

sche, pp. 229—235. Walter de Gruyter, Berlin.

[20] Uhlenbruck, G. et al., 1983, *Experientia*, 39: 1314—1315.

间隙连接通讯—生长调控—癌变三者之间的关系

林 仲 翔

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物室)

一、前 言

多细胞动物体内有严密的细胞间通讯网络,传递基因信号,调控细胞的增殖、分化和代谢功能,维持体内平衡。细胞间通讯的形式不同;信号物质如激素、生长因子等从一种细胞产生,经过体液循环,传送到靶细胞,这是远距离的细胞间通讯。另一种是细胞连接通讯;接触的细胞之间,细胞膜形成通道结构—间隙连接,能通透小分子的信号物如cAMP等,从一个细胞的胞质内传送信号到另一个细胞的胞质,是组织或细胞群体内信号传播的主要通道。现已知间隙连接的结构单位是连接子(Connexon)。连接子在电镜下是膜上的六角形小颗粒(60—80 Å直径);许多连接子密集的小区即是间隙连接^[1]。其生化成分主要是分子量28 kD的膜蛋白质。连接子由6个哑铃形、贯穿细胞膜的蛋白质亚单位组装形成,中心是直径约15 Å的亲水性通道。相邻的细胞膜对应面上的一对连接子构成间隙连接通道,只能通过1000—1600 D以下的小分子。实验证明,连接通道可允许带不同电荷的分子向不同的方向流动,这种流动是依赖于分子的化学浓度级差的扩散方式^[2]。通道的启、闭或有效直径的大小,受到细胞质局部条件如Ca²⁺浓度、pH等变动和细胞生理条件变动的影响而变化,反映在电镜下连接子颗粒数量、排列形式、密度及间隙连接分布数量的改变,也反映在细胞对示踪染料通透性和电偶合的强弱程度上。间隙连接通讯受到细胞内调控系统的调

节,弄清这些调节机制是了解间隙连接通讯在细胞功能活动中作用的关键。因此,连接通道组装和调节的分子机制成为有关基础研究的核心问题。研究间隙连接通讯常用的方法是电偶合技术、细胞代谢协同作用试验及荧光染料示踪方法^[2]。其中的FRAP方法^[3]可以定量地检测连接通讯功能。新近发展的划痕标记染料示踪技术^[4],操作简易,适用于检查各种培养细胞的间隙连接通讯功能。

间隙连接在胚胎发育的早期就存在,它们对胚胎组织的生长控制、形态发生及分化起重要作用^[5]。在成体组织和体外培养的细胞,它们与细胞增殖调控密切相关。许多肿瘤细胞缺少或无间隙连接通讯^[4]。正常细胞转化后的明显标志是丧失接触性抑制,间隙连接减少或消失。许多促癌剂(Tumor Promoter)有抑制连接通讯的作用^[6]。间隙连接通讯与生长调控及癌变的关系已成为重要的研究领域,近年来有更大的进展。我国关于间隙连接与胚胎发育的研究,引起国内外重视^[5,7],但与生长调控和癌变关系的研究刚开始。本文介绍这一领域的概况和新进展,试图引起人们重视,以利有关研究的开展。

二、间隙连接通讯与细胞生长调控

1. 间隙连接传送生长调节信号分子

细胞增殖的调控是在外来信号如激素、生长因子等刺激下,通过细胞内自身调控系统的作用进行的。这些自身调控的信号是通过许多离子和小分子如碱基、氨基酸、核苷酸、高能

磷酸盐、cAMP、抑素和干扰素等传送的。它们在细胞之间的流动受到间隙连接通讯机制的精细控制，保持细胞群体对生长刺激和调节反应的同步性，达到内部平衡，使增殖与分化按正常的基因程序进行。在个体发育过程中，某一组织或器官增长到一定体积，或体外培养细胞达到密度饱和和停止生长，可能与间隙连接通讯生长调节因子的作用有关^[8]。

2. 生长活跃的细胞的间隙连接通讯

两栖类胚胎卵裂期虽有间隙连接存在，但呈低功能状态^[9]。大鼠实验性肝部分切除后，局部再生的肝细胞间隙连接减少，通讯功能低下^[10]。当再生组织达到一定的体积，细胞增殖停止，间隙连接通讯功能恢复^[11]。培养的牛主动脉内皮细胞实验性创伤后，创伤边沿细胞的间隙连接通讯明显下降。细胞与创伤距离的远近和间隙连接通讯的强弱正相关^[12]。妊娠期子宫平滑肌细胞的间隙连接稀少，至分娩期子宫开始收缩前，间隙连接数量骤增^[13]。生长活跃的细胞间隙连接的低功能状态或许是保持生长刺激信号分子在细胞内的浓度，有利于细胞增殖^[2]。

3. Ca^{2+} 和 cAMP 对间隙连接通讯的影响

细胞内第二信使 Ca^{2+} 和 cAMP 在调控细胞生长和分化中有重要的作用。实验证明， Ca^{2+} 或 cAMP 水平的波动都影响细胞的连接通讯功能。细胞内 Ca^{2+} 含量的升高，抑制间隙连接通讯^[14]。显微注射 Ca^{2+} 到细胞内，或细胞培养在高 Ca^{2+} 浓度的基质内，或以诱导 Ca^{2+} 水平升高的物质如钙离子载体 A_{23187} ，促生长因子或佛波酯(TPA)等处理细胞，间隙连接通讯减弱或消失^[15,16]。细胞内 cAMP 水平升高使间隙连接通讯增强。以外源性 cAMP 注射给无通讯功能的细胞如转化细胞或通讯功能被药物抑制的细胞，可能连接通讯功能恢复^[17,18]。cAMP 受体缺陷的突变型细胞无通讯功能，在接受显微注射的外源性 cAMP 蛋白激酶催化亚单位后，连接通讯功能出现^[19]。

4. 间隙连接蛋白质的磷酸化与连接通讯

功能

细胞内自身调控的信使系统可能通过依赖于它们的蛋白激酶对间隙连接蛋白质的磷酸化作用调节连接通讯。已证明 cAMP 对大鼠肝细胞连接通讯的增强效应与依赖于 cAMP 的蛋白激酶(PKA)对 27 kD 多肽的磷酸化作用有关^[20]。PKA 也介导牛晶体 28 kD 多肽的磷酸化。钙调素(CaM)可能参与对间隙连接通讯的调节^[16]；依赖于 Ca^{2+} /CaM 的蛋白激酶可催化牛晶体 28 kD 多肽的磷酸化。依赖于双酰甘油酯(DG)活化的蛋白激酶 C(PKC)也促使牛晶体 28 kD 多肽的磷酸化^[21]。上述三种蛋白激酶活化的代谢途径之间可能通过反馈或负反馈机制相互协调统一，调控细胞增殖；间隙连接通道相应的变化可能是一个重要的环节。

5. 正常细胞与转化细胞之间的连接通讯与生长调控^[22]

化学转化或病毒转化的细胞与正常细胞混合培养时，转化细胞的生长受到抑制，与单独培养的转化细胞相比，集落生成数量明显减少，或集落变小。用显微注射荧光染料示踪方法证明，在转化细胞与正常细胞之间有异型细胞间隙连接通讯(Heterologous Communication)现象。另一些混合培养中，转化细胞的生长不受抑制，转化细胞与正常细胞之间的异型连接通讯很弱或无通讯。后一种混合培养中加入 cAMP-依赖性磷酸化作用的诱导剂后，异型细胞连接通讯作用明显增强，转化细胞的生长受到抑制。反之，在前一种有异型连接通讯的混合培养中加入维甲酸类试剂后，通讯被阻断，转化细胞生长抑制的现象消失。以上表明，间隙连接通讯很可能是正常细胞向转化细胞传送生长控制信号的途径。

6. 有关的假说

Loewenstein^[2,22]提出，细胞与细胞间的连接通道是传输生长调控信号的结构。根据这个假说，他用两种模式说明间隙连接的作用。一种是传输生长抑制信号的模式；间隙连接把生长抑制信号从生长静止的细胞传送入生长活跃

表 1^[2] 通讯功能缺陷的肿瘤细胞培养

细胞培养	来源	通讯功能
原代、细胞系	大鼠肝癌 Morris H 5123	无 (e. f. m)*
原代、细胞系	地鼠胚胎(x-ray)	无 (e. f. m)
原代、细胞系 MCF-7 T-231	人乳腺癌	无 (m. f.)
原代、细胞系	小鼠肿瘤 C1-1 D/人皮肤杂交	无 (e. f.)
细胞系 M, N-32, A ₂ , N ₁₈	小鼠神经母细胞瘤 C-1300	无 (e)
2 bps, 2 D 等	C 1-1 D/人皮肤杂交	无 (e. f.)
LN SV-78, 100, SV	人(SV-40)	弱通讯(m)
HT-1080, HT-1080.6 TG ^r	人成纤维肉瘤	弱通讯(m)
HeLa, HeLa 65	人宫颈癌	弱通讯(m)
D 98G	HeLa 细胞	弱通讯(m)

注*: e: 电偶合, f: 显微注射示踪分子, m: 代谢协同作用。

的细胞, 达到一定阈值时, 后者生长停止。第二种是传输生长刺激信号的模式, 又叫生长刺激信号稀释模式; 间隙连接把生长刺激信号从生长活跃的细胞内传输到周围细胞, 生长刺激信号分子分布在更大的细胞群体内, 受到稀释, 当水平低于阈值时, 生长停止。这一假说得到越来越多的实验资料支持。

三、间隙连接通讯与癌变的关系

肿瘤在某种意义上被称为“增殖病”。肿瘤细胞的主要恶性特征和对人生命的威胁是增殖的失控或无限增殖。这可能与间隙连接通讯功能的抑制或破坏有关。

1. 肿瘤细胞的连接通讯

以电偶合技术或荧光染料示踪技术与电镜冰冻蚀刻技术相结合, 前人曾观察了多种动物和人的肿瘤组织和体外培养的肿瘤细胞间隙连接通讯功能^[2, 23]。根据已有的资料, 可以归纳为三种情况: (a) 多数肿瘤细胞无连接通讯, 其间隙连接少或无; 邻近的正常组织或良性肿瘤的间隙连接正常; (b) 少数肿瘤细胞有脆弱的连接通讯, 但很容易受到破坏, 其间隙连接数量少; (c) 少数肿瘤细胞有连接通讯功能, 但比正常细胞低, 其间隙连接的数量也少(表 1, 2)。

虽然对肿瘤细胞间隙连接通讯的情况还不能得出结论性分析, 但总的趋势是大多数肿瘤

表 2^[30] 肿瘤组织细胞的间隙连接

器官	肿瘤名称	间隙连接 (超微结构)
乳 腺	乳腺癌(小鼠)	减少
	Villous 腺瘤(人)	正常*
肾	肝癌 BC ₃ (小鼠)	正常
	肝癌 H-31780(大鼠)	减少
肝	Germinoma, intracranial (Seminoma, 人)	正常
	Granulosa theca Cell 肿瘤 (人)	无
卵 巢	基底细胞癌(人)	减少
	鳞 癌 (人)	正常
皮 肤	Mesothelioma(大鼠)	无
	肉瘤(Moloney Virus, 大鼠)	正常
软 组 织	Leydig Cell Tumor	正常
	Seminoma(人)	正常
辜 丸	移行细胞癌(I 级)	正常
	移行细胞癌(II, III 级)	正常
输 尿 管、膀胱	乳头状腺癌(人)	正常
	鳞癌, 宫颈原位(人)	明显减少
子 宫	鳞癌, 宫颈(人)	明显减少或无

注*: 正常表示与肿瘤来源器官的正常细胞相比。

细胞的间隙连接减少或无通讯功能。肿瘤细胞表型的多样化(Diversification)与缺少细胞间通讯联络可能有关^[24]。

2. 癌基因表达与间隙连接通讯

近代关于癌基因与癌变关系研究的新成就

提示, 癌基因表达导致间隙连接变化与细胞转化有关^[25]。V-src, V-mos, V-ras病毒癌基因转化的NRK细胞温度敏感株, 细胞间隙连接结构改变, 连接通讯低于正常细胞^[26]。V-src癌基因转化的NIH-3T3细胞, 丧失接触性抑制, 细胞的PKC活性升高, 间隙连接通讯功能下降^[27]。间隙连接通讯功能减弱可能是病毒癌基因诱导细胞转化过程中的一个重要事件, 与PKC代谢途径的活化可能有关系。

3. 转化细胞与周围未转化细胞之间的连接通讯^[28]

BALB/C 3T3细胞可以被细胞癌基因PJE-ras转染而发生转化, 也可以被化学致癌剂MCA(3-methylcholanthrene)诱导转化。癌基因转化的细胞有明显的P²¹蛋白质表达, 而化学转化的细胞则无, 表明二种转化过程的不同分子机制。用显微注射荧光染料示踪法发现, 在二种转化过程中, 已转化的细胞和周围未转化的细胞之间的连接通讯完全阻断, 尽管正常与正常细胞之间或转化细胞与转化细胞之间仍有连接通讯功能。间隙连接通讯功能的阻断可能使转化的细胞脱离周围正常细胞的控制, 从而获得自主性生长^[28]。尽管细胞转化的分子机制不同, 转化细胞与未转化细胞间连接通讯的阻断是这类细胞转化的共同特征, 因此可能在同类型细胞系的转化研究中作为一种转化标志。

4. 促癌变(Tumor Promotion)与间隙连接通讯

癌变的多阶段学说得到许多体内、外实验的支持; 它包括(a)起始阶段——在致癌剂作用下细胞核内遗传物质DNA的变化使细胞向恶性转化; (b)促癌变阶段——少数开始转化的细胞在促癌剂作用下增殖, 形成肿瘤组织; (c)进展阶段——在致癌剂和促癌剂反复刺激下, 肿瘤发展。TPA是已证明的促癌剂, 它抑制V₇₉中国地鼠细胞的间隙连接通讯; 在电镜下检查, 间隙连接明显减少^[6]。TPA对其它已检查过的许多种培养细胞的连接通讯有抑制作用。

TPA不仅抑制同型细胞连接通讯, 也抑制异型细胞连接通讯^[22]。间隙连接通讯的抑制很可能是促癌变阶段的重要机制。TPA对间隙连接通讯的抑制作用在1979年被初次证明后, 其它促癌剂相继被证明有抑制间隙连接通讯的作用^[6]。因此, 间隙连接通讯的抑制被作为检测促癌剂的一个重要指标; 有关的检测方法如代谢协同试验、划痕标记荧光染料示踪技术, 已被用于检查可疑促癌剂的研究中, 成为非致突变性致癌剂或促癌剂检测中的一个重要有效手段, 有应用意义^[4, 6]。

5. 促癌剂TPA对细胞的多效应性的启示

TPA可能是通过基因后(Epigenetic)机制, 改变基因表达, 影响细胞的代谢、增殖和分化, 表现为多效应性。TPA可能改变膜的结构与功能, 和膜上受体的分布, 使某些生长因子受体表达“去压抑(derepression)”, 对细胞有促分裂效应; TPA抑制另一些细胞分化基因的表达^[6]。TPA抑制间隙连接通讯。TPA改变细胞内Ca⁺⁺水平和CaM含量, 活化依赖于Ca⁺⁺的代谢途径。PKC在细胞增殖信号转导中起关键作用, 受到DG的活化; 而TPA有类似DG活化PKC的作用^[20]。TPA可能影响cAMP水平和细胞骨架的组装^[6]。研究TPA作用下以上诸变化的内在连系, 可能对间隙连接在生长调控与癌变中的作用提供有意义的资料。

摘 要

间隙连接普遍存在于动物细胞, 是细胞群体内信号传递的主要途径, 对于传播生长调节信号, 调控细胞增殖有重要的作用。细胞增殖的不同状态, 其间隙连接通讯功能表现不同。许多转化的细胞和肿瘤细胞的间隙连接通讯低下或无通讯。间隙连接通讯的抑制或破坏可能与细胞生长失控有关, 被认为是癌变促癌阶段的重要机制。

参 考 文 献

- [1] Bennett, M. and D. Spray, eds. 1985. Gap

- Junctions. Cold Spring Harbor Laboratory.
- [2] Loewenstein, W. R., 1979. *Biochim. Biophys. Acta*, 560: 1—65.
- [3] Wade, M. H. et al., 1986. *Science* 232: 429—552.
- [4] El-Fouly, M. H. et al., 1987. *Exp. Cell Res.*, 168: 422—430.
- [5] Chuang, Tseng, M. P. 1986. In *Cellular Endocrinology*, pp. 35—44. Alan R. Liss, Inc.
- [6] Trosko, J. E. et al., 1982. *Carcinogenesis* 7: 565—585.
- [7] Tseng, M. P., 1987. *J. Electron Microscopy Technique* 7: 85—89.
- [8] Levine, E. M. et al., 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53: 350—356.
- [9] Slack, C., and J. P. Palmer, 1969. *Exp. Cell Res.* 55: 416—419.
- [10] Meyer, D. J. et al., 1981. *J. Cell Biol.*, 91: 505—523.
- [11] Yee, A. G., and J. P. Revel, 1978. *J. Cell Biol.*, 78: 554—564.
- [12] Larson, D. M., and C. C. Haudenschild, 1987. Abs. Intl. Congr. Gap Junction, pp. 23. Asilomar.
- [13] Garfield, R. E., 1987. Abs. Intl. Congr. Gap Junction, pp. 18. Asilomar.
- [14] Rose, B. et al., 1977. *Nature*, 267: 625—627.
- [15] Spray, D. C., and M. V. L. Bennett, 1985. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 281—303.
- [16] Trosko, J. E. et al., 1987. Abs. Intl. Congr. Gap Junction, pp. 32. Asilomar.
- [17] Azarnia, R. et al., 1981. *J. Membr. Biol.*, 63: 133—146.
- [18] Flagg-Newton, J. et al., 1981. *J. Membr. Biol.*, 63: 105—121.
- [19] Erik, C. et al., 1983. *Nature*, 305: 433—435.
- [20] Saez, J. C. et al., 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2473—2477.
- [21] Lampe, P. D. et al., 1987. Abs. Intl. Congr. Gap Junction, pp. 22. Asilomar.
- [22] Mehta, P. P. et al., 1986. *Cell*, 44: 187—196.
- [23] Swift, J. G. et al., 1983. *J. Submicrosc. Cytol.*, 15: 799—810.
- [24] Nicolson, G. L., 1987. *Cancer Res.*, 47: 1473—1487.
- [25] Azarnia, R. and W. R. Loewenstein, 1984. *J. Membr. Biol.*, 82: 191—205.
- [26] Atkinson, M. 1987. Abs. Intl. Congr. Gap Junction, pp. 8. Asilomar.
- [27] Chang, C. C. et al., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5360—5364.
- [28] Yamasaki, H. et al., 1987. *Cancer Res.*, 47: 5658—5664.
- [29] Nishizuka, Y., 1984. *Nature*, 308: 693—698.
- [30] Weinstein, R. S. et al., 1976. *Adv. Cancer Res.*, 23: 23—89.

植物细胞固定化的生产技术

田中 渥夫

利用细胞筛选和最适宜的培养基、培养条件，建立有用物质高产的植物培养细胞系已在前面（细胞生物学杂志 1986，8卷第三期至1988年10卷第一期）详细叙述过。但是为了工业化的稳定生产这些有用物质，尚应解决几个问题。

- 1) 生产性能低：由于筛选增加了生产量，但因生长发育迟缓而生产性能低；
- 2) 生产的不稳定性：在各种培养中，生产性能有变动；
- 3) 发生在大量培养时的困难等等。

由于反复筛选提高了生产性能，以及随之大量培养技术的确立（请参考下节），利用细胞固定化是提高并稳定生产性能的有力解决方法。

固定化细胞的优点为：

- 1) 高度保持反应槽内的细胞（生物体催化剂）量，能提高反应效率；
- 2) 固定化使反应活性稳定，能够长期连续运行；
- 3) 产物易于和作为催化剂的细胞分离；
- 4) 柱式或槽式有可能连续运转，易于控制生产中最适的环境条件、基质浓度等，能使生产稳定；