

# 高糖对人晶状体上皮细胞缝隙连接细胞间通讯的影响

李霞, 刘奕志, 吴明星

(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】研究高糖对人晶状体上皮细胞缝隙连接细胞通讯活性(GJIC)的影响。【方法】将人晶状体上皮细胞(SRA01/04)培养于正常葡萄糖浓度(5.5 mmol/L),传代时将其接种于16个35 mm的培养皿中,实验分为4组(每组4个培养皿):正常糖浓度组(培养基葡萄糖含量是5.5 mmol/L)、高糖组(培养基葡萄糖含量是30 mmol/L)、佛波酯(TPA)组(阳性对照)及二甲基亚砷(DMSO)组(阴性对照)。当细胞生长至90%融合时,用划痕荧光染料示踪技术(SL/DT)检测其缝隙连接细胞间通讯活性。【结果】在高糖培养的人晶状体上皮细胞划痕荧光黄向两侧传递的细胞列数为 $2.23\pm 0.33$ ,明显少于正常糖浓度培养的人晶状体上皮细胞( $3.75\pm 0.57$ ,  $P < 0.01$ )。TPA显著抑制晶状体上皮细胞的GJIC,与正常糖浓度组比较差异具有显著性( $1.65\pm 0.26$  vs  $3.75\pm 0.57$ ,  $P < 0.01$ )。【结论】人晶状体上皮细胞缝隙连接细胞间通讯活性在高糖中受到抑制,可能在糖尿病晶状体渗透水肿和离子代谢紊乱中发挥作用。

**关键词:**晶状体上皮细胞; 糖性白内障; 缝隙连接细胞间通讯; 划痕荧光染料示踪技术

中图分类号:R776.1

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)03-0257-03

## Effect of Glucose in High Concentration on Gap Junction Intercellular Communication Activity in Human Lens Epithelial Cells

LI Xia, LIU Yi-zhi, WU Ming-xing

(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate the effects of glucose in high concentration on gap junction intercellular communication (GJIC) activity in human lens epithelial cells. 【Methods】 Human lens epithelial cells (HLECs, SRA01/04) were grown in 16 (35-mm) dishes. And they were divided into 4 groups (Every group containing 4 dishes): normal (5.5 mmol/L) glucose, high (30mmol/L) glucose, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, positive control) and Dimethyl Sulfoxide (DMSO, negative control). When the HLECs were grown to 90% confluency, the GJIC activity was evaluated by Scrape-Loading/Dye Transfer. 【Results】 A reduced number of Lucifer Yellow coupled cell layers was observed on either side of the scrape in human lens epithelial cells grown in high-glucose medium compared with the cells grown in normal medium ( $2.23\pm 0.33$  vs  $3.75\pm 0.57$ ,  $P < 0.01$ ). TPA inhibited GJIC activity significantly compared with the group of normal glucose ( $1.65\pm 0.26$  vs  $3.75\pm 0.57$ ,  $P < 0.01$ ). 【Conclusion】 Glucose in high concentration inhibits GJIC activity in human lens epithelial cells. It may contribute to osmotic damage and abnormal ionic flux in the diabetic lens.

**Key words:** lens epithelial cells; diabetic cataract; gap junction intercellular communication; Scrape-Loading/Dye Transfer

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(3):257-259, 272]

缝隙连接细胞间通讯 (gap junction intercellular communication, GJIC)的改变是白内障的发生因素之一<sup>[1-3]</sup>。晶状体上皮细胞担负着晶状体的生长、分化、代谢及对损伤修复的功能,并含有大量

的保护晶状体免受氧化损伤的酶系统。白内障的形成与晶状体上皮细胞的功能低下有关。缝隙连接 (gap junction)是相邻晶状体上皮细胞之间重要的连接方式,而GJIC是以缝隙连接为途径进行的

收稿日期:2004-09-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070802);教育部博士学科点专项科研基金资助项目(9949)

作者简介:李霞(1974-),女,广西防城人,博士生;刘奕志,教授,博士生导师.E-mail:lixiaohd@hotmail.com

细胞间的信息交流。糖尿病性白内障的发生过程中存在渗透压改变及离子平衡紊乱,而晶状体上皮细胞间的 GJIC 被认为与晶状体的渗透平衡及部分离子转运有关<sup>[4]</sup>,对出生后晶状体代谢的正常维持起着重要作用<sup>[5]</sup>,所以,研究高糖状态下晶状体上皮细胞 GJIC 改变有助于阐明糖性白内障的发生机制。晶状体缝隙连接的报道多与先天性白内障有关,与糖性白内障相关的很少。近年有学者已经注意到高糖可以引起主动脉血管平滑肌细胞、视网膜血管内皮细胞、视网膜周细胞 GJIC 的改变<sup>[6-8]</sup>,但尚未见高糖对晶状体上皮细胞 GJIC 影响的报道。本研究应用划痕荧光染料示踪技术 (scrape-loading/dye transfer, SL/DT) 观察高糖对人晶状体上皮细胞 GJIC 的影响,以探讨其在糖性白内障发生中的可能作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

人晶状体上皮细胞系 SRA01/04 在含有 150 mL/L 胎牛血清 (Hy Clone 公司) 和 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素的低糖 DMEM 培养基 (含有 5.5 mmol/L 葡萄糖, Gibco 公司), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养。传代时用 2.5 g/L 胰酶消化, 接种至 16 个 35 mm 的培养皿中。实验分 4 个组 (每组 4 个培养皿): 正常糖浓度组, 培养基是葡萄糖含量为 5.5 mmol/L 的 DMEM 培养基; 高糖组, 培养基是含有 30 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基; TPA 组, 为阳性对照, 在正常糖浓度培养基中的终浓度是  $5 \times 10^{-8}$  mol/L; DMSO 组, 为阴性对照。TPA 及 DMSO 在 GJIC 活性测定前 1 h 加入<sup>[5]</sup>。

### 1.2 GJIC 测定

当细胞生长达到 90% 融合时进行 GJIC 活性测定。所用的方法为 SL/DT: 弃去培养液, 用含有 1 mL/L 血清及 1 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$  的 Hank's 液 (HBC) 洗涤细胞 3 次, 加入 LY 1 mL, 用外科手术刀在培养皿上刻痕数条, 移入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  培养箱 3 min, 弃去染液。用 HBC 洗 3 次, 以去除游离的荧光染料及脱落的细胞, 室温下用其原培养液孵育 10 min, 让染料充分扩散, PBS 洗涤 3 次, 多聚甲醛室温固定 30 min, 激光扫描共聚焦显微镜下观

察。在 40 倍镜下随机选取划痕旁带有荧光的细胞列数进行计数。每个培养皿观察 10 个点, 每组共观察 40 个点。

### 1.3 统计分析

将每个培养皿所得的 10 个点的细胞列数取算术平均值, 作为该样本的荧光染料扩散的细胞列数。再将每组 4 个样本的荧光扩散的细胞列数值取平均值, 得到每个组的荧光扩散强度。应用 SPSS11.0 for windows 进行 one-way ANOVA。

## 2 结果

4 组 LY 向划痕两侧扩散的细胞列数平均值有差别,  $F=22.82, P=0.000$ 。高糖组 ( $2.23 \pm 0.33$ ), 少于正常糖浓度组 ( $3.75 \pm 0.57, P < 0.01$ , 图 1A, B)。TPA 作为阳性对照, 显著抑制细胞间的 GJIC, LY 仅向细胞周围 1~2 列细胞传递 ( $1.65 \pm 0.26$ , 图 1C), 与正常糖浓度组及 DMSO 组 ( $3.65 \pm 0.50$ ) 比较差异均有显著性 ( $P < 0.01$ )。DMSO 作为 TPA 的阴性对照, 细胞间 GJIC 未受抑制 (图 1D), 与正常糖浓度组比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 说明 TPA 抑制了细胞间的 GJIC, 而不是 DMSO 的作用。

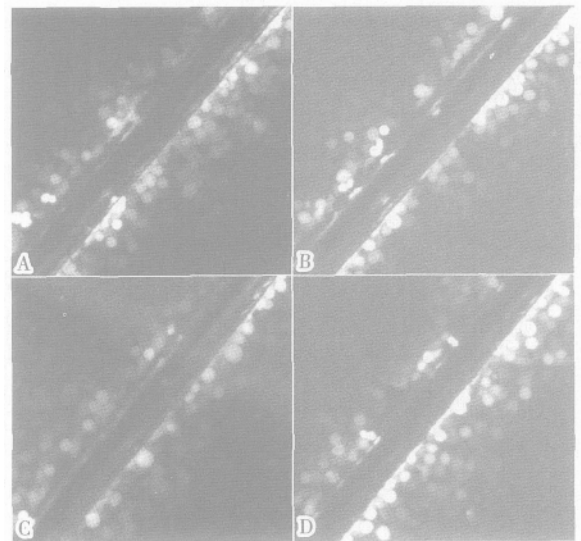


图 1 人晶状体上皮细胞 GJIC 的 SL/DT 检测

Fig.1 Analysis of gap junction intercellular communication activity in human lens epithelial cells using Scrape-Loading/Dye Transfer technique ( $\times 100$ )

A: high glucose group; B: normal glucose group; C: TPA group; D: DMSO group

### 3 讨论

缝隙连接是相邻晶状体上皮细胞的主要连接方式之一。GJIC 是细胞间的直接通讯形式。细胞之间依靠缝隙连接直接传递离子和分子质量小于 1 ku 的分子,其中包括细胞内代谢产物、 $\text{Ca}^{2+}$ 、cAMP、1,4,5-三磷酸肌醇以及一些参与细胞生长分化的调节性物质。GJIC 在胚胎发育、细胞分化和生长控制中起重要作用<sup>[9,10]</sup>。

晶状体上皮细胞之间的 GJIC 被认为与维持晶状体代谢和渗透平衡有关。敲除小鼠构成晶状体上皮细胞缝隙连接蛋白 43 (Connexin43, Cx43) 基因,对其胚胎鼠的晶状体进行组织学研究发现晶状体上皮细胞与其下面的纤维细胞分离,并在纤维细胞中,尤其在皮质深层,出现大量的空泡,同时伴有细胞外间隙的扩张,提示细胞的渗透平衡发生改变<sup>[4]</sup>。敲除 Cx43 后的胚眼晶状体的形态,大小和质量并无显著变化,提示 Cx43 并不是胚眼晶状体发育所必需,而对于出生后晶状体代谢的正常维持起着重要作用<sup>[5]</sup>。晶状体上皮细胞在晶状体内部与房水之间的离子与代谢物质的转运中担任重要作用<sup>[11]</sup>。这个动态平衡的破坏将引起晶状体代谢紊乱,而发生白内障。近年来,晶状体的 GJIC 异常已经作为白内障的可能致病因素而受到重视。

本研究发现高糖抑制人晶状体上皮细胞 GJIC。研究表明,高糖抑制主动脉血管平滑肌细胞、视网膜血管内皮细胞、视网膜周细胞的 GJIC<sup>[6-8]</sup>。目前认为糖尿病中血管通透性改变可能与这些细胞间 GJIC 的改变有关。高糖引起的晶状体上皮细胞间 GJIC 受到抑制可能通过以下几个方面引起白内障:①引起离子代谢紊乱。GJIC 与离子代谢密切相关。 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  的浓度在很大程度上受到 GJIC 的控制。例如,对于神经胶质细胞,缝隙连接使  $\text{Na}^+$  在细胞间交换,并使细胞间  $\text{Na}^+$  浓度相等<sup>[12]</sup>。关于 GJIC 与  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP 酶的活性的关系在其它类型的细胞中也有报道<sup>[13]</sup>。正常晶状体由于具有排钠储钾的能力,而处于晶状体内钾/钠比例高,(房水中钠/钾比例高),糖性白内障发生过程中,晶状体细胞水肿伴随着细胞膜通透性的改变及细胞内钾/钠比例降低,最终导致白内障发生。GJIC 受损也可能影响了  $\text{Ca}^{2+}$  的转运而引起白内障的发生。

$\text{Ca}^{2+}$  在维持晶状体透明性中具有重要作用。新近的研究表明,晶状体内部的  $\text{Ca}^{2+}$  是经由缝隙连接传递至晶状体的表面,再由晶状体上皮细胞的  $\text{Ca}^{2+}$  - ATP 酶和  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交换而进入房水<sup>[14]</sup>。②促进晶状体上皮细胞凋亡。已经有多篇文献报道 GJIC 在促进细胞凋亡中的作用<sup>[15,16]</sup>。而晶状体上皮细胞的凋亡是包括糖性白内障在内的多种类型白内障的共同病理变化,是目前白内障发病机制中重要的学说之一。③引起晶状体实质代谢紊乱。不仅晶状体上皮细胞之间存在着缝隙连接,晶状体上皮细胞与晶状体纤维之间也存在着大量的缝隙连接,也就是这样,营养物质才能从晶状体外部进入晶状体内部,而代谢物质则由内至外被排出,保证了晶状体营养和代谢。晶状体上皮细胞的 GJIC 受损必将引起晶状体整个缝隙连接网的功能受损而影响晶状体的营养及代谢。近来的研究还表明,缝隙连接还传递 ATP。对视网膜周细胞的研究表明由 Cx43 组成的缝隙连接转运 ATP 的能力是由 Cx32 组成的缝隙连接的 300 倍<sup>[17]</sup>。晶状体上皮细胞间的缝隙连接由 Cx43 组成,高糖抑制了晶状体上皮的 GJIC,其对 ATP 转运的影响尚需进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Krutovskikh V, Yamasaki H. Connexin gene mutations in human genetic diseases[J]. *Mutat Res*, 2000, 462(2-3):197-207.
- [2] Jiang H, Jin Y, Bu L, *et al.* A novel mutation in GJA3 (connexin46) for autosomal dominant congenital nuclear pulverulent cataract[J]. *Mol Vis*, 2003, 24 (9): 579-83.
- [3] Lewis S, Karrer J, Saleh S, *et al.* Synthesis and evaluation of novel aldose reductase inhibitors: Effects on lens protein kinase Cgamma[J]. *Mol Vis*, 2001, 18 (7):164-71.
- [4] Gao Y, Spray DC. Structural changes in lenses of mice lacking the gap junction protein connexin43 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39(7): 1198-209.
- [5] White TW, Sellitto C, Paul DL, *et al.* Prenatal lens development in connexin43 and connexin50 double knockout mice[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42 (12): 2916-23.
- [6] Kuroki T, Inoguchi T, Umeda F, *et al.* High glucose induces alteration of gap junction permeability and phosphorylation of connexin-43 in cultured aortic smooth muscle cells[J]. *Diabetes*, 1998, 47(6):931-36.

(下转第 272 页 to page 272)

平升高,可直接引起或通过其它机制下降调节了 IRS-1 的酪氨酸磷酸化水平,从而导致其下游信号 MAPK 的改变,使它们的酪氨酸磷酸化水平的降低明显超过蛋白表达水平自身的变化。长期的胰岛素水平升高也可能通过 IGF-1 受体刺激相关的丝氨酸激酶,影响胰岛素受体功能,导致或加重胰岛素抵抗<sup>[7]</sup>。

综上所述,可以推测胰岛素可直接作用于受体,通过改变受体后 MAPK 信号通路的活化状态而对成骨细胞的生长、增殖发挥作用,即适当浓度的胰岛素可通过激活受体酪氨酸蛋白激酶介导的 MAPK 信号途径对生长期成骨细胞的生长、增殖及代谢发挥促进作用,而高浓度胰岛素的慢性刺激则诱发胰岛素受体后信号转导降调节,可能对生长产生负性影响。

#### 参考文献:

- [1] Vignolo M, Naselli A, Dibattista E, *et al.* Growth and development in simple obesity[J]. *Eur J Pediatr*, 1998, 147(3): 242-4.
- [2] Peyssonnaud C, Eychene A. The Raf/MEK/ERK Pathway: new concepts of activation[J]. *Biol Cell*, 2001, 93(1-2):53-62.
- [3] 王 华,黎海芪,杨锡强,等. 大鼠长骨成骨细胞体外培养形态观察[J]. *第三军医大学学报*, 2002, 24(5): 603-5.
- [4] Bjornholm M, Kawano Y, Lehtihet M, *et al.* Insulin receptor substrate-1 Phosphorylation and Phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after *in vivo* insulin stimulation [J]. *Diabetes*, 1997, 46(3):524-7.
- [5] Thomas DM, Hards DK, Rogers SD, *et al.* Insulin receptor expression in bone[J]. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(9):1312-20.
- [6] Zhande R, Mitchell JJ, Wu J, *et al.* Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(4): 1016-26.
- [7] Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance[J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(3):588-97.
- [8] Sato T, Haimovici R, Kao R, *et al.* Downregulation of connexin43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells [J]. *Diabetes*, 2002,51(5): 1565-71.
- [9] Li AF, Sato T, Haimovici R, *et al.* High glucose alters connexin43 expression and gap junction intercellular communication activity in retinal pericytes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(12): 5376-82.
- [10] Guthrie SC, Gilula NB. Gap junctional communication and development[J]. *Trends Neurosci*, 1989, 12(1): 12-6.
- [11] Charles AC, Naus CC, Zhu D, *et al.* Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells[J]. *J Cell Biol*, 1992, 118(1): 195-201.
- [12] Mathias RT, Rae JL, Baldo GJ. Physiological properties of the normal lens[J]. *Physiol Rev*, 1997, 77(1) :21-50.
- [13] Xia A, Kikuchi T, Hozawa K, *et al.* Expression of connexin26 and Na, K-ATPase in the developing mouse cochlear lateral wall: functional implications[J]. *Brain Res*, 1999, 846(1):106-11.
- [14] Gao J, Sun X, Martinez-Wittinghan FJ, *et al.* Connections between connexins, calcium, and cataracts in the lens[J]. *J Gen Physiol*, 2004, 124(4): 289-300.
- [15] Krysko DV, Mussche S, Leybaert L, *et al.* Gap junctional communication and connexin43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells[J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(9):1199-207.
- [16] Kalvelyte A, Imbrasaite A, Bukauskiene A, *et al.* Connexins and apoptotic transformation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(8): 1661-72.
- [17] Goldberg GS, Moreno AP, Lampe PD. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP[J]. *J Bio Chem*, 2002, 277(39): 36725-30.

(编辑 张恩健)

(上接第 259 页 from page 259)

- [7] Sato T, Haimovici R, Kao R, *et al.* Downregulation of connexin43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells [J]. *Diabetes*, 2002,51(5): 1565-71.
- [8] Li AF, Sato T, Haimovici R, *et al.* High glucose alters connexin43 expression and gap junction intercellular communication activity in retinal pericytes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(12): 5376-82.
- [9] Guthrie SC, Gilula NB. Gap junctional communication and development[J]. *Trends Neurosci*, 1989, 12(1): 12-6.
- [10] Charles AC, Naus CC, Zhu D, *et al.* Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells[J]. *J Cell Biol*, 1992, 118(1): 195-201.
- [11] Mathias RT, Rae JL, Baldo GJ. Physiological properties of the normal lens[J]. *Physiol Rev*, 1997, 77(1) :21-50.
- [12] Rose CR, Ransom BR. Gap junctions equalize intracellular Na<sup>+</sup> concentration in astrocytes [J]. *Glia*, 1997, 20(4): 299-307.

(编辑 刘清海)