

· 文献综述 ·

连接蛋白 43、细胞连接通讯与心血管疾病

白雪松 综述 楼定安 审校

(浙江医科大学心血管病理研究室, 杭州 310006)

摘要 细胞连接通讯是动物体内细胞通讯的重要方式之一,其发挥细胞之间信息传递功能的结构基础是细胞间隙连接。细胞间隙连接的主要结构成份是连接蛋白。连接蛋白 43 是心肌、血管平滑肌细胞间隙连接的主要组成成份。连接蛋白 43 的表达与心律失常、缺血性心脏病、动脉粥样硬化、先天性心脏畸形等心血管疾病均有密切关系。

关键词 细胞间隙连接; 连接蛋白 43; 心血管疾病

广泛存在于动物体内的细胞通讯有两种方式,即通过释放信使物质执行远距离联络和通过相邻细胞之间的间隙连接(gap junction)交换信息的接触联络。在间隙连接中,通过化学偶联、离子偶联对细胞的生长、分化、增殖发挥调控作用。而这种间隙连接是由相邻细胞质膜上的连接子(connexon)连成的一条亲水管道,该通道直径约 1.5 nm,允许细胞内离子及分子量小于 1.5 kDa 的小分子物质通过。连接子则是由六个形状一致,功能一致的亚单位即连接蛋白(connexin)环绕排列成中空小管。其外形如棒状,直径达 6~7 nm。组成连接子时与小管长轴略有倾斜,倾斜角度可受到许多因素影响,引起的构型改变被认为是间隙连接通道可以受调控而启闭的基础^[1,2]。

1 连接蛋白家族的组成、分布和功能

目前研究中已分离到的分子量从 26 kDa 到 56 kDa 不等的数十种连接蛋白组成了一个家族。其中的每个成员在不同组织中的专一性与特定的细胞分化表型有关。同一细胞中也可有多种连接蛋白基因同时表达。例如,根据分子量命名的连接蛋白 32、43、46 中,氨基酸序列相同区域只占 56%,而同为连接蛋白 32 的氨基酸序列在小鼠、人类的比较中竟有 98% 的区域一致。在心肌细胞中可有连接蛋白 43、40 的共同表达^[3]。

连接蛋白是由数百个氨基酸残基组成的蛋白多肽链。例如,在心肌和平滑肌中的连接蛋白 43 是由 382 个氨基酸残基组成^[4,5]。它以四个 α 螺旋穿过质膜的脂

双层,位于质膜外的区域在不同连接蛋白中是高度保守地,并允许连接蛋白家族中不同成员相互作用^[1,2,6]。例如,连接蛋白 43 与 32 之间可形成功能性的间隙连接^[7]。而在细胞质面的结构区域在不同连接蛋白中差异很大,可能代表了不同连接蛋白之间的组织差异性和电传导通讯的相异性^[6,7]。

自从六十年代 Stoker 等提出细胞间隙连接通讯的恢复与肿瘤生长的调控、转化表型的抑制相关以来,连接蛋白在肿瘤发生的研究不断深入,特别是研究中发现的一些连接蛋白基因所表现出肿瘤抑制的特点,正成为人们探索肿瘤发生机制及早期诊断价值的热点^[8,9]。由于心肌细胞和血管平滑肌细胞间隙连接主要由连接蛋白 43 组成^[10],本文着重讨论连接蛋白 43 及细胞间隙连接通讯在心血管疾病中的意义。

2 连接蛋白 43 的分布和结构

连接蛋白 43 在动物体内分布很广,包括肾小管上皮细胞、结缔组织细胞、巨噬细胞、肝细胞、星形胶质细胞、心肌细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等^[8,11]。但在不同细胞中分布量有很大差异。已知心肌细胞及血管平滑肌细胞的间隙连接的组成中以连接蛋白 43 为主。

通过对小鼠连接蛋白 43 的结构分析,发现在核苷酸水平上,5' 未翻译区和 3' 未翻译区的碱基中 84% 是保守的,在不同种动物中表现为很大的相似性。而碱基排列的差异性主要集中在 3' 未翻译区。在蛋白水平上,在与人类连接蛋白 43 比较中发现有九个区域存在差异,包括 257 位点上丙氨酸代替了丝氨酸,251 位点上丝氨酸代替了苏氨酸。人心肌细胞中间隙连接蛋白氨基酸序列中的疏水区与小鼠来源的心肌细胞是一致的,并且保持着每圈三个半胱氨酸的精确空间,这些特定氨基酸之间形成的双硫键在形成间隙连接通道中起重要作用^[4,5]。研究表明,连接蛋白 43 的许多潜在蛋白激酶 C 修饰位点集中在羧基端胞浆区,即多肽链的第 364、368、372 个氨基酸残基上。在 265 位点上小鼠与人的连接蛋白 43 均有一个潜在的酪氨酸磷酸化位点。以

上位点起着细胞内有效调节的作用^[4]。已经有一些报道证实了在部分包含有连接蛋白 43 的细胞类型中蛋白激酶 A、C 影响着间隙连接的信息传导。例如, 已有人证明, 细胞内连接蛋白 43 由非磷酸化转化为二磷酸化时, 才能装配成功能性的间隙连接^[12]。

3 连接蛋白 43 与心血管疾病

连接蛋白 43 在心血管疾病中起着什么样的作用正成为人们关注的一个新的热点问题。在这方面的研究中已取得了一批成果。

3.1 连接蛋白 43 与心律失常

在心律失常发生机制方面, 发现心肌细胞的间隙连接在维持正常节律的电生理中起重要作用^[13]。间隙连接的结构或功能的改变均可以引起心律失常^[14]。以连接蛋白 43 为主组成的低阻力通道的电偶联^[15]使心肌细胞同步收缩, 并通过离子交换发挥调控作用。通过培养的心肌细胞发现随培养时间延长, 心肌细胞收缩率增加, 从不规则收缩趋向规则收缩, 最终形成同步收缩。免疫荧光检测发现连接蛋白 43 荧光点数和面积同时增加。而此时连接蛋白 43 磷酸化/非磷酸化比例的增加可能在心肌同步收缩建立中起一定的作用^[14]。最近, 又有报道认为连接蛋白 40 在心脏传导系统中有大量表达^[16]。尤其在蒲肯野纤维中更显著, 通过原位杂交证实其表达量高出心室肌三倍以上。而心室肌中以连接蛋白 43 mRNA 的表达为主。这可能是两者传导特性不同的基础。心肌细胞可能通过改变不同连接蛋白水平的表达, 来调节细胞间电偶联特性。但在研究窦房结连接蛋白 43 表达时发现, 表达量非常稀少。有人用免疫组织化学方法观察豚鼠窦房结细胞, 发现在起搏区 α -肌动蛋白阳性, 而连接蛋白 43 反应阴性, 从而认为原始起搏点区域与连接蛋白 43 密度梯度关系不大^[17]。所以, 连接蛋白 43 在心脏传导系统中的表达及作用机制有待进一步研究。

3.2 连接蛋白 43 与先天性心脏畸形

在先天性心脏畸形发生机制方面, 有研究报道至少在部分病人中存在着连接蛋白基因的突变, 进而导致细胞连接通讯功能障碍并伴有心脏移位。这种基因突变可以由一个或多个磷酸化的丝氨酸或苏氨酸残基引起。也有认为, 一个常染色体隐性失调, 引起两个独立的突变点, 继而引起细胞通讯功能下降, 最终形成心脏畸形^[18]。新近又有报道认为, 心脏畸形的发生可能与连接蛋白 43 的低表达或不表达有关, 这方面的直接证据来自对新生小鼠的研究, 发现当小鼠发生心脏畸形时, 缺少连接蛋白 43 的表达^[19]。

3.3 连接蛋白 43 与缺血性心脏病

在缺血性心脏病发生机制方面, 对心肌缺血、梗塞相关的心律失常做了研究与探索。通过免疫组织化学方法研究进展期缺血性心脏病梗死区心肌时发现, 功能性损伤较重的左心室组织与相对损伤较轻的右心室组织在连接蛋白 43 的数量和分布上无显著差异性。而在心肌梗塞交界处的间隙连接通讯功能障碍, 免疫反应物斑点广泛散在于心肌表面, 造成快速的细胞间电冲动刺激心肌同步收缩不能实现, 导致传导减慢, 继而引起心律失常^[20]。

3.4 连接蛋白 43 与动脉粥样硬化

在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生机制方面, 目前发现在人、牛、小鼠和猪来源的血管壁细胞中均有连接蛋白 43 的表达^[10]。血管壁完整的功能可能经间隙连接实现^[18], 有关这方面的研究目前报道尚不多。已有的研究表明, 高严谨条件下 Northern Blot 中发出新鲜分离、纯化的动脉内皮细胞及平滑肌细胞 RNA 中主要含连接蛋白 43 mRNA, 排除了各种培养过程中导致基因表达改变的可能性。对平滑肌细胞的进一步研究发现, 不管是培养条件下的还是完整动脉壁中的平滑肌细胞, 也不论是收缩型还是合成型平滑肌细胞中主要是连接蛋白 43。但收缩型中含量低于合成型平滑肌细胞^[21]。血管壁巨噬细胞中 ATP 敏感的质膜通道组成一种类似于连接蛋白 43 的蛋白。而这种巨噬细胞吞噬脂质后形成的泡沫细胞在动脉粥样硬化斑块中表达连接蛋白 43 mRNA^[2, 22]。有报道, 在早期动脉粥样硬化内膜增厚区连接蛋白 43 的表达水平很高, 这可能是早期病灶中脂质堆积作为刺激物刺激启动动脉壁平滑肌细胞间隙连接形成, 使得早期动脉粥样硬化病变时连接蛋白 43 显著高于进展期动脉粥样硬化。另一方面, 泡沫细胞表达连接蛋白 43 mRNA 以及平滑肌细胞从中膜移入内膜转为合成型细胞, 使连接蛋白 43 表达增加也是早期动脉粥样硬化中连接蛋白 43 表达升高的可能机制^[22]。由于功能性的间隙连接的形成与连接蛋白磷酸化有关, 所以早期病灶中连接蛋白 43 是否磷酸化并且具有细胞通讯的功能有待进一步探索。

在正常动脉壁中以收缩型平滑肌细胞为主, 其中连接蛋白 43 表达较少, 而随着动脉粥样硬化病变的进展, 细胞外基质不断增多, 细胞之间紧密接触的面积减少, 细胞之间距离增大, 最终使平滑肌细胞间隙连接结构形成减少, 连接蛋白 43 表达下降, 明显低于早期动脉粥样硬化病灶^[22]。但是连接蛋白 43 与动脉粥样硬化发生发展的关系尚有许多不明之处。例如, 病变动脉中膜平滑肌细胞向内膜迁移并增殖是动脉粥样硬化形成

病灶的关键,而这种增殖主要是合成型平滑肌细胞,其连接蛋白 43 表达升高意义尚不清楚。可能这种增殖与间隙连接数量之间的关系不是直接的^[11]。因为连接蛋白的表达,间隙连接通讯的功能是与平滑肌细胞自身分化、表型及激素等多方面因素影响有关。

近年来有报道认为,连接蛋白 43 的过度表达可以改变转型细胞的表型,即可以控制平滑肌细胞表型的转变。但这是通过什么机制,在动脉粥样硬化中的平滑肌细胞增殖中的意义如何,及在动脉粥样硬化发展中的意义等尚不清楚,值得进一步深入研究。

参考文献

- Stauffer KA, Kumar NM, Gilula NB, et al. Isolation and purification of gap junction channels. *J Cell Biol*, 1991, **115**: 141~150.
- Polacek D, Lal R, Volin MV, et al. Gap junctional communication between vascular cells. *Am J Pathol*, 1993, **142**(2): 593~606.
- Littel TL, Beyer EC, Duling BR. Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium *in vivo*. *Am J Physiol*, 1995, **268** (Heart circ physiol): H729~H739.
- Fishman GI, Spray DC, Levin LA. Molecular characterization and functional expression of the human cardiac gap junction channel. *J Cell Biol*, 1990, **111**: 589~598.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin 43: A protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol*, 1987, **105**: 2 621~629.
- Barbara Yancey S, Scott A, John LR, et al. The 43-kDa polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization (I), topology (I), and functional domains (I). *J Cell Biol*, 1989, **108**: 2 241~254.
- Laird DW, Revel JP. Biochemical and immunochemical analysis of the arrangement of connexin 43 in rat heart gap junction membranes. *J Cell Sci*, 1990, **97**: 109~117.
- 林仲翔. 间隙连接通讯—生长调控—突变三者之间的关系. *细胞生物学杂志*, 1988, **10**(3): 111~115.
- 林仲翔, 张志谦, 韩亚玲. 连接蛋白基因表达与横纹肌肉瘤分化关系研究. *中国科学*, 1994, **24**(6): 623~628.
- Larson DM, Hanenschild CC, Beyer EC. Gap junction messenger RNA expression by vascular wall cells. *Circ Res*, 1990, **66**(4): 1 074~80.
- Yamamoto T, Hossain MZ, Hertzberg EL, et al. Connexin 43 in rat pituitary: localization at pituicyte and stellate cell gap junctions and within gonadotrophs. *Histochemistry*, 1993, **100**: 53~64.
- Musil LS, Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin 43 intracellular transport, phosphorylation and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 1991, **115**: 1 357~374.
- Rook MB, Van ACG, De Jonge BG, et al. Differences in gap junction channels between cardiac myocytes, fibroblasts and heterologous pairs. *Am J Physiol*, 1992, **263**(5): C959~977.
- Masahito Oyamada, Hisakazu Kimura, Yumiko Oyamada, et al. The expression, phosphorylation, and localization of connexin 43 and gap-junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Exp Cell Res*, 1994, **212**: 351~358.
- Blennerhassett MG, Kannan MS, Garfield RE. Functional characterization of cell-to-cell coupling in cultured rat aortic smooth muscle. *Cell Physiol*, 1987, **252**(5 Pt 1): C555~C569.
- Kanter HL, Laing JG, Beau SL, et al. Distinct patterns of connexin expression in canine purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ Res*, 1993, **72**(5): 1 124~131.
- Velde IT, De Jonge B, Verheijck EE, et al. Spatial distribution of connexin 43, the major cardiac gap junction protein, visualized the cellular network for impulse propagation from sinoatrial node to atrium. *Circ Res*, 1995, **76**(5): 802~811.
- Britz-cunningham SH, Shah MM, Zuppan CW, et al. Mutation of the connexin 43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N Engl J Med*, 1995, **332**(20): 1 323~329.
- Reaume AG, De Sousa PA, Kulkarni S, et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin 43. *Science*, 1995, **267**(5 205): 1 831~834.
- Smith JH, Green CR, Peters NS, et al. Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. *Am J Pathol*, 1991, **139**(4): 801~821.
- Rennick RE, Connant JL, Burnstock G, et al. Expression of connexin 43 gap junctions between cultured vascular smooth muscle cells is dependent upon phenotype. *Cell Tissue Res*, 1993, **271**(2): 323~332.
- Blackburn JP, Peters NS, Yeh HI, et al. Upregulation of connexin 43 gap junctions during early stages of human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**(8): 1 219~228.

(1996-06-16 收到, 1996-11-12 修回)