

- (5) 余森海,许隆祺. 人体寄生虫学彩色图谱[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992: 1.
- (6) 王云昆,俞慧,杨家伦,等. 云南省人体肠道寄生原虫分布调查[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1994(S1): 89-91.
- (7) WHO. Guidelines for drinking water quality, 2nd ed. Addendum [M]. Geneva: World Health Organization 2002: 70-118.
- (8) 蒋则孝,许隆祺,余森海,等. 中国贾第虫感染流行病学现状[J]. 中国公共卫生, 1997, 13(7): 407-408.

收稿日期: 2011-12-17

(张翠编辑 李贵福校对)

【综述】

Connexin43 磷酸化调节与细胞间隙连接通讯功能*

王苏 张永兴

关键词: Connexin43; 细胞间隙连接; 磷酸化; 去磷酸化

中图分类号: Q 507

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)03-0322-03

细胞间隙连接通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)对于细胞增殖、分化、内环境稳定及机体新陈代谢、生长发育等生理过程起重要作用。细胞间隙连接是由细胞间隙连接蛋白(connexin, Cx)六聚体形成的跨膜通道结构,细胞间隙连接蛋白是构成细胞间隙连接的蛋白大家族,在人类组织中已经有超过 20 种细胞间隙连接蛋白被鉴定,connexin43(Cx43)则是该蛋白家族中组织分布最广、研究最多的一个重要成员,主要表达在心肌、肺、平滑肌、晶状体、成纤维细胞、星形细胞等多种组织。各种蛋白激酶及蛋白磷酸酶通过使 Cx43 蛋白不同氨基酸位点磷酸化和去磷酸化来调控细胞间隙连接通讯,而且 Cx43 蛋白只有适当磷酸化才能促进细胞间隙连接通讯功能发挥,非适当磷酸化或去磷酸化均能抑制细胞间隙连接通讯功能。本文就 Cx43 蛋白磷酸化与细胞间隙连接通讯功能关系研究现状综述如下。

1 细胞间隙连接通讯

细胞间隙连接蛋白是跨细胞膜蛋白质,因其构成相邻细胞之间的膜通道结构-细胞间隙连接而得名。6 个相同或相似的跨膜 Cx 蛋白环绕形成筒状结构,称连接子(connexon) 2 个连接子在相邻细胞的细胞膜上分别从膜中伸出并对接,组装成亲水性细胞间隙连接通道。由同聚体连接子构成的间隙连接称为同型间隙连接(homotypic junction),由异聚体连接子构成的间隙连接称为异型间隙连接(heterotypic junction)。由于不同 Cx 蛋白的同源性主要在细胞外的两个结构域,由此推断 Cx 家族成员之间细胞结构域的高度保守性能允许成员之间相互作用⁽¹⁾。但并非所有 Cx 蛋白成员之间都可以任意形成异型间隙连接,目前被一致接受的是 Cx43 蛋白可以与 Cx37、Cx43、Cx45 以及 Cx46 蛋白形成有功能的间隙连接,但不能与 Cx26、Cx31、Cx32、Cx33、Cx40 或 Cx50 蛋白形成间隙连接。间隙连接通道的直径取决于连接蛋白种类,一般约 1.5~2 nm,此通道允许分子量小于 1.5kD 或直径小于 1nm 的离子或小分子物质,如钠、钾、钙等离子,氨基酸、核苷、第二信使

分子、小分子药物、致癌物等通过。

细胞之间通过间隙连接相互沟通信息,使相邻细胞间形成协调的整体组织结构,细胞间的这种相互交流称为间隙连接通讯功能。间隙连接在结构上使细胞间相互连接,在功能上允许各种离子及小分子物质的通过从而介导细胞间电和化学信号传递,协调不同系统和组织之间电导性或代谢来有效地调控各种信息;使相邻细胞之间形成一个整体,从而调控细胞整体功能代谢,增殖分化⁽²⁻³⁾。细胞间隙连接通讯在维持内环境稳定,调节胚胎发育与分化,增强组织对激素的反应以及控制细胞恶性增殖等方面起重要作用⁽⁴⁻⁵⁾。由于细胞间隙连接通讯功能的正常发挥能够抑制细胞过度生长,因此肿瘤细胞间隙连接也能够抑制肿瘤细胞生长。研究表明,很多肿瘤细胞都出现了 Cx 蛋白表达下降,导致细胞间隙连接通讯功能下降甚至丧失,使细胞丧失了接触抑制,脱离其他细胞对它的监控⁽⁶⁾。间隙连接通讯介导的细胞间信号异常还可以引起身体各系统疾病,如 Samoilova⁽⁷⁾ 研究表明 Cx43 蛋白表达的高低与癫痫发生有一定关系,在癫痫形成时, Cx43 蛋白表达通常上调。Melchionda⁽⁸⁾ 等认为 Cx26 基因突变是遗传性先天性听力丧失的主要原因。

细胞间隙连接通道的功能受多种因素影响,这些因素主要有胞内 pH 值、Ca²⁺ 浓度、Cx 蛋白磷酸化状态、跨通道电压以及一些神经体液因子。Cx 蛋白磷酸化在间隙连接通讯功能的调节中发挥重要作用。正常情况下, Cx 蛋白本身存在一定程度磷酸化,这种磷酸化有助于细胞通讯功能正常发挥,磷酸化程度过高或过低都会抑制间隙连接通讯功能。

2 Connexin43 蛋白磷酸化

2.1 Cx43 蛋白在稳态中的生命周期 Cx43 蛋白首先在内质网合成,然后转运至高尔基复合体进行修饰,最后转运到细胞膜上聚集形成间隙连接⁽⁹⁾。有报道显示, Cx43 蛋白是在反面高尔基网聚合形成连接子,而天竺鼠肝脏的连接子是由 Cx26 蛋白和 Cx32 蛋白在内质网和高尔基体中间隔聚合而成⁽¹⁰⁾。聚合而成的连接子(或半通道)转运至胞膜,相邻细胞的两个半通道对接组装形成间隙连接。正常情况下,这些半通道的功能被严格调控,从而保障细胞间信息的稳定交流。丝裂原活化蛋白激酶和蛋白激酶都能够通过磷酸化反应关闭半通道⁽¹¹⁾。Cx43 蛋白半衰期约为 1~3h,意味着 Cx43 蛋白有较

* 基金项目: 国家自然科学基金(81071927/H1615); 福建省自然科学基金(2009J0101); 厦门市科技局指导性项目(3502z20089016)

作者单位: 厦门大学医学院预防医学系, 福建 厦门 361005

作者简介: 王苏(1985-),女,山东济宁人,硕士在读,研究方向: Connexin43 抑制肺癌细胞生长的机制研究。

通讯作者: 张永兴 E-mail: z63y94x@xmu.edu.cn

快的更新速度。

2.2 Cx43 蛋白的磷酸化 正常细胞生命周期中 Cx43 蛋白发生着不同的磷酸化。LAMPE 等人⁽¹²⁾分析 Cx43 蛋白发现, Cx43 蛋白在聚丙烯酰胺凝胶电泳分析中有多个电泳条带亚型,包括 1 个迁移较快的非磷酸化 Cx43 蛋白亚型(P0),分子量约为 40~42 kD;至少 2 个迁移较慢的磷酸化亚型(P1 和 P2),P1 代表部分磷酸化的 Cx43 蛋白,分子量约 43~44 kD;P2 代表高度磷酸化 Cx43 蛋白,分子量约 46 kD。在使用碱性磷酸酶处理后,电泳结果显示,原 P1 和 P2 条带迁移到 P0 条带位置处,表明磷酸化是主要的共价修饰。

Cx 蛋白的 C-端肽链包含复杂的磷酸化位点,是发生磷酸化的主要区域,大多 Cx 蛋白磷酸化主要发生在丝氨酸残基上,而当 v-Src 基因编码的 PP60src 蛋白激酶激活时,也可以出现酪氨酸的磷酸化。Cx43 蛋白的 C-端 241~382 氨基酸为主要磷酸化区,多种蛋白激酶能够识别该区域内的磷酸化位点,不同位点磷酸化对于间隙连接通道通透性及功能有重要调节作用。

3 Cx43 蛋白磷酸化相关激酶

Cx 蛋白的磷酸化修饰主要通过蛋白激酶和蛋白磷酸酶共同调节完成。一种蛋白激酶可以通过一种或几种作用机制来影响细胞的间隙连接通讯功能。

3.1 蛋白激酶 A (cAMP-dependent protein kinase, PKA)

PKA 是一种 cAMP 依赖蛋白,可以与 cAMP 结合并被其激活,活化 PKA 磷酸化 Cx43 蛋白,Cx43 蛋白不同位点的磷酸化对于间隙连接通讯功能影响不同。Yogo 等⁽¹³⁾发现由卵泡雌激素诱导的 PKA 磷酸化大鼠颗粒细胞中 Cx43 蛋白的 Ser365、Ser368、Ser369、Ser373 等位点,结果增强了细胞间隙连接形成及通讯功能。TenBroek 等人⁽¹⁴⁾认为 PKA 磷酸化 Cx43 蛋白的 Ser364 位点,能增加间隙连接通道组装。而 Bao 等⁽¹⁵⁾发现 PKA 磷酸化 Cx43 蛋白的 Ser368 位点,该位点磷酸化可改变 Cx43 蛋白构象,降低连接子渗透性,从而使间隙连接通讯功能下调。

3.2 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) PKC 在许多细胞类型中通过增强 Cx43 蛋白磷酸化抑制细胞间通讯⁽¹⁶⁾。Fernandes 等⁽¹⁷⁾研究发现高糖通过 PKC 高度磷酸化 Cx43 蛋白导致其降解,抑制肾小管上皮细胞间隙连接。研究表明,在很多细胞中,PKC 能使 Cx43 蛋白 Ser262 位点发生磷酸化,导致 Cx43 蛋白构象改变,在凝胶中迁移改变,下调间隙连接通讯功能⁽¹⁸⁻¹⁹⁾。EK-VITORIN 等⁽²⁰⁾研究发现,PKC 高度磷酸化 Cx43 蛋白的 Ser368 位点,降低通道选择通透性,降低间隙连接功能。

3.3 蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 2004 年 Geomans⁽²¹⁾研究了大鼠心肌细胞中 cGMP 可以激活 PKG,而激活的 PKG 使 Cx43 蛋白 Ser257 位点磷酸化,导致细胞间信息传递和对染料的通透性降低。有关 PKG 磷酸化 Cx43 蛋白的研究不多,尚需要更深入研究。

3.4 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) MAPK 家族包括 ERK (extracellular regulated protein kinases) 1/2、BMK-1 (Big MAP kinase-1, 又称 ERK5)、p38、JNK (c-Jun N terminal kinase) 等成员,是与细胞生长、分化、凋亡等过程密切相关的关键激酶。ERK 磷酸化 Cx43 蛋白的 Ser255、Ser279 及 Ser282 位点,减少间隙连接通道开放率,下调通讯功能⁽²²⁾。但一种具有弱雌激素样作用的环境污染物

壬基酚,能通过 p38-MAPK 途径使 Cx43 蛋白去磷酸化,从而下调间隙连接通讯⁽²³⁾。氧化磷脂 POVPC 能通过 MAPK 途径增强 Cx43 蛋白 Ser279/282 位点的磷酸化促进血管平滑肌细胞生长⁽²⁴⁾。

3.5 酪蛋白激酶 1 (casein kinase, CK1) Cooper⁽²⁵⁾研究 CK1 与 Cx43 蛋白的组装,发现 CK1 作用于小鼠肾细胞,可直接磷酸化 Cx43 蛋白的 Ser325、328 或 330 等位点,调节细胞膜上 Cx43 蛋白组装形成连接通道,用 CK1 抑制剂能使 Cx43 蛋白在原位点的磷酸化降低,并伴随着 Cx43 蛋白向细胞膜的聚集减少。LAMPE 等⁽²⁶⁾研究心肌缺血细胞时,发现心肌缺血能降低 Cx43 蛋白磷酸化,将 Ser325/328/330 3 个位点色氨酸突变为丙氨酸后,通道功能明显下降,进一步证明 Ser325/328/330 位点磷酸化能够影响连接通道组装及连接选择通透性。

3.6 细胞分裂周期蛋白激酶 2 (Cdc2) Cdc2 是一种蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶,细胞周期进程中必不可少。体外研究表明⁽²⁷⁾,Cdc2 能直接磷酸化 Cx43 蛋白,作用靶点可能为 Ser255 或 Cx43 蛋白的 C-末端尾部,并且可能会引起 Cdc2 下游激酶激活。在有丝分裂期中,Cdc2 介导的连接子磷酸化可能降低细胞间隙连接⁽²³⁾。

3.7 非受体蛋白酪氨酸激酶 Src 家族是研究最多的非受体酪氨酸激酶,Src 家族成员有 3 个同源区域:SH1、SH2、SH3,在磷酸化 Cx43 过程中发挥不同作用。蛋白 c-Src 蛋白激酶是正常细胞中酪氨酸特异性蛋白激酶,其基因突变后表达的 v-Src 蛋白激酶则是一种致癌蛋白激酶,Warn-Cramer 等⁽²⁸⁾认为,v-Src 必须同时作用于 Cx43 蛋白的 Tyr265 及 Tyr247 位点才能引起间隙连接通道关闭。

4 Cx43 蛋白去磷酸化与间隙连接

Cx43 蛋白上有一系列磷酸化位点,因此也有很多直接作用其上的蛋白磷酸酶 (protein phosphatase, PP)。根据磷酸化氨基酸残基的种类可分为蛋白质丝氨酸/苏氨酸磷酸酶、蛋白质酪氨酸磷酸酶。

4.1 丝氨酸/苏氨酸磷酸酶 (serine/threonine protein phosphatase S/TPP) PP1、PP2A、PP2B 和 PP2C 都是苏/丝氨酸蛋白磷酸酶家族成员。Duthe 等⁽²⁹⁾在缺少 ATP 的电偶联心肌细胞中发现 PP1 抑制剂能部分地维持通道活性。PP2B 属于钙调蛋白依赖磷酸酶家族,是唯一由第二信使 Ca²⁺ 调控的蛋白磷酸酶,所以又被称为神经钙蛋白。在动物实验中发现,心衰竭的家兔心肌细胞中,PP2A 局部含量明显增高,并导致细胞的 Cx43 蛋白去磷酸化,间隙连接通讯功能下降,而 PP1 的含量无明显变化⁽³⁰⁾,说明此动物模型中 PP2A 对间隙连接通讯起主要调节作用。Wei 等人⁽³¹⁾也发现在低氧的星形胶质细胞中,PP2B 抑制剂能减少低氧诱导的 Cx43 蛋白去磷酸化和连接解耦联。

4.2 蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase, PTP) PTP 作为信号转导调节因子,通过去除酪氨酸残基上磷酸基团,可对信号转导产生开关效应⁽³²⁾,如 SHP-1 (Src homology-2-containing protein-tyrosine phosphatase 1) 在细胞因子信号转导中呈现重要的负向调节,其缺乏将导致酪氨酸持续磷酸化,结果使细胞异常增殖。Giepmans 等⁽³³⁾发现受体蛋白酪氨酸磷酸酶 μ (RPTPμ) 的磷酸酶结构域能降低过表达的 Cx43 蛋白,并且 RPTPμ 与 Cx43 蛋白能免疫共沉淀,这些数据表明,RPTPμ 能抑制 Src 的磷酸化作用,使 Cx43 蛋白处在非磷酸化

状态,从而阻止通道关闭。

5 结 语

近年来研究表明,Cx43 蛋白异常表达与多种疾病密切相关,如心律失常、肿瘤发生等^[34-35]。Cx43 蛋白磷酸化和去磷酸化是调控 Cx43 蛋白功能的重要方式,而 Cx43 蛋白的非适当磷酸化必将影响细胞功能正常发挥,因此,Cx43 蛋白磷酸化研究将有助于理解 Cx43 蛋白与生物特定生命过程的关系,有助于临床疾病诊断和疾病预后判断,甚至为基因靶向治疗提供新思路。Cx43 蛋白磷酸化调节非常复杂,可能存在着不同蛋白激酶磷酸化特定的氨基酸位点,也可能存在着特定氨基酸位点被特定蛋白激酶磷酸化的特点,而不同位点磷酸化可能使 Cx43 蛋白表现出不同功能,如细胞间隙连接通讯功能的开关,甚至特定位点的磷酸化可能使 Cx43 蛋白参与细胞内信号通路调控,这些都需要进一步的实验研究证实。

参考文献

- Xin L, Guo GQ, Shen WZ. Progress in protein families of gap junction[J]. Chinese Journal of Pathophysiology 2007 23(6): 1240-1243.
- Cronier L, Crespin S, Strale PO, et al. Gap junctions and cancer: new functions for an old story[J]. Antioxidants and Redox Signaling 2009 2(11): 323-338.
- Kim MO, Lee YJ, Han HJ. Involvement of Cx43 phosphorylation in 5'-N-ethylcarboxamide-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells[J]. Journal of Cellular Physiology 2010 224(1): 187-194.
- Zhuang YY, Tang XL. Gap junction and phosphorylation[J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine 2006 26(5): 444-447.
- 王翠华, 吴瑾, 周红凤, 等. 不同分化胃癌细胞系中间隙连接蛋白的表达[J]. 中国公共卫生 2006 22(12): 1431-1432.
- 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.
- Samoilova M, Li J. Gap junctions in epileptogenesis: chicken or egg[J]. Epilepsy Curr 2004 4(2): 80-81.
- Melchionda S, Bicego M, Marciano E, et al. Functional characterization of a novel Cx26(T55N) mutation associated to non-syndromic hearing loss[J]. Biochem Biophys Res Commun 2005 337(3): 799-805.
- Salameh A. Life cycle of connexins: regulation of connexin synthesis and degradation[J]. Adv Cardiol 2006 42: 57-70.
- Musil LS, Goodenough DA. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein: gap junction connexin43 occurs after exit from the ER[J]. Cell 1993 74: 1065-1077.
- Saez JC, Retamal MA, Basilio D, et al. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta 2005 1711: 215-224.
- Lampe PD, Kurata WE, Warn-Cramer BJ, et al. Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase[J]. J Cell Sci 1998 111: 833-841.
- Yogo K, Ogawa T, Akiyama M, et al. PKA implicated in the phosphorylation of Cx43 induced by stimulation with FSH in rat granulosa cells[J]. Journal of Reproduction and Development 2006 52(3): 321-328.
- TenBroek EM, Lampe PD, Solan JL, et al. Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP[J]. J Cell Biol 2001 155: 1307-1318.
- Bao X, Reuss L, Altenberg GA. Regulation of purified and reconstituted connexin43 hemichannels by protein kinase C-mediated phosphorylation of serine 368[J]. J Biol Chem 2004 279(19): 20058-20066.
- Meacci E, Bini F, Sassoli C, et al. Functional interaction between TRPC1 channel and connexin-43 protein: a novel pathway underlying SIP action on skeletal myogenesis[J]. Cellular and Molecular Life Sciences 2010 67(24): 4269-4285.
- Fernanders R, Girao H, Pereira P. High glucose down-regulates intercellular communication in retinal endothelial cells by enhancing degradation of connexin43 by a proteasome-dependent mechanism[J]. J Biol Chem 2004 279(26): 27219-27224.
- Solan JL, Lampe PD. Connexin43 in LA-25 cells with active v-src is phosphorylated on Y247, Y265, S262, S279/282 and S368 via multiple signaling pathways[J]. Cell Commun Adhes 2008 15: 75-84.
- Solan JL, Marquez RL, Sorgen PL, et al. Phosphorylation at S365 is a gatekeeper event that changes the structure of Cx43 and prevents down-regulation by PKC[J]. Journal of Cell Biology 2007 179(6): 1301-1309.
- Ekvitorin JF, King TJ, Heyman NS, et al. Selectivity of connexin43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation[J]. Circ Res 2006 98: 1498-1505.
- Giepmans BN. Gap junctions and connexin interacting proteins[J]. Cardiovasc Res 2004 62: 233-245.
- Abdelmohsen K, Vonmontfort C, Stuhlmann D, et al. Doxorubicin induces EGF receptor-dependent downregulation of gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells[J]. Biol Chem 2005 386(3): 217-223.
- Aravindakshan J, Cyr DG. Nonylphenol alters connexin43 levels and connexin43 phosphorylation via an inhibition of the p38-mitogen-activated protein kinase pathway[J]. Biol Reprod 2005 72(5): 1232-1240.
- Johnstone SR, Ross J, Rizzo MJ, et al. Oxidized phospholipid species promote *in vivo* differential Cx43 phosphorylation and vascular smooth muscle cell proliferation[J]. American Journal of Pathology 2009 175(2): 916-924.
- Cooper CD, Lampe PD. Casein kinase 1 regulates connexin43 gap junction assembly[J]. J Biol Chem 2002 277(47): 44962-44968.
- Lampe PD, Cooper CD, King TJ, et al. Analysis of connexin43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart[J]. Journal of Cell Science 2006 119(16): 3435-3442.
- Cameron SJ, Malik S, Akaike M, et al. Regulation of epidermal growth factor-induced connexin43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinase1/ERK5 but not ERK1/2 kinase activation[J]. Biol Chem 2003 278(20): 18682-18688.
- Warn-Cramer BJ, Lau AF. Regulation of gap junctions by tyrosine protein kinases[J]. Biochim Biophys Acta 2004 1662: 81-95.
- Duthe F, Plaisance I, Sarrouilhe D, et al. Endogenous protein phosphatase 1 runs down gap junctional communication of rat ventricular myocytes[J]. American Journal of Physiology 2001 281: C1648-1656.
- Ai X, Pogwizd SM. Connexin43 downregulation and dephosphorylation in nonischemic heart failure is associated with enhanced colocalized protein phosphatase type 2A[J]. Circ Res 2005 96(1): 54-63.
- Wei L, Nagy JL. Connexin43 phosphorylation state and intercellular communication in cultured astrocytes following hypoxia and protein phosphatase inhibition[J]. European Journal of Neuroscience 2000 12: 26444-26450.
- Heneberg P, Draberova L, Bambouskova M, et al. Down-regulation of protein-tyrosine phosphatases activates an immune receptor in the absence of its translocation into lipid rafts[J]. Journal of Biological Chemistry 2010 285(17): 12787-12802.
- Giepmans BN, Feiken E, Gebbink MF, et al. Association of connexin43 with a receptor protein tyrosine phosphatase[J]. Cell Commun Adhes 2003 10: 201-205.
- 陈必良, 马向东. 分娩机制中细胞间隙连接蛋白 Cx43 瞬时表达定位、定量分析及其意义[J]. 实用妇科杂志 1999 15(6): 299-300.
- Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, et al. Altered connexin expression in human congestive heart failure[J]. J Mol Cardiol 2001 33(2): 359-371.

收稿日期: 2010-12-08

(解学魁编辑 李贵福校对)