

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 24520111153427

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Cx43 及 AKAP95 参与细胞周期调控机制的研究

Research on the mechanism of Cx43 and AKAP95 involving
in cell cycle

邹 璇

指导教师姓名: 张永兴 教授

专业名称: 药 理 学

论文提交日期: 2014 年 07 月

论文答辩时间: 2014 年 09 月

学位授予时间: 2014 年 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2014 年 09 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

肺癌是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤之一，近年来，肺癌致死率依然呈急剧上升的状态，当前也没有有效的治疗方法。Cx43 是构成细胞间隙连接通道重要的膜蛋白，主要功能是允许不同细胞间的信息交流，研究表明 Cx43 的生物学作用并不局限于在细胞膜上形成间隙连接，它还存在于细胞内参与细胞周期的调控，且这一过程不依赖于细胞间隙连接通讯功能。AKAP95 蛋白能锚定 PKA 于细胞核内，PKA 与 AKAP95 蛋白连接形成复合物并接近其特异性底物，继而发挥其激酶活性。此外 AKAP95 蛋白也参与了细胞生理活动中许多过程，如参与细胞周期及细胞凋亡过程。PKA 激酶在 cAMP 介导的细胞信号通路扮演重要角色，其活性依赖于 cAMP，且被认为与细胞增殖有密切联系，在肿瘤细胞中 PKA 活性降低。

本文选取人肺腺癌细胞 A549 作为研究对象，Co-IP 结合 western blot 实验发现去磷酸化作用促进了 Cx43 与 AKAP95 的结合。通过瞬时转染质粒改变 A549 中 Cx43 及 AKAP95 的表达，western blot 实验发现 Cx43 及 AKAP95 影响细胞周期调控因子 CyclinD1、CyclinE1、CDK2、CDK4 的表达，Cx43 改变了 CyclinD1-（pThr286）及 CDK1-（pThr14）的磷酸化。IF 结果显示上调 Cx43 蛋白表达对 CyclinE1 在 A549 细胞中的定位产生影响。利用药物 Foskolin 及 H89 处理 A549 细胞，改变 PKA 激酶活性，western blot 结果提示 PKA 活性影响 Cx43、AKAP95、CyclinD1 蛋白表达水平。上述实验研究旨在解释 Cx43 及 AKAP95 参与了细胞周期调控活动，但更具体的调控机制有待进一步深入研究。

关键词：Cx43；AKAP95；细胞周期；PKA

Abstract

Lung cancer is a common malignancy which does a serious harm to human health, in recent years, the mortality rates of lung cancer still showed a sharp rise, currently there is no effective treatment. Cx43 is an important cell membrane protein which constitutes gap junction channels, its main function is to allow the exchange of information between different cells, studies have shown that the biological role of Cx43 is not limited to the formation of gap junction in the cell membrane, it also exists in the cells and is involved in cell cycle regulation. AKAP95 can anchor PKA in the nucleus, PKA and AKAP95 form a complex and connects near the specificity substrate of PKA, and then exert its kinase activity. In addition AKAP95 is also involved in many processes in cell physiology activities, such as participation in the cell cycle and apoptosis processes. PKA plays an important role in cAMP mediated cell signaling pathway, its activity is dependent on cAMP and considered to have a close contact with cell proliferation, PKA activity has reduced in tumor cells.

this paper selects human lung adenocarcinoma cell A549 as the research subject, Co-IP and western blot experiments found that dephosphorylation has promoted the combination of Cx43 and AKAP95. Changed the expression of Cx43 and AKAP95 by transient transfection plasmids into A549, western blot test found that Cx43 and AKAP95 affect the expression of cell cycle regulatory factors CyclinD1、CyclinE1、CDK2、CDK4, meanwhile Cx43 has changed the phosphorylation of CyclinD1-(pThr286) and CDK1-(pThr14). IF result has shown that upregulated expression of Cx43 impacts on the location of CyclinE1 in A549. Using treatments of Foskolin and H89 in A549 to change the PKA activity, western blot result suggests that PKA activity has an effect on the expression levels of Cx43、AKAP95、CyclinD1. All the experimental study aims to explain that Cx43 and AKAP95 have involved in cell cycle regulation activity, however, more specific regulatory mechanisms need to be further studied

Key words: Cx43; AKAP95; Cell cycle; PKA

目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
第一章前言	1
1.1 细胞周期蛋白	1
1.1.1 细胞周期蛋白 D1	2
1.1.2 细胞周期蛋白 E	3
1.2 细胞周期依赖性激酶 CDKs	4
1.3 细胞间隙连接蛋白	5
1.3.1 细胞间隙连接蛋白 43	6
1.3.3 Cx43 的磷酸化	7
1.3.4 Cx43 相连蛋白	8
1.3.5 Cx43 与肿瘤	9
1.4 PKA 锚定蛋白	10
1.4.1 PKA 锚定蛋白 95	10
1.5 本论文的目的、研究内容和意义	11
第二章实验材料与方法	13
2.1 实验材料	13
2.1.1 细胞系与质粒	13
2.1.2 主要试剂及耗材	13
2.1.3 主要仪器及设备	15
2.1.4 主要溶液的配置	16
2.2 实验方法	19
2.2.1 细胞复苏	19
2.2.2 细胞培养	19
2.2.3 细胞蛋白提取	19
2.2.4 细胞蛋白浓度测定	20

2.2.5 质粒转化及扩增.....	20
2.2.6 质粒中提.....	21
2.2.7 质粒瞬时转染细胞.....	21
2.2.8 western blot 实验.....	22
2.2.9 细胞免疫荧光.....	22
2.2.10 免疫共沉淀.....	23
第三章实验结果	24
3.1 磷酸化对 Cx43 与 AKAP95 结合作用的影响	24
3.2 Cx43 对 CyclinD1、CyclinE1、CDK2、CDK4 表达水平的影响.....	24
3.3 AKAP95 对 CyclinD1、CyclinE1、CDK2、CDK4 表达水平的影响.....	26
3.4 Cx43 与 AKAP95 对 CyclinD1- (pThr286) 及 CDK1-(pThr14)磷酸化的影响.....	28
3.5 PKA 活性对 Cx43 及 AKAP95 表达水平的影响.....	29
3.6 PKA 活性对 CyclinD1 表达水平的影响	33
3.7 Cx43 对 CyclinE1 与 CDK2 在 A549 细胞中定位及共定位的影响	33
第四章讨论	37
4.1 碱性磷酸酶促进 Cx43 与 AKAP95 的结合作用	38
4.2 Cx43 及 AKAP95 影响 CyclinD1、CyclinE1、CDK2、CDK4 的表达.....	39
4.3 Cx43 影响 CyclinD1- (pThr286) 及 CDK1- (pThr14) 的磷酸化	39
4.4 PKA 活性影响 Cx43、AKAP95、CyclinD1 的表达.....	40
4.5 Cx43 影响 CyclinE1 在 A549 细胞中的定位.....	41
第五章结论	43
参考文献	44

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Cell cycle proteins	2
1.1.1 Cell cycle protein D1	3
1.1.2 Cell cycle protein E	4
1.2 Cyclin-dependent kinases CDKs	5
1.3 Connexins	6
1.3.1 Connexin 43.....	7
1.3.3 Phosphorylation of Cx43	8
1.3.4 Proteins connected with Cx43	9
1.3.5 Cx43 and cancer	10
1.4 PKA anchor proteins	10
1.4.1 PKA anchor protein 95	11
1.5 Purposes and contents of this project	13
Chapter 2 Materials and Methods	13
2.1 Materials	13
2.1.1 Cell line and plasmids	13
2.1.2 Reagents in need.....	15
2.1.3 Experiment equipments	16
2.1.4 Solutions preparation.....	19
2.2 Methods	19
2.2.1 Cell revive	19
2.2.2 Cell culture	19
2.2.3 Protein extraction.....	20
2.2.4 Detection of protein concentration	20

2.2.5 Plasmid transformation and amplification.....	20
2.2.6 Plasmid extraction	21
2.2.7 Plasmid transient transfection.....	21
2.2.8 western blot	22
2.2.9 Immunofluorescence	22
2.2.10 Immunofluorescence	23
Chapter 3 Results	24
3.1 Effect of the combination of Cx43 and AKAP95 induced by Phosphorylation	24
3.2 Effect of expression levels of CyclinD1、CyclinE1、CDK2、CDK4 induced by Cx43	24
3.3 Effect of expression levels of CyclinD1、CyclinE1、CDK2、CDK4 induced by AKAP95	26
3.4 Effect of the phosphorylation on CyclinD1-(pThr286) and CDK1-(p Thr14) induced by Cx43 and AKAP95.....	28
3.5 Effect of expression levels of Cx43 and AKAP95 induced by changing PKA activity.....	29
3.6 Effect of expression levels of CyclinD1 induced by PKA	33
3.7 Effect of the location and co-location of CyclinE1 and CDK2 in A549 induced by Cx43.....	33
Chapter 4 Discussion	37
4.1 Alkaline phosphatase promotes the combination of Cx43 and AKAP95 ..	38
4.2 Cx43 and AKAP95 affect the expression levels of CyclinD1、CyclinE1、CDK2、CDK4	39
4.3 Cx43 affects the phosphorylation of CyclinD1-(pThr286) and CDK1-(pThr14).....	39
4.4 PKA affects expression levels of Cx43、AKAP95、CyclinD1	40
4.5 Cx43 affects the location of CyclinE1 in A549	41
Chapter 5 Conclusion	43
Reference	44

缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
MAPK	Mitogen activated protein kinase	有丝分裂原激活蛋白激酶
CDK	Cyclin-dependent kinases	周期蛋白依赖性蛋白激酶
MPF	Mature promoting factor	成熟促进因子
GJIC	Gap junction intercellular communication	细胞间隙连接通讯
PKA	Protein kinase A	蛋白激酶 A
Cx43	Connexin 43	连接蛋白 43
VSMC	Vascular smooth muscle cells	血管平滑肌细胞
cAMP	Cyclic Adenosine monophosphate	环磷酸腺苷
AKAP95	A-kinase anchoring protein 95	蛋白激酶 A 锚定蛋白 95
IF	immunofluorescence	免疫荧光
Co-IP	Co-immunoprecipitation	免疫共沉淀
FastAP	Fast Alkaline Phosphatase	碱性磷酸酶
AP	Ammonium persulphat	过硫酸铵
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine	N, N, N', N'-四甲基乙二胺
Tris	Hydroxymethyl aminomethane	三羟基甲基氨基甲烷
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
TXRD	Texas Red	德克萨斯红荧光素
Glycine	Aminoacetic acid	甘氨酸
biNLS	bipartite nuclear localization signal	二分型核定位信号
PDGF	platelet-derived growyh factor	血小板生长因子

第一章 前言

肺癌是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤之一，近年来，肺癌发病及死亡率依然呈急剧上升的状态。在我国乃至全世界范围内发病率排名前列，堪称恶性肿瘤中的头号杀手^[1]。常规的肺癌治疗方法有手术、化疗及放疗，但这些治疗方法一般难以治愈肺癌，一般情况下，肺癌患者存活五年的概率很低^[2]。伴随分子生物学领域的不断发展，近年来不断有文献报道，肺癌是一类由于细胞生长和增殖紊乱为主要特征的疾病，肺癌的发生、发展主要呈现为细胞在增殖、分化和凋亡方面发生异常，其中细胞周期调控异常是细胞不断增殖继而出现异常细胞克隆最终导致癌变的重要原因，因此从细胞周期的角度研究肿瘤发生及发展原因已成为一个热门方向。

1.1 细胞周期蛋白

生命是一个不停繁衍的延续过程，因此需要保持更新、不断从头开始。细胞作为生物体基本结构功能单位，其各组成部份在发展变化的基础上还要不断复制形成新细胞，以取代衰老、死亡和创伤所损失的细胞，这是机体新陈代谢的表现，也是机体能够生长发育，生命得于延续的基础。细胞生命始于产生它的母细胞的分裂，止于它的子细胞的形成，或是细胞的自身凋亡。由细胞分裂生成的新细胞的生长开始到下一次细胞分裂形成子细胞所经历的周期过程为细胞周期。整个细胞周期分为细胞间期及分裂期，其中间期又细分为G1期、S期及G2期。整个细胞周期进程由细胞周期调控因子——细胞周期蛋白（Cyclins）及细胞周期蛋白依赖性激酶（CDKs）严密配合进行推动。细胞周期蛋白按字母顺序已发现有8大类，分别是CyclinA、B1、B2、C、D1、D2、D3和E，也有按照它们在细胞周期不同时间中发挥作用分成（G1-Cyclin、G1/S-Cyclin、S-Cyclin、M-Cyclin）。不过由于每类细胞周期蛋白不仅仅只在细胞周期某一阶段发挥调节作用，因此这类的分类方法一般不予采用。细胞由一个细胞周期阶段向另一阶段的推进关键的调节机制是不同的细胞周期蛋白与相应的细胞周期蛋白依赖性激酶形成复合物在适

当的时间激活和失活^[3, 4]。整个细胞周期处于一种动态平衡的状态，细胞周期推动过程中同时也存在一些细胞周期抑制因子，例如P21和P27蛋白，通过抑制Cyclins与CDKS的结合从而抑制细胞周期的转换。

不同的细胞周期蛋白分子在结构上存在一定的差异。Cyclin分子在结构上都具有一个高度保守序列被称之为细胞周期蛋白盒 (Cyclin box)序列(100~150 个氨基酸)，其功能是与相应的CDK结合形成复合物推动细胞周期进程。另外Cyclin还具有一个降解盒(destruction box) 结构，主要负责参与蛋白自身降解过程^[5]。在整个细胞周期过程中Cyclin的含量呈现规律性的表达趋势，但整个过程中表达相对恒定。与相应的CDK结合形成异源二聚体并激活CDK，激活的CDK则能磷酸化细胞内特异底物从而实现细胞周期不同阶段的转换。

1.1.1 细胞周期蛋白D1

细胞周期蛋白D家族目前发现有CyclinD1、CyclinD2、CyclinD3，而广泛被研究的对象是CyclinD1，研究表明CyclinD1与肿瘤的发生有着紧密的关联性。CyclinD1由基因CCND1(定位于11q13)编码生成，其羧基末端含有多种氨基酸残基序列，如脯氨酸(Pro)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asn)、丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)，细胞周期盒为51~141位残基序列，在其氮端具有LeuXCysXGlu序列，主要功能作用是结合调控抑癌基因蛋白-视网膜母细胞瘤蛋白pRb^[6]。当CyclinD1的268位的苏氨酸被糖原合成酶激酶3B (gsk glycogen synthase kinase)磷酸化^[7]或者通过Ras/Raf/MEK/MAPK信号途径均能诱导其泛素降解或被蛋白酶体所降解^[8]。现在普遍被认可的CyclinD1调控细胞周期原理是CyclinD1通过接受G蛋白ras、有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinase ,MAPK)等信号传导，开始表达于G1期，而后与相应细胞周期蛋白依赖性激酶CDK4及CDK6结合，并活化后者，使得pRb蛋白由低磷酸化状态转换为高磷酸化状态，与E2F转录因子解离，游离的E2F参与细胞周期中大部分相关基因的转录，由此推进了细胞周期由G1期朝S期跃进^[9]。细胞周期最常停滞于G1/S期，此处存在一个检测点(checkpoint)，CyclinD1表达异常是导致检测点缺陷的关键因素，遗传基因突变和染色体结构异常的细胞增殖失控常被发现在该检测点功能缺陷。有研究发现无论是正常的细胞还是已癌变的细胞，CyclinD1均担当着非常重要的角色，CyclinD1的表达水平增高最直接的影响是过度激活CDK4及CDK6的激酶活性，导致G1期

缩短，细胞增殖失控引发癌变。

细胞周期蛋白D1 (CyclinD1) 首次被人们发现是在甲状腺癌的研究中，甲状旁腺激素基因的调控序列与CyclinD1 基因5' 端发生融合，在染色位点上出现重排现象，导致CyclinD1过表达，使得CyclinD1的功能出现异常，并因此引起细胞周期G1/S期的转换异常，最终导致甲状腺癌的发生^[10]。在正常细胞中CyclinD1的表达达到峰值发生在G1期，被认为是细胞周期的启动因子，主要功能是促进细胞周期由G1期向S期推进，有研究者通过微注射的方法向细胞内注射CyclinD1的单克隆抗体，结果引起了细胞G1期停滞。Sicinski等^[11]发现在CyclinD1表达缺陷的小鼠与正常小鼠比较，视网膜细胞显著减少，这一现象归结于该型小鼠在胚胎发育期间增殖失败，说明CyclinD1在细胞增殖过程中发挥了关键的作用。另外CyclinD1也是所有细胞周期蛋白中唯一被认为的原癌基因^[12]，原癌基因被激活或者抑癌基因发生功能突变是肿瘤生成的一个重要机制之一。CyclinD1继在甲状腺癌中首次被发现有表达现象，之后陆续有研究者发现CyclinD1在多种恶性肿瘤中均有表达现象。Buckley MF等^[13]通过20种乳腺癌细胞系研究Cyclin A、B1、D1或E基因表达，发现其中有5种细胞系中显示CyclinD1过表达，而CyclinD2出现了相反的结果，与正常乳腺上皮细胞比较，在乳腺癌细胞中CyclinD2表达量更低。后又通过活组织切片检查，与正常乳腺组织比较乳腺肿瘤出现45% CyclinD1基因高表达现象。也有学者通过构建了含有CyclinD1反义核酸的表达载体，稳定转染于A549细胞中，结果显示CyclinD1反义核酸引起肺癌细胞的凋亡。Jiang W等^[14]也在胃癌及食道癌中发现CyclinD1有高表达现象。

1.1.2 细胞周期蛋白E

周期蛋白E在1991年首次被发现，其编码基因位于人类19q12-13，有4个外显子和3个内含子，编码相对分子量为50KD的蛋白，由395个氨基酸残基构成，属于核内蛋白^[15]。区别于CyclinD1，CyclinE1于G1晚期表达最多。CyclinE1的表达伴随细胞周期呈规律性的变化，在正常的成纤维细胞中，CyclinE1在G1期开始表达增多，G1晚期达到巅峰，之后由S期激酶结合蛋白 (Skp) 2-SCF介导的泛素化降解。所以在G1晚期CyclinE1是一个关键的调控因素，严格控制细胞周期由G1期迈入S期^[16, 17]。

CyclinE主要与激酶CDK2及CDK3结合，形成关键的激酶复合物^[18]，目前研

究较多的是CyclinE/CDK2形成的复合物，CyclinE与CDK2结合后，并将CDK2激酶活性激活，磷酸化一系列底物，如Rpb蛋白，改变Rpb蛋白磷酸化状态，释放出E2F转录因子，游离的E2F能与众多DNA合成相关因子结合如：二氢叶酸盐、c-Myc、DNA聚合酶等，保证细胞周期有序地进行^[19]。CyclinE的泛素化降解能够诱导CyclinE-CDK2失活，CyclinE与CDK2结合以后，其Ser384、Thr380、Ser372和Thr62位点能够被磷酸化，之后通过CDC34介导的蛋白水解途径降解^[20]。目前许多研究已经证明CyclinE为癌基因，其高表达引起G1期缩短，使细胞越过G1期直接达到S期，引起中心体倍增，细胞恶性增殖导致癌变。有研究指出在肺癌及胃癌中，肿瘤细胞侵袭能力、转移能力、恶化程度均与CyclinE蛋白表达水平成正相关^[21]。通过观察不同分化程度的骨肉瘤组织发现，低分化骨肉瘤组织相较于高分化骨肉瘤组织，CyclinE表达明显更多，伴随着骨肉瘤恶化程度加重，CyclinE加速细胞增殖。Ying Gao等^[22]在研究RNF146蛋白与非小细胞肺癌的关系中发现，RNF146在临床肺癌标本及细胞系中均出现高表达，其高表达也引起了CyclinE、CyclinD1的过表达现象。

1.2 细胞周期依赖性激酶CDKs

最早周期蛋白依赖性激酶是由Leland、Hartwell 等人在20世纪80年代通过遗传学的方法在啤酒酵母中发现了这一类参与细胞周期调控的基因，当时被称为细胞分裂周期基因(cell division cycle genes, cdc genes)，是一个庞大的家族。细胞周期蛋白依赖性激酶（CDKs）是细胞周期调控的重要大分子，其家族按照数字命名，目前发现的有CDK1-CDK9，属于丝氨酸/苏氨酸激酶。CDK的功能主要是与细胞周期蛋白结合，活化后磷酸化特异性底物，参与周期调控^[23]。其中目前研究最多的是CDK2、CDK4及CDK6。CDK的活性主要受Cyclins的调控，CDKs的活化需要与相应的Cyclins结合，因此被命名为细胞周期蛋白依赖性激酶。每类CDK中都存在与细胞周期蛋白结合的保守序列，称之为PSTAIRE区域。目前普遍被认为的结合顺序是：在细胞周期G1期，CyclinD1能与CDK4及CDK6结合，而CDK2主要与CyclinE结合，其生物学功能均是促进G1期向S期转换。S期早期发挥主要功能作用的是CDK2/CyclinA，而细胞另外一个关键检测点G2/M期则主要有CDK1与CyclinB形成的活性复合物调控^[24]。该复合物的形成与细胞进行有丝

分裂有着直接的关系，也因此被称为成熟促进因子（Mature Promoting Factor, MPF），在G2/M期MPF的活性达到高峰，促进细胞由G2期向M期转换，直到有丝分裂末期，MPF的自身磷酸化诱导CyclinB的快速泛素化降解。以此同时，细胞内也存在与之相反的细胞周期蛋白抑制因子（cyclin kinaseinhibitor,CKI），一类是激酶4 抑制因子(inhibitors o f kinase4,INK4) 家族，其结构上存在四个重复的锚定序列，能识别CDK4及CDK6，但却不能识别CDK2。另外一类是是CIP/ KIP家族，该类蛋白氮端存在CDK抑制性结构域，与CyclinE/CDK2及CyclinA/CDK2复合物结合，抑制CDK2的激酶活性。后续研究发现了CKI一个新的家族成员14-3-3R，主要功能作用是抑制CyclinB1/ CDK1 复合物活性，引起细胞周期不能顺利由G2期向M期推动^[25, 26]。

Cyclins的结合不是调控CDK活性的唯一途径，CDK的活性调控方式也需要通过磷酸化以及去磷酸化的修饰。CDK激活性蛋白激酶(CDK2activating kinase, CAK)能催化CDK2第160位苏氨酸磷酸化，并因此将CDK2活化。CAK激酶主要由CDK7、CyclinH 和Mat1 三部分构成。Correze 等^[27]发现在FRTL25 鼠胸腺细胞系中使用p38 MAPK的抑制剂SB202474，抑制了CDK2第160位苏氨酸的磷酸化，并最终导致CDK2失活，其中参与的信号通路是Raf /MEK/ERK信号途径。另外结合了细胞周期蛋白的CDK的活化还依赖于第14位的苏氨酸及15位的酪氨酸的去磷酸化，参与这一过程的激酶主要是CDC25A磷酸酶^[28]。而细胞周期检测点激酶(check-point kinase, Chk)又控制着CDC25A的活性，在外界伤害下，如放射线和紫外线损伤时，机体内的Chk被磷酸化激活后磷酸化CDC25A第123位的丝氨酸，加速其泛素化降解，也因此使得Cyclin-CDK复合物失活，整个过程处于正反反馈交叉，从而保证机体细胞周期始终处于动态平衡中。调控真核细胞进入到细胞分裂M期的CDK1，其活化过程除了与相应的细胞周期蛋白结合以及第161位的苏氨酸的磷酸化以外^[29]，最关键的活化调控机制在于其第14位的苏氨酸以及第15位的酪氨酸的去磷酸化^[30]，CDK1第14位的苏氨酸以及第15位的酪氨酸发生磷酸化会抑制Wee1以及Myt1对CDK1的激活^[31, 32]。

1.3 细胞间隙连接蛋白

细胞与细胞之间的信息交流可通过细胞间隙连接来实现，被称之为细胞间隙

连接通讯 (gap junction intercellular communication, GJIC), 它能允许小于1-2KD的小分子物质通过, 如: 第二信使物质 (Ca^{2+} 、cAMP、cGMP等)、金属小离子或者其他细胞内的小分子代谢产物, 但分子量较大的分子, 如蛋白质、核酸类物质一般是不能通过间隙连接。细胞可通过间隙连接发生电耦合, 来调节细胞内 Ca^{2+} 、cAMP、ATP、 NAD^{+} 、1, 4, 5-三磷酸肌醇等物质的水平。该功能在维持机体稳定及平衡方面发挥重要的作用^[33, 34]。间隙连接现象是在1966年首次被发现, Loewenstein等人通过培养成纤维细胞而发现了细胞间这一特殊的功能^[35]。形成细胞间隙连接的基本单元是缝隙连接蛋白, 它是一种形似哑铃状的跨膜蛋白, 每六个这种类似的跨膜蛋白排列构成一个半通道 (hemichannels), 也称为连接子 (connexons), 两个配对的连接子分布在相邻细胞膜上, 每个连接子中央存在一个亲水性孔道, 通道宽度约3nm~25nm左右, 亲水性孔道对接后则形成了一个完整的间隙连接通道^[34]。间隙连接又分为同型间隙连接 (homotypic junction) 和异型间隙连接 (heterotypic junction), 同型间隙连接由同聚体连接子构成, 异源聚体则形成异型间隙连接。在细胞内细胞间隙连接通道的开通及关闭被严格控制, 胞浆与胞外的物质流通若不受限制将会导致细胞死亡, MAPK和蛋白激酶C (protein kinase C, PKC) 均能通过磷酸化特异底物来调控间隙连接通道的开合^[36]。

1.3.1 细胞间隙连接蛋白43

目前已经被人们发现的连接蛋白有21种, 分别用数字命名, 其中对于Cx43的研究最为广泛深入^[37]。Cx蛋白在机体内各个系统均有分布, 如心脏、中枢神经系统, 近年来的研究中也发现在肺组织中有多种Cx类蛋白, Cx26、Cx32、Cx43在肺泡上皮细胞有较多表达, 而在内皮细胞则主要存在Cx37、Cx40、Cx43, 缝隙连接是肺组织上皮细胞的主要连接方式, 许多急性或者慢性的肺脏病中都发现了Cx蛋白^[38-40]。在正常细胞中, 细胞间隙连接通讯功能能够发挥平衡细胞增殖速度, 防止细胞生长速度过快, 在肿瘤细胞也是如此, 很多有关肿瘤研究中均发现, Cx蛋白的表达呈现下降的趋势, 降低甚至丧失了细胞间隙连接通讯功能。

Cx是具有高度保守序氨基酸序列的蛋白家族, 每一种蛋白由一种基因编码生成^[41]。Cx43蛋白基因含有2768个碱基对 (bp) 以及3条互补脱氧核糖核酸 (cDNA), 其cDNA具有21146 bp的开放阅读框, 是一个由387个氨基酸残基构成分子量为43KD的多肽分子^[42]。Cx43蛋白结构与其他Cx蛋白具有高度同源性, 含

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫