

## Cx43 和 Pax3 蛋白在早期人胎小肠黏膜的表达及意义

张泳<sup>1</sup> 刘学红<sup>2△</sup>

(<sup>1</sup>绍兴文理学院医学院医学实验中心, <sup>2</sup>组织学与胚胎学教研室 浙江 绍兴 312000)

缝隙连接(gap junction),又称间隙连接、通讯连接,是由两个相邻细胞之间的连接通道而形成的一种特殊膜结构。Cx43 是一种主要的细胞间缝隙连接蛋白,Cx43 基因的表达状态与胚胎发育、细胞诱导、分化、生长控制、细胞凋亡等生物过程有着十分密切的关系<sup>[1-3]</sup>。Pax3 基因是进化高度保守的 Pax 基因家族中的一员,其编码的 128 个氨基酸组成的成对结构域普遍存在于各种生物体内。Pax3 作为一种重要的调控基因,其蛋白能够在体外与某些 DNA 靶序列结合并激活下游报告基因的转录,在胚胎发育过程中对组织和器官的特异化起着重要的调控作用<sup>[4]</sup>。目前关于 Cx43 和 Pax3 蛋白在动物和人肠组织中的病理生理机制研究报道较多<sup>[5-7]</sup>,但关于 Cx43 和 Pax3 蛋白在早期人胎小肠黏膜层组织细胞发育过程中的表达、分布规律及作用机制的研究,国内外未见文献报道。本文应用免疫组织化学方法,研究早期人胎小肠生长发育过程中,Cx43 和 Pax3 蛋白在小肠黏膜层的分布、变化趋势,探讨两者在小肠黏膜层组织细胞生长发育过程中的作用及意义。

### 资料和方法

**胚胎收集与分组** 收集意外怀孕行人工流产术的、发育正常的人群胎标本 14 例,并根据孕妇末次月经时间和 B 超检测胎儿双顶径数据确定其胎龄为 7~15 周。以每 4 周为单位计算月龄,每个月龄为 1 个研究组,其例数分布如下:2 个月龄(5~8 周)组 5 例,3 个月龄(9~12 周)组 5 例,4 个月龄(13~16 周)4 例。

**取材和免疫组织化学染色分析** 从流产胎儿内取出小肠,分别从每例小肠标本中截取约 2 cm,用 4℃生理盐水冲洗管腔,放入 10%中性甲醛水溶液中固定 12 h 后取出,流水冲洗 30 min,行常规脱水、透明、浸蜡和包埋。石蜡切片厚 4 μm,每个标本取 4 片,行免疫组织化学染色(所用试剂包括 Cx43 和 Pax3 多克隆抗体及其辅助试剂盒均购于武汉博士德生物制品有限公司);免疫组化染色采用 SABC 法,即切片常规脱蜡至水→3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性酶→微波修复抗原→正常山羊血清封闭→滴加一抗(抗体浓度为 1:120)→生物素化山羊血清→SABC→DAB 显色(在以上各步之间均用 PBS 洗涤 5 min×3 次)→苏木精轻度复染,然后脱水,透明,中性树胶封片,显微镜观察。

**对照实验** 用 PBS 替代一抗、二抗作阴性对照,用已知阳性片作阳性对照。

### 结果

切片经免疫组织化学染色后,可见 Cx43 和 Pax3 蛋白阳

性表达的细胞胞质或胞膜呈淡黄色、黄色或褐黄色,细胞核不着色。2 个月龄时,Cx43 蛋白在人胎小肠黏膜层组织细胞中阴性表达,Pax3 蛋白则在部分细胞的胞质呈阳性表达(图 1A、B),此时肠腺尚未完全形成。3 个月龄时,肠腺形成,Cx43 和 Pax3 蛋白在小肠黏膜层细胞的胞质弱阳性或阳性表达,绒毛上皮细胞阳性表达较肠腺上皮细胞弱(图 1C、D)。4 个月龄时,Cx43 和 Pax3 蛋白在小肠黏膜上皮细胞的胞质呈阳性或强阳性表达,但在肠腺上皮细胞呈最强阳性表达(图 1E、F)。

### 讨论

包括人在内的哺乳动物的肠黏膜上皮是机体代谢最活跃的場所,正常小肠黏膜上皮细胞之间主要依靠紧密连接、中间连接、桥粒、缝隙连接等相互连接。其中缝隙连接是由两个相邻细胞之间的连接通道而形成的一种特殊膜结构。相邻细胞间通过缝隙连接所介导的细胞间通讯,进行信息、能量和物质的交换,参与细胞间代谢偶联和电偶联,对细胞的新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理过程起着重要的调控作用。缝隙连接通道的主要成分是连接蛋白,其中 Cx43 蛋白是一种主要的细胞缝隙连接蛋白。Pax3 蛋白是一种重要的转录因子,可以通过控制靶基因表达而调控人和哺乳动物胚胎的生长发育<sup>[8]</sup>。本实验结果显示,在人胎 2 个月龄时,Cx43 蛋白在小肠黏膜层细胞呈阴性表达,Pax3 蛋白在小肠黏膜部分上皮细胞胞质呈阳性表达;3~4 个月龄时,Cx43 和 Pax3 蛋白在小肠黏膜层均呈阳性表达且逐渐增强。我们的研究结果与刘婧等<sup>[9]</sup>研究结果“Cx43 mRNA 在正常胃黏膜组织胃腺区呈中等阳性表达”相似,说明 Cx43 和 Pax3 基因参与黏膜组织细胞的分化、增殖活动。我们的研究结果提示在 2 个月龄前的人胎小肠黏膜组织细胞已经被细胞调控因子 Pax3 所启动,但仍处于发育的幼稚阶段,绒毛上皮和肠腺的形态还未分化、发育完善,细胞比较幼稚,细胞间还没有形成有效的缝隙连接通讯,这时期黏膜层大部分细胞的生长发育、分化、增殖方向可能主要由细胞自身基因的调控所决定。随着胎龄增大,小肠黏膜层部分细胞逐渐发育成熟,Cx43 和 Pax3 蛋白在黏膜层表达越来越强,表明在黏膜上皮细胞的分化、发育过程中,Cx43 和 Pax3 蛋白逐渐取代细胞自身基因的调控作用。在人胎 3 个月龄时,小肠的绒毛上皮在小肠绒毛中分化为形态较完整的柱状细胞。随着胎龄增大,黏膜层部分细胞逐渐发育成熟,细胞间缝隙连接通讯渠道逐渐形成。细胞数量增加、体积增大、黏膜层增厚,均导致黏膜层组织细胞受外界环境的影响越来越大,逐渐超

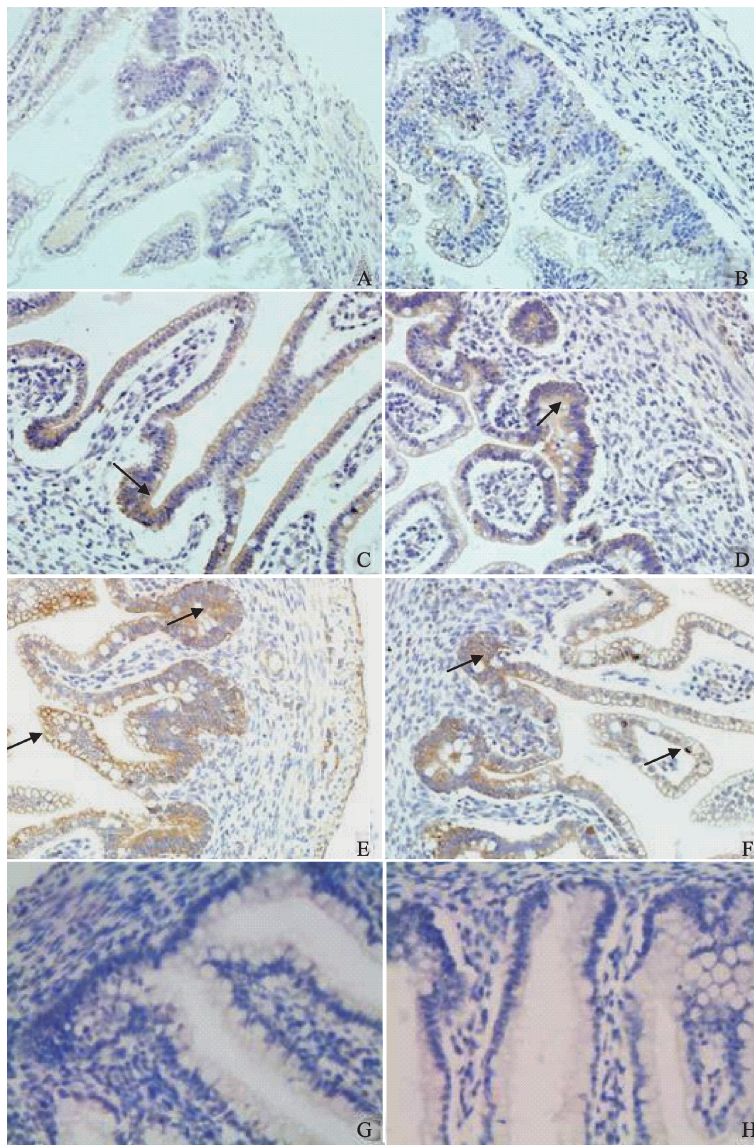


图1 Cx43和Pax3蛋白在早期人胎小肠黏膜的表达(免疫组织化学染色,×400)

Fig 1 Expressions of Cx43 and Pax3 proteins in the mucous membrane of small intestine in human early fetus (Immunohistochemical staining, ×400)

A: Negative immunostaining of Cx43 protein in 2-month-old; B: Positive immunostaining of Pax3 protein (↑) in some cells located in 2-month-old; C: Positive or weak immunostaining of Cx43 protein (↑) in 3-month-old; D: Positive or weak immunostaining of Pax3 protein (↑) in 3-month-old; E: Positive immunostaining of Cx43 protein (↑) in 4-month-old; F: Positive immunostaining of Pax3 protein (↑) in 4-month-old; G: Negative control of Cx43 protein in 4-month-old; H: Negative control of Pax3 protein in 4-month-old

出自身基因的调控能力。此阶段,神经系统和循环系统尚未建立或未发育完善,长距离信息传递难以进行,胚胎肠黏膜层细胞的增殖、分化与生长发育离不开细胞间化学信息的交换。据报道<sup>[10]</sup>,缝隙连接在调节细胞感受信号传导的过程中,可能会激活、产生许多可溶性细胞因子。这些细胞因子都是作用于局部的生化介质,可直接和间接地作用于黏膜细胞,激活靶细胞合成、分泌大量具有细胞保护作用的物质,对黏膜的血流、再生起调节作用。根据实验结果,我们推测人胎3个月后,大量Cx43蛋白在小肠黏膜层肠腺上皮细胞中表达,不仅起到细胞间信息传递的功能,可能还具有抑制肠腺上皮细胞过度增生,维持肠黏膜层组织细胞的正常分化、

发育、增殖的微环境。我们的前期实验结果显示,2~4个月龄的人胎小肠肌间神经丛细胞,随着胎龄增大,Cx43和Pax3蛋白的表达由全部细胞阴性→部分细胞阳性→大部分细胞阳性发展,说明Cx43和Pax3蛋白在人胎小肠肌间神经丛细胞的表达基本上与小肠黏膜层的表达呈同步表达趋势。同样,我们在人胚胎脊髓发育过程中也发现上述结果<sup>[11]</sup>。因此,我们认为Cx43和Pax3蛋白在人胚胎小肠黏膜层的表达与肌层相似。

综上所述,我们认为在早期人胎小肠黏膜层组织细胞发育、分化、增殖的过程中,Pax3和Cx43起着协同作用,共同参与调节肠壁黏膜层组织细胞的生长发育。(下转第662页)