力的抑制剂，曾被认为是“安全可靠”的农药而广泛使用。但新近的研究证实，鱼藤酮能诱导黑质 DA神经元退行性变和胞体内出现 Lewy小体等 PD病理变化。研究表明，神经退行性疾病的病理过程不仅包括神经元的退变，而且包括神经胶质细胞增生、病变或萎缩，功能发生改变的星形胶质细胞可能在神经元变性过程中发挥重要作用[7]。星形胶质细胞是脑内含量最为丰富的神经细胞。因此，有关星形胶质细胞在神经元退变过程中的作用研究成为热点之一。

脑内神经细胞与神经胶质细胞之间、胶质细胞与胶质细胞之间存在大量的缝隙连接，主要由缝隙连接蛋白组成，其数量直接影响细胞间缝隙连接耦联功能。相邻细胞间通过缝隙连接耦联进行信息和物质传递，包括参与细胞间物质交换的代谢耦联和电信号传递的电耦联。星形胶质细胞间存在的丰富细胞缝隙连接，使部分细胞群形成功能的合胞体形式，而使胶质细胞代谢和信号转导具有统一性，实现调节细胞内外

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的离子平衡、向神经元运送能量底物、缓冲神经递质、调控胶质细胞增殖生长、传播细胞间钙波等功能[8]。CX43是构成星形胶质细胞缝隙连接的基本结构和功能蛋白，其表达强度也受神经元的调控。因此，本实验在体外建立星形胶质细胞与 PC12细胞共培养染毒模型，旨在模拟脑内微环境，观察鱼藤酮对星形胶质细胞缝隙连接的毒性作用。

在本实验中，采用划痕染料示踪技术检测细胞间缝隙连接耦联功能，其工作原理是利用划痕造成两侧的细胞损伤，将染料荧光黄（一种不能通过细胞膜但很易通过细胞缝隙连接的小分子强荧光物质）导入两侧的受伤细胞内，荧光黄由标记细胞通过缝隙连接向邻近细胞扩散，以扩散面积作为评价细胞缝隙连接耦联功能的指标。本实验发现，鱼藤酮可使染料扩散面积随染毒剂量的增加而减小，提示鱼藤酮对星形胶质细胞缝隙连接耦联功能具有抑制作用。缝隙连接耦联功能的破坏，细胞间即无法形成合胞体协同代谢有害物质，同时亦阻碍有益物质在细胞间传递，从而引起神经细胞损伤。进一步检测 CX43基因和蛋白表达发现，随着鱼藤酮染毒剂量的增大，CX43 mRNA和蛋白表达均显著降低，提示鱼藤酮染毒剂量的逐渐增加，也导致神经元和胶质细胞结构进一步破坏，细胞之间的缝隙连接数量明显减少，从而造成脑组织微环境和细胞通讯失调，最终可能导致神经细胞大量死亡。

曾有研究发现，细胞缝隙连接耦联功能在环境毒物致神经损伤机制中可能发挥双重作用：缝隙连接的失耦联虽然在一定程度上破坏了细胞通讯，但可能会避免将产生的有害代谢产物和伤害信息传递给与其耦联的正常细胞，从而起到保护作用[9]。因此，缝隙连接耦联功能在染毒星形胶质细胞间的动态变化，以及所发挥的确切作用仍有待深入探索。

参考文献：

[1] Zundorf G, Kahlert S, Reiser G. Gap-junction blocker carbenoxolone differentially enhances NMDA induced cell death in hippocal neurons and astrocytes in co-culture[J]. J Neuro Chem, 2007, 102(2): 508-521.

[2] Koulakoff A, Ezan P, Giaume C. Neurons control the expression of connexin30 and connexin43 in mouse cortial astrocytes[J]. Glia, 2008, 56(9): 1299-1311.

[3] McCarthy K D, De Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. J Cell Biol, 1980, 85(3): 890-902.

[4] 胡婧, 邓芙蓉, 郭新彪. 大气细颗粒物对心肌细胞缝隙连接通讯的影响[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(7): 565-568.

[5] Di Monte D A, Lavasani M, Manning-Bog A B. Environmental factors in Parkinson's disease[J]. Neurotoxicology, 2002, 23(4-5): 487-502.

[6] Herishanu Y O, Medvedovski M, Goldsmith J R, et al. A case-control study of Parkinson's disease in urban population of southern israel[J]. Can J Neurol Sci, 2001, 28(2): 144-147.

[7] Toshiki H, Naoto K, Yuko K, et al. Neuroprotective effect of arundic acid, an astrocyte-modulating agent in mouse brain against MPTP neurotoxicity[J]. Neuropharmacology, 2006, 50(3): 329-344.

[8] 闫景彬, 李浩瀚. 缝隙连接和细胞凋亡[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(6): 849-851.

[9] 闫华, 只达石, 黄慧玲, 等. 脑蛋白水解液对大鼠神经胶质细胞间缝隙连接通讯的研究[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2007, 7(1): 66-70.

作 者 须 知

正文中参考文献的标注：采用顺序编码制，即按文献出现的先后顺序用阿拉伯数字连续编码，并将序号置于方括号中。可根据具体情况分别按下述 3种格式之一标注。

a 薛社普等[1]指出棉酚从体内排泄缓慢。

b 麦胶敏感性肠病的发病有 3种机制参与[2,4~6]。

c 间质细胞 cAMP含量测定方法见文献[7]。

正文指明原始文献作者姓名时，序号标注于作者姓名右上角（如例 a）；正文未指明作者或非原始文献作者时，序号标注于句末（如例 b）；正文直接述及文献序号将之作为语句的组成部分时，不用角码标注（如例 c）。

文后参考文献：需注意以下 2种改动之处。

a 析出文献

原：诸骏仁. 昏厥与休克. 见：董承琅，陶寿淇，陈灏珠. 实用心脏病学. 第 3版. 上海：上海科学技术出版社，1993：561-585.

新：诸骏仁. 昏厥与休克//董承琅，陶寿淇，陈灏珠. 实用心脏病学. 3版. 上海：上海科学技术出版社，1993：561-585.

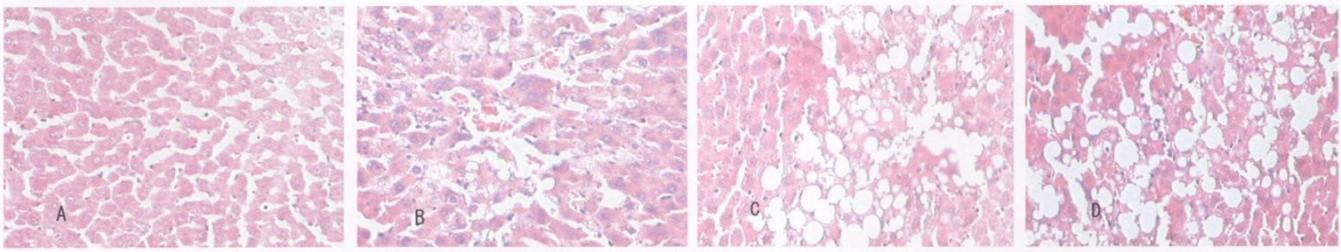
b 标准（包括国际标准、国家标准、行业标准等）

原：GB/T 3179—1992科学技术期刊编排格式.

新：全国文献工作标准化技术委员会第七分委员会. GB/T3179—1992科学技术期刊编排格式. 北京：中国标准出版社，1992.

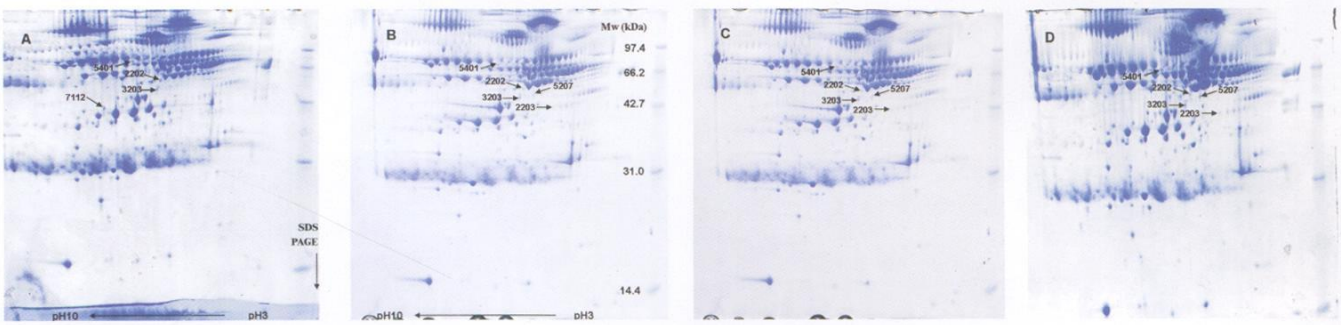
?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

二噁英慢性低剂量暴露对雌性 SD 大鼠血清蛋白的影响(正文见 163～167 页)



对照组　20 ng/(kg · d)组　50 ng/(kg · d)组　125 ng/(kg · d)组

图 1　各剂量组大鼠肝脏的组织病理学检测（× 200）

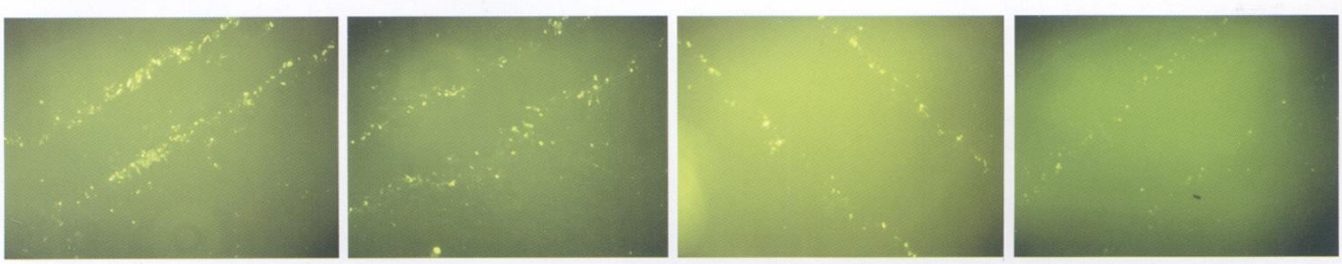


对照组　20 ng/(kg · d)组　50 ng/(kg · d)组　125 ng/(kg · d)组

Mw：分子量；　SDS PAGE：十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

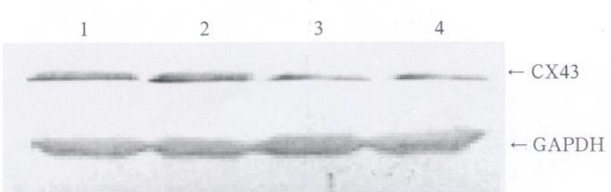
图 2　四组双向凝胶电泳图(考马斯亮蓝染色)

鱼藤酮对星形胶质细胞缝隙连接耦联功能的影响（正文见 168～170 页）



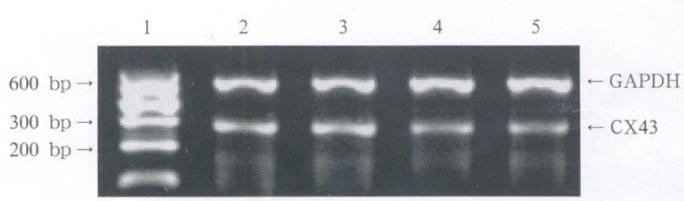
正常对照组　0.1 μmol/L 鱼藤酮组　0.5 μmol/L 鱼藤酮组　1.0 μmol/L 鱼藤酮组

图 1　各实验组细胞荧光染料扩散观察（× 100）



1：正常对照组；2：0.1 μmol/L 鱼藤酮组；
3：0.5 μ mol/L 鱼藤酮组；4：1.0 μmol/L 鱼藤酮组

图 2　鱼藤酮对星形胶质细胞 CX43 蛋白表达的影响



1：Marker；2：正常对照组；3：0.1 μmol/L 鱼藤酮组；
4：0.5 μmol/L 鱼藤酮组；5：1.0 μmol/L 鱼藤酮组

图 3　鱼藤酮对星形胶质细胞 CX43 mRNA 表达的影响

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net