

· 论 著 ·

缝隙连接蛋白 43 磷酸化在兔脑血管痉挛中的表达变化*

陈红伟, 洪涛[△], 宋湖平, 叶新运, 汪阳

(南昌大学第一附属医院神经外科, 南昌 330006)

摘要:目的 研究缝隙连接蛋白 43(Cx43)磷酸化在兔 2 次蛛网膜下腔出血(SAH)后脑血管痉挛(CVS)中的表达变化。方法 新西兰大白兔 72 只,随机分为:正常对照组(18 只)、SAH 组(又分 3、7、14 d 3 个亚组,每个亚组各 18 只)。采用枕大池 2 次注血法建立兔 SAH 后 CVS 模型。脑血管造影及光镜观察分析基底动脉的直径及形态学变化,应用 Western blotting 检测 Cx43 蛋白磷酸化表达的变化。结果 (1)在 SAH 后第 7 天,脑血管造影及光镜观察证实基底动脉管腔狭窄程度与形态学变化最明显,第 14 天逐渐缓解,但与正常对照组相比仍有统计学意义;(2)Western blotting 结果显示,SAH 后磷酸化的 Cx43 (P-Cx43) 蛋白表达以第 7 天表达最高,14 d 开始下降,但仍高于正常对照组;去磷酸化的 Cx43(NP-Cx43)蛋白表达以第 7 天表达最低,14 d 开始升高,但仍低于正常对照组。结论 SAH 后,基底动脉 Cx43 发生磷酸化,其表达水平的变化与 CVS 发生发展的时相性一致,提示 Cx43 磷酸化可能在 CVS 的发生发展过程中起作用。

关键词: 缝隙连接; 缝隙连接蛋白 43; 脑血管痉挛; 磷酸化**中图分类号:** R365.743**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)09-1027-03

Expression changes of connexin 43 phosphorylation on cerebral vasospasm in rabbits*

CHEN Hong-wei, HONG Tao[△], SONG Hu-ping, et al.

(Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract: Objective To investigate the expression changes of connexin 43 (Cx43) phosphorylation in the pathogenesis of cerebral vasospasm (CVS) after experimental subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** 72 New Zealand pure rabbits were afforded. Models of CVS after SAH were successfully made via double blood injection into the cisterna magna. Angiography and hematoxylin and eosin staining method were respectively performed to observe the diameter and morphological changes of the basilar artery. Western blotting was employed to determine the expression changes of Cx43 phosphorylation in basilar artery. **Results** On 7 d after SAH, arterial narrowing and morphological changes in vascular structure were significantly more than those in other groups, and the changes were relieved gradually on 14 d after SAH; Western blotting result indicated that the expression of phosphorylated Cx43 protein on 7 d was greater than that in other groups, and it was decreased on 14 d after SAH, but it was still significantly higher than that in control group. And the expression changes of NP-Cx43 protein made a contrast with P-Cx43. **Conclusion** There is a coincidence between the expression changes of Cx43 phosphorylation and CVS after SAH in rabbits, implying that Cx43 phosphorylation may play an important function in the happening and progress of CVS.

Key words: gap junction; connexin43; cerebral vasospasm; phosphorylation

缝隙连接(gap junction, GJ)是介导相邻细胞间直接通讯的特殊膜结构,在调节组织的内环境稳定,包括血管系统的舒缩等方面起到了关键作用^[1-2]。血管系统 GJ 主要是由缝隙连接蛋白(connexins, Cxs)Cx43 组成,其蛋白的表达变化在脑血管痉挛(CVS)的发生发展中起到重要作用^[3-4]。目前有关 Cx43 蛋白磷酸化水平的变化与心脏、神经系统等疾病关系的研究很多^[5-8],但国内外尚未见其与 CVS 关系的研究。作者推测在 CVS 中, Cx43 蛋白磷酸化水平可能发生改变,并参与 CVS 发生发展。

1 材料与方

1.1 材料 新西兰大白兔由南昌大学医学院动物科学研究部提供,所有实验流程均遵照中华人民共和国科学技术委员会制定的实验动物管理条例进行。兔抗磷酸化 Cx43 多克隆一抗购自于 Cell Signaling 公司;小鼠抗去磷酸化 Cx43 单克隆一抗购自于 Zymed 公司;兔抗 GAPDH 一抗购自于 Chemicon 公司;辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔 IgG 二抗和辣根过氧化物酶

偶联山羊抗小鼠 IgG 二抗均购自于中山金桥公司;蛋白裂解抽提试剂盒和复合磷酸酶抑制剂均购自于北京普利莱公司;ECL 增强型化学发光显色试剂盒购自于美国 Pierce 公司;造影剂 Omnipaque(350 mg/mL)为丹麦生产;其余试剂为国产。

1.2 实验分组 72 只体质量 2.5~3.5 kg 的雄性新西兰大白兔被随机分为对照组(n=18)、SAH 组(又分 3、7、14 d 3 个亚组,每个亚组 n=18)。对照组及 SAH 各亚组均随机选取 6 只兔子分别行脑血管造影、形态学观察及 Western blotting 检测,见表 1。

1.3 兔 SAH 后 CVS 模型的建立 枕大池 2 次注血法制成兔 SAH 后 CVS 模型^[9]。应用戊巴比妥(20 mg/kg)耳缘静脉麻醉动物,颈部备皮消毒后行枕大池穿刺,引出 1.5 mL 脑脊液后缓慢注入 0.5 mL/kg 非抗凝自体耳动脉血,立即将动物头低 30°,持续 15 min;次日重复上述操作。2 次注血 3 d 后为 SAH 后第 3 d,依次类推。正常对照组同样进行穿刺并注入 0.5 mL/kg 生理盐水。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30660188);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ10325)。[△] 通讯作者, E-mail: ht2000@vip. sina.com。

表 1 实验兔分组检查情况

组别	脑血管造影	形态学观察	Western blotting
正常对照组	6	6	6
SAH 3 d 组	6	6	6
SAH 7 d 组	6	6	6
SAH 14 d 组	6	6	6

1.4 脑血管造影 用于脑血管造影的实验兔经麻醉后,分别在脑池注血前及 2 次注血后第 3、7、14 天行脑血管造影。正常对照组分别于脑池注入生理盐水前和第 7 天行脑血管造影。经股动脉插入 5-F 导管至左侧椎动脉,在相同放大率下注入 Omnipaque 2 mL 后行脑血管造影。基底动脉的直径应用计算机影像分析系统(NIH Image version 1.62)进行测量;每个基底动脉图像取 3 个测量点:两侧椎动脉汇合点上方 0.1 mm 处,基底动脉中点以及基底动脉顶端下方 0.1 mm 处;3 点测量的平均值作为基底动脉的直径值。将第 2 次造影与首次造影基底动脉直径的百分比值作为最终统计数据。

1.5 形态学观察 将用于形态学观察的实验兔在各时间点麻醉后行胸廓切开术,10%中性甲醛灌注固定,迅速开颅取出附有基底动脉全长的脑组织,将标本放入固定液中,经脱水、包埋、制片等处理后,行 HE 染色。光镜下观察其形态学变化,包括血管内皮细胞变化、内弹力层皱褶及平滑肌细胞收缩的变化。

1.6 Western blotting 检测 Cx43 蛋白磷酸化表达的变化 用于 Western blotting 检测的实验兔在各时间点用戊巴比妥过量麻醉后,快速开颅取出基底动脉,放入液氮中速冻,然后转入-80℃冰箱冻存。将冻存的血管用液氮研磨后,匀浆,应用蛋白裂解抽提试剂盒,再加入复合磷酸酶抑制剂(1:100),提取血管总蛋白,Western blotting 检测的具体方法及过程省略。蛋白条带结果采用 Quantity one 图像分析软件进行分析。

1.7 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。运用 SPSS11.5 统计软件,首先对计量资料进行正态性检验及方差齐性检验,组间资料比较应用单因素方差分析,随后再进行 Dunnett-t 检验,两两比较应用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑血管造影 正常对照组第 7 天与脑池注入生理盐水前的基底动脉直径相比较差异无统计学意义[(97.9±2.3)%, $P > 0.05$];SAH 后 3 d 组与正常对照组相比基底动脉显著狭窄[(78.8±2.3)%, $P < 0.05$],SAH 后 7 d 组与 3 d 组相比基底动脉狭窄更加明显[(65.1±5.3)%, $P < 0.05$],SAH 后 14 d 组与 7 d 组相比基底动脉狭窄开始缓解[(80.9±3.4)%, $P < 0.05$],但与正常对照组相比仍狭窄,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 形态学观察 光镜下显示正常组脑血管内皮细胞排列平整,核椭圆,淡染;其下内弹力层光滑;平滑肌细胞分布均匀,较紧密,核圆钝。SAH 后 3 d 组出现血管内皮细胞变性、皱缩,排列紊乱;内弹力层呈波浪状;平滑肌细胞肥大,分布稀疏,核呈梭形,内弹力层与平滑肌层之间有水肿。SAH 后 7 d 组较 SAH 后 3 d 组上述变化更加明显。SAH 后 14 d 组较 SAH 后 7 d 组上述变化明显减轻,内皮细胞排列趋于平整;内弹力层波浪状基本消失;内弹力层与平滑肌层之间水肿减轻,见图 2。

2.3 Western blotting 检测结果 正常基底动脉 Cx43 蛋白磷酸化表达(17.1±2.9)%处于较低水平,SAH 后 3 d 组

(70.0±7.3)%、7 d 组(166.8±13.7)%及 14 d 组(88.4±9.1)% Cx43 蛋白磷酸化表达与正常对照组相比均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),以 7 d 组升高最明显,14 d 组开始下降;正常基底动脉 Cx43 蛋白去磷酸化表达(36.0±3.7)%处于较高水平,SAH 后 3 d 组(17.2±3.9)%、7 d 组(8.0±2.7)%及 14 d 组(26.2±5.1)%的 Cx43 蛋白去磷酸化表达与正常对照组相比均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),以 7 d 组下降最明显,14 d 组开始升高,见图 3。

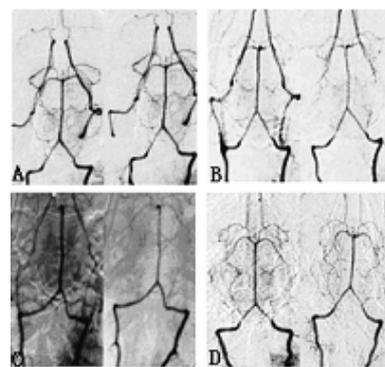


图 1 正常组;B: SAH 后 3 d 组;C: SAH 后 7 d 组;D: SAH 后 14 d 组。

图 1 脑血管造影结果

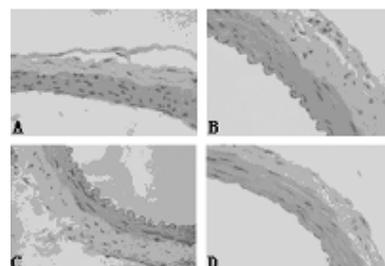


图 2 正常对照组;B: SAH 后 3 d 组;C: SAH 后 7 d 组;D: SAH 后 14 d 组。

图 2 各组基底动脉形态学变化 HE 染色(×400)

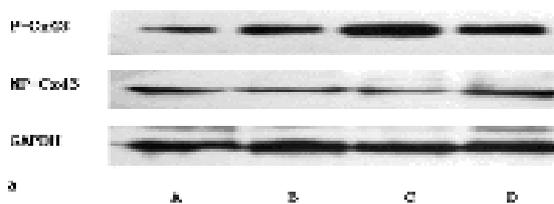


图 3 正常对照组;B: SAH 后 3 d 组;C: SAH 后 7 d 组;D: SAH 后 14 d 组。

图 3 Western blotting 检测基底动脉 Cx43 蛋白磷酸化表达变化

3 讨论

本研究应用兔 SAH 后 CVS 模型发现 SAH 后第 3 天出现血管内皮变性、皱缩,平滑肌细胞肥大;第 7 天上述变化更加显著;第 14 天与第 7 天相比血管变化明显减轻。结合脑血管造影进一步证实本实验模型的可靠性。

CVS 是 SAH 后最常见的并发症,是 SAH 患者致残和死亡的重要原因^[9-10]。目前公认 SAH 后 CVS 是由于血管周围的凝血块及其分解产物所致,但其病理机制不明,因此 CVS 的机制探讨仍然是神经科学领域的难题^[11]。

作者前期研究发现,GJ 作为一种细胞间直接信息交流通

道,通过参与血管壁各种致痉信号的传导与调节在 CVS 的发生发展过程中起到重要作用^[3-4,12-13]。Cx43 中大多数属于磷蛋白,处于不同的磷酸化水平。磷酸化是蛋白转录后非常普遍的一种修饰,是调控细胞信号转导的主要方式之一,通过蛋白激酶和蛋白磷酸化酶的相互作用,影响 Cx43 生命周期中的各个过程而调节细胞间缝隙连接通讯(gap junctional intercellular communication,GJIC),这些过程涉及到 Cx43 的转运、组装/解离、降解以及通道的门控等^[14]。Cx43 的磷酸化与去磷酸化对 GJ 通道的功能有非常重要的影响。已有研究表明,Cx43 磷酸化参与 GJ 重构,通过改变 GJIC 影响了心脏、神经系统等疾病的发生^[5-8]。但有关 Cx43 磷酸化与 CVS 的研究尚未见报道。本研究从磷酸化的角度,探讨兔 CVS 时 Cx43 磷酸化水平的变化参与 CVS 的机制。

本实验 Western blotting 检测显示在正常情况下,基底动脉存在磷酸化和非磷酸化 2 种状态的 Cx43,其中 P-Cx43 表达量较弱,而 NP-Cx43 表达量较高。但 Beardslee 等^[8]研究认为正常情况下心肌细胞间 Cx43 均以磷酸化形式存在,提示不同组织细胞间 Cx43 的存在形式可能不同。在实验中,SAH 后 3、7、14 d 组与对照组相比 P-Cx43 蛋白表达量均增高,以第 7 天表达量最高,第 14 天开始下降;各时间点 NP-Cx43 蛋白表达量与 P-Cx43 相反。结合脑血管造影和 HE 染色结果表明,CVS 后 Cx43 蛋白磷酸化表达变化与脑血管痉挛程度密切相关,提示 Cx43 蛋白磷酸化可能参与了 CVS 的发生、发展全过程。

研究表明,血凝块^[15]或者其他致痉物质(如 ET-1^[4])可以增强兔血管平滑肌细胞间 GJIC。迄今为止,有关 Cx43 特定位点磷酸化与 GJIC 关系的研究尚存在争议。有研究报道,Cx43 Ser368 位点磷酸化后可以降低非心肌细胞 GJ 的单通道传导性和对染料的通透性^[16];而在体外心脏灌流的实验研究中 Cx43 Ser368 位点的去磷酸化导致细胞间失偶联^[8];同时王荣等^[17]研究也认为 Cx43 Ser368 位点磷酸化水平的降低导致了细胞间失偶联。本研究采用兔抗 P-Cx43 多克隆一抗和小鼠抗 NP-Cx43 单克隆一抗分别特异性针对 Ser368 位点磷酸化与去磷酸化,因此结合本实验结果作者推测,正常情况下基底动脉 Cx43 主要以非磷酸化形式存在,CVS 后由于血凝块或其他致痉物质(如 ET-1)刺激脑血管壁使 Cx43 由非磷酸化形式向磷酸化形式发生转变,Cx43 Ser368 位点磷酸化水平增高导致基底动脉平滑肌 GJIC 增加,以致腔内外各种致痉信号通过 GJ 通道向平滑肌细胞传导增加,最终引发 CVS。为了进一步明确 Cx43 磷酸化参与 CVS 病理过程的机制,仍需深入探讨:血凝块或其他致痉物质通过何种途径使 Cx43 发生磷酸化;Cx43 磷酸化如何促使平滑肌 GJIC 增加。

本研究从磷酸化的角度探讨了 GJ 参与 CVS 的发病机制。上述研究结果表明,SAH 后基底动脉 Cx43 发生磷酸化,其表达水平的变化与 CVS 的发生、发展相一致,提示 Cx43 蛋白磷酸化可能在 CVS 的发生、发展过程中起到了作用。

参考文献:

- [1] De Wit C, Wölfle SE. Connexin-dependent communication within the vascular wall; contribution to the control of arteriolar diameter[J]. *Adv Cardiol*, 2006, 42: 268.
- [2] Figueroa XF, Duling BR. Gap junctions in the control of vascular function [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(2): 251.
- [3] Hong T, Wang H, Wang Y, et al. Effects of gap junctional blockers on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits[J]. *Neurol Res*, 2009, 31(3): 238.
- [4] Wang H, Hong T, Wang H, et al. Altered expression of connexin43 and its possible role in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery[J]. *Neurol Res*, 2009, 31(1): 67.
- [5] Matsushita S, Kurihara H, Watanabe M, et al. Alterations of phosphorylation state of connexin 43 during hypoxia and reoxygenation are associated with cardiac function [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(3): 343.
- [6] Lampe PD, Cooper CD, King TJ, et al. Analysis of Connexin43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 16): 3435.
- [7] Kawasaki A, Hayashi T, Nakachi K, et al. Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of Parkinson's disease[J]. *Neuroscience*, 2009, 160(1): 61.
- [8] Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, et al. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia [J]. *Circ Res*, 2000, 87: 656.
- [9] 刘全生, 黄祖春. 内皮素与脑血管痉挛[J]. *重庆医学*, 2007, 36(5): 478.
- [10] 李玉香. 尼莫地平预防蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛 36 例疗效观察[J]. *山东医药*, 2009, 49(40): 18.
- [11] Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, et al. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought[J]. *Neurol Res*, 2009, 31(2): 151.
- [12] 洪涛, 汪阳, 蒋丽萍, 等. 缝隙连接阻断剂 1-庚醇对脑血管痉挛的抑制作用[J]. *中华神经外科杂志*, 2005, 21(4): 244.
- [13] 王海涛, 洪涛, 王欢, 等. 甘珀酸治疗蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的体内实验研究[J]. *中华神经外科杂志*, 2008, 24(8): 589.
- [14] Solan JL, Lampe PD. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects[J]. *Biochem J*, 2009, 419(2): 261.
- [15] 闫华, 只达石, 刘睽黄, 等. 低温抑制兔血管平滑肌细胞间缝隙连接通讯的研究[J]. *中华神经外科杂志*, 2007, 23(1): 70.
- [16] Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, et al. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication[J]. *J Cell Biol*, 2000, 149(7): 1503.
- [17] 王荣, 张存泰, 阮燕菲, 等. 大鼠心肌急性缺氧时缝隙连接蛋白 43 磷酸化水平的改变及心律失常肽 10 对其影响[J]. *临床心血管病杂志*, 2007, 23(5): 375.