

分类号:
学 号: 2012109003

密 级:
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



自发性高血压和正常血压大鼠脑动脉缝隙连接的 表达和功能差异

学 位 申 请 人	潘 立 君
指 导 教 师	马 克 涛
申请学位门类级别	理 学 硕 士
学 科 、 专 业 名 称	生 理 学
研 究 方 向	神 经 生 理 与 血 管 生 理
所 在 学 院	医 学 院

中国·新疆·石河子

2015年5月

分类号:
学 号: 2012109003

密 级:
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



自发性高血压和正常血压大鼠脑动脉缝隙连接的 的表达和功能差异

学 位 申 请 人	潘 立 君
指 导 教 师	马 克 涛
申请学位门类级别	理 学 硕 士
学 科 、 专 业 名 称	生 理 学
研 究 方 向	神 经 生 理 与 血 管 生 理
所 在 学 院	医 学 院

中国·新疆·石河子
2015年5月

**The differences gap junction in the expression and function of
cerebral artery in spontaneously hypertensive and normotensive
rat**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Natural Science

By

Pan Li Jun

(Physiology)

Dissertation Supervisor: Prof. Ma Ke Tao

May, 2015

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：潘立君

时间：2015年6月12日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：潘娟

时间：2015年6月12日

导师签名：马克刚

时间：2015年6月15日

摘 要

目的: 观察自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉细胞间缝隙连接通道功能和连接蛋白 (connexin, Cx) 表达的变化, 进而探讨脑动脉中缝隙连接的功能和表达与高血压发病的相关性。

方法: 应用全细胞膜片钳观察 SHR 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉平滑肌细胞间缝隙连接通讯功能的变化; 应用 RT-PCR 和 Western blot 技术比较 SHR 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉中 Cx37、Cx40、Cx43 和 Cx45 的 mRNA 和蛋白表达差异; 采用透射电镜技术比较 SHR 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉缝隙连接的形态学改变。

结果: (1) 全细胞膜片钳技术结果显示 SHR 脑动脉平滑肌细胞膜电容和膜电导都显著高于正常血压 Wistar 大鼠 ($P < 0.05$), 提示 SHR 脑动脉平滑肌细胞间缝隙连接通讯能力增强。

(2) RT-PCR 检测 SHR 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉 Cx37、Cx40、Cx43 和 Cx45 mRNA 的表达。与正常血压大鼠相比, SHR 脑动脉 Cx37 和 Cx40 mRNA 的表达显著下调 ($P < 0.01$); Cx43 mRNA 的表达与正常血压大鼠相比, 无显著差异 ($P > 0.05$); 此外, SHR 脑动脉 Cx45 mRNA 的表达较正常血压大鼠显著升高 ($P < 0.01$)。

(3) Western blot 检测 SHR 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉中 Cx 蛋白表达, 结果显示出与转录水平相一致的结果, 即: 与正常血压大鼠相比, SHR 脑动脉 Cx37 和 Cx40 蛋白的表达明显降低 ($P < 0.05$); SHR 脑动脉 Cx43 蛋白表达无统计学差异 ($P > 0.05$), 但 Cx43 的磷酸化水平显著高于正常血压大鼠 ($P < 0.01$); SHR 脑动脉 Cx45 的表达水平显著高于正常血压大鼠 ($P < 0.01$)。

(4) 透射电镜检测 SHR 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉平滑肌细胞间缝隙连接的数量发现, 与正常血压大鼠比较, SHR 脑动脉平滑肌细胞间缝隙连接的数量显著升高。

结论: SHR 脑动脉平滑肌细胞间的缝隙连接通讯能力增强。缝隙连接可能通过下调血管内皮 Cx37 和 Cx40 的表达并上调平滑肌细胞 Cx45 的表达来调节脑动脉舒缩活性, 进而影响高血压的发生发展。

关键词: 自发性高血压大鼠; 高血压; 脑动脉; 缝隙连接; 连接蛋白

论文类型: A (基础研究)

Abstract

Objective: To investigate the change of connexins (Cxs) in brain artery (BA) of spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar rats.

Methods: whole cell patch clamp investigate the electrophysiological properties of gap junction in BA between the SHR and Wistar rats. RT-PCR and Western blot were used to investigate the difference express of gap junction in BA between the SHR and Wistar rats. Application of transmission electron microscopy to observation the morphological change of gap junction between smooth muscle cells in BA.

Results: (1) Whole cell patch clamp technique found the membrane capacitance and conductivity to artery smooth muscle cell in brain of SHR were obviously higher than normal Wistar rats ($P<0.05$). Indicate that gap junctional intercellular communication capacity enhancement between cerebral artery smooth muscle cell of SHR.

(2) RT-PCR detected the expression of Cx37、Cx40、Cx43 and Cx45 mRNA to SHR and normotensive Wistar rat in brain artery. Compared with that of the normotensive rats, the level of Cx37 and Cx40 mRNA expression in MA from SHR was decreased by RT-PCR technology ($P<0.01$); Cx45 mRNA expression in MA from SHR was significantly increased compared with the normotensive rats ($P<0.01$), but no change in the expression of Cx43 mRNA ($P>0.05$).

(3) Western blot detected the protein expression of connexin in brain artery to SHR and normotensive Wistar rat. The results show consistent with the transcript levels. Compared with normotensive rats, the protein expression of Cx37 and Cx40 was significantly reduced in brain artery of SHR ($P<0.05$); The protein expression of Cx43 in brain artery have no statistical difference between two kinds of rat ($P>0.05$), but the phosphorylation level of Cx43 was significantly higher than normotensive rats ($P<0.01$); The expression of Cx45 in brain artery of SHR was significantly higher than normotensive rats ($P<0.01$).

(4) The number of gap junctions between smooth muscle cells was significantly higher to SHR in brain artery than normotensive rats by transmission electron microscopy.

Conclusion: Through the experiment results indicate the gap junction communication between SHR brain artery smooth muscle cells is enhancement. Gap junction may by lowering the Cx37 and Cx40 on the vascular endothelial cells and elevating the expression of Cx45 to regulation of smooth muscle cells in the brain artery diastolic activity that will affect hypertension development and progression.

Key words: SHR; Hypertension ; Brain artery; Gap junction; Connexin

Type of Thesis: A (Basic Research)

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
英文缩略语表.....	IV
前 言.....	1
材料与方法.....	3
1 材料.....	3
1.1 实验动物.....	3
1.2 主要试剂.....	3
1.3 主要实验仪器.....	4
2 方法.....	5
2.1 溶液配制.....	5
2.2 大鼠无创血压测定.....	6
2.3 全细胞膜片钳技术.....	7
2.4 大鼠脑动脉血管取材.....	7
2.5 RT-PCR技术检测Cx37、Cx40、Cx43 和Cx45 mRNA 水平.....	7
2.6 Western-Blot技术检测Cx37、Cx40、Cx43 和Cx45 蛋白表达.....	8
2.7 统计学处理.....	11
实 验 结 果.....	12
1 SHR和Wistar大鼠尾动脉血压.....	12
2 SHR和正常血压Wistar大鼠脑动脉平滑肌细胞电生理特性比较.....	12
3 SHR和正常血压Wistar大鼠脑动脉Cx37 和Cx40 mRNA表达.....	12
4 SHR和正常血压Wistar大鼠脑动脉Cx43 和Cx45 mRNA表达.....	13
5 SHR和正常血压大鼠脑动脉Cx37 和Cx40 蛋白表达.....	14
6 SHR和正常血压大鼠脑动脉Cx43 和Cx45 蛋白表达.....	15
7 SHR和正常血压大鼠脑动脉平滑肌细胞间缝隙连接形态学变化.....	15
讨 论.....	17
结 论 与 展 望.....	19
1 结论.....	19
2 展望.....	19
参 考 文 献.....	20
文 献 综 述.....	23
致 谢.....	31
作 者 简 介.....	32

英文缩略语表

List of Abbreviations

英文缩写	英文全名	中文译名
VSMCs	Vascular smooth muscle cells	血管平滑肌细胞
GJ	Gap junction	缝隙连接
GJIC	Gap junction intercellular communication	缝隙连接细胞间通讯
Cx	Connexin	连接蛋白
BA	Brain artery	脑动脉
EC	Endothelial cell	内皮细胞
SHR	Spontaneously Hypertension Rat	自发性高血压大鼠
SMC	Smooth muscle cell	平滑肌细胞
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
G_{input}	membrane conductance	膜电导
C_{input}	membrane capacitance	膜电容
R_{input}	membrane resistance	膜电阻

前 言

(Preface)

高血压是一种以心输出量和外周阻力增加导致动脉血压持续升高为主要表现的慢性疾病，常引起一些重要器官（心、脑、肾等）病变并出现相应后果。高血压常引起脑血管疾病，脑血管疾病是较为常见的急症，是指脑动脉发生持久而严重的痉挛或动脉血栓导致栓塞，造成大脑缺血缺氧。在我国流行病学统计中发现急性脑血管疾病的发生率和死亡率明显高于冠心病，其中脑卒中的发生比例较高。脑卒中作为危害人类生命和健康的心血管疾病，其发病关键部位位于血管^[1]，当脑动脉管腔发生狭窄或闭塞时，导致大脑缺血、缺氧，最终导致脑血栓形成。长期性高血压也可引起微动脉管壁发生变性和坏死从而形成动脉瘤；血压的突然升高，也可使硬化的血管突然破裂出血，从而引起中风。外周阻力血管的压力增高往往是高血压的直接发病原因之一^[2]，可导致重要器官（心、脑、肾）及周围血管内皮功能障碍。众所周知，血管外周阻力及血压主要由微、小动脉的肌源性张力改变而形成，全身血管紧张度增加是血管相关疾病的发病的关键，血管紧张度的调节依赖于细胞间信号物质的传递及相应血管平滑肌的舒缩活动来调节。细胞间缝隙连接进行直接信息交流的异常改变与血管紧张度密切相关^[3]。

缝隙连接（gap junction, GJ）是细胞之间直接进行信息交流及物质交换的主要途径，GJ是由相邻细胞膜上的两个连接子相互锚定而形成的一种特殊的细胞膜结构。连接子又称为半通道，是由六个相同或不同的亚单位也就是连接蛋白（Connexin, Cx）而组成^[4]。相邻细胞膜之间的GJ能够容许相对分子质量小于 1KD的物质，如无机离子、氨基酸、葡萄糖及第二信使（cAMP、IP₃、Ca²⁺）等自由通过，其在细胞的增殖、分化、胚胎发育、新陈代谢以及组织器官的协同有序活动等生理过程中占据着至关重要的调控作用^[5]。缝隙连接蛋白种类很多，目前，已在人类发现 21 种Cx基因组，在大鼠中发现 20 种Cx基因^[6]，在心血管系统中主要表达Cx37、Cx40、Cx43 以及Cx45^[7]，在血管的内皮细胞上主要表达Cx37、Cx40 以及Cx43，Cx37 表达量最高^[8]，平滑肌细胞上除了表达Cx43 以及Cx45，也会低水平表达Cx37 和Cx40^[9]。分布的差异性和GJ功能的改变对血管紧张性的调节有着重要作用。在某些病理情况下，GJ结构及功能受到损伤，会使血管细胞间同步收缩出现障碍^[10]。

血管壁主要由内皮以及平滑肌组成，GJ介导的电以及化学信号交流普遍存在于内皮细胞之间、平滑肌细胞之间及内皮细胞和平滑肌细胞之间，GJ可保持血管壁电活动与机械活动的一致性，使血管成为统一的功能单位^[11-12]。内皮细胞与平滑肌细胞之间的GJ也叫做肌内皮连接（myoendothelial junction, MEGJ），其参与血管舒缩活动调节，生理机制为血管活性调节物质和/或内皮分泌的超极化因子通过肌内皮连接将电化学信号传递到平滑肌细胞对兴奋性或者是非兴奋性物质作出统一反应，从而保持血管正常生理功能的稳定性和统一性^[13]。

有研究表明当缝隙连接的表达和功能异常改变时能引起高血压^[14-18]，例如，利用基因敲除技术已证实小鼠血管Cx与血压之间存在相关性，特异性敲除血管内皮Cx43和Cx40基因，小鼠表现出高血压和心肌肥厚^[19]。但是，Cx在自发性高血压大鼠（spontaneously hypertensive rat, SHR）的变化比较复杂。Kansui等发现Cx37和Cx40在SHR血管内皮细胞表达相对降低，但是平滑肌细胞Cx43表达增加^[20]。在SHR肾入球动脉Cx40和Cx43表达没有任何变化，但Cx37表达增加^[21]。Li等人发现在SHR大脑中动脉血管平滑肌细胞上Cx45表达增加且GJ通讯增强^[22-23]。由此可见Cx在高血压病的发生发展中具有举足轻重的作用，这使得我们需要对GJ及Cx在高血压发病过程中的改变做更进一步的探讨和研究，它将既有助于我们对生命活动基本过程的了解，同时也会显示出Cx越来越广的临床应用价值，使其成为一个新的研究热点。

GJ的存在对于组织和器官是必须的。它使同一类型或不同类型细胞能够相互交流，从而形成完整的有机体并承担一定的生物学功能。血管平滑肌之间的GJ确保了血管受神经递质的影响，而内皮细胞间的GJ则感受体液调节的变化，内皮细胞和平滑肌细胞存在的肌内皮缝隙连接实现了内皮层与平滑肌层的协调，完成血管舒张。两者相互协调相互影响，从某种意义上它们既是感受器又是效应器。有研究表明高血压以及抗高血压药物能够改变大动脉、中动脉和心肌细胞上Cx的表达。但是，作为阻力血管的微、小动脉细胞间GJ的表达以及功能，在高血压过程中是否发生改变，以及高血压时抗高血压药物导致Cx的表达改变，是否会影响到脑血管的舒缩功能都还不是十分清楚。^[24]现在，还没有报道能够明确在脑动脉上表达哪一种Cx，同时尚不清楚在高血压时脑动脉血管Cx的变化。

因此，对正常和病理状态下脑动脉血管GJ结构和功能的差异性的比较研究是十分重要和必要的。本研究将应用全细胞膜片钳记录技术、RT-PCR、Western blot和透射电镜技术比较SHR和正常血压Wistar大鼠脑动脉上GJ是否存在差异和功能的变化，初步解析SHR脑动脉Cx37、Cx40、Cx43和Cx45在高血压病中所扮演的角色，本实验从而揭示脑动脉GJ是否参与高血压的发生发展。

材料与方法

(Materials and Methods)

1 材料

1.1 实验动物

SHR(购自北京维通利华实验动物有限责任公司, 许可证编号 SCXK 京 2007-0001); Wistar 大鼠 (购自新疆医科大学实验动物中心, 许可证编号 SCXK 新 2003- 0001), 各 6 只, 平均体重为 250 g, 均为雄性, 动物质量符合一级标准。老鼠饲养环境有良好通风, 室温与湿度控制在 20 °C 和 50%左右, 每日需更换垫料和自由饮水摄取食物。

1.2 主要试剂

- 1) 木瓜蛋白酶、牛血清白蛋白、胶原酶 I A、HEPES、Na-HEPES
均购自美国Sigma公司
- 2) NaCl、CaCl₂、KCl、MgCl₂、葡萄糖
均为国产分析纯
- 3) PBS缓冲液
购自美国Hyclone公司
- 4) 十二烷基硫酸钠 (SDS)、牛血清白蛋白 (BSA)、四甲基乙二胺 (TEMED)、Tris、甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、细胞裂解液 RIPA (高效)
购自北京 Solarbio 公司
- 5) 过硫酸胺 (AP)、甘氨酸
购自 Amresco 公司
- 6) Tween 20
购自天津市天达净化材料精细化工厂
- 7) Cx37 兔抗大鼠单克隆抗体
购自美国 Santa 公司
- 8) Cx40 小鼠抗大鼠多克隆抗体
购自美国 abcam 公司
- 9) Cx43 小鼠抗大鼠单克隆抗体
购自美国 abcam 公司
- 10) Cx45 小鼠抗大鼠单克隆抗体
购自美国 Santa 公司
- 11) β -actin小鼠抗大鼠一抗、辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxide) 偶联的山羊抗小鼠/兔 IgG二抗
购自北京中杉金桥生物技术有限公司
- 12) 化学发光试剂盒
购自美国 Thermo 公司
- 13) PVDF 膜(0.45 μ m)
购自Millipore公司
- 14) 曝光底片
购自柯达公司
- 15) 显影粉、定影粉
均为市售

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 16) TRIzol | 购自美国 Invitrogen 公司 |
| 17) cDNA 反转录试剂盒 | 购自美国 Thermo 公司 |
| 18) PCR 反应试剂盒 | 购自美国 Thermo 公司 |
| 19) BCA 蛋白浓度测定试剂盒 | 购自碧云天公司 |

1.3 主要实验仪器

- 1) AXON multicalmp 700B 膜片钳放大器: Axon 公司, 美国
- 2) Digidata 1440A 数模转换器: Axon 公司, 美国
- 3) 倒置相差显微镜: Olympus, 美国
- 4) P-97 拉制仪: sutter 公司, 美国
- 5) 生物信号采集处理分析系统: Axoscope10.2 软件, Axon 公司, 美国
- 6) 恒温水浴槽: HSS-1B, 成都仪器厂
- 7) 体式显微镜: 云南光学仪器厂
- 8) 电子天平: Sartorius, 美国
- 9) 玻璃微电极: sutter 公司, 美国
- 10) 离心机: TDL-60B, 上海安亭科学仪器厂
- 11) 多管灌流排药系统: 自制
- 12) BP-6 无创血压监测仪: 成都泰盟科技有限公司
- 13) 低温冰箱: 上海海尔公司
- 14) HARRIS-80℃冰箱: Asheville 公司, 美国
- 15) 高压蒸汽灭菌器: 三洋公司 ML-S-3020 型, 日本
- 16) 磁力搅拌器: 南汇电讯器材厂
- 17) 低速大容量离心机: 上海安亭科学仪器厂
- 18) AN841Y 型电热恒温干燥箱: 吴江奥能电器设备厂
- 20) Milli-Q Academic 超纯水仪: Millipore 公司, 美国
- 21) 低温离心机: Sigma 公司, 美国
- 22) NanoDrop 2000c: Thermo 公司, 美国
- 23) 蛋白加热变性器: 苏净集团安泰公司
- 24) Western-Blot 电泳槽、胶架、电泳仪、半干式转膜仪、胶板、凝胶图象成像仪等:

BIO-RAD 公司, 美国

25) 制冰机: 美国 GRANT-FM 100 型

26) 超薄切片机: 德国徕卡

27) 电子显微镜: 日本日立

2 方法

2.1 溶液配制

2.1.1 膜片钳所用溶液配制

(1) 膜片钳血管段细胞外液 (HEPES):

NaCl	138.00 mmol/L
KCl	5.00 mmol/L
CaCl ₂	1.60 mmol/L
MgCl ₂	1.20 mmol/L
Na-HEPES	5.00 mmol/L
HEPES	6.00 mmol/L
Glucose	10.00 mmol/L

(2) 电极内液: pH = 7.25 ~ 7.40 (用 1mol/L KOH 溶液标定), 渗透压 = 280 mOsm/L

2.1.2 Western-Blot 所用溶液配制

(1) 30%丙烯酰胺溶液: 丙烯酰胺 (Acr) : 37.5 g 甲叉双丙烯酰胺 (Bis) : 1 g 双蒸水定容至 100 ml; 4 °C 棕色玻璃瓶保存。

(2) 10%SDS: SDS 10 g 双蒸水定容至 100 ml; 室温保存。

(3) 10%过硫酸胺 (AP): AP 0.1 g 双蒸水 1.0 ml; 4 °C 冰箱避光保存, 七天内使用。

(4) 1.5 mol/L Tris-HCl: Tris-base 45.43 g 双蒸水 200 ml, 用 HCl 将溶液调至 pH = 8.8; 可长时间保存在 4 °C, 使用时恢复至室温。

(5) 0.5 mol/L Tris-HCl: Tris-base 15.14 g 双蒸水 200 ml, 用 HCl 将溶液调至 pH = 6.8; 可长时间保存在 4 °C, 使用时候恢复至室温。

(6) 10×电泳液: SDS 10 g Tris-base 30 g 甘氨酸 282 g 双蒸水定容至 1000 ml; 放置常温保存。

(7) 1×电泳液 (通过稀释获得): 10×电泳液 100 ml 10 % SDS 10 ml

双蒸水定容至 1000 ml; 常温保存。

(8) 1×电转液 (通过稀释获得): SDS 0.37 g Tris-base 5.8 g 甘氨酸 2.9 g 甲醇 200 ml

双蒸水定容至 1000 ml; 4 °C 保存, 可回收利用 3-5 次。

(9) 10×TBS:NaCl 87.66 g Tris-base 12.114 g 双蒸水 900 ml 用 HCl 将 pH 值调至 7.4, 再定容至 1000 ml; 4 °C 保存。

(10) 1×TBST (通过稀释获得): 10×TBS 50 ml Tween-20 0.5 ml 双蒸水定容至 500 ml; 4 °C 保存, 最好现配现用。

(11) 5 % BSA 封闭液: 牛血清蛋白 2 g 1×TBST 40 ml; 在 4 °C 冰箱里保存不能超过两天, 或者-20°C 长期保存, 可用 1~2 月。

(12) 制作 SDS-PAGE 凝胶:

10%分离胶	
分离胶	10 ml
双蒸水	3.8 ml
30 % 丙烯酰胺	3.4 ml
Tris-HCl (pH=8.8)	2.6 ml
10 % AP	100 μl
10 % SDS	100 μl
TEMED	4 μl
5%浓缩胶	
浓缩胶	5 ml
双蒸水	2.7 ml
30 % 丙烯酰胺	670 μl
Tris-HCl (pH=6.8)	500 μl
10 % AP	40 μl
10 % SDS	40 μl
TEMED	4 μl

(13) 显影液配制: 双蒸水加热至 50 °C 左右, 先把小包药粉在 200 ml 双蒸水中充分溶解, 然后再加入大包药粉摇匀, 等到全部溶解后, 再用事先预热好的双蒸水定容至 250 ml, 配液体全过程要注意避光, 室温避光保存。

(14) 定影液配制: 双蒸水预热至 25 °C 左右, 取 200 ml 蒸馏水将定影粉进行充分溶解, 再用事先预热好的双蒸水定容至 250 ml, 室温避光保存。

2.2 大鼠无创血压测定

随机选取 SHR 和 Wistar 大鼠各 6 只, 打开 BP-6 无创血压监测仪, 温度设定为 37 °C。将随机选取的 SHR 和 Wistar 大鼠置于预热箱中 15 min, 之后将大鼠放入鼠笼里并固定其头部。然后连接动脉血压计, 将传感器环固定于大鼠尾巴的根部。最后用无创血压测量系统测定清醒安静状态下大鼠尾部动脉的血压, 测量时仅收集收缩压数据, 测定

3次取平均值，即为大鼠尾动脉收缩压。

2.3 全细胞膜片钳技术

麻醉状态下放血处死大鼠，迅速取出大鼠脑，放入含有 95% O₂和 5% CO₂的 37 °C 饱和生理盐溶液(138 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 5 mM Na-HEPES, 6 mM HEPES, 7.5 mM葡萄糖, pH=7.4)中。然后把脑动脉(brain artery, BA)标本放入培养皿中，使用铂金片将其固定于培养皿底部，在 37°C条件下，用含有胶原酶 A (1.5 mg/mL) 的生理盐溶液消化 15 min，之后用生理盐溶液漂洗两次以去除残存的胶原酶A，并去除结缔组织，最后转移到倒置显微镜下，用Axon 700B 放大器进行全细胞膜片钳实验。记录电极阻抗约为 5 MΩ，由P-97 拉制仪拉制的，电极内充灌的是电极内液。电极内液成分是 (mmol/L): K-gluconate 130, NaCl 10, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 1.2, HEPES 10, EGTA 5, 葡萄糖 7.5, 调节pH到 7.4。通过细微的操纵器来接触到细胞之后，给予负压来形成GΩ封接。补偿电极的电容后可以给瞬间较强的负压或者电刺激击破细胞膜，从而形成全细胞膜片钳记录。生物电信号是通过PC计算机clampex软件记录。细胞膜电容是通过公式C=Q/V来计算，电极电阻 (R_a) 所引起的实际钳制电压 (V_m) 和命令电压 (V_c) 的误差是按照公式V_m=V_c-I×R_a来进行补偿的。

2.4 大鼠脑动脉血管取材

大鼠麻醉状况下，断头处死，去除后脑头皮，剥去脑骨，将整个脑组织取出置于含 95% O₂和 5% CO₂的 4 °C饱和生理盐溶液(Krebs)中。Krebs液成分是：NaCl 125 mmol/L, KCl 5 mmol/L, CaCl₂ 1.6 mmol/L, MgCl₂ 1.2 mmol/L, NaH₂PO₄ 1.2 mmol/L, NaHCO₃ 20 mmol/L, 葡萄糖 8.3 mmol/L, 将pH调至 7.4。在体视显微镜下取出大鼠脑动脉，并放在 4 °C饱和Krebs液中。去除大脑动脉血管内血液以及外膜，再用PBS进行反复清洗。脑血管组织称取 20 mg为一组，冻存于-80 °C冰箱供蛋白质和总RNA的提取，样本最好一周内用于实验。

2.5 RT-PCR 技术检测 Cx37、Cx40、Cx43 和 Cx45 mRNA 水平

2.5.1 大鼠脑动脉血管总 RNA 提取

分别以 SHR 以及 Wistar 大鼠脑动脉血管 (20 mg) 为材料。剪碎组织，并超声粉碎充分裂解组织。采用 Trizol 法提取总 RNA，使用 NanoDrop 2000c 测定总 RNA 浓度和纯度后反转录成 cDNA。

2.5.2 RNA 逆转录

分别取已调整好的各组mRNA样本 3 μl，以Oligo(dT) primer为引物，加水补齐至 12 μl，混匀低速离心后在 70 °C条件下反应 5 min，之后于 4 °C条件下冷却 2 min，再加入指定量的 5 × Reaction Buffer、RNase inhibitor、10 mM Dntp Mix 用 RNase freed H₂O补齐至 20 μl，混匀离心后在 37 °C条件下反应 5 min，4 °C冷却 2 min，最后加入Revert Aid H Minus Reverse Transcriptase 1μl混匀后在 42°C下孵育 60 min，70 °C反应 5 min终止反

应, 已合成的cDNA可以直接用于PCR扩增反应, 剩余样本于-20 °C保存。

2.5.3 PCR 扩增反应

每组分别取 3 μ l 逆转录产物作为模板, 按照顺序依次加下面组成成分: 2 \times PCR Master Mix 12.5 μ l, Cx37、Cx40、Cx43 和 Cx45 上下游引物分别是 0.5 μ l, β -actin 上下游引物分别是 0.5 μ l, 加灭菌双蒸水至 26 μ l, 在 PCR 合成仪中进行。实验所用引物序列具体参照表 1, 反应条件为: 94 °C 5 min, 然后循环参数:94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 37 个循环, 最后一个循环在 72 °C 延伸 10 min。取 10 μ l PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 紫外透射分析仪进行观察后呈像, 采用凝胶呈像分析系统对 PCR 扩增产物进行定量。

表 1 缝隙连接蛋白和 β -actin mRNA 引物

Primer Name	Forward Primer	Revers Primer	bp
Cx37	agc tct gca tcc aag aag cag ta	agt tgt ctc tca agt gcc tta ga	119
Cx40	gga aag agc tga acg gga aga tt	cac agc cat cat aaa gac tat gaa	243
Cx43	gag atg cag ctg aag cag att gaa	gat gtt caa agc gag aga cac caa	295
Cx45	atc aga acg cag ctc gga gca a	caa gga act atg ctc aca ta	320
β -actin	atc atg ttt gag acc ttc aa	cat ctc ttg ctc gaa gtc ca	310

2.6 Western-Blot 技术检测 Cx37、Cx40、Cx43 和 Cx45 蛋白表达

2.6.1 大鼠脑动脉蛋白提取

以上述 SHR 和 Wistar 大鼠脑动脉血管 (20 mg) 为材料, 剪碎组织, 并超声粉碎充分裂解组织, 使用 RIPA 裂解液 (添加 10% Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 提取全蛋白, 超速离心后取上清液, 按照 15 μ g/ μ l 来进行定量, 然后放在-80 °C冰箱中保存。

2.6.2 蛋白质浓度测定和处理步骤

1. 根据样品数量, 按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B (50:1), 配制适量BCA工作液, 充分混匀。BCA工作液室温24 h内稳定。
2. 完全溶解蛋白标准品, 取10 μ l稀释至100 μ l, 用PBS液稀释使终浓度为0.5 mg/ml。(蛋白样品在什么溶液当中, 标准品也宜用什么溶液稀释。)
3. 将标准品按0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ l 加到96孔板的标准品孔中, 加PBS液补足到20 μ l。
4. 加适当体积样品到96孔板的样品孔中, 加PBS液至20 μ l。
5. 各孔加入200 μ l BCA工作液, 37°C放置30min。BCA法测定蛋白浓度时, 吸光度会随着时间的延长不断加深。并且显色反应会因温度升高而加快。如果浓度较低, 适合在较高温度孵育, 或延长孵育时间。
6. 测定A562, 540 - 595 nm之间的波长也可接受。根据标准曲线计算出蛋白浓度。

7. 根据测定浓度按15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 进行稀释。
8. 稀释后的蛋白上清，每组蛋白中按照一定的体积加入等比例的5 \times 蛋白上样缓冲液，振荡器充分混匀。
9. 将蛋白置于加热变性器上，100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热 8 min，室温下冷却后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存备用。

2.6.3 SDS-PAGE 凝胶的制作

- (1) 清洗制胶板：纱布沾洗洁精用适力进行擦洗。两面都擦洗后用自来水冲洗，再用单蒸水、双蒸水冲洗，立在筐内晾干。若制胶板上有刮痕不易清洗，可用酸先浸泡 12h 再清洗。
- (2) 装制胶板：制胶板对齐后放入夹中卡紧，垂直固定于制胶架上，用双蒸水试漏 5min，若液面有下降，则需要重新装板、测漏，此时应检查胶垫是否完整无损。按照制备分离胶以及浓缩胶的配方准备所需液体。
- (3) 弃水：倒掉测漏所用双蒸水，用滤纸在胶板边缘吸干水分，注意滤纸纸屑不要留在胶板上，以免影响制胶。
- (4) 加分离胶：按上述配方，制作 10%分离胶，配制制胶液体的器皿要干净干燥，加入 TEMED 后需立即摇匀即可灌胶，否则液体会很快凝固。加入配好的分离胶时，用 1 ml 的枪吸取液体，沿制胶板的边角加入，加入分离胶的高度是以插入梳子后，距离梳子下边缘 1 cm ~ 1.5 cm 为宜，可事先用记号笔做好标记。
- (5) 双蒸水液封：分离胶加入后，要更换枪头，用 1 ml 移液器吸取双蒸水，将分离胶液封，注意加水的力度要轻柔，移液器在胶板上缘滑动加入。
- (6) 室温下静置 0.5 h 至二蒸水与胶面之间出现一条明显的分界线时，将双蒸水倾出，并用滤纸尽量吸净胶面上的双蒸水，同时按上述配方制作 5%浓缩胶。
- (7) 清洗梳子：用少许洗洁精轻轻按照梳齿的方向擦洗，小心不要损坏，自来水冲洗，再用单蒸水、双蒸水依次冲洗，置于烘箱中烘干水分。
- (8) 加浓缩胶：从烘箱中拿出梳子至室温，将配制 5%浓缩胶加入胶板中至上缘，插入梳子，注意梳子要垂直插入，室温下静置 15 ~ 30 min 浓缩胶即可凝固，取下胶板，将其装入保鲜袋或 PE 手套内进行保存，注意保鲜袋内加入适量双蒸水，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存（常规制作完毕 2 h 后即可使用，或过夜后再使用）。

2.6.4 蛋白电泳

- (1) 先将胶板上漏出的胶在自来水下冲干净，装入电泳内槽上，先加入自来水或双蒸水测漏，若不漏，倒出双蒸水，内槽加入电泳内液和外槽加入电泳外液，向上水平把梳子拔出，并检查每一泳道是否足够完整，有无变形。上样：每孔蛋白上样量为 10 μl - 20 μl

(梳子规格是 10 孔, 0.75 mm), 每组蛋白每孔上样量约为 5 μ l-10 μ l, Mark 每孔 5 μ l; 按照每个孔的上样量, 废蛋白的上样量与最后一孔的上样量相同。上样第一泳道一般是生物素标记的 Marker。

(2) 电泳: 浓缩胶电泳电压一般选择 80V 恒压电泳, 约 20-40 min; 观察当电泳条带至分离胶, 肉眼可看到 Marker 已分开清晰可见, 将电压转换至 110V 恒压电泳, 继续电泳至溴酚蓝指示剂距离胶底部 1~1.5 cm, 即为电泳结束。电泳时电泳槽最好放入冰水化合物中。

2.6.5 转膜

(1) 电泳时, 配制好电转液, 根据上样孔数量剪取 PVDF 膜和滤纸。注意: 转膜用的膜不可折叠、压出印痕, 否则不可用。

(2) 滤纸剪好后在电转液里浸泡, 膜要先在甲醇液体里浸泡 3~5 min, 然后在电转液里浸泡最少 20min。

(3) 电泳结束后, 拆卸胶板, 小心取出凝胶, 根据分子量大小用切胶板切取需要部分(宽 2 cm), 可以稍微比 PVDF 膜以及滤纸大 1 mm, 尽量让目的蛋白所在位置位于剪下的胶靠近中间位置, 切除左上角做好标记, 剪下后放到电转液里浸泡平衡 10-20 min。

(4) 用电转液湿润转膜仪, 按照由下至上是滤纸-膜-胶-滤纸的顺序, 依次放在转膜仪上, 注意每放一层都要用切胶板或玻璃棒把气泡赶掉; 用滤纸吸干周围电转液。

(5) 放置电极, 接通电源, 然后开始转膜, 转膜电压为 23V, 转膜时间 43-50 min (内参 β -actin 转膜 43 min, Cx43 转膜 43 min, Cx40 转膜 40 min, Cx45 转膜 45 min, 每次根据实验结果可以调整转膜时间, 上下浮动 1~3 min)。

(6) 转膜时, 尤其是高电流快速转膜时, 通常会有严重的发热现象, 最好在转膜仪上或者转膜仪上层盖子放置小冰袋。设定转膜时间, 防止超过转膜所需时间, 蛋白转过。

(7) 考马斯亮蓝快速染色液对完成转膜的 SDS-PAGE 凝胶进行染色, 以观察蛋白在凝胶上的残留情况。

2.6.6 免疫反应

(1) 转膜结束后, 把膜取出, 放至 5%的 BSA 中, 在室温下, 摇床上封闭 2 h, 根据实验结果, 亦可增加或缩短封闭时间, 若延长转膜时间, 将膜转移至 4 $^{\circ}$ C 冰箱中封闭。

(2) 用 5% 牛奶封闭液稀释一抗, β -actin、Cx43、Cx45 稀释比例均是 1:1000, 二抗稀释比例是 1:200。

(3) 封闭结束后, 按照实验需要, 分别转移至 β -actin、Cx43、Cx40、Cx45 的一抗中, 室温下摇床上孵育 2 h, 然后将摇床一起移至 4 $^{\circ}$ C 冰箱内进行孵育过夜; 或者在室温下置于摇床上孵育 3 h, 继续后续实验。

(4) 1×TBST 洗膜: 5 min×3 次, 10 min×3 次; 根据实验结果, 亦可延长或缩短洗膜时间。

(5) 将洗后的膜转移至辣根过氧化物酶标记的二抗反应液 (1:10000) 中, 室温下在摇床上孵育 2 h, 二抗是根据一抗选择, β -actin、Cx43、Cx45 均是山羊抗小鼠, Cx40 是山羊抗兔。

(6) 1×TBST 洗膜: 5 min×3 次, 10 min×3 次; 根据实验结果, 亦可延长或缩短洗膜时间。

2.6.7 显影、定影 (暗室中操作)

(1) 整理暗室操作台, 保持干净, 准备显影定影所需物品: 显影液, 定影液, 发光试剂 (发光试剂配制, 根据膜的数量分别抽取等量发光试剂 A 液、B 液于 1 ml 离心管中混匀), 胶片 (装好在盒子中, 不可见光), 剪刀, 保鲜膜, 滤纸, 曝光板, 移液器, 镊子, 计时器。

(2) 放一张干净无褶皱的纸, 将保鲜膜平铺在纸上, 用滤纸将膜上 TBST 液体尽量吸干, 然后按照左上角方向轻轻铺平在曝光板上, 用移液器抽取适量发光试剂, 涂匀在膜上, 覆盖好上层保鲜膜, 注意不要有气泡, 关灯 (以下操作严格避光)。

(3) 把胶片剪好适当大小及左上角, 与膜上左上角方向一致, 放在膜上, 用手掌按压 (手套要干净、干燥, 防止污物出现在胶片上影响实验结果), 一旦放上, 便不可再移动, 开始计时, 根据条带发光的信号强弱适当调整曝光时间, 一般为 1-5min。

(4) 显影: 按压结束后, 迅速将胶片浸入显影液中, 一边显影一边观察, 等到胶片条带清晰度合适时, 结束显影。

(5) 定影: 把胶片放到定影液里浸泡, 在自来水下把定影液冲洗掉, 室温晾干。

(6) 采图: 把胶片放到凝胶成像仪 Quantity One 成像系统中采像。

2.7 统计学处理

采用 Gel-Pro analyzer 4 软件分析核酸和蛋白条带积分光密度值 (integrated optical density, IOD=平均光密度×面积), 以目的/ β -actin 标化值作为统计指标。所有实验数据是用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计处理, 计量资料用 mean \pm SEM 来表示。两个独立样本间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

实验结果

(Results)

1 SHR 和 Wistar 大鼠尾动脉血压

如图 1 所示, Wistar 大鼠收缩压为 (121.5 ± 6.9) mmHg, SHR 收缩压为 (207.3 ± 10.5) mmHg, 明显高于正常 Wistar 大鼠 (121.5 ± 6.9) mmHg ($P < 0.01, n = 6$)。

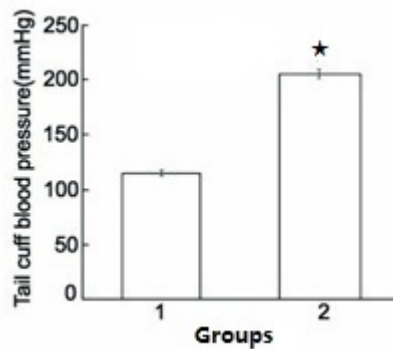


图 1 SHR 和正常血压 Wistar 大鼠尾动脉血压的比较

1: Wistar 大鼠尾动脉收缩压; 2: SHR 尾动脉收缩压; 2 组与 1 组, $*P < 0.01, n = 6$

Fig 1. The compare with SHR and Wistar Rats of the tail artery pressure

2 SHR 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉平滑肌细胞电生理特性比较

SHR 和 Wistar 大鼠脑动脉动脉段上平滑肌细胞膜电生理特性 (表 2)。Wistar 大鼠以及 SHR 脑动脉平滑肌细胞膜电容分别为 (74 ± 13) pF 和 (195 ± 47) pF, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 细胞膜电导分别为 (4.01 ± 0.93) nS 和 (7.71 ± 0.81) nS, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2. SHR 和 Wistar 大鼠的动脉段上的平滑肌细胞膜的电生理特性

Table 2. SHR electrophysiological properties of arterial smooth muscle cells and segments on Wistar rats

Membrane property	Wistar ($n=10$)	SHR($n=10$)
Input resistance (M Ω)	362±85	142±15*
Input conductance (nS)	4.01±0.93	7.71±0.81*
Input capacitance (pF)	74±13	195± 47*

* $P < 0.05$ vs Wistar rats

3 SHR 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉 Cx37 和 Cx40 mRNA 表达

RT-PCR 方法检测 SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx37 和 Cx40 mRNA 表达。SHR 脑动脉 Cx37 mRNA 表达较正常血压大鼠下降 ($P < 0.01$) (图 2); SHR 脑动脉 Cx40 mRNA 表达和正常血压大鼠比较显著下降, 具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 3)。

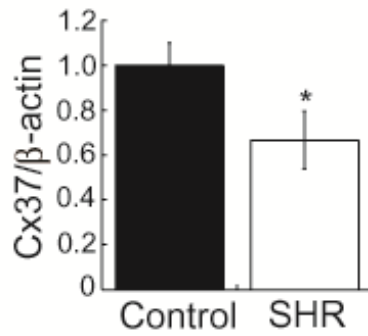


图 2. SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx37 mRNA 表达

Fig 2. The expression of Cx37 mRNA in brain artery of SHR and normotensive rats respectively. * $P < 0.01$ vs control.

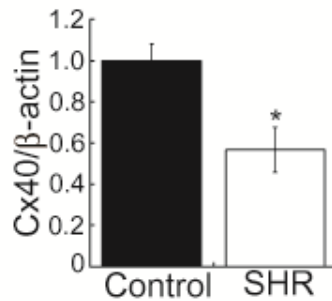


图 3. SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx40 mRNA 表达

Fig 3. The expression of Cx40 mRNA in brain artery of SHR and normotensive rats respectively, * $P < 0.01$ vs control.

4 SHR 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉 Cx43 和 Cx45 mRNA 表达

RT-PCR 方法检测 SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx43 和 Cx45 mRNA 表达。结果如图所示, SHR 脑动脉 Cx45 mRNA 表达较正常血压大鼠显著升高, 具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 4); 但 SHR 脑动脉 Cx43 mRNA 与正常血压大鼠比较, 无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 5)。

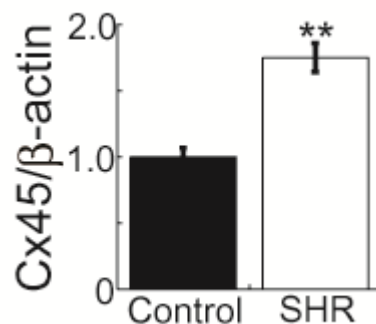


图 4. SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx45 mRNA 表达

Fig 4. The expression of Cx45 mRNA in brain artery of SHR and normotensive rats respectively, ** $P < 0.01$ vs control.

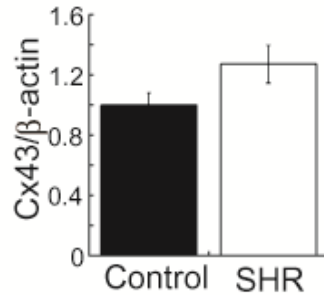


图 5. SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx43 mRNA 表达

Fig5. The expression of Cx43 mRNA in brain artery of SHR and normotensive rats respectively

5 SHR 和正常大鼠脑动脉中 Cx37 和 Cx40 蛋白的表达差异

Western blot 方法检测 SHR 以及正常血压大鼠脑动脉 Cx37 和 Cx40 蛋白表达, 光密度测定以及统计学分析显示: 与正常血压大鼠比较, SHR 脑动脉 Cx37 蛋白表达显著降低, 具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 6); SHR 脑动脉 Cx40 表达较正常血压大鼠显著降低, 具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 7)。

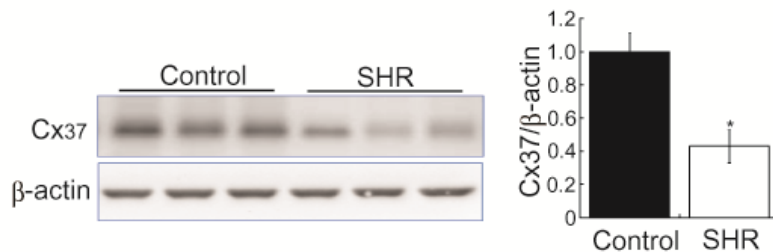


图 6 SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx37 蛋白表达

Fig 6 The expression of Cx37 protein in brain artery of SHR and normotensive rats respectively, * $P < 0.01$ vs control.

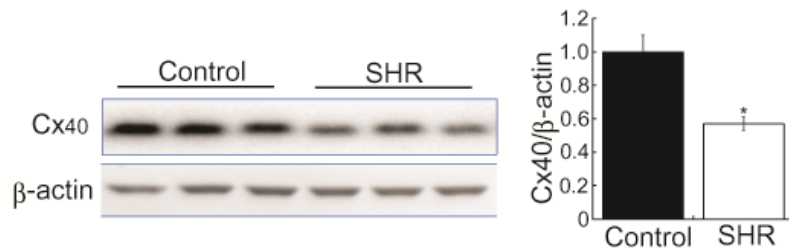


图 7 SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx40 蛋白表达

Fig 7 The expression of Cx40 protein in brain artery of SHR and normotensive rats respectively, * $P < 0.01$ vs control.

6 SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx43 和 Cx45 蛋白表达

Western blot方法检测 SHR 以及正常血压大鼠脑动脉Cx43和Cx45蛋白表达,光密度测定以及统计学分析显示:与正常血压大鼠比较,SHR脑动脉 Cx43 表达无统计学差异($P > 0.05$) (图8),但Cx43 磷酸化水平显著高于正常血压大鼠,具有统计学意义($P < 0.01$) (图9); SHR 比正常血压大鼠脑动脉 Cx45 表达显著增高,具有统计学意义($P < 0.01$) (图10)。

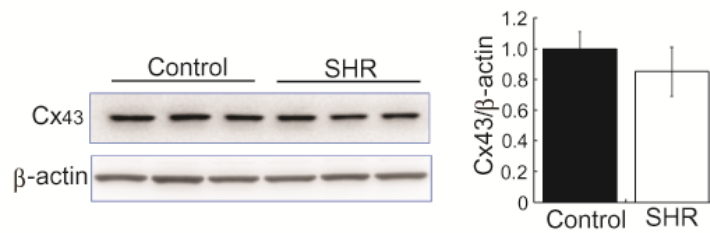


图 8 SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx43 蛋白表达

Fig 8 The expression of Cx43 protein in brain artery of SHR and normotensive rats respectively

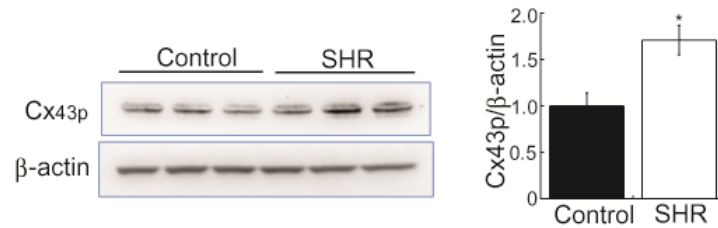


图 9 SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx43p 蛋白表达

Fig 9 The expression of Cx43p protein in brain artery of SHR and normotensive rats respectively, * $P < 0.01$ vs control.

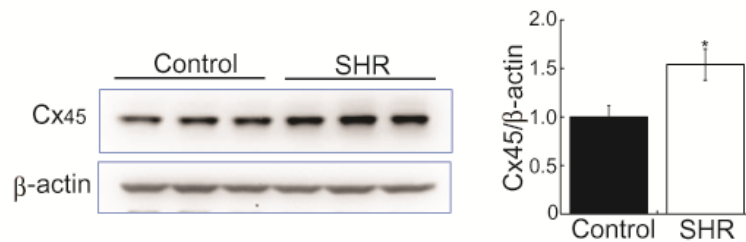


图 10 SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx45 蛋白表达

Fig 10 The expression of Cx45 protein in brain artery of SHR and normotensive rats respectively, * $P < 0.01$ vs control.

7 SHR 和正常血压大鼠脑动脉平滑肌细胞间缝隙连接形态学变化

透射电镜结果显示,与正常血压大鼠比较,SHR 脑动脉平滑肌细胞间缝隙连接数量

显著增多，这也表明高血压发病过程中，脑动脉平滑肌细胞间缝隙连接通讯功能增强。

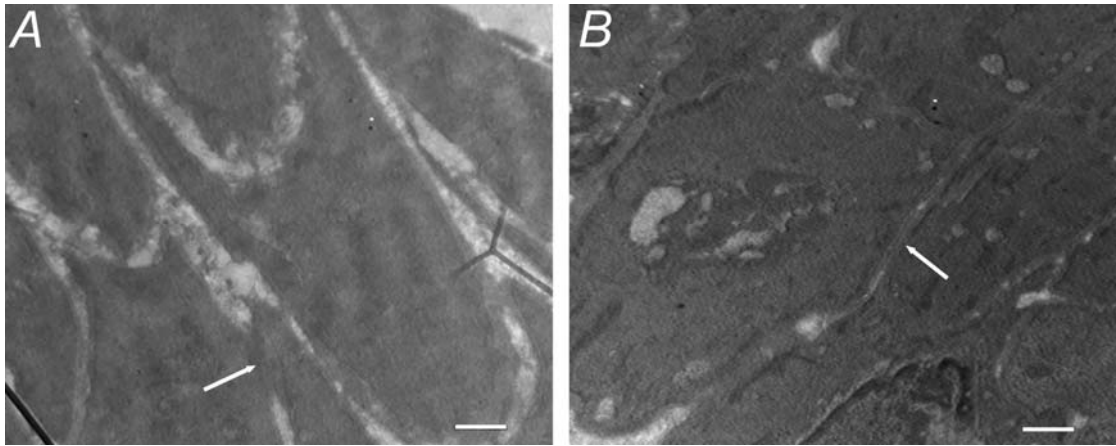


图 11 SHR 和正常血压大鼠脑动脉显微结构

Fig 11. Electron micrographs of aorta sectioned from SHR and normotensive rats respectively. A: normotensive rats; B: SHR. Individual gap junction profiles are identified by arrows. Bar=0.5 μ m

讨 论

(Discussion)

高血压是心脑血管等疾病导致死亡的主要危险因素，是全人类常见的慢性疾病。高血压的直接发病环节就是外周血管的压力增加^[2]。而微小动脉的肌源性张力是血管外周阻力以及血压形成的重要因素，在高血压病理进程中，由于血管平滑肌细胞过度增殖、凋亡不足，增殖与凋亡之间的动态平衡被打破，导致血管壁异常增殖^[25]。脑动脉管腔狭窄或闭塞时，会造成脑组织缺血、缺氧，最终诱发脑血管相关疾病。

血管紧张度增加是脑血管疾病发病的关键原因，血管紧张度由血管平滑肌舒缩活动来调节，舒缩活动的调节依赖于细胞间信号物质的传递。细胞间的通讯方式有直接和间接两种，直接通讯是以细胞间缝隙连接为途径而进行相邻细胞间的物质交流及信号传递。GJ是由两个相邻细胞膜上的连接子排列而成的一种特殊的 2-3 nm通道结构^[26]。相邻细胞之间通过GJ进行信息、能量以及物质等交换，对细胞之间新陈代谢、内部环境稳定以及胚胎发育等方面起着至关重要的调控作用^[27]，同时在血管同步收缩中发挥着重要作用，保障血管壁能够在纵向和横向上保持电活动和机械活动的同步性。而在病理情况下，异常细胞的伤害性信息也可通过GJ传递至正常细胞引起病理性改变。GJ在许多疾病的发生、发展以及转归过程中起了非常重要作用。研究报道GJ促使相邻细胞形成一步化活动，造成异常放电是形成癫痫发病重要因素之一^[28]。在恶性肿瘤细胞时，GJ减少可使异常细胞脱离与正常细胞胞间联系及正常调控，最终发展成为无序生长^[29]。

构成GJ的基本单位为缝隙连接蛋白（Cx）。Cx的N末端较为保守，然而C末端在不同的Cx中差异较大。并且羧基末端的Ser、Thr以及Tyr残基的磷酸化/去磷酸化水平，也会影响GJ的形成以及功能活性，并且可以根据感受到的细胞的信息变化，来改变其构象，从而调节GJ的变化和传导性^[30]。现在已经发现了有大于二十种Cx亚型，血管结构中可以检测到四种Cx的表达，分别是Cx37、Cx40、Cx43和Cx45，分布由血管大小、血管部位以及动物种属决定。内皮细胞以及平滑肌细胞作为血管壁的两大大细胞组分，其表达的Cx类型有区别但又同时存在重叠，Cx37与Cx40在内皮细胞共表达，Cx43在内皮细胞的表达是由血管类型以及血管位置确定，呈现出不均匀分布，然而平滑肌细胞表达最丰富的是Cx43^[2]，偶尔有Cx37以及Cx45表达，此外，在某些血管平滑肌细胞里也可看到Cx40表达；这些Cx在内皮细胞间、平滑肌细胞间以及内皮细胞与平滑肌细胞间形成GJ，实现细胞之间信息的直接联系^[31]。

本实验研究主要集中在SHR脑动脉，高血压对脑动脉血管GJ的影响。通过比较SHR和正常血压Wistar大鼠脑动脉平滑肌细胞电生理特性改变，发现SHR脑动脉平滑肌细胞膜电容和膜电导均高于Wistar大鼠，表明在SHR脑动脉平滑肌细胞间存在紧密的电耦联，PCR技术和Western Blot技术检测结果发现Cx37以及Cx40 mRNA和蛋白表达降低，提示GJ可能是通过降低血管内皮细胞上Cx37以及Cx40表达，来调节脑动脉的舒缩活性进而

影响高血压状态。由于Cx在血管平滑肌细胞以及内皮细胞的分布不同,结合电生理实验、PCR技术和Western Blot技术我们发现Cx45 表达增高且Cx43 磷酸化水平也增高,因此推测SHR脑动脉平滑肌细胞间的GJ耦联力增强,可能是通过上调平滑肌细胞Cx45 表达和增加Cx43 磷酸化功能,增强脑动脉平滑肌细胞间缝隙连接通讯,保证血管同步收缩。前期研究,我们在SHR肠系膜动脉上发现了Cx43 磷酸化水平以及Cx45 表达上升,透射电镜技术发现平滑肌细胞间缝隙连接数目增加^[32]。此外,Alonso等人发现Cx43 和Cx45 在大动脉和小动脉血管平滑肌上有表达^[33,34],Li等人研究指出Cx45 在SHR脑动脉血管平滑肌上表达增加^[23],然而,Cx43 和Cx45 在脑动脉血管的表达无明显改变^[35]。因此,Cx43 和Cx45 在SHR脑动脉改变的机制还需进一步研究。

上述Cx在高血压中的表达差异可能是和动物模型、检测方法以及部位不同有关^[2],且有关Cx表达的研究,主要是以主动脉等一些直径较大的弹性动脉做研究对象,然而对于参与血压调节起到重要作用的微小动脉的研究较少。本研究选取重要脏器大脑的微小动脉进行比较研究。同时应用膜片钳技术,前期实验大都采用膜片钳技术研究关于缝隙连接的表达^[32,36,37]。在一段血管微动脉标本上,使用全细胞膜片钳记录^[38-42],这种独特的记录方法对于血管微动脉细胞膜电生理特性有深刻认识。

另外,一些报道发现高血压时,血管紧张度的增强往往与GJ通道的功能改变有关。GJ提供血管舒缩信号传导的直接通路,会使得相邻的平滑肌细胞之间的Ca²⁺实现统一性改变。肺动脉高压大鼠模型上,5-羟色胺所引起的血管收缩可以被特异性的GJ阻断剂³⁷⁻⁴³Gap27 减弱,苯肾上腺素引起的血管收缩可以被³⁷⁻⁴³Gap27 以及⁴⁰Gap27 所减弱^[43]。在去氧皮质酮所致的高血压大鼠,血管平滑肌细胞对各种收缩性的刺激会更加的敏感^[44]。前期研究发现在SHR肠系膜动脉上苯肾上腺素引起的收缩幅度明显升高,在使用GJ阻断剂后收缩幅度显著减弱^[32]。本研究中发现SHR的阻力血管对血管收缩药物的反应明显升高,我们推测自发性高血压可能会造成动脉上Cx表达升高,GJ通讯功能加强。

综上,脑动脉血管平滑肌间 Cx 的功能及表达的异常改变与高血压联系密切,且可能是导致血管疾病发病的重要原因,若采取措施积极有效地去预防,并且检测到 GJ 的功能改变,这对高血压疾病的预防及治疗提供了有价值的线索。

结论与展望

(Conclusion & Prospect)

1 结论

从本实验中我们可以得到如下结论：

SHR 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉 Cx37、Cx40、Cx43 和 Cx45 mRNA 以及蛋白的表达水平,结合 GJ 的形态学观察,发现 GJ 可能是通过降低血管内皮细胞 Cx37 和 Cx40,升高平滑肌细胞 Cx45 的表达调节脑动脉的舒缩活性从而影响高血压状态。

2 展望

根据现有研究结果,后续可进行以下研究：

为更加全面阐明缝隙连接蛋白在高血压进展中所扮演的角色。可对靶器官例如肾脏血管以及冠状动脉上的不同 Cx 的表达水平进行研究。而高血压形成的原因之一是外周阻力的增加,这一作用主要是微小动脉功能和结构发生改变,所以还需要进行各靶器官微小动脉研究。这样以便筛选出与高血压形成密切相关的缝隙连接蛋白,使我们深入认识细胞间通讯在高血压中的调控机制,并成为高血压病新的治疗靶点。

参考文献

(Reference)

- [1] Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation [J]. *Microcirculation*, 2005, 12(1): 33-45.
- [2] Figueroa XF, Isakson BE, Duling BR. Vascular gap junctions in hypertension [J]. *Hypertension*, 2006, 48(5):804-811.
- [3] Figueroa XF, Isakson BE, Duling BR. Connexins: gaps in our knowledge of vascular function [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2004, 19: 277-284.
- [4] Davis LM, Rodefeld ME, Green K, et al. Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1995, 6(10 Pt 1):813-822.
- [5] Mese G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function [J]. *The Journal of vascular function. Physiology (Bethesda)*, 2004, 19: 277-284.
- [6] Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family [J]. *Cardiovasc Res.*, 2004, 62: 228-232.
- [7] Larson DM, Haudenschild CC, Beyer EC. Gap junction messenger RNA expression by vascular wall cells [J]. *Circ Res.*, 1990, 66(4):1074-1080.
- [8] De Wit C. Connexines pave the way for vascular communication [J]. *News Physiol Sci*, 2004, 19(3):148-153.
- [9] Okamoto T, Akiyama M, Takeda M, et al. Connexin 32 is expressed in vascular endothelial cells and participates in gap-junction intercellular communication [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(2): 264-268.
- [10] Schmidt VJ, Wolfle SE, Boettcher M, et al. Gap junctions synchronize vascular tone within the microcirculation [J]. *Pharmacol Rep*, 2008, 60(1): 68-74.
- [11] Sandow SL. Factors fiction and endothelium-derived hyperpolarizing factor[J]. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 2004, 31: 563-570.
- [12] Jiang ZG, Nuttall AL, Zhao H, Dai CF, Guan BC, Si JQ, et al. Electrical coupling and release of K⁺ from endothelial cells co-mediate ACh-induced smooth muscle hyperpolarization in guinea-pig inner ear artery[J]. *The Journal of physiology*, 2005, 564: 475-487.
- [13] 明佳, 刘良明. 缝隙连接及其与血管舒缩功能调节的关系[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2008, 28(5): 436-442.
- [14] Derouette J P, Wong C, Burnier L, et al. Molecular role of Cx37 in advanced atherosclerosis: A micro-array study[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 206(1): 69-76.
- [15] Kwak B R, Veillard N, Pelli G, et al. Reduced connexin 43 expression inhibits atherosclerotic lesion formation in lowdensity lipoprotein receptor-deficient mice[J]. *Circulation*, 2003, 107(7): 1033-1039.
- [16] Yeh H I, Lee P Y, Su C H, et al. Reduced expression of endothelial connexins 43 and 37 in hypertensive rats is rectified after 7-day carvedilol treatment[J]. *Am J Hypertens*, 2006, 19(2): 129-135.

- [17] Johnson T L, Nerem R M. Endothelial connexin 37, connexin 40, and connexin 43 respond uniquely to substrate and shear stress [J]. *Endothelium*, 2007, 14(4-5): 215-226.
- [18] Dlugosová K, Mitasíková M, Bernátová I, et al. Reduced connexin-43 expression in the aorta of prehypertensive rats[J]. *Physiol Res*, 2008, 57 Suppl 2: S23-29.
- [19] Koval, M, Billaud M, Straub AC, et al. Spontaneous lung dysfunction and fibrosis in mice lacking connexin 40 and endothelial cell connexin 43[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(6): 2536-2546.
- [20] Kansui Y, Fujii K, Nakamura K, et al. Angiotensin II receptor blockade corrects altered expression of gap junctions in vascular endothelial cells from hypertensive rats[J]. *American journal of physiology*, 2004, 287:H216-224.
- [21] Braunstein TH, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH. Connexin abundance in resistance vessels from the renal microcirculation in normo- and hypertensive rats[J]. *Apmis*, 2009, 117(4):268-276.
- [22] Li X, Simard JM. Increase in Cx45 gap junction channels in cerebral smooth muscle cells from SHR[J]. *Hypertension*, 2002, 40:940-946.
- [23] 李新芝, 司军强, 陈新燕, 等. 自发性高血压大鼠和 Wistar 大鼠脑动脉 Cx45 表达的差异[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2012, 50(11): 39-42.
- [24] 马克涛, 李新芝, 李丽, 等. 豚鼠不同部位微动脉平滑肌细胞电生理学特性的比较[J]. *生理学报*, 2010, 62(5):421-426.
- [25] Shin, Chensy. Mechanisms simultaneously regulate smooth muscle proliferation and differentiation [J]. *J Biomed Res*, 2014, 28(1): 40-46.
- [26] Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family[J]. *Cardiovasc Res.*, 2004, 62: 228-232.
- [27] Shimizu K, Stopfer M. Gap junctions[J]. *Curr Biol*, 2013, 23(23): R1026-1031.
- [28] Simon A, Traub RD, Vladimirov N, et al. Gap junction networks can generate both ripple-like and fast ripple-like oscillations[J]. *Eur J Neurosci*, 2014, 39(6): 46-60.
- [29] Treppe X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration[J]. *Compr Physiol*, 2012, 2(4): 2369-2392.
- [30] Xie F1, Yi SL, Zhong JQ, et al. Role of group I metabotropic glutamate receptors, mGluR1/mGluR5, in connexin 43 phosphorylation and inhibition of gap junctional intercellular communication in H9c2 cardiomyoblast cells[J]. *Mol Cell Biochem.*, 2015, 400(1-2): 213-222.
- [31] Brisset AC, Isakson BE, Kwak BR. Connexins in vascular physiology and pathology[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(2): 267-282.
- [32] Ma KT, Li L, Jun-Qiang Si, et al. Role of gap junctions in the contractile response to agonists in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension Research*, 2014, 37: 110-115.
- [33] Haefliger JA, Nicod P, Meda P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62: 345-356.

- [34] Alonso F, Krattinger N, Mazzolai L, et al. An angiotensin II- and NF-kappaB-dependent mechanism increases connexin 43 in murine arteries targeted by renin-dependent hypertension[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 87(1): 166-176.
- [35] Brisset AC, Kwak BR, Isakson BE. Connexins in vascular physiology and pathology[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11: 267-282.
- [36] Li XZ, Si JQ, Ma KT, et al. Inhibitory effect of 18 β -glycyrrhetic acid on gap junction of vascular smooth muscle cells in guinea pig[J]. *J Jilin Univ (Medicine Edition)*, 2011, 37(3):413-417.
- [37] Ma KT, Li L, Si JQ, et al. Comparison of electrophysiological properties of vascular smooth muscle cells in different arterioles in guinea pig[J]. *Acta Physiol Sin*, 2010, 62(5): 421-426.
- [38] Yamamoto Y, Klemm MF, Edwards FR, et al. Intercellular electrical communication among smooth muscle and endothelial cells in guinea-pig mesenteric arterioles [J]. *J Physiol*, 2001, 535 (1): 181-195.
- [39] Quinn K, Beech DJ. A method for direct patch-clamp recording from smooth muscle cells embedded in functional brain microvessels [J]. *Pflugers Arch*, 1998, 435(4): 564-569.
- [40] Guibert C, Beech DJ. Positive and negative coupling of the endothelin ETA receptor to Ca²⁺-permeable channels in rabbit cerebral cortex arterioles [J]. *J Physiol*, 1999, 514(3): 843-856.
- [41] Quinn K, Guibert C, Beech DJ. Sodium-potassium-ATPase electrogenicity in cerebral precapillary arterioles [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279 (1): 351-360.
- [42] Yamazaki J, Kitamura K. Cell-to-cell communication via nitric oxide modulation of oscillatory Cl (-) currents in rat intact cerebral arterioles [J]. *J Physiol*, 2001, 536 (1): 67-78.
- [43] Billaud M, Dahan D, Marthan R, et al. Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension[J]. *Respir Res.*, 2011, 12(1): 30.
- [44] Watts SW, Webb RC. Vascular gap junctional communication is increased in mineralocorticoid-salt hypertension[J]. *Hypertension*, 1996 , 28(5):888-893.

文献综述

(Review)

缝隙连接及其研究进展

潘立君(综述) 马克涛(审校)

摘要: 缝隙连接(Gapjunctions, GJ)是常见的细胞连接通道,几乎存在哺乳动物所有的组织和细胞中,在细胞生长发育及分化过程中起重要作用,它允许小分子或离子在细胞之间通过,从而完成细胞间信息交流。相邻细胞通过缝隙连接进行信息和物质能量的交换,对细胞的新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理过程起着重要作用。本文就缝隙连接的生物学特征及其功能的调节作一综述。

关键词: 缝隙连接; 调控通路; 血管紧张素 II; 神经递质

1 缝隙连接的生物学特征及其细胞间信息传递

1958年应用微电极技术证实,龙虾神经索中相邻神经细胞间存在GJ。进一步应用荧光小分子物质的实验证实,小于1~1.5 kD的小分子物质可在细胞之间通过,而大分子不能,提示连接通道的直径约1.5 nm,这是缝隙连接执行各种生理功能的结构基础^[1]。哺乳动物的GJ通道由连接蛋白(connexins, Cxs)构成,其由一个十分相近的基因家族所编码。一般光学显微镜下不能看到GJ通道,1个GJ由2个头一头相接的半通道连接子(connexons)组成,每个半通道由6个Cx分子形成的六聚体围绕一个通道排列而成,贯穿细胞膜,它和相邻细胞膜的连接子共同形成一个连接通道,中间围成一个水相通道,活化能导致PKC依赖的缝隙连接电调控多样性^[2,3]。亲水通道管径的大小受细胞膜电位、细胞内酸碱度以及胞液游离钙离子浓度的调节,膜电位下降、PH值变小或胞液游离钙离子浓度升高均可改变连接蛋白的构象而使管腔变小甚至关闭,在生物学上可能起保护作用,即当个别细胞受损或死亡时,可关闭与之相邻的细胞间通道,避免受损细胞释放毒素等物质经通道传递及损害临近细胞^[4]。

GJ通道允许小分子物质自由通过,如Ca²⁺、环磷酸鸟苷(cGMP)、环磷酸腺苷(cAMP)、糖、氨基酸和维生素等,但大分子如蛋白质与核酸等不能通过。GJ的主要功能是介导细胞间电和化学信号的传递,确保不同类型细胞间的耦联,与离子流介导的动作电位的传导有关,从而维持电活动与机械收缩,保证活动的同步性^[5]。缝隙连接除了使细胞牢固连接外,还通过电耦联和代谢耦联两种方式进行细胞间信息传递。缝隙连接的阻抗小,单通道记录显示缝隙连接的基本电导为100 Ω /cm²,而细胞膜其它部位的阻抗为500~1000 Ω /cm²,因此,缝隙连接是细胞间电耦联的最有效的方式。

缝隙连接作为离子通道可长时间开放,具有高开放性、选择性的特点^[6],由异聚体连接子参与组成的缝隙连接称作异型缝隙连接(heterotypic gap junction)反之称作同型缝隙连接(homotypic gap junction),异型缝隙连接通道有不同Cx组成,同型缝隙连接通道

由单一Cx组成,同型通道具有电传导性和电压稳定性的特点^[7]。因为半通道连接由相对保守的胞外环所介导,许多由一种Cx构成的连接子也可由不同的Cx所构成异质连接子,在心脏及动脉中,不同的Cx共存于GJ斑中^[3]。

采用1 Hz频率对接头一尾或侧一侧排列的细胞条索进行刺激,正常情况下,纵向传导速度对GJ系数的变化不甚敏感,而横向传导速度GJ系数的变化很敏感^[8]。人的Cx43通道大部分时间保持开放,开放平均时间为0.043~5.255 s,平均关闭时间为0.56-0.95 s^[9]。缝隙连接对第二信使的通透性,使之成为介导信息传导的重要通道,如钙离子可经缝隙连接在晶状体上皮细胞、软骨细胞、胰岛素分泌细胞、神经细胞中存在^[10]。依赖性勃附因子(E-cadherin)可抑制缝隙连接的功能^[11]。

2 缝隙连接功能的调节

2.1 缝隙连接蛋白磷酸化

对大多数连接子来说,缝隙连接蛋白翻译后的磷酸化被认为是调节GJ传导的重要机制,从而控制连接子、高尔基复合物到细胞质膜的转运,使连接子聚合成选择性通道,从质膜上转移及降解到连接通道的门控^[12]。如Cx43的C端对形成功能性通道并不是必须的,但对GJ细胞传导的调节非常重要^[13]。

不同的信号分子共同作用GJ的聚合,常通过磷酸化与脱磷酸化过程。其中磷酸化过程通过快速和可逆的变化调节这些通道的门控及缝隙连接间信息交流(gap junction intercellular communication, GJIC)程度^[14]。连接子C一端的磷酸化后能形成具有复杂功能的孔道。一种缝隙连接的抑制剂,18 β -glycyrrhetic acid(18 β -GA),可引起Cx43的脱磷酸化及缝隙连接斑的降解,提示缝隙连接组合体的半衰期由蛋白激酶谱的活性和磷酸化及许多信号分子调节^[15]。

新近的一些研究对分子水平细胞间的交流提供了一些线索,心肌或其他器官的Cx代谢率极高,如成年鼠心Cx43的半衰期仅约1.3 h,表明通道蛋白的替换率较高。Cx43的降解有2个不同的胞内蛋白溶解途径:核内体酶/溶酶体酶和蛋白酶途径。心脏Cx为磷酸蛋白,磷酸化的改变意味着对Cx代谢动力学和不同途径降解的调节。磷酸化也对通道的组装和通道传导特性起重要的作用^[16]。但是不同细胞间的缝隙连接,不同的连接蛋白组合,在不同的刺激因子作用下,导致连接蛋白具有不同的氨基酸磷酸化,同时不同的磷酸化水平,对缝隙连接的影响是不同的。如平滑肌细胞、肝细胞中连接蛋白的磷酸化导致缝隙连接的中断,而心肌细胞中连接蛋白的非磷酸化导致缝隙连接的中断^[17]。基础状况下,GJ中Cx的高含量、组装调节、传导特性和通过特异Cx磷酸化的降解动力学是调节心脏细胞间交流的基本机理,对病理生理刺激的应答所致的特殊激酶和/或磷酸酶的激活是GJ重塑的基本机理,也将是急慢性疾病状况下调节耦联的新疗法。部分位点磷酸化会导致通道关闭,导致脱耦联,Cx降解与更新增强,会减弱细胞间耦联,减慢传导。因此,对病理生理刺激的应答所致的磷酸酶的激活是GJ重塑的基本机制。

2.2 PKC 调控通路

PKC是调控缝隙连接的蛋白激酶，包括一系列信号转导通路。典型的是，与GQ/11蛋白耦联的膜受体与磷脂酶C/肌醇三磷酸/甘油二酸P/KC通路(α_1 肾上腺受体, AT_1 受体或ETA受体)的耦联。已证实用苯肾上腺素刺激 α_1 肾上腺素所引起的大鼠心室肌细胞缝隙连接上调是PKC依赖性的^[18]。

用佛波酯激活的PKC能增强缝隙连接的电导率^[19]。PKC还能被如TPA佛波酯直接活化，而不是非活化的佛波酯(α PDD)。TPA处理能导致新生鼠心肌细胞中PKC α 和 ϵ 的快速转位。心脏中存有PKC的多种异构体诸如 α β ϵ ζ γ ^[20]，但不是所有的异构体都能参与缝隙连接的调节，PKC亚型的差异也导致不同处理下观察到的效应差异。在新生大鼠心肌细胞，用TPA处理能同时观察到GJ的增加和减少，此外在新生鼠心肌细胞缝隙连接还发现TPA能增加电导并减少电透性。因此小分子电渗性和电导在多种情况下似乎无相关性。为证明此，Kwka等^[19]使用一个表达系统测定PKC，PKA，PKG在单通道电阻和电渗的效应:在低表达Cx45 并无法进行细胞间分子转运如LUCIFERYELLOW的SKHEPI细胞株，其只表达Cx45，染料转移的缺失并不受 8-Br cAMP(PKA激动)，TPA(PAK激动)，8-Br cGMP(PKG激动)的影响。TPA激活PKC后产生了Cx43-更小的电导同时减少 61 和 69Ps的相对频率。这种复杂的表现可能最终导致现在报道的多样性。在非转染的通过Cx45 耦联的SKHEP1 细胞，PKC活化诱导一个额外的 16 ps电导状态。

最近研究发现被纤维生长因子刺激活化的PKC ϵ 导致心肌细胞的去耦联，而抗心律失常多肽引起的PKC α 活化能增强缝隙连接耦联^[21]。这支持不同PKC亚型活化能导致PKC依赖的缝隙连接电导调控多样性的假设^[22]。因此，佛波酯如TPA能活化多种亚型(对GJ有相反效应)，所报道的TPA多样效应可能与不同的PKC α/ϵ 活化比率相关。更近期的研究表明，TPA处理可降低HELA-Cx43 以及同时表达Cx43 和 45 细胞的缝隙连接耦联，但不改变HELA-Cx45 细胞的缝隙连接耦联，证实细胞能形成由Cx43 和 45 构成的四聚体通道^[23]。但另一项研究表明Cx45 转染的HELA细胞PKC活化能增加缝隙连接耦联^[24]。二者的区别在于后者用的是另一种佛波酯PMA。因此，可以推测可能是不同亚型PKC受到激活。

2.3 神经递质和体液因素的调节

交感神经递质(如异丙肾上腺素)能够增加缝隙连接通道的开放速率，增加其传导，而迷走神经介质(如乙酸胆碱)能够降低缝隙连接的传导性。这一调节机制还涉及到通道的开放， β 受体兴奋剂提高细胞cAMP而使通道蛋白磷酸化而被激活，相反，乙酰胆碱提高细胞内cGMP而使 β 蛋白结合体去磷酸化而关闭。Yan 等^[25]发现细胞间传导可由离子及代谢物调节，并提出 Ca^{2+} 对细胞间的缝隙连接有调节作用，即在缝隙连接电导的调节中， Ca^{2+} 起着关键性作用，形成了“ Ca^{2+} 假说”。该假说认为，当细胞内 Ca^{2+} 浓度升高时，缝隙连接的电导随之降低，甚至导致脱耦联。通过 Ca^{2+} 指示剂发光蛋白质的监测，发现细胞间电脱耦联与细胞内 Ca^{2+} 增高有关。

细胞内 Ca^{2+} 的作用在许多类型的细胞中被证实,包括心肌细胞、大鼠泪腺细胞、造骨细胞及胰腺 β -细胞等。另有研究提示,当紧邻缝隙连接的 $[\text{Ca}^{2+}]$,迅速增高时可造成细胞间的脱耦联,但 Ca^{2+} 在细胞间的弥散有自限性, Ca^{2+} 的缓冲很快,不会在连接中积聚过多^[26]。

已有证据表明 Ca^{2+} 能影响通道门控,但激活门控的机制尚不清楚,可能不同的连接蛋白和不同的细胞类型有不同的机制。

近年来,发现了越来越多的影响缝隙连接功能状态的因素^[27]。强心剂抑制 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶,增加钠钙交换,使细胞内钙离子增加,降低缝隙连接的电导。血管紧张素也能降低其电导。抗心率失常肽可与细胞膜上的蛋白结合,激活 $\text{PKC}\alpha$,导致连接蛋白的磷酸化,增强缝隙连接的功能。

Turin和Warner^[28]发现缝隙连接电导的调节十分重要,进而形成“ H^+ 假说”。“ H^+ 假说”强调,当细胞内 H^+ 浓度升高时,可使缝隙连接的电导降低,也能导致脱耦联,并认为 Ca^{2+} 对电导的影响是通过 H^+ 的作用而产生。目前 Ca^{2+} 和 H^+ 对电导的调节机制尚不完全清楚,但能够肯定,不同组织的各种缝隙连接对 Ca^{2+} 和 H^+ 的敏感性不同。酸中毒时增加缝隙连接电阻,进而减慢动作电位的扩布速率而引起传导延迟或阻滞,碱中毒时相反。还可看到,组织细胞损伤时可造成胞内PH值下降,可使细胞间的耦联作用降低,进而限制了损伤在组织中的扩布,从而起到保护作用。

2.4 血管紧张素 II

血管紧张素能降低缝隙连接的电阻。血管紧张素被认为是心梗后心室重塑的一种重要调节物,Stephen等^[29]发现作用新生鼠心室肌细胞 24h可提高主要的心室肌连接蛋白Cx43的表达,并导致缝隙连接数目及大小的增加。重塑过程涉及连接蛋白表达和分布的动态改变,这些改变是室性心律失常的发病基础,临床实验用ACEI治疗降低了梗塞后猝死或死亡率,支持了这些观点。De Mello和Altieri^[30]发现对成年鼠的心肌细胞注射 1 g/ml Ang II可以在20s内使缝隙连接传导下降55%。 $10\text{ }\mu\text{ mol}$ Ang II可以使GJ传导下降18%。相反,ACE抑制剂依那普利(1 g/ml)可在2分钟内使GJ传导增加106%。Ang II的作用不能被 β -肾上腺受体拮抗剂普萘洛尔阻断,但对蛋白激酶C抑制剂很敏感,并且可以完全被血管紧张素受体阻断剂阻断。可能的机理是,Ang作用AT受体(可能是 AT_1 受体)激活蛋白激酶C,从而降低GJ传导。但也不能完全排除Ang II释放去甲肾上腺素作用于 α -肾上腺受体的可能。另一研究中,DeMello^[31]提出细胞外肾素-血管紧张素可能控制细胞间GJ传导,他的研究显示细胞外给予Ang I ($10\text{ }\mu\text{ M}$)可导致耦联降低76%,可被ACE抑制剂(依那普利, $1\text{ }\mu\text{ M}$)阻断,而给予Ang II ($10\text{ }\mu\text{ M}$)时,可导致耦联降低60%,并可被ACE受体阻断剂 ($1\text{ }\mu\text{ M}$)阻断,从这个实验中,DeMello认为细胞外存在肾素-血管紧张素系统及其受体控制着细胞通讯。但至今为止,这些细胞间受体的自然特征及分布尚不清楚,因为这些作用起效很快,可以认为这些信号直接对连接子起作用,而不是改变了连接子的合成。Ang II对缝隙连接的慢性作用首先由Dodge等^[29]提出,研究显示

Ang II 作用于培养的新生大鼠心肌细胞 24h后可提高细胞间耦联。他们用二甲基硅油作为代谢标记物,发现Ang II 作用于培养的细胞 6-24h后, Cx43 含量将提高 0.24~0.29 倍,同时细胞膜内缝隙连接的数目增加,这些作用可被氯沙坦阻断,提示Ang II 是通过AT₁起作用。Polontehouk等^[32]同样发现, Ang II 作用于新生大鼠心肌细胞 24h后, Cx43 的含量可增加 50%左右,并可使电耦联提高大约 2 倍。

在前面的研究中提示,将培养的新生鼠心室肌细胞暴露于cAMP将提高Cx的含量和缝隙连接的数目和大小,近来研究结果及以前的观察提示至少有 2 大信号转导参与Ang II 刺激后引起的细胞内cAMP水平提高, Cx43 的表达增加及缝隙连接的数目和大小的改变^[33]。这些动态变化提示梗塞愈合早期传导通路的重塑是一个涉及提高连接蛋白表达和分布重排的过程,而非单纯的被动过程。

总之,缝隙连接几乎存在于哺乳动物所有的组织和细胞中,在细胞生长发育及分化过程中起重要作用,它的表达具有组织特异性。相邻细胞通过缝隙连接进行信息、和物质能量的交换,对细胞的新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理过程起着重要的调控作用。缝隙连接不仅受连接蛋白的磷酸化、PKC 通路的调控,还受各种神经介质和体液因素的调节。

2.5 GJ 相关疾病

目前已确认不少疾病和GJ基因突变相关^[34-37]。然而这些突变会影响细胞的门控通道开闭、膜稳定性等功能。细胞迁移在发育中起到了至关重要作用。发育中的中枢神经系统如果缺乏Cx43 表达则会影响神经元细胞的迁移^[38]。Cx43 基因突变相关人类疾病也报道过,如内脏心房异位综合征和眼齿指发育不良(ODDD)综合征^[39,40]。目前关于间隙连接(Gap junctions, GJs)临床意义的研究主要是有关肿瘤细胞增殖方面的作用^[41],而增殖恰是恶性肿瘤最具代表性标志之一。肿瘤细胞可以离开自身肿瘤组织跨细胞迁移到别处产生新的肿瘤^[42,43]。鉴于细胞骨架在细胞迁移中发挥了重要作用,表明Cx43 是通过与多种蛋白质相互作用来调节细胞骨架,无论Cx43 基因敲除还是抑制Cx43,都对细胞形态、黏附、极性及移动有着广泛的作用。随着研究的进一步深入, Cx43 将在肿瘤细胞的浸润和转移过程中扮演着越来越重要角色。

3 展望

细胞 GJ 通道的通讯功能受多种因素影响,主要与缝隙连接蛋白表达水平有关,相关研究证实其功能异常可导致产生多种 GJ 相关疾病,如蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后的脑血管痉挛(cerebral vascular spasm, CVS)、内脏心房异位综合征、ODDD、神经系统肿瘤等。有关人类的缝隙连接蛋白仍需要更进一步的研究,包括病理情况下在细胞运动迁移中缝隙连接蛋白如何发挥作用,有助于进一步揭示这类疾病的发病机制,并为预防治疗等提供理论依据。

参 考 文 献

(Reference)

- [1] De Leon JR, Buttrick PM, Fishman GI. Functional analysis of the connexin43 gene Promoter in vivo and in vitro[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1994, 26(3):379-389.
- [2] Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling[J]. *Eur J Biochem*, 1996, 238(1):1-27.
- [3] Gros DB, Jongasma HJ. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays*[J]. 1996, 18(9): 719-730.
- [4] Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel[J]. *Cell*. 1996, 84(3): 381-388.
- [5] IStauffrKA, Kumar NM, Gilula NB, et al. Isolation and Purification of gap junction channels [J]. *Cell Biol*, 1991, 115:141-150.
- [6] Christ GJ, Brink PR. Analysis of the presence and physiological relevance of subconducting states of connexin43- derived gap junction channels in cultured human corporal vascular smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 1999, 84(7):797-803.
- [7] Li X, Simard JM. Multiple connexins form gap junction channels in rat basilar artery smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 1999, 84(11): 1277-1284.
- [8] Spaeh MS, Heidlage JF, Dolber PC, et al. Electrophysiological effects of remodeling cardiac gap junctions and cell size: experimental and model studies of normal cardiac growth[J]. *Circ Res*, 2000, 86(3):302-311.
- [9] Brink PR, Ramanan SV, Christ GJ. Human connexin 43 gap junction channel gating: evidence for mode shifts and/or heterogeneity[J]. *Am J Physiol*, 1996, 271:C321-C331.
- [10] DAndrea P, Vittur F. Gap junctions mediate intercellular calcium signaling in cultured articular chondrocytes[J]. *Cell Calcium*, 1996, 20(5):389-397.
- [11] Hernandez -Blazquez FJ, Paulo PJ, et al. Control of intracellular movement of connexins by E-cadherin in murine skin papilloma cells[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 270(2):235-247.
- [12] Herve JC, Derangeon M, Sarrouilhe D, et al. Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818(8):1844-1865.
- [13] Cina C, Maass K, Theis M, et al. Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin 43 in neuronal migration[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(7): 2009-2021.
- [14] John SA, Revel JP. Connexin integrity is maintained by non-covalent bonds: Intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 178(3):2312-2318.
- [15] Guan X, Wilson S, Sehlender KK, Rueh RJ. Gap junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18beta-glycyrrhetic acid[J]. *Mol Carcinog*, 1996, 16:157-164.
- [16] Goodenough DA, Goliger J A, Paul DL. Connexins, connexons and intercellular communication[J]. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65:472-481.
- [17] Saez JC, Nainr AC, Czemik AJ, et al. Phosphorylation of connexin 43 and the regulation of

- neonatal rat cardiac myocyte gap junctions[J]. *J Mol Cell Cardiol*.1997,29(8):2131-2145.
- [18] De Mello,WC. Influence of alpha-adrenergic-receptor activation on junctional conductance in heart cells: interaction with beta-adrenergic adrenergic agonists[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*.1997,29(2):273-277.
- [19] Kwak BR, VanVeen TA, Analbers LJ, Jongsma HJ. TPA increases conductance but decreases permeability in neonatal rat cardiomyocyte gap junction channels[J]. *Exp Cell Res*.1995, 220(2): 456-463.
- [20] Rouet-Benizeb P, Mohmamadi K, Perennec J, et al. Protein kinase C isoform expression in normal and failing rabbit hearts[J]. *Circ Res* 1996,79(2):153-161.
- [21] Doble BW, Ping P, Kardami E. The epsilon subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation[J]. *Circ Res*. 2000,86(3):293-301.
- [22] Dhein S, Hammerrath SB. Aspects of the intercellular communication in aged hearts: effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2001, 364(5):397-408.
- [23] Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. Connexin 43 and connexin 45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation[J]. *Circ Res*, 2002,90(10):1100-1107.
- [24] Vna der Velden HM, Ausma J, Rook MB, et al. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat[J]. *Cardiovasc Res*, 2000,46(3):476-486.
- [25] Yan X, Zeng Z, Chen M, et al. Gap junction-associated Na⁺ influx is involved in the mediation of Ca²⁺ transients in neonatal rat ventricular myocytes[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015.
- [26] Li WC. Gap junctions in the nervous tissue[J]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*.1999,30:321-325.
- [27] Dhein S. Peptides acting at gap junctions[J]. *Peptides*, 2002,23:1701-1709.
- [28] Turin L, Warner AE. Intercellular pH in early *Xenopus* embryos: its effect on current flow between blastomeres[J]. *J Physiol*, 1980,300:489-504.
- [29] Dodeg SM, Beardslee MA, Darrow BJ, et al. Effects of angiotensin II on expression of gap junction channel protein connexin 43 in neonatal rat ventricular myocytes[J]. *J Am Cell Cardiol*, 1998,32(3):800-807.
- [30] De Mello W, Altieri P. The role of the renin-angiotensin system in the control of cell communication in the heart: effects of enalapril and angiotensin II [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*.1992,20(4):643-651.
- [31] De Mello,WC. Is an intracellular renin-angiotensin system involved in control of cell communication in heart[J]? *J Cardiovasc Pharmacol*, 1994,23(4):640-646.
- [32] Polontehouk L, Ebel B, Jaekels M, Dhein S. Chronic effects of endothelin-1 and angiotensin II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells[J]. *FASEB J*, 2002, 16(1): 87-89.
- [33] Salameh A, Polonchouk L, Hagendorff A, Dhein S, Pefieffr D. On the chronic regulation of gap junction protein connexin43(Cx43) expression[J]. *Br J Pharmacol*, 2001,133: 211-217.

- [34] Rhett JM, Jourdan J, Gourdie RG. Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1 [J]. *Mol Biol Cell*, 2011,22(9):1516-1528.
- [35] Butkevich E, Hulsmann S, Wenzel D, et al. Drebrin is an occludin-43 binding partner that links gap junction to the submembrane cytoskeleton[J]. *Curr Biol*, 2004, 14(8): 650-658.
- [36] Olk S, Turchinovich A, Grzendowski M, et al. Proteomic analysis of astroglial connexin 43 silencing uncovers a cytoskeletal platform involved in process formation and migration[J]. *Glia*, 2010, 58(4): 494-505.
- [37] Xu X, Francis R, Wei CJ, et al. Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells[J]. *Development*, 2006, 133(18):3629-3639.
- [38] Liu X, Hashimoto-Torii K, Torii M, et al. The role of ATP signaling in the migration of intermediate neuronal progenitors to the neocortical subventricular zone[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(33):11802-11807.
- [39] Becker DL, Thrasivoulou C, Phillips SR. Connexins in wound healing; perspectives in diabetic patients[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012,1818(8): 2068-2075.
- [40] Pfenniger A, Wohlwend A, Kwak BR. Mutations in connexin genes and disease[J]. *Eur J Clin Invest*, 2011, 41(1):103-116.
- [41] Zoidl G, Dermietzel R. Gap junctions in inherited human disease[J]. *Pflugers Arch*, 2010, 460(2):451-466.
- [42] Herve JC, Derangeon M, Sarrouilhe D, et al. Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012,1818(8):1844-1865.
- [43] Cina C, Mass K, Theis M, et al. Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin 43 in neuronal migration[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(7): 2009-2021.

致 谢

(Acknowledgement)

光阴似箭，转眼间，三年的大学生活即将结束，依依不舍之情难以言表。总结三年的大学生活，感觉获益颇多。在这里需要感谢的人很多，是他们让我从专业知识到人格塑造等等方面有了全新的改变。感谢石河子大学，在这里，舒适的学习环境，为我的日常学习生活提供了诸多方便。三年时间，亲身的学习生活体验更让我增加了对这所学校的热爱与依恋。感谢每一位老师，他们知识渊博，阅历丰富，讲课独具特色，无论是学识方面，还是品德方面，他们都是我最值得尊敬的人。

衷心感谢导师马克涛副教授三年来诲人不倦，无私奉献，在我硕士学习的三年中，从实验选题、方案设计等各个方面，马克涛副教授都倾注了大量的心血和汗水。从马老师的日常工作和教学中，让我深刻体会到他对事业的执着追求和勇于创新的精神，为我今后的工作学习树立了榜样。

衷心感谢司军强教授、李丽副教授在学习中的无私帮助与教诲，在实验过程中，无论遇到什么样的困难与困惑，他们都会一一解答，化繁为简，帮助我顺利完成实验。每次周会上都会对我的实验进展及相关数据细心指导。

感谢赵磊老师在电生理实验仪器维护、维修方面对本人的帮助，使研究工作得以顺利进行。感谢石文艳老师、张亮老师、魏丽丽老师、单莉雅等老师，有了他们帮助使学习及实验中遇到的问题迎刃而解。他们严谨求实的治学态度、敏锐丰富的科研思维、孜孜不倦的工作精神、朴实正直的生活作风都使我受益终身。还要感谢所有的师兄、师姐、师弟、师妹，感谢他们对我学习及生活上的支持和帮助。

作者简介

潘立君，女，生于1980年12月，籍贯山东。1998年09月至2003年06月就读于新疆医科大学 临床医学系 学历本科，2012年08月至今就读于石河子大学医学院，生理学专业。

学历与经历

1992年9月—1998年6月	新疆农业大学附属中学
1998年9月—2003年6月	新疆医科大学临床医学系
2012年9月—2015年6月	石河子大学医学院 2012级生理学研究生

攻读硕士研究生学位期间参与的科研项目

参加了国家自然科学基金《自发性高血压大鼠心、脑、肾和肠系膜微动脉缝隙连接特性的比较研究》(31260247)的部分研究工作。

研究生期间的研究成果

1、潘立君，李新芝，卓泓宇等.Cx37和Cx40在自发性高血压大鼠不同动脉间表达差异，重庆医学，2015，44(1):4-6.

石河子大学硕士研究生学位论文 导师评阅表

研究生姓名	潘立君	学制	三年
专业	生理学	研究方向	神经生理和血管生理

学术评语:

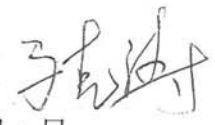
该学位论文以自发性高血压和正常血压的大鼠脑动脉作为研究对象,运用全细胞膜片钳技术、western-blot、RT-PCR 以及透射电镜技术,观察自发性高血压和正常血压大鼠的脑动脉的收缩反应的异同,并探讨了自发性高血压大鼠的脑动脉平滑肌细胞间缝隙连接对血管收缩反应的影响。进行了以下研究:

- 1、自发性高血压和正常血压大鼠脑动脉分支,应用全细胞膜片钳观察平滑肌细胞膜电容和膜电导的异同。
- 2、Western-blot 技术检测 SHR 和正常血压大鼠脑动脉 Cx37、Cx40、Cx43 和 Cx45 蛋白的表达。
- 3、RT-PCR 检测 SHR 和正常血压 Wistar 大鼠脑动脉 Cx37、Cx40、Cx43 和 Cx45 mRNA 的表达。
- 4、透射电镜检测 SHR 和正常血压大鼠脑动脉平滑肌细胞间缝隙连接的数量。

此项研究主要集中在自发性高血压模型的脑动脉,深入研究了自发性高血压疾病对血管系统损害的发生机制,也为本实验室后续研究自发性高血压对缝隙连接的影响机制提供了依据。

课题研究立意新颖,构思严谨,实验设计完整、合理,技术路线清晰,数据充分、真实,结果可靠。

该研究生具备严肃的科学态度和严谨求实的科研作风,科研动手能力强,勤奋钻研,善于思考,论文撰写观点明确,论据充分,条理性和逻辑性强。同意作为硕士学位论文提交答辩委员会进入答辩过程。

指导教师签字: 

2015 年 6 月 12 日