

缝隙连接蛋白与动脉粥样硬化

章顺荣 综述, 洪鸣鸣 审校

(杭州市第一人民医院干部科, 浙江省杭州市 310006)

[关键词] 病理学与病理生理学; 缝隙连接蛋白 37; 动脉粥样硬化

[摘要] 组成缝隙连接的蛋白亚单位称为连接蛋白, 现已发现有 20 种以上的连接蛋白亚型, 其中连接蛋白 37 在人类主要表达在血管内皮细胞。研究表明 Connexin37 在动脉粥样硬化的发生、发展中起着重要作用, 涉及到切应力, 炎症, 高胆固醇血症等目前动脉粥样硬化研究的许多热点方面。同时一些研究表明连接蛋白 37 基因多态性在动脉粥样硬化的发病机制中可能有重要作用。本文将着重在连接蛋白 37 及其基因多态性与动脉粥样硬化的关系作一综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是威胁人类健康的最常见的疾病之一, 常引起重要脏器的严重病变(比如心肌梗死和脑梗死等), 而且随着人口的老龄化, 其发生率有逐年上升趋势。研究表明多种因素参与了 As 的发生、发展, 其中内皮细胞异常起着重要的作用。组成缝隙连接的蛋白亚单位称为连接蛋白, 现已发现有 20 种以上的连接蛋白亚型, 而内皮细胞表面有连接蛋白 37, 连接蛋白 40 和连接蛋白 43 的表达。研究表明连接蛋白 37 的改变在内皮细胞功能异常和 As 的发生发展中可能起着重要的作用。

1 连接蛋白的结构和连接蛋白 37 生理功能简述

组成缝隙连接的蛋白亚单位称为连接蛋白, 是一跨膜蛋白家族的成员, 后者编码至少 20 种不同的哺乳动物基因, 在广泛的组织中表达。这些基因有 40% 的序列一致性和有一个共有的结构, 其外显子仅在少数情况下被内含子所隔断。因此, 连接蛋白的氨基酸序列是高度保守的。连接蛋白有 4 个跨膜 α 螺旋结构域(M1-M4), 两个细胞外环(E1 和 E2), 一个短的细胞内环(CL), 以及细胞内的氨基和羧基末端(分别是 NT 和 CT)。C 末端在长度和组成都显著的不同, 每种类型的连接蛋白几乎是唯一的。对大多数连接蛋白来说, CT 是特异性激酶和/或配对蛋白的底物, 作为调节域来调节连接蛋白通道对适当生化刺激物反应的活性^[1]。

连接蛋白的生命周期起始于 6 个连接蛋白单体非共价的多聚化成为轴状结构称为 Connexons。Connexons 可由一种(同源的)或多种(异源的)连接蛋白所组成。聚集后, Connexons 在滤泡中转运, 沿着微管从高尔基体转运到细胞膜。这些细胞膜的 Connexons 向旁边移动到通道丛的边缘, 然后与邻近细胞的相应成分藕联形成细胞间通道, 即为缝隙连接。在人类血管壁中目前发现有连接蛋白 37, 连接蛋白 40,

连接蛋白 43 和连接蛋白 45 的表达, 前两者主要表达在血管内皮细胞, 而后两者则表达在血管平滑肌细胞。连接蛋白 37 在血管的新生和维持血管正常的结构和功能中起着重要的作用。连接蛋白 37 的缺失引起雌性小鼠的不孕^[2]。而内皮缺乏连接蛋白 37 和连接蛋白 40 的表达引起血管结构和功能的异常^[3]。国内 Cai 等^[4]对狗冠状动脉回旋支进行慢性阻塞, 对平滑肌细胞的连接蛋白 37 进行了检测, 表明连接蛋白 37 的存在是血管形成的早期标志物。

2 连接蛋白 37 可能具有防止动脉粥样硬化作用

连接蛋白 37 基因主要表达在血管内皮细胞, As 斑块的泡沫细胞和平滑肌细胞表面也可以检测到连接蛋白 37 的表达, 最近研究表明在血液游离单核巨噬细胞表面也有连接蛋白 37 的表达。许多研究表明连接蛋白 37 可能具有抗 As 作用, 是一个值得进一步研究的靶点。

2.1 连接蛋白 37 与高胆固醇血症致动脉粥样硬化作用

Wong 等^[5]对连接蛋白 37 基因敲除的小鼠与载脂蛋白 E 基因缺失的小鼠进行了杂交以获得双基因敲除的小鼠, 并且给予这些小鼠高胆固醇饮食。结果与对照组(连接蛋白 37^{+/+} 载脂蛋白 E^{-/-})相比, 缺失连接蛋白 37 加速了连接蛋白 37^{-/-} 载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠的 As, 喂食 10 周后胸腹主动脉和主动脉窦苏丹 IV 染色的脂质增加了两成可以证实这一点。这些观察结果表明连接蛋白 37 在载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠中起到抗 As 的作用。Hung 等^[6]最近研究表明在高脂血症的大鼠中主动脉内皮的缝隙连接连接蛋白 37 表达减少, 而予辛伐他汀短期降脂治疗后连接蛋白 37 的表达得以恢复, 表明了连接蛋白 37 在 As 的发生可能具有保护作用, 而他汀类调脂药可能通过连接蛋白 37 在动脉内皮的表达上调而稳定斑块和延缓 As 进展。最近, Hou CJ 等^[7]利用链脲霉素在载脂蛋白 E 基因缺失 apoE^{-/-} 的小鼠中制造糖尿病模型, 发现与非糖尿病载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠相比, 前者主动脉内膜连接蛋白 37 和连接蛋白 40 的表达减少, 说明糖尿病能引起内皮细胞连接蛋白表达的改变, 这可能也是糖尿病引起 As 危

[收稿日期] 2008-04-22 [修回日期] 2008-06-11

[作者简介] 章顺荣, 硕士, 主治医师, 主要从事心血管病研究, 联系电话为 13486353477, E-mail 为 zsr8888@126.com。洪鸣鸣, 主任医师, 主要从事老年医学临床和研究工作, 联系电话为 0571-87065701-21982。

险增加的可能机制之一;然而,经辛伐他汀处理后这些糖尿病小鼠的连接蛋白 37 的表达进一步减少,因此,他汀类药物对内皮连接蛋白表达的影响尚待进一步研究明确。

Kwak 等^[8]在小鼠和人 As 斑块中检测了三种血管缝隙连接蛋白(连接蛋白 37,连接蛋白 40 和连接蛋白 43)的表达模式。给 LDL 受体缺失的小鼠喂养高脂饮食制造 As 的小鼠模型,分别在 0,6,10 和 14 个星期检测 As 不同阶段上述 3 种连接蛋白的表达。在没有病变的动脉中,可在内皮检测到连接蛋白 37 和连接蛋白 40 的表达,而连接蛋白 43 则可在中层检测到;粥样斑块的早期,内皮和中层连接蛋白的表达不变,但在粥样斑块新生内膜的平滑肌中有连接蛋白 43 表达而巨噬细胞则有连接蛋白 37 表达;进展斑块中,脂质核的巨噬细胞和中层的平滑肌细胞表面有连接蛋白 37 的表达,而覆盖斑块的內皮则失去了连接蛋白 37 的表达,连接蛋白 40 也不能在覆盖斑块的內皮表面检测到,连接蛋白 43 则可在覆盖斑块肩部的內皮上和新生内膜平滑肌细胞上检测到。对人颈动脉的研究也得到与上述相似的结果。表明粥样斑块中连接蛋白的表达发生了变化,提示缝隙连接在 As 形成中可能起着重要作用。

2.2 血流动力学与连接蛋白 37

动脉粥样硬化(As)的发生与局部血流动力学因素密切相关,切应力在内皮功能异常和粥样硬化的发生发展中起着重要作用^[9],不同的切应力不仅能影响动脉粥样斑块的大小,而且可影响斑块的脆性^[10]。但是这种现象的内在机制是什么呢?目前尚不完全清楚。最近 Ebong 等^[11]研究了液流对培养的人主动脉內皮细胞连接蛋白表达和集结的影响,表明流体能促进连接蛋白 37 和连接蛋白 40 等集结而形成有功能的缝隙连接通道,从而可以引起內皮功能的改变,导致对粥样斑块形成的不同易感性。

Dai 等^[12]模拟斑块易感和抵抗区域的动脉波型,应用于培养的内皮细胞,对其表型进行了观察,结果发现斑块易感波形引起连接蛋白 43 蛋白表达上调,而斑块保护波形则与连接蛋白 37 和连接蛋白 40 的水平升高有关,这与 Kwak 等^[8]研究结果相一致,提示连接蛋白 37 可能有防止 As 作用而连接蛋白 43 可能有促 As 作用。同时这也部分解释了局部血流动力学异常的部位,比如冠状动脉弯曲及分叉部位,易形成粥样斑块的现象。

2.3 连接蛋白 37 与动脉粥样硬化炎症机制

van Rijen 等^[13]观察到培养的人脐静脉內皮细胞暴露于肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor- α , TNF- α) 48 h 后,不能再检测到连接蛋白 37 和连接蛋白 40 蛋白的表达,其 mRNA 的表达水平也下降,而连接蛋白 43 蛋白和 mRNA 的水平则保持不变,同时內皮细胞间的染料的转移也减少了 40%;从培养液中去除 TNF α 后,则连接蛋白 37 和连接蛋白 40 蛋白的表达则得以恢复。已知 TNF α 在炎症反应中起重要作用,其主要靶细胞是血管內皮细胞,在 TNF α 刺激下,內皮细胞得以激活而更具有促炎和促 As 的功能^[14]。因此可以设想,內皮连接蛋白 37 具有抗炎和抗 As 的作用,內皮连接蛋白 37 表达的减少促进 As 的发生,这也与 Dai 等和 Kwak 等的研究结

果相一致。单核细胞在 As 的形成过程中起着重要的作用,而单核细胞表面有连接蛋白 37 的表达,那么连接蛋白 37 有助于单核细胞和內皮细胞之间的相互作用,从而促进单核细胞穿过內膜进入到內膜下组织吗?为了证实这种可能性,Wong 等^[15]通过向 As 模型小鼠输入缺乏连接蛋白 37 的单核细胞;而向连接蛋白 37 缺乏的 As 的小鼠输入正常的单核细胞(表达有连接蛋白 37),两组都测定了黏附于或者位于 As 斑块內的单核细胞的数量,结果前者在粥样斑块中有更多的单核细胞,说明单核细胞而不是內皮细胞缺乏连接蛋白 37 基因的表达可能会加速 As 的进展,也表明连接蛋白 37 在单核细胞/巨噬细胞功能中的作用。并同时观察到连接蛋白 37 缺乏的单核/巨噬细胞向其它內皮细胞,塑料,或者玻璃的黏附能力得到了增强(与正常表达连接蛋白 37 的白细胞相比);连接蛋白通道阻断剂,包括 α 乌热酸和连接蛋白模拟肽增加了白细胞的黏附,而连接蛋白缺乏的巨噬细胞株表达连接蛋白 37 后降低了其向底物的黏附能力,这些结果表明连接蛋白 37 在单核细胞/巨噬细胞的黏附中起作用。

进一步的研究^[15]观察到表达连接蛋白 37 的单核/巨噬细胞的黏附性降低可能与向细胞外释放 ATP 有关。没有连接蛋白 37 或者阻断连接蛋白 37 半通道能减少 ATP 释放出细胞,并且增强其向底物的黏附能力。而且,使用细胞外 ATP 清除剂增加正常单核/巨噬细胞的黏附能力,而增加细胞外的 ATP 量能使连接蛋白 37 缺乏的白细胞的黏附特性降低,与表达连接蛋白 37 的白细胞的黏附特性趋于一致。说明连接蛋白 37 半通道可能通过释放 ATP,然后通过一种尚不消除的机制干预单核/巨噬细胞的黏附作用。众所周知,单核细胞黏附內皮细胞然后进入到內皮下是 As 发生过程中的早期事件,因此提示连接蛋白 37 在 As 发病中具有负向调节作用。

3 连接蛋白 37 基因多态性与动脉粥样硬化

连接蛋白 37 基因 C1019T 多态性与 As 的关系是研究较多的一个,这一单核苷酸多态性(SNP)引起 connexin37 分子的 319 脯氨酸被丝氨酸所取代,自 Boerma M 等^[15]首次报导这一多态性与 As 斑块的进展相关以来,国内外已有不少关于连接蛋白 37 基因 C1019T 多态性与 As,以及与冠心病、心肌梗死相关性的研究,但各研究结果出入较大。Yamada 等^[16]报导,在日本人群中,连接蛋白 37 基因 C1019T 多态性与心肌梗死的危险性相关,T 等位基因携带者患心肌梗死的危险性增高。Listi 等^[17]研究表明在意大利西西里岛人群中 T 等位基因携带者患心肌梗死的危险性增高,此后,又以健康百岁老人作为对照组进一步研究^[18],表明健康百岁老人中有较高的 C 等位基因频率,从而进一步证实连接蛋白 37 基因 T 等位基因在意大利人群中是心肌梗死的危险基因,这与 Yamada 在日本人群的研究结果相一致。然而,Yeh 等^[19]研究表明在台湾人群中连接蛋白 37 基因 1019C 等位基因是冠心病的独立危险因素,这与 Yamada 等的研究结果相反。Wong 等^[20]研究也表明在瑞士人群中连接蛋白 37 基因 C1019T 多态性 C 等位基因是冠状动脉疾病和心肌梗死的独

立危险因素。颈动脉内中膜的厚度是亚临床 As 的指标,与冠心病的危险因素相关^[21],但是最近 Collings 等^[22]对芬兰年轻人中 C1019T 多态性的检测表明,连接蛋白 37 基因 C1019T 多态性与颈动脉内中膜的厚度之间没有相关性。最近,爱尔兰一个以家庭为基础的研究也得出了阴性的结果^[23]。

韩雅玲等^[24]研究表明在中国北方人群中连接蛋白 37 基因 C 等位基因在男性中是冠心病的独立危险因素,而女性中则没有统计学意义。谢学兰等^[25]研究也表明 C 等位基因是冠心病的危险基因。而先前的研究^[26]则表明在来自温州地区的一个人群中,连接蛋白 37 基因 T 等位基因是冠心病的独立危险基因。这种研究结果明显差异的原因,认为可能与不同种族和地区的研究人群,样本量不够大,以及不同的研究对象(比如冠心病,心肌梗死,颈动脉粥样硬化)等有关。Lanfean 等^[27]最近研究表明连接蛋白 37 基因 C1019T 多态性能预测急性冠脉综合征的预后,T 等位基因携带者 3 年的死亡率增高(14.0% 对 8.3% 与 CC 纯合子相比, $P = 0.02$),调整后的危险比为 1.7,95% CI 1.05-2.8, $P = 0.03$ 。但总之,连接蛋白 37 基因 C1019T 多态性是否与 As 的危险性相关,是 T 等位基因还是 C 等位基因是 As 的危险基因,是否可作为冠心病的遗传决定因素,尚有待于进一步研究明确。此外,连接蛋白 37 基因还存在-1930C/T 和 I1297D 多态性,但这两个多态位点与 As 的关系目前研究较少,韩雅玲等^[24, 28]表明这两个多态位点与冠心病之间无显著相关性。

4 结论与展望

综上所述,连接蛋白 37 可能具有抗 As 的功能,涉及到切应力,炎症,高胆固醇血症等目前动脉粥样硬化研究的许多热点方面。连接蛋白 37 基因 C1019T 多态性与 As 易感染性之间的关系目前国内外研究结果相左,这可能与不同的研究人群,样本量,研究对象的不同有关,故有待今后大样本的研究进一步明确。但不可否认,连接蛋白 37 在 As 发病机制中起重要的潜在作用,是一个值得进一步研究的靶点。可以设想,对连接蛋白 37 与 As 关系的进一步研究,将对进一步阐述动脉粥样硬化发病机制,对冠心病、心肌梗死的危险性预测和防治,乃至抗 As 新药的开发等方面具有重要的意义。

[参考文献]

- [1] Chadjichristos CE, Kwak BR. Connexins: new genes in atherosclerosis [J]. *Ann Med*, 2007, **39** (6): 402-411.
- [2] Simon AM, Goodenough DA, Li E, et al. Female infertility in mice lacking connexin 37 [J]. *Nature*, 1997, **385** (6 616): 525-529.
- [3] Simon AM, McWhorter AR. Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40 [J]. *Dev Biol*, 2002, **251** (2): 206-220.
- [4] Cai WJ, Kocsis E, Scholz D, et al. Presence of Cx37 and lack of desmin in smooth muscle cells are early markers for arteriogenesis [J]. *Mol cell Biochem*, 2004, **262** (1-2): 17-23.
- [5] Wong CW, Christen T, Roth I, et al. Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion [J]. *Nat Med*, 2006, **12** (8): 950-954.
- [6] Yeh HI, Lu CS, Wu YJ, et al. Reduced expression of endothelial connexin37 and connexin40 in hyperlipidemic mice recovery of connexin37 after 7-day simvastatin treatment [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (8): 1 391-397.

- [7] Hou CJ, Tsai CH, Su CH, et al. Diabetes reduces aortic endothelial gap junctions in apoE-deficient mice: simvastatin exacerbates the reduction [J]. *J Histochem Cytochem*, 2008, **56** (8): 745-752.
- [8] Kwak BR, Mulhaupt F, Veillard N, et al. Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (2): 225-230.
- [9] Stone PH, Coskun AU, Kinlay S, et al. Effect of endothelial shear stress on the progression of coronary artery disease, vascular remodeling, and in-stent restenosis in humans: in vivo 6-month follow-up study [J]. *Circulation*, 2003, **108** (4): 438-444.
- [10] Cheng C, Tempel D, van Haperen R, et al. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress [J]. *Circulation*, 2006, **113** (23): 2 744-753.
- [11] Elong EE, Kim S, DePaola N. Flow regulates intercellular communication in HAEC by assembling functional Cx40 and Cx37 gap junctional channels [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **290** (5): H2 015-023.
- [12] Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (41): 14 871-876.
- [13] van Rijen HV, van Kempen MJ, Postma S, et al. Tumour necrosis factor alpha alters the expression of connexin43, connexin40, and connexin37 in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Cytokine*, 1998, **10** (4): 258-264.
- [14] Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function [J]. *FASEB J*, 1992, **6** (8): 2 591-599.
- [15] Boerma M, Forsberg L, Van Zeijl L, et al. A genetic polymorphism in connexin37 as a prognostic marker for atherosclerotic plaque development [J]. *J Intern Med*, 1999, **246** (2): 211-218.
- [16] Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes [J]. *N Engl J Med*, 2002, **347** (24): 1 916-923.
- [17] List F, Candore G, Lio D, et al. Association between C1019T polymorphism of connexin37 and acute myocardial infarction: a study in patients from sicily [J]. *Int J Cardiol*, 2005, **102** (2): 269-271.
- [18] List F, Candore G, Balistreri CR, et al. Connexin37 1019 gene polymorphism in myocardial infarction patients and centenarians [J]. *Atherosclerosis*, 2007, **191** (2): 460-461.
- [19] Yeh HI, Chou Y, Liu HF, et al. Connexin37 gene polymorphism and coronary artery disease in Taiwan [J]. *Int J Cardiol*, 2001, **81** (2-3): 251-255.
- [20] Wong CW, Christen T, Pfenniger A, et al. Do allelic variants of the connexin37 1019 gene polymorphism differentially predict for coronary artery disease and myocardial infarction [J]? *Atherosclerosis*, 2007, **191** (2): 355-361.
- [21] Fox CS, Polak JF, Chazaro I, et al. Genetic and environmental contributions to atherosclerosis phenotypes in men and women: heritability of carotid intima-media thickness in the Framingham Heart Study [J]. *Stroke*, 2003, **34** (2): 397-401.
- [22] Collings A, Islam MS, Juonala M, et al. Associations between connexin37 gene polymorphism and markers of subclinical atherosclerosis: The Cardiovascular Risk in Young Finns study [J]. *Atherosclerosis*, 2007, **195** (2): 379-384.
- [23] Horan PG, Allen AR, Patterson CC, et al. The connexin 37 gene polymorphism and coronary artery disease in Ireland [J]. *Heart*, 2006, **92** (3): 395-396.
- [24] Han Y, Xi S, Zhang X, et al. Association of connexin 37 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in northern han chinese [J]. *Cardiology*, 2007, **110** (4): 260-265.
- [25] 谢学建, 郭文怡, 李兰荪, 等. Connexin37 基因多态性与冠心病的相关性[J]. *心脏杂志*, 2006, **18** (5): 539-541.
- [26] 章顺荣, 徐力辛, 张怀勤, 等. Connexin37 基因多态性与冠心病的关联研究[J]. *心脑血管病防治*, 2007, **7** (6): 390-392.
- [27] Lanfean DE, Jones PG, Marsh S, et al. Connexin37 (GJA4) genotype predicts survival after an acute coronary syndrome [J]. *Am Heart J*, 2007, **154** (3): 561-566.
- [28] 韩雅玲, 席素雅, 张效林, 等. 连接蛋白 37 基因 I1297D 多态性与中国北方汉族人群早发冠心病的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (8): 630-633.

(此文编辑 李小玲)