

· 综 述 ·

Connexin43 介导的缝隙连接与心血管疾病研究进展

沈文娟¹, 张 琛², 刘语新³, 徐建辉³综述, 魏 威^{3△}审校

(湖北省孝感市中心医院: 1. 重症监护室; 2. 急诊科; 3. 中心实验室, 湖北孝感 432000)

摘 要:半通道蛋白 Connexin(Cx)是一种跨膜蛋白,通常以六聚体形式在细胞膜的特定区域形成缝隙连接通道,允许小分子物质通过。心血管系统内有多种 Cx 蛋白表达,其中 Cx43 表达最为广泛,由 Cx43 组成的缝隙连接介导心肌细胞间电化学信号传递和物质交换,在维持正常心脏功能中起着重要的作用。近年来文献报道,Cx43 结构、数量或其分布的变异与多种心血管疾病有关,如先天性心脏病、肥厚型心脏病、心律失常、高血压以及心力衰竭等。因此,该文对 Cx43 与心血管疾病关系作一综述。

关键词:缝隙连接; Connexin43; 心血管疾病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.21.028

中图法分类号:R54

文章编号:1673-4130(2018)21-2702-04

文献标识码:A

细胞膜上存在两类主要的转运蛋白,即载体蛋白和通道蛋白。通道蛋白是一类横跨质膜的亲水性通道,允许适当大小的离子顺浓度梯度通过。在脊椎动物界,目前认为存在两种通道蛋白:Connexin(Cx)和 Pannexin(Panx)。6 个半通道蛋白 Cx 环绕组成六聚体,镶嵌在细胞膜而形成半通道,相邻细胞的半通道蛋白可两两对接形成缝隙连接。缝隙连接在开放状态时允许小分子($<1\ 000 \times 10^3$)物质通过,可传导电化学信号,从而形成细胞间通讯参与细胞病理生理活动^[1]。目前,在人类基因组中 21 种 Cxs 亚型和小鼠基因组中的 20 种 Cxs 亚型已经被确认。Cxs 蛋白家族有着相似的拓扑膜结构,其中包括 4 个跨膜结构域(M1~M4),2 个胞外环(E1、E2),3 个胞内段[N 末端(N-)、细胞 C 末端(C-)和胞浆环]。已有研究发现 Cxs 家族胞外环 E1、E2 及跨膜结构域 M3 变异较大,而 C 端和 N 端则相对保守,这些不同程度的变异导致了 Cxs 蛋白家族的多态性。有研究表明,Cxs 蛋白的功能调节位点大多位于羧基端,各类激素及炎症因子理化因素等可使 Cxs 蛋白羧基端(241~382 位氨基酸)磷酸化,从而调节缝隙连接的功能,Cx43 的磷酸化大多发生在丝氨酸上^[2]。

1 Cxs 在心血管系统中的表达

1.1 在心脏组织中有多种 Cxs 蛋白广泛表达,且不同的 Cxs 有不同的表达模式。Cx2、Cx3、Cx4 在某些特定的心肌组织中(如心肌细胞、心房肌细胞和传导系统)表达量随时间变化而变化,如胚胎期和出生后的 Cx2 表达量不同。Cx40、Cx43、Cx45 和 Cx30.2 的表达具有时空特异性,见图 1。Cx45 是心脏发育中

最先表达的通道蛋白,且在心脏组织中广泛表达,其他 Cxs 在心脏发育后期特定表达,Cx30.2 在传导系统中特异性表达,Cx43 主要表达在心室肌细胞和心房肌细胞。随着心脏组织发育,Cx43 和 Cx40 共表达逐渐增加,导致 Cx45 表达水平显著低于其他 Cx 蛋白水平,目前的实验方法(如免疫荧光法等)无法准确地检测 Cx45 表达部位及表达含量^[3]。Cx43 在种间具有高度保守性,人类和与大鼠 Cx43 氨基酸序列同源性高达 97%,仅 9 个氨基酸不同^[4]。

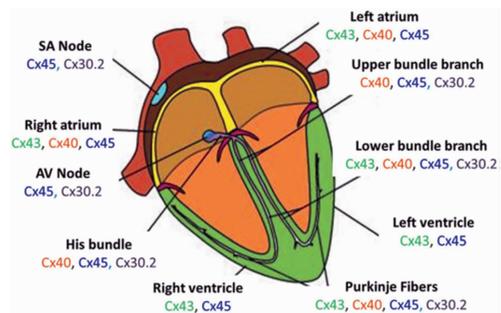


图 1 心脏组织中 Cx 表达模式

1.2 Cx43 在心脏组织发育过程中的表达有严格的时空调节机制。Cx43 最早出现于胚胎期(13~14 d)心房前游离壁以及心室肌小梁。当心脏形态基本发育完成时(16~20 d),Cx43 几乎在整个心脏均有表达包括心房肌细胞、心室肌细胞、窦房结、房室束、房室结和近端束支等,且在心脏发育完成后表达部位基本不变,但 Cx43 在细胞上的分布有一定的变化,出生时在心肌细胞均匀分布,而后重新分布逐渐集中在心肌闰盘处。Cx43 表达水平在心脏发育中也存在一定的规律,胚胎期大鼠心脏 Cx43 mRNA 表达增加,出生

△ 通信作者, E-mail: 283928430@qq.com。

后 9 d 达到峰值,后逐渐降至 50%。蛋白表达水平也呈同样的趋势,但相对于 mRNA 时间上有所滞后,在出生后逐渐增加到峰值,随后逐渐下降到峰值的 63%。血管内皮存也在多种 Cxs 蛋白表达(通常表达 Cx37、Cx40、Cx43),与血管系统发育有关。Cx37 单独缺失对血管系统发育无明显影响,而 Cx37 和 Cx40 同时缺失将导致小鼠胃肠系统、生殖系统、呼吸系统等发生严重的血管畸形,将在出生后 1 d 死亡。而 Cx37 的多态性与动脉粥样硬化、心肌梗死等心血管疾病有关^[5]。Cx43 则与血管内皮细胞的增殖和迁移有关,细胞周期素 E 可通过 Cx43 激活 MAPK 通路,调节血管内皮细胞增殖与迁移^[6]。Cx43 是心血管系统中表达最为广泛的通道蛋白,Cx43 介导的缝隙连接在心血管系统的发育和功能起着重要的作用,Cx43 蛋白异常与多种心血管疾病相关,本文将对 Cx43 介导的缝隙连接与心血管疾病作一综述。

2 Cx43 与心律失常

2.1 缝隙连接是相邻的心肌细胞传导电化学信号的重要通道,维持心肌细胞间通讯,调控和保证心脏的正常节律性。Cx 蛋白重构包括表达量变化、重新分布或组合异常等,可引起心肌细胞通讯异常,从而诱发心律失常。Cx43 是心脏工作细胞表达的最主要通道蛋白,它的表达水平和磷酸化水平下降以及分布异常均可使心脏传导速率降低,导致心律失常^[7]。Cx43 表达下调 90% 可使心脏电传导速率降低 50%;而 Cx43 表达下调 50%,除能减慢传导速率外,还可导致大量电耦合脱耦联,导致室性心律失常。Cx43 缺失也可引起心律失常,GUTSTEIN 等^[8]发现 Cx43 敲除后的小鼠 2 个月后死于自发性室性心律失常,电生理检查显示,与对照组相比心室传导横向速率下降 55%,纵向速率下降 42%,GUTSTEIN 等认为这可能是由于 Cx43 缺失可使心肌细胞间脱耦联和细胞通讯异常,从而导致电传导异常,引发心房颤动。

2.2 Cx43 异常分布与多种心脏疾病所致的心律失常有关,如心肌缺血、心肌炎、扩张性心肌病等。正常的心肌组织 Cx43 集中分布在心肌闰盘处,当 Cx43 发生重排,散在分布在细胞膜表面时,可引发心律失常,这可能是由于 Cx43 重分布,导致心肌细胞内钙超载。KITAMURA 等^[9]研究非缺血性扩张型心肌病发现,右心室射血分数与 Cx43 含量无明显相关,但其中 23% 的持续性室性心动过速的患者,与无室速患者相比,左心室 Cx43 含量明显降低,且 Cx43 分布不均,提示 Cx43 表达量增加以及均匀分布的恢复在改善心肌细胞间传导和抑制心律失常中起着重要的作用。心房颤动是最常见的异构所致的持续性心律失常,包括结构重置和电重构。AMPK 磷酸化在阵发性心房颤动中增加,而慢性房颤中减少,提示 AMPK 磷酸化增

加是房颤早期适应性反应,而 AMPK 磷酸化下调则可加速房颤进展。CHEN 等^[4]在研究新生儿成纤维细胞时发现,Cx43 是 AMPK 下游分子信号,运用 AMPK 激动剂可增加 Cx43 蛋白表达,提示房颤进展期可能与 AMPK 磷酸化下调所导致的 Cx43 蛋白表达下调有关。房颤发生后心肌细胞耗能增加,细胞内 ATP 水平降低,AMPK 磷酸化水平降低,部分学者认为细胞内 ATP 水平的改变可使 AMPK 磷酸化,激活 mTOR 信号通路,从而降低 Cx43 蛋白的表达。而 Alesutan 得出相反的结论,他们发现 AMPK 的催化亚基 $\alpha 1$ 可加速 Cx43 泛素化,减少心肌细胞 Cx43 的表达,但是对 Cx43 转录水平并无明显影响。Cx43 与 AMPK 磷酸化的关系还有待进一步研究。

3 Cx43 与肥厚型心肌病

肥厚型心肌病是心肌最常见的遗传性疾病,其特征是心脏增厚,尤其是左心室壁。它与猝死有关,特别是在青壮年,在一般人群发病率为 1/500。在主动脉瓣狭窄或慢性高血压等疾病中心室压力负荷超载,从而导致心肌细胞肥大、排列紊乱、纤维化,心室改变可能是肥厚型心肌病最危险的因素之一。缝隙连接的数量和分布在肥厚型心肌病进展中不断发生变化,在代偿初期 Cx43 表达不变或者增加,而在进展期心肌细胞膜表面 Cx43 重新分布以及表达量降低。ITO 等^[10]利用主动脉和腔静脉造瘘所创的左心室超负荷模型中,心肌肥厚初期 Cx43 表达增加,但在进展期表达下降;他利用颈动脉和颈动脉分流术所创的兔心室超负荷模型中也得到类似结论,分流术后 12 周 Cx43 mRNA 表达明显低于对照组,且 Cx43 分布发生重排,大部分散在分布在细胞膜表面,而心肌闰盘处 Cx43 分布比例相对减少。SEVERIS 等^[11]研究原发性心肌扩张病时发现,浦肯野纤维网旁的心内膜处心肌细胞 Cx43 蛋白和 mRNA 表达下调伴随 Cx40 蛋白和 mRNA 表达上调,这可能是对 Cx43 下调的补偿机制。病理性心肌肥厚是由于心肌细胞特异性 microRNA-1(miR-1)下调,而 Cx43 是 miR-1 的上游分子靶点,CURCIO 的团队发现,miR-1 下调与 Cx43 蛋白表达增加以及经 MAPK-ERK1/2 途径磷酸化增强有关^[12]。总之,Cx43 介导的心肌肥厚机制可能是,在心肌肥厚代偿期 Cx43 表达增加,经 Cx43 介导 MAPK-ERK1/2 通路磷酸化增加,从而导致心肌细胞特异性 miR-1 下调,最终使心肌细胞肥大并出现纤维化。

4 Cx43 和先天性心脏疾病

缝隙连接心脏发育过程中起着重要的调控作用,维持正常心肌细胞的增殖与分化,多项研究表明,Cx43 突变可导致多种先天性心脏病。BRITZ-CUNNINGHAM 等^[13]研究儿童先天性心脏病时发现,在

30 例患儿中 23 例没有出现 Cx43 的氨基酸突变,而 6 例复杂先天性心脏病患儿发现有一个或多个丝氨酸或苏氨酸磷酸化位点突变,其中 2 例出现独立突变位点,5 例出现 Ser364Pro 突变。体外实验显示,转染使心肌细胞 Cx43 蛋白的 Ser364Pro 突变,出现细胞间通讯功能失调。DASGUPTA 等^[14]对 20 多种复杂先天性心脏病进行基因测序,检测 20 例复杂先天性心脏病患者的 Cx43 基因编码序列,发现其中 9 例患者 5 号染色体上 Cx43 均存在 4 个突变位点,提示先天性心脏病与 Cx43 基因突变有关。Cx43 蛋白表达量增加或减少也可引起心脏畸形。REAUME 等^[15]发现,Cx43 突变与胚鼠生存率密切相关,Cx43 缺失的胚鼠在宫内可存活,但出生后不久则发生缺氧死亡,心脏解剖发现右心室流出道膨隆并阻塞,引起肺换气异常,最终导致胚鼠死亡,而 Cx43 过表达的小鼠出现右心室流出道梗阻畸形,而将 CMV Cx43 转入 Cx43^{-/-}小鼠体内,能明显改善小鼠的生存率。

总之,Cx43 在心脏发育中具有重要的调控作用,它的表达量变化或突变,都可影响心脏的正常发育,导致先天性心脏病。提示 Cx43 有望成为干预先天性心脏病的新的靶点。

5 Cx43 和高血压

根据目前的研究,缝隙连接通过控制肾素的释放参与高血压的形成。肾素-血管紧张素系统包括肾素、血管紧张素原、血管紧张素转化酶、血管紧张素 I、II、III,是细胞外液量和血压的调节系统,在调节肾小球血流动力学中起关键作用。Cx37、Cx40 及 Cx43 在肾小球入球小动脉和肾小球旁器中均有高表达,HAEFLIGER 及其团队研究 Cx43KI32 小鼠系(即 Cx43 编码区被 Cx32 编码区替代的小鼠系)发现,与野生鼠和 KI32 杂合小鼠相比,KI32 纯合鼠肾素分泌明显减少。经过高盐饮食饲养 4 周后,野生鼠和 KI32 杂合鼠肾素分泌及血压均明显升高,而 KI32 纯合小鼠肾素分泌和血压均保持正常^[16]。提示 Cx43 缺失可减少肾素分泌,从而阻止高盐模型下肾素型高血压。IRAVANIAN 等^[17]研究发现,抑制肾素-血管紧张素系统,则可增加 Cx43 磷酸化及其总表达量。不论在大动脉还是小动脉中,高血压均可改变血管内皮细胞和平滑肌细胞中 Cx 蛋白的表达,在肾素型高血压中,Cx43 表达明显增加,其机制可能与血管紧张素 II 激活 NF- κ B 信号通路有关。以上研究结果提示,肾素分泌与 Cx43 表达可能存在相互影响,且根据设计的模型不同,互相影响的方式不同,其相互作用其机制还有待进一步研究。

6 Cx43 与心力衰竭

Cx43 组成的缝隙连接在心室肌组织中广泛、大量表达,其信息传导具有低电阻、高转导的特点,在维

持心肌细胞同步收缩中起着重要的作用。如若 Gj/Cx43 数量分布或结构发生异常,将会出现心脏同步收缩功能失常,泵血功能下降,最终导致心力衰竭,SCHULZ 等^[18]研究发现在终末期心脏动物模型中,Cx43 总表达以及在由 Cx43 组成的缝隙连接表达下降是心力衰竭的独立危险因素。在人类心力衰竭的离体心脏组织中,Cx43 表达下调且 Cx43 发生重分布,利用腺病毒使衰竭的心脏组织中 Cx43 过表达,可使心肌细胞间偶联增加,提高心肌收缩功能。GIVVIMANI 等^[19]在研究衰竭的心脏组织中 Cx43 表达变化的具体机制时发现,Cx43 表达下降可能与线粒体自噬增加,以及基质金属蛋白酶活化有关,而抑制线粒体分裂则可部分逆转 Cx43 表达下调,还可增加 miR-19a/b 表达。以上研究结论提示 Cx43 蛋白表达下降是心力衰竭发生的危险因素,其机制可能与心肌细胞线粒体自噬有关。

综上所述,Cx43 蛋白在心血管系统中广泛存在,传导细胞间电化学信号,介导细胞间通讯,在维持心脏正常发育和功能中起着重要的作用,如果 Cx43 发生突变、分布重排、表达水平增加或减少及磷酸化状态改变都可能导致心脏发育异常以及功能紊乱。Cx43 还通过影响肾素的合成和释放参与肾素型高血压的形成。但是由于 Cx43 异常而引起心血管疾病的具体机制还尚未研究清楚,仍需进一步研究。根据目前的研究成果提示,Cx43 有望成为治疗心血管疾病的新的靶点,针对 Cx43 的临床药物需进一步开发。

参考文献

- [1] RIQUELME M A, KAR R, GU S, et al. Antibodies targeting extracellular domain of connexins for studies of hemichannels[J]. *Neuropharmacology*, 2013, 75(12): 525-532.
- [2] JOHNSON K E, MITRA S, KATOCH P, et al. Phosphorylation on Ser-279 and Ser-282 of connexin43 regulates endocytosis and gap junction assembly in pancreatic cancer cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(6): 715-733.
- [3] MCCAIN M L, DESPLANTEZ T, GEISSE N A, et al. Cell-to-cell coupling in engineered pairs of rat ventricular cardiomyocytes: relation between Cx43 immunofluorescence and intercellular electrical conductance[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302(2): H443-450.
- [4] CHEN F, ZHAO W T, CHEN F X, et al. High glucose promotes gap junctional communication in cultured neonatal cardiac fibroblasts via AMPK activation[J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2014, 48(4): 687-695.
- [5] MEENS M J, PFENNIGER A, KWAK B R, et al. Regulation of cardiovascular connexins by mechanical forces and junctions[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(2): 304-314.
- [6] JOHNSTONE S R, KRONCKE B M, STRAUB A C,

- et al. MAPK phosphorylation of connexin 43 promotes binding of cyclin E and smooth muscle cell proliferation [J]. *Circ Res*, 2012, 111(2):201-211.
- [7] GAO J, ZHAO Y, WANG Y, et al. Anti-arrhythmic effect of acupuncture pretreatment in the rats subjected to simulative global ischemia and reperfusion--involvement of intracellular Ca²⁺ and connexin 43 [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15:5.
- [8] GUTSTEIN D E, MORLEY G E, TAMADDON H, et al. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43 [J]. *Circ Res*, 2001, 88(3):333-339.
- [9] KITAMURA H, OHNISHI Y, YOSHIDA A, et al. Heterogeneous loss of connexin43 protein in nonischemic dilated cardiomyopathy with ventricular tachycardia [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2002, 13(9):865-870.
- [10] ITOH M, TAKEISHI Y, NAKADA S, et al. Long-term treatment with angiotensin II type 1 receptor antagonist, CV-11974, restores beta-catenin mRNA expression in volume-overloaded rabbit hearts [J]. *Heart Vessels*, 2002, 17(1):36-41.
- [11] SEVERS N J, COPPEN S R, DUPONT E, et al. Gap junction alterations in human cardiac disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2):368-377.
- [12] CURCIO A, TORELLA D, IACONETTI C, et al. MicroRNA-1 downregulation increases connexin 43 displacement and induces ventricular tachyarrhythmias in rodent hypertrophic hearts [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e70158.
- [13] BRITZ-CUNNINGHAM S H, SHAH M M, ZUPPAN C W, et al. Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality [J]. *N Engl J Med*, 1995, 332(20):1323-1329.
- [14] DASGUPTA C, MARTINEZ A M, ZUPPAN C W, et al. Identification of connexin43 (alpha1) gap junction gene mutations in patients with hypoplastic left heart syndrome by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [J]. *Mutat Res*, 2001, 479(1/2):173-186.
- [15] REAUME A G, DE SOUSA P A, KULKARNI S, et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43 [J]. *Science*, 1995, 267(5205):1831-1834.
- [16] HAEFLIGER J A, KRATTINGER N, MARTIN D, et al. Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(2):405-413.
- [17] IRAVANIAN S, SOVARI A A, LARDIN H A, et al. Inhibition of renin-angiotensin system (RAS) reduces ventricular tachycardia risk by altering connexin43 [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2011, 89(7):677-687.
- [18] SCHULZ R, GORGE P M, GORBE A, et al. Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 153:90-106.
- [19] GIVVIMANI S, PUSHPAKUMAR S, VEERANKI S, et al. Dysregulation of Mfn2 and Drp-1 proteins in heart failure [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92(7):583-591.

(收稿日期:2018-03-12 修回日期:2018-06-02)

• 综 述 •

POCT 误区分析及其分析对策

黎灵锋, 刘桂荣 综述, 韦慧萍 审校

(中山大学附属第三医院粤东医院检验科, 广东梅州 514700)

摘要: 随着免疫技术、分子生物技术的发展,以及人群整体素质和生活水平的提高,人们对自身机体健康越加重视。同时医学模式的改变,使得即时检验技术(POCT)的应用越来越广泛。目前,POCT 主要运用于心血管疾病、感染性疾病、内分泌疾病及优生优育等方面的检测。然而由于 POCT 自身的特点、质控体系的不完善、操作人员水平参差不齐等,使得 POCT 检测结果的可靠性低。因此,POCT 误区认识和分析,对其正确的使用尤为重要。

关键词: POCT; 误区; 分析对策

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.21.029

文章编号: 1673-4130(2018)21-2075-04

中图法分类号: R197.39

文献标识码: A

即时检验技术(POCT)是指在实验室外,靠近检验对象,并且能在短时间内得到结果的一种检验技术^[1]。它包括两个层面的含义:其一是地点,在接近患者或者现场进行,即床旁检验;其二是时间,在发病时进行检验,结果的即时性,即即时检验^[2]。

1 POCT 的应用概况

美国国家临床生化科学院在其《POCT 循证文件》草案中,定义到“在接近患者治疗处,由未接受临床实验室科学训练的临床人员或患者进行的临床实验室检验”。该定义指出了 POCT 的特点:(1)可由非