

间隙连接及其调控因素

杨德鸿 高天明¹⁾ 陈建庭 金大地*

(第一军医大学南方医院, 广州 510515)

摘要 概述了间隙连接的结构和功能, 以及 pH 值、电压、生长因子对它的调节作用。间隙连接作为相邻细胞间信息物质通道, 起着传递细胞信息, 协调细胞群体功能的作用, 但是其形成过程以及对机体生理功能影响的研究有待进一步深入。pH 值降低可引起间隙连接通道的关闭, 电压升高降低通道的导电性, 生长因子可通过影响间隙连接蛋白的形成和降解、促使间隙连接蛋白磷酸化调节其通透性。

关键词 间隙连接, pH 值, 电压, 生长因子

学科分类号 Q26

在生物体内, 细胞间的信息交流方式可分为长距通讯和短距通讯。前者以激素或生长因子为介质, 通过血循环和局部组织液的流动, 将信息从一个细胞传到另一个细胞。后者指相邻的细胞形成直接的通道, 信息物质由此进行交流。这种细胞间的通道即是间隙连接 (gap junction), 由此而形成的信息交流方式称为间隙连接细胞通讯 (gap junction intercellular communication, GJIC)。

1 间隙连接的结构和功能

1.1 连接蛋白的结构

连接蛋白 (connexin, Cx) 是间隙连接的基本组成单位。目前人们已经从哺乳动物的体内发现了 14 种连接蛋白分子。所有的蛋白质分子均具有相同的拓扑结构图 (图 1)。连接蛋白分子的肽链 4

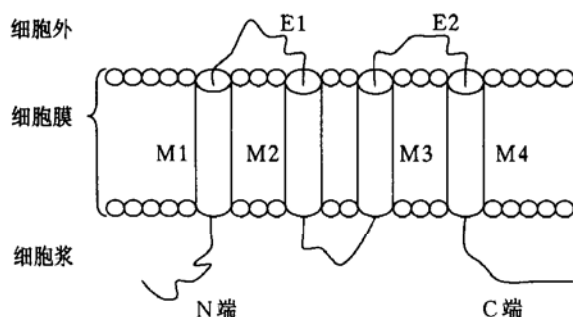


Fig. 1 The topography of Connexin

图 1 连接蛋白的拓扑结构图

次横穿细胞膜的脂双层结构, N 端和 C 端位于胞浆内, 其中跨膜区 M3 同时具有亲水和疏水的特性, 可直接影响间隙连接通道的排列^[1]。两个胞

外襻 (E1 和 E2) 引发细胞间连接复合体的形成, 每个襻具有特征性的三个半胱氨酸残基, 有助于维持牢固的蛋白质三级结构, 使细胞相互之间锚着牢固。位于胞浆内的内襻和肽链的 C 端在不同的连接蛋白之间差别很大, 是该蛋白质重要的受调控区域。

1.2 间隙连接的形成和降解

六个连接蛋白先形成六聚体结构 (连接子), 然后相邻两个细胞的连接子以非共价方式结合形成间隙连接。许多间隙连接形成间隙连接斑, 这就是平时光镜观察到的结构。

当连接子半通道在胞浆细胞器内形成后, 即通过微管系统将连接子输送到细胞膜, 已经证明, 一些粘附分子如 L-CAM, E-Caderin 和 N-Caderin 参与了细胞间间隙连接通道的形成。磷酸化过程也可能参与间隙连接的形成和保持。到达细胞表面后, 相邻细胞的连接子便具有了形成间隙连接的潜能。实验证明在几秒内或几分钟内可形成间隙连接。但具体的形成方式尚待进一步研究。

间隙连接的降解具有两个途径: a. 在其中一个细胞的间隙连接斑里内化, 即细胞的一部分细胞膜连同一起的 Cx 脱离功能位并随着细胞膜的降解而降解。Cx 脱离后是否可重新回到功能位尚需进一步研究。b. Cx 直接脱离细胞膜。但是, 只有间隙连接产生松动, 才能出现上述两个途径的降解过

¹⁾ 第一军医大学基础部生理教研室, 广州 510515。

* 通讯联系人, 第一军医大学南方医院骨科。

Tel: 020-85141725, E-mail: orthops@fimmu.edu.cn

收稿日期: 2000-07-21, 接受日期: 2000-09-28

程. 目前已经测定 Cx43 的半衰期为 1.5~3.5 h, 短的半衰期提示间隙连接可根据外界的调节而即时产生反应^[2].

1.3 间隙连接的功能

与其他的膜通道不同, 间隙连接是联系相邻两个细胞的信息物质通道, 对相对分子质量小于 1 000 (或者直径小于 1.5 nm) 的物质相对不具有选择性, 物质以被动扩散方式通过间隙通道. 但对不同的第二信使分子 (cAMP, IP₃, cGMP, Ca²⁺) 则具有不同的通透性, 其结果是仅有部分特定的细胞受到第二信使的调节.

通道的不同通透性对正常的生理过程十分重要, 研究已发现在机体的很多系统, 在细胞生长的不同时期连接蛋白的表达水平不同, 甚至可以表达不同的连接蛋白^[3,4]. 这些改变与细胞生物学特性的关系有待进一步研究.

分子重组和对细胞间间隙连接通道特性的生物物理学研究表明不同的连接蛋白具有不同的单通道导电性, 从 20 pS 到数百 pS, 不同的单通道导电特性可以反映连接蛋白的排列.

间隙连接的主要生理功能体现在: a. 在可兴奋组织传导动作电位, 允许带电离子自由从一个细胞到达另一个细胞; b. 在非兴奋组织维持细胞间小分子物质的动态平衡, 协调细胞群体的功能; c. 在胚胎形成、生长和发育中调节细胞间信号的传递.

2 间隙连接的影响因素

2.1 pH 值

pH_i 的降低可引起间隙连接通道的通透性下降或关闭, 而且不同的 Cx 通道对 pH_i 的敏感性不一样^[5]. Francis 等^[6]认为, 连接蛋白的一级结构决定着通道的 pH_i 敏感性, 连接子之间的相互作用也影响通道的 pH_i 敏感性. 短时间的低 pH_i 引起通道的关闭是可逆的, 长时间的作用可引起通道不可逆性的失活. 关于 pH_i 对间隙连接的调节机制, Morley 等^[7]提出了“粒子-受体 (particle receptor)”模型. 连接蛋白的 C 端包含一个特殊区域 (粒子), 与此同时, 在连接蛋白的胞浆内褶 (受体) 参与形成间隙通道的内口, 当受到低 pH_i 值刺激时, “粒子”移动与“受体”结合, 通道全部或部分关闭. 目前已经初步明确, “受体”位于第 95 位组氨酸附近; “粒子”处于 C 端第 261~300 位氨基酸, 富

含亮氨酸残基, 具有 (PXX)₃ 重复结构, 呈 α 左手螺旋. 进一步研究发现, pH_i 关闭间隙连接通道并非“粒子”和“受体”二者间的直接作用, 而是存在一个或多个中介蛋白^[8].

2.2 电压

所有哺乳动物细胞间隙连接对电压敏感, 电压增高, 间隙连接通道的导电性降低, 但几乎所有的通道在较大电压的情况下仍能保留残余通透性. Moreno 等^[9]认为, 通道的残余导电性是由于 Cx43 蛋白通道的亚开放状态对电压相对不敏感引起. 他们的研究进一步提示, 间隙连接通道在某些特殊因子刺激下的关闭是逐级发生的而非“全或无”方式. Verselis 等^[10]证明 Cx 的 N 端和 M1E1 交界区的氨基酸残基参与构成电荷复合体, 进而参与形成电压感受器, 这一肽段位于或靠近通道孔, 感受跨间隙连接电场. 游离 N 端的蛋氨酸残基可能组成电荷复合体的正电荷. M1 和 M3 及其他跨膜的保守电荷是电压感受器的辅助成分.

一般情况下, 连接子半通道处于关闭状态, 以防止胞浆内物质漏出和胞外物质进入. 当两个细胞形成连接后, 半通道才打开, 此时, 两个半通道形成一个整体对跨间隙连接电压 (V_j) 的变化作出反应. Cx46、Cx56、Cx36 等的半通道在中等程度去极化的情况下也可以打开. Trexler 等^[11]用“襻”阀门机制解释这一现象: 胞浆内带负电时, 连接子的胞浆外襻阀门关闭; 当胞膜逐步去极化, 胞浆内阀门 (V_j 阀门) 不完全关闭, 胞浆外襻阀门不完全打开, 形成了介于完全开放 (γ_{open}) 和关闭 (γ_{close}) 之间的中间开放状态 (γ_{sub}); 进一步去极化, V_j 阀门完全关闭, 襻阀门打开, 则半通道处于关闭状态. Banach 等^[12]发现 Cx43 单通道存在多导电状态, 除了位于主要开放状态和残余导电状态间的快速过渡态之外, 尚存在开放状态 (主要开放状态和残余导电状态) 和关闭状态之间的慢速过渡态. 前者持续 2 ms, 后者持续 3.5 到 145 ms. Revilla 等^[13]证明在 Cx32 和 Cx43 分子, 羧基端参与了快速过渡态的电压阀门开闭.

2.3 细胞因子

细胞因子从调节连接蛋白的合成和分解、促进连接蛋白的磷酸化等方面调节细胞间隙连接通讯.

连接蛋白是间隙连接的物质基础, 细胞因子对它的调节可发生在基因转录水平. 不同的生长因子对不同的 Cx mRNA 的表达具有不同的作用. 有证据表明 Cx43 磷酸化可触发其降解过程.

磷酸化是生长因子调节间隙连接通透性的重要方式。Cx43 蛋白的丝/苏氨酸残基磷酸化可引起通道短暂而快速的关闭;酪氨酸的磷酸化则引起永久的或长期的通道关闭。已经证明, Cx43 的分子上存在蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和丝裂素激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的作用位点, 与间隙连接通道的关闭有关。磷酸化发生后, 可能出现下列三种情况: 其一, C 端可直接影响通道孔, 使通道关闭。其二, C 端与中介分子形成复合物, 阻塞通道孔, 其三, 可能是 C 端磷酸化后调节中介分子, 使其能附着到通道孔。磷酸化后, GJIC 受到抑制, GJIC 的恢复有赖于连接蛋白的新合成。在影响 GJIC 的众多生长因子中, 血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 和胰岛素生长因子 (insulin growth factor, IGF) 受到了较多的关注。

2.3.1 PDGF: PDGF 是分子质量 30 ku 的多肽, 是一种较强的细胞促分裂因子^[14]。研究证明, PDGF 对间隙连接的信息交流具有干扰作用。PDGF 的主要作用机制是使间隙连接蛋白磷酸化, 它在 Cx43 上的作用位点是 C 端的第 257~382 位残基^[15]。当连接蛋白的 C 端磷酸化以后, 激活某一个或几个中间分子, 形成粒子, 阻塞通道孔, 使间隙连接通道关闭。

已经证明, PDGF 引起的通道抑制通过多重信号传递来完成, 这种作用与 PKC 和 MAPK 的激活有关, 但 MAPK 激活和 Cx43 蛋白的磷酸化并非是干扰间隙连接通讯的充分条件。Hossain 等^[16]发现, 当 PDGF 活化 PDGF 受体 (PDGFR) 后, 包含于 Src 同源结构域的蛋白酪氨酸磷酸化酶 (Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2, SHP-2) 和磷脂酶 C γ 1 (phospholipase C γ 1, PLC γ 1) 进一步将信号传给下游的 PKC 和/或 MAPK, 最终完成介导 PDGF 对 GJIC 的抑制。而其他信号分子可能参与构成信号通路的代偿途径或者起调节作用。他们的研究还发现, MAPK 的活化和 Cx43 的磷酸化不足以引起 GJIC 通道的关闭, 必须在其他分子的参与下形成一个“全或无” (all or none) 的体系来介导 PDGF 等因子的作用。

SHP-2 和 PLC γ 1 与 PDGF 的促增殖活性和促异型变有关, 提示 PDGF 抑制 GJIC 与上述两种现象存在联系。一般认为, GJIC 出现快速而短暂的抑制, 使细胞间连接松动, 然后细胞才能分裂。Moorby 等^[15]认为, 除了间隙连接与细胞的增殖有

关, 连接蛋白自身还可能对细胞的增殖有单独作用。

2.3.2 IGF: IGF 与细胞表面 IGF 受体结合后, 激活 MAPK, 使 Cx43 蛋白磷酸化和 GJIC 通道关闭。

Homma 等^[17]证明 IGF 可使爪蟾卵母细胞的 G_j 明显下降, 但它并不引起 pH_i 的改变。他们认为, IGF 的作用可用“粒子-受体”模型解释, C 端磷酸化后, 在中介分子的参与下, 形成“粒子”, 阻塞通道孔, G_j 下降。但与 pH_i 调节 GJIC 不同的是, IGF 在 C 端的作用位点不同。

3 结 语

细胞通讯对细胞和组织的功能有重要的调节作用。如女性生育、细胞增殖和生长的控制、胚胎发育、晶状体导光、正常心脏电生理。间隙连接作为相邻细胞间直接的通讯通道, 起着传导细胞信息, 协调细胞群体功能的作用, 它是细胞生长、发育和其他各种功能活动的重要局部协调因素。近来, 人们逐步发现间隙连接功能的失调与多种疾病有关, 如: 肿瘤的发生、心脏疾病、肝脏疾病 (如 Charcot-Marie-Tooth)、非综合征性感觉神经失聪、严重心脏结构不良 (如内脏前房异位) 等。但是下列问题仍不十分明确: a. 间隙连接的形成过程。b. 间隙连接在机体生理活动中的作用。c. 间隙连接改变和组织病理变化的关系。d. 相关因素的调节作用对机体生理和病理活动的影响。随着对间隙连接研究的进一步深入, 人们必将获得对疾病病因和治疗的新认识。

参 考 文 献

- 1 Kumar N M, Gilula N B. The gap junction communication channel. *Cell*, 1996, **84** (3): 381~388
- 2 Laird D W. The life cycle of a connexin: gap junction formation removal, and degradation. *J Bioenergetics Biomembrane*, 1996, **28** (4): 311~317
- 3 Brissette J L, Kumar N M, Gilula N B, *et al.* Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (14): 6453~6457
- 4 Larson D M, Wroblewski M J, Sagar G D V, *et al.* Differential regulation of connexin43 and connexin37 in endothelial cells by cell density, growth, and TGF- β . *Am J Physiol*, 1997, **272** (2-1): C405~415
- 5 Hermans M M, Kortekaas P, Jongsman H J, *et al.* pH sensitivity of the cardiac gap junction proteins, connexin 45 and 43. *Pflügers Arch*, 1995, **431** (1): 138~140

- 6 Francis D, Stergiopoulos K, Ek-Vitorin J F, *et al.* Connexin diversity and gap junction regulation by pH_i . *Dev Genet*, 1999, **24** (1~2): 123~136
- 7 Morley G E, Ek-Vitorin J F, Taffet S M, *et al.* Structure of connexin43 and its relation by pH . *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1997, **8** (8): 939~951
- 8 Calero G, Kanemitsu M, Taffer S M, *et al.* A 17mer peptide interferes with acidification-induced uncoupling of connexin43. *Circ Res*, 1998, **82** (9): 929~935
- 9 Moreno A P, Rook M B, Fishman G I, *et al.* Gap junction channels: distinct voltage-sensitive and -insensitive conductance states. *Biophys J*, 1994, **67** (1): 113~119
- 10 Verselis V K, Ginter C S, Bargiello T A. Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature*, 1994, **368** (6469): 348~351
- 11 Trexler E R, Bennett M V L, Bargiello T A, *et al.* Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (12): 5836~5841
- 12 Banach K, Weingart R. Voltage gating of Cx43 gap junction channels involves fast and slow current transitions. *Pflugers Arch*, 2000, **439** (3): 248~250
- 13 Revilla A, Castro C, Barrio L C. Molecular dissection of transjunctional voltage dependence in the connexin32 and connexin43 junctions. *Biophys J*, 1999, **77** (3): 1374~1383
- 14 Yang D H, Chen J T, Jing Z S, *et al.* Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) - AA: A Self-imposed Cytokine In the Proliferation of Human Fetal Osteoblasts. *Cytokine*, 2000, **12** (8): 1271~1274
- 15 Moorby C D. Expression of a Cx43 deletion mutant in 3T3 A31 fibroblasts prevents PDGF-induced inhibition of cell communication and suppresses cell growth. *Experiment Cell Research*, 1999, **249** (2): 367~376
- 16 Hossain M Z, Jagdale A B, Ao P, *et al.* Disruption of gap junctional communication by the platelet-derived growth factor is mediated via multiple signaling pathways. *J Biochem Chem*, 1999, **274** (15): 10489~10496
- 17 Homma N, Alvarado J L, Coombs W, *et al.* A particle receptor model for the Insulin-induced closure of connexin43 channels. *Circ Res*, 1998, **83** (1): 27~32

Gap Junction: Modulated by pH_i , Voltage and Cytokines

YANG De-Hong, GAO Tian-Ming¹⁾, CHEN Jian-Ting, JIN Da-Di*

(The Spinal and Orthopedic Department, Nanfang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;

¹⁾ Department of Physiology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstracts Structure and function of gap junction as well as the role of pH_i , voltage and cytokines on the modulating of gap junction are introduced. Gap junction is an information channel between the adjacent cells, with the function that delivering message and coordinating the actions of cell groups, but its formation and its function on the physical events need more research. The lower pH_i closes the gap junctional channel and it is explained by "particle-receptor" model. The increase of voltage downregulates the conductance of the channel. Cytokines regulate the permeability of gap junction by changing the synthesis and degradation of connexin, enhancing the phosphatizing the connexin.

Key words gap junctions, pH_i , voltage, cytokine

* Corresponding author. Tel: 86-20-85141725, E-mail: orthops@fimmu.edu.cn

Received: July 21, 2000 Accepted: September 28, 2000