骨组织细胞Cx43形成的间隙连接及半通道研究进展

张 健 续惠云 乌佳伟 关 莹 商 澎*

(西北工业大学生命学院, 西北工业大学特殊环境生物物理学研究所,
空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西安 710072)

摘要 连接子蛋白43(connexin 43, Cx43)是骨组织中主要的间隙连接(gap junction)蛋白和半通道(hemichannel)蛋白, 由Cx43形成的间隙连接及半通道实现了骨组织细胞间的直接通讯。连接子蛋白对骨组织的正常发育、骨重建过程的建立与平衡是非常重要的。目前研究指出, Cx43不仅参与了骨组织的力学响应过程, 也参与了二磷酸盐、甲状旁腺激素等药物对骨重建的调节过程。该文以骨组织细胞内信号传递途径的关键分子Cx43为对象, 就其目前的研究现状作一综述。

关键词 Cx43; 间隙连接; 半通道; 骨组织细胞

骨组织细胞主要包括骨细胞、成骨细胞、破骨细胞, 它们均表达连接子蛋白43(connexin 43, Cx43), 并在彼此间形成间隙连接, 使得骨组织所有细胞形成一个整体网络。Cx43在骨组织发育及骨重建过程中均发挥着重要作用, 它可将骨组织对外界力学、药物等刺激产生的生物信号在细胞间进行传递。本文就Cx43在骨组织的发育、力学和药物刺激下骨重建过程中的作用作一综述。

1 Cx43简介

Cx43是分子量为43 kDa的跨膜连接子蛋白, 由9个主要的结构域组成, 包括N末端、两个胞外环(通过胞外分子二硫键稳定)、一个胞内环、四个跨膜结构域和C末端, 这些序列都高度保守[1]。位于胞质内的N末端、质膜环及C末端可以与其它蛋白质因子相互作用, 从而调节其功能的实现[2]。

6个Cx43环绕形成一个跨膜的连接子(connexon), 即半通道; 相邻细胞膜上的两个连接子对接便形成一个间隙连接单位[3]。连接子中心形成一个直径约1.5 nm的孔道, 能允许分子量小于1.2 kDa的分子在细胞之间进行交换。由于许多间隙连接单位往往集结在一起, 因此, 可以用密度梯度离心技术将质膜上的间隙连接区域的膜片段分离出来[1]。连接子蛋白的半衰期较短, 多为几个小时, 新转运过来的连接子位于已存在的间隙连接斑的边缘, 而老的连接子在间隙连接斑中央处降解[4-5]。

骨组织细胞中的骨细胞之间、骨细胞与成骨细胞和破骨细胞之间都存在间隙连接, 骨细胞及成骨细胞膜上也分布着很多半通道[6](图1)。由Cx43形成的间隙连接(gap junction)和半通道(hemichannel)可以实现细胞之间的通讯连接[7]。通过间隙连接可以使相邻骨组织细胞间的小分子, 如Ca^{2+}、IP3及siRNA等进行交换, 通过半通道也可以使胞内的一些小分子, 如前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)、NO、ATP等释放到胞外[8]。一些连接子蛋白相关蛋白, 包括细胞骨架因子(cytoskeletal elements)、酶(激酶及磷酸酶)、黏附分子、信号传递分子等[2], 调节并介导通道依赖性及非依赖性连接子的功能。

2 Cx43与骨组织发育

Cx43在骨骼的正常发育过程中发挥着重要作用。*Cx43*基因的缺失及突变均会造成骨骼的畸形发育[9]。眼齿指发育不良(oculodentodigital dysplasia, ODDD)是一种与*Cx43*基因点突变相关的常染色体显性疾病。患者常表现出手或足并指畸形、面颅骨畸形等症状[10]。2006年, Chung等[11]定向敲除小鼠成骨细胞中的*Cx43*基因后, 发现小鼠出生时并没有畸形现象发生, 但是随着不断发育, 开始表现出低峰骨量(low peak bone mass), 且伴随着骨质减少。这表明定向敲除成骨细胞*Cx43*基因后的小鼠, 其骨形成能力降低, 成骨细胞功能缺陷。然而在特异性敲除骨细胞和成熟成骨细胞*Cx43*的小鼠模型的发育过程

收稿日期: 2011-12-08 接受日期: 2012-04-16

国家自然科学基金(No.31170812)和西北工业大学基础研究基金(No.NPU-FFR-JC201160)资助项目

*通讯作者。Tel: 029-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

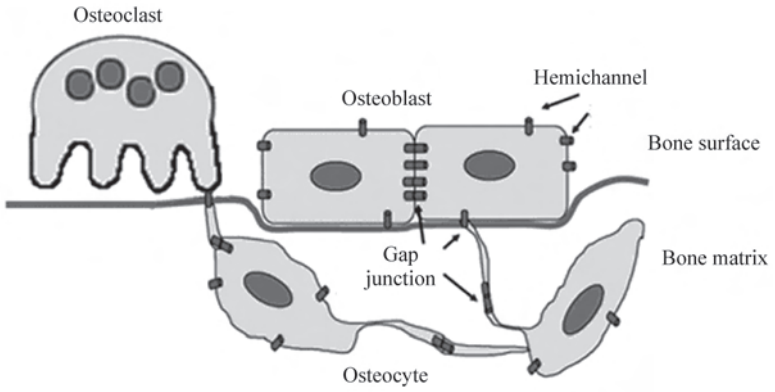

图1　骨组织细胞中的间隙连接和半通道
(根据参考文献[6]修改)
Fig.1　Gap junctions and hemichannels in bone tissue cells(modified from reference [6])

中, 并没有发现骨正常生长被破坏的现象[12]。但是, Zhang等[13]和Bivi等[14]建立了特异性敲除骨细胞及成骨细胞*Cx43*的小鼠模型, 发现成骨细胞的间隙连接信号通讯(gap junction intercellular communication)有所降低, 同时有骨吸收增加引起的骨丢失现象。

以上实验中*Cx43*敲除小鼠显示出的骨骼发育缺陷、骨化延迟等现象表明, Cx43对于骨组织发育具有重要作用[15]。这可能是因为缺乏Cx43会破坏骨组织中骨细胞、成骨细胞及破骨细胞之间的连接, 导致骨组织细胞之间的正常通讯受阻。

3　Cx43与骨组织力学响应

3.1　Cx43参与骨组织的力学响应

Grimston等[16]分别对野生型及定向敲除*Cx43*基因小鼠的颅骨成骨细胞施加循环牵张力(cyclic stretch), 发现在*Cx43*敲除小鼠模型中, 前列腺素E2(PGE2)的含量增加。对特异性敲除成骨细胞*Cx43*的小鼠模型的胫骨进行四点弯曲实验, 虽然编织骨(woven bone)显著形成, 但与野生型相比骨沉积明显减少; 对胫骨施加三点弯曲实验发现, 成骨细胞*Cx43*敲除小鼠的内皮质表面的矿物质沉积率显著降低, 并且需要多大约40%的力才会产生与野生型同样的内皮质应变(endocortical strain)[17]。这些结果说明, 在成骨细胞中特异性敲除*Cx43*会改变骨组织对机械应力的响应, 这也提示, Cx43可能参与了骨组织在机械应力刺激下的骨重建过程。

3.2　Cx43的力学响应机制

骨细胞在受到力学刺激时, Cx43的表达及分布会发生变化。2001年, Cheng等[18]发现Cx43是骨样细胞系MLO-Y4的主要间隙连接蛋白, 其中, 大约5%为磷酸化形式; 在施加流体剪切应力(fluid flow shear stress, FFSS)后, 骨细胞中的Cx43从细胞核周围向细胞质及突触处转移, 并迅速增加了细胞间耦联(intercellular coupling)。2003年, Thi等[19]将骨样细胞MLO-Y4及成骨样细胞MC3T3-E1施加5 dyn/cm^{2}及20 dyn/cm^{2}的流体剪切力刺激, 发现这两种细胞系细胞膜上Cx43蛋白的含量降低, 而细胞质中该蛋白含量升高。然而, Cherian等[20]的研究却发现流体剪切力刺激会诱导骨细胞细胞质中Cx43蛋白向细胞膜表面转移。Siller-Jackson等[21]发现, 短时间的流体剪切力刺激可增加骨细胞Cx43的寡聚化及其向细胞膜的转运, 但更长时间的流体剪切力处理后则发现细胞膜上Cx43的表达水平降低, 且与对照组相比无显著性差异。2011年, 本课题组的研究也发现, 抛物线飞行提供的可变重力环境显著降低了骨样细胞MLO-Y4中Cx43的表达[22]。这些研究结果表明, Cx43对力学刺激敏感, 并且对不同的力学刺激形式、强度及作用时间会有不同的响应。这也提示, 由Cx43形成的半通道或间隙连接可能在骨组织细胞中起着力学感受器的作用。

力学刺激除了能改变骨细胞中Cx43的表达分布外, 还能诱发Cx43形成的半通道在骨细胞及成骨细胞中的开放。在人成骨细胞HOBIT及小鼠成骨样细胞MC3T3-E1中, 力学刺激诱发Cx43半通道的开放, IP3、Ca^{2+}、ATP等小分子物质的释放增加[23-24]。骨样细胞MLO-Y4受到流体剪切力之后, 同样会诱发

Cx43半通道开放的增加, 并释放PGE2、ATP、NO等骨重建因子[25]。2008年, Siller-Jackson等[21]发现, 骨细胞通过Cx43半通道释放的PGE2适应性地受到流体剪切力的调节, 并且释放的PGE2通过与其两种受体亚型EP2与EP4结合, 从而激活PI3K/Akt与cAMP-PKA信号通路, 引起GSK-3的磷酸化, 导致β-catenin在核区的累积, 最终作用于Cx43转录环节, 增加Cx43的表达量[26]。2010年, Kitase等[27]发现, 流体剪切力诱导的PGE2的释放还可以通过β-catenin和PKA通路抑制由糖皮质激素诱导的骨细胞凋亡。2012年, Batra等[28]发现整合素α5β1可以与Cx43直接相互作用, 并且力学刺激或整合素α5β1的构象变化都会引起Cx43形成的半通道的开放。总之, 通过半通道释放的信号分子会通过与其特异受体的相互作用激活不同的信号通路, 从而实现对细胞生物学功能的调节。

2010年, Burra等[29]利用transwell filter系统培养骨细胞, 使得骨细胞胞体与突触得以分开。然后, 他们利用落下来的液滴对骨细胞施加流体剪切力刺激, 结果发现, 不论流体剪切力刺激施加到细胞体上还是突触上, 均可诱发细胞体上的Cx43半通道开放。如果预先用透明质酸酶处理细胞突触一端后, 再用流体剪切力刺激细胞突触端, 则发现细胞体端的Cx43半通道的开放性程度显著降低; 但是当对透明质酸处理后的胞体这一端施加流体剪切力刺激时, 却没有此现象发生。这提示我们相对于细胞体, 骨细胞突触可能对流体剪切力的作用更加敏感, 并且多糖蛋白质复合物在其中起着重要的作用。

此外, 作为骨组织的主要力学感受器与调解者, 骨细胞受到的力学刺激可通过功能性间隙连接传递给其周围的骨组织细胞, 调节骨重建过程。Yellowley等[30]利用荧光黄染料转移实验, 证实MLO-Y4细胞可通过Cx43形成的间隙连接实现功能上的耦联; 他们还发现, 由MLO-Y4细胞变形诱导产生的钙信号可通过间隙连接传递给相邻的共培养的MC3T3-E1细胞。Taylor等[31]将骨样细胞MLO-Y4与成骨样细胞MC3T3-E1共培养后, 对MLO-Y4施加流体剪切力, 结果发现通过功能性间隙连接增加了MC3T3-E1碱性磷酸酶的活性。2006年, Guo等[32]把骨细胞培养在类似于体内真实骨细胞网络环境尺寸的平板上, 通过对单个骨细胞施加机械刺激后, 发现通过间隙连接可实现钙信号的传递。

4　Cx43与药物刺激

除了在骨重建过程中起重要作用的力学刺激对骨细胞Cx43有调节作用外, 一些抗骨质疏松的化学药物如二磷酸盐、甲状旁腺激素等也对骨细胞Cx43起着调节作用。Plotkin等[33]发现, 二磷酸盐可诱导Cx43半通道开放, 激活Src与细胞质ERK, 诱导促凋亡蛋白BAD及C/EBPβ的磷酸化, 并最终抑制骨细胞凋亡。进一步特异性敲除小鼠骨细胞及成熟成骨细胞中的*Cx43*后发现, 二磷酸盐(阿仑膦酸钠)不能抑制由糖皮质激素诱导的骨细胞及成骨细胞凋亡[12]。虽然这些发现表明二磷酸盐对骨细胞及成骨凋亡的抑制与Cx43关系密切[34], 但是, Lezcano等[35]的研究表明, Cx43并没参与到骨细胞或成骨细胞对二磷酸盐的摄取及二磷酸盐与目标分子的结合过程中。

甲状旁腺激素也会影响成骨细胞Cx43的表达分布、间隙连接的形成。研究表明, 甲状旁腺激素对骨代谢平衡的促进是通过影响Cx43形成的间隙连接活性而不是半通道开放的方式来实现的[36]。甲状旁腺激素会促进Cx43的组装, 从而使得细胞膜上有较高的Cx43蛋白水平, 并最终增强间隙连接的形成[37]。Chung等[11]研究表明, 皮下注射甲状旁腺激素会使小鼠骨矿物质含量迅速并显著增加, 然而, 在敲除成骨细胞*Cx43*的小鼠模型中发现骨矿物质沉积率并没有上升。这提示Cx43可能参与了甲状旁腺激素介导的骨形成。二磷酸盐及甲状旁腺激素都是对骨重建起着调节作用的化学物质, 而Cx43对此过程的参与提示我们, Cx43可能在骨重建的过程中起着重要作用。

5　小结

骨细胞、成骨细胞及破骨细胞均表达Cx43, 并通过间隙连接的相互作用形成一个整体网络。作为骨组织主要力学感受器的骨细胞能够感知力学刺激并通过间隙连接传递给其它骨组织细胞, 从而调节骨重建过程。此外, 由Cx43形成的半通道的开放状态也受到力学刺激的调节, 释放的小分子, 如PGE2、ATP、NO等, 可通过与其特异的受体相互作用参与到骨重建过程中。除了力学刺激之外, 一些抗骨质疏松物质如二磷酸盐、甲状旁腺激素等介导的骨重建过程也涉及到了骨组织细胞Cx43半通道的参与。但是, 目前关于Cx43半通道的开放及功能性间隙连接形成的机制研究还很少。

综上所述, Cx43形成的间隙连接及半通道可能在骨重建过程中起着重要作用。因此, 对其机制进行进一步的研究将对抗骨质疏松等疾病机制的阐明及相关药物的研发起重要作用。

参考文献 (References)

1 Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhou RS. Connexins: A myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. Cell Commun Signal 2009; 7: 4.

2 Herve JC, Bourmeyster N, Sarrouilhe D, Duffy HS. Gap junctional complexes: From partners to functions. Prog Biophys Mol Biol 2007; 94(1/2): 29-65.

3 Laird DW. The gap junction proteome and its relationship to disease. Trends Cell Biol 2010; 20(2): 92-101.

4 Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, *et al*. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. Science 2002; 296(5567): 503-7.

5 Wayakanon P, Bhattacharjee R, Nakahama KI, Morita I. The role of the Cx43 C-terminus in GJ plaque formation and internalization. Biochem Biophys Res Commun 2012; 420(2): 456-61.

6 Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. Arch Biochem Biophys 2008; 473(2): 188-92.

7 Batra N, Kar R, Jiang JX. Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. Biochim Biophys Acta 2011; 26(5): 417-22.

8 Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: Functions of unpaired connexon channels. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4(4): 285-95.

9 Watkins M, Grimston SK, Norris JY, Guillotin B, Shaw A, Beniash E, *et al*. Osteoblast connexin43 modulates skeletal architecture by regulating both arms of bone remodeling. Mol Biol Cell 2011; 22(8): 1240-51.

10 Paznekas WA, Karczeski B, Vermeer S, Delatycki M, Laurence F, Koivisto PA, *et al*. GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype. Hum Mutat 2009; 30(5): 724-33.

11 Chung DJ, Castro CH, Watkins M, Stains JP, Chung MY, Szejnfeld VL, *et al*. Low peak bone mass and attenuated anabolic response to parathyroid hormone in mice with an osteoblast-specific deletion of connexin 43. J Cell Sci 2006; 119(Pt 20): 4187-98.

12 Plotkin LI, Lezcano V, Thostenson J, Weinstein RS, Manolagas SC, Bellido T. Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts *in vivo*. J Bone Miner Res 2008; 23(11): 1712-21.

13 Zhang Y, Paul EM, Sathyendra V, Davison A, Sharkey N, Bronson S, *et al*. Enhanced osteoclastic resorption and responsiveness to mechanical load in gap junction deficient bone. PLoS One 2011; 6(8): e23516.

14 Bivi N, Condon KW, Allen MR, Farlow N, Passeri G, Brun LR, *et al*. Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: Consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation. J Bone Miner Res 2012; 27(2): 374-89.

15 Chaible LM, Sanches DS, Cogliati B, Mennecier G, Dagli ML. Delayed osteoblastic differentiation and bone development in Cx43 knockout mice. Toxicol Pathol 2011; 39(7): 1046-55.

16 Grimston SK, Screen J, Haskell JH, Chung DJ, Brodt MD, Silva MJ, *et al*. Role of connexin43 in osteoblast response to physical load. Ann N Y Acad Sci 2006; 1068: 214-24.

17 Grimston SK, Brodt MD, Silva MJ, Civitelli R. Attenuated response to *in vivo* mechanical loading in mice with conditional osteoblast ablation of the connexin43 gene (Gja1). J Bone Miner Res 2008; 23(6): 879-86.

18 Cheng B, Zhao S, Luo J, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX. Expression of functional gap junctions and regulation by fluid flow in osteocyte-like MLO-Y4 cells. J Bone Miner Res 2001; 16(2): 249-59.

19 Thi MM, Kojima T, Cowin SC, Weinbaum S, Spray DC. Fluid shear stress remodels expression and function of junctional proteins in cultured bone cells. Am J Physiol Cell Physiol 2003; 284(2): C389-403.

20 Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang Xin, Bonewald LF, Sprague E, *et al*. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: A novel mechanism for the release of prostaglandin. Mol Biol Cell 2005; 16(7): 3100-6.

21 Siller-Jackson AJ, Burra S, Gu S, Xia X, Bonewald LF, Sprague E, *et al*. Adaptation of connexin 43-hemichannel prostaglandin release to mechanical loading. J Biol Chem 2008; 283(39): 26374-82.

22 Di SM, Qian AR, Qu LN, Zhang W, Wang Z, Ding C, *et al*. Graviresponses of osteocytes under altered gravity. Adv Space Res 2011; 48(6): 1161-6.

23 Romanello M, Pani B, Bicego M, D'Andrea P. Mechanically induced ATP release from human osteoblastic cells. Biochem Biophys Res Commun 2001; 289(5): 1275-81.

24 Romanello M, Veronesi V, D'Andrea P. Mechanosensitivity and intercellular communication in HOBIT osteoblastic cells: A possible role for gap junction hemichannels. Biorheology 2003; 40(1/2/3): 119-21.

25 Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, Yellowley CE, Donahue HJ. Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. J Cell Physiol 2007; 212(1): 207-14.

26 Xia X, Batra N, Shi Q, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX. Prostaglandin promotion of osteocyte gap junction function through transcriptional regulation of connexin 43 by glycogen synthase kinase 3/beta-catenin signaling. Mol Cell Biol 2010; 30(1): 206-19.

27 Kitase Y, Barragan L, Qing H, Kondoh S, Jiang JX, Johnson ML, *et al*. Mechanical induction of PGE(2) in osteocytes blocks glucocorticoid induced apoptosis through both the beta-catenin and PKA pathways. J Bone Miner Res 2010; 25(12): 2657-68.

28 Batra N, Burra S, Siller-Jackson AJ, Gu S, Xia X, Weber GF, *et al*. Mechanical stress-activated integrin α5β1 induces opening of connexin 43 hemichannels. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109(9): 3359-64.

29 Burra S, Nicolella DP, Francis WL, Freitasb CJ, Mueschkeb NJ, Poole K, *et al*. Dendritic processes of osteocytes are mechanotransducers that induce the opening of hemichannels. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107(31): 13648-53.

30 Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, Jacobs CR, Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. J Bone

Miner Res 2000; 15(2): 209-17.
31 Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. Am J Physiol Cell Physiol 2007; 292(1): C545-52.
32 Guo XE, Takai E, Jiang X, Xu Q, Whitesides GM, Yardley JT, *et al*. Intracellular calcium waves in bone cell networks under single cell nanoindentation. Mol Cell Biomech 2006; 3(3): 95-107.
33 Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. J Biol Chem 2005; 280(8): 7317-25.
34 Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: Preservation of osteoblast and osteocyte viability. Bone 2011; 49(1): 50-5.
35 Lezcano V, Bellido T, Plotkin LI, Boland R, Morelli S. Role of connexin 43 in the mechanism of action of alendronate: Dissociation of anti-apoptotic and proliferative signaling pathways. Arch Biochem Biophys 2012; 518(2): 95-102.
36 Schiller PC, Mehta PP, Roos BA, Howard GA. Hormonal regulation of intercellular communication: Parathyroid hormone increases connexin 43 gene expression and gap-junctional communication in osteoblastic cells. Mol Endocrinol 1992; 6(9): 1433-40.
37 Cherian PP, Xia X, Jiang JX. Role of gap junction, hemichannels, and connexin 43 in mineralizing in response to intermittent and continuous application of parathyroid hormone. Cell Commun Adhes 2008; 15(1): 43-54.

Advances on Research of Cx43 Formed Gap Junction and Hemichannel in Bone Cells

Zhang Jian, Xu Huiyun, Wu Jiawei, Guan Ying, Shang Peng*

(*Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China*)

Abstract　Connexin 43 (Cx43) is the main gap junction and hemichannel protein in bone cells. Cx43 formed gap junction and hemichannel directly allowing cell-cell communication, which is of importance in skeleton development and bone remodeling. Present researches have shown that Cx43 not only responds to mechanical and pharmaceutical stimulus, but also involves in bone remolding. This review summarized the current status of knowledge in this area of research.

Key words　Cx43; gap junction; hemichannel; bone cells

Received: December 8, 2011　Accepted: April 16, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31170812) and Northwestern Polytechnical University (NPU) Foundation for Fundamental Research (No.NPU-FFR-JC201160)

*Corresponding author. Tel: 86-29-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn