

·成果简介·

细胞间隙连接半通道的生理学特性

刘泰榘

(北京大学生命科学学院生物膜及膜工程国家重点实验室,北京 100871)

[关键词] 间隙连接,细胞间通讯,半通道,膜片钳制技术,染料外逸

细胞间通信是一个在进化上很古老的功能,而间隙连接在形态上是一个古老的结构。然而它并没有在进化过程中消失,而是随着进化不断发展。对于它的研究可追溯到 50—60 年代^[1,2]到目前,它已经是一个重要的研究领域,受到广泛地重视,每年有数百篇论文发表,涉及生命科学各个领域。其重要性可想而知。

1 细胞间隙连接的分子结构

细胞的间隙连接作为细胞间通信的结构基础已经有了广泛的研究。该连接是由位于相邻细胞膜上的一对六聚体(hexamer)互相铆接(docking)而成,并形成细胞间连接细胞质的轴向通道。每个六聚体,或间隙连接半通道,或连接子(connexon),含有 6 个叫做连接蛋白(connexin, Cx)的亚单位。由半通道构成的亲水性通道,提供小于分子量为 1 000 Da 的分子一个直接而非特异性的通路^[3]。通过该通道的分子运动是由弥散所驱动并受分子的大小所限制。

细胞的间隙连接是动物界进化过程中很古老的结构,除血细胞、骨骼肌纤维及其神经纤维支配以外,它存在于几乎所有类型的细胞。它们的生理学意义主要有:(1)在可兴奋细胞中传播电信号,例如在心肌细胞间兴奋的传播就是靠间隙连接进行的;(2)缓冲非可兴奋细胞的代谢产物的浓度,或具有调节作用的分子浓度,例如,在眼的晶体细胞间,只有通过间隙连接才能把营养物和代谢产物输进或排除;(3)以及在胚胎发育及生长的控制中起重要作用,例如,在胚胎细胞分化时,开始分化的细胞与尚未分化的细胞之间,出现脱偶联,即细胞间通讯中断,从而保证细胞分化的进行,等等。尽管如此,其作用仍有待于进一步的研究。

连接蛋白的分子结构已被广泛研究并在 80 年代中期已确定出 16 种连接蛋白的序列(Cx26, Cx30, Cx30.3M, Cx31.1R, Cx32, Cx33, Cx37, Cx38, Cx40, Cx42, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50 及 Cx56)^[4]。业已确定所有连接蛋白均有 4 个跨膜片段,而 C-端及 N-端均在膜的细胞质侧(图 1)。

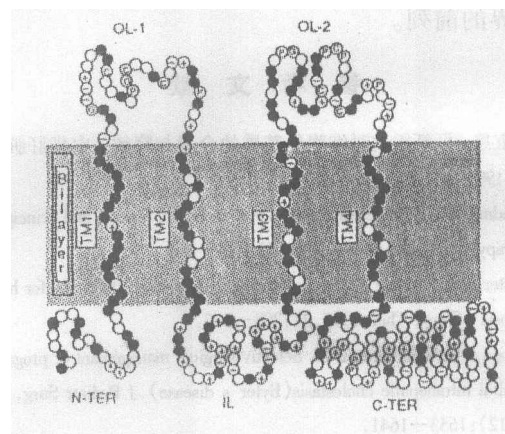


图 1 连接蛋白的拓扑图(此处所示为大鼠肝细胞 Cx32)

该蛋白的各跨膜区及两个细胞外环,在各个连接蛋白中均高度相似,而其余的 2 个区域,即内环及 C-端有明显变异。其中 C-端在各个连接蛋白中均极不相同,一般认为在调节通道的门控及间隙连接的组装起控制作用的磷酸化的位点就存在于 C-端。

2 间隙连接生理学特性的研究方法

研究间隙连接的功能特性,主要有 2 种方法:化学偶联及电偶联。用中等大小分子量的荧光染料(300—600 Da)注入一个细胞而观察该染料向相邻细胞的传播情况,并进行定量计算即为化学偶联法^[5];而用电学手段,特别在近年使用膜片钳制技术^[6]观察一对细胞的间隙连接的电导与电流,则为

本文于 1999 年 7 月 5 日收到。

电学偶联方法。使用这些方法,每年都有不少论文发表,而间隙连接在化学及电学偶联的基本特性已经比较明确。

在间隙连接的研究进展中,近年来提出一个新问题:在单个细胞的细胞膜上,其半通道在一定条件下,是否也有开发功能,以及如何阐明该功能。

3 间隙连接半通道的研究进展

由于半通道是在细胞膜内形成,而连接蛋白亦可在非连接部位的膜上测出,因此有理由推测,这种由连接蛋白形成的半通道保持着关闭状态,以避免细胞质与其周围环境进行分子交换,否则将引起细胞的损伤。实际上,在正常情况下,细胞膜上的半通道是保持关闭的,而极不容易开放。细胞外的染料,例如 Lucifer Yellow,就不能弥散进入细胞^[7];同时注入到细胞内的染料也不能自由外逸^[8]。然而,在特殊条件下,半通道可以被激活,导致分子通过该通道进出细胞。

首先,在鲶鱼(catfish)视网膜的单个水平细胞上有人报道了半通道的活动^[9]。在全细胞钳制条件下,降低细胞外的 Ca^{2+} 浓度观察了该细胞的膜电流。该电流呈电压与时间的依赖性。其最大电流发生在 $[Ca^{2+}]_o$ 低于 $10\mu M$ 。当 $[Ca^{2+}]_o$ 达到 1.0 mM 或更高时,该电流降至最大电流的 4% 以下。该电流可由多巴胺所抑制。当向细胞内导入 cAMP-依赖性蛋白激酶抑制剂时,多巴胺的作用可被消除。作为间隙连接活动的强抑制因素的细胞内酸化,也抑制该电流。Lucifer Yellow 在低 $[Ca^{2+}]_o$ 时可进入单个水平细胞,而这一活动可由多巴胺所阻断。所有这些结果表明,半通道,即间隙连接的一半,起关键的作用。

另一组工作是在电鳗视网膜水平细胞上进行的。当所有离子流均受到阻断后,长时间的去极化可出现一种外向电流^[10]。这种所谓的 Q-电流可分别由 25 mM 乙酸盐, 4 mM 氯化钴, 2 mM 1-辛烷,以及饱和 halothane 所强烈抑制。降低细胞外 Ca^{2+} 浓度,从 1 mM 到 0.4 mM , Q-电流的幅度明显增大。此外,较小分子量的 Lucifer Yellow,在 Q-电流激活时,可从细胞外进入细胞内,而大分子量的 dextran-fluorescein(3 KD)则不能通过细胞膜。这一结果显示该电流是由间隙连接半通道开放所致。

大鼠 Cx46 在爪蟾卵上的表达,显示出大的时间-及电压-依赖性电流,而在对照的卵上则无此现象^[11,12,13]。除去细胞外 Ca^{2+} 导致由 Cx46-诱发电流

幅度明显增大。增高 $[Ca^{2+}]_o$ 导致相反效果。鸡 Cx56 的表达,在去极化时也出现电压-依赖性电流,而在 $[Ca^{2+}]_o$ 降低时该电流增大。Cx56-诱发的电流与该卵细胞对所形成的间隙连接特性相符合^[14]。此外,爪蟾卵内源性 Cx38 也显示半通道活动,这就支持了由 Cx46 及 Cx56 所表达的半通道活动,并非由于外来连接蛋白的过分表达的伪差所致^[14]。

在大鼠巨嗜细胞上的观察,显示出在细胞膜上有另一种的非离子选择性,而具有分子大小限制性的膜通道,其特点与间隙连接通道相似^[15]。与上述研究不同的是,它开放是由细胞外 ATP 所激活。其他核苷酸无效,而高浓度的细胞外离子,如 Ca^{2+} , 或 Mg^{2+} 能抑制染料的摄取^[15,16,17]。

Li 等人^[7]较系统地观察了某些细胞株当细胞外 Ca^{2+} 降低时,荧光染料从细胞外进入细胞的情况。在 Novikoff 细胞上显示染料的摄取与该染料的分子大小有关,而庚醇及辛醇能降低这种摄取的 50%。在 HeLa 细胞上,根据报道,用 Northern 分析检测不到 Cx26, Cx30.3, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, 及 Cx45^[18]。在细胞外低 Ca^{2+} 条件下 HeLa 细胞只能通过尚未查明的连接蛋白摄取少量的染料^[18]。但在 Cx43-转染的 HeLa 细胞上,低 Ca^{2+} 则引起明显染料摄取^[7]。

正常大鼠肾细胞(NRK),其细胞膜上的 Cx-43 含量高,Novikoff 细胞 7 倍,当用 EGTA 处理时,出现高水平的染料摄取。与此相反,MDAMB231 细胞,一种人类乳腺肿瘤细胞株用 Northern 分析检测不到 Cx31.1, Cx32, Cx40 及 Cx43 则在对照及 EGTA 处理下,只有少量染料摄取。所有这些结果表明,在单个细胞上经 EGTA 处理后,染料的摄取是与细胞膜上的 Cx,即半通道密切相关^[7]。

在另一系列用离子电泳法向细胞内注入染料的研究中,Liu 等观察了在 EGTA 处理下染料外逸的情况。早在 1982 年^[19]以及 1987 年^[5]就建立了在细胞对之间染料转运的定量录像观察。用同样方法,在细胞外液中有 EGTA 存在条件下,研究了已注入染料的 Novikoff 细胞其染料外逸的情况^[8]。在对照条件下, Lucifer Yellow 负荷的 Novikoff 细胞无染料外逸。说明此时细胞膜上单通道不开放。在 EGTA 处理后,在 36 例中有 21 例出现染料外逸。这与上述染料摄取实验结果一致。

在反义 Novikoff 细胞上,细胞间染料传播明显受阻^[20]。在该细胞上于低 Ca^{2+} 条件下,与对照的正常细胞相比,其染料外逸速度减低。这进一步提供

证据,表明染料的外逸是通过间隙连接的半通道。

最近有报道表明,一种致肿瘤物质,12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, (TPA),能抑制多种细胞间隙连接的功能^[21]。Lampe^[22]报道了在用 TPA 处理后,60 min 内在再聚合的细胞对上间隙连接的组装完全被抑制,与此同时,染料转运也完全停止。在分离成单个的 Novikoff 细胞上,Liu 等^[23]证实了 TPA 对再聚合的细胞对上染料转运的抑制作用,并发现在经分离的单个细胞上,由 EGTA 引起的染料外逸也受到 TPA 的抑制。在对照实验中,单个的分离 Novikoff 细胞无染料外逸,而在用 EGTA 处理后几乎所有细胞均出现染料外逸(91 例中有 89 例)。当在 TPA 与 EGTA 共同处理下分离的细胞无外逸例增加,特别是在经 60 min 及 90 min 处理组。这进一步证明,染料通过半通道的外逸与染料通过间隙连接的转运一样,受到 TPA 的抑制。

4 间隙连接半通道的研究意义

由于间隙连接是以一对细胞为基础进行活动的,因此,无论用点偶联或化学偶联的方法,都是以一对以上的细胞为对象进行研究的。而这也正是它的正常功能。然而间隙连接是由 2 个半通道所构成,半通道的功能特性应当是间隙连接的活动的基。当然在形成过程中以及间隙连接形成后其功能特点会与半通道有所不同,但它们之间必然有其共同之处^[14]。细胞间通信虽然已被证明具有广泛的生理学意义,对间隙连接的功能也有不少的研究,然而,对其功能的最终解决,还要依赖于对半通道这一结构基础的功能理解。

同时,对半通道的研究,能大大简化研究的步骤,这就有利于对大量的不同 Cx 所构成的半通道进行观察,以及比较。由此,可以进一步深入揭示由不同 Cx 构成的间隙连接在功能上的不同。可以说,这是一个新领域,新方向,有其光明的发展前景。

参 考 文 献

- [1] Bennett M V, Goodenough D A. Gap Junctions, electrotonic coupling, and intercellular Communication. *Neurosci. Res. Prog. Bull.*, 1978, **16**(3).
- [2] Loewenstein W R. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.*, 1981, **61**:829—973.
- [3] Schwarzmann H G, Weigandt S, Rosa A et al. Diameter of the cell-to-cell junctional membrane channels as probed with neutral molecules. *Science*, 1981, **231**:551—553.
- [4] Peracchia C, Lazrak A, Peracchia L. Molecular models of channel interaction and gating in gap junctions. In: Peracchia C, ed. *Handbook of Membrane Channels: Molecular and Cellular Physiology*. New York: Academic Press, 1994. 361—378.
- [5] Bieganski R M. Permeance of Novikoff Hepatoma Gap junctions: Quantitative Video Analysis of Dye Transfer. *J. Membrane Biol.*, 1987, **96**:225—233.
- [6] Veenstra V, DeHaan R L. Measurements of single channel currents from cardiac muscle. *Science*, 1986, **233**:972—974.
- [7] Li H, Liu T F, Lazrak A et al. Properties and regulation of gap junction hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J. Cell Biol.*, 1996, **134**:1019—1030.
- [8] Liu T F, Li H, Atkinson M M et al. Intracellular Lucifer Yellow leakage from Novikoff cells in the presence of ATP or low extracellular Ca: evidence for hemi-gap junction channels. *Meth Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 1995, **17**:23—28.
- [9] DeVries S H, Schwartz E A. Hemi-gap-junction channels in solitary cells of the catfish retina. *J. Physiol.*, 1992, **445**:201—130.
- [10] Malchow R P, Qian H, Rupps H. Evidence for hemi-gap junctional channels in isolated horizontal cells of the skate retina. *J. Neurosci Res.*, 1993, **35**:237—245.
- [11] Paul D L, Ebihara L J, Takemoto K I et al. Connexin 46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunction plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.*, 1991, **115**:1077—1089.
- [12] Ebihara L, Steiner E. Properties of a nonjunctional current expressed from a rat connexin46 cDNA in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.*, 1993, **102**:59—74.
- [13] Trexler E B, Bennett M V L, Bargiello T A et al. Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**:5836—5841.
- [14] Ebihara L, Berthoud V M, Beyer E C. Distinct behavior of connexin56 and connexin46 gap junctional channels can be predicted from the behavior of their hemi-gap junctional channels. *Biophys. J.*, 1995, **68**:1—8.
- [15] Steinberg T H, Newman A S, Swanson J A et al. ATP-permeabilized the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J. Biochem.*, 1987, **262**:8884—8888.
- [16] Buisman H P, Steinberg T H, Fischberg J et al. Extracellular ATP induces a large non-selective conductance in macrophage plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**:7988—7992.
- [17] Beyer E C, Steinberg T H. Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**:2971—2974.
- [18] Elfgang C R E, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A et al. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.*, 1995, **129**:805—827.
- [19] Lau T F, Kam E Y, Sheridan J D. Dye transfer through permeable junction between cultured mammalian cells: quantitative video analysis. *J. Cell Biol.*, 1982, **95**:106.
- [20] Lau T F, Li H-Y, Atkinson M M et al. Comparison of Lucifer Yellow leakage and cell-to-cell transfer following intracellular injection in normal and antisense Novikoff cells under treatment with low extracellular

- Ca²⁺. *Meth. Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 1996, **18**:493—397.
- [21] Murray A W, Gainer S C. Regulation of gap junctional communication by protein kinases. In: Speralakis N, Cole WC, eds. *Cell interactions and gap junctions*. Boca Raton: CRC Press Inc., 1989, 97—106.
- [22] Lamp2 P D. Analyzing phorbol ester effects on gap junction communication: A dramatic inhibition of assembly. *J. Cell Biol.*, 1994, **127**: 1895—1905.
- [23] Liu T F, Paulson A F, Li H Y et al. Inhibitory effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on dye leakage from single Novokoff cells and on dye transfer between reaggregated cell pairs. *Meth. Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 1997, **19**:573—577.

PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF HEMI-CHANNEL OF GAP JUNCTION

Liu Taifeng

(National Laboratory of Biomembrane and Biotechnology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Key words gap junction, intercellular communication, hemi-channel, physiological properties

·资料·信息·

国家自然科学基金重大项目“洪水特性与减灾方法研究”项目指南

由于致洪暴雨较大的随机性和地表调蓄能力明显的不均匀性,加上大规模人类活动的影响,洪水已连续多年对我国造成巨大灾害。大量的降雨和有限的蓄泄能力是流域洪水产生的直观原因,新的江湖环境变化给洪水预报和调控带来了较大影响。面对设计水位以下的洪水,堤防是我国防洪减灾的基本设施,但国内现有的堤防隐患探测理论和方法远不能满足实际工作的需要。对于超过设计水位的洪水,洪灾风险管理理论和流域防洪高度决策支持系统是国际上防洪减灾较先进的手段,在我国还处于初步研究和开发阶段。1998年长江流域大洪水暴露出我国防洪减灾科技水平的落后现状,迫切需要在防洪减灾方面开展基础和应用基础研究。

1 科学目标

以长江流域为主要依托背景,从人与自然协调相处出发,从更深层次和更广的视野上认识江湖洪水规律和“小水大灾”机理,加强对洪水行为的预测和调控能力,提出防洪减灾对策新的科学依据;提高堤防隐患探测的理论水平和实用性能,建立典型堤防安全评价的理论和方法;突破传统防洪观念,加强和发展洪灾风险管理理论,建立防洪减灾保障体系新的理论基础。

2 研究内容

(1)洪灾成因和防洪减灾对策研究

森林植被变化和水土流失对洪水的影响和对策;江湖关系演变及其对洪水的影响和对策;典型河段洪水位偏高的成因和对策。

(2)洪水预报和防洪调度方法研究

提高洪水预见期和预报精度的新方法;复杂情况下洪水过程的数值模拟;水库群和分蓄洪工程联合防洪调度的理论和方法。

(3)堤防破坏机理和安全评价方法研究

高洪水水位下堤防破坏机理和规律;堤防隐患快速无损探测与评价方法;典型堤防工程信息集成和安全性评价,

(4)洪灾风险管理理论研究

洪涝灾害损失快速评估的指标体系和方法;洪泛区和分蓄洪区的洪涝灾害风险分析和管理体系;防洪减灾体系综合风险评估理论。

研究期限:4年

拟资助研究经费:530万元(其中:国家自然科学基金委员会资助350万元,长江水利委员会资助180万元)。

本领域由工程与材料科学部和管理科学部联合提出,由工程与材料科学部受理申请。

注:受理申请时间为1999年12月20—30日。申请注意事项详见《国家自然科学基金委员会关于发布“九五”第三批国家自然科学基金重大项目申请指南的通告》。

(工程与材料科学部 李万红 供稿)