

# 间隙连接蛋白 Cx43 在去卵巢雌鼠腺垂体滤泡星形细胞中的表达

马兴 李起鸿 王全平 吕荣 张胜利

**摘要** 目的 探讨间隙连接蛋白 Cx43 在骨质疏松(OP)雌鼠腺垂体滤泡星形细胞(FS 细胞)中的表达规律及其生物学意义。方法 采用 10 月龄未孕产 SD 雌性大鼠 40 只,随机分为去卵巢组 and 对照组,于术后 6 周处死两组大鼠。处死前测量大鼠全身骨密度。取大鼠垂体,应用 SP 免疫组化方法检测大鼠腺垂体 FS 细胞中间隙连接蛋白 Cx43 的表达。结果 术后 6 周末去卵巢组大鼠全身骨密度明显低于对照组大鼠骨密度( $P < 0.01$ )。腺垂体中 Cx43 阳性表达主要定位于相邻的 FS—FS、FS—内分泌细胞中,上述细胞的胞浆和/或胞膜呈棕黄色。去卵巢组大鼠腺垂体 Cx43 的表达阳性率和阳性信号的表达强度均明显降低( $P < 0.01$ )。结论 SD 雌性大鼠去卵巢 6 周建立 OP 模型。OP 模型腺垂体中 Cx43 蛋白在上述细胞中表达下降可能是大鼠 OP 发生的一个环节。

**关键词** 骨质疏松症 间隙连接蛋白 Cx43 腺垂体滤泡星形细胞 骨密度 免疫组化

## Expression of gap junction protein connexin43 in adenohypophyseal folliculo-stellate cells of female rats during osteoporotic development

Ma Xing, Li Qihong, Wang Quanping, Lu Rong, Zhang Shengli

Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China & Department of Orthopaedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

**Abstract Objective** To investigate the expression of gap junction protein connexin 43(Cx43) in adenohypophyseal folliculo-stellate cells(FSCs) of female rats during osteoporotic development. **Methods** Postmenopausal osteoporosis models of female rats were established by bilateral ovariectomy and 40 female rats were equally randomized into 2 groups: ovariectomized group and control group. Rats in either group were killed at the end of 6 weeks after operation. Prior to their death, total skeletal BMD of every rat was measured by DEXA. The expression of Cx43 in adenohypophyseal glands of all rats was detected by SP immunohistochemical methods. **Results** Total skeletal BMD in ovariectomized group was significantly lower than that of control animals ( $P < 0.01$ ). Cx43 proteins as numerous individual spots with immunopositive brown or yellow signals were located in cytoplasm and part of the plasma membrane. Most immunostaining pituicytes were FSCs. Positive staining also could be found in certain hormone-secreting pituicytes adjacent to FSCs. The positive rate of Cx43 was significantly lower in

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院骨科(马兴、李起鸿);710032 西安,第四军医大学西京医院全军骨科研究所(王全平、吕荣、张胜利)

作者简介:马兴,男,25岁,第四军医大学西京医院全军骨科研究所医师,现为第三军医大学西南医院骨科博士研究生。荣获国家级优秀学术论文一等奖1项,多次参加国际、国内和军队学术交流,以第一作者在国家核心医学刊物发表学术论文7篇。主要研究方向:骨质疏松。

ovariectomized group than in control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** It took 6 weeks for the ovariectomized rats to show definite osteoporosis by means of significantly low BMD. The noticeable inhibition of Cx43 in FSCs in anterior pituitary glands may contribute to occurrence of rat osteoporosis in this research.

**Key words** Osteoporosis Connexin 43 Folliculo-stellate cells Bone mineral density Immunohistochemistry

骨质疏松症(osteoporosis, OP)的内分泌机理复杂。腺垂体滤泡星形细胞(folliculo-stellate cells/FSCs, 简称为FS细胞), 虽然其本身不是内分泌细胞, 但是FS细胞作为多种腺垂体内分泌细胞的干细胞, 除了在特定条件下能分化为特定的内分泌细胞之外, FS细胞还能通过细胞间隙连接、旁分泌等多种方式对腺垂体内分泌细胞的生物学行为和功能进行着精细调控<sup>[1-3]</sup>。以间隙连接蛋白Cx43(Connexin43)为蛋白分子组所构成的相邻细胞膜上的间隙连接通道结构, 是垂体细胞生命活动的重要物质基础<sup>[4]</sup>。本研究旨在应用SP免疫组化方法探讨Cx43在OP腺垂体FS细胞中的表达规律及其生物学意义。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物:** 选用10月龄未孕产SD雌性大鼠40只, 体重(337±23)g。动物购进后先于动物饲养室行适应性喂养2周, 而后随机分为去卵巢组(20只)和对照组(20只)。各组大鼠均用1%戊巴比妥钠行腹腔内麻醉(30mg/kg), 取下腹部切口, 去卵巢组行双侧卵巢切除术, 对照组仅行开腹后关腹术。术后各组大鼠分笼饲养。动物在24±2℃、通风良好、湿度60~70%的条件下用标准实验室饲料喂养, 自由进食水。

**1.2 仪器:** 美国Lunar DPX-IQ型双能X线骨密度仪, 附小动物骨密度(BMD)测量软件。

**1.3 标本采集与制备:** 于术后6周末处死去卵巢组和对照组大鼠。处死前测量大鼠全身BMD。用1%戊巴比妥钠行腹腔内麻醉, 经左心室灌注4%多聚甲醛, 取垂体, 并将垂体标本经4%多聚甲醛后固定, 脱水, 常规石蜡包埋, 制备

成4μm厚连续切片。

**1.4 试剂来源:** Cx43mAb、SP免疫组化试剂盒及DAB染色试剂盒为美国Zymed公司产品。

**1.5 免疫组化染色:** 标本行常规脱蜡至水, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性过氧化物酶, 30分钟, ddH<sub>2</sub>O 振洗, 10%正常山羊血清封闭30分钟, 倾去血清, 加Cx43mAb(1:500)37℃孵育1小时, PBS振洗后滴加生物素化二抗(1:100)37℃, 30分钟, PBS振洗, 加辣根酶标记的链霉卵白素(1:100)37℃, 10分钟, PBS振洗, DAB显色, 苏木精复染, 脱水透明封片。

**1.6 对照实验:** 以胞浆内和胞膜上出现棕黄色信号为阳性, 根据染色强度和范围分为: 阴性(-); 阳性细胞<5%; 阳性(+): 阳性细胞5%~50%; 强阳性(++): 阳性细胞>50%。设阳性对照和以PBS代替一抗的阴性对照。

**1.7 统计学分析:** 骨密度参数值用均数±标准( $\bar{x} \pm s$ )表示, *t* 检验作组间差异性比较。Cx43免疫组化结果行四格表精确概率检验。 $P < 0.05$  为显著性水平。

## 2 结果

**2.1 骨密度测量:** 术后6周末去卵巢组大鼠全身BMD明显低于对照组BMD( $P < 0.01$ )见表1。

表1 各组大鼠BMD的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	全身BMD
去卵巢组	20	0.346±0.007**
对照组	20	0.367±0.009

注: 与对照组比较 \*\* $P < 0.01$

2.2 免疫组织化学结果:腺垂体中 Cx43 阳性表达主要定位于相邻的 FS—FS、FS—内分泌细胞中,上述细胞的胞浆和/或胞膜呈棕黄色(图 1,2);FS 细胞以胞体或胞突与相邻 FS 细

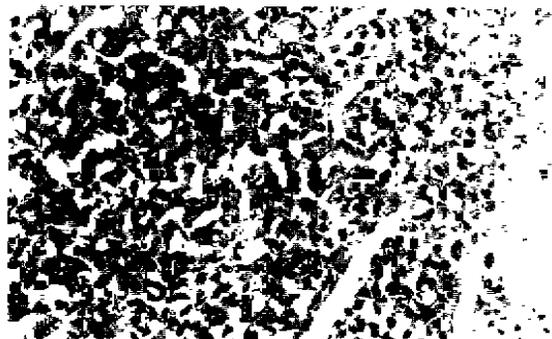


图 1 对照组标本:Cx43 在腺垂体细胞中阳性表达主要定位于相邻的 FS—FS、FS—内分泌细胞中,上述细胞的胞浆和/或胞膜呈棕黄色(一+),SP  $\times$  400

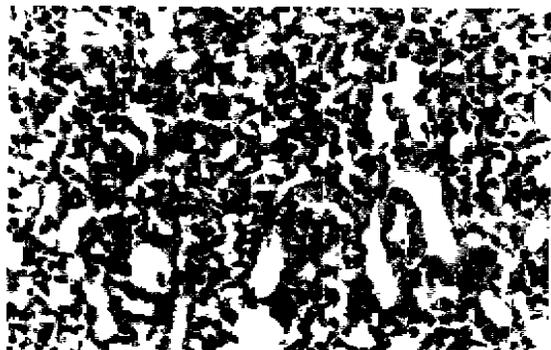


图 2 对照组标本:Cx43 在腺垂体细胞中阳性表达主要定位于相邻的 FS—FS、FS—内分泌细胞中,上述细胞的胞浆和/或胞膜呈棕黄色(+),SP  $\times$  400

胞及内分泌细胞相连,除了 FS 细胞有 Cx43 阳性表达外,与其相连的内分泌细胞的胞浆中和/或胞膜上也有棕黄色的阳性信号。对照组 Cx43 的表达阳性率为 90%,而去卵巢组中腺垂体 Cx43 的阳性表达率为 25%,显著低于对照组水平( $P < 0.01$ )(见表 2);阳性表达信号也明显减弱,在多数标本中相邻的 FS—FS、FS—内分泌细胞中无阳性表达(图 3)。

表 2 各组 Cx43 阳性表达比较

组别	例数	Cx43 阳性表达			阳性率(%)
		++	+	-	
去卵巢组	20	1	4	15	25**
对照组	20	10	8	2	90

注:与对照组比较 \*\* $P < 0.01$



图 3 去卵巢组标本:Cx43 在腺垂体细胞中无阳性表达(-),SP  $\times$  400



图 4 Cx43 阳性表达对照:在垂体后叶中 Cx43 阳性表达信号强烈呈棕黄色(++),SP  $\times$  400

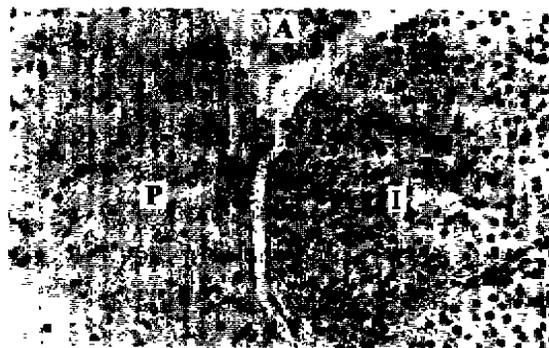


图 5 以 PBS 代替一抗的阴性对照(-):垂体前(A)、间(I)和后叶(P)无阳性表达,SP  $\times$  400

### 3 讨论

术后6周,去卵巢组大鼠全身BMD低于对照组BMD( $P < 0.01$ )<sup>[5]</sup>,提示本组SD雌性大鼠去卵巢后6周即建立OP模型。

间隙连接是普遍存在于相邻细胞间的细胞连接方式,是相邻细胞膜上的一种膜蛋白通道结构,是目前所确认的唯一能够进行细胞间直接的物质和信息交流的细胞连接方式,间隙连接蛋白Cx43作为间隙连接蛋白多基因家庭成员之一,是间隙连接重要的蛋白分子元件。机体对细胞进行严密调控的重要手段——第二信使,是细胞内维持细胞正常生命活动的关键环节之一,其中包括了:cAMP、Ca<sup>2+</sup>、IP<sub>3</sub>等小分子物质。这些小分子物质正是借助于相邻细胞间的间隙连接,把调控和协同的信号逐步传达给周围其他的细胞,从而维持着相邻的多个细胞的正常功能与活性<sup>[6,7]</sup>。越来越多的研究证实腺垂体间隙连接蛋白的表达与功能活性是“腺垂体←→性腺”回路中多个环节的重要的结构和功能枢纽。Kurono C<sup>[8]</sup>发现,幼鼠去卵巢后明显抑制FS细胞中的Cx43蛋白的表达,当给予性激素替代治疗后,FS细胞的Cx43蛋白表达及其介导的细胞间通讯功能显著增强。Cx43蛋白的表达还与雌鼠的动情周期密切相关。动情间期的Cx43蛋白数量仅为动情前期和动情期数量的一半<sup>[1]</sup>。在雌鼠妊娠晚期腺垂体FS细胞中Cx43蛋白表达显著高于其在妊娠中期的表达水平。究其原因在于性激素水平变化对间隙连接蛋白的表达有重要的调控作用<sup>[1,9]</sup>。本实验发现,去卵巢大鼠OP动物模型中腺垂体间隙连接蛋白Cx43表达显著下降,不仅从本研究角度证实了腺垂体Cx43表达与雌激素水平密切相关,而且提示以Cx43表达下降为物

质基础的FS细胞生物学行为的变化,可能是雌激素缺乏导致大鼠OP发生的一个环节,其作用机理尚待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 Soji T, Mabuchi Y, Kurono C, et al. Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microsc Res Tech*, 1997, 39: 138-149.
- 2 Koike K, Zhang ZX, Sakamoto Y, et al. The pituitary folliculo-stellate cell line TtT/GF augments basal and TRH-induced prolactin secretion by GH3 cells. *Life Sci*, 1997, 61: 2491-2497.
- 3 Renner U, Gloddek J, Arzt E, et al. Interleukin-6 is an autocrine growth factor for folliculostellate-like TtT/GF mouse pituitary tumor cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1997, 105: 345-352.
- 4 Guerineau NC, McKinney RA, Debanne D, et al. Organotypic cultures of the rat anterior pituitary: morphology, physiology and cell-to-cell communication. *J Neurosci Methods*, 1997, 73: 169-176.
- 5 Zent S, Gomea AC, Mautalen C. The effect of olpadronate in ovariectomized thyroxine-treated rats. *Bone*, 1997, 21: 329-333.
- 6 Christ GJ, Brink PR, Ramanan SV. Dynamic gap junctional communication; a delimiting model for tissue responses. *Biophys J*, 1994, 67: 1335-1344.
- 7 Bevens CG, Kordel M, Rhee SK, et al. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J Biol Chem*, 1998, 273: 2808-2816.
- 8 Kurono C. Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland; VI. Development of gap junctions between folliculo-stellate cells under the influence of ovariectomy and sex steroid in the female rat. *Anat Rec*, 1996, 244: 366-373.
- 9 Soji T, Yashiro T, Herbert DC. Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland; IV. Changes in cell-to-cell communications during pregnancy. *Anat Rec*, 1992, 233: 97-102.