

# 从遗传疾病看间隙连接研究的新进展

曾 弥 白

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

间隙连接(gap junction)由连接蛋白(connexin, Cx)构成, 目前已有 13 种连接蛋白(表 1), 每一个蛋白是一个基因产物, 它们组成一个高度相关的蛋白质家族。

所有的连接蛋白都有相同的分子构形, 由四个跨膜区(M1-M4)、两个胞外环(E1-E2)、一个胞内环以及胞质 NH<sub>2</sub> 和 COOH 末端构成(图 1)。序列同源性集中在跨膜区和胞外环, 序列差异则位于胞内环和 COOH 末端, 这部分可能负责调控由各种不同连接蛋白构成的间隙连接通道的通讯功能<sup>[1]</sup>。

连接蛋白广泛的分布和在不同细胞和物种之间的保守性都指示了它们在细胞活动方面所起的作用。有事实说明, 连接蛋白表达的异常和肿瘤发生, 心脏局部缺血以及心脏肥大有关。最近, 人类遗传学对间隙连接通道的结构与功能提出了令人振奋的新的揭示。

## 一、夏马图三氏型进行性、神经性肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth Disease, CMT)

这是最早发现连接蛋白基因突变引起的疾病<sup>[3]</sup>。它是一种神经疾病, 引起病人周边神经进

行性退化、远侧肌肉无力和萎缩, 感觉麻木以及腱反应衰退。这是最普遍的遗传病中的一种, 每 2,500 儿童和成人中有一例患者。CMT 中的一

表 1 连接蛋白的表达

连接蛋白	组织和细胞的分布
Cx26	肝细胞, 胰腺泡细胞, 乳腺腺泡细胞, 角质形成细胞, 肾, 软脑膜, 松果体细胞, 肠
Cx30.3	皮肤, 着床前胚泡, 肾
Cx31	角质形成细胞, 着床前胚泡, 滋养外胚层, 肾
Cx31.1	角质形成细胞, 着床前胚泡, 扁平上皮
Cx32	肝细胞, 胰腺泡细胞, 乳腺腺泡细胞, 神经元, 少突胶质细胞, 施旺氏细胞, 甲状腺细胞
Cx33	睾丸
Cx37	内皮, 角质形成细胞, 心, 胃, 睾丸
Cx38	胚胎
Cx40	内皮, 传导性心肌膜(希氏束, 浦肯野纤维), 着床前胚泡
Cx43	心肌细胞, 平滑肌, 内皮细胞, 乳腺, 肌上皮, 睾丸, 晶体和角膜上皮, 胰β-细胞, 角质形成细胞, 着床前胚泡, 甲状腺滤泡细胞
Cx45	心, 肾, 肺, 皮肤, 肠, 着床前胚泡
Cx46	晶体纤维, 肾, 心, 施旺氏细胞
Cx50	晶体纤维, 角膜上皮, 房室瓣

(参阅[1]和[10])

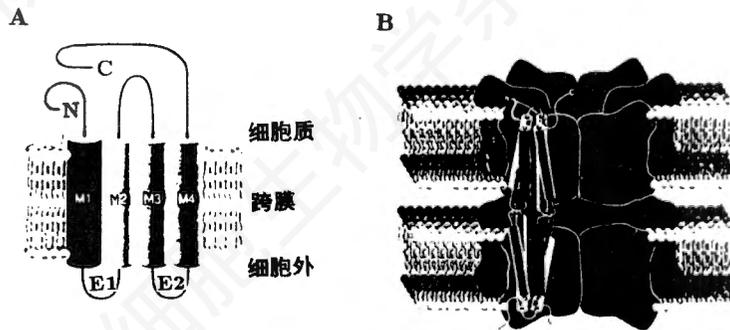


图 1 连接蛋白的分子模式图<sup>[1]</sup>

A. 连接蛋白的模式图。

B. 相邻两细胞各提供一个连接子, 它们各自的六个连接蛋白亚单位共同构成连接通道。

种类型(CMTX)和施旺氏细胞(Schwann cell)的脱髓鞘现象有关。以前认为它们和位于染色体17和染色体1编码髓鞘蛋白PMP-22和PO的基因有关,最近基因图谱分析指出,和它们有关的基因位于X-染色体Cx32位点的附近。

后来,对CMTX病人样品的Cx32基因编码区进行了直接序列分析<sup>[2]</sup>,发现有不少突变,在54家族中有42处突变,包括错义突变、无义突变、移码和缺失(图2)。Cx32是构成间隙连接通道的蛋白质多基因家族的一员,为了了解连接通道的通信功能,用成对卵母细胞系统<sup>[3]</sup>,对CMTX病人Cx32的三个突变基因(图3)进行检测,结果发现,野生型诱发较强的连接传导,而CMT突变基因没有传导的能力,通讯受阻。但是,注射编码野生型Cx32和突变Cx32 cDNA的卵母细胞质膜的Western印迹法指出两者条带相似,而且免疫荧光观察也证明CMT病人Cx32和野生型Cx32一样都集中在成对卵母细胞接触的部位<sup>[4]</sup>。可见,在突变型,Cx32是存在的,但是间隙连接通讯却受到阻抑。

Cx32的遗传变异和周边神经系统脱髓鞘疾病有关,令人费解。因为,电镜观察指出,在相邻有髓施旺氏细胞之间间隙连接极少。免疫荧光观察看到,施旺氏细胞表达Cx32是集中在施兰切迹(incisure of Schmidt-Lantermann)等部位(图4)。图4显示在一个施旺氏细胞之内的间隙连接,它们只在连接施兰切迹处相邻的髓鞘处出现,在髓鞘紧密旋绕的部位不存在。在施旺氏细胞中,施兰切迹处的间隙连接和一般在相邻两个细胞之间形成的间隙连接不同,它们是在一个施旺氏细胞中,在不同髓鞘旋转之间形成的,可以称为细胞内间隙连接。

在一个施旺氏细胞中,这种螺旋式的细胞质管道十分漫长,这样长距离的分子扩散对保证细胞间的代谢要求可能太缓慢。通过施兰切迹处连接相邻髓鞘细胞内的间隙连接,可能提供短捷的扩散通路。Cx32的突变干扰了间隙连接的正常功能,因此施旺氏细胞和远侧肌肉之间营养物或信号分子的转运受阻而引起退化<sup>[2,5]</sup>。

特别引人注意的是,Cx32的突变除了在周边神经系统,在其它器官不引起显著的功能变异。Cx32在许多种类细胞中都是间隙连接的主要组成成份。为什么大多数表达突变Cx32的

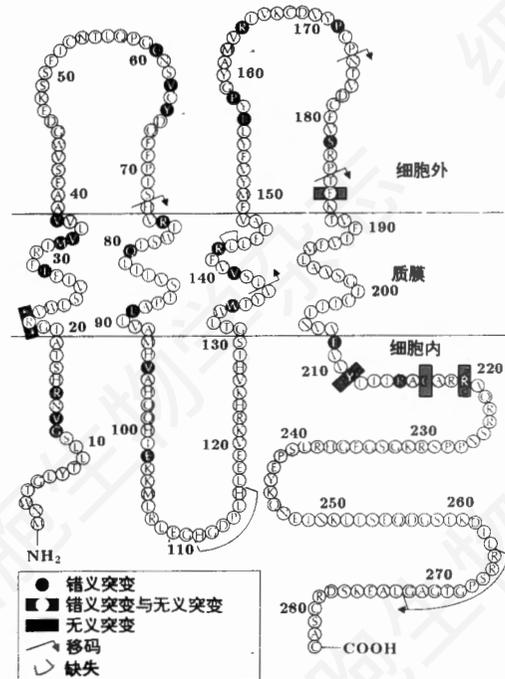


图2 CMTX病人Cx32的突变<sup>[5]</sup>

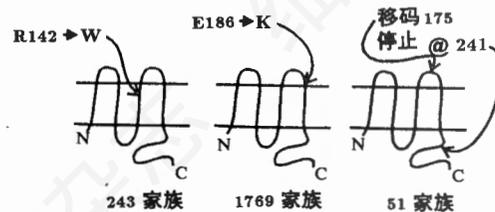


图3 被检测的CMTX家族的三个突变基因<sup>[4]</sup>

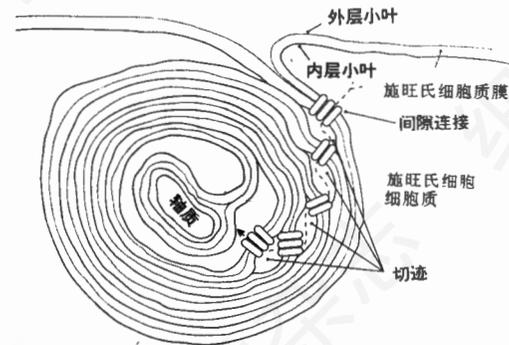


图4 简图示在施兰切迹处细胞内间隙连接通道如何连接邻近的髓鞘<sup>[5]</sup>

细胞表型是正常的?可能的解释是,大多数细胞能表达多种Cx,在Cx32突变后,其它Cx起了补偿作用,而施旺氏细胞或者只能产生Cx32,或者它所产生的其它Cx不能承担Cx32的专一功能<sup>[2,5]</sup>。所有这些都还有待进一步研究。

## 二、内脏心房移位(visceroatrial heterotaxia,VAH)综合症

这是一个由连接蛋白基因引起的心脏畸形疾病。最初是在小鼠Cx43剔除(knockout)实验中发现的<sup>[6]</sup>。Cx43是人和小鼠心脏中表达的最丰富的连接蛋白,它从受精卵转录开始就存在,以后在着床后和成体的器官中都有表达。Cx43剔除的纯合子小鼠胚胎能成活到分娩,但在出生后不久就死亡。只在心脏看到明显的畸形,右室外流通道之上的圆锥体(conus arteriosus)明显扩大,右心室的外流通路原来是畅通无阻的,在纯合子小鼠胚胎却充满了心室内隔壁,它们堵塞了通路。因此,右心室通向肺动脉的血流受阻。这是小鼠出生后死亡的原因。其它表达Cx43的组织组织学检查都未见异常。

后来发现,Cx43基因突变和人类家族心脏畸形有关。在VAH综合症的病人中检测到Cx43基因突变,而在其它类型心脏病的病人中并无这种突变。

这方面的资料是根据美国患病儿童的调查报告。美国婴儿出生时死亡率的半数是心脏畸形,而Cx43基因是一个可能和心脏发育有关的基因,Britz-Gunningham等发表了一份调查报告<sup>[7]</sup>,他们从25个正常儿和30个有先天性心脏畸形的病儿取样,检测Cx43、COOH末端氨基酸的序列,因为这里包含有和调控间隙连接通讯的有关氨基酸。结果和基因库的比较,发现正常的25例COOH末端无一例异常,30例病儿中23例未见异常,可见,Cx43这一区域的变异尚属少见。其它7例中的1例还有待进一步观察,有变异的是6例,以Ser364Pro突变,也就是在364位点Ser被Pro替代,为最显著。

配合临床调查的结果,在体外的培养细胞用抗体注射的技术检测了Cx43各域区对间隙

连接所起的作用<sup>[8]</sup>。以抗Cx43三个域区(图5)的抗体注射到新生大鼠的心肌培养细胞,结果发现,5-17位和314-322位域区不影响间隙连接通讯,而363-384位域区的抗体50%注射细胞的间隙连接通讯受到阻抑,这一结果和抗Cx43整个分子的抗体相似,说明这一域区在间隙连接通讯中的重要性。临床调查报告<sup>[7]</sup>指出,VAH病儿Cx43基因突变中以Ser364Pro为最显著也正涉及这一域区。

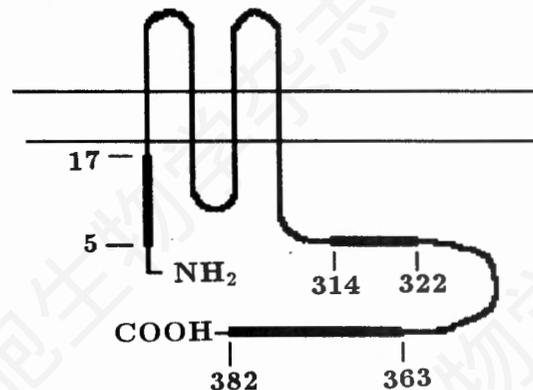


图5 连接蛋白Cx43示意图,粗线示引抗体的三个多肽域区<sup>[8]</sup>

目前,这类实验分析的工作正在各个实验室进行着,所得到的结果,结合更多的临床资料,将对VAH综合症和Cx43的关系提供进一步的剖析。

## 三、间隙连接研究的新进展

### 1. 新的功能的启示

许多相关的事实都支持间隙连接在细胞的不同活动中起着协调的作用,如电突触处神经信号的传送、兴奋在心肌细胞间的传播、早期发育的调控以及癌变和细胞生长等,但是,直接的实验事实还十分有限,而且个别连接蛋白的功能也还有待证实。最近,人类遗传病CMT和VAH中连接蛋白基因突变的发现,对它们的功能提供了无可置疑的证据。到目前为止,在小鼠有目的地剔除个别Cx基因的影响还只有一篇报道<sup>[2]</sup>。干扰其它Cx基因的尝试正在进行,对这些小鼠的分析定能揭示更多Cx基因的功能

能,同时,也还可能找出哪些是丰余的。

## 2. 连接通道实验分析数据的积累

六个连接蛋白亚单位组成一个连接子,相邻细胞的两个连接子共同构成间隙连接中央的通道(参阅图1)。已知的连接蛋白至少有13种(参阅表1),连接蛋白这么多,许多细胞都表达不止一种连接蛋白,可以想像,连接蛋白通过各种组合以形成各种类型的通道。通道的性质由组成它的连接蛋白决定,为了了解通道的性质,近年来,对各种连接蛋白的兼容性以及功能进行了实验的分析<sup>[9]</sup>。White和Bruzzone(1996)总结了利用成对卵母细胞系统<sup>[4]</sup>以及Cx转染的HeLa细胞<sup>[10]</sup>的结果(表2)。60个异型连接蛋白组合中,有33个不能形成有功能的通道,大多数Cx能和大约半数测试的对象形成有功能的通道,如Cx32(5/12),但是,也有绝对不相容的,如Cx31只和同型Cx形成功能通道,和其它测试的6个不同型Cx则不形成。Cx40形成异型通道的能力也很有限,只和Cx37与Cx45形成而和Cx26、Cx31、Cx31.1、Cx32、Cx43以及Cx46都不形成,相反,Cx46除了Cx40和所测试的对象都形成异型有功能通道。以上关于各种连接蛋白的兼容性,结合它们的不同渗透性<sup>[11]</sup>,对一些过去已经发现而无法阐明的现象提供了可能的解释。在胚胎发育过程中,通讯间隔在鼠胚胎以及果蝇表皮都曾被描述,而且认为和发育区域相吻合<sup>[12]</sup>。在鼠胚胎,Cx43是最早出现的连接蛋白之一,在4-8细胞期就可以检测到,在发育进程中它逐渐被局限到胚胎本身,在滋养外胚层中不存在。相反,另一个连接蛋白Cx26基因只在滋养外胚层中表达。这种Cx26和Cx43时空不同的表达正和间隙连接通讯间隔相一致。很可能连接

蛋白基因的不同表达对早期鼠胚通讯间隔的形成起着调控的作用。

表2 在细胞间连接通道形成中,鼠类Cx显示不同的兼容性

	Cx26	Cx30	Cx30.3	Cx31	Cx31.1	Cx32	Cx33	Cx37	Cx40	Cx43	Cx45	Cx46	Cx50
Cx50	+					+			-	-		+	+
Cx46	+					+			-	+		+	
Cx45	-		-	-	-			+	+	+	+		
Cx43	-		+	-	-			-	+	+			
Cx40	-			-	-			+	+				
Cx37	-		+	-	-			-	+				
Cx33							-						
Cx32	+					+							
Cx31.1	-				+								
Cx31	-			+									
Cx30.3	-	-	+										
Cx30	+	+											
Cx26	+												

(+)示功能通道形成,(-)示不形成功能通道<sup>[9]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Kumar, N. M. and Gilula, N. B. 1996, *Cell*, **84**:381-388.
- [2] Bergoffen, S. S. et al., 1993, *Science*, **262**:2039-2042.
- [3] Dahl, G. et al., 1987, *Science*, **236**:1290-1293.
- [4] Bruzzone, R. et al., 1994, *Neuron*, **13**:1253-1260.
- [5] Paul, D. L. 1995, *Current Opinion Cell Biol.*, **7**:665-672.
- [6] Reaume, A. G. 1995, *Science*, **267**:1831-1833.
- [7] Britz-Gunningham, S. H. et al., 1995, *The New England Journal of Medicine*, **332**:1323-1329.
- [8] Bastide, B. et al., 1996, *J. Membr. Biol.*, **150**:243-253.
- [9] White, T. W. and Bruzzone, R. 1996, *J. Bioenergetics and Biomembrane*, **28**:339-350.
- [10] Elfgang, C. et al., 1995, *J. Cell Biol.*, **129**:805-817.
- [11] Veenstra, R. D. 1996, *J. Bioenergetics and Biomembrane*, **28**:327-337.
- [12] Lo, C. W. 1996, *J. Bioenergetics and Biomembrane*, **28**:379-385.

## 双特异性抗体与肿瘤导向治疗研究新进展

袁金辉 张尚权 严缘昌

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

双特异性单克隆抗体(Bispecific monoclonal antibody,BSAb)是已发展起来的免疫治