

缝隙连接和连接蛋白 43 与动脉粥样硬化

陈冰 综述, 宋剑南 审校

(中国中医研究院基础理论研究所, 北京市 100700)

[关键词] 细胞生物学; 连接蛋白的作用; 综述; 动脉粥样硬化; 缝隙连接

[摘要] 动脉粥样硬化是一种多因素所致的慢性疾病, 发病机理非常复杂。缝隙连接作为细胞间连接的重要方式, 在动脉粥样硬化发生发展过程中起着不容忽视的作用。连接蛋白 43 是主要由血管壁表达的连接蛋白, 与内皮细胞凋亡、平滑肌细胞增生及泡沫细胞的生成密切相关, 在多种细胞生长及肿瘤分化过程中起重要作用。本文主要就缝隙连接和连接蛋白 43 在动脉粥样硬化发生中的变化作一综述。

[中图分类号] Q26

[文献标识码] A

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种多因素所致的慢性疾病, 其发病机理尚未完全明确。在诸多致病因素中, 各细胞间信息通讯的失调是 As 发生发展的重要环节。细胞间的通讯可分为直接与间接两种方式, 以体循环远程分泌、旁分泌或自分泌方式经第二信使途径完成的调节方式称为间接通讯; 通过细胞间缝隙连接(gap junction)所进行的信息物质交换称为直接通讯。即缝隙连接细胞间通讯(gap junction inter cellular communication, GJIC)

1 缝隙连接的分布、结构和功能

缝隙连接几乎存在于哺乳动物所有的组织和细胞中, 在细胞生长发育及分化过程中起重要作用, 它的表达具有组织特异性^[1]。相邻细胞通过缝隙连接进行信息和物质能量的交换, 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。缝隙连接是由相邻细胞质膜上的连接子连成的亲水通道, 直径约 1.5 nm, 允许分子质量低于 1.5 kDa 或直径小于 1 nm 的离子或小分子物质通过, 这是缝隙连接执行各种生理功能的结构基础^[2]。亲水通道管径的大小受细胞膜电位、细胞内酸碱度以及胞液游离钙离子浓度的调节, 膜电位下降、pH 值变小或胞液游离钙离子浓度升高均可改变连接蛋白的构象而使管径变小甚至关闭, 这在生物学上可能起保护作用, 即当个别细胞受损或死亡时, 及时关闭与之相邻的细胞间通道, 避免受损细胞释放毒素等物质经通道传递及损害邻近细胞^[3]。

缝隙连接的结构单位是连接子(connexon)。连接子是由 6 个形状相同、功能一致的亚单位即连接蛋白(connexin, Cx)环绕排列成的中空小管, 其外形如棒状, 直径 6~7 nm。纯化的连接蛋白有相互聚集的趋势, 可形成尾对尾的无极性连接, 提示连接蛋白是以成对方式构成细胞间通道的。缝隙连接的主要功能是介导细胞间电和化学信号的传递, 确保不同类

型细胞间的偶联, 与离子流介导的动作电位的传布有关, 从而维持电活动与机械收缩, 保证活动的同步性^[4]。缝隙连接除了使细胞牢固连接外, 还通过电偶联和代谢偶联两种方式进行细胞间信息传递。缝隙连接的电阻抗很小, 单通道记录显示缝隙连接的基本电导为 100 Ω/cm^2 , 而细胞膜其他部位的阻抗为 500~10 000 Ω/cm^2 , 因此, 缝隙连接是细胞间电偶联的最有效方式^[4]。

缝隙连接在多个生理环节中发挥重要作用, 应用逆转录聚合酶链式反应对大鼠胃腺进行研究, 证实壁细胞间存在缝隙连接, 并认为这种功能性缝隙连接通道是胃腺细胞间信息传递及胃酸快速分泌启动的基础^[5]。正常人前列腺组织中 Cx43 在基底膜上皮细胞表达。有人对 106 例前列腺组织的冰冻切片研究发现, 23 例正常样品中有 87% 发现 Cx43 的表达; 43 例良性前列腺肥大样品 Cx43 表达量与正常接近, 其中有 23% 的样品表达于基质细胞; 而 40 例低分化前列腺癌中仅有 10% 样品表达 Cx43, 远低于正常; 说明缝隙连接在细胞分化过程中起重要作用^[6]。

缝隙连接作为离子通道可长时间开放, 具有高开放性、低选择性的特点^[7], 异型缝隙连接通道由不同 Cx 组成, 同型缝隙连接通道由单一 Cx 组成, 同型通道具有电传导性和电压稳定性的特点^[8]。人的 Cx43 通道大部分时间保持开放, 平均开放时间为 0.43~5.25 s, 平均关闭时间为 0.56~0.95 s^[9]。缝隙连接对第二信使的通透性, 使之成为介导信息传递的重要通道^[10], 如钙离子可经缝隙连接在晶状体上皮细胞、软骨细胞、胰岛素分泌细胞、神经细胞中存在。依赖性粘附因子钙粘素(E-cadherin)可抑制缝隙连接的功能^[11,12]。

2 连接蛋白家族的组成和结构

连接蛋白是由 10 余个成员组成的保守家族, 分子质量 26~56 kDa, 是由数百个氨基酸残基组成的蛋白多肽链, 编码连接蛋白的基因是一类非突变型抑癌基因^[13]。连接蛋白有 4 个跨膜片段 M1~4, 为螺旋结构, 2 个胞外环(extracellular loop) E1、E2, 1 个胞内环(cytoplasmic loop)。其跨膜及膜外部分具有很高的同源性, 差异主要表现在胞浆区的羧基, 通过羧

[收稿日期] 2002-08-28 [修回日期] 2003-01-03

[基金项目] 国家自然科学基金(39976883)资助。

[作者简介] 陈冰, 女, 1975 年出生, 硕士研究生, 电话: 010-64014411-2505。宋剑南, 男, 1942 年出生, 生物化学研究员, 博士生导师。

基末端的酪氨酸残基等的磷酸化或去磷酸化水平改变构象,从而调节缝隙连接的功能^[14]。Cx40 和 Cx37 是血管壁细胞中主要表达的两种连接蛋白,在结构上较相似,广泛分布于绝大多数组织中,但在不同组织中的分布并不相同;Cx26 是肝细胞中的主要连接蛋白,广泛分布于上皮和结缔组织中,编码 Cx26 的基因位于 14 号染色体,实验证实,其突变会导致 50% 病人发生无并发症的听觉丧失^[15]。有人发现 Cx43 与 Cx32 之间可形成功能性缝隙连接^[16],但 Cx43 与 Cx40 之间不能形成功能性缝隙连接,说明细胞可通过对不同连接蛋白的不同表达来调节信息传递^[17]。

3 连接蛋白 43 的分布、特殊结构和功能

连接蛋白 43 分布广泛,目前在牛、猪、鼠和人的组织中均发现其存在^[18],包括巨噬细胞、结缔组织细胞、心肌细胞、内皮细胞 (endothelial cell, EC)、平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC)、成纤维细胞、晶状体、角膜上皮细胞均发现 Cx43 的表达,人大多数大中动脉的中层 SMC 仅表达 Cx43^[19-21]。应用逆转录聚合酶链式反应在离体培养的人、鼠肾小球系膜细胞及人近端肾小管细胞中均检测到 Cx43 mRNA 的表达^[22]。人类 Cx43 基因定位于 6q22.3,含有 1 146 个碱基对的开放读码框, Cx43 蛋白的分子质量为 43 kDa,故命名为 Cx43。Cx43 组成的连接子在质膜上常成簇出现,称缝隙连接斑 (gap junction plaques),其数量直接影响缝隙连接的功能。环磷酸腺苷的升高可促进缝隙连接斑的形成,抑制糖基化作用可加快此过程,而微丝断裂使这一过程终止^[23]。

对小鼠和人的连接蛋白 43 同源性进行比较,发现只有几个氨基酸存在差异,而在 265 位点上小鼠和人的 Cx43 均有一个潜在的酪氨酸磷酸化位点,这些位点在胞间信息传递上起调节作用^[24],Cx43 的磷酸化与缝隙连接的功能密切相关^[25]。肿瘤促进剂佛波醇酯可通过蛋白激酶 C 途径抑制 Cx43 介导的细胞间通讯^[26],降低 Cx43 的表达可加速缺血导致的室性早搏的发生并增加其发生频率。有人发现血小板源性生长因子可阻断 T51B 大鼠肝上皮细胞的缝隙连接和 Cx43 的磷酸化,此作用与有丝分裂激活蛋白激酶及其它激酶的参与有关^[27]。

Guerrero 等^[28]发现连接蛋白 43 在细胞的生长与发育中起重要作用,纯合子 (Cx43^{-/-}) 小鼠出生后不久即死亡。通过闭塞小鼠冠状动脉左前降支诱发急性缺血实验发现,杂合子 (Cx43^{+/+}) 小鼠快速自发性室性心律失常的发生率超过纯合子 (Cx43^{+/+}) 小鼠的 2 倍,且发作的时间更长^[29]。从肿瘤的发生中来看, Cx43 在神经胶质瘤细胞中低表达,提高 Cx43 表达,肿瘤细胞增生受到抑制,停滞在 S 期^[30]。体外把肿瘤细胞与 Cx43 表达正常的细胞共同培养,肿瘤细胞向正常细胞转化。

人为增加平滑肌细胞的机械负荷可使 Cx43 蛋白表达升高,实验显示^[31],SMC 在增加机械负荷后 2 h,部分细胞 Cx43 mRNA 表达升高 3 倍,4 h Cx43 蛋白表达增高并维持高表达至 16 h。

4 缝隙连接、连接蛋白 43 与动脉粥样硬化

血管内皮细胞是循环血液与血管平滑肌细胞间的机械屏障,可分泌多种细胞因子,释放血管活性物质,调节细胞的生理活动。EC 的损伤是 As 发病的主要环节,许多因素如机械作用、高胆固醇血症、高血压、过氧化脂质、免疫因素、毒素等因素都能引起 EC 的损伤。电镜下观察兔实验性高脂血症主动脉内膜脂斑,可见斑块表面 EC 收缩,露出下方的泡沫细胞;缝隙连接可促进损伤后 EC 的修复^[17]。

平滑肌细胞的增生是动脉粥样硬化重要的病理生理现象。SMC 在形态和功能上有两种表型,即收缩表型和合成表型,前者具有 SMC 的各种形态特征,肌浆中含有粗细肌丝,有收缩功能,抗肌球蛋白染色呈强阳性;后者可分泌多种细胞因子,胞质内含许多细胞器,仅含少量肌丝,抗肌球蛋白染色呈阴性,无收缩功能^[31]。在激光共聚焦显微镜下观察到,正常动脉壁中以收缩型 SMC 为主,且 Cx43 表达量很低,而合成型 SMC 连接蛋白 43 的含量和缝隙连接数量均高于收缩型 SMC,合成型平滑肌细胞荧光斑点数目增多但直径变小,且功能降低,推测可能由于 Cx43 磷酸化后缝隙连接解体为 2 个半通道,干扰了 Cx43 的正常转运和装配,使之滞留于胞质内所致^[32]。早期 As 内膜增厚区 Cx43 荧光斑点数目明显增多,其原因是 SMC 由中膜移向内膜,导致内膜增厚;而表型由收缩型转变为合成型,致使荧光斑点数目增多。

此外,多种细胞因子也对平滑肌细胞的缝隙连接产生影响。白细胞介素 6 可引起 SMC 缝隙连接功能一过性下降,而碱性成纤维细胞生长因子可使 SMC 缝隙连接功能一过性升高, γ -干扰素会导致这一功能持续降低。但这 3 种因素都促进了 SMC 的增生^[33],说明细胞因子在 SMC 病理改变中的作用并不相同,其机制还需要进一步探讨。

近年来有人发现,平滑肌细胞与内皮细胞间存在缝隙连接,构成肌-内皮连接,染料和电流可以在两种细胞间移动^[34]。电镜下观察肠系膜动脉发现,肌-内皮连接直径小于 100 nm,远端多见,近端较少,其表达可能与内皮衍生的超极化因子的表达有关^[35]。以染料示踪法研究发现,染料在肌-内皮连接中的移动具有极性,即总是从 EC 移向 SMC,而相反方向几乎不移动^[20]。正常 EC 能通过肌-内皮连接维持 SMC 的收缩表型,而血液中低密度脂蛋白、高葡萄糖等物质可抑制这种连接的形成^[36]。

正常单核细胞和巨噬细胞都未见 Cx43 mRNA 的表达,也无缝隙连接形成。Polacek^[37]等人经原位杂交证明,As 斑块中的泡沫细胞中 Cx43 mRNA 大量表达,推测可能由于白细胞、细胞因子及细胞外基质的相互作用所致。

最新研究有人认为连接蛋白有双重作用^[38],一是已被公认的参与构成缝隙连接通道;二是可通过胞质面羧基区直接介导细胞的生长。血管壁细胞间缝隙连接、连接蛋白 43 的数量变化和功能失调与动脉粥样硬化密切相关,但参与病变的机制和具体途径并不完全清楚,尚需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Haefliger JA, Bruzzone R, Jenkins NA, et al. Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. *Biol Chem*, 1992, **267** (3): 2 057-064
- [2] De Leon JR, Buttrick PM, Fishman GI. Functional analysis of the connexin 43

- gene promoter in vivo and in vitro. *Mol Cell Cardiol*, 1994, **26**: 379-389
- [3] Stauffer KA, Kumar NM, Gilula NB, et al. Isolation and purification of gap junction channels. *Cell Biol*, 1991, **115**: 141-150
- [4] Christ GJ, Spray DC, Marwan ES, et al. Gap Junctions in vascular tissues. *Circ Res*, 1996, **79**: 631-646
- [5] Redebold k, Horakova E, Spray DC, et al. Gap junctional channels regulate acid secretion in the mamalian gastric gland. *Membr Biol*, 2001, **183**(3): 147-153
- [6] Habermann H, Ray V, HabermannW, Prins GS. Alterations in Gap Junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Urol*, 2001, **166**(6): 2 267-272
- [7] Christ GJ, Brink PR. Analysis of the presence and physiological relevance of subconducting states of connexin43-derived gap junction channels in cultured human corporal vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1999, **84**: 797-803
- [8] Li X, Simard JM. Multiple connexins form gap junction channels in rat basilar artery smooth muscle cells. *Circ Res*, 1999, **84**: 1 277-284
- [9] Brink PR, Ramanan SV, Christ GJ. Human connexin43 gap junction channel gating: evidence for mode shifts and/or heterogeneity. *Am J Physiol*, 1996, **271**: C321-C331
- [10] D Andrea P, Vittur F. Gap junction mediate window intercellular calcium signaling in cultured articular chondrocyte. *Cell Calcium*, 1996, **20**(5): 389-397
- [11] Francisco J, Hernandez B, Paulo PJ, et al. Control of intracellular movement of connexins by E-cadherin on murine skin papilloma cells. *Expe Cell Res*, 2001, **270**(2): 235-247
- [12] Wang Y, Rose B. An inhibition of gap junctional communication by cadherins. *Cell Sci*, 1997, **110** (Pt 3): 301-309
- [13] Vaidya D, Morley GE, Samie FH, Jalife J. Reentry and fibrillation in the mouse heart: a challenge to the critical mass hypothesis. *Circ Res*, 1999, **85**: 174-181
- [14] Thomas HS. Gap junction function: the messenger and the message. *Am J Pathol*, 1998, **152**(4): 851-854
- [15] Kammen JK, Ichiki H, Scholtz AW, et al. Connexin26 in human fetal development of the inner ear. *Hear Res*, 2001, **160**(1-2): 21-25
- [16] Laird DW, Revel JP. Biochemical and immunochemical analysis of the arrangement of connexin43 in rat heart gap junction membranes. *Cell Sci*, 1990, **97**: 109-117
- [17] Bruzzone R, Haefliger JA, Gimlich RL, et al. Connexin40, a component of gap Junction in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol Biol Cell*, 1993, **4**(1): 7-20
- [18] Larson DM, Hanenschild CC, Beyer EC. Gap junction messenger RNA expression by vascular wall cells. *Circ Res*, 1990, **66**(4): 1 074-080
- [19] Yeh HI, Duont E, Coppen S, et al. Gap junction localization and connexin expression in cytochemically identified endothelial cells from arterial tissue. *Histochem Cytochem*, 1997, **45**: 539-550
- [20] Little TL, Xia J, Duling BR. Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ Res*, 1995, **76**: 498-504
- [21] Yeh HI, Lupu F, Dupont E, et al. Upregulation of connexin43 gap junctions between smooth muscle cells after balloon catheter injury in the rat carotid artery. *Arte Thro Vasc Biol*, 1997, **17**: 3 174-184
- [22] Hillis GS, Duthie LA, Mlynski R, et al. The expression of connexin43 in human kidney and cultured renal cells. *Nephron*, 1997, **75**: 458-463
- [23] Wang Y, Rose B. Clustering of Cx43 cell to cell channel into gap junction plaques: regulation by camp and micro filaments. *Cell Sci*, 1995, **108** (Pt 11): 3 501-508
- [24] Fishman GI, Spray DC, Leinwand LA. Molecular characteriation and functional expression of the human cardiac gap junction channels. *Cell Biol*, 1990, **111**: 589-598
- [25] Cooper CD, Solan JL, Dolejsi MK, et al. Analysis of connexin phosphorylation sites. *Methods*, 2000, **20**(2): 196-204
- [26] Ren P, Mehta PP, Ruch RJ. Inhibition of gap junction intercellular communication by tumor promoters in connexin43 and connexin32 expressing living cells: cell specificity and role of protein kinase C. *Carcinogenesis*, 1998, **19**(1): 169-175
- [27] Hossain MZ, Jagdale AB, Ao P, et al. Mitogen-activated protein kinase and phosphorylation of connexin43 are not sufficient for the disruption of gap junction communication by platelet-derived growth factor and tetradecanoyl phorbolacetate. *Cell Physiol*, 1999, **179**(1): 87-96
- [28] Guerrero PA, Schuessler RB, Davis LM, et al. Slow ventricular conduction in mice heterozygous for a connexin43 null mutation. *Clin Invest*, 1997, **99**(8): 1991-998
- [29] Deborah L, Lerner MD, Kathryn A, Yamda PD, et al. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. *Clin Invest*, 1997, **99**(8): 1 991-998
- [30] Sanchez AR, Tabernero A, Orfao A, et al. Proliferation of C6 glion cells is blunted by the increase in gap junction communication caused by tolbutamide. *Fels Lett*, 2001, **7**, **509**(2): 202-206
- [31] Cowan DB, Lye SJ, Langille BL. Regulation of vascular connexin43 gene expression by mechanical loads. *Circ Res*, 1998, **82**: 786-793
- [32] Blackburn JP, Peters NS, Yeh HI, et al. Upregulation of connexin43 gap junction during early stages of human coronary atherosclerosis. *Arte Thro Vasc Biol*, 1995, **15**(8): 1 219-228
- [33] Mensink A, Van DE, Burg EH, et al. Modulation of intercellular communication between smooth muscle cells by growth factors and cytokines. *Eur J Phar*, 1996, **310**(1): 73-81
- [34] Yamamoto H, Fukuta H, Nalahira Y, et al. Blockade by 18 β -glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea pig arterioles. *J Phy*, 1998, **511**: 501-508
- [35] Sandow SL, Hill CE. Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res*, 2000, **86**: 341-346
- [36] Navab M, Ross LA, Hama S, et al. Interactions of human aortic wall cells in co culture. *Athe Rev*, 1991, **23**: 153-160
- [37] Polacek D, Lal R, Volin MV, et al. Gap junction communication between vascular cells: induction of Cx43 messenger RNA in macrophage from cells of atherosclerosis lesions. *Am J Path*, 1993, **142**(2): 593-606
- [38] Mpprbu C, Patel M. Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res*, 2001, **27**(2): 238-248

(此文编辑 曾学清)

•消息•

中国病理生理学会网页

中国病理生理学会网页已在北京大学医学部网上建立,可先进入 [www. bjmu. edu. cn](http://www.bjmu.edu.cn), 然后点击科学研究,再点击学会就可进入。