

间隙连接蛋白家族的研究进展*

辛莉, 郭国庆, 沈伟哉[△]

(暨南大学医学院解剖学教研室, 广东广州 510630)

Progress in protein families of gap junction

XIN Li, GUO Guo-qing, SHEN Wei-zai

(Department of Anatomy, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510630, China.

E-mail: tshenwz@jnu.edu.cn)

[A Review] Gap junctions are intercellular channels, which connect adjacent cells and allow direct molecular exchange of low molecular weight between them. Three protein families including connexins, innexins and pannexins are involved in gap junctions. Connexins are only found in chordate and innexins compose the gap junctions of invertebrates, while pannexins are ubiquitous and present in both vertebrates and invertebrates. Gap junctions in metazoan play important roles in electrical coupling, regulating proliferation, differentiation, and embryonic development. Evidently, the defects of gap junctions resulting from proteins contribute to many diseases of vertebrates and invertebrates, such as tumor, heart diseases, nervous system disorders and other diseases in human.

[关键词] 缝隙接合部; 连接蛋白类; Innexins; Pannexins

[KEY WORDS] Gap junctions; Connexins; Innexins; Pannexins

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

细胞通讯是指多细胞生物体中细胞之间通过化学物质或电信号传递信息的通讯机制。包括间隙连接、膜表面分子接触通讯和化学通讯 3 种方式。其中间隙连接是指相邻的细胞间存在的一种特殊的由蛋白质构成的结构-连接子(connexon), 连接子分别嵌入两个相邻的细胞, 形成一个亲水性通道, 信息物质由此通道直接进行交流的通讯方式, 这种通讯方式与机体多种疾病密切相关, 因此成为近年来研究的热点。脊椎动物和无脊椎动物的间隙连接在结构和功能上都有相似性, 但是前者的通道由 connexin (Cx) 蛋白家族构成, 后者由一个拓扑结构相似但不相关的 innexin (Inx) 蛋白家族构成。Pannexin (Px) 是另外一类广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物的蛋白家族, 目前已经证明 pannexin 参与哺乳动物间隙连接的形成^[1]。本文分别对这 3 种不同的蛋白家族的结构、功能, 以及与人类疾病的关系作一综述。

1 Connexin 蛋白家族及其所形成的间隙连接

1.1 Connexin 蛋白家族及其形成的连接通道的结

构 Cx 以前被普遍认为只存在于脊椎动物中。在小鼠体内可能有 20 种 connexin 基因, 在人类可能有 21 种 connexin 基因。但是 White 等^[2]认为 Cx 也存在于无脊椎动物后口动物门, 从无脊椎动物克隆出 Cx 的基因序列, 并且认为无脊椎动物的 Cx 与人类的 Cx 具有 25% - 40% 的同源性。所有的 Cx 都是具有 4 次横穿细胞膜的肽链, 包括通过 3 个二硫键紧密连接在一起的 2 个细胞外袂, 以及位于细胞质内的 1 个细胞内袂、1 个 N 末端和 1 个 C 末端。跨膜区和细胞外区高度保守, 然而不同 Cx 的功能不同是由这些区域的氨基酸序列的不同造成的。哺乳动物的间隙连接由分别位于两个细胞膜上的被称为连接子(connexin)的半通道构成, 每个连接子由 6 个 Cx 形成六聚体结构。由相同的连接子构成的间隙连接称为同型间隙连接(homotypic junction), 由不同的连接子构成的间隙连接称为异型间隙连接(heterotypic junction), 如果连接子由不同的连接蛋白构成, 则称

[收稿日期] 2005-07-05 [修回日期] 2006-04-13

* [基金项目] 广东省自然科学基金团队项目(No. 039213); 广州市科技计划项目(No. 2004J1-C0214)

[△]通讯作者 Tel: 020-85228518; E-mail: tshenwz@jnu.edu.cn

为异侧间隙连接(heteromeric junction)。研究表明连接蛋白之间的同源性主要在细胞外的两个结构域,其次是跨膜结构域,细胞质内的结构域差别最大,由此推断连接蛋白成员之间细胞外结构域的高度保守性可能允许成员之间的相互作用,例如,Cx32组成的连接子可以和Cx43组成的连接子相连接形成细胞间通道;细胞质面的差别可能代表连接蛋白成员的组织差异性和通道开关的多种细胞内调节机制以及电导通讯的差别^[3]。但是,并非所有的连接蛋白成员之间都可以任意形成连接,目前被一致接受的是Cx43可以与Cx37、Cx43、Cx45以及Cx46形成有功能的间隙连接,但不能与Cx26、Cx31、Cx32、Cx33、Cx40或者Cx50形成连接。间隙连接通道的直径取决于连接蛋白的种类,约1.5-2 nm,可通透分子量小于1 kD的小分子物质。研究证实水、离子、糖类、氨基酸、核酸多肽、第二信使、激素、药物以及致癌物等能透过间隙连接通道,蛋白质、RNA、多糖和脂质复合体等大分子物质则不能透过间隙连接通道。但是,Steinberg等^[4]的研究表明,许多间隙连接通道不仅对分子大小有选择性而且对电荷具有选择性,例如Cx43构成的通道允许荧光黄透过,而Cx45构成的通道不允许其通过。

1.2 Connexin 蛋白家族构成的间隙连接的功能

间隙连接在多细胞动物中广泛存在,表明其对多细胞动物的生存具有重要作用,其功能主要涉及以下几个方面:①电偶联作用:可以作为电兴奋细胞的电突触,使细胞间的动作电位迅速传递。许多神经系统及心血管系统疾病都是因为该功能的异常导致。②细胞间离子、营养物质、液体的迅速交换:细胞间这些物质的交换对于维持细胞稳态以及神经元之间、心肌细胞之间的同步放电具有重要意义。例如离子交换功能异常可能引起大脑皮层的协调障碍(Cx36)、心脏部分性传导阻滞(Cx40)、室性心律失常(Cx43)^[5]。细胞间营养物质交换的异常会影响到与母体与胎儿健康有关抗体的胎盘转移。③调控细胞的生长和分化:这一功能的缺陷和肿瘤的发生发展有密切关系。④在胚胎的形成、生长和发育中调节细胞间信号的传递。⑤提高组织对激素的应答:环核苷酸、钙离子、磷酸肌醇等第二信使可以从已被激素激活的细胞通过间隙连接进入并激活静止细胞。

间隙连接介导的细胞间信号的异常可以引起全身各系统的疾病,由于不同的Cx在各器官、组织的分布不同,因此某一种或几种Cx基因缺陷会引起某种与之相关的疾病。例如,神经嵴迁移的协调

(Cx43)、卵母细胞的成熟(Cx37、Cx43)、髓鞘的发育(Cx32、Cx47)、心脏、血液、骨以及脉管系统的形态形成(Cx43、Cx45),皮肤的形态形成(Cx26、Cx30、Cx30.3)。Kelsell等^[6]认为50%的遗传无症状性感神经性耳聋都是由Cx26的突变造成的。下面仅就近年来研究比较充分并且与间隙连接关系密切的几个系统的疾病进行论证。

①间隙连接与肿瘤的发生 肿瘤细胞的间隙连接主要表现为肿瘤细胞间的间隙连接(同型间隙连接)减少,肿瘤细胞与周围正常细胞间的间隙连接(异型间隙连接)选择性丧失,使来自正常细胞的生长调控信号不能到达肿瘤细胞,引起肿瘤细胞无限制的自主生长。Cx32在肝脏组织中特异性地表达,马向东等^[7]的研究发现,Cx32在正常肝细胞中有较高水平的表达(88.9%),在肝细胞癌中表达显著降低(43.7%)。Cx43蛋白表达的缺失引起宫颈癌细胞间隙连接结构和功能的异常,为宫颈癌细胞的恶性转化、增殖提供必要条件。划痕标记荧光传输技术证实,随着Cx43蛋白表达的升高,细胞间隙连接的功能显著恢复,最终使宫颈癌细胞生长受到严重抑制,实现对恶性肿瘤的杀伤作用。多项研究表明,Cx32是人正常胃上皮细胞间隙连接通道的主要成分,Cx32表达降低在胃癌的发生发展中起重要作用。由此可见间隙连接功能缺陷与肿瘤发生发展有密切联系,这也给我们提供了肿瘤治疗的新思路,即通过恢复间隙连接的功能达到治疗肿瘤的目的。

②间隙连接与神经系统疾病 有近似一半的Cx蛋白都在哺乳动物的中枢神经系统中表达^[8]。在星形胶质细胞大量表达的有Cx26、Cx30、Cx43,在少突胶质细胞中大量表达的有Cx29、Cx32、Cx47,但是大多数并不在神经元表达。研究表明少突胶质细胞中表面Cx32或者Cx47表达缺失的大鼠仍然可以生存,但是两者同时缺失的动物则会在6周中枢髓磷脂异常而导致死亡,表现为髓鞘薄或缺失、空泡形成、轴旁周隙扩大、少突胶质细胞死亡、轴突缺失^[9]。Cx47最初被认为在中枢的神经元上表达,现已清楚它是少突胶质细胞的产物。冰冻断裂复型免疫标记的数据表明,Cx36在神经元之间的间隙连接中表达,但少突胶质细胞间、星形胶质细胞间、少突胶质细胞与星形胶质细胞间并没有Cx36的表达^[10]。Cx36是Cx家族中目前唯一被证明构成哺乳动物脑神经元之间间隙连接的蛋白,但是视网膜的水平细胞、海马的锥体细胞似乎并不表达Cx36也同样能形成间隙连接。在视网膜中Cx36在视锥细胞表达,缺乏Cx36会损伤光知觉。Cx45在嗅上皮和嗅球的神经元中表

达^[11],也在水平细胞中表达。

间隙连接与心血管系统疾病:目前,在人的心血管系统内发现的Cx主要是Cx37、Cx40、Cx43、Cx45、Cx46。各种间隙连接蛋白分布在心脏的不同区域,而且在数量上存在很大差异,这些差异可能在调节心脏传导速度方面起着重要的作用。黄国英等^[12]首次提出Cx43基因在心脏胚胎发育中有重要作用,最近,他们通过研究Cx43基因在人类及小鼠胎心发育中的时空表达规律,进一步证明Cx43对于胚胎心脏发育至关重要,Cx43作为一种细胞间隙连接蛋白,表达于心脏神经嵴细胞等许多器官和组织,而它的异常,使心脏神经嵴细胞在胚胎发育过程中不能向原始心管转移,从而影响心脏神经嵴细胞的活动,进而对右心室流出道的发育产生影响,这一蛋白的异常,可导致肺动脉的狭窄等先天性心脏病。李大强等^[13]用免疫荧光双标共聚焦显微镜和Western印迹观察32例风湿性心脏病患者Cx40和Cx43蛋白质表达和分布的改变,得出的结论是心房肌Cx40和Cx43蛋白质水平降低和再分布与风湿性瓣膜病慢性房颤的发生和维持有关。Li等^[14]的研究表明Cx45在脑动脉平滑肌中表达,并且在高血压表达明显增加,他们推测脑动脉中Cx45的相对优势超过Cx43可能导致脑缺血发作。

2 Innexin 蛋白家族及其形成的间隙连接

2.1 Innexin 蛋白的结构

无脊椎动物的间隙连接是由Inx构成的,Inx在结构和功能上与Cx相似。也具有4次跨膜的肽链、2个细胞外袂、1个N末端、1个C末端,但其与Cx之间表现出极低的序列同源性。关于无脊椎动物的间隙连接,研究较多的是果蝇属(*Drosophila*)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)。目前在果蝇属中鉴定到8个innexin基因^[15],分别是shake-B、ogre、inx2-7。Shake-B基因编码3种蛋白质,包括shake-B(neural)、shake-B(neural+16)和shake-B(lethal)。其中,shake-B(lethal)是第一个在成对爪蟾卵中表达时被证明能够形成间隙连接通道的组成蛋白。但是,到目前为止,果蝇属的8个Inx只有2个被直接证明能够形成间隙连接^[16]。基因测序工程已经在秀丽隐杆线虫体内鉴定出25个innexin基因^[17],它们编码的蛋白多数都能形成间隙连接。

2.2 Innexin 蛋白构成的间隙连接的功能

无脊椎动物的间隙连接通道也具有间隙连接最基本的功能,即允许离子、小分子、第二信使等在细胞间进行交流。Innexin之间可以形成同型间隙连接也可以形成异型间隙连接和异侧间隙连接。果蝇属只有

shakeB(L)和Inx-2两个蛋白可以形成同型间隙连接。在成对的爪蟾卵中注入Inx-2 mRNA,只有40%的成对细胞间形成电压敏感性通道,相反,单纯注入Inx-3 mRNA不会形成通道,当两者联合注入时,均会形成有功能的通道^[18],Inx-2在对WNT信号作出反应而控制前肠的形成中是必需,也是果蝇属上皮形态发生的关键因素。Orge和shake-B(N)是形成视网膜光感受器细胞和薄板神经元之间正常的神经信息流所必需的,其中Orge是视网膜感受器细胞所必需,shake-B(N)是薄板神经元所必需的,两者任何一种突变都将导致视觉信息传导障碍^[19]。种系特异性连接蛋白Inx-4(zpg protein)在配子形成过程中早期生殖细胞的存活上发挥重要作用,zpg蛋白可以与Inx-2形成异型间隙连接,但是zpg蛋白之间不能形成同型间隙连接。Unc-7是秀丽隐杆线虫属第一个被鉴定的innexin基因,其突变导致向前运动障碍和伊维菌素抵抗,unc-9突变也表现类似的症状。秀丽隐杆线虫属许多inx都在咽肌表达,例如Inx-6是编码咽机电偶联的连接蛋白,该属另一innexin基因eat-5在体内可以部分替代inx-6的功能^[20]。Eat-20是该属Inx蛋白家族又一重要成员,其主要在咽肌和一些神经元上表达,一些真皮细胞也有所表达,eat-20基因突变的动物会出现排卵周期延长或者由于咽肌运动障碍而饿死^[21]。

3 Pannexin 蛋白家族

Pannexin是广泛存在于蠕虫、软体动物、昆虫和哺乳动物的高度保守的家族^[22]。它同样具有4个跨膜区,2个细胞外袂、1个细胞内袂以及细胞内的N末端和C末端。Cx与Px除了细胞外袂的2个半胱氨酸残基相同外,其它序列几乎没有相似性^[23]Px1和Px2在中枢神经系统中广泛表达,例如海马、嗅球、皮层、小脑,脑白质中目前只发现Px1阳性细胞^[24]。Baranova等^[22]认为人类的Px2是脑特异性蛋白。对单个或成对的爪蟾卵母细胞的电记录研究表明Px1既能形成半通道又能形成细胞间通道,Px1和Px2可以形成连接通道,但是Px2单独不能形成通道。Px3在卵母细胞中不具有功能,因此其功能还不清楚。目前的研究主要集中在Cx蛋白上,对于Px蛋白的研究还处于初级阶段,对其结构、功能、组织分布等了解很少。有实验证明其参与形成间隙连接,但Px是否独立于Cx蛋白家族的构成哺乳动物间隙连接的另一蛋白家族还有待进一步的验证。

4 结语

间隙连接是细胞间直接进行物质交流的唯一通道,无论在脊椎还是无脊椎动物都发挥着重要的作

用。虽然它们由不同的蛋白家族构成,但是两者在结构和功能上具有相似性,因此无脊椎动物间隙连接的研究结果可以为人类间隙连接研究提供新的思路和研究方向。但是,对于无脊椎动物间隙连接的研究目前多数是用爪蟾卵母细胞作为蛋白通道的研究载体而进行的体外试验,其结果是否能揭示体内的真实情况还有待验证。虽然有研究在无脊椎动物的脊索动物体内克隆出 connexin 基因,向 connexin 只存在于无脊椎动物体内的说法提出了挑战,到目前为止尚未在其它无脊椎动物体内发现,所以不能排除 connexin 是脊索动物门特有的间隙连接蛋白的可能,其它无脊椎动物是否有 connexin 存在还需进一步的研究。由于间隙连接异常与人类多种疾病密切相关,因此对其通道蛋白的结构、功能、装配与降解、通透性、调控因素等多方面的研究应该受到广泛重视。

[参 考 文 献]

- [1] Panchin YV. Evolution of gap junction proteins - the pannexin alternative[J]. *J Exp Biol*, 2005, 208(Pt 8): 1415 - 1419.
- [2] White TW, Wang H, Mui R, et al. Cloning and functional expression of invertebrate connexins from *Halocynthia pyriformis*[J]. *FEBS Lett*, 2004, 577(1 - 2): 42 - 48.
- [3] 姚庆华. 细胞间隙连接通讯、连接蛋白与肿瘤的抑制[J]. *肿瘤研究与临床*, 2005, 17(1): 67 - 70.
- [4] Steinberg TH, Civitelli R. Connexin 43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells[J]. *EMBO J*, 1994, 13(4): 744 - 750.
- [5] Bruce J, Nicholson. Gap junctions from cell to molecule [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 22): 4479 - 4481.
- [6] Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non - syndromic sensorineural deafness[J]. *Nature*, 1997, 387(6628): 80 - 83.
- [7] 马向东, 隋延仿, 王文亮. 间隙连接蛋白 Cx32 在肝细胞癌组织中的表达[J]. *第四军医大学学报*, 1999, 20(7): 593 - 596.
- [8] Connors BW, Long MA. Electrical synapses in the mammalian brain[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2004, 27: 393 - 418.
- [9] Menichella DM, Goodenough DA, Sirkowski E, et al. Connexins are critical for normal myelination in the CNS [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(13): 5963 - 5973.
- [10] Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, et al. Cell - specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(6): 1983 - 2000.
- [11] Zhang C, Restrepo D. Expression of connexin 45 in the olfactory system[J]. *Brain Res*, 2002, 929(1): 37 - 47.
- [12] 黄国英, 常才, 陈萍. Cx43 基因在人类及小鼠胎心发育中的时空表达规律[J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13(1): 16 - 19.
- [13] 李大强, 冯义柏, 张会琴. 心房肌间隙连接重构与风湿性瓣膜病患者心房颤动的关系[J]. *中华医学杂志*, 2004, 184(5): 384 - 386.
- [14] Li X, Simard JM. Increase in Cx45 gap junction channels in cerebral smooth muscle cells from SHR[J]. *Hypertension*, 2002, 40(6): 940 - 946.
- [15] Stebbings LA, Todman MG, Phillips R. Gap junctions in *Drosophila*: developmental expression of the entire innexin gene family[J]. *Mech Dev*, 2002, 113(2): 197 - 205.
- [16] Curtin KD, Zhang Z, Wyman RJ. *Drosophila* has several genes for gap junction proteins [J]. *Gene*, 1999, 232(2): 191 - 201.
- [17] Starich T, Sheehan M, Jadrlich J, et al. Innexins in *C. elegans*[J]. *Cell Commun Adhes*, 2001, 8(4 - 6): 311 - 314.
- [18] Stebbings LA, Todman MG. Two *Drosophila* innexins are expressed in overlapping domains and cooperate to form gap - junction channels [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(7): 2459 - 2470.
- [19] Curtin KD, Zhang Z, Wyman RJ. Gap junction proteins expressed during development are required for adult neural function in the *Drosophila* optic lamina[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(16): 7088 - 7096.
- [20] Li S, Dent JA, Roy R. Regulation of intermuscular electrical coupling by the *Caenorhabditis elegans* innexin *inx - 6*[J]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(7): 2630 - 2644.
- [21] Shibata Y, Fujii T, Dent JA, et al. EAT - 20, a novel transmembrane protein with EGF motifs, is required for efficient feeding in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 2000, 154(2): 635 - 646.
- [22] Baranova A, Ivanov D, Petrash N, et al. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins[J]. *Genomics*, 2004, 83(4): 706 - 716.
- [23] Hua VB, Chang AB, Tehieu JH. Sequence and phylogenetic analyses of 4 TMS junctional proteins of animals: connexins, innexins, claudins and occludins[J]. *J Membr Biol*, 2003, 194(1): 59 - 76.
- [24] Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, et al. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23): 13644 - 13649.