

文章编号: 1001-098X(2005)06-0269-03

·放射医学·

缝隙连接蛋白 43 基因及其辐射诱导表达反应

龙贤辉¹ 周平坤²

摘要 由缝隙连接蛋白构成的膜通道是相邻细胞间细胞通讯方式之一。缝隙连接蛋白是一超基因家族, 其中缝隙连接蛋白 43 分布最为广泛, 它在调控细胞增殖及分化、维持细胞内环境稳态、维护机体正常发育、血细胞形成等方面有着重要的生理功能。最新研究表明, 低剂量电离辐射能诱导该基因高表达, 由此, 从分子水平揭示了细胞间通讯在低剂量辐射反应中的作用, 而且缝隙连接蛋白 43 还有可能被发展成新的辐射损伤生物分子标记物。

关键词 缝隙连接蛋白 43; 细胞间通讯; 低剂量电离辐射; 基因表达

中图分类号 R979.1, Q691.9

文献标识码 A

Connexin43 gene and its irradiation-induced expression

LONG Xian-hui, ZHOU Ping-kun

(1. School of Public Health, Nanhua University, Hengyang, Hunan Province 421001, China; 2. Department of Radiation Toxicology and Oncology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Gap junctions, composed of connexin protein subunits, provide the important channel for the intercellular communication. Connexin43, the most popular component of the connexin protein family, is widely expressed in multiple tissues and cell lines and plays an important role in cell proliferation, differentiation and tissue homeostasis. Recently it was reported that the expression of connexin43 gene is remarkably up-regulated by low dose ionizing radiation, the available data suggest connexin43 gene to be a potential sensitive bio-marker in radiation damage.

Key Words connexin43; intercellular communication; low dose ionizing radiation; gene expression

缝隙连接介导的细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)是细胞间通讯方式之一。缝隙连接(gap junction)是相邻细胞间由两个半膜通道组合而成, 每个半膜通道由 6 个缝隙连接蛋白(connexin, Cx)组成。该通道允许相对分子质量 $<1 \times 10^3$ 的小分子自由通过, 如水分子、 Na^+ 、氨基酸、第二信使(Ca^{2+} 、cAMP、cGMP、肌醇三磷酸)等^[1,2]。细胞间的这种信息交流使得 GJIC 在调控细胞增殖与分化、维护机体正常发育等方面发挥重要的作用。

1 Cx 基因家族简介

Cx 基因是一超基因家族, 目前已知人源性 Cx 基因有 21 个成员, 并已克隆成功, 分别是 Cx23、Cx25、Cx26、Cx30、Cx30.2、Cx30.3、Cx31、Cx31.1、Cx31.9、Cx32、Cx36、Cx37、Cx40、

Cx40.1、Cx43、Cx45、Cx46、Cx47、Cx50、Cx59 和 Cx62 基因, 各自编码不同相对分子质量的 Cx 蛋白。其中, Cx43 蛋白在机体大多数组织和细胞中均有表达, Cx43 蛋白分布最为广泛^[3], 对其功能及作用机制研究较多。

2 Cx43 基因和蛋白的结构

人源 Cx43 基因位于 6 号染色体 6q²¹⁻²³² 上, 全长 6.176Mbp, 包括两个外显子及转录调控区域, 编码蛋白含有 382 个氨基酸, 分子质量为 43 036u。缝隙连接蛋白为跨膜蛋白, 膜外形成两个环, 具有 4 个跨膜的 α 螺旋结构以及膜内氨基端的胞内环和羧基末端结构区, 与其他 Cx 蛋白相比, Cx43 的羧基末端链比较长, 包含蛋白激酶作用区。

3 Cx43 基因的功能

3.1 Cx43 基因作为抑癌基因, 调控细胞增殖与分化, 维持组织细胞内环境稳态

作者单位: 1. 421002 衡阳, 南华大学公共卫生学院卫生毒理学教研室 2. 100850 北京, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所

Cx43 基因的表达产物 Cx43 膜通道蛋白在保持 GJIC 功能方面起着决定性作用,而正常 GJIC 功能状态在调控细胞增殖、维持细胞内环境稳态等方面有着重要影响。构成 GJIC 的 Cx43 膜通道蛋白的活性丧失与人及哺乳动物各种肿瘤的发生、发展有关。Cesen-Cummings K 等^[4]研究发现,在人及小鼠肺癌细胞中,Cx43 基因表达下降。Huang RP 等^[5]通过转染 Cx43 基因到人胶质瘤细胞中,发现该肿瘤细胞生长受到抑制,通过对其作用机理的进一步研究表明,Cx43 基因的表达能明显下调人胶质瘤细胞中单核细胞趋化因子-1 的表达,从而抑制了该肿瘤细胞的生长^[6]。Fernstrom M 等^[7]把 Cx43 基因导入人卵巢癌 skov-3 细胞,筛出稳定表达细胞克隆,与未转染 Cx43 基因的卵巢癌细胞相比,Cx43 基因表达水平显著上调后恢复 GJIC 通路,使癌细胞生长受到抑制。在 HeLa 细胞中,Cx43 基因无论在转录水平还是翻译水平均无表达,King TJ 等^[8]通过转染和表达 Cx43 基因,使 HeLa 细胞的增殖能力明显抑制。从临床非小细胞肺癌患者中收集标本,研究表明,在癌组织中 Cx43 基因表达沉默,癌旁肺组织中 Cx43 基因表达水平与癌组织的间距有关,离癌组织越近,Cx43 基因表达越低^[9]。由此可知,Cx43 基因表达下调与肺组织细胞恶性化之间有密切关系。

一些外界环境刺激因子,如大剂量电离辐射或紫外线等作用机体后,Cx43 基因的表达水平与辐照存在量效关系。 γ 射线 6Gy 辐照后,Cx43 基因表达显著下降,与组织受损害有关,因此提示 Cx43 基因表达抑制可能与放射病的发生有关^[10]。Provort N 等^[11]发现,人正常皮肤经 A 波段紫外线照射后,Cx43 基因表达下调,这可能与皮肤角质化细胞的老化及癌变有关。

3.2 维持机体的正常发育

在成骨细胞中,Cx43 是主要的缝隙连接蛋白。Lecanda F 等^[12]通过建立 Cx43 基因剔除小鼠模型,证实 Cx43 基因的缺失延迟了骨骼钙化,新生小鼠出现骨骼畸形,发育不全。Cx43 的表达与正常血细胞的形成也有着密切关系,研究发现,在 Cx43 杂合子及 Cx43 基因剔除胚胎小鼠中,T、B 淋巴细胞生成障碍,而正常纯合子的血细胞生成良好^[13]。Oviedo-Orta E 等^[14]研究表明,人外周血及舍扁桃体中 Cx43 蛋白的表达对 T、B 淋巴细胞的免疫功能

起重要作用。还有研究发现,处于妊娠阶段的正常女性与未怀孕的正常女性相比,子宫内膜细胞 Cx43 蛋白明显要高^[15],该研究结果揭示 Cx43 的表达水平对胚胎的正常发育有着一定的作用。

4 Cx43 基因是一辐射敏感基因

近年来,低剂量电离辐射效应及作用机制越来越受到关注,特别是就参与低剂量辐射反应调控相关基因的分离鉴定和功能研究有着重要意义。

Azzam EI 等^[16]报道,用不同低剂量的 α 粒子(0, 3, 6, 12, 24cGy)照射正常人二倍体成纤维细胞,照射后培养 6h, Northern Blot 分析 Cx43 mRNA 的表达变化,发现低剂量 α 粒子照射显著增高了该基因的表达;同样是该细胞系,照射剂量分别为 0, 1, 3, 10cGy,照射后培养 3h,提取细胞总蛋白,Western Blot 分析,Cx43 蛋白含量亦明显增高。以上结果显示低剂量的 α 粒子照射诱导 Cx43 基因的高表达,表明 Cx43 基因是一低剂量辐射敏感基因。经 γ 射线、加热等其他环境损害因子处理也能在一定程度上诱导 Cx43 的表达^[16]。Glover D 等^[17]研究表明,正常人纤维上皮细胞经低剂量 γ 射线(0.5Gy)照射后,Cx43 基因表达水平亦显著上调。由于 Cx43 蛋白是缝隙连接重要结构蛋白,上述结果从基因和蛋白水平上揭示了 GJIC 在低剂量辐射反应中的重要性。

5 Cx43 基因表达调控机制

5.1 转录水平上的调控

通过分析 Cx43 基因上游的转录调控元件,发现许多转录因子和启动子反应元件与 Cx43 基因表达有关。在人源、大鼠、小鼠的 Cx43 基因启动子中,存在多个转录因子结合位点^[17-19]。我们实验室采用活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cell, NFAT)调控报告基因可激活分泌性碱性磷酸酶(secreted alkaline phosphatase, SEAP)表达系统,检测发现 0.5Gy γ 射线照射细胞后,NFAT 的转录活性提高了 45 倍多,表明 Cx43 基因上游启动子驱动调控元件的存在,对该基因的转录诱导表达反应可能起决定性的作用。

5.2 翻译后 Cx43 蛋白的修饰

Cx43 蛋白磷酸化水平受到多途径信号转导通路影响。多种激酶和 Ca^{2+} 作用于膜内 Cx43 蛋白结

构域,使其磷酸化或高磷酸化,导致 GJIC 功能紊乱^[20,21]。GJIC 抑制剂内皮生长因子通过有丝分裂原活化蛋白激酶信号通路,使 Cx43 蛋白高磷酸化,佛波脂类 四癸酰佛波醇乙酸则通过蛋白激酶 C 信号转导途径使 Cx43 蛋白磷酸化,从而抑制了细胞间的间隙通讯,引起细胞内环境稳态失调,细胞增殖失控^[22,23]。

总之, Cx43 基因表达调控的更详细机制还需进一步研究。在转录水平及翻译水平上的调控存在反馈调节,并且 Cx43 基因表达水平的高低并不只是单一因素的影响,多种方式同时参与影响其表达。

综上所述, Cx43 在调控细胞增殖与分化,维持内环境稳态等方面有着重要的生理功能,其作用机制有待进一步探讨。Cx43 基因作为抑癌基因,在癌症的基因治疗方面有着重要意义。Cx43 基因是新发现的辐射敏感基因,电离辐射对其表达水平影响的量效关系已有初步认识,但更详细的调控机制及其诱导表达规律和生物学意义还需更进一步的确定和深入研究。由于 Cx43 基因的辐射诱导表达剂量很低,而且在外周血中能检测到,故 Cx43 基因有可能作为新的分子靶标用于低剂量辐照人员的受照剂量评估、危险度评价以及受照人员的生物学效应评价等。因此, Cx43 基因有可能开发成为辐射损伤新的生物分子标记物。

参 考 文 献

- 1 Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel[J]. Cell, 1996, 84(3): 381-388.
- 2 Alexander DB, Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels[J]. Curr Med Chem, 2003, 10(19): 2045-2058.
- 3 Willecke K, Eiberger J, Degen J, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome[J]. Biol chem, 2002, 383(5): 725-737.
- 4 Cesen-Cummings K, Fernstym MJ, Malkinson AM, et al. Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and Connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells [J]. Carcinogenesis, 1998, 19(1): 61-67.
- 5 Huang RP, Fan Y, Hossain MZ, et al. Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin43[J]. Cancer Res, 1998, 58(22): 5089-5096.
- 6 Ruochun H, Ying L, Cheng C, et al. Connexin43 suppresses human glioblastoma cell growth by down-regulation of monocyte chemotactic protein 1, as discovered using protein array technology[J]. Cancer Res, 2002, 62(10): 2806-2812.
- 7 Fernstrom MJ, Koffler LD, Abou-Rjaily G, et al. Neoplastic reversal of human ovarian carcinoma cells transfected with connexin43[J]. Exp Mol Pathol, 2002, 73(1): 54-60.
- 8 King TJ, Fukushima LH, Donlon TA, et al. Correlation between growth control, neoplastic potential and endogenous connexin43 expression in Hela cell line: implications for tumor progression[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(2): 311-315.
- 9 Chen JT, Cheng YW, Chou MC, et al. The correlation between aberrant connexin43 mRNA expression induced by promoter methylation and nodal micrometastasis in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(11): 4200-4204.
- 10 吴德昌, 陈家佩, 毛秉智. 放射医学(M). 北京: 军事医学科学院出版社. 2001. 458-461.
- 11 Provost N, Moreau M, Leturque A, et al. Ultraviolet radiation transiently disrupts gap junctional communication in human keratinocytes[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 284(1): C51-C59.
- 12 Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, et al. Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction[J]. J Cell Biol, 2000, 151(4): 931-944.
- 13 Monocino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Expression of connexin43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis[J]. Blood, 2000, 96(3): 917-924.
- 14 Oviedo-Orta E, Hoy T, Evans WH. Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood and tonsil human lymphocyte subpopulations[J]. Immunology, 2000, 99(4): 578-590.
- 15 Di WL, Lachelin GC, McGarrigle HH, et al. Oestriol and oestradiol increase cell to cell communication and connexin43 protein expression in human myometrium[J]. Mol Hum Reprod, 2001, 7(7): 671-679.
- 16 Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Expression of connexin43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses[J]. Cancer Res, 2003, 63(21): 7128-7135.
- 17 Glover D, Little JB, Lavin MF, et al. Gueven low dose ionizing radiation induced activation of connexin43 expression[J]. Int J Radiat Biol, 2003, 79(12): 955-964.
- 18 Yu W, Dahi G, Werner R. The connexin43 gene is responsive to oestrogen[J]. Proc Biol Sci, 1994, 255(1334): 125-132.
- 19 Chen ZQ, Lefebvre D, Bai XH, et al. Identification of two regulatory elements within the promoter region of the mouse connexin 43 gene [J]. Biol Chem, 1995, 270(8): 3863-3868.
- 20 Holder JW, Elmore E, Barrett JC. Gap junction function and cancer [J]. Cancer Res, 1993, 53(15): 3475-3485.
- 21 Saez JC, Martinez AD, Branes MC, et al. Regulation of gap junctions by protein phosphorylation[J]. Braz J Med Biol Res, 1998, 31(5): 593-600.
- 22 Rivedal E, Opsahl H. Role of PKC and MAP kinase in EGF and TPA-induced connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells [J]. Carcinogenesis, 2001, 22(9): 1543-1550.
- 23 Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, et al. Phosphorylation of connexin43 on serine 368 by protein kinase C regulates gap junctional communication[J]. Cell Biol, 2000, 149(7): 1503-1512.

(收稿日期: 2005-01-10)