

# · 综 述 ·

## 脏器保护与细胞间隙连接 (上)

林仲翔 张志谦 赵威

人体脏器结构功能的健全和脏器间活跃的协同作用是保持机体内稳定和对外环境信号迅敏应答的前提。人类生命光辉的闪烁依赖于器官的健康,包括能有效地摄取外界营养、能量,保持自身组织生长、代谢和更新,修复损伤与抵抗有害因素(物理、化学、微生物等等)侵袭及疾病发生。脏器健康表现在:良好的内部平衡;灵活的调节;活跃的功能状态;代偿功能强;自身修复力好;缓冲性能好;解毒和抗病力强等方面。它的保持除依赖于神经、体液和免疫系统综合形成的全身性调节网络外,还以细胞与细胞间的相互作用和通讯为重要基础。细胞间相互作用最为普遍和重要的形式是细胞连接;它们是细胞-细胞间的粘附连接、间隙连接和细胞-外基质间的粘着连接。其中细胞间隙连接是介导细胞质直接交流惟一的膜通道结构;一个细胞膜上形成的通道结构称为半通道,只有与对应细胞的另一个半通道相对接才形成一个完整的间隙连接通道(图 1)。间隙连接维持细胞间代谢协同和相互通讯,对调节机体组织的内稳态起主导作用,它的异常与疾病发生有密切关系<sup>[1,2]</sup>。近期不同来源的研究资料表明,细胞间隙连接直接参与细胞生命活动包括细胞增殖、分化和凋亡的调节;在重要脏器如神经系统、心脏、肺和视觉器官中间隙连接细胞间通讯的功能状态与器官疾病防护有关。“间隙连接的脏器保护作用”是基础医学研究中的新思路已受到日益关注,其进展对于老年多器官疾病机制将带来许多启示。本篇介绍脏器保护与间隙连接有关的基础研究新进展。

### 1 间隙连接通讯功能参与细胞生命的社会性调控

正常细胞膜上有丰富的间隙连接。电子显微镜冰冻蚀刻图像证明,细胞膜上间隙连接为膜上突起的均质性小颗粒聚集形成的片块(图 2),每个片块直径大小不一,含有数个多至数百个小颗粒。它们是间隙连接的结构单位,称为连接子(connexon)。每一个连接子为由 6 个间隙连接蛋白(connexin)亚

单位聚合组成的管道,中央通道直径约为 1.5nm,只能通过分子量小于 1 000D(1D=0.992 1u)的分子和离子。培养的细胞仍保持有丰富的间隙连接这一特点,并显示很强的的细胞间通讯功能,表现在细胞间传输小分子量荧光染料的功能(图 3,4)<sup>[3,4]</sup>。间隙连接介导神经元之间和心肌细胞之间化学物质和兴奋电位的传导;核苷/核苷酸如 ATP,cAMP,磷酸肌醇 IP3 等重要能量分子和信号分子,营养分子葡萄糖、氨基酸和维生素,还有 Ca<sup>2+</sup> 等带电荷的离子通过间隙连接在细胞间进行交流,参与神经兴奋和抑制性电波的扩散和心肌同步搏动的调节及其他许多细胞功能活动的调节。已经证明,神经元电突触的细胞膜上主要分布着间隙连接<sup>[5]</sup>,心肌细胞闰盘上存在密集的间隙连接<sup>[6]</sup>。神经胶质细胞之间及与神经元之间,人肺细胞、肺泡间隔间质细胞均由间隙连接相连(图 4,5)<sup>[5,7-9]</sup>。由间隙连接通道将组织细胞的胞质相连贯,形成具有空间缓冲能力类似合胞体的细胞网络,从而保持器官的内在平衡和稳定;

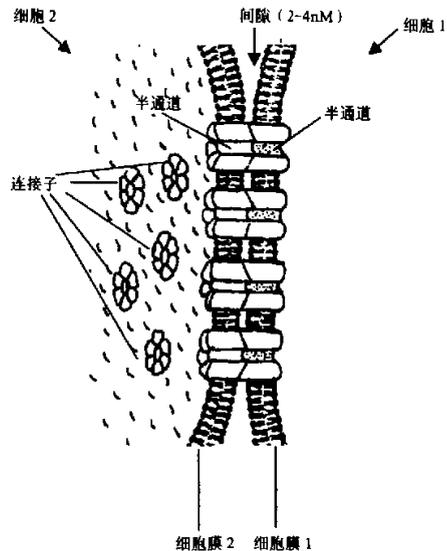


图 1 间隙连接通道组装模式(示意图)

注:连接子(connexon)为间隙连接的结构单位,是由 6 个连接蛋白(connexin)形成的六聚体。许多连接子在膜上聚集形成大小不同的片块,为电镜所描述的间隙连接(图 2)。一个完整的连接通道由 2 个相邻细胞膜上的半通道对接形成

作者单位:100034 北京,北京市肿瘤防治研究所暨北京大学临床肿瘤学院  
作者简介:林仲翔,女,医学本科,教授

通过这种机制对个体细胞进行调控,可以看作如同社会对人类个体的制约一样,细胞个体受到细胞群体“社会”的制约,这种“社会性”调控对于细胞增殖、分化及凋亡的作用特别明显<sup>[10]</sup>。间隙连接功能失调对于疾病发生的影响也为大量资料所强调,最为广泛了解的是细胞通讯抑制与肿瘤发生的关系。前人曾在不同种系细胞证明,恶性肿瘤如人的胃癌、肺癌、横纹肌肉瘤、肝癌、大鼠神经胶质细胞瘤的间隙连接通讯抑制,细胞膜上的连接通道消失,并且间隙连接蛋白表达和基因转录抑制。然而,当在生长抑制药物或促分化药物处理后使肿瘤生长抑制,分化改善,恶性逆转的同时,细胞通讯功能恢复。基因转染实验的结果,进一步表明,细胞通讯的恢复对于癌细胞去恶化有着主导作用,例如用间隙连接基因 Cx43 或 Cx32 的 cDNA 分别导入相应 Cx 基因表达抑制和间隙连接通讯功能缺陷的癌细胞,分离到稳定表达 Cx 基因的转染细胞克隆,但程度不同,都表现间隙连接通讯功能恢复,及恶性逆转,突出表现在肿瘤生长抑制和分化改善(图 6)<sup>[11-13]</sup>。如何理解细胞生长由间隙连接贯通的细胞群体“社会”所调控?目前较为广泛接受的假说是“促生长因子扩散稀释论”,或“生长抑制因子输入论”。这一假说得到体外实验结果支持,增殖旺盛的培养细胞通讯功能差,膜上间隙连接少,达到密度饱和后通讯功能强,膜上间隙连接增多。体外肝局部切除肝再生区细胞通讯功能差,间隙连接少。当肝组织再生达到体积饱和后,间隙连接增多细胞通讯恢复,增生停止。肿瘤发生过程间隙连接通讯抑制,癌变细胞与周围正常细胞间失去联系,癌基因产物在癌变细胞内聚集使增殖失控;周围正常细胞内的增殖调控因子如 cAMP 等不能进入癌变细胞,癌变细胞失去正常的细胞群体“社会性”调控后进一步扩增形成肿瘤。促癌剂佛波酯(TPA)的一个主要作用是抑制细胞间隙连接通讯,使早期癌变细胞失去周围正常细胞的“社会性”调控得以迅速扩增,这已在动物实验得到证实<sup>[9,14-16]</sup>。另一种有促癌变作用的中草药黄芩花促进 V79 细胞增殖的同时间隙连接通讯抑制<sup>[3]</sup>。间隙连接通讯的“社会性”调控对细胞生长发育的影响已有大量证据,动物实验胚胎学资料证明,间隙连接蛋白显性阴性抑制使蝶螈发育畸形<sup>[17]</sup>;间隙连接基因 Cx43 敲除纯合子小鼠生后不久死亡,心脏明显畸形。流行病学资料表明,Cx43 基因突变与人类家族性心脏畸形有关。另一些资料证明,其他 Cx 基因突变与人类家族性遗传疾病有关,如 Cx32 突

变与 CMT 神经性肌萎缩症及 Cx26 突变与神经性耳聋的关系<sup>[17,18]</sup>。

## 2 间隙连接与神经保护

在发育中的及成熟的神经系统,神经元与胶质细胞间由间隙连接偶合,通过间隙连接传播化学性和电子性信号,并在细胞间直接交流代谢产物及细胞分解产物<sup>[5]</sup>。形成间隙连接蛋白家族(connexins, 略称 Cx),它有许多成员,不同 Cx 成员形成的间隙连接通道其通透性、开关效率及通道内调变特性明显不同<sup>[19]</sup>。在发育过程中通过表达不同的 Cx 成员影响细胞间第二信使的传播,诱导细胞分化方向,从而支持形态发生的级差与“地区分割”调节的形成。在发育成熟的神经系统,间隙连接存在于电突触,介导不依赖于化学突触的电兴奋传导。中枢神经系统已证明的 7 种 Cx 成员中,Cx26、Cx32 存在于神经元细胞,而 Cx43、Cx45 存在于胶质细胞亚群。胶质细胞和神经元细胞之间相互作用参与正常信息传播和神经保护过程,间隙连接细胞间通讯(GJIC)就是这种相互作用的途径之一<sup>[5]</sup>。间隙连接蛋白 Cx43 为形成具有空间缓冲潜能的星形细胞功能性胞体提供了基质<sup>[20,21]</sup>。当中枢神经系统(CNS)损伤导致谷氨酸细胞毒(例如局部贫血)情况下,间隙连接细胞间通讯可能起神经保护作用<sup>[21]</sup>。利用共培养的星形细胞与神经元细胞进行谷氨酸损伤实验,结果证明,当 GJIC 被甘珀酸(carbenoxolone, CBX) 25 μmol/L, 24h 抑制时,细胞释放乳酸脱氢酶(LDH)和凋亡指数均比对照增高 25%。利用 Cx43 敲除杂合子小鼠中脑动脉阻断性卒中模型也证明这一点,该动物表现 Cx43 水平与 GJIC 功能下降。局限性缺血形成的脑梗死体积测量表明,Cx43 敲除小鼠与野生型对照比较,其脑梗死体积明显增大。以上结果提示星形细胞 GJIC 功能增强对于脑缺血性损伤具有神经保护作用<sup>[21]</sup>。中脑底黑质的多巴胺神经元在运动行为的发生与调节中起着关键作用,它们的退行性变是帕金森病(PD)的主要原因。体内、外实验证明,成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)在发育过程中对中枢神经和外周神经的神经元细胞包括脊髓运动神经元和中脑多巴胺能神经元具有促生存和分化的作用。生物化学与电生理的证据表明,成体中脑多巴胺能神经元之间存在电偶合,表达 Cx32, Cx43。FGF-2 可诱导细胞内的第二信使分子和离子 IP<sub>3</sub>, cAMP, Ca<sup>2+</sup> 升高,通过间隙连接而传播。当神经元或神经胶质细胞间 GJIC 发生

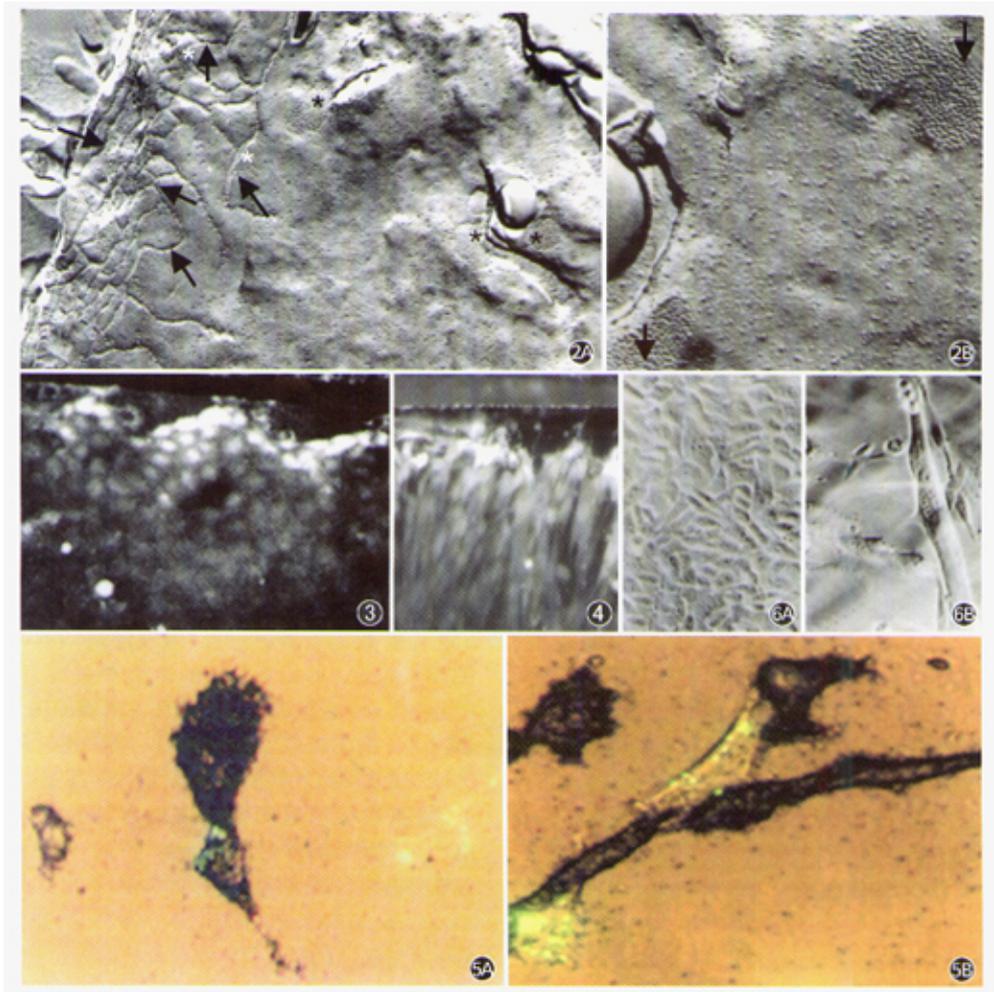


图 2 胃粘膜细胞膜电镜冰冻蚀刻照片

注:2A 星号标志大小不同的间隙连接片块,箭头指向细胞顶侧面膜紧密连接及附近的小块间隙连接(14 666×);2B 箭头指示间隙连接片块,其中每个小颗粒代表一个连接子(900 000×)

图 3 图 4 示细胞间传输小分子物质的功能

注:图 3:培养的肝细胞 WB 系列痕标记荧光染料传输,从标记细胞(图上沿)向邻近细胞传输约 10 级,表明间隙连接细胞间通讯功能很强(550×);图 4:同图 3 方法,培养的肺细胞荧光染料传输 5 级以上,间隙连接通讯功能强(214×)

图 5 同位素自显影图像(570×)

注:神经胶质瘤细胞 P98F47 系,荧光小球标记受体细胞(含黄绿色小球),<sup>3</sup>H-尿嘧啶标记宿主细胞(含黑色颗粒)。5A 示两种细胞共培养接触后形成细胞间隙连接,宿主细胞<sup>3</sup>H-尿嘧啶可以通过连接通道输入受体细胞(含荧光小球与黑色颗粒)。5B 用间隙连接通讯抑制剂处理,两种细胞接触但细胞间无传输。与宿主细胞(含黑色颗粒)接触的受体细胞只含荧光小球

图 6 横纹肌肉瘤细胞(RD 系)相差显微照相(182×)

注:6A RD 细胞的连接蛋白 Cx43 表达抑制,通讯阴性,肌分化经抑制,在分化培养基培养数日不形成肌管。6B RD 细胞经 Cx43 DNA 转染后的稳定表达 Cx43 细胞克隆 RD C4,通讯功能恢复,肌分化改善,在分化培养基培养数日形成多核肌管

变化则干扰 FGF-2 信号途径,因此 GJIC 对中枢多巴胺能神经元的 FGF-2 效应应具有神经保护作用<sup>[20]</sup>。FGF-2 使培养的胎龄 14 天的大鼠胚胎中脑底细胞

Cx43 水平与 GJIC 功能升调,而间隙连接抑制剂 Oleamide 抑制 FGF-2 对多巴胺能神经元的促生存作用,从而进一步强化了 GJIC 可能是神经元生存

状态的有力标志<sup>[20]</sup>。小鼠星形细胞在低渗液应激后 GJIC 功能反应性升高,可促进第二信使信号分子在胶质细胞网内的传播,对神经损伤起到神经保护作用<sup>[22]</sup>。

#### 参 考 文 献

- Ruth RL. Role of gap junction in cellular growth control and neoplasia: evidence and mechanisms. *Curr Top Memb*, 2000, 49:535-554.
- Spray DC, Scemes E, Rozental R. Introduction to cell-cell communication. In: Zigmond, Bloom, Landis, et al. eds. *Fundamental Neuroscience*. New York: Academic Press, 1998. 317-343.
- 林仲翔,吕桂芝,江世文,等. 黄芩花提取物对 V79 细胞和 WB 肝细胞的生物学效应. 1. 细胞连接通讯与增殖活性的相关性变化. *实验生物学报*, 1991, 24:307-315.
- 高燕,林仲翔,吕桂芝,等. 小鼠胃粘膜细胞和人胃癌细胞间隙连接的超微结构研究与促癌变剂的影响. *细胞生物学杂志*, 1991, 13:24-27.
- Rozental R, Giaume C, Spray DC. Gap junctions in the nervous system. *Brain Res Rev*, 2000, 32:11-15.
- Fromaget C, el-Aoumari A, Gros D. Distribution pattern of connexin 43, a gap junctional protein, during the differentiation of mouse heart myocytes. *Differentiation*, 1992, 51:9-20.
- Willecke K, Heynkes R, Dahl E, et al. Mouse connexin 37: cloning and functional expression of a gap junction gene highly expressed in lung. *J Cell Biol*, 1991, 114: 1049-1057.
- Ruch RJ, Porter S, Koffler LD, et al. Defective gap junctional intercellular communication in lung cancer: loss of an important mediator of tissue homeostasis and phenotypic regulation. *Exp Lung Res*, 2001, 27:231-243.
- 林仲翔, Chang CC, Trosko JE. 大鼠神经胶质瘤间隙连接通讯-代谢协同现象及其抑制剂效应的研究. *中国科学 (B 辑)*, 1989, (6):613-621.
- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 1992, 356:397-400.
- 李金萍,张志谦,宁涛,等. 胃癌细胞 Cadherin 亚型改变与通讯连接蛋白抑制. *科学通报*, 2001, 46:1294-1299.
- Zhang ZQ, Zhang W, Wang NQ, et al. Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin 43. *Carcinogenesis*, 1998, 19 :1889-1894.
- Proulx AA, Lin ZX, Naus CC. Transfection of rhabdomyosarcoma cells with connexin43 induces myogenic differentiation. *Cell Growth Differ*, 1997, 8: 533-540 .
- Krutovskikh VA, Oyamada M, Yamasaki H . Sequential changes of gap- junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication *in vivo*. *Carcinogenesis*, 1991, 12: 1701-1706.
- Metha PP, Bertram JS, Loewenstein WR. Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell*, 1986, 44: 187-196.
- Yancey SB, Edens JE, Trosko JE, et al. Decreased incidence of gap junctions between Chinese hamster V-79 cells upon exposure to the tumor promoter 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate . *Exp Cell Res*, 1982, 139:329-340.
- Paul DL. New functions for gap junctions. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, 7:665-672.
- Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, et al. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie- Tooth disease. *Science*, 1993, 262:2039-2042.
- Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*, 1996, 84:381-388.
- Siu YL D, Unsicker K, Reuss B. Gap junctions modulate survival-promoting effects of fibroblast growth factor-2 on cultured midbrain dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci*, 2001, 18:44-55.
- Naus CC, Ozog MA, Bechberger JF, et al. The neuroprotective role of gap junctions. Abstracts of papers presented at the 2001 International. *Gap Junction Conference, Hawaii*, 2001. 2001. 26.
- Scemes E, Spray DC. Increased intercellular communication in mouse astrocytes exposed to hyposmotic shocks. *Glia*, 1998, 24:74-84.

(收稿日期:2002-03-12)

(本文编辑 周国泰)