

· 综 述 ·

## 缝隙连接在血管内皮细胞和平滑肌细胞间信号传递的研究进展\*

于学军 综述, 何作云 审校

(第三军医大学新桥医院全军心血管病研究所, 重庆 400037)

关键词: 缝隙连接; 内皮细胞; 平滑肌细胞

中图分类号: R322.1202

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)11-1448-03

血管内皮细胞和平滑肌细胞间的相互调节是血管生理和病理学研究的重要内容之一。近年研究发现, 缝隙连接在血管内皮细胞与平滑肌细胞间相互调节过程中起着重要作用。本文仅对缝隙连接在血管内皮和平滑肌细胞之间信号传递的研究进展作一综述。

### 1 缝隙连接和缝隙连接蛋白缝隙连接蛋白(connexin, Cx)

**1.1 缝隙连接** 在介导细胞接触的蛋白复合物如 Cx、桥粒及细胞黏附分子中, 缝隙连接允许相邻细胞间的直接通讯<sup>[1-2]</sup>。多种分子量不大于 1.0 kd 物质能以被动扩散的方式经过缝隙连接管道进行交换, 如代谢产物、离子、第二信使、水及电冲动力<sup>[3]</sup>。在某些条件下, 半通道也能发挥作用, 允许细胞释放和摄取可扩散分子<sup>[4]</sup>。血管内皮细胞与平滑肌细胞间的缝隙连接可以穿过内弹力层, 使血管内皮细胞和平滑肌细胞进行直接的电和化学交流<sup>[5]</sup>。

**1.2 Cx** Cx 亚单位是一种 4 次横跨细胞膜的跨膜蛋白, 包括 2 个细胞外环和 1 个细胞内环, 其 C 末端和 N 末端均位于胞浆内。在两个细胞外环中, 3 个半胱氨酸残基的顺序是高度保守的(Cx31 除外), 其基本结构是: 第一个环(CX6 CX3C); 第二个环(CX5 X5C)。而胞浆内的羧基末端区域具有明显的差异, 它可以因为胞内信号变化而改变蛋白构象, 从而对缝隙连接功能状态有影响<sup>[2]</sup>。2 个环上相应的半胱氨酸可能形成二硫桥以在 2 个连接子铆合期间使环稳定<sup>[3]</sup>。在哺乳动物细胞类型中, 发现其表达的 Cx 已达 21 种<sup>[11]</sup>。血管内皮细胞可以同时表达 Cx37、Cx40 和 Cx43, 其中 Cx37 表达量最高<sup>[6]</sup>。完整的内皮细胞是维持血管正常生理功能所必需的, 而 Cx43 是维持内皮连续性 & 完整性所必需的, 在大动脉和血流稳态被扰乱的区域 Cx43 的表达较高。血管平滑肌细胞可以协同表达 Cx43、Cx40、Cx45 和 Cx37, 其中 Cx43 表达量最高, 其他 3 种连接蛋白的表达量依次递减。不同类型的连接蛋白可以形成不同类型的连接子, 不同类型的连接子可以形成不同类型的缝隙连接通道, 而不同类型的缝隙连接在电导率、通透性及门控通道等特性方面均有很大的差别, 这样就构成了缝隙连接在结构组成和功能方面的多样性<sup>[6]</sup>。同一种细胞或组织上表达多种不同类型的连接蛋白有着重要的生理意义。当机体受到高血压、动脉硬化、缺血缺氧等所致细胞损伤或增生后, 通过改变连接蛋白的表达比例, 可以明显改变细胞之间的通讯, 进而调节其功能。不同的 Cx 同型异构体的组合有助于异型细胞间缝隙连接通道的形成, 而这种组成可导致调节的多样性。也有研究显示, 不同 Cx 形成缝隙连接具有不同的通透性, 可选择性通过不同的第二信使如环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、Ca<sup>2+</sup> 或三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>), 从而影响不同的生物学功能<sup>[7]</sup>。

### 2 缝隙连接功能的调节

缝隙连接通道的通透性受多种因素的影响, 诸如 pH 值、

Ca<sup>2+</sup> 浓度、电压、环核苷酸、转化的病毒癌基因的活性等, 但它们的作用多数是通过改变连接蛋白的磷酸化状态发挥的, 磷酸化状态几乎影响了连接蛋白从合成、组装、功能发挥到降解的整个生命周期。

**2.1 Cx 的代谢** 缝隙连接的形成和降解是一个动态的过程, 大多数缝隙连接的生命周期(lifecycle)很短(普遍短于 5 h), 小鼠肝细胞缝隙连接在体内的生命周期约 5 h, 大鼠心肌细胞的缝隙连接生命周期约 1.3 h<sup>[8]</sup>。连接蛋白首先在内质网内合成, 然后以出芽的方式与高尔基腔室的 cis-或 trans-高尔基网络融合, 在此过程中 6 个连接蛋白寡聚化, 形成六聚体的连接子, 此时合成的寡聚化的连接子尚处于关闭状态, 一系列运输囊泡将连接子运送至细胞膜, 连接子可以融合入细胞膜上原有的缝隙连接斑, 也可与邻近细胞的连接子形成新的缝隙连接, 多个新的缝隙连接再形成新的缝隙连接斑, 此时的连接子才有了开放的潜能, 在适宜的刺激下, 可以介导电和化学信号的传导<sup>[9]</sup>。缝隙连接斑的降解一般是从内部结构开始, 内部结构变疏松后可以融入细胞内形成环状连接(annular junctions), 此过程被称为连接蛋白的内化(internalization), 环状连接最终在细胞内被溶酶体或蛋白酶降解(degradation), 多余的或有缺陷的连接蛋白也是由蛋白酶或溶酶体消化降解<sup>[9]</sup>。

目前研究发现, 许多生长因子如内皮素、血管紧张素 II、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)及血管内皮生长因子(VEGF)等可通过不同的信号通路来影响 Cx 的表达<sup>[2, 4]</sup>。近来发现, 机械性刺激如切应力也可影响 Cx 的表达<sup>[10]</sup>。

**2.2 连接蛋白磷酸化对缝隙连接功能的影响** 许多蛋白激酶可以引起连接蛋白的磷酸化, 并调节缝隙连接的功能。以 Cx43 为例, 其羧基末端的 2 个酪氨酸和 21 个丝氨酸中的 12 个可以被不同的激酶磷酸化。酪氨酸激酶 v-Src 可以磷酸化 Cx43 C 末端第 247 和 265 位的酪氨酸, 表皮生长因子、VEGF 和血小板衍生生长因子等刺激因素通过受体介导的途径可以激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated p rotein kinase, MAPK)、蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)和 c-Src 等激酶, 这些激活的激酶可以磷酸化 Cx43 不同位点的丝氨酸或酪氨酸, 其中 MAPK 可以磷酸化 255, 279 和 282 位的丝氨酸, PKC 可以磷酸化 368 和 372 位的丝氨酸<sup>[3]</sup>, 二者均可以引起缝隙连接通道的关闭, 抑制缝隙连接的功能。PKC 的磷酸化作用还可以引起 Cx43 构象发生变化, 从而降低通道的通透性<sup>[7]</sup>; 抑制寡聚化的连接蛋白向细胞膜的运输以及缝隙连接全通道的形成, 从而抑制缝隙连接的功能<sup>[2]</sup>。有资料表明, 在 Cx43 寡聚化和向细胞膜运输过程中, MAPK 和 PKC 介导的连接蛋白磷酸化保证了 Cx43 半通道呈关闭状态, 从而避免了细胞膜的渗漏, 保持了细胞内环境的稳定<sup>[7]</sup>。多种刺激可以引起细胞内

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30570765)。

cAMP 的增加,后者可以加强 Cx43 的磷酸化和增加细胞间的缝隙连接交流,此过程由蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 介导,PKA 可以磷酸化 Cx43 的 C2 末端第 364, 365, 369 和 373 位丝氨酸,从而增加 Cx43 的合成、增加连接子向细胞膜的运输,导致缝隙连接形成增加,原有缝隙连接通道大小和数量增加。P34cdc2 可以磷酸化 262 位的丝氨酸,酪氨酸激酶 1 (casein kinase 1, CK1) 可以磷酸化 325, 328 和 330 位的丝氨酸,PKA 和 CK1 还可以上调连接蛋白的合成和组装,加强缝隙连接的功能<sup>[3]</sup>。既然 Cx43 拥有众多的磷酸化位点,理论上推测,磷酸酶 (phosphoprotein phosphatases, PP) 必然对其有作用。事实上,磷酸酶 PP1 和 PP2B 的抑制剂——okadaic acid, 可以延迟 Cx43 的去磷酸化、延迟细胞间交流的恢复时间。但是,在许多细胞实验中发现,okadaic acid 对 Cx43 在 SDS-PAGE 胶上的迁移和缝隙连接交流无明显作用。由此可以推测,磷酸酶在调节缝隙连接交流中具有多种作用,但对它的充分理解有赖于对连接蛋白磷酸化位点的研究,以及对连接蛋白磷酸化作用的充分认识。

**2.3 缝隙连接通道的门控调节** 缝隙连接通道是电压依从性的,其依从性的程度随 Cx 类型而变化,异型缝隙连接通道的电压依从性由组成通道的 Cx 类型决定。通道的传导性由两个耦联的细胞间的电势差即传导连接电压 (transjunctional potential,  $V_j$ ) 来调节,也可由细胞内外的电势差来调控。电压依从性在非兴奋组织中的作用不甚明确,可能是将受损细胞与周围正常细胞分开。因为缝隙连接通道有同型和异型之分,所以它们的电压依从性各不相同,由 Cx32 或 Cx26 组成的同型缝隙连接通道的电压依从性很相似,当  $V_j$  小于 50 mV 时,其电压敏感性极不稳定,且无瞬时电压依从性,Cx32/x26 异型缝隙连接通道则表现出不对称的瞬时电压依从性,当 Cx32 占优势时,电压依从性的稳定性消失<sup>[11]</sup>。Cx 的电压依从性通常由 Boltzmann 数来定量。研究证实许多电压依从性通道都有一个决定电压敏感性的结构域,称为 S4 区,它是一个独特的氨基酸残基的延伸,跨越膜,且每隔三个位点就有一个正电荷残基。Cx 缝隙连接通道无 S4 区,Cx 的第一个细胞外环 (E1) 和第二个跨膜区 (M2) 是其电压依从性决定因素,E1 感受电压变化,而 M2 中的脯氨酸残基则是电压感受器和电压门控的转换因子<sup>[12]</sup>。电压触发的缝隙连接的启闭与 pH 诱导的启闭既独立又交叉<sup>[13]</sup>。与其他电压敏感的离子通道相比,缝隙连接不具有 S4 样结构的电压感受器。在大多数的细胞中,连接蛋白是电压敏感的,Rubin 等<sup>[14]</sup> 在 xenopus 卵母细胞间 Cx26 与 Cx32 组成的异型缝隙连接间发现了一种在同型缝隙连接中不存在的新的电压依赖性,这种电压依赖性对于膜电位非常敏感,由此得出缝隙连接的电压敏感性不仅取决于单个连接蛋白内在特性,而且也依赖于连接蛋白间相互作用的一些特性。用 Cx32E1 区的 E241 和 S242 的氨基酸残基替代 Cx26E1 区的带二价正电子的 K241 和 E242 的氨基酸残基,缝隙连接则失去电压依赖特性,说明 E1 区域是缝隙连接对电压快或慢反应机制的关键区域。有人利用 Cx43/Cx32 嵌合体发现,羧基末端与 M2 间的区域与电压依赖的通道启闭相关,Cx26 分子中第 87 位脯氨酸残基的突变将逆转通道的电特性<sup>[15]</sup>。总之,连接蛋白在胞内的不同部分的相互作用构成一个“电荷复合体”,是电压感受器的一个集合部分。同一种或不同 Cx 的相互作用改变了阀门的极性,从而影响了缝隙连接的启闭。

### 3 缝隙连接介导的信号在血管内皮细胞和平滑肌细胞间的传递

传统的观点认为缝隙连接只能在同型细胞间建立,现在研

究表明,不同类型的细胞间也可以建立缝隙连接。对大鼠小动脉和微动脉的研究发现,在其血管内皮细胞和平滑肌细胞内存在 Cx 的表达,Cx43 和 Cx37 分别存在血管内皮细胞和平滑肌细胞内,而 Cx40 蛋白仅仅存在平滑肌细胞中,Cx43 是内皮和平滑肌细胞缝隙连接的主要蛋白<sup>[16]</sup>。内皮和平滑肌细胞间的这种缝隙连接称为肌内皮连接,而这种异型细胞间的通讯在调节血管收缩和舒张功能中起到重要的作用。缝隙连接传递的信号介质仍不十分清楚。目前认为主要有以下几种:

**3.1 电耦联** 内皮源性超极化因子 (EDHF) 是近年来研究较多的内皮源性舒张因子,EDHF 不是单一的 1 种化学物质,而是在内皮细胞中生成的多种因子,包括  $Ca^{2+}$  的动态平衡,  $K^+$  通道的激活等,它先引起血管内皮细胞的超极化,并通过血管内皮细胞-平滑肌细胞缝隙连接的电耦联作用,将超极化电流传递至平滑肌细胞,引起平滑肌细胞的超极化,促发平滑肌的舒张。乙酰胆碱 (ACh) 引起的内源性平滑肌舒张被认为是 EDHF 参与导致的。Liao 等<sup>[17]</sup> 通过研究新西兰大耳兔的肠系膜小动脉,发现在肠系膜动脉内皮和平滑肌细胞间存在缝隙连接,内皮细胞通过缝隙连接通讯把超极化信号传到平滑肌细胞引起肠系膜动脉的舒张,而缝隙连接阻滞剂可以抑制由 ACh 的血管舒张作用。但是也有少部分研究表明缝隙连接在血管收缩反应中也起重要的作用。洪涛等<sup>[18]</sup> 的研究发现用缝隙连接阻滞剂 Heptanol 可以抑制兔蛛网膜下腔出血后急性和慢性脑血管痉挛。脑池内注射 Heptanol 能有效抑制由蛛网膜下腔出血引起的形成脑血管收缩。但其机制尚不清楚。

**3.2 钙离子** 最近,Isakson 等<sup>[19]</sup> 应用血管内皮和平滑肌细胞联合培养模型发现:(1) 用预先耗竭平滑肌细胞内质网的  $Ca^{2+}$  后,应用 ATP 刺激血管内皮细胞,平滑肌细胞内的  $[Ca^{2+}]_i$  仍有明显升高;而预先耗竭血管内皮细胞内质网的  $Ca^{2+}$ ,后应用苯肾上腺素刺激平滑肌细胞,血管内皮细胞内的  $[Ca^{2+}]_i$  也有明显升高。(2) 预先在血管内皮细胞内加入  $Ca^{2+}$  螯合剂,应用 ATP 刺激血管内皮细胞,血管内皮和平滑肌细胞均没有  $[Ca^{2+}]_i$  的升高;应用苯肾上腺素刺激平滑肌细胞,则仅有平滑肌细胞本身  $[Ca^{2+}]_i$  的升高,血管内皮细胞内的  $[Ca^{2+}]_i$  无明显变化。(3) 预先在平滑肌细胞内加入  $Ca^{2+}$  螯合剂,应用 ATP 刺激血管内皮细胞,血管内皮本身  $[Ca^{2+}]_i$  升高,平滑肌细胞内  $[Ca^{2+}]_i$  无明显变化;但在应用苯肾上腺素刺激平滑肌细胞时,尽管平滑肌细胞本身  $[Ca^{2+}]_i$  无明显变化,血管内皮细胞内的  $[Ca^{2+}]_i$  却有明显升高。这些结果提示  $Ca^{2+}$  在缝隙连接介导的信号传递中充当着重要的信使,它通过缝隙连接进行跨膜运动而发挥其生物学作用。

**3.3  $IP_3$**  以前的研究显示,来源于血管平滑肌细胞的  $IP_3$  能够调节内皮细胞的  $Ca^{2+}$  储备,但反之则不然,这提示  $IP_3$  通过缝隙连接是一种单向运动。最近,Isakson<sup>[20]</sup> 发现, $IP_3$  是以双向流动的形成通过缝隙连接,位于内皮细胞上的  $IP_3$  受体 1 能够与来自血管平滑肌细胞的  $IP_3$  结合而使内皮细胞发生反应,但来自内皮细胞的  $IP_3$  经缝隙连接进入平滑肌细胞在与  $IP_3$  受体结合前就被分解而不能使平滑肌细胞发生反应。

**3.4 其他** cAMP 或 cGMP 是重要的第二信使分子,在多种生物学过程中发挥重要作用。由于其分子量小且具有水溶性等特点而被认为是缝隙连接传递的重要介质,但目前尚无直接证据能够证实这一点。

## 4 展望

缝隙连接介导的细胞间信号传递在细胞之间的相互调节中具有重要的意义。它和细胞的旁分泌及自分泌一起,构成了细胞间相互调节的网络。这对了解细胞间的相互调节机制,以

及在病理条件下的变化具有重要的意义,并可能成为干预病变的新的靶点。但目前的研究尚处于起始阶段,很多问题尚未清楚。如究竟有多少介质进行跨膜传递,缝隙连接通道如何进行调节,以及介质进入另一细胞后的信号转导过程如何,这些问题均有待进一步阐明。相信随着研究的不断深入以及新的研究方法的建立,这些问题可以逐步解决,从而为探索细胞间信号传递开拓出新的领域,并对干预其病理变化寻找新的靶点。

#### 参考文献:

- [1] Hesketh GG, Shah MH, Halperin VL, et al. Ultrastructure and regulation of lateralized connexin 43 in the failing heart[J]. *Circ Res*, 2010(Epub ahead of print).
- [2] Goodenough DA, Paul DL. Gap junctions[J]. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 2009, 1(1):a002576.
- [3] Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2):228.
- [4] Hanner F, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, et al. Connexins and the kidney[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010(Epub ahead of print).
- [5] Isakson BE, Duling BR. Heterocellular contact at the myoendothelial junction influences gap junction organization[J]. *Circ Res*, 2005, 97(1):44.
- [6] Figueroa XF, Duling BR. Gap junctions in the control of vascular function[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(2):251.
- [7] Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR. Selective permeability of gap junction channels[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1662(1-2):96.
- [8] Personius KE, Chang Q, Mentis GZ, et al. Reduced gap junctional coupling leads to uncorrelated motor neuron firing and precocious neuromuscular synapse elimination[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(28):11808.
- [9] Segretain D, Falk MM. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1662(1-2):3.
- [10] Johnson TL, Nerem RM. Endothelial connexin 37, connexin 40, and connexin 43 respond uniquely to substrate and shear stress[J]. *Endothelium*, 2007, 14(4-5):215.
- [11] Trexler EB, Bennett MV, Bargiello TA, et al. Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12):5836.
- [12] Abrams CK, Bennett MV, Verselis VK, et al. Voltage opens unopposed gap junction hemichannels formed by a connexin 32 mutant associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(6):3980.
- [13] Niger C, Geneau G, Fiorini C, et al. Endothelin-1 inhibits human osteoblastic cell differentiation; influence of connexin-43 expression level[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(1):110.
- [14] Rubin JB, Verselis VK, Bennett MV, et al. A domain substitution procedure and its use to analyze voltage dependence of homotypic gap junctions formed by connexins 26 and 32[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(9):3820.
- [15] Nambara C, Kawasaki Y, Yamasaki H. Role of the cytoplasmic loop domain of Cx43 in its intracellular localization and function; possible interaction with cadherin[J]. *J Membr Biol*, 2007, 217(1-3):63.
- [16] Johnstone S, Isakson B, Locke D. Biological and biophysical properties of vascular connexin channels[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2009, 278:69.
- [17] Liao Y, Regan CP, Manabe I, et al. Smooth muscle-targeted knockout of connexin43 enhances neointimal formation in response to vascular injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(5):1037.
- [18] 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.
- [19] Isakson BE, Ramos SI, Duling BR.  $Ca^{2+}$  and inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling across the myoendothelial junction[J]. *Circ Res*, 2007, 100(2):246.
- [20] Isakson BE. Localized expression of an Ins(1,4,5)P3 receptor at the myoendothelial junction selectively regulates heterocellular  $Ca^{2+}$  communication[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 21):3664.

(收稿日期:2009-10-13 修回日期:2010-01-13)

• 综 述 •

## NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 信号通路与皮肤病\*

郁 博<sup>1,2</sup>综述,何 威<sup>1 $\Delta$</sup> 审校

(1. 第三军医大学新桥医院皮肤科,重庆 400037;2. 青岛大学医学院附属医院皮肤科 266003)

关键词: NF- $\kappa$ B; I $\kappa$ B; 信号转导; 皮肤病

中图分类号: R365.751

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)11-1450-04

核因子- $\kappa$ B (nuclear factor kappa binding, NF- $\kappa$ B)是广泛存在于细胞中的具有多向调节作用的蛋白质分子,可调节 100 多种靶基因的表达,其中的大多数均参与了宿主的免疫和炎症

反应。NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B) 是 NF- $\kappa$ B 的抑制因子。本文主要就 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 信号通路的概况及其在某些皮肤病发病机制中的作用进行综述。

\* 基金项目:第三军医大学第二附属医院 1520 人才基金资助课题(2006-188)。  $\Delta$  通讯作者, E-mail: weihegj@yahoo.com。