

· 论 著 ·

过表达缝隙连接蛋白 Cx43 与人脑胶质瘤细胞 U251 侵袭性的研究*

闻海兵, 邹树峰, 李嘉杰, 洪涛[△]

(南昌大学医学院第一附属医院神经外科, 南昌 330006)

摘要:目的 通过上调脑胶质瘤细胞 U251 的 Cx43 表达水平, 检测其对 U251 侵袭能力的影响, 为抑制肿瘤的恶性浸润提供新的治疗途径。方法 通过构建缝隙连接蛋白 Cx43 真核表达重组质粒, 并转染 U251 细胞, 过表达 U251 细胞缝隙连接蛋白 Cx43, RT-PCR 及 Weston-blot 检测 Cx43 mRNA 及蛋白表达水平变化。用 Traswell 细胞培养板结合 MTT 法测定 U251 细胞侵袭能力的改变。结果 (1) 成功构建 pCMV-Cx43 cDNA 重组质粒。(2) 成功转染 U251 细胞并筛选稳定转染过表达 Cx43 细胞株。(3) Traswell 细胞培养板结合 MTT 法, 检测到过表达 Cx43 后 U251 细胞侵袭能力较正常组下降。结论 过表达缝隙连接蛋白 Cx43 能抑制人脑胶质瘤细胞 U251 侵袭能力。

关键词:质粒转染; 缝隙连接蛋白 Cx43; 人脑胶质瘤细胞; 侵袭性

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2011. 19. 004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)19-1881-04

A study of connexin Cx43 overexpression on U251 glioma cell invasion*

Wen Haibing, Zou Shufeng, Li Jiajie, Hong Tao[△]

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

Abstract: **Objective** Through in vitro overexpression of connexin Cx43 on U251 glioma cell invasion studies. To provide a new therapeutic approach the inhibition of invasion of malignant tumor. **Methods** Connexin Cx43 by constructing eukaryotic expression plasmid and transfected into U251 cells overexpressing connexin Cx43, RT-PCR and weston-blot detected the expression of Cx43 mRNA levels. Traswell cell culture plates with MTT method and the invasive ability of U251 cells to change. **Results** 1. successfully constructed the recombinant plasmid pCMV-Cx43 cDNA 2. successfully transfected U251 cells and selected stably transfected cell lines overexpressing Cx43. 3. TRASWELL cell culture plates with MTT assay after the overexpression of Cx43 U251 cell infiltration capacity than the control group decreased. **Conclusion** Over expression of connexin Cx43 can inhibit invasion of U251 glioma cells.

Key words: plasmid transfection; gap junction protein Cx43 mRNA; human glioma cells

神经胶质瘤是指来源于神经上皮的肿瘤, 根据瘤细胞的分化情况可分为星形细胞瘤、少突胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤等。是神经外科常见颅内恶性肿瘤, 其发病率高, 约占全部颅内肿瘤的 40%~50%, 因其生长迅速, 浸润能力强, 手术治疗后复发率高, 化疗及放疗并发症多, 一直是神经外科的难题。众多研究表明, 缝隙连接蛋白与肿瘤存在密切相关性, 且缝隙连接蛋白 Cx43 能抑制肿瘤的增殖, 但对脑胶质瘤侵袭性与缝隙连接蛋白 Cx43 关系尚不明确。本实验旨在基因水平上上调缝隙连接蛋白 Cx43, 观察体外人脑胶质瘤细胞 U251 侵袭能力的改变, 为进一步体内探讨脑胶质瘤侵袭性实验研究提供理论依据, 也可能为临床治疗恶性脑胶质瘤带来新的思想。

1 材料与方 法

1.1 主要材料及试剂

1.1.1 细胞 U251 细胞(由中山医科大学药理实验室提供); PCDNA3.1(本实验室存有), Traswell 细胞培养板(Chemicon 公司)。

1.1.2 实验主要试剂 进口胎牛血清、DMEM 细胞培养基(美国 Gobao 公司), Traswell 细胞培养板, MTT(天根公司) TRIzol 总 RNA 提取试剂盒(天根公司)、RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司), 随机引物(美国 Promega 公司), 各种内切酶及连接酶(上海天根公司), 引物合成(上海捷瑞生物工程有

限公司), Cx43 兔抗人抗体(美国 Promega 公司)。β-actin 兔抗人抗体(美国 Promega 公司)。山羊抗兔二抗(美国 Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 pCMV-Cx43 cDNA 重组质粒构建及鉴定

1.2.1.1 U251 细胞总 RNA 的提取 按 QIAGEN 总 RNA 制备试剂盒(RNeasy Mini Kit)操作方法提取总 RNA。

1.2.1.2 RT-PCR 扩增人 Cx43 基因蛋白编码序列 子 Cx43 引物序列按 Pubmed 基因库提供该基因人的 cDNA 全序列, 序列号为 GI:59709441, 通过引物设计软件设计全序列引物, 下游引物分别加入 NHE1 及 KPN1 酶切序列, 扩增产物全长 149 bp。β-actin 引物采用上海闪晶分子生物技术研究所的 β-actin 序列, F: 5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3', R: 5'-TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3', 引物扩增产物长 150 bp。两对引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。以提取的总 RNA 为模板, 使用 Promega 公司 RT-PCR 试剂盒反转录合成 cDNA 第一条链。取反转录产物 2 μL, PCR 扩增 Cx43 蛋白编码序列, 上游引物: 5'-GTG CTA GCA TGG GTG ACT GGA GCG CC-3', 其酶切位点: GCT AGC, 内切酶为 NHE1, 下游引物: 5'-GCG GGT ACC CAG GAT CTC CAG GTC A-3', 其酶切位点 GGT ACC, 内切酶为 Kpn I, PCR 反应

条件为 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 3 min, 35 个循环。PCR 扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶图像仪分析并进行照相。使用 U-gene DNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 Cx43 PCR 产物。

1.2.1.3 pCMV-Cx43 cDNA 载体的构建及鉴定 使用 NHE I 和 Kpn I 限制性内切酶对 Cx43 RT-PCR 扩增产物及 pcDNA3.1 质粒分别进行双酶切, 酶切产物切胶回收后用 Ligation High DNA 连接酶, 16 °C 连接 16 h; 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细菌, 氨苄霉素平板筛选。挑取阳性克隆, 摇菌过夜, 提取质粒。重组质粒用 NHE I 和 Kpn I 限制性内切酶双酶切初步鉴定正确后, 测序进一步验证所构建质粒的正确性。所构建的质粒命名为 pCMV-Cx43 cDNA。

1.2.2 重组质粒及空质粒转染 U251 细胞并筛选稳定细胞株 主要步骤: U251 细胞 G418 筛选浓度的确定、脂质体 2000 行质粒的 U251 细胞转染、G418 筛选转染空质粒及重组质粒细胞株得出稳定转染空质粒及重组质粒细胞株。

1.2.3 实验分组 (1) 正常对照组: 不进行任何处理, 直接行 RT-PCR 检测正常 U251 细胞 Cx43 mRNA 表达水平及 Weston-blot 检测 Cx43 蛋白表达水平 ($n=6$), 并通过 Transwell 细胞培养板结合 MTT 法测定正常 U251 细胞侵袭能力。(2) 转染 Cx43 重组质粒组: 转染 pCMV-Cx43 cDNA 重组质粒的 U251 细胞, RT-PCR 检测转染后 U251 细胞 Cx43 mRNA 表达水平及 Weston-blot 检测 Cx43 蛋白表达水平 ($n=6$), 并通过 Transwell 细胞培养板结合 MTT 法测定正常 U251 细胞侵袭能力。(3) 转染空质粒组: 转染空质粒后的 U251 细胞, RT-PCR 检测转染空质粒后 U251 细胞 Cx43 mRNA 表达水平及 Weston-blot 检测 Cx43 蛋白表达水平, 并通过 Transwell 细胞培养板结合 MTT 法测定正常 U251 细胞侵袭能力。

1.2.4 体外细胞侵袭模型的建立 (Transwell 侵袭实验模型通过 Transwell 细胞培养板结合 MTT 检测) 取 24 孔 0.8 μ m 的 24 孔 Transwell 细胞培养板 (Transwell 上室内已铺好基质胶)。按 Chemicon 公司的说明书要求, 将小室放入培养板中, 在上室加入 300 μ L 预温的无血清培养基, 室温下静置 15~30 min, 使基质胶再水化, 再吸除培养基, 将分为正常组、转染 Cx43 重组质粒组、转染空质粒组的 U251 细胞经胰酶消化后, 以 2×10^3 /mL 接种于 Transwell 细胞培养板上室内, 待细胞贴壁后, 更换上室内培养基为无血清培养基。下室用 10% 胎牛血清培养基, 培养 24 h, 用无菌棉签擦除上室内细胞, 用 MTT 法间接检测小室培养板侧细胞数量, MTT 法检测细胞培养板下室侧的细胞吸光度即代表穿过基质胶及聚碳酸酯膜细胞数量, 而穿过的细胞数量即代表侵袭能力变化。

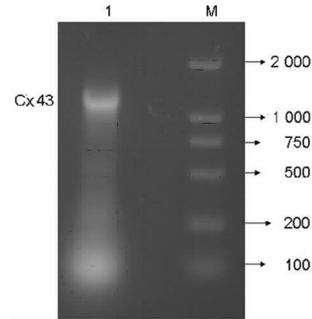
1.2.5 检测 Cx43 mRNA 及 Cx43 蛋白表达情况 通过 RT-PCR 检查各组 Cx43 mRNA 表达水平, Weston-blot 法检测蛋白表达。

1.3 统计学处理 实验完成后数据输入微机, 采用 SPSS13.0 软件进行统计处理, 所有定量指标数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 方差齐时, 计量资料采用单因素方差分析, 多个样本均数两两比较采用 SNK- q 检验; 方差不齐时采用秩和分析统计, 组间两两比较, 采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

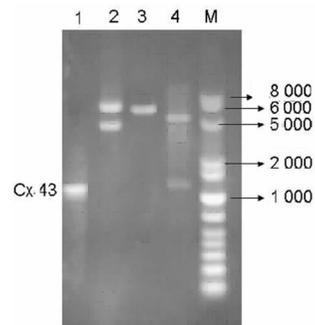
2.1 pCMV-Cx43 cDNA 载体的酶切及鉴定 以 U251 总 RNA 为模板 RT-PCR 扩增 Cx43, 对扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 1 000 bp 左右处出现单一条带, 与 1 149 bp Cx43 目

的片段大小相符 (图 1)。用 Kpn I 和 NHE I 对质粒 pCMV-Cx43 cDNA 进行单酶及双酶切后, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见约 1.0 kb 和 5.4 kb 大小条带, 符合预期结果 (图 2)。测序结果与 GenBank 所提供的人 Cx43 cDNA 序列 (GI: 59709441) 完全一致, 证明质粒构建成功。用于载体质粒的 pcDNA3.1 及单酶切结果 (图 3), pCMV-Cx43 cDNA 则是在该质粒多克隆位点 NheI 和 KpnI 之间插入 1.149 Kbp 的 Cx43 目的基因片段。重组质粒经测序后与基因库无差异。



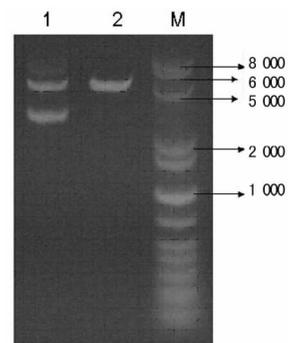
泳道 1: 目的条带 PCR 产物; M: DNAMark。

图 1 目的基因 Cx43 PCR 电泳结果



泳道 1: 目的基因 CX43 条带; 泳道 2: 重组质粒 pCMV-Cx43 cDNA 条带; 泳道 3: 重组质粒 pCMV-Cx43 cDNA 单酶切条带; 泳道 4: 重组质粒 pCMV-Cx43 cDNA 双酶切结果条带; M: DNAMark。

图 2 重组质粒 pCMV-Cx43 cDNA 酶切电泳结果

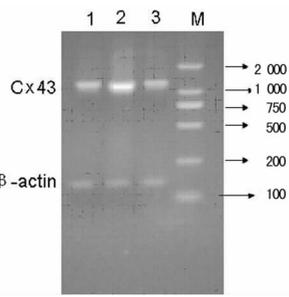


泳道 1: PCDN3.1(+) 质粒; 泳道 2: PCDN3.1(+) 单酶切; M: DNAMark。

图 3 载体 PCDN3.1(+) 及单酶切电泳结果

2.2 重组质粒 pCMV-Cx43 cDNA 测序结果 AGC AGA GCT CTC TGG CTA CTA GAG AAC CCA CTG CTT ACT GGC TTA TCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCC AAG CTG GCT AGC ATG GGT GAC TGG AGC GCC TTA GGC AAA CTC CTT GAC AAG GTT CAA GCC TAC TCA ACT GCT GGA GGG AAG GTG TGG CTG TCA

GTA CTT TTC ATT TTC CGA ATC CTG CTG CTG GGG
 ACA GCG GTT GAG TCA GCC TGG GGA GAT GAG CAG
 TCT GCC TTT CGT TGT AAC ACT CAG CAA CCT GGT
 TGT GAA AAT GTC TGC TAT GAC AAG TCT TTC CCA
 ATC TCT CAT GTG CGC TTC TGG GTC CTG CAG ATC
 ATA TTT GTG TCT GTA CCC ACA CTC TTG TAC CTG
 GCT CAT GTG TTC TAT GTG ATG CGA AGG GAA GAG
 AAA CTG AAC AAG AAA GAG GAA GAA CTC AAG
 GTT GCC CAA ACT GAT GGT GTC AAT GTG GAC ATG
 CAC TTG AAG CAG ATT GAG ATA AAG AAG TTC AAG
 TAC GGT ATT GAA GAG CAT GGT AAG GTG AAA ATG
 CGA GGG GGG TTG CTG CGA ACC TAC ATC ATC AGT
 ATC CTC TTC AAG TCT ATC TTT GAG GTG GCC TTC
 TTG CTG ATC CAG TGG TAC ATC TAT GGA TTC AGC
 TTG AGT GCT GTT TAC ACT TGC AAA AGA GAT CCC
 TGC CCA CAT CAG GTG GAC TGT TTC CTC TCT CGC
 CCC ACG GAG AAA ACC ATC TTC ATC ATC TTC ATG
 CTG GTG GTG TCC TTG GTG TCC CTG GCC TTG AAT
 ATC ATT GAA CTC TTC TAT GTT TTC AAG GGC
 GTT AAG GAT CGG GTT AAG GGA AAG AGC GAC CCT
 TAC CAT GCG ACC AGT GGT GCG CTG AGC CCT GTC
 AAA GAC TGT GGG TCT CAA AAA TAT GCT TAT TTC
 AAT GGC TGC TCC TCA CCA ACC GCT CCC CTC TCG
 CCT ATG TCT CCT CCT GGG TAC AAG CTG GTT ACT
 GGC GAC AGA AAC AAT TCT TCT TGC CGC AAT TAC
 AAC AAG CAA GCA AGT GAG CAA AAC TGG GCT AAT
 TAC AGT GCA GAA CAA AAT CGA ATG GGG CAG GCG
 GGA AGC ACC ATC TCT AAC TCC CAT GCA CAG CCT
 TTT GAT TTC CCC GAT GAT AAC CAG AAT TCT AAA
 AAA CTA GCT GCT GGA CAT GAA TTA CAG CCA CTA
 GCC ATT GTG GAC CAG CGA CCT TCA AGC AGA GCC
 AGC AGT CGT GCC AGC AGC AGA CCT CGG CCT GAT
 GAC CTG GAG ATC CTG GGT ACC GAG CTC GGA TCC
 ACT AGT CCA GTG TGG TGG AAT TCT GCA GAT ATC
 CAG CAC AGT GGC GGC CGC TCG AGT CTA GAG CCC C
 测序报告 Best Regards sequence TIANGEN BIOTECH(BEI-
 JING)CO.,LTD. 测序结果与 Pubmed 基因库提供该基因人的
 cDNA 全序列全部相符。



泳道 1: 目的基因 Cx43 条带; 泳道 2: 重组质粒 pCMV-Cx43 cDNA 条带; 泳道 3: 重组质粒 pCMV-Cx43 cDNA 单酶切条带; 泳道 4: 重组质粒 pCMV-Cx43 cDNA 双酶切结果条带; M: DNAmark。

图 4 各组 Cx43 蛋白 mRNA 表达水平变化

2.3 各组 Cx43 蛋白 mRNA 表达水平变化检测 见表 1 及图 4。

2.4 各组 Cx43 蛋白表达水平变化检测 见图 5 及表 2。

2.5 各组 U251 细胞迁移力检测结果 见表 3。

表 1 各组 Cx43 蛋白 mRNA 表达水平变化检测 ($\bar{x} \pm s$)

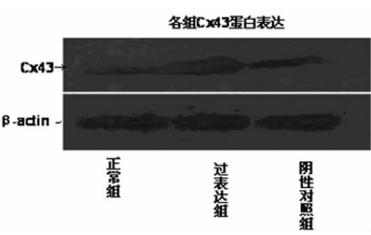
实验分组	样本数(n)	Cx43 蛋白 mRNA/ β -actin(%)
正常组	6	153.4 \pm 4.6
Cx43 重组质粒组	6	286.6 \pm 5.7*
空质粒组	6	138.1 \pm 3.8

* : $P < 0.05$, 与正常组、空质粒组比较。

表 2 各组 Cx43 蛋白表达水平变化检测 ($\bar{x} \pm s$)

实验分组	样本数(n)	Cx43 蛋白/ β -actin 内参(%)
正常组	6	86.4 \pm 3.6
Cx43 重组质粒组	6	146.8 \pm 2.7*
空质粒组	6	89.5 \pm 3.8

* : $P < 0.05$, 与正常组、空质粒组比较。



空质粒组及正常组对比无明为变化, 转染 Cx43 重组质粒组蛋白表达明显高。正常组即未处理组、过表达组即转染 Cx43 组、阴性对照组即为转染空质粒组

图 5 各组 Cx43 蛋白表达水平

表 3 各组 U251 细胞迁移力检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

实验分组	样本数(n)	MTT 法检测吸光度
正常组	6	0.65 \pm 0.014
Cx43 重组质粒组	6	0.26 \pm 0.011*
空质粒组	6	0.59 \pm 0.016

* : $P < 0.05$, 与正常组、空质粒组比较。

3 讨 论

脑胶质瘤发病率约 12/100 000, 占有颅内肿瘤的 40%, 具有发病率、复发率、病死率高和治愈率低等“三高一低”的特点。美国最新资料显示, 在所有胶质细胞瘤中 50% 的胶质母细胞瘤患者 1 年生存率约为 30%, 5 年生存率不足 5%^[1]。其为预后不佳的肿瘤之一, 其发病机制仍不明确, 随着分子生物学技术的发展, 对其脑胶质瘤发生机制的研究近年来又取得了一些进展, 特别是与之相关的肿瘤生长抑制因子等的研究有了一些新的发现。如 LRRC4、P53 等抑制脑胶质瘤增殖^[2-4]; 而缝隙连接蛋白与肿瘤相关性的研究尤为热点, 如缝隙连接与脑胶质瘤放、化疗相关性; 以及缝隙连接与肿瘤化疗的旁观者效应; 缝隙连接脑胶质瘤增殖的相关性等^[5-6]。缝隙连接被认为是细胞直接信息传导的惟一通道, 允许相对分子质量在 1 000 ~ 1 500 亲水分子及离子自由出入, 参与细胞内电学及内环境稳定等的调节作用^[7]。每个缝隙连接子是由并列相邻的细胞各提供一个跨膜半管结构构成, 每个跨膜半管结构由 6 个跨膜的连接蛋白组成^[8-9], 而连接蛋白家族包括一大群连接蛋白,

根据组成连接蛋白的不同其连接子构成也不同,连接蛋白根据其分子量大小被命名,如 Cx40、Cx43 等,目前为止,科研人员发现人细胞中连接蛋白家族中包括有 21 种连接蛋白,而鼠为 20 种,物种不同其连接蛋白家族成员也不同^[10-11],而在人的细胞中,连接蛋白因组织不同其分布也有明显差异,如心血管中 Cx40 的表达主要在心房、Cx45 在系统传导,而 Cx43 主要是心室连接蛋白表达为主。同时在肾组织和脑组织分别以 Cx26、Cx43 为主^[11-12]。而在众多缝隙连接蛋白家族中,缝隙连接蛋白 Cx43 与肿瘤疾病的研究是最多的。众多研究认为 Cx43 有明显抑制肿瘤生长作用^[6,13],但具体机制仍不明确。作者前期也作了相应的研究,发现 C6 细胞缝隙连接蛋白 Cx43 表达明显减少,并且在体外实验中能观察到其抑瘤细胞增殖的作用^[14],同时其他相关研究表明,在体内 Cx43 也能明显抑制肿瘤生长^[15]。但迄今脑胶质瘤发生机制尚未完全阐明。此外,在对脑胶质瘤浸润能力方面的研究也较多,但缝隙连接蛋白 Cx43 与脑胶质瘤的浸润能力相关性的研究尚无明确报道。本实验通过基因水平调节肿瘤细胞缝隙连接蛋白 Cx43 表达水平,观察肿瘤细胞的侵袭能力的变化,在实验中,通过转染过表达 Cx43 重组质粒,能够在肿瘤细胞中稳定表达,检测到肿瘤细胞 Cx43 表达水平升高,并且筛选出稳定转染细胞株。而 Transwell 细胞培养板聚碳酸酯膜上室侧铺上一层基质胶,用以模仿体内细胞外基质,建立了体外细胞侵袭性实验模型。细胞欲进入下室,先要分泌基质金属蛋白酶(MMPs)将基质胶降解,方可通过聚碳酸酯膜。Transwell 细胞培养板上室接种肿瘤细胞,内加无血清培养基,下室加入有血清的培养基,肿瘤细胞会向营养成分高的下室迁移,但肿瘤细胞要向下室内迁移,则必须突破上室聚碳酸酯膜上的基质胶,方能通过聚碳酸酯膜进入下室的培养板侧,传统的方法是进行计数下室侧培养板的细胞来衡量肿瘤细胞的侵袭能力。而 MTT 比色法检测细胞相对数为当前较为常用的一种方法,是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓩(Formazan)并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的甲瓩,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内,MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。本实验结合 Transwell 细胞培养板建立体外侵袭性模型及 MTT 法间接检测细胞数量,很好地反映了肿瘤细胞侵袭能力的强弱。最终实验结果显示转染 Cx43 质粒高表达缝隙连接蛋白 Cx43 的细胞株从上室突破基质胶进入下室明显减少,MTT 法检查其吸光度明显降低。在实验中转染空质粒组为阴性对照组,与正常组比较进入下室侧的细胞数量检测无明显差异,表明过表达缝隙连接蛋白 Cx43 后人脑胶质瘤细胞 U251 侵袭能力较正常组及阴性对照组下降,即可说明缝隙连接蛋白 Cx43 能抑制肿瘤细胞 U251 的侵袭能力。因此,缝隙连接蛋白 Cx43 能够抑制肿瘤细胞的侵袭性,为进一步行体内肿瘤细胞侵袭性能力的研究奠定基础,并可能通过调节肿瘤细胞的 Cx43 表达而抑制恶性肿瘤的侵袭性,为治疗脑胶质瘤带来新的方法。

参考文献:

[1] Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA, et al. Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Sur-

veillance, Epidemiology, and end results program 1973 to 2001[J]. *Neurosurg Focus*, 2006, 20(4): E1-9.

- [2] Wu MH, Huang C, Li XY, et al. LRRC4 inhibits glioblastoma cell proliferation, migration, and angiogenesis by downregulating pleiotropic cytokine expression and responses J[J]. *Cell Physiol*, 2008, 214: 65-74.
- [3] Weinmann L, Wischhusen J, Demma MJ, et al. A novel p53 rescue compound induces p53-dependent growth arrest and sensitises glioma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2008, 15: 718-729.
- [4] Aboody KS, Najbauer J, Danks MK, et al. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy[J]. *Gene Therapy*, 2008, 15: 739-752.
- [5] Go Edwards, Botchway SW, Hirst G, et al. Gap junction communication dynamics and bystander effects from ultrasoft X-rays[J]. *British Journal of Cancer*, 2004, 90: 1450-1456.
- [6] Tomas JW, Fox P, Christian C, et al. Connexin over-expression differentially suppresses glioma growth and contributes to the bystander effect following HSV-thymidine kinase gene therapy[J]. *Cell Communication and Adhesion*, 2006, 13: 79-92.
- [7] Mesnil M, Yamasaki H. Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: evidence and hypothesis[J]. *Mol Carcinogenesis*, 1993, 7: 14-21.
- [8] Stauffer KA, Kumar NM, Gilula N, et al. Isolation and purification of gap junction channels[J]. *Cell Biol*, 1991, 115: 141-150.
- [9] Paul DL. New functions for gap junctions[J]. *Cell Biol*, 1995, 7: 665-672.
- [10] Tanabe T, Oyamada M, Fujita K. Multiphoton excitation-evoked chromophore-assisted laser inactivation using green fluorescent protein[J]. *Nat Methods*, 2005, 2: 503-505.
- [11] Sohl G, Willecke K. Gap junction and the connexin protein family[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62: 228-232.
- [12] Van Veen TAB, Van Rijen HVM, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties[J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 51(2): 17-29.
- [13] Marc S, Marcaud V, Robin E, et al. Connexin 43-mediated bystander effect in two rat glioma cell models[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2002, 9: 149-155.
- [14] 洪涛, 孙华, 蒋雨萍, 等. 全反式维酸对脑胶质瘤细胞缝隙连接细胞间通讯功能的影响[J]. *江西医学院报*, 2005, 29(1): 140-143.
- [15] Dong JQ, Liu ML, Zou SQ. Relationship between connexin 43 and bystander effect of suicide gene system[J]. *Chin J Bases Clin General Surg*, 2008, 8(8): 15-21.

(收稿日期: 2010-11-03 修回日期: 2011-02-24)