

# 不同固定剂对高渗状态下角膜上皮细胞中 YAP 核质定位的影响

戴义芹 张婧 徐建江

复旦大学附属眼耳鼻喉科医院眼科 国家卫生健康委员会近视眼及相关眼病重点实验室  
中国医学科学院近视眼及相关眼病重点实验室, 上海 200031

通信作者: 徐建江, Email: jianjiangxu@126.com

**【摘要】 目的** 探讨不同固定剂对高渗状态下角膜上皮细胞中 Yes 相关蛋白(YAP)核质定位的影响。

**方法** 将永生化人角膜上皮细胞分为对照组和高渗组, 常规培养 1 d 后高渗组细胞采用 450 mOsm 渗透压的氯化钠溶液处理 1 h, 对照组不做特殊处理。采用 4 种不同的固定剂(4% 多聚甲醛、-20 °C 预冷无水乙醇、-20 °C 预冷甲醇丙酮 1:1 混合液、Zamboni 固定液)固定细胞 20 min, 行免疫荧光染色, 观察对照组与高渗组细胞 YAP 在细胞内的定位变化情况。**结果** 4% 多聚甲醛固定后, 角膜上皮细胞形态较好, 对照组与高渗组细胞中 YAP 主要集中在细胞核内, 对照组与高渗组细胞核内 YAP 平均荧光强度比较, 差异无统计学意义( $t = 1.803, P = 0.121$ ); 无水乙醇固定后角膜上皮细胞呈现一定程度的皱缩变形, YAP 荧光染色弥散, 2 个组细胞中 YAP 阳性信号主要定位在细胞质中。与对照组相比, 高渗组角膜上皮细胞核中 YAP 平均荧光强度有所降低, 差异无统计学意义( $t = 0.803, P = 0.453$ )。甲醇丙酮 1:1 混合液固定后角膜上皮细胞形态不佳, YAP 主要定位在细胞质中, 高渗组细胞核内 YAP 荧光强度较对照组有所降低, 差异无统计学意义( $t = 1.067, P = 0.327$ )。Zamboni 固定液固定后细胞结构完整, 轮廓清晰, 能明显观察到不同状态下角膜上皮细胞中 YAP 核质转位现象。高渗组 YAP 平均荧光强度为  $197.5 \pm 34.5$ , 明显高于对照组的  $62.2 \pm 10.0$ , 差异有统计学意义( $t = 7.530, P < 0.001$ )。**结论** 在免疫荧光染色实验中, 角膜上皮细胞中 YAP 的核质定位会受到不同固定剂处理的影响, 应用 Zamboni 固定液比 4% 多聚甲醛、无水乙醇、甲醇丙酮 1:1 混合液能更好地观察到高渗刺激后 YAP 的核移位现象。

**【关键词】** 干眼; 泪液渗透压; 角膜上皮细胞; 免疫荧光技术; 固定剂; Yes 相关蛋白核质定位

**基金项目:** 国家自然科学基金(82201150、82171020)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240701-00170

## Effects of different fixatives on the nuclear-cytoplasmic localization of YAP in human corneal epithelial cells under hyperosmotic stress

Dai Yiqin, Zhang Jing, Xu Jianjiang

Eye Institute and Department of Ophthalmology, Eye & ENT Hospital, Fudan University, NHC Key Laboratory of Myopia and Related Eye Diseases, Key Laboratory of Myopia and Related Eye Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences, Shanghai 200031, China

Corresponding author: Xu Jianjiang, Email: jianjiangxu@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the impact of various fixatives on the nuclear-cytoplasmic localization of Yes-associated protein (YAP) in human corneal epithelial cells under hyperosmotic stress condition. **Methods** Immortalized human corneal epithelial cells were divided into control group and hypertonic group. After 1 day of normal culture, cells of the hypertonic group were exposed to hyperosmotic medium at 450 mOsm by adding sodium chloride for 1 hour. No special treatment was given to the control group. Both groups of cells were fixed with four different fixatives, including 4% paraformaldehyde (PFA), -20 °C precooled absolute ethanol, -20 °C precooled methanol-acetone 1:1 mixture, and Zamboni fixative solution for 20 minutes. Subsequent to fixation, immunofluorescent staining procedures were performed to identify the intracellular localization of YAP in the two groups. **Results** After fixation with 4% PFA, human corneal epithelial cells showed normal morphology with YAP

mainly in the nucleus in both groups, and there was no significant difference in the mean nuclear YAP fluorescence intensity between the two groups ( $t = 1.803, P = 0.121$ ). After fixation with absolute ethanol, cells showed some degree of shrinkage and deformation, diffuse YAP fluorescence staining with YAP-positive signals mainly localized in the cytoplasm in both groups, and the mean nuclear YAP fluorescence intensity was slightly decreased in the hypertonic group compared with the control group, but the difference was not statistically significant ( $t = 0.803, P = 0.453$ ). After fixation with methanol-acetone 1:1 mixture, cells were crenulated with YAP mainly in the cytoplasm, and the mean nuclear YAP fluorescence intensity in the hypertonic group was slightly decreased compared with the control group, but the difference was not statistically significant ( $t = 1.067, P = 0.327$ ). After fixation with Zamboni solution, the cell structure was complete and clearly outlined, and the YAP nucleoplasmic translocation phenomenon could be clearly observed in cells in different states. The mean nuclear YAP fluorescence intensity in the hypertonic group was  $197.5 \pm 34.5$ , which was significantly higher than  $62.2 \pm 10.0$  in the control group ( $t = 7.530, P < 0.001$ ).

**Conclusions** In the immunofluorescence staining experiment, the nucleoplasmic localization of YAP in corneal epithelial cells is affected by different fixative treatments. Zamboni fixative is better than 4% PFA, absolute ethanol, and methanol-acetone 1:1 mixture in observing nuclear translocation of YAP after hypertonic stimulation.

**[Key words]** Dry eye syndrome; Tear film osmolarity; Corneal epithelial cells; Immunofluorescence; Fixatives; Yes-associated protein nuclear-cytoplasmic localization

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (82201150, 82171020)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240701-00170

Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 是一类核质穿梭蛋白, 其亚细胞定位对于细胞增殖、凋亡、器官发育及疾病的发生和发展至关重要<sup>[1]</sup>。YAP 的生物活性主要受 Hippo 通路的调控。当 Hippo 通路开启时, YAP 被上游激酶磷酸化, 以非活性形式存在于细胞质中; 相反, 当 Hippo 通路关闭时, YAP 活化并进入细胞核, 与 TEAD 等转录因子结合, 调控下游基因的表达<sup>[2]</sup>。作为 Hippo 通路的核心效应因子, YAP 参与多种生理病理过程, 深入研究 YAP 的活性及其在细胞核与细胞质之间的定位规律, 对于揭示疾病发生的机制及探索新型治疗策略具有重要意义。在干眼的病理过程中, 泪液渗透压升高会诱导角膜上皮细胞内 YAP 的激活和核转位, 进而诱发角膜炎症反应<sup>[3]</sup>。为了在体外模拟这一病理过程, 研究者通常使用添加氯化钠的高渗培养液处理角膜上皮细胞, 这种方法已被广泛应用于构建干眼细胞模型<sup>[4]</sup>。然而, 在应用上述细胞模型进行干眼药物的研究及药效评估时, 能否对 YAP 等关键核质穿梭蛋白进行正确的亚细胞定位分析尤为重要。

在 YAP 定位的研究中, 常用的实验技术包括 Western blot、免疫胶体金标记、免疫荧光技术等<sup>[5]</sup>, 其中使用激光扫描共聚焦显微镜观察免疫荧光染色后目的蛋白的定位是一种简便且直观的方法。在免疫荧光实验中, 固定剂的选择对于确保实验结果的准确性和可靠性至关重要。不同的固定方法可能影响细胞的形态和细胞内蛋白的定位。有研究表明, 在甲醇固定的人类肺成纤维细胞中, 转录因子干扰素调节因子 3

(interferon regulatory factor 3, IRF3) 主要存在于细胞质中, 而当使用 4% 中性甲醛固定液或者 4% 多聚甲醛固定时, IRF3 则主要定位在细胞核内<sup>[6]</sup>。钠-钾 ATP 酶是一类胞膜蛋白, 小鼠海马神经元的免疫荧光染色结果显示, 4% 多聚甲醛固定和乙二醛固定的样本中钠-钾 ATP 酶分布不同。在 4% 多聚甲醛固定的神经元中, 阳性信号主要集中在细胞核和细胞质, 而在乙二醛固定的神经元中, 能检测到正确的钠-钾 ATP 酶膜定位信号<sup>[7]</sup>。因此, 在免疫荧光实验中, 研究者需要根据所要检测的抗原特性以及定位选用合适的固定剂。本研究拟探讨不同固定剂对高渗状态下角膜上皮细胞中 YAP 核转位的影响, 为进一步研究干眼中 YAP 类穿梭蛋白的细胞内定位与功能提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** 永生化人角膜上皮细胞系 (human corneal epithelial cells, hTCEpi) 由山东省眼科医院史伟云教授馈赠。

**1.1.2 主要试剂及仪器** DMEM/F12 培养基 (SH30023, FS, 美国 HyClone 公司); 胎牛血清 (10099141C)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA (25200114, 美国 Gibco 公司); 青霉素-链霉素-新霉素 (penicillin-streptomycin-neomycin, PSN) 抗生素混合物 (15640055)、Hoechst 33342 荧光染料 (H1399, 美国 ThermoFisher 公司); 兔抗人 YAP1 抗体 (A11264, 武汉

Abclonal 公司); Alexa Fluor 555 标记驴抗兔 IgG 荧光二抗 (A-31572, 美国 Invitrogen 公司); QuickBlock™ 免疫染色封闭液 (P0260)、SignalUp™ 免疫染色一抗稀释液 (P0277)、免疫荧光染色二抗稀释液 (P0108, 上海碧云天公司); 4% 多聚甲醛 (PH0427)、Zamboni 固定液 (PH0991, 福州飞净生物公司); Triton X-100 (X100PC, 美国 Sigma 公司)。Leica SP8 激光扫描共聚焦显微镜 (德国莱卡公司); 光学显微镜 (Axio observer, 德国蔡司公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** hTCEpi 用含 10% 胎牛血清和 1% PSN 混合液的 DMEM/F12 培养基培养。细胞于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化传代, 并取 1×10<sup>5</sup> 个/ml 细胞接种于 24 孔板爬片上, 每孔 400 μl。将细胞分为对照组和高渗组, 第 2 天对照组细胞不做特殊处理, 高渗组细胞采用 450 mOsm 渗透压的氯化钠溶液处理。继续放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1 h<sup>[8-9]</sup>。

**1.2.2 细胞固定** 从培养箱中取出细胞, 吸弃上清, 预热磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗 3 次。每孔分别加入 500 μl 固定剂固定 20 min<sup>[10-14]</sup>。使用 4 种固定液, 分别为 -20 °C 预冷无水乙醇、-20 °C 预冷甲醇丙酮 1:1 混合液、4% 多聚甲醛和 Zamboni 固定液。固定结束后用 PBS 洗 3 次, 进行后续实验。

**1.2.3 光学显微镜下观察细胞形态变化** 2 个组细胞经不同固定剂固定后, 置于光学显微镜下观察细胞形态, 并在 400 倍镜下采集图像, 比较各组细胞的形态学变化。

**1.2.4 免疫荧光染色法检测 YAP 荧光强度** 细胞经固定后用 0.3% Triton X-100 室温透化 15 min, PBS 洗 3 次。通用型免疫荧光染色封闭液室温封闭 30 min 后去除封闭液。在孔板爬片上加 120 μl YAP1 一抗稀释液 (1:200), 孔板置于湿盒内 4 °C 孵育过夜。PBS 洗净一抗后加入 IgG 荧光二抗稀释液 (1:1 000) 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次。Hoechst 33342 (1:2 000) 染核后用 50% 甘油封片, 激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。YAP 阳性表达表现为红色荧光, 存在于细胞质和细胞核中。采用 ImageJ 软件对细胞核中 YAP 平均荧光强度进行半定量分析。YAP 平均荧光强度 = 区域荧光强度总和/区域面积。实验独立重复 4 次。

## 1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。对照组与高渗组细胞中 YAP 平均荧光强度比较采用独立样本 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 4 种固定剂对角膜上皮细胞形态的影响

光学显微镜下观察各组细胞形态发现, 4% 多聚甲醛与 Zamboni 固定液固定后, 对照组和高渗组细胞呈上皮样, 形态较好, 轮廓清晰; 无水乙醇、甲醇丙酮 1:1 混合液固定后 2 个组细胞均呈现一定程度的皱缩和变形, 细胞结构不完整 (图 1)。

### 2.2 4% 多聚甲醛固定对角膜上皮细胞中 YAP 核定位的影响

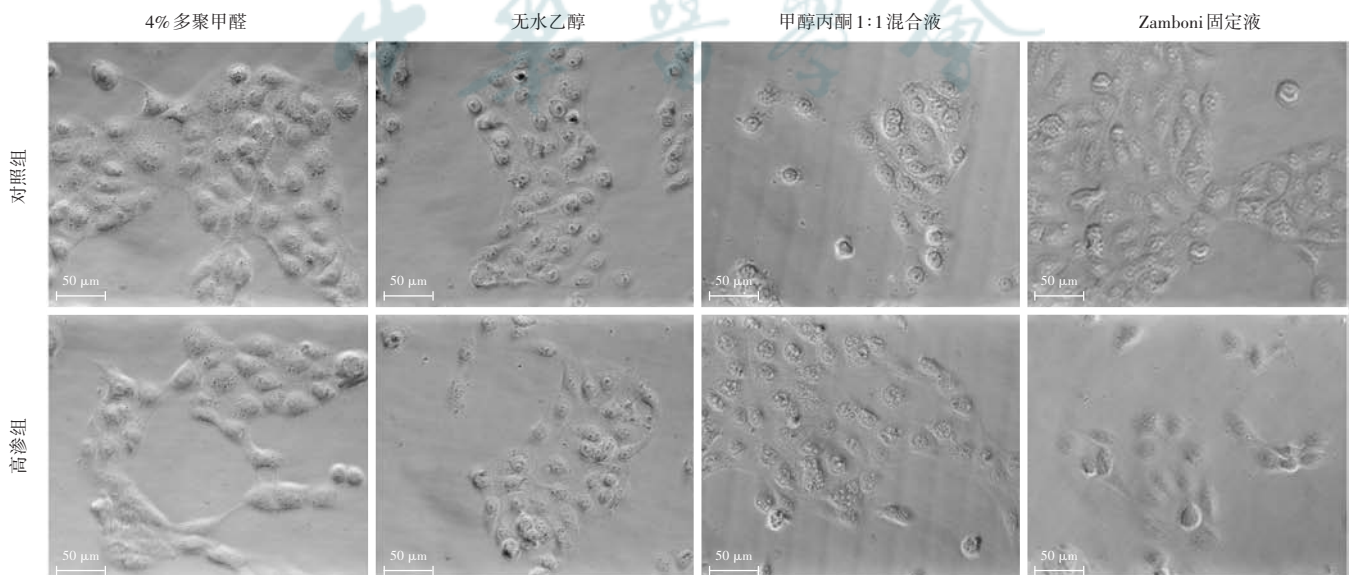


图 1 4 种固定剂对高渗组和对照组角膜上皮细胞形态变化的影响 (×400, 标尺 = 50 μm)

Figure 1 Effects of four fixatives on the morphology of human corneal epithelial cells in hypertonic group and control group (×400, scale bar = 50 μm)

4%多聚甲醛固定角膜上皮细胞后,免疫荧光染色结果显示细胞核质分界不清,对照组部分细胞质中可见少量荧光信号,大部分信号聚集在细胞核中,呈现核染色假阳性。经高渗处理后 YAP 大部分存在于细胞核中(图 2A)。高渗组角膜上皮细胞核中 YAP 平均荧光强度为  $155.1 \pm 13.7$ ,略高于对照组的  $132.4 \pm 21.2$ ,差异无统计学意义( $t = 1.803, P = 0.121$ )(图 2B)。

### 2.3 无水乙醇固定对角膜上皮细胞中 YAP 核定位的影响

无水乙醇固定角膜上皮细胞后,免疫荧光染色结果显示 YAP 信号呈弥散状,核形态较差。细胞质内可见 YAP 阳性信号,细胞核内信号较少。经高渗处理后,未观察到明显的 YAP 核转位现象(图 3A)。对照组与高渗组角膜上皮细胞核中 YAP 的平均荧光强度分别为  $31.4 \pm 11.1$  和  $26.6 \pm 4.8$ ,差异无统计学意义( $t = 0.803, P = 0.453$ )(图 3B)。

### 2.4 甲醇丙酮 1:1 混合液固定对角膜上皮细胞中 YAP 核定位的影响

甲醇丙酮 1:1 混合液固定角膜上皮细胞后,免疫荧光染色结果显示细胞略有变形,尤其是核形态较差,荧光信号不均匀, YAP 主要定位在细胞质中,核内见少量阳性信号分布。经高渗处理后未观察到明显的 YAP 核转位现象(图 4A)。对照组与高渗组细胞核内 YAP 平均荧光强度分别为  $37.4 \pm 10.3$  和  $29.8 \pm 9.8$ 。高渗处理后细胞核内的荧光强度有所下降,但差异无统计学意义( $t = 1.067, P = 0.327$ )(图 4B)。

### 2.5 Zamboni 固定液固定对角膜上皮细胞中 YAP 核定位的影响

Zamboni 固定液固定角膜上皮细胞后,免疫荧光染色结果显示 YAP 荧光信号强且染色清晰,极少非特异性背景着色,细胞核质界限分明。对照组 YAP 主要

集中在细胞质内,经高渗处理后 YAP 聚集在细胞核内,细胞质及细胞核荧光对比明显(图 5A)。对照组与高渗组角膜上皮细胞核中 YAP 平均荧光强度分别为  $62.2 \pm 10.0$  和  $197.5 \pm 34.5$ ,高渗处理后细胞核中 YAP 荧光强度较对照组明显升高,差异有统计学意义( $t = 7.530, P < 0.001$ )(图 5B)。

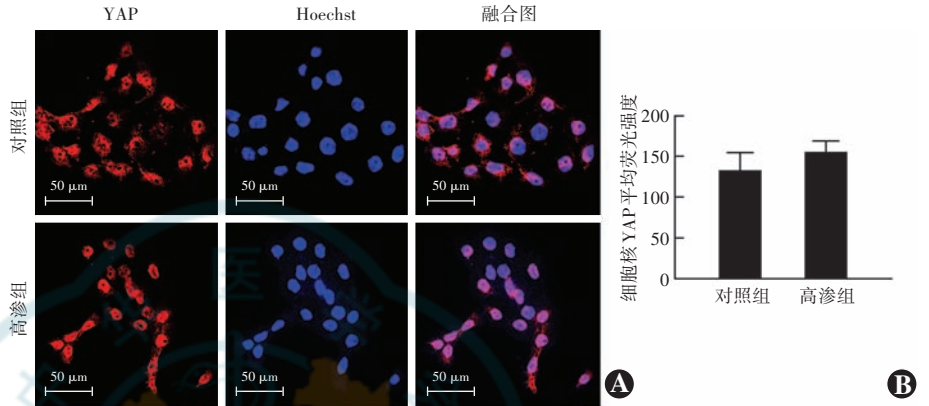


图 2 4%多聚甲醛固定后各组角膜上皮细胞中 YAP 免疫荧光染色结果 A: YAP 呈红色荧光 (Alexa Fluor 555), 细胞核呈蓝色荧光 (Hoechst)。对照组与高渗组细胞中 YAP 染色均集中在核内 ( $\times 630$ , 标尺 =  $50 \mu\text{m}$ ) B: 2 个组细胞核内 YAP 平均荧光强度定量分析 2 个组细胞核内 YAP 平均荧光强度比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (独立样本  $t$  检验,  $n = 4$ ) YAP: Yes 相关蛋白

Figure 2 Immunofluorescence staining of YAP in human corneal epithelial cells in two groups after 4% paraformaldehyde fixation A: YAP appeared red fluorescence (Alexa Fluor 555) and nuclei showed blue fluorescence (Hoechst). YAP was mainly in the nucleus in both control group and hypertonic group ( $\times 630$ , scale bar =  $50 \mu\text{m}$ ) B: Quantitative analysis of the mean nuclear YAP fluorescence intensity in two groups There was no significant difference in the mean nuclear YAP fluorescence intensity between the two groups ( $P > 0.05$ ) (Independent samples  $t$ -test,  $n = 4$ ) YAP: Yes-associated protein

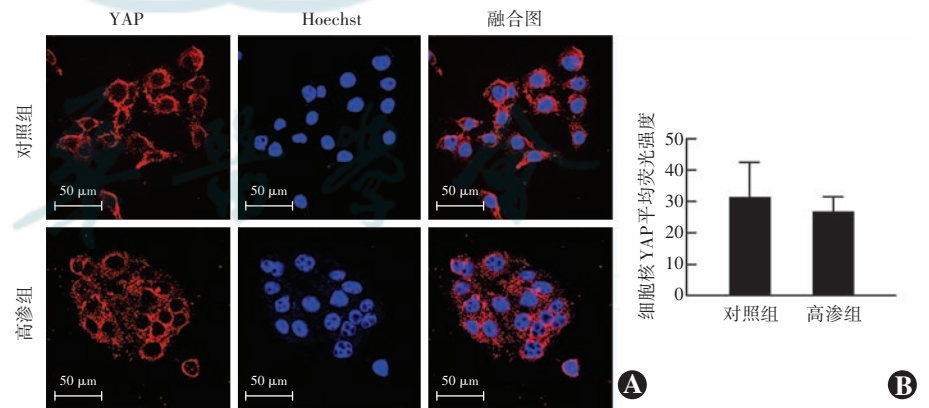
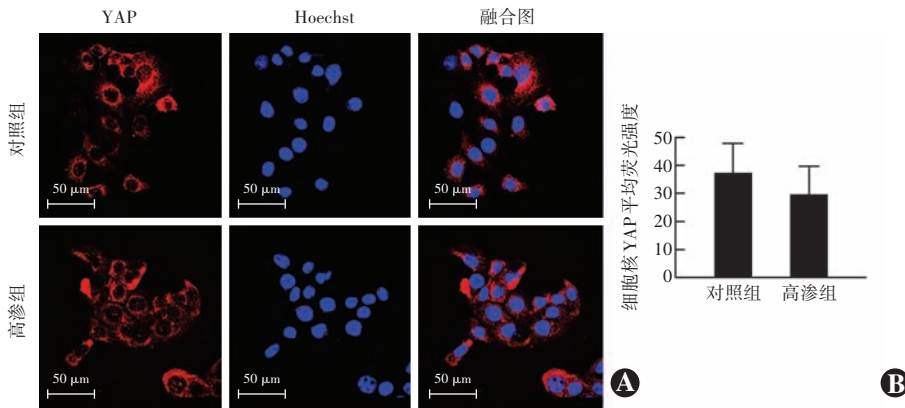


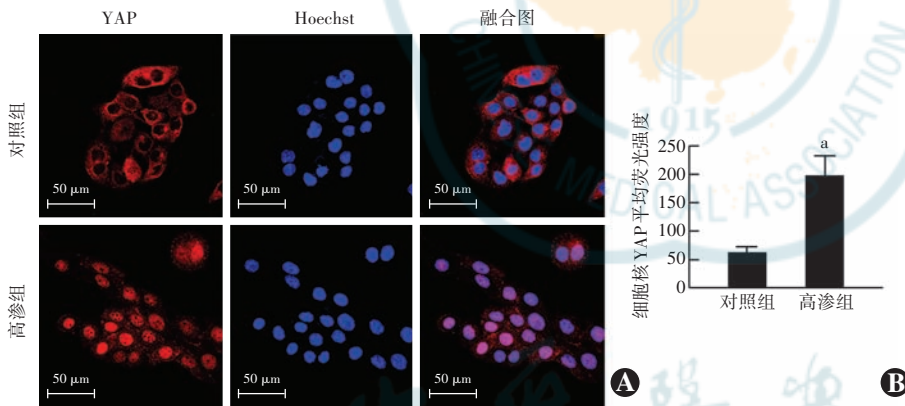
图 3 无水乙醇固定后各组角膜上皮细胞中 YAP 免疫荧光染色结果 A: YAP 呈红色荧光 (Alexa Fluor 555), 细胞核呈蓝色荧光 (Hoechst)。对照组与高渗组细胞 YAP 染色大部分呈现细胞质着色 ( $\times 630$ , 标尺 =  $50 \mu\text{m}$ ) B: 2 个组细胞核内 YAP 平均荧光强度定量分析 2 个组细胞核内 YAP 平均荧光强度比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (独立样本  $t$  检验,  $n = 4$ ) YAP: Yes 相关蛋白

Figure 3 Immunofluorescence staining of YAP in human corneal epithelial cells in two groups after absolute ethanol fixation A: YAP appeared red fluorescence (Alexa Fluor 555) and nuclei showed blue fluorescence (Hoechst). YAP was mainly in the cytoplasm in both control group and hypertonic group ( $\times 630$ , scale bar =  $50 \mu\text{m}$ ) B: Quantitative analysis of the mean nuclear YAP fluorescence intensity in two groups There was no significant difference in the mean nuclear YAP fluorescence intensity between the two groups ( $P > 0.05$ ) (Independent samples  $t$ -test,  $n = 4$ ) YAP: Yes-associated protein



**图 4** 甲醇丙酮 1:1 混合液固定后各组角膜上皮细胞中 YAP 免疫荧光染色结果 A: YAP 呈红色荧光 (Alexa Fluor 555), 细胞核呈蓝色荧光 (Hoechst)。对照组与高渗组细胞 YAP 荧光信号主要集中在细胞质中 ( $\times 630$ , 标尺 =  $50 \mu\text{m}$ ) B: 2 个组细胞核内 YAP 平均荧光强度定量分析 2 个组细胞核内 YAP 平均荧光强度比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (独立样本  $t$  检验,  $n = 4$ ) YAP: Yes 相关蛋白

**Figure 4 Immunofluorescence staining of YAP in human corneal epithelial cells in two groups after methanol-acetone 1:1 mixture fixation** A: YAP appeared red fluorescence (Alexa Fluor 555) and nuclei showed blue fluorescence (Hoechst). YAP was mainly in the cytoplasm in both control group and hypertonic group ( $\times 630$ , scale bar =  $50 \mu\text{m}$ ) B: Quantitative analysis of the mean nuclear YAP fluorescence intensity in two groups There was no significant difference in the mean nuclear YAP fluorescence intensity between the two groups ( $P > 0.05$ ) (Independent samples  $t$ -test,  $n = 4$ ) YAP: Yes-associated protein



**图 5** Zamboni 固定液固定后各组角膜上皮细胞中 YAP 免疫荧光染色结果 A: YAP 呈红色荧光 (Alexa Fluor 555), 细胞核呈蓝色荧光 (Hoechst)。对照组细胞 YAP 呈现细胞质着色; 高渗组细胞 YAP 荧光信号聚集在核内 ( $\times 630$ , 标尺 =  $50 \mu\text{m}$ ) B: 2 个组细胞核内 YAP 平均荧光强度定量分析 与对照组比较,  $^a P < 0.001$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 4$ ) YAP: Yes 相关蛋白

**Figure 5 Immunofluorescence staining of YAP in human corneal epithelial cells in two groups after Zamboni fixation** A: YAP appeared red fluorescence (Alexa Fluor 555) and nuclei showed blue fluorescence (Hoechst). YAP was present in the cytoplasm in control group, and it was present in the nucleus in hypertonic group ( $\times 630$ , scale bar =  $50 \mu\text{m}$ ) B: Quantitative analysis of the mean nuclear YAP fluorescence intensity in two groups Compared with control group,  $^a P < 0.001$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 4$ ) YAP: Yes-associated protein

### 3 讨论

免疫荧光染色技术是一种常用的细胞和分子生物学技术, 通过使用特异性荧光标记抗体对生物组织或细胞中的特定抗原进行定量和定位<sup>[15]</sup>。在这个过程中, 需要加入固定剂来终止内源性蛋白酶的活性, 保持细胞、组织原有结构及其抗原性。因此选择合适的固

定剂对于维持组织和细胞形态、亚细胞结构以及蛋白抗原性至关重要, 这直接关系到实验结果的准确性和可靠性<sup>[16]</sup>。目前在免疫细胞实验中常用的固定剂包括交联剂和有机溶剂两大类。交联剂大部分为醛类固定剂, 目前较为常用的有 4% 多聚甲醛、4% 中性甲醛固定液、戊二醛等交联剂。醛类固定剂主要通过和蛋白质中的氨基、羟基发生交联反应, 形成稳定的网络结构, 从而实现对组织细胞的固定作用<sup>[17]</sup>。而有机溶剂类固定剂可以通过改变细胞的通透性, 使蛋白质脱水, 使蛋白质沉淀在亚细胞结构上, 常用的有甲醇、乙醇及丙酮等<sup>[18]</sup>。本研究对比了醛类固定剂 (4% 多聚甲醛)、有机溶剂固定剂 (无水乙醇、甲醇丙酮 1:1 混合液) 以及混合固定液 (Zamboni 固定液) 对 YAP 类穿梭蛋白染色以及定位的影响, 为后续的研究提供实验技术支持。

本研究结果显示, 固定剂的选择对 YAP 的核质定位影响较大。使用 4% 多聚甲醛固定对照组角膜上皮细胞后, 免疫荧光染色结果显示 YAP 主要聚集在细胞核内。这种错误的定位可能是因为固定液中的甲醛成分虽然渗透组织的时间很快, 但固定过程本身很慢, 导致蛋白的流动性不会立即被抑制<sup>[19-21]</sup>。固定初期, 甲醛处理仍会导致一些核质穿梭蛋白或转录因子进出细胞核, 并且这一作用与固定液中甲醛的浓度相关<sup>[6, 22]</sup>, 本研究推测这可能是造成对照组细胞经 4% 多聚甲醛固定后呈核染色假阳性的重要原因。Zamboni 固定液是一种混合固定剂, 是在 4% 中性甲醛固定液的基础上降低甲醛含量到 2%, 并且加入了苦味酸。以往的研究表明, 含苦味酸的固定液能迅速均匀地渗透组织, 并且能很好地保存待检抗原以及细胞的超微结构<sup>[23]</sup>。有研究报道, Zamboni 固定液能很好

地维持小鼠眼球的形态及视网膜结构,且后续细胞免疫荧光信号强<sup>[24-25]</sup>。本研究结果也显示,使用 Zamboni 固定液固定后角膜上皮细胞形态更好,荧光信号清晰。并且在高渗处理前后 YAP 的核质定位准确,能明显观察到高渗诱导角膜上皮细胞中 YAP 核转位这一现象。

有机溶剂类固定剂具有较好的脂溶性,能有效溶解生物样本中的脂质成分,并能与生物样本中的蛋白质发生相互作用,促使蛋白质变性、沉淀<sup>[26-27]</sup>。本研究发现,用无水乙醇以及甲醇丙酮 1:1 混合液固定角膜上皮细胞后 YAP 染色较弥散, YAP 主要分布在细胞质,并且在经高渗刺激后未观察到明显的核转位现象。这可能是因为有有机溶剂类固定剂有一定的穿透性,对细胞结构有一定的损伤。透射电子显微镜图像显示,在丙酮或甲醇固定后部分细胞器丢失。尽管细胞骨架仍然可见,但核仁结构变得松散,核膜和染色质被破坏,核蛋白含量大幅下降(尤其是在丙酮固定细胞中)<sup>[28]</sup>。Hoetelmans 等<sup>[29]</sup>研究表明,使用丙酮或甲醇等有机溶剂固定 MCF-7 乳腺癌细胞株时,细胞中核纤维层受损,核基质的纤维网络结构被破坏,导致肿瘤细胞核内 B 淋巴细胞瘤 2 等核蛋白无法被检测到。本研究推测,在人角膜上皮细胞中, YAP 在进入细胞核与转录因子结合后,由于核染色质受到有机溶剂的破坏,导致核内的 YAP 失去了抗原性。

本研究探讨了不同固定剂对 YAP 细胞内定位的影响。通过对比多种固定剂的应用效果,发现采用 Zamboni 固定液固定角膜上皮细胞后行免疫荧光染色能准确检测到 YAP 的核转位现象。本研究以 YAP 为例探索了其在细胞中核质定位的技术方法,该成果可推广到其他核质穿梭蛋白的定位研究中。尤其是对细胞内定位受甲醛浓度影响的转录因子,如 IRF3<sup>[6]</sup>、GATA<sup>[22]</sup> 等进行定位研究时,可以考虑使用 Zamboni 固定液作为免疫荧光染色的固定剂。需要注意的是,目前尚无一种固定剂能适用于所有抗原的检测,因此在免疫荧光染色实验中需要根据不同固定剂对组织细胞形态以及所要检测抗原稳定性的影响,选择适当的固定方法。尤其是对一些定位易受固定剂影响的蛋白,如 BRCA1、p53<sup>[30]</sup> 等进行免疫荧光定位研究时要充分考虑到固定方式的影响,必要时可进行多种固定剂的染色对比,从而选择最适合目标抗原的实验条件,以确保实验结果准确可靠。

本研究仍存在一定局限性。首先,在对 YAP 的定位研究中仅聚焦该蛋白在单一时间点的静态分布,未能通过设置多个时间点来追踪其动态变化过程。其

次,使用不同的固定剂对细胞进行固定,行免疫荧光染色后发现 YAP 的核转位现象存在一定差异,这提示通过免疫荧光实验所观察到的核质转位现象可能并不全面,应辅以其他定性或者定量实验来互相佐证,以获得更加真实可靠的实验结果。最后,本研究对比分析了不同固定剂对染色结果的差异性影响,但尚未深入探讨固定时间在免疫荧光染色中对蛋白定位的作用。未来的研究可以在此基础上,进一步探讨固定剂及固定时间对核质穿梭类蛋白免疫荧光定位的影响,为这类蛋白的定位与功能分析提供更为详实的技术参考和实验依据。

综上所述,角膜上皮细胞中 YAP 的核质定位会受到不同固定剂处理的影响,应用 Zamboni 固定液比 4% 多聚甲醛、无水乙醇、甲醇丙酮 1:1 混合液能更好地观察到高渗刺激后 YAP 的核移位现象。本实验探索了在干眼发病机制的研究中,固定剂的选择对穿梭类蛋白 YAP 核质定位的关键性影响。该结果为研究此类蛋白在干眼等眼科疾病发病机制中的作用以及寻找疾病治疗潜在的药物靶点提供了方法学支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 戴义芹: 酝酿和设计实验、实施研究、文章撰写; 张婧: 分析/解释数据、文章修改; 徐建江: 研究指导、论文审阅及定稿

## 参考文献

- [1] Fu M, Hu Y, Lan T, et al. The Hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases [J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 376 [2024-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36347846/>. DOI: 10.1038/s41392-022-01191-9.
- [2] Zheng Y, Pan D. The Hippo signaling pathway in development and disease [J]. *Dev Cell*, 2019, 50(3): 264-282. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.06.003.
- [3] Efrain Y, Chen F, Stashko C, et al. Alterations in corneal biomechanics underlie early stages of autoimmune-mediated dry eye disease [J/OL]. *J Autoimmun*, 2020, 114: 102500 [2024-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32565048/>. DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102500.
- [4] Baudouin C, Aragona P, Messmer EM, et al. Role of hyperosmolarity in the pathogenesis and management of dry eye disease: proceedings of the OCEAN group meeting [J]. *Ocul Surf*, 2013, 11(4): 246-258. DOI: 10.1016/j.jtos.2013.07.003.
- [5] Melo RC, Morgan E, Monahan-Earley R, et al. Pre-embedding immunogold labeling to optimize protein localization at subcellular compartments and membrane microdomains of leukocytes [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(10): 2382-2394. DOI: 10.1038/nprot.2014.163.
- [6] Banerjee A, Falzarano D, Misra V. Caution: choice of fixative can influence the visualization of the location of a transcription factor in mammalian cells [J]. *Biotechniques*, 2018, 65(2): 65-69. DOI: 10.2144/btn-2018-0060.
- [7] Richter KN, Revelo NH, Seitz KJ, et al. Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy [J]. *EMBO J*, 2018, 37(1): 139-159. DOI: 10.15252/embj.201695709.
- [8] Hong AW, Meng Z, Yuan HX, et al. Osmotic stress-induced phosphorylation by NLK at Ser128 activates YAP [J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(1): 72-86. DOI: 10.15252/embr.201642681.

- [9] Cai D, Feliciano D, Dong P, et al. Phase separation of YAP reorganizes genome topology for long-term YAP target gene expression [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21 (12) : 1578-1589. DOI: 10.1038/s41556-019-0433-z.
- [10] Hong J, Qian T, Le Q, et al. NGF promotes cell cycle progression by regulating D-type cyclins via PI3K/Akt and MAPK/Erk activation in human corneal epithelial cells [J]. *Mol Vis*, 2012, 18 : 758-764.
- [11] Rizwan M, Peh G, Ang HP, et al. Sequentially-crosslinked bioactive hydrogels as nano-patterned substrates with customizable stiffness and degradation for corneal tissue engineering applications [J]. *Biomaterials*, 2017, 120 : 139-154. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.12.026.
- [12] Ho JH, Chuang CH, Ho CY, et al. Internalization is essential for the antiapoptotic effects of exogenous thymosin beta-4 on human corneal epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48 (1) : 27-33. DOI: 10.1167/iovs.06-0826.
- [13] Zhang YN, Dong YL, Hao WP, et al. Increased cGAS/STING signaling components in patients with Moore's ulcer [J]. *Int J Ophthalmol*, 2021, 14 (11) : 1660-1665. DOI: 10.18240/ijo.2021.11.03.
- [14] Morishige N, Ko JA, Morita Y, et al. Expression of semaphorin 3A in the rat corneal epithelium during wound healing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 395 (4) : 451-457. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.03.124.
- [15] Im K, Mareninov S, Diaz M, et al. An introduction to performing immunofluorescence staining [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1897 : 299-311. DOI: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_26.
- [16] Poulsen CP, Vereb G, Geshi N, et al. Inhibition of cytoplasmic streaming by cytochalasin D is superior to paraformaldehyde fixation for measuring FRET between fluorescent protein-tagged Golgi components [J]. *Cytometry A*, 2013, 83 (9) : 830-838. DOI: 10.1002/cyto.a.22282.
- [17] Baczewska M, Eder K, Ketelhut S, et al. Refractive index changes of cells and cellular compartments upon paraformaldehyde fixation acquired by tomographic phase microscopy [J]. *Cytometry A*, 2021, 99 (4) : 388-398. DOI: 10.1002/cyto.a.24229.
- [18] Francisco-Cruz A, Parra ER, Tetzlaff MT, et al. Multiplex immunofluorescence assays [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2055 : 467-495. DOI: 10.1007/978-1-4939-9773-2\_22.
- [19] Huebinger J, Spindler J, Holl KJ, et al. Quantification of protein mobility and associated reshuffling of cytoplasm during chemical fixation [J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1) : 17756 [2024-06-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30532039/>. DOI: 10.1038/s41598-018-36112-w.
- [20] Molenaar C, Weeks KL. Nucleocytoplasmic shuttling: the ins and outs of quantitative imaging [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2018, 45 (10) : 1087-1094. DOI: 10.1111/1440-1681.12969.
- [21] Kuzmin AN, Pliss A, Prasad PN. Changes in biomolecular profile in a single nucleolus during cell fixation [J/OL]. *Anal Chem*, 2014, 86 (21) : 10909-10916 [2024-06-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25268694/>. DOI: 10.1021/ac503172b.
- [22] Tate JJ, Cooper TG. Formalin can alter the intracellular localization of some transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2008, 8 (8) : 1223-1235. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00441.x.
- [23] Copper JE, Budgeon LR, Foutz CA, et al. Comparative analysis of fixation and embedding techniques for optimized histological preparation of zebrafish [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2018, 208 : 38-46. DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.11.003.
- [24] Akiyama G, Azuchi Y, Guo X, et al. Edaravone prevents retinal degeneration in adult mice following optic nerve injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58 (11) : 4908-4914. DOI: 10.1167/iovs.17-22250.
- [25] Akaiwa K, Namekata K, Azuchi Y, et al. Edaravone suppresses retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8 (7) : e2934 [2024-06-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28703795/>. DOI: 10.1038/cddis.2017.341.
- [26] Hobro AJ, Smith NI. An evaluation of fixation methods: spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging [J]. *Vib Spectrosc*, 2017, 91 : 31-45. DOI: 10.1016/j.vibspec.2016.10.012.
- [27] Dong T, Wan S, Wang Y, et al. Effects of chemical fixatives on kinetic measurements of biomolecular interaction on cell membrane [J]. *J Membr Biol*, 2024, 257 (1-2) : 131-142. DOI: 10.1007/s00232-024-00305-4.
- [28] Hoetelmans RW, Prins FA, Cornelese-ten Velde I, et al. Effects of acetone, methanol, or paraformaldehyde on cellular structure, visualized by reflection contrast microscopy and transmission and scanning electron microscopy [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2001, 9 (4) : 346-351. DOI: 10.1097/00129039-200112000-00010.
- [29] Hoetelmans RW, van Slooten HJ, Keijzer R, et al. Routine formaldehyde fixation irreversibly reduces immunoreactivity of Bcl-2 in the nuclear compartment of breast cancer cells, but not in the cytoplasm [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2001, 9 (1) : 74-80.
- [30] Brodie KM, Henderson BR. Differential modulation of BRCA1 and BARD1 nuclear localisation and foci assembly by DNA damage [J]. *Cell Signal*, 2010, 22 (2) : 291-302. DOI: 10.1016/j.cellsig.2009.09.034.

(收稿日期: 2024-10-10 修回日期: 2025-02-28)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

读者 · 作者 · 编者

## 本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件: (1) 参与课题的选题和实验设计, 参与实验资料的收集、分析和论证。 (2) 参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。 (3) 能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修, 能够答疑并承担责任。 (4) 对论文的诚信负责。 仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。 文中如有外籍作者, 应附外籍作者亲笔签名的在本刊发表的同意函。 集体署名的文章应于题名下列出署名单位, 于文末列出论文整理者的姓名, 并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方, 每篇论文须列出通信作者 1 名。 如无特殊约定, 则视第一作者为通信作者。 作者 (包括通信作者) 的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定, 在编排过程中不宜变更或增减, 尤其是通信作者和前三名作者, 若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。 有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音, 列于英文文题之下。

(本刊编辑部)