

分类号:
学 号: 20172014013

密 级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



逼尿肌 Cx43 分布和表达异常 在 DCP 膀胱形成中的作用

学 位 申 请 人	李朋
指 导 教 师	王勤章
申 请 学 位 类 别	医学硕士
专 业 名 称	外科学
研 究 领 域	尿动力学相关研究
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2020年6月

**Role of abnormal detrusor Cx43 distribution and expression in
bladder formation of DCP**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Li Peng

(Surgery)

Dissertation Supervisor: Prof. Wang Qin-zhang

Jun, 2020

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

本人所呈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：李明

时间：2020年6月4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：李明

时间：2020年6月4日

导师签名：李勤章

时间：2020年6月4日

摘要

目的: 检测逼尿肌组织缝隙连接蛋白 43 (Connexin43, Cx43) 在豚鼠糖尿病膀胱 (Diabetic cystopathy, DCP) 中的分布及表达情况, 研究 Cx43 在糖尿病膀胱形成中的作用。

方法: 2-3 月龄健康雄性豚鼠 60 只, 随机分为实验组 (n=40)、正常对照 (normal control, NC) 组 (n=20)。实验组豚鼠单次腹腔注射溶于 pH4.4、浓度 0.1mmol/L 枸橼酸钠的链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 诱导建立糖尿病豚鼠模型, 利用尿动力学检测筛选出糖尿病膀胱豚鼠纳入 DCP 组 (n=10), 未形成糖尿病膀胱豚鼠纳入 NDCP 组 (n=10);

NC 组 (n=10) 豚鼠单次腹腔注射枸橼酸钠溶液。HE 染色观察 DCP 组、NDCP 组和 NC 组三组膀胱逼尿肌组织病理学变化, 通过免疫荧光染色法观察 Cx43 在三组膀胱逼尿肌中的定位及分布, 采用 Western blot 技术检测三组膀胱逼尿肌组织内 Cx43 蛋白的表达。

结果: HE 染色发现: DCP 组豚鼠膀胱逼尿肌肌束形态相对不规则, 各肌纤维之间间距增宽且分布稀疏, 可见疏松纤维结缔组织数量增加且呈无序不规则排列。NDCP 组和 NC 组豚鼠膀胱逼尿肌肌束形态规则, 肌纤维排列紧密有序。免疫荧光染色结果显示: 逼尿肌组织细胞膜和细胞质内 Cx43 被标记荧光特异染为红色, 表明 Cx43 主要表达在细胞膜和细胞质中, 细胞核上未见 Cx43 表达。DCP 组豚鼠逼尿肌组织 Cx43 荧光染色强度明显低于 NDCP 组和 NC 组。NDCP 组和 NC 组之间阳性染色强度对比无明显差异。

Western blot 检测发现, DCP 组膀胱组织 Cx43 蛋白表达 (0.52 ± 0.02) 低于 NC 组 (0.68 ± 0.02) 和 NDCP 组 (0.70 ± 0.01) ($P < 0.01$), NDCP 组与 NC 组膀胱组织 Cx43 蛋白表达对比, 差异无统计学意义 ($P > 0.01$)。

结论: DCP 膀胱逼尿肌 Cx43 表达明显减少, Cx43 的表达降低或许是导致 DCP 发病的重要因素之一。

关键词: 糖尿病膀胱; 逼尿肌; 缝隙连接蛋白 43; 链脲佐菌素;

论文类型: A (基础研究)

Abstract

Objective: To detect the distribution and expression of connexin43 (Cx43) in detrusor tissue in guinea pig diabetic cystopathy (DCP), and to study the role of Cx43 in the formation of diabetic bladder.

Methods: Sixty healthy male guinea pigs aged 2-3 months were randomly divided into a experimental group (n = 40) and a normal control (NC) group (n = 20). In the experimental group, guinea pigs were injected intraperitoneally with Streptozotocin (STZ) dissolved in pH 4.4 and concentration of 0.1 mmol / L sodium citrate to induce diabetic guinea pig models. Diabetic bladder guinea pigs were screened into the DCP group (n = 10), guinea pigs without diabetic bladder were included in the NDCP group (n = 10), and the NC group (n = 10) was given a single intraperitoneal injection of sodium citrate Solution. The pathological changes of bladder detrusor muscle were observed by HE staining in DCP group, NDCP group and NC group. The location and distribution of Cx43 in bladder detrusor muscle were observed by immunofluorescence staining. The expression of Cx43 protein in bladder detrusor tissue of the three groups was detected by western blot.

Results: HE staining revealed that the morphology of the bladder detrusor muscle bundles in the guinea pigs of the DCP group was relatively irregular, and the distance between the muscle fibers was widened and sparsely distributed. The morphology of bladder detrusor muscle bundles of guinea pigs in NDCP group and NC group was regular, and the muscle fibers were arranged closely. The results of immunofluorescence staining showed that Cx43 in the detrusor tissue cell membrane and cytoplasm was specifically stained with red, indicating that Cx43 was mainly expressed in the cell membrane and cytoplasm, and no Cx43 expression was seen on the nucleus. Compared with the NDCP group and the NC group, the intensity of Cx43 fluorescent staining in the detrusor tissue of guinea pigs in the DCP group was significantly lower. The difference in the intensity of positive staining between the NDCP group and the NC group was not significant. Western blot showed that the expression of Cx43 protein (0.52 ± 0.02) in bladder tissue in DCP group was lower than that in NC group (0.68 ± 0.02) and NDCP group (0.70 ± 0.03) ($P < 0.01$). The expression of Cx43 protein in the bladder tissue between the NDCP group and the NC group was not significantly different ($P > 0.01$).

Conclusion: Decreased expression of Cx43 in bladder detrusor may be one of the important factors leading to the onset of DCP.

Key words: diabetic cystopathy; detrusor muscle; connexin 43; streptozotocin

Type of Dissertation:A (Basic research)

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
目录.....	III
英文缩略语表.....	IV
前言.....	1
材料与方法.....	2
1. 材料.....	2
1.1 实验动物.....	2
1.2 主要试剂.....	2
1.3 主要仪器设备.....	3
1.4 主要液体配制.....	3
2. 实验方法.....	4
2.1 建立动物模型.....	4
2.2 尿动力学检测.....	4
2.3 采集实验标本.....	4
2.4 HE 染色.....	4
2.5 免疫荧光染色观察逼尿肌 Cx43 的分布情况.....	6
2.6 Western blot 法检测逼尿肌组织 Cx43 蛋白的表达.....	7
2.7 统计学分析.....	8
3. 技术路线.....	9
.....
实验结果.....	10
1. 尿动力学检查结果.....	10
2. HE 染色结果.....	10
3. 免疫荧光染色结果.....	10
4. Western blot 结果.....	11
讨论.....	12
结论.....	15
参考文献.....	16
文献综述.....	21
致谢.....	35
作者简介.....	36
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表.....	37

英文缩略语表

(Abbreviations)

缩略词	英文名称	中文名称
Cx43	connexin43	缝隙链接蛋白 43
DCP	diabetic cystopathy	糖尿病膀胱
STZ	streptozotocin	链脲佐菌素
ICCs	interstitial cells of Cajal	卡哈尔间质细胞
Cx	connexin	缝隙连接蛋白
GJ	gap junction	缝隙连接
PBS	phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲溶液
GJIC	gap junction intercellular communication	缝隙连接细胞间通讯功能
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
BCA	bicinchoninic acid	聚氰基丙烯酸正丁酯
PVDF	Poly vinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
TBS	tris buffered saline	三乙醇胺缓冲盐水溶液
ECL	electrochemiluminescence	电化学发光
FD	functional dyspepsia	功能性消化不良
NGF	nerve growth factor	神经生长因子
ATP	adenosine triphosphate	三磷酸腺苷

前言

(Introduction)

随着社会经济的飞速发展和物质生活的日益丰富,加之遗传易感性等相关危险因素,中国成年人群糖尿病患病率显著升高^[1]。糖尿病作为一种代谢性疾病,其多种相关并发症的出现给患者和医生带来很大困扰。糖尿病膀胱病变(diabetic cystopathy, DCP)是糖尿病泌尿系统并发症之一,在糖尿病患者中的发病率为 25%~85%^[2]。糖尿病膀胱病变临床主要表现为膀胱收缩功能障碍、膀胱敏感性减弱、膀胱顺应性增加,导致残余尿量增多、膀胱最大容量增大,患者常表现为尿急、排尿困难、尿潴留等症状,可伴尿失禁及反复泌尿道感染,严重影响患者的生活质量^[3-5]。DCP 发展到后期严重者可最终导致尿毒症的出现,从而危及患者的生命安全,因此越来越受到临床医生和患者的重视^[6]。DCP 的病因较为复杂,其发病机制至今仍不明确,近些年国内外尚未出现关于 DCP 发病机制研究的大型随机对照试验,对 DCP 相关病因和发病机制的研究仍处于探索阶段^[7, 8]。既往观点认为神经功能障碍可能是 DCP 的唯一病因,而随着针对 DCP 更加深入的研究,逼尿肌功能障碍也被认为是导致 DCP 发生发展的重要病因^[9]。有研究表明在通过注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)建立的小鼠糖尿病模型中,实验发现糖尿病小鼠的膀胱逼尿肌异常肥大,膀胱逼尿肌的收缩力明显降低,同时逼尿肌中负责调节收缩功能的离子泵出现功能障碍^[10]。裴立文等^[11]对 68 例进行尿动力学检测患者的结果和糖尿病小鼠逼尿肌肌条实验结果采用回顾性分析,发现逼尿肌兴奋性降低导致的收缩功能障碍可能是引起 DCP 的主要原因。本课题组的既往研究结果表明,膀胱逼尿肌 cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)可能作为起搏细胞,参与了膀胱逼尿肌的收缩活动,ICCs 细胞的数量减少、结构变化及形态异常都会影响膀胱逼尿肌的正常舒缩,进而导致 DCP 的形成^[12]。以上有关糖尿病膀胱动物模型的体外实验结果均表明,膀胱逼尿肌功能障碍可能是糖尿病膀胱的重要发病机制之一。

缝隙连接蛋白(Connexin, Cx)是跨膜蛋白超家族的一员,广泛分布于除红细胞和骨骼肌之外的各器官和组织中,其作为重要的组成蛋白参与细胞间缝隙连接(gap junction, GJ)的形成^[13-15]。6 个 Cx 聚集成团形成六聚体,称为连接子或半通道,中间的中央孔具有亲水性。邻近细胞间两个连接子能够对接,组成细胞间缝隙连接通道^[16]。正常状态下跨膜通道呈关闭状态,在特殊情况下才能被激活,介导细胞间缝隙连接通讯功能(gap junction intercellular communication, GJIC),负责细胞间信息和物质的交换,调控细胞新陈代谢、增殖和分化等生理过程^[17, 18]。目前已发现的 Cx 有 20 多种,其中 Cx43 数量最丰富且分布最为广泛,是组成缝隙连接最主要的蛋白^[19, 20]。其构成的连接子在包膜上大量存在,并彼此聚集成团成为缝隙连接斑,Cx43 数量的多少影响着缝隙连接细胞间的正常通讯功能的实现^[21]。Cx43 与多系统、多种疾病的发生发展密切相关。Zhu 等^[22]证实 Cx43 是心脏组织内缝隙连接蛋白的重要成员,Cx43 对心脏缺血/再灌注过程中心肌保护起着至关重要的作用。刘佳丽等^[23]发现胃肠道 ICCs 细胞 Cx43 蛋白表达降低是胃肠动力障碍性疾病发病的主要原因之一。黄科华等^[24]的研究结果显示子宫平滑肌组织中 Cx43 表达降低与子宫收缩乏力性产后出血的发病紧密相关。Cx43 还参与了多种类型肿瘤的形成^[25-27]。

泌尿系统疾病的发生发展过程中 Cx43 的存在同样不可忽略,Cx43 表达增高导致的

缝隙连接细胞间通讯增强可能是膀胱过度活动症发病的重要原因^[28]。Takuma 等^[29]研究则表明年龄相关性逼尿肌收缩功能障碍可能是由于膀胱平滑肌 Cx43 表达降低导致的缝隙连接通讯功能下调。由此可见 Cx43 表达增高或降低都会对膀胱逼尿肌正常收缩活动产生影响，逼尿肌 Cx43 表达量减少使得细胞间无法形成足够数量的缝隙连接，缝隙连接细胞间通讯功能不能正常实现，最终导致逼尿肌收缩活动无法正常进行。而逼尿肌收缩功能障碍作为 DCP 主要病因之一，Cx43 与 DCP 的发病是否有关，DCP 膀胱组织中 Cx43 的表达情况如何，国内外尚未有相关研究作出解释。

据此本研究推测：Cx43 在 DCP 的形成中起重要作用，DCP 膀胱逼尿肌细胞间 Cx43 表达下降。本研究通过诱导建立糖尿病动物模型，利用尿动力学检查筛选出符合实验要求的 DCP 动物模型，采用免疫荧光染色技术观察 DCP 膀胱逼尿肌组织 Cx43 的定位及分布，通过 Wester blot 技术检测 DCP 膀胱逼尿肌组织内 Cx43 的表达情况，探讨 Cx43 在 DCP 形成中的作用，为 DCP 后续深入研究和临床治疗提供理论参考。

材料与方法

(Materials & Methods)

1. 材料

1.1 实验动物

2~3 月龄，体质量 200~300 g 的普通级荷兰种健康雄性豚鼠 40 只，采购于新疆医科大学动物实验中心，普通环境下饲养于石河子大学医学院第一附属医院动物实验中心。

1.2 主要试剂

试剂	生产厂家/品牌
水合氯醛	上海吉至生化科技有限公司
链脲佐菌素	北京索莱宝科技有限公司
BAC 蛋白检测试剂盒	NC-BIO
枸橼酸钠	上海经科化学科技有限公司
无水乙醇	国药集团
二甲苯	国药集团
伊红	上海源叶科技有限公司
苏木精	上海源叶科技有限公司
PBS	上海联迈生物科技公司
浓缩型正常山羊血清	武汉博士德生物工程有限公司
DAPI	碧云天生物技术研究所
荧光标记羊抗小鼠 IgG	武汉博士德生物工程有限公司
抗荧光淬灭封片剂	southernbiotech 公司
Cx43 抗体	Abcam 公司
GAPDH	Bioss
ECL 显色试剂盒	北京索莱宝科技公司

生理盐水	武汉纯度生物科技有限公司
TBST	Absin
丙烯酰胺	Aladdin
N, N'-亚甲双丙烯酰胺	Macklin
十二烷基硫酸钠 SDS 溶液	北京凯瑞基生物科技有限公司
SDS-PAGE 浓缩胶缓冲液	LG
SDS-PAGE 加样缓冲液	LG
75%酒精	上海经科化学科技有限公司
Nacl	上海源叶科技有限公司

1.3 主要仪器设备

仪器设备	生产厂家/品牌
尿动力仪	Laborie 公司
病理切片机	德国 Leica
组织摊烤片机	武汉俊杰设备有限公司
BX53 型生物显微镜	日本奥林巴斯
脱水机	武汉俊杰设备有限公司
抗原修复用微波炉	美的
垂直板电泳槽	美国 Bio-rad
电泳仪	美国 Bio-rad
水平摇床	碧云天生物技术研究
电转仪	Invitrogen
水浴锅	上海博迅医疗生物仪器有限公司、
离心机	湘仪离心机仪器有限公司
移液枪	美国 Drummond
匀浆器	德国 ART
酶标仪	Thermofisher
凝胶成像分析系统	美国 Proteinsimple 公司
-80°C立式超低温冰箱	Thermofisher
-20°C低温冰箱	青岛海尔生物医疗公司
超净工作台	上海智城分析仪器公司

1.4 主要液体配制

主要液体	配制方法
30%丙烯酰胺	29g 丙烯酰胺+1g 甲叉双丙烯酰胺，溶于 100mL 三蒸水中
SDS-PAGE 缓冲液	14.4g 甘氨酸+3g Tris 碱+1g SDS，溶于 1L 三蒸水中
0.5mol/L Tris-Cl (pH6.8)	将 6g Tris 碱溶于 80mL 三蒸水中，用浓盐酸调 pH 到 6.8(约需浓盐酸 3ml)，加三蒸水至 100mL
1mol/L Tris-Cl (pH7.5)	将 60.58g Tris 碱溶于三蒸水中，用浓盐酸调 pH 到 8.8 (约需浓盐酸 32ml)，加三蒸水定容至 500mL。
10%过硫酸铵	将 0.1g 过硫酸铵溶于 1ml 水中，现用现配
10%SDS	将 5g SDS 溶于 50mL 三蒸水中，室温避光保存
10×电泳液	Tris 碱 30.3 g+甘氨酸 187.7 g，三蒸水定容至 1000 mL 保存
1×电泳液	10×电泳液 100 mL+ 10%SDS 10 mL，加入三蒸水定容至 1000

	mL, 保存
10×TBS 缓冲液	1.0M Tris-HCl 100 mL+NaCl 88 g, PH 值调至 7, 加入三蒸水定容至 250 mL, 保存
TBST	Tris 碱 1.21g+NaCl 14.6g, 溶于 500ml 蒸馏水中, 加入 6~10 滴浓盐酸, 调 pH 到 7.5 左右, 加入 250 μ l tween-20
封闭液	5%脱脂奶粉或 1%BSA (用 TBS 配制)。现用现配
水合氯醛	水合氯醛 10mL 与 100mL 三蒸水充分混合后保存

2. 实验方法

2.1 建立动物模型

参考李维仁等^[30]方法建立糖尿病豚鼠模型。全部动物正常饮水饲料适应性喂养 1 周后随机分为 2 组: 实验组 40 只, 正常对照组 20 只。造模开始前先将实验组豚鼠禁食 12h, 后按 200 mg/kg 体质量剂量将链脲佐菌素 STZ[溶于 0.1 mol/L 枸橼酸钠溶液(pH=4.4)中] 一次性注射到豚鼠腹腔内, 正常对照组豚鼠按 200 mg/kg 体质量剂量向豚鼠腹腔内一次性注射 0.1 mol/L 的枸橼酸钠溶液。以耳静脉取血法监测豚鼠血糖, 4 周内每次随机测量血糖均 \geq 16.7 mmol/L 的豚鼠为糖尿病豚鼠^[31], 做标记并放回笼中以高糖高脂饲料饲养, 其余豚鼠保持正常饮水饲料饲养。造模过程中实验组豚鼠死亡 2 只, 糖尿病诱导失败 4 只, 共 34 只豚鼠糖尿病模型诱导成功。

2.2 尿动力学检测

成功诱导糖尿病豚鼠共 34 只, 后续喂养过程中死亡 2 只, 剩余 32 只。第 9 周时对所有豚鼠行尿动力学检查。将水合氯醛以 300 mg/kg 体质量为注射剂量, 对豚鼠腹腔注射进行麻醉, 麻醉生效后将豚鼠摆仰卧位并固定, 充分暴露下腹部, 碘伏消毒局部皮肤, 在耻骨上部位行正中切口, 逐层分离使膀胱充分暴露, 两个 4 号留置针自膀胱顶穿刺进入, 一个连接微量灌注泵 (0.25 mL/min 生理盐水灌注膀胱), 另一个与压力换能感受器相连进行膀胱压力及膀胱残余尿量测定。连续记录 5 个排尿周期, 分别记录每个模型的膀胱残余尿量、膀胱顺应性、最大膀胱压力及最大膀胱容量, 以膀胱残余尿量/膀胱最大容量 $>$ 10%为 DCP 诊断标准^[31]。实验组共筛选出符合标准的 DCP 豚鼠 14 只, 从中随机选取 10 只纳入 DCP 组; 不符合标准豚鼠 18 只, 从中随机选取 10 只纳入 NDCP 组; 从 20 只正常对照组豚鼠中随机选取 10 只纳入 NC 组。

2.3 采集实验标本

待完成尿动力学检测后, 移除尿动力学检测设备。确认豚鼠仍处于麻醉状态下, 用组织剪将膀胱自腹腔内取出并快速保存。

2.4 HE 染色

(1) 取材与固定

取豚鼠膀胱组织, 投入预先配好的固定液中 (10%福尔马林) 进行固定。

(2) 组织脱水

依次用低浓度到高浓度酒精作脱水剂, 逐渐脱去组织中水分

脱水剂	时间
75%酒精	4h
85%酒精	2h
90%酒精	1.5h
95%酒精	1h
无水乙醇I	0.5h
无水乙醇II	0.5h

(3) 组织透明

脱水完成后将组织置于透明剂（二甲苯）中进行透明，二甲苯既溶于酒精又溶于石蜡。

(4) 浸蜡和包埋组织

完成透明之后，将组织块重二甲苯中取出并晾干，晾干后将组织块完整浸泡在溶化好的石蜡中，保证石蜡将组织块完全包裹。将石蜡包裹的组织块放入溶蜡箱中保温，观察石蜡完全浸入组织块后，对组织块进行包埋。

(5) 切片与贴片

把包埋好的蜡块放在切片机上，固定蜡块，使用切片机将蜡块切成厚度为 4 微米的均匀薄片，把切好的薄片放入温水浴锅中，切片在温水中加热发生形变，观察到切片完全展开后，将切片贴到载玻片上，放入 60℃烤箱中，烤片 3 小时。

(6) 切片脱蜡

将石蜡切片置于以下溶液中浸泡脱蜡

液体	时间
二甲苯 I	10min
二甲苯	10min
无水乙醇	5min
无水乙醇	5min
95%酒精	3min
90%酒精	3min
80%酒精	2 min
70%酒精	2min
蒸馏水	2min

(7) 染色

将已入蒸馏水后的切片放入苏木精水溶液中染色 5-7min，自来水浸洗返蓝后将切片置于 1%盐酸酒精分化 2-5s，随后放入自来水浸洗返蓝。将切片放入伊红染色中染色 1min 后用自来水冲洗。

(8) 脱水透明

染色完后需要对切片进行再次脱水和透明。将切片放入盛有纯酒精的容器内脱水，在置于装有二甲苯的器皿中进行透明处理。

(9) 封固

对切片进行二次透明之后，将切片从二甲苯溶液中取出，将切片风干，将美国树胶滴在切片上，盖上盖玻片，封固，将切片置于显微镜下观察。

2.5 免疫荧光染色观察逼尿肌 Cx43 的分布情况

(1) 取材与固定

取豚鼠膀胱组织，投入预先配好的固定液中（10%福尔马林）进行固定。

(2) 组织脱水

依次用低浓度到高浓度酒精作脱水剂，逐渐脱去组织中水分

脱水剂	时间
75%酒精	4h
85%酒精	2h
90%酒精	1.5h
95%酒精	1h
无水乙醇I	0.5h
无水乙醇II	0.5h

(3) 组织透明

组织块经酒精脱水后置于二甲苯中透明。

(4) 浸蜡和包埋组织

完成透明之后，将组织块重二甲苯中取出并晾干，晾干后将组织块完整浸泡在溶化好的石蜡中，保证石蜡将组织块完全包裹。将石蜡包裹的组织块放入溶蜡箱中保温，观察石蜡完全浸入组织块后，对组织块进行包埋。

(5) 切片与贴片

把包埋好的蜡块放在切片机上，固定蜡块，使用切片机将蜡块切成厚度为 4 微米的均匀薄片，把切好的薄片放入温水浴锅中，切片在温水中加热发生形变，观察到切片完全展开后，将切片贴到载玻片上，放入 60℃烤箱中，烤片 3 小时。

(6) 切片脱蜡

将石蜡切片置于以下溶液中浸泡脱蜡

液体	时间
二甲苯 I	10min
二甲苯	10min
无水乙醇	5min
无水乙醇	5min
95%酒精	3min
90%酒精	3min
80%酒精	2 min
70%酒精	2min
蒸馏水	2min

(7) 抗原修复

抗原修复的过程需要在微波炉中进行。切片完成脱蜡水化之后，把切片从蒸馏水中取出。准备一个烧杯，将不锈钢切片架置于烧杯内，向烧杯中加入适量枸橼酸缓冲液（0.01M，pH6.0），保证枸橼酸钠缓冲液的液面要高于切片。将微波炉调制高档位，快速加热使液体沸腾后，将微波炉调至中档位。开始计时，10-15min 后取出微波炉中的烧杯，迅速放入冷水中降温，当枸橼酸钠溶液的温度下降到室温是，将玻片取出，用 PBS 冲洗 3 遍，每遍冲洗 3min。

(8) 血清封闭

PBS 冲洗玻片后, 用吸水纸把玻片上的水分吸干, 用免疫组化笔在组织周围画圈。将正常山羊血清进行稀释, 稀释完成后滴加在玻片上。在室温下封闭 30min, 目的是减少非特异性染色。

(9) 加入一抗

封闭 30min 后, 将玻片上多余的液体甩去。对 Cx43 抗体进行稀释, 将稀释好的 Cx43 抗体滴加在玻片上, 放到 4°C 湿盒中孵育过夜。

(10) 加入荧光二抗

将切片从湿盒中取出, 用 PBS 对切片进行冲洗, 冲洗 3 次, 每次冲洗 3min。然后用吸水纸把切片上的水分吸干, 把稀释好的荧光(FITC)标记羊抗小鼠 IgG 滴在切片上, 置于湿盒中 20-37°C 孵育 1h, 随后用 PBS 冲洗切片 4 次, 每次冲洗 3min。

(11) 复染

在切片上滴加 DAPI 后, 避光孵育 5min, 对本标本进行染核, 用 PBS 对切片进行冲洗, 冲洗 4 次, 每次 5min。最后洗去多余的 DAPI。

(12) 封片镜检

将切片上的液体用吸水纸擦干, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 最后在荧光显微镜下观察切片、采集图像。

2.6 Western blot 法检测逼尿肌组织 Cx43 蛋白的表达

(1) 提取逼尿肌组织总蛋白

①将膀胱组织从-80°C冰箱中取出, 用组织剪将膀胱组织轻轻剪碎, 将少量剪碎的组织置于 2mL EP 管中。

②每个 EP 管中加入 300 μ l 含 PMSF 的单去污剂裂解液裂, 并置于自动匀浆机中匀浆。

③匀浆完成后将 EP 管置于冰上 30min 充分裂解。裂解 30 min 后, 即可用移液器将裂解液移至 1.5ml 离心管中, 然后在 4°C 下 12000rpm 离心 5min, 取上清分装于 0.5ml 离心管中并置于-20°C保存。

(2) BCA 法测定蛋白浓度:

①将蛋白样品进行适当稀释。样品各取 1 μ l, 与 19 μ l PBS 混合进行稀释, 即测试样品稀释 20 倍。

②将 BSA 标准品进行稀释, 制成蛋白浓度为 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 标准蛋白。

③BCA 工作液的制备

④将 PBS 稀释过的蛋白样品、稀释过的标准蛋白分别加入 96 孔板内, 标准品各设 2 个平行孔, 待测样品设 3 个平行孔, 每孔加入体积 20 μ l。加入 PBS 的 2 个平行孔为空白对照。

⑤按 50:1 比例将 BCA 试剂盒中 A 液和 B 液进行混合, 将混合液加入 96 孔板内, 每孔加入 200 μ l, 注意不要产生气泡, 以免影响反应。准备 96 孔板, 每孔先加入 200 μ L BCA 工作液, 再加入标准品或样本 25 μ L。

⑥37°C 环境下, 避光孵育 30 min。

⑦用 DG-3022A 酶标仪测定 OD568。

⑧根据标准蛋白浓度及其相应的 OD 值计算直线回归方程, 根据蛋白样品 OD 值, 利用回归方程计算出样品蛋白浓度。

(3) 蛋白变性

将提取的蛋白上清 5x 蛋白上样缓冲液, 放入沸水中进行沸水浴 10min。变性完后冷

却至室温再放入-20℃保存。

(4) 电泳

①制备电泳胶。将玻璃板洗净擦干后，固定在制胶器上后，开始配分离胶，将分离胶灌入玻璃板空隙内到适当的高度，用无水乙醇覆盖分离胶，直至胶完全聚合。将无水乙醇倒出后用双蒸水轻轻冲洗，用滤纸吸干水分。然后加入浓缩胶到合适的高度，插入梳齿。浓缩胶完全聚合后取出梳齿。

②电泳分离。将制备好的胶固定到电泳槽上，储液池中倒入电泳液。用微量加样器将制备好的蛋白样品和 MAKER 加入上样孔，各样品总蛋白量为 40μg。加样后先恒压 80V 电泳至溴酚蓝指示剂在浓缩胶与分离胶交界处成线状，改为恒压 120v 至溴酚蓝到凝胶底部，此过程约用时 1.5h。

(5) 电转移

取出凝胶根据 Marker 切下目的条带，用蒸馏水冲洗，根据 PAGE 凝胶的大小，剪出相同大小的 PVDF 膜和滤纸，PVDF 膜用甲醇浸泡数秒后和滤纸一同浸泡于电转缓冲液中。按照黑色板-纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-纤维垫-白色板依次放好，夹紧板后放入转膜仪内，黑色板的一面对照黑色负极。在转膜槽中加满电转液开始转膜。转膜条件：GAPDH---200mA，90min；Cx43---200mA，120min 后 300mA，30min。

(6) 免疫印迹显色

①用 TBST（封闭液）浸泡 PVDF 膜，室温摇床封闭 2h。

②用封闭液稀释一抗，使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中，4℃孵育过夜。GADPH 按 1:1000 稀释，Cx43 按 1:100 稀释。

③TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5-6 次，5min/次。

④用封闭液稀释二抗---1:50000 稀释，使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中，37℃摇床孵育 2h。

⑤TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5-6 次，5min/次。

⑥将 ECL 试剂中增强液与稳定的过氧化物酶溶液按 1:1 比例混匀，滴加工作液于 PVDF 膜上，反应数分钟待荧光带明显后，用滤纸吸去多余的底物液，铺盖保鲜膜，X 光胶片压片后依次放入显影液中显影，待有明显条带出现后，终止显影并放入定影液中定影，自来水冲洗胶片后晾干。

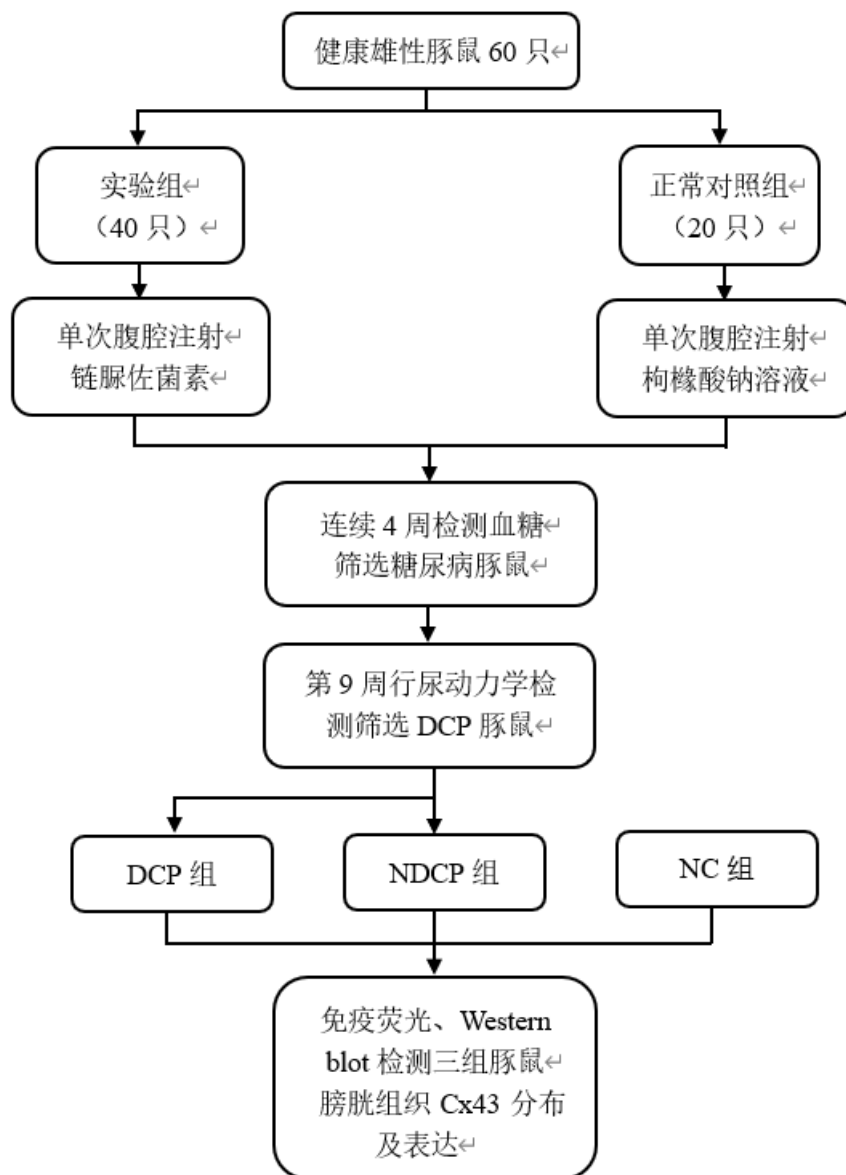
(7) 结果分析

晾干胶片，扫描胶片，用 Image J 分析胶片灰度值。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较用 One-way ANOVA 方差分析，组间多重比较采用 SNK-q 检验， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 技术路线



实验结果

(Results)

1. 尿动力学检查结果

尿动力学参数显示: DCP 组豚鼠最大膀胱容量、膀胱顺应性及残余尿量较 NDCP 组和 NC 组明显增加 ($P < 0.01$), DCP 组膀胱最大压力较 NDCP 组和 NC 组明显减小 ($P < 0.01$), NDCP 组和 NC 组上述指标比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

Tab.1 Comparison of urodynamic parameters and bladder wet weights between three groups

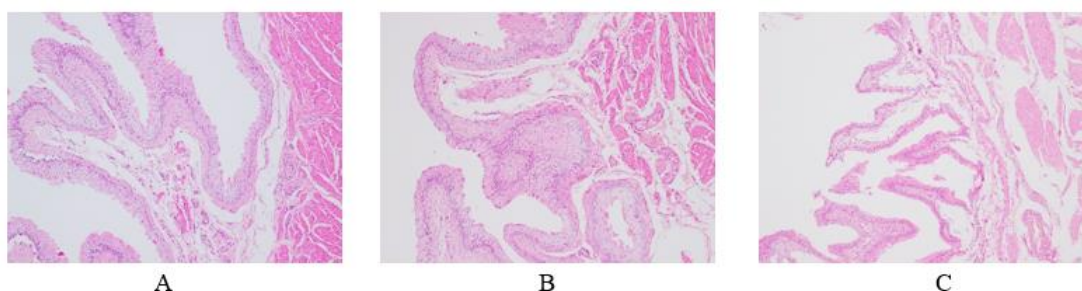
组别	<i>n</i>	最大膀胱容量 (mL)	最大膀胱压力 (kPa)	膀胱顺应性 (mL/kPa)	残余尿量 (mL)
NC 组	10	1.69±0.06	2.41±0.04	1.12±0.03	0.04±0.01
NDCP 组	10	1.73±0.01	2.26±0.18	1.06±0.01	0.07±0.02
DCP 组	10	3.33±0.18 ^{ab}	1.63±0.06 ^{ab}	3.54±0.52 ^{ab}	0.70±0.04 ^{ab}
<i>F</i>		747.39 ^{**}	130.56 ^{**}	218.33 ^{**}	2160.43 ^{**}

** $P < 0.01$; a: 与 NC 组比较, $P < 0.05$; b: 与 NDCP 组比较, $P < 0.05$

图 1. 三组豚鼠膀胱尿动力学参数对比

2. HE 染色结果

HE 染色发现: DCP 组豚鼠膀胱逼尿肌肌束形态相对不规则, 各肌纤维之间间距增宽且分布稀疏, 可见疏松纤维结缔组织数量增加且呈无序不规则排列。NDCP 组和 NC 组豚鼠膀胱逼尿肌肌束形态规则, 肌纤维排列紧密有序。结果表明 DCP 组豚鼠膀胱逼尿肌形态和分布发生改变, 提示 DCP 膀胱模型建立成功。



注: A 表示 DCP 组; B 表示 NDCP 组; C 表示 NC 组

图 1 光镜下三组豚鼠膀胱逼尿肌的形态及分布 ($\times 100$)

3. 免疫荧光染色结果

免疫荧光染色结果显示: 逼尿肌组织细胞膜和细胞质内 Cx43 被标记荧光特异染为红色, 而细胞核未被染色。表明 Cx43 主要表达在细胞膜上和细胞质中, 较少或不表达于细胞核。DCP 组豚鼠逼尿肌组织 Cx43 荧光染色强度明显低于 NDCP 组和 NC 组。

NDCP 组和 NC 组之间阳性染色强度对比无明显差异 (图 2)。

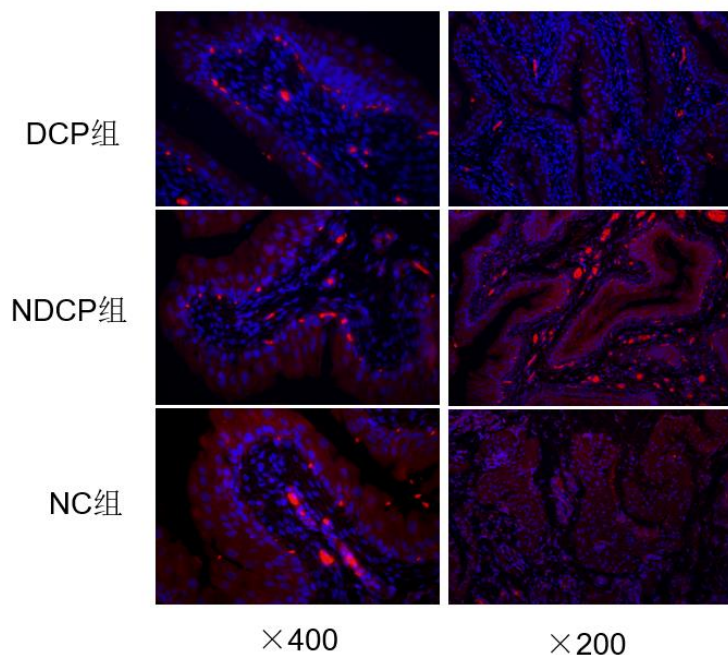
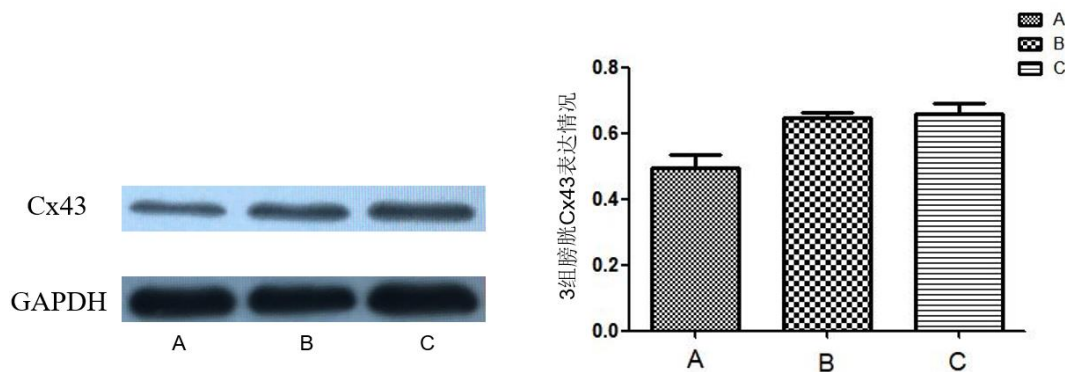


图 2. 三组逼尿肌组织 Cx4 分布情况

4. Western blot 结果

Western blot 结果显示: DCP 组膀胱组织 Cx43 蛋白表达 (0.52 ± 0.02) 低于 NC 组 (0.68 ± 0.02) 和 NDCP 组 (0.70 ± 0.01) ($P < 0.01$), NDCP 组与 NC 组膀胱组织 Cx43 蛋白表达对比, 差异无统计学意义 ($P > 0.01$) (图 3)。



注: A 表示 DCP 组, B 表示 NDCP 组, C 表示 NC 组

图 3 Western blot 检测三组膀胱逼尿肌中 Cx43 蛋白的表达情况

讨论

(Discussion)

糖尿病是一种以慢性高血糖为特征的代谢综合征，多种病因共同参与了糖尿病的形成过程。长期的高血糖水平使体内各类大血管和微血管受累，进而危及脑、眼、心脏、肾脏、足等器官，最终导致以糖尿病为基础的多种并发症的形成，给人们的正常工作和生活增加了较重负担^[32,33]。糖尿病在疾病发展过程中导致的泌尿系统并发症主要包括糖尿病肾病、糖尿病膀胱（diabetic cystopathy, DCP）等。其中，DCP 临床特点主要体现在逼尿肌收缩功能、排尿反射通路、膀胱容受性、尿道括约肌协同性等一系列异常^[34-36]。患者多表现为下尿路症状，虽极少危及生命，却给患者造成了生理和心理上的双重压力，给患者的日常活动带来诸多不便，因此逐渐得到医患双方的关注和重视^[37,38]。DCP 的病因较复杂，至今尚无研究报道对其具体发病机制作出明确阐释。随着关于 DCP 的研究不断深入，与各相关研究领域取得的成果相联系，各种论点相继出现。传统观点认为神经功能障碍可能是 DCP 的唯一病因，Aizawa 等^[39]发现在通过注射链脲佐菌素建成的糖尿病大鼠模型中，大鼠体内负责控制膀胱运动的传入神经存在异常活动，从而导致大鼠膀胱感觉功能障碍，主要表现在膀胱信号传导速度降低，对神经递质的敏感性提高，膀胱容量增加等。膀胱组织和细胞内神经元产生的神经生长因子（nerve growth factor, NGF）有助于外周神经元的生长，并且能够提高外周神经元的存活率，程晨等^[40]通过 Western blot 以及反转录 PCR 法进行实验，发现在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠中，其膀胱组织 NGF 蛋白和 mRNA 的表达水平明显降低。基因工程技术的发展也在助力 DCP 相关研究的推进，有研究者通过基因工程技术使 DCP 中 NGF 的表达人为增加，惊人地发现实验动物膀胱残余尿量降低、膀胱容量减小，其排尿功能得到改善^[41]，Sasaki 等^[42]以单纯疱疹病毒为载体将复制缺陷的编码神经因子的基因注入动物膀胱壁后，检测其神经依赖的膀胱痛觉反射和自主排尿情况，发现 STZ 注射 8 周后注入组的 NGF 表达水平较未注入组明显增高，认为 NGF 在周围神经元上的缺失可能是 DCP 形成的重要因素之一。上述研究表明周围神经病变与糖尿病膀胱功能障碍形成之间存在一定的联系，但尚未证实两者之间存在确切的因果关系。随着科研水平的提升和研究热点的出现，DCP 相关研究也日趋深入，有关学者就 DCP 发病机制的研究提出新的观点。Birder 等^[43]提出膀胱尿路上皮的变化在 DCP 的形成过程发挥作用，膀胱上皮不但负责细胞内外渗透压的稳定、细胞间物质运输和调控细胞吞噬作用，而且还作为传感器控制膀胱的部分功能。Lee 等^[44]在对糖尿病大鼠进行的离体膀胱逼尿肌肌条实验中发现，膀胱上皮剥离的大鼠其逼尿肌肌条对于 ATP 和乙酰胆碱的刺激的反应较未剥离膀胱上皮的大鼠明显降低，借此评价尿路上皮与膀胱逼尿肌收缩功能的关系。一项动物实验也证实在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠的尿路上皮中，电、化学信号的产生和传递异常以及受体蛋白表达明显降低，影响了与下层平滑肌细胞之间的信息交换和信号传导，明确了糖尿病会对尿路上皮

产生影响^[45]。

膀胱作为人体内负责储尿和排尿的肌性器官，主要靠膀胱逼尿肌的收缩实现其功能，任何原因导致的逼尿肌功能障碍都会影响膀胱的正常生理活动。近年来围绕逼尿肌功能障碍展开的关于 DCP 发病机制的研究受到广泛关注，目前针对 DCP 发病相关逼尿肌功能障碍的研究主要包括膀胱逼尿肌基因水平的变化、蛋白水平的改变和氧化应激损伤等方面。一些基因组学的研究已经开始应用于糖尿病为基础的泌尿系统疾病相关领域，在一项有关神经生长因子的动物模型实验中，研究者发现神经生长因子及其受体 P75 的低表达与膀胱排空功能密切相关^[46]。Hipp 等^[47]通过 STZ 造模后对比糖尿病大鼠与正常组大鼠，发现糖尿病大鼠逼尿肌细胞内与逼尿肌收缩相关的多种基因如网状蛋白基因、钙调节蛋白基因、基质金属蛋白酶-7 等表达上调，同时明确了某些与逼尿肌生成和神经支配相关的基因如神经营养因子-3、神经微丝蛋白-3 以及速激肽受体-2 等表达下调。上述研究提示与 DCP 发病相关的肌肉和神经基因的表达水平变化明显，这些改变可能发生在 DCP 形成早期。众所周知，无干预情况下糖尿病患者的血糖水平长期居高，持续的高血糖会引发细胞内代谢变化，导致细胞对葡萄糖的转运调节能力降低，细胞内葡萄糖大量蓄积，使三羧酸循环增加，伴随大量自由基的产生，细胞达到氧化应激高水平状态。膀胱功能损伤过程中氧化应激会导致必需神经因子的供应减少或中断，使得膀胱退行性神经病变的进程加快^[48]。氧自由基同样发挥着重要作用，自由基损伤被发现存在于 DCP 早期膀胱组织内，其在 DCP 的病理损伤过程中扮演着重要角色^[49]。Browlee^[50]提出，氧化应激过程中过氧化物和氧自由基同细胞损伤通路结合，共同导致了 DCP 的形成。另一项有关实验也证实，在通过注射四氧嘧啶建立的糖尿病动物模型中，过表达的醛糖还原酶及异常激活的多元醇途径可能导致了膀胱逼尿肌的收缩力降低^[51]。而 Wang 等^[52]则发现人为激活并使抗氧化剂产生增多后，糖尿病大鼠的最大膀胱收缩力进一步提高。以上研究表明氧化应激过程可能在 DCP 的发生发展中发挥了作用，但具体机制的明确仍需后续大量研究证据证实。

细胞内各种蛋白的数量和结构异常往往影响着细胞的正常功能。膀胱逼尿肌细胞内蛋白质的数量和分布异常被认为是 DCP 形成的重要因素之一，而目前相关研究报道较少^[53]。缝隙连接蛋白 43 (connexin43, Cx43) 在所有缝隙连接蛋白中数量最丰富、分布最为广泛，在人体绝大多数器官组织中均有 Cx43 存在，是具有细胞间信息交换作用的功能蛋白^[54, 55]。四个跨细胞膜区域、三个细胞内段和两个细胞外环共同构成了 Cx43 的整体结构，Cx43 结构中 C 末端、胞浆环和 N 末端三个细胞内段全部位于细胞胞浆一侧，这种高度保守的结构有助于连接蛋白之间对接及相互识别^[56]。6 个 Cx43 单体彼此聚集，形成连接子或半通道，两个连接子相互对接形成细胞间的“桥梁”，即缝隙连接 (gap junction, GJ) 通道，它是实现细胞间缝隙连接通讯功能 (gap junction intercellular communication, GJIC) 的关键结构，负责细胞与细胞之间信息的传送和物质能量的互换，调控细胞的增值、分化以及新陈代谢等生理过程^[57, 58]。Cx43 作为重要的结构和功能蛋白在生物体内多种病理生理过程中发挥着重要作用，其结构或功能异常都可能导致相关

疾病的发生。张国山^[59]通过模拟功能性消化不良（FD）大鼠模型，利用免疫组织化学染色法检测对比 FD 大鼠和正常大鼠胃肠组织中 Cx43 的表达情况，发现 FD 大鼠胃肠组织内 Cx43 表达明显降低。Cx43 与胃肠道癌症的发病也具有相关性，正常胃组织中 Cx43 的阳性表达率为 100%，而胃癌组织中 Cx43 的阳性表达率却不到 40%，从正常胃粘膜到癌前病变直至发展为胃癌的整个病理过程中 Cx43 表达持续降低^[60, 61]。另有一项 80 例结肠癌组织样本分析的免疫组化结果显示结肠癌组织 Cx43 表达较正常组织明显下降^[62]，这表明 Cx43 是胃肠道系统中负责协调胃肠运动的关键蛋白，Cx43 表达的下降或缺失在多种胃肠道疾病的发生中发挥作用。Cx43 还与多种心血管疾病的发病有关，研究发现 Cx43 表达降低及其构成的缝隙连接减少可能加速了心力衰竭的发生^[63]，另有多项研究表明 Cx43 表达异常可能间接参与了动脉粥样硬化、心肌肥厚、心肌缺血再灌注损伤及房颤等多种心血管疾病的发病过程^[64-67]。多种神经精神疾病的形成和发展过程中也有 Cx43 的存在，Cx43 构成的缝隙连接通道是实现细胞间兴奋传递的主要途径，Cx43 的高表达使得细胞间缝隙连接形成规模增加，脑损伤后大量谷氨酸通过缝隙连接通道进入细胞外，引起神经元兴奋性毒性反应，从而加重脑损伤后脑水肿的程度^[68]。Cx43 构成的缝隙连接半通道呈关闭状态时可以抑制癫痫发作，半通道开放则加速癫痫的发作，而缝隙连接阻断剂通过降低 Cx43 的表达，能够减轻癫痫发作的程度^[69, 70]。

Cx43 及其构成的缝隙连接在膀胱组织中也广泛存在。研究证实 Cx43 是大鼠逼尿肌细胞中重要的连接蛋白，其构成的缝隙连接是逼尿肌细胞间兴奋传递的关键途径。Christ 等^[71]通过人为缩小尿道直径建立膀胱出口相关的膀胱过度活动症的大鼠模型，造模 6 周后利用反转录 PCR 和免疫印迹法检测 Cx43 mRNA 和蛋白的表达，以此评估通过 Cx43 构成的缝隙连接通道进行的缝隙连接通讯功能对部分流出道阻塞所致的膀胱过度活动症的作用。结果显示造模后 3 天到 6 周，实验组大鼠膀胱出口梗阻的持续时间与 Cx43 转录水平之间存在统计学上的显著正相关，6 周后实验组大鼠膀胱逼尿肌组织 Cx43 转录水平较正常组增加了 75 倍。Western blot 显示 6 周后实验组大鼠膀胱逼尿肌组织 Cx43 表达明显增加。国内开展的类似研究中，通过 Western blot 检测不稳定逼尿肌细胞和正常逼尿肌细胞内 Cx43 的表达，结果显示与正常组相比不稳定膀胱组织中 Cx43 表达显著增高，而通过将反义基因转染到不稳定膀胱逼尿肌内使 Cx43 表达降低，发现不稳定膀胱逼尿肌细胞间缝隙连接通讯功能降低明显^[72]。上述国内外研究结果表明 Cx43 是膀胱逼尿肌细胞内重要的结构和功能蛋白，其构成的细胞间缝隙连接通讯功能增强是不稳定膀胱逼尿肌兴奋性增强的关键因素，Cx43 可能在不稳定膀胱即膀胱过度活动症的形成中发挥重要作用。

由此与 DCP 的发病机制展开联系，Cx43 作为逼尿肌细胞间组成缝隙连接通讯功能的重要蛋白，可能也参与了 DCP 膀胱逼尿肌功能障碍的形成，DCP 膀胱组织中 Cx43 的表达可能存在变化，Cx43 在 DCP 的形成过程功能可能扮演重要的角色。为了验证此观点，本研究利用 STZ 诱导建立糖尿病豚鼠模型，采用剪耳法连续 4 周检测血糖水平，4 周后按照随机血糖 $\geq 16.7\text{mmol/L}$ 为标准筛选出符合标准的糖尿病豚鼠，标记后放回笼中

继续饲养至第 9 周，9 周后对糖尿病豚鼠行尿动力学检查，尿动力学参数显示部分糖尿病豚鼠其膀胱最大容量、膀胱顺应性及膀胱残余尿量显著增加，最大逼尿肌压力明显减小，结果表明部分豚鼠已经存在膀胱功能障碍。参考罗广承等^[31]研究中提出的尿动力学评价标准，以残余尿量 > 10% 膀胱容量为 DCP 诊断标准，于糖尿病豚鼠中筛选出符合标准的 DCP 豚鼠。通过 HE 染色发现 DCP 组豚鼠膀胱平滑肌肌束形态相对不规则，各肌纤维之间间距增宽且分布稀疏，可见疏松纤维结缔组织数量增加且呈无序不规则排列。NDCP 组和 NC 组豚鼠膀胱平滑肌肌束形态规则，肌纤维排列紧密有序，结果提示伴随糖尿病的发病进程，膀胱肌肉组织的形态和结构已经发生改变。免疫荧光染色结果显示 DCP 组豚鼠膀胱组织 Cx43 荧光染色强度明显低于 NDCP 组和 NC 组。NDCP 组和 NC 组之间阳性染色强度对比无明显差异。Western blot 检测发现，DCP 组膀胱组织 Cx43 蛋白表达 (0.52 ± 0.02) 低于 NC 组 (0.68 ± 0.02) 和 NDCP 组 (0.70 ± 0.01) ($P < 0.01$)，NDCP 组与 NC 组膀胱组织 Cx43 蛋白表达对比，差异无统计学意义 ($P > 0.01$)，这也与上文提到 Christ 等^[71]的研究结果相呼应。结合本研究中上述结果，表明 DCP 膀胱逼尿肌中 Cx43 表达水平降低，Cx43 的低表达可能在 DCP 的形成中起重要作用，也验证了本研究先前作出的假设，考虑具体机制可能是 Cx43 表达降低使逼尿肌细胞间缝隙连接减少，缝隙连接细胞间通讯功能受损，电信号传输异常，动作电位无法正常传导，导致兴奋无法广泛产生，逼尿肌细胞兴奋性减低，逼尿肌收缩活动障碍，伴随后期膀胱的失代偿作用，最终导致了 DCP 的形成。

综上，本研究通过动物实验在基因和蛋白水平上证实了 DCP 膀胱中 Cx43 表达降低。Cx43 作为构成膀胱逼尿肌缝隙连接通讯功能的主要蛋白，其可能通过影响膀胱逼尿肌的收缩功能在 DCP 的形成过程中起重要作用。目前关于 Cx43 与 DCP 发病的相关研究甚少，本研究就 Cx43 与 DCP 发病的相关性进行初步探讨，旨在为 DCP 发病机制的研究探明一个新的方向，助力 DCP 的临床治疗，但 DCP 具体发病机制的阐明仍需后续深入研究。

结论

(Conclusion)

DCP 膀胱逼尿肌组织中 Cx43 表达降低，Cx43 的低表达可能在 DCP 的形成过程中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Wang L, Gao P, Zhang M, et al. Prevalence and Ethnic Pattern of Diabetes and Prediabetes in China in 2013 [J]. JAMA, 2017, 317(24): 2515-23.
- [2] Daneshgari F. Diabetic Bladder Dysfunction: Current Translational Knowledge [J]. The Journal of Urology, 2009, 6 (182): 18-26.
- [3]Alireza E.The association between urodynamic findings and microvascular complications in patients with long-term type 2 diabetes but without voiding symptoms [J]. Diabetes research and clinical practice, 2007, 1(78): 42-50.
- [4] 罗广承, 陈一衍, 王新君, 等. 糖尿病膀胱病大鼠膀胱 Cajal 间质细胞丙酮酸激酶表达及活性改变 [J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(4): 692-694.
- [5] P H, XZ Z, WH S, et al. The function of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel in diabetic cystopathy [J]. European review for medical and pharmacological sciences, 2018, 22(20): 6575-6582.
- [6] 罗丰伟,黎玮.糖尿病膀胱功能障碍的研究进展[J].临床荟萃,2016,31(06):689-692.
- [7] 谈博, 连大卫,黄涌鑫,等.糖尿病膀胱功能障碍小鼠的膀胱功能及尿动力学改变 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(4): 573-578.
- [8] Schulman J M. Diabetic Cystopathy with Bilateral Hydronephrosis [J]. The American Journal of Medicine, 2018, 131(6): 255-256.
- [9] 双卫兵, 仝煦楠. 糖尿病膀胱研究进展 [J]. 临床外科杂志, 2016, 24(2): 95-97.
- [10]Mustafa, Seham. Effect of Diabetes on the Ion Pumps of the Bladder [J]. Urology, 81(1): 211.e17-211.e21.
- [11] 裴立文, 马壮志, 王保存, 等. 糖尿病膀胱尿动力学及逼尿肌功能改变的相关性探讨 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(71): 60.
- [12]徐浩, 钱彪, 杨立, 等. 观察在体灌注 SCL 基因重组慢病毒对豚鼠糖尿病膀胱中 ICC 功能的影响 [J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2018, 36(04): 486-491.
- [13]Aasen T. Connexins: junctional and non-junctional modulators of proliferation [J]. Cell and Tissue Research, 2015, 360(3): 685-699.
- [14]Cong-Yuan X, Zhen-Zhen W, Tohru Y, et al. A novel mechanism of depression: role for connexins [J]. European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology, 2018, 28(4): 483-498.
- [15]Gabriele S, Salvatore B, Claudio P. The Renal Connexome and Possible Roles of Connexins in Kidney Diseases [J]. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 2016, 67(4): 677-687.
- [16]Takeshi K, Yu-Ki I, Stanley N. Connexins and atrial fibrillation: filling in the gaps [J].

- Circulation, 2012, 125(2): 203-206.
- [17] Hills C E, Price G W, Squires P E. Mind the gap: connexins and cell-cell communication in the diabetic kidney [J]. Diabetologia, 2015, 58(2): 233-241.
- [18] Thomas D, L M M, Philippe B, et al. Connexin43 ablation in foetal atrial myocytes decreases electrical coupling, partner connexins, and sodium current [J]. Cardiovascular research, 2012, 94(1): 58-65.
- [19] Chevallier D, Carette D, Segretain D, et al. Connexin 43 a check-point component of cell proliferation implicated in a wide range of human testis diseases [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2013, 70(7): 1207-1220.
- [20] Zhao Y, Li G, Wang Y, et al. Alteration of Connexin43 expression in a rat model of obesity-related glomerulopathy [J]. Experimental & Molecular Pathology, 2018, 104(1): 12-18.
- [21] Strale P O, Clarhaut J, Lamiche C, et al. Down-regulation of connexin43 expression reveals the involvement of caveolin-1 containing lipid rafts in human U251 glioblastoma cell invasion [J]. Molecular Carcinogenesis, 2012, 51(11): 845-860.
- [22] Zu L, Wen N, Liu C, et al. Connexin43 and myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2018, 18(1): 14-16.
- [23] 刘佳丽, 陈萌, 张冬梅, 等. Cx43 在调节胃肠运动障碍机制中的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(23): 4577-4581.
- [24] 黄科华, 颜建英, 林顺和, 等. 子宫平滑肌中缝隙连接变化及 CX43 表达与子宫收缩乏力性产后出血关系的研究 [J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7(23): 40-43.
- [25] Angel F F, Adrian V V, Manuel S P J, et al. Expression of Connexin 43 in 32 Cases of Merkel Cell Carcinoma [J]. The American Journal of dermatopathology, 2020, 42(3): 178-185.
- [26] Han X, Tong X H, Dong S Y, et al. Effects of retinoic acid on the expression of Cx43 and its gap junction intercellular communication function in testicular cancer cell [J]. Journal of Sichuan University, 2013, 44(44): 924-927.
- [27] 余彬彬, 曹莺. 连接蛋白 43 与睾丸肿瘤相关性的研究进展 [J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(3): 267-270.
- [28] Kuhn A, Stadlmayr W, Monga A, et al. A pilot study of Connexin 43 (Cx43) in human bladder tissue in patients with idiopathic detrusor overactivity [J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology & Reproductive Biology, 2008, 141(1): 1-86.
- [29] Takuma O, Minoru M, Seiichi S. Relationship between connexin43-derived gap junction proteins in the bladder and age-related detrusor underactivity in rats [J]. Life sciences, 2014, 116(1): 37-42.
- [30] 李维仁, 王勤章, 丁国富, 等. 豚鼠糖尿病膀胱模型的建立 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2008, 13(5): 368-370.

- [31] 罗广承, 何志华, 罗建珍, 等. 构建糖尿病膀胱病豚鼠模型及其尿动力学评价 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(7): 1063-1068.
- [32] Nentwich M M, Ulbig M W. Diabetic retinopathy-ocular complications of diabetes mellitus [J]. World Journal of Diabetes, 2015, 6(3): 489-499.
- [33] 董迎. 糖尿病慢性并发症的治疗进展 [J]. 继续医学教育, 2019, 33(3): 76-79.
- [34] Chancellor B M. The overactive bladder progression to underactive bladder hypothesis [J]. International Urology & Nephrology, 2014, 46(Suppl 1): 23-27.
- [35] Shin Y S, On J W, Kim M K. Clinical significance of diabetes mellitus on detrusor functionality on stress urinary incontinent women without bladder outlet obstruction [J]. International Urogynecology Journal, 2016, 27(10): 1557-1561.
- [36] Nichols G A, Brodovicz K G, Kimes T M, et al. Prevalence and Incidence of Urinary Tract and Genital Infections Among Patients with and without Type 2 Diabetes [J]. J Diabetes Complications, 2017, 31(11): 1587-1591.
- [37] Thomas, Wilke, Bjoern, et al. Epidemiology of urinary tract infections in type 2 diabetes mellitus patients: An analysis based on a large sample of 456,586 German T2DM patients [J]. Journal of Diabetes & Its Complications, 2015, 29(8): 1015-1023.
- [38] Yu S, Fu A Z, Qiu Y, et al. Disease burden of urinary tract infections among type 2 diabetes mellitus patients in the U.S [J]. J Diabetes Complications, 2014, 28(5): 621-626.
- [39] Aizawa N, Homma Y, Igawa Y. Characteristics of Lower Urinary Tract Dysfunction and Bladder Afferent Nerve Properties in Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats [J]. J Urol, 2013, 189(4): 1580-1587.
- [40] 程晨, 张晶, 王静, 等. 大鼠糖尿病性膀胱病变与神经生长因子表达相关性研究 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(6): 533-536.
- [41] Kadow B T, Tyagi P, Chermansky C J. Neurogenic Causes of Detrusor Underactivity [J]. Current Bladder Dysfunction Reports, 2015, 10(4): 325-331.
- [42] Sasaki K, Chancellor M B, Phelan M W, et al. Diabetic Cystopathy Correlates With a Long-Term Decrease in Nerve Growth Factor Levels in The Bladder and Lumbosacral Dorsal Root Ganglia [J]. J Urol, 2002, 168(3): 1259-1264.
- [43] Birder L A, Andersson K E, Kanai A J, et al. Urothelial mucosal signaling and the overactive bladder-ICI-RS 2013 [J]. Neurourology & Urodynamics, 2014, 33(5): 597-601.
- [44] Lee S, R R M, C M, et al. Diabetes-induced alterations in urothelium function: enhanced ATP release and nerve-evoked contractions in the streptozotocin rat bladder [J]. Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology, 2018, 45(11): 1161-1169.
- [45] Pitre D A, Ma T, Wallace L J, et al. Time-dependent urinary bladder remodeling in the streptozotocin-induced diabetic rat model [J]. Acta Diabetologica, 2002, 39(1): 23-27.
- [46] Tong Y C, Cheng J T. Aldose Reductase Inhibitor ONO-2235 Restores the Alterations of

- Bladder Nerve Growth Factor and Neurotrophin Receptor p75 Genetic Expression in Streptozotocin Induced Diabetic Rats [J]. *J Urol*, 2007, 178(5): 2203-2207.
- [47] Hipp J D, Davies K P, Tar M, et al. Using gene chips to identify organ-specific, smooth muscle responses to experimental diabetes: potential applications to urological diseases [J]. *Bju International*, 2007, 99(2): 418-430.
- [48] Whitmire W, Al-Gayyar M M, Abdelsaid M, et al. Alteration of growth factors and neuronal death in diabetic retinopathy: What we have learned so far [J]. *Molecular Vision*, 2011, 17(36): 300-308.
- [49] J N. Transition metals and polyol pathway in the development of diabetic neuropathy in rats [J]. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2002, 5(18): 395-402.
- [50] Brownlee, M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism [J]. *diabetes* 2005, 54(6): 1615-1625.
- [51] Changolkar A K, Hypolite J A, Disanto M, et al. DIABETES INDUCED DECREASE IN DETRUSOR SMOOTH MUSCLE FORCE IS ASSOCIATED WITH OXIDATIVE STRESS AND OVERACTIVITY OF ALDOSE REDUCTASE [J]. *Journal of Urology*, 2005, 173(1): 309-313.
- [52] Dan W. *Pygeum africanum*: effect on oxidative stress in early diabetes-induced bladder [J]. *International urology and nephrology*, 2010, 2(42): 401-408.
- [53] 刘亚东, 卫中庆, 张思聪, 等. 糖尿病膀胱的研究进展 [J]. *临床泌尿外科杂志*, 2018, 33(7): 582-585.
- [54] Chojnacka K, Brehm R, Weider K, et al. Expression of the androgen receptor in the testis of mice with a Sertoli cell specific knock-out of the connexin 43 gene (SCCx43KO(-/-)) [J]. *Reproductive Biology*, 2012, 12(4): 341-346.
- [55] Hossain M Z, Jagdale A B, Ao P, et al. Impaired expression and posttranslational processing of connexin43 and downregulation of gap junctional communication in neoplastic human prostate cells [J]. *Prostate*, 2015, 38(1): 55-59.
- [56] Weider K, Bergmann M, Brehm R. Connexin 43: its regulatory role in testicular junction dynamics and spermatogenesis [J]. *Histology & Histopathology*, 2011, 26(10): 1343-1352.
- [57] Molica F, Meens M J, Morel S, et al. Mutations in cardiovascular connexin genes [J]. *Biology of the Cell*, 2015, 106(9): 269-293.
- [58] Yu B B, Dong S Y, Yu M L, et al. Total flavonoids of *litsea coreana* enhance the cytotoxicity of oxaliplatin by increasing gap junction intercellular communication [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2014, 37(8): 1315-1322.
- [59] 张国山. 从 ICC 超微结构及其细胞内、外 Ca^{2+} 的变化研究电针足三里对 FD 大鼠胃肠动力障碍的调节机制: [博士学位论文]. 湖南长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [60] 吴瑾, 周红凤, 王翠华, 等. 胃癌中连接蛋白 32 和 43 的表达及细胞间隙连接通讯功

- 能的研究 [J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(10): 742-747.
- [61]汪灵芝, 彭建新, 陶亮, 等. 缝隙连接蛋白 43 组成的缝隙连接对依托泊苷抗肿瘤作用的影响 [J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(01): 1-5.
- [62]Ismail R, Rashid R, Andrabi K, et al. Pathological Implications of Cx43 Down-regulation in Human Colon Cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(7): 2987-2991.
- [63]Greener I D, Sasano T, Wan X, et al. Connexin43 Gene Transfer Reduces Ventricular Tachycardia Susceptibility After Myocardial Infarction [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2012, 60(12): 1103-1110.
- [64]Xu J, Qin X, Cai X, et al. Mitochondrial JNK activation triggers autophagy and apoptosis and aggravates myocardial injury following ischemia/reperfusion [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(2): 262-270.
- [65]Igarashi T, Finet J E, Takeuchi A, et al. Connexin Gene Transfer Preserves Conduction Velocity and Prevents Atrial Fibrillation [J]. Circulation, 2012, 125(2): 216-225.
- [66]Yanggan W. Electrophysiological remodeling in heart failure [J]. Journal of molecular and cellular cardiology, 2010, 4(48): 619-632.
- [67]Wang X H, Zhuo X Z, Ni Y J, et al. Improvement of cardiac function and reversal of gap junction remodeling by Neuregulin-1 β in volume-overloaded rats with heart failure [J]. Journal of Geriatric Cardiology, 2012, 9(2): 172-179.
- [68]Jayakumar A R, Panickar K S, Curtis K M, et al. Na-K-Cl cotransporter-1 in the mechanism of cell swelling in cultured astrocytes after fluid percussion injury [J]. 2011, 117(3): 437-448.
- [69]X R, J X, PP S, et al. Effects of gap junctions blockers on fast ripples and connexin in rat hippocampi after status epilepticus [J]. Epilepsy research, 2018, 146(10): 28-35.
- [70]L W, A P, G A, et al. Inhibition of astroglial connexin43 hemichannels with TAT-Gap19 exerts anticonvulsant effects in rodents [J]. Glia, 2018, 66(8): 1788-1804.
- [71]Christ G J, Day N S, Day M, et al. Increased connexin43-mediated intercellular communication in a rat model of bladder overactivity in vivo [J]. AJP Regulatory Integrative & Comparative Physiology, 2003, 284(5): 1241-1248.
- [72]封建立, 孙道冬, 颜加强, 等. 不稳定逼尿肌中 Cx43 的表达及其对细胞间通讯的影响 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2013, 18(6): 562-564.

文献综述

(Review)

缝隙连接蛋白43与多种疾病发生相关性的研究进展

李朋 综述 王勤章 审校

(石河子大学医学院附属第一医院泌尿外科, 新疆 石河子 832000)

摘要: 连接蛋白是人体内重要的结构和功能蛋白, 其参与构成的缝隙连接通道允许离子、部分小分子物质和第二信使通过, 能帮助实现细胞间通讯功能, 负责细胞间物质、信息的传递和交流, 在细胞增殖、分化以及新陈代谢等一系列病理生理过程中起调控作用。缝隙连接蛋白 43 是人体内分布最为广泛的连接蛋白, 被证实与多种疾病的发生发展有着密切联系。胃肠道中 Cx43 表达降低使 ICCs 细胞间通讯功能受损, 造成胃肠道中平滑肌运动功能失调, 被认为与糖尿病性胃轻瘫和梗阻性巨结肠等胃肠动力障碍性疾病的产生有关。随着针对 Cx43 的相关研究逐渐深入, 研究范围已经涉及人体各器官和系统中多个方面, Cx43 在生物体内各种病理生理活动中的作用逐渐被研究者所发现。本文就近年来 Cx43 的相关研究进展展开综述, 旨在了解 Cx43 与各类疾病的相关性及其机制, 为 Cx43 在更多疾病领域的研究和临床治疗提供参考。

关键词: 缝隙连接蛋白; 缝隙连接蛋白 43; 缝隙连接细胞间通讯

Abstract: Connexin is an important structural and functional protein in the human body. The gap junction channels involved in it allow ions, some small molecular substances and second messengers to pass. It has intercellular communication functions, is responsible for information exchange and material transfer between cells, and regulates a series of pathophysiological processes such as cell metabolism, proliferation and differentiation. Gap connexin 43 is the most widely distributed connexin in humans and has been shown to be closely related to the occurrence and development of many diseases. Decreased expression of Cx43 in the gastrointestinal tract impairs the intercellular communication function of ICCs, leading to dysfunction of smooth muscle movement in the gastrointestinal tract, which is believed to be related to the development of gastrointestinal motility disorders such as diabetic gastroparesis and obstructive megacolon. With the in-depth study of Cx43, the research scope has covered many aspects of human organs and systems, and the role of Cx43 in various pathophysiological activities in vivo has gradually been discovered by researchers. This article reviews the recent research progress of Cx43 in order to understand the correlation between Cx43 and various diseases and its mechanism, and to provide a reference for the research and clinical treatment of Cx43 in more disease fields.

Key words: connexin43; urinary system; cardiovascular; nervous system

连接蛋白 (connexin, Cx) 是一个跨膜蛋白家族, 广泛分布于人体内, 连接蛋白之间拼接形成细胞间通道, 实现缝隙连接 (gap junction, GJ) 的基本结构和功能^[1]。六个 Cx 亚单位围绕中央孔在细胞膜周围形成半通道, 相邻细胞的两个中央孔在胞外空间相互对接形成缝隙连接通道^[2], 允许离子、小分子 (如 ATP、谷胱甘肽、IP3 和葡萄糖)、营养物质和第二信使等在细胞间传递, 负责传递化学信号和交换能量物质^[3]。Cx43 是 Cx 家

族中含量最丰富的成员，在调节细胞凋亡、细胞信号传导、细胞周期、细胞分化、增殖和肿瘤形成等方面发挥重要作用^[4]，Cx43 参与构成的缝隙连接参与着人体内各种生理病理过程，与各系统和器官中多种疾病的发病具有一定的相关性。本文就 Cx43 与多种疾病之间的关系进行综述。

一 Cx43 与心血管疾病

1. Cx43 与心率失常

近来研究显示，各种心脏疾病中 Cx43 的表达明显改变。心律失常（即不规则的心跳或异常的心律）是许多心脏病常见且严重的并发症，严重的心律失常会导致心脏猝死^[5]。已有研究证实一些心肌疾病中存在 Cx43 蛋白表达的变化，实验发现老年小鼠和大鼠心肌细胞中的 Cx43 表达显著下降^[6, 7]。Cx43 位于这些心肌细胞的侧面（侧化），Cx43 细胞间的侧面电耦合的侧向化可能增加，横向电导率的机会增加，对电导率的均质性产生影响，从而降低传导速度^[8]。Gutstein 等^[9]发现在 Cx43 +/- 小鼠心脏中，横向传导速度的下降幅度比纵向传导速度的下降幅度更大，从而导致传导率各向异性比率显著增加，尽管它仍具有正常的收缩功能和解剖结构，但可能存在自发的致命性心室心律失常。女性心脏中的 Cx43 表达水平较高，表明 Cx43 表达存在性别差异^[10]。这种现象的产生可能有雌激素有关，雌激素可以直接与 Cx43 启动子结合，从而诱导相关基因表达^[11]。此外，功能衰竭的心脏组织中 Cx43 的表达和磷酸化显著减少，而通过腺病毒转染 Cx43 使其过度表达可以恢复心肌细胞的偶联^[12]。Cx43 分布的改变使年龄相关性心律失常和房颤的发生率增加^[13]。

Cx43 是缝隙连接半通道的基本单位，其在健康心肌中大多是封闭的，缺血或炎症发生时这些半通道可以由电信号和化学信号触发而开放^[14]。在心肌细胞中非选择性 Cx43 半通道流出被新陈代谢所抑制。在缺血/再灌注过程中发生的心肌细胞重塑，通常表现为表达减少、分布异常和功能失调，造成电传导速度降低并引起心律不齐。研究发现在实验动物模型中，Cx43 在心肌细胞的表达量降低 50% 时，动物模型的心室传导速率降低 38%，ECG 结果提示 QRS 波段持续时间增加^[15]。在研究急性心肌缺血效应和心肌缺血传导速度过程中 Cx43 的降解过程中，发现缺血区域的传导速度是不均匀的，并且某些区域在传导阻滞中持续存在。Cx43 在这些区域内严重降解，可以表明 Cx43 的严重降解是缺血区域持久传导阻滞的重要解剖学基础^[16]。因此，Cx43 降解可导致传导速度降低和异质性，Cx43 过分降解会造成持续的传导阻滞，是引发折返性心律不齐的重要因素之一。

1.2 Cx43 与肥厚型心肌病

由于该病在年轻人中发病率很高，且常跟猝死有关，因此肥厚型心肌病为越来越多的人所了解^[17]。作为最常见的心肌遗传病，肥厚型心肌病患者的左心室壁增厚是其主要特征。这种心肌病涉及心肌细胞肥大、肌原纤维紊乱、纤维化，并且通常与由于慢性高血压或主动脉瓣狭窄引起的压力超负荷有关^[18]。值得注意的是，肥厚型心肌病的最强危险因素之一可能是心室改变。通常将这种导致心脏传导改变、延长 QRS 间隔的损害来识别肥厚型心肌病的发作风险^[19]。多项研究表明，在肥厚型心肌病发病过程中，心肌缝隙连接的数量大小和分布都会产生改变。一般而言，Cx43 表达在肥大的初始和代偿期似乎没有改变或上调，但在心肌细胞表面沿心肌细胞表面重新分布，并在肥大持续发展且心衰发展为不良时被降低^[20]。在通过创建主动脉-静脉曲张痿管形成的左心室容量超负荷的实验猪模型中，表明 Cx43 表达最初在急性肥大性反应期间增加，但随着肥大的进展而减少^[21]。在容积超负荷的兔室肥大模型中，在颈总动脉和颈静脉之间进行动静脉

分流, 相对于假手术动物, 分流形成后 12 周 Cx43 mRNA 的表达显著降低^[22]。在大鼠模型中, 由克罗他林 (MCT) 诱发的肺动脉高压继发的右心室 (RV) 肥大和由于腹主动脉束带而导致的左心室肥大, 大鼠模型中, Cx43 在整个细胞表面上的分散和比例的降低在插入的椎间盘中心观察到 Cx43^[23,24]。

研究发现, 在压力超负荷的人心脏左心室瓣膜主动脉狭窄中, Cx43 表达在代偿性肥厚阶段增加, 但在代偿失调阶段降低并在整个脑室中异质分布, 在蛋白质水平上 Cx43 表达的降低伴随着 Cx43 mRNA 的降低, 表明肥厚性心脏病中 Cx43 的下调在转录水平受到调节^[25]。另一研究表明, 特发性扩张型心肌病患者中, Cx43 蛋白和 mRNA 的下降伴随着心内膜浦肯野纤维旁的心内膜 Cx40 mRNA 和蛋白的上调^[26]。Cx40 上调反应被认为是 Cx43 丢失的补偿。相反, Cx45 mRNA 表达似乎遵循与 Cx43 相同的模式, 而 Cx45 蛋白则无法检测到^[27]。与 Cx43 的下调相结合, 在衰竭的人类心脏中 Cx45 蛋白 (而非 Cx45 mRNA) 显著增加。Cx45 的这种增强表达似乎以异质模式发生, 并且与 Cx43 共定位。Cx43 和 Cx45 的异型 GJ 电导率降低, 导致发生室性心律不齐的机会增加^[28]。病理性心脏肥大归因于肌肉特异性 microRNA-1 (miR1) 的下调。众所周知, Cx43 是 miR-1 的靶标, 其功能异常在心脏肥大过程中会导致室速性心律失常。相关研究表明, miR-1 的下调与 Cx43 的蛋白水平升高和磷酸化增强 (通过 MAPK-ERK 1/2 激活) 有关。Cx43 磷酸化的增加与其从 GJ 的置换相关^[29]。

1. 3Cx43 与心肌缺血

由缺血导致的细胞或组织损伤往往会造成各种器官功能异常, 这些损伤中有些是不可逆的, 在此过程心脏受影响最大。其表现为代谢产物在细胞外室的积聚和氧气供应的减少。无氧代谢和血流量减少导致细胞内外酸中毒, 细胞外钾离子增加^[30]。缺血导致 GJs 关闭, 这是由于细胞溶质钙离子浓度增加、ATP 浓度降低、Cx43 磷酸化变化和酸化所致^[31]。此外, 由于急性缺血可能对蛋白激酶和磷酸酶起到激活或抑制作用, 因此在缺血过程中细胞内钙离子和氢离子水平的升高以及两亲脂质代谢物的积累会促进电解偶联, 这是由 Cx43 磷酸化的改变所介导的。此外, Severs 等^[32]通过共聚焦显微镜显示了心肌 GJ 的两个主要变化: 丢失了与梗塞疤痕相邻的 GJ 的通常有序分布, 以及远离梗塞区的心肌中 GJ 的数量减少。预期这些变化将在心脏病患者的机电功能障碍的形成中发挥重要作用。

二 Cx43 与神经精神疾病

2.1 Cx43 与创伤性脑损伤

应激情况下某些物质的产生和释放、脑细胞水肿变性以及缺血缺氧造成的不可逆损伤等都是颅脑损伤发生的病因之一。都可能导致颅脑损伤的发生。Cx43 组成的 GJ 是神经细胞的重要结构, 颅脑损伤发病可能与细胞间物质交换和信息传递机制有关, GJ 允许离子、小分子和第二信使等自由通过, 细胞之间物质和能量的代谢等因此得以偶联, 与此同时, GJ 还参与了细胞中坏死信号和凋亡信号介导的自损伤过程, 并且在应激细胞向邻近活细胞扩散的过程中扮演着重要角色^[33]。Chen 等^[34]研究表明, Cx43 的表达情况以及其磷酸化水平影响着创伤性脑损伤的严重程度。实验表明: Cx43 的高表达持续发生在创伤性脑损伤的各个病理阶段。创伤造成的缺氧和脑组织破坏引起毒性物质的产生和释放, 受损伤部位的脑组织内细胞凋亡增加, 从而波及到周围脑组织。Cx43 的表达增加会加速上述脑损伤的进程, 且随着半通道的大量开放导致的谷氨酸盐释放增加, 脑组织水肿的程度也因神经兴奋性毒性作用而加剧^[35]。另外, Cx43 的高度表达在后期脑损伤的修复过程中同样发挥着关键作用, 神经修复相关营养物质的运送和传输有赖于 Cx 介

导的缝隙连接形成增加^[36]。创伤性脑损伤的严重程度与 Cx43 和蛋白激酶 C/促分裂原活化的蛋白激酶磷酸化之间的关联也可以支持涉及脑损伤的特定途径，特别是在 Cx43 基因剔除动物海马切片中，创伤诱导的细胞死亡和突触功能损伤均减少^[37]。在人类神经系统中，星形胶质细胞是体积最大、分布范围最广的神经胶质细胞，其参与着颅脑组织中重要的兴奋性神经递质-谷氨酸稳态维持的多种生理过程。Sun 等^[38]研究表明，创伤性脑损伤后 GJ 和自噬之间在某种程度上密切相关，且证实了星形胶质细胞 GJ/Cx 是调控海马神经元自噬的关键调节因子。有研究对脑损伤动物的海马 Cx43 基因进行剔除后，结果发现创伤后的脑组织中死亡细胞的数量减少，神经突触的损伤程度降低，从侧面印证了 Cx43 和蛋白激酶 C 磷酸化的相关作用也参与了创伤后脑损伤的形成过程。

2.2 Cx43 与癫痫

既往多项研究提示，神经元同步化放电驱动导致的癫痫发作，其关键形成机制之一是 Cx43 参与的星形胶质细胞神经元间 GJ 通讯功能增强^[39]。Raos 等^[40]通过 Northern blot 技术对癫痫病人行病变区域切除后的脑组织进行检测，发现病变区域脑组织中 Cx43 的表达量显著增加。考虑这种 Cx43 的表达增加是代偿行为，Cx43 表达增加带来的缝隙连接形成数量增多，目的是转移或消除因神经元过度同步化放电造成的在细胞外大量蓄积的钾离子，进而恢复正常的内环境。同时表明了高度表达的 Cx43 蛋白在癫痫发病过程中起重要作用。侯圆^[41]则通过建立大鼠急性癫痫模型并观察记录其行为学变化，利用 HE 染色、免疫印迹法、免疫组化、反转录 PCR 等实验技术检测大鼠脑组织海马和皮质 Cx43 的表达变化，发现海马 CA1 和 CA3 区 Cx43 的变化最为明显，提示 Cx43 可能参与了急性癫痫的海马损伤过程。Samoilova 等^[42]通过特异性荧光标记 Cx43 抗体进行染色，在显微镜下观察癫痫病人和正常人群海马组织内星形胶质细胞 Cx43 的表达情况，结果显示癫痫病人星形胶质细胞内 Cx43 阳性染色程度明显高于正常人，表明星形胶质细胞种 Cx43 表达增加可能加重了全面性癫痫发作的程度。Motaghi 等^[43]发现在局灶性癫痫发作状态形成后的海马组织中，Cx43 蛋白的表达明显增加。在颞叶癫痫的毛果芸香碱模型中，达到局灶性癫痫发作状态的过程中，由 Cx43 组成的海马 GJ 表达上调。在一项相关临床研究中，研究者收集了一年内住院并接受手术治疗的 24 例顽固性癫痫患者(实验组)和同期行神经外科手术的 6 例患者(对照组)的资料，通过免疫组织化学方法收集脑组织中 Cx43 的表达情况，并对结果行统计学分析。结果 Cx43 在实验组和对照组均有表达。实验组 Cx43 明显高于对照组，得出结论是顽固性癫痫患者表现出较高的 Cx43 表达，提示 Cx43 形成的缝隙连接可能在慢性癫痫的发病中起着重要作用^[44]。上述研究提示，Cx43 与癫痫的发生发展密切相关。近年来 Cx43 在癫痫发病中作用机制研究不断深入，未来 Cx43 相关研究可能成为临床治疗癫痫的新的着力点。

2.3 Cx43 与抑郁症

星形胶质细胞连接蛋白功能异常与突触损伤密切相关，并促进了抑郁样行为的病理发展。有研究通过建立慢性社交衰竭应激(CSDS)的小鼠模型，从海马，杏仁核、内侧前额叶皮层(mPFC)和腹侧被盖区(VTA)分离出星形胶质细胞，对连接蛋白 Cx43 进行表达谱分析。发现在 CSDS 小鼠的 mPFC 和海马中，Cx43 的表达显著降低，并且与神经元活性的降低密切相关。此外，在 mPFC 和海马中 Cx43 的过表达增加了神经元的活性并抑制了抑郁样行为。而在正常小鼠中抑制 Cx43 足以减少神经元活动并诱发抑郁样行为^[45]。这些观察提供了星形胶质细胞基因表达在应激诱导的抑郁样行为中的作用的新见解。另有研究通过注射链脲佐菌素建立糖尿病大鼠模型，利用慢性不可预知性刺激建立抑郁症大鼠模型，两种方式联合建立糖尿病抑郁症模型，造模完成后动物行为学检

测、Elisa 及免疫组织化学染色等方法测定海马血脑屏障中 Cx43 的表达。结果发现较对照组而言,糖尿病组和抑郁症组大鼠空间探索时间明显减少,自主活动次数显著降低,逃避潜伏期延长;海马血脑屏障功能性蛋白 CX43 积分吸光度减小。而对比糖尿病组,糖尿病并发抑郁症组大鼠空间探索时间及自主活动次数均减少,逃避潜伏期时间明显增加;海马血脑屏障功能性蛋白 CX43 积分吸光度明显降低,表明在糖尿病并发抑郁症的形成中, CX43 表达紊乱所致的海马血脑屏障功能障碍可能发挥重要作用^[46]。

中医中药领域有关抑郁症的研究中也有 Cx43 的存在。有实验通过单支单独饲养的形式,采用慢性不可预见性轻度应激 (CUMS) 诱导抑郁症动物模型,来研究酸枣仁汤 (SZRD) 方剂对抑郁症大鼠大脑皮质中星形胶质细胞 Cx43 和胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 的影响^[47]。实验中采用 HE 染色检测大脑皮质中神经细胞的损伤情况,通过免疫组化染色对大脑皮质 Cx43 和 GFAP 的表达进行半定量分析。结果表明酸枣仁汤导致抑郁症大鼠的自主活动变频繁,其糖水消耗增加、神经细胞的损伤程度降低,大脑皮质星形胶质细胞中 GFAP 和 Cx43 的表达增高。一项有关金雀异黄素通过改变 miR-221/222 水平来改善抑郁症的研究中,结果行为测试表明,金雀异黄素在体内和体外均可降低抑郁小鼠前额叶皮层中 miR-221 和 miR-222 的水平,同时上调 Cx43 的表达。双荧光素酶报告基因检测结果表明,星形胶质细胞中 Cx43 直接受 miR-221/222 调控。表明金雀异黄素可通过靶向 Cx43 下调 miR-221/222 的表达来发挥抗抑郁作用^[48]。

三 Cx43 与骨骼系统疾病

2003 年的一项报道称,人类 Cx43 基因 (GJA1) 的点突变导致眼牙指发育不良综合征 (ODDD),这是一种常染色体显性遗传疾病,主要表现为多种骨骼异常,包括宽管状长骨、颅面畸形、再生障碍性或发育不全的中指骨和并指畸形^[49]。至少有 62 个跨越 Cx43 所有功能域的突变可以引起 ODDD^[50]。从机制上讲,这些突变的连接蛋白通常在间隙连接通讯方面起显性的负性作用;它们可以形成缝隙连接,但是细胞间通道在功能上是有缺陷的^[51-55]。虽然一些 ODDD 患者有颅骨增生的报道,但他们的骨骼特征和骨量尚未得到系统的评估。尽管如此,这些患者中骨骼表型的存在加强了早期小鼠遗传学研究中出现的观点,即缝隙连接,特别是 Cx43 在骨骼发育和内环境稳定中具有生物学相关作用。

迄今为止,已有三种不同的 ODDD 小鼠模型被描述,它们有助于描述 ODDD 的分子机制,进一步了解 Cx43 在骨骼中的生物学功能。在一种名为 *gjajrt* 的 N-乙基-N-亚硝基脲突变筛选中发现了一个具有人类 ODDD 许多表型特征的小鼠突变株。该小鼠突变体具有在人类疾病 (Gjal G60S) 中未发现的杂合子 Gjal 突变,但其表型包括 ODDD 特征,如并指畸形、釉质发育不全和颅面畸形^[51]。GjalJrt 小鼠的骨密度 (BMD) 较野生型低,骨小梁体积减小,机械强度明显降低,这些特征在人类疾病中没有描述。此外,在微计算机断层扫描 (ICT) 图像中, GjalJrt 小鼠似乎在股骨干中具有薄皮质骨和扩大的骨髓腔,尽管这种异常尚未得到充分表征。第二个 ODDD 小鼠模型是由一个野生型 Gjal 等位基因与一个 Gjal G138R 突变体的条件替换产生的,由广泛表达的 PGK-Cre (cODDDPGK) 驱动^[54]。在一些 ODDD 病例中发现了 Gjal G138R 点突变,与 GjalJrt 相似, CODDDPGK 小鼠具有人类 ODDD 的许多表型特征,包括颅面异常和相对于野生型对照组的小梁骨体积减少。骨骼异常的细胞自主性是通过使用 Dermo1/Twist2-Cre (仅在 E9.5 (cODDDTW2) 处表达) 有条件地替换软骨成骨细胞系细胞中的 Gjal G138R 等位基因而建立的^[56]。出生时,这些老鼠的头骨呈低矿化状态,到 1 个月时,头骨呈正常

矿化状态,但仍小于野生型幼鼠的头骨。此外,从1个月到至少12个月大,CODDTW2小鼠的全身骨密度降低。全身骨密度降低是由于皮质变薄(相对于野生型为20%)和骨干横截面积明显增大所致,而不是由于小梁骨的改变。值得注意的是,骨髓腔扩张和皮质变薄也发生在衰老和废用过程中,增加了Cx43可能参与这些过程的病理生理学的可能性。还需要注意的是,这些Gjal-ODDD突变体是显性负性的;也就是说,它们可以在连接器中组装,但是间隙连接通道不起作用^[55]。因此,骨骼表型的某些方面可能是由于干扰了在骨中表达的其他连接蛋白(如Cx37、Cx40或Cx45)或通过抑制成骨细胞(或骨细胞)与骨中存在的其他细胞(如血管内皮细胞)之间的间隙连接通讯而引起的。

四 Cx43 与癌症

异常的Cx43表达,无论是上调还是下调,都是导致癌症的发展进展的重要一环。Cx43表达模式是癌症特有的,可以根据癌症分期而变化。尽管人们普遍认为Cx43的异常表达与肿瘤的生长和/或转移有关,但Cx43的表达、癌症分期和癌症类型之间并不总是存在明显的相关性。

在对117份胃癌样品的免疫组织化学分析中,结果表明Cx43和E-cadherin表达量降低在原发性胃癌的发展过程中起促进作用。然而,Cx43和E-cadherin表达增加有助于淋巴结转移^[57]。在原发性尿路上皮性膀胱癌中,Cx43表达增强与患者预后不良有关,此研究以组织微阵列形式检查了来自174位患者的组织样本,并通过免疫组织化学分析对Cx43的表达进行了半定量评估(0,1+和2+)。在174个患者样本中,有31个样本(17.8%)显示Cx43呈高表达(2+),这与肿瘤分级高、增殖增加和无进展生存期缩短有关^[58]。通过计算机分析乳腺癌组织的基因表达谱时发现,原发性乳腺癌中Cx43和Cx26表达的增加与复发和患者生存期差有关。相比之下,在对483例浸润性乳腺癌患者进行的组织微阵列研究中,连接蛋白标记物(Cx26、Cx32和Cx43)均与患者生存率或肿瘤分级无关^[59]。在黑色素瘤患者中,Cx43和Cx26的表达增加与转移和患者生存率低下相关。此外,在原发性乳腺癌的脑转移中,Cx43仅在转移中过表达,而在健康的脑组织中则没有^[60]。这些数据有力地表明乳腺癌和黑色素瘤细胞利用Cx43在远处启动转移灶的形成。支持这一点的是,4T-1细胞中的Cx43基因敲除使微肿瘤的形成减少了大约三倍,并且Cx43需要与微肿瘤形成所需的内皮细胞形成功能性缝隙连接。与对照相比,表达Twist并具有增加的Cx43表达的人乳腺癌细胞迅速外渗并形成更多的微瘤。与这些发现一致,蔡等^[61]使Cx43在乳腺癌细胞系中过度表达,观察到转染细胞的迁移率明显高于未转染细胞,这与Cx43对转移性疾病和癌症进展的作用一致。用两点标度法对大肠腺瘤中Cx43的表达进行免疫组化分析。当少于10%的细胞为Cx43阳性时,认定样本为阴性;当多于10%的细胞为Cx43阳性时,认定样本为阳性。Cx43的表达与患者特征和组织病理学特征相关。高级别不典型增生的腺瘤周围粘膜Cx43表达增加^[62]。在甲状腺癌的病例中,在120名患者(60名良性甲状腺疾病患者和60名恶性甲状腺癌患者)的Cx43 mRNA研究中,转移似乎与Cx43的低表达有关。Cx43和cadherin在78.3%的原发性胃癌中表达降低^[63],这可能与晚期病理分期和淋巴结转移具有相关性。同样,慢性B细胞白血病患者(n=113)的Cx43与健康供体细胞相比显著下调^[64]。

Cx43的表达模式已经在不同的癌症类型中进行了研究,并且随着癌症类型和阶段的不同而不同^[58,60,65]。然而,为了充分了解Cx43的表达如何影响癌症的进展,Cx43的表达模式和水平必须在患者的癌组织中进行量化和表征。

五 Cx43 与泌尿生殖系统疾病

5.1 Cx43 与泌尿系癌症

Cx43 被证明与多种癌症的发生密切相关,泌尿系癌症的发生发展同样与 Cx43 具有一定的联系。有研究通过应用免疫组织化学染色法将 54 例膀胱癌组织和 22 例正常膀胱上皮组织中 Cx43 的表达程度进行对比,结果显示正常标本中移行细胞的细胞膜上以及细胞质中 Cx43 表达明显升高。然而在膀胱癌组织中, Cx43 表达显著降低, Cx43 在胞浆或核膜上分布不均匀。两组 Cx43 表达对比差异显著, Cx43 阳性表达的定性分析和其半定量检测结果均表明跟膀胱癌恶性程度具有一定的相关性,而与肿瘤分期无明显相关性。 Cx43 表达水平随着膀胱肿瘤分级的高低程度呈负相关,提示 Cx43 表达异常可能在膀胱肿瘤发生发展过程中发挥重要作用^[66]。另一项研究也表明 Cx43 蛋白表达的改变可影响肿瘤细胞的增殖和凋亡,其机制可能与 MAPK 信号调控有关^[67]。刘凡等^[68]通过对 41 例肾细胞癌组织、10 例正常肾组织以及 12 例癌旁肾组织采用免疫组织化学染色法检测 Cx43 蛋白的表达情况,根据阳性染色情况,发现 Cx43 主要定位在细胞膜上和细胞质中。与正常肾组织及癌旁肾组织中相比,肾细胞癌组织中 Cx43 蛋白的阳性表达率明显降低,同时 Cx43 在透明细胞癌、颗粒细胞癌、梭形细胞癌中的阳性表达率比较差异无统计学意义。随着临床分期的增加,Cx43 表达的阳性率明显减小,且与肾细胞癌转移呈负相关,但与肿瘤大小无明显相关性。研究表明 Cx43 对肾细胞癌发生和转移有明显抑制作用,Cx43 表达减弱或消失可能在肾细胞癌的发生发展中发挥重要作用。

5.2 Cx43 与排尿异常

Cx43 作为细胞间缝隙连接重要的组成部分,影响着细胞间通讯功能,可能也参与泌尿系尿动力学障碍性疾病的产生。逼尿肌过度活动症是泌尿外科常见疾病之一,其主要症状包括尿急、尿频及夜尿增多,可伴或不伴有尿失禁。目前其病因和发病机制仍不明确,给临床治疗带来很多困难。膀胱出口部分梗阻是导致逼尿肌过度活动症的主要原因之一,针对膀胱出口梗阻导致的逼尿肌过度活动症的研究目前主要围绕神经源性学说和肌源性学说展开。另有研究认为细胞间缝隙连接通讯功能的改变是导致逼尿肌过度活动症的发病机制之一,CX43 蛋白表达水平的改变可能逼尿肌过度活动症的发生紧密相关。朱景振^[69]通过实验表明, CX43 蛋白磷酸化水平的增加可能与逼尿肌过度活动症的形成和发展过程密切相关。而一项关于儿童先天性肾积水的临床研究报道则表明,患儿肾盂输尿管连接部狭窄段的细胞异常增殖和运动功能失调可能与该部位 Cx43 的异常分布有关, Cx43 的异常分布可能是先天性肾积水形成和加重的关键因素^[70]。

5.3 Cx43 与慢性肾病及肾细胞纤维化

1989 年首次在大鼠肾脏中检测到 Cx43^[71]。Barajas 等^[72]通过实验证实:肾脏中 Cx43 主要定位于肾血管、肾小球系膜细胞和集合管。1997 年, Hillis 等^[73]研究了不同炎症性肾小球病患者活检组织中 Cx43 的表达,发现其在浸润细胞和肾小管上皮细胞中强烈表达,并在损伤的间质部位从头表达。一项研究报道了糖尿病肾病患者正常足细胞中 Cx43 的存在呈线性模式,并且这种线性分布发生了变化^[74]。而 Guo^[75]等报道糖尿病患者肾小球中 Cx43 减少,但未明确涉及的细胞类型。肾上皮细胞暴露于高葡萄糖的体外数据首次为应激条件下 Cx43 上调提供了功能解释,表明 Cx43 间隙连接介导了有害癌信号的发射^[76]。然而, Cx43 在肾脏疾病进展中的确切作用仍不清楚。同时,许多研究集中于 Cx43 在肾素分泌和血压调节中的可能作用上,初步研究表明 Cx43 促进肾素分泌。转基因小鼠中用 Cx32 替代 Cx43 减少了肾素的表达和分泌,并预防了 2K1C (2-肾脏, 1-夹子) 模型中依赖于肾素的高血压^[77]。然而, Takenaka 等^[78]证明了与 Cx37 和 Cx40 的阻断作用相比, Cx43 特异性阻断肽 (GAP26) 在不改变血压或肾素活性的情况下可以降低肾小球滤过率。此外,与缺乏 Cx40 的小鼠相比,内皮特异性 Cx43 的缺失对肾素分泌和血压没有影响^[79]。上述研究证实了 Cx43 在动物和人类静息和/或病理状态下均在肾血管

和肾实质中表达。

孙小鸿等^[80]通过建立自发性糖尿病小鼠模型,以腺病毒为载体将过表达的 Cx43 经尾静脉注入大鼠体内,观察大鼠肾脏病理学改变及肾功能指标的变化,结果表明通过 Cx43 羧基端对 SIRT1 表达的上调,可以增强 SIRT1 对 HIF1- α 的去乙酰化作用,从而降低 HIF1- α 的活性,使糖尿病基础下的肾小管间质纤维化情况得到改善。

5.4 Cx43 与女性生殖系统疾病

多项研究表明 Cx43 与女性生殖系统多种疾病的发生有关。多囊卵巢综合征是一种病因复杂的内分泌紊乱综合征,发病人群多为育龄妇女。连红梅^[81]利用来曲唑建立多囊卵巢综合征大鼠模型,通过免疫组织化学染色观察 Cx43 和 Cx37 在正常及多囊卵巢综合征的大鼠卵巢中的表达情况,研究结果表明多囊卵巢综合征大鼠模型卵巢中 Cx43 在表达降低,Cx43 表达量的减少可能有多囊卵巢综合征卵泡发育障碍的发病进程中扮演着重要角色。在多种子宫相关疾病的发生中也有 Cx43 的存在。有研究对取材自 79 例因子宫内膜息肉或其他妇科疾病行子宫诊刮的患者术后的病理组织进行了实验,采用免疫组织化学染色法检测 Cx43 蛋白在正常子宫内膜及子宫内膜息肉绝经前、后期的表达情况。结果发现子宫内膜息肉患者 Cx43 阳性染色强度较其他组明显降低,而其他几组中 Cx43 阳性染色强度对比,差异无统计学意义。结果表明子宫内膜息肉中 Cx43 蛋白表达降低,Cx43 的低表达可能与子宫内膜息肉的形成和发展有着密切关系^[82]。陈卓等^[83]通过免疫组织化学染色法对比检测不同病理分级的子宫内膜组织中 Cx43 的表达是发现,相较于其他组织而言,子宫内膜癌组织中 Cx43 阳性染色强度明显降低,子宫内膜癌病理分级的提高与 Cx43 阳性染色强度呈负相关。表明 Cx43 蛋白与内膜癌发生发展有关。另有研究表明 Cx43 可促进小鼠子宫基质细胞发生蜕膜化^[84]。另外,有研究报道 Cx43 还可能参与了分娩的过程,何宜静等^[85]采用酒精灌胃的方式建立小鼠早产模型,采用 Western blot 法分别检测足月未临产组、足月临产组以及早产临产组小鼠子宫平滑肌 Cx43 蛋白的表达及其磷酸化水平的变化。表明子宫平滑肌 Cx43 蛋白的磷酸化水平升高可能参与了小鼠的分娩发动。

六 总结与展望

本文就近年来 Cx43 与心血管、神经、骨骼、癌症及泌尿生殖系统相关疾病的关系及 Cx43 可能在多种疾病发生发展过程中的作用进行了综述。既往研究结果表明 Cx43 与某些疾病的形成过程具有相关性,可能是由于其分布和表达的异常导致细胞间缝隙连接无法正常形成,从而影响细胞和组织间生物信号的传导和物质的运输,阻碍了正常生理活动的进行,进而直接或间接加快了某些疾病的进程。因此,未来针对 Cx43 的更深层次研究可能为某些疾病的临床治疗指明新的方向。

参考文献

(Reference)

- [1] Liu Q, Ji X, Ge Z, et al. Role of connexin 43 in cadmium-induced proliferation of human prostate epithelial cells [J]. *Appl Toxicol*, 2017, 37(8): 933-942.
- [2] Molica F, Meens M J, Morel S, et al. Mutations in cardiovascular connexin genes [J]. *Biol Cell*, 2014, 106(9):269-293.
- [3] Upham B L, Sovadinova I, Babica P. Gap junctional intercellular communication: A functional biomarker to assess adverse effects of toxicants and toxins, and health benefits of natural products [J]. *Vis Exp*, 2016, (118):e54281.
- [4] Gago F R, Bechberger, J F, Varela E M, et al. The C-terminal domain of connexin43 modulates cartilage structure via chondrocyte phenotypic changes [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(45): 73055-73067.
- [5] Agullo P E, Cerrone M, Delmar M. Arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome: Diseases of the connexome [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(8): 1322-1330.
- [6] Jeyaraman M M, Srisakuldee W, Nickel B E, et al. Connexin43 phosphorylation and cytoprotection in the heart. [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818(8): 2009-2013.
- [7] Eckardt D, Degen J, Theis M, et al. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. [J]. *Circulation*, 2004, 109(8): 1048-1055.
- [8] Nakashima T, Ohkusa T, Okamoto Y, et al. Rapid electrical stimulation causes alterations in cardiac intercellular junction proteins of cardiomyocytes. [J]. *Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(9): 1324-1333.
- [9] 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.
- [10] Knezl V, Bacova B, Kolenova L, et al. Distinct lethal arrhythmias susceptibility is associated with sex-related difference in myocardial connexin-43 expression[J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2008, 29(5): 798-801.
- [11] Yu W, Dahl G, Werner R. The connexin43 gene is responsive to oestrogen. [J]. *Proc Biol Sci*, 1994, 255(1343):125-132.
- [12] Ai X, Zhao W, Pogwizd S M. Connexin43 knockdown or overexpression modulates cell coupling in control and failing rabbit left ventricular myocytes[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85(4): 751-762.
- [13] Beyer E C, Kistler J, Paul D L, et al. Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues[J]. *Cell*

- Biol, 1989, 108(2): 595-605.
- [14] Goodenough D A, Paul D L. Beyond the gap: Functions of unpaired connexon channels. [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(4): 285-294.
- [15] Hemrais M M, Kortekaas P, Jongsma H J, et al. PH sensitivity of the cardiac gap junction proteins, connexin45 and 43[J]. J Pflugers Arch, 1995, 431(1): 138-142.
- [16] Jijin L, Xuerui T, Xin Z. Degradation of connexin 43 during acute myocardial ischemia. Study on the effect of conduction velocity[J]. Chin J Pathophysiol, 2003 (6): 66-68.
- [17] Maron B J. Hypertrophic Cardiomyopathy A Systematic Review[J]. Jama the Journal of the American Medical Association, 2002, 287(10):1308-1320.
- [18] Lips D J, Dewindt L J, Van K D J W, et al. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy[J]. European Heart Journal, 2003,24(10): 883–896.
- [19] Jacob D, Main M L, Gupta S, et al. Prevalence and significance of isolated T wave inversion in 1755 consecutive American collegiate athletes[J]. Journal of Electrocardiology, 2015, 48(3):407-414.
- [20] Teunissen B E J, Jongsma H J, Bierhuizen M F A. Regulation of myocardial connexins during hypertrophic remodelling[J]. European Heart Journal, 2004, (22): 1979-1989.
- [21] Formigli L, Ibba-Manneschi L, Perna A M, et al. Altered Cx43 expression during myocardial adaptation to acute and chronic volume overloading[J]. Histology and histopathology, 2003, 18(2):359-369.
- [22] Itoh M, Takeishi Y, Nakada S, et al. Long-term treatment with angiotensin II type 1 receptor antagonist, CV-11974, restores β -catenin mRNA expression in volume-overloaded rabbit hearts[J]. Heart & Vessels, 2002, 17(1):36-41.
- [23] Uzzaman M , Honjo H , Takagishi Y , et al. Remodeling of Gap Junctional Coupling in Hypertrophied Right Ventricles of Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension[J]. Circulation Research, 2000, 86(8):871-878.
- [24] Emdad L , Uzzaman M , Takagishi Y , et al. Gap Junction Remodeling in Hypertrophied Left Ventricles of Aortic-banded Rats: Prevention by Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade[J]. Journal of Molecular & Cellular Cardiology, 2001, 33(2):219-231.
- [25] Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family [J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(2): 228-232.
- [26] Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, et al. Gap junctions. Compr Physiol [J]. 2012, 2(3):1981-2035.
- [27] Yamada K A, Rogers J G, Sundset R, et al. Up-Regulation of Connexin45 in Heart Failure[J]. Journal of Cardiovascular Electrophysiology, 2003, 14(11):1205-1212.
- [28] Teunissen B E J, Jongsma H J, Bierhuizen M F A. Regulation of myocardial connexins

- during hypertrophic remodelling[J]. *European Heart Journal*, 2004, 22(22): 1979-1989.
- [29] Wang X H, Zhuo X Z, Ni Y J, et al. Improvement of cardiac function and reversal of gap junction remodeling by Neuregulin-1 β in volume-overloaded rats with heart failure[J]. *Journal of Geriatric Cardiology*, 2012, 9(2):172-179.
- [30] Michela P, Velia V, Aldo P, et al. Role of connexin 43 in cardiovascular diseases[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2015, 768: 71-76.
- [31] Johansen D, Cruciani, Véronique, et al. Ischemia Induces Closure of Gap Junctional Channels and Opening of Hemichannels in Heart-derived Cells and Tissue[J]. *Cellular Physiology & Biochemistry*, 2011, 28(1):103-114.
- [32] Severs N J, Coppin S R, Dupont E, et al. Gap junction alterations in human cardiac disease[J]. *Cardiovascular Research*, 2004, 62(2):368-377.
- [33]Chen W, Guo Y, Yang W, et al. Phosphorylation of connexin 43 induced by traumatic brain injury promotes exosome release[J]. *J Neurophysiol*, 2018, 119(1): 305-311.
- [34] Chen B, Sun L, Wu X, et al. Correlation between connexin and traumatic brain injury in patients[J]. *Brain and Behavior*, 2017, 7(9):e00770.
- [35]Baranowska B I, Falkowska A, Gutoeska I, et al. Glycogen metabolism in brain and neurons-astrocytes metabolic cooperate can be altered by pre- and neonatal lead (Pb) exposure[J]. *Toxicology*, 2017, 390:146-158.
- [36]吴中亮, 廖青华, 任宁. 缝隙连接蛋白 43 与创伤后脑水肿相关性研究[J].*中华神经外科疾病研究杂志*, 2008, 7(3) :201-204.
- [37]Frantseva MV, Kokarovtseva L, Naus CG, et al. Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(3): 644-653.
- [38]Sun LQ, Gao JL, Cui CM, et al. Astrocytic p-connexin 43 regulates neuronal autophagy in the hippocampus following traumatic brain injury in rats[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(1):77-82.
- [39]Deshpande T, Li T, Herde MK, et al. Subcellular reorganization and altered phosphorylation of the astrocytic gap junction protein connexin43 in human and experimental temporal lobe epilepsy[J]. *Glia*, 2017, 65(11): 1809-1820.
- [40]Jordan, M D, Raos B J, Bunting A S, et al. Human astrocytic grid networks patterned in parylene-C inlaid SiO₂ trenches[J]. *Biomaterials*, 2016, 105:117-126.
- [41]侯圆. Cx43 和 Cx36 在癫痫中的表达变化及作用的研究:[硕士学位论文].吉林长春: 吉林大学, 2016.
- [42] Samoilova K A, Bogacheva O N, Obolenskaya K D, et al. Enhancement of the blood growth promoting activity after exposure of volunteers to visible and infrared polarized light. Part I: stimulation of human keratinocyte proliferation in vitro[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2004, 3(1):96.

- [43] Motaghi S, Sayyah M, Babapour V, et al. Hippocampal Expression of Connexin36 and Connexin43 during Epileptogenesis in Pilocarpine Model of Epilepsy[J]. Iranian Biomedical Journal, 2017, 21(3): 167-173.
- [44] Li-Zhi Z, Jun-Qiang F, Jin C. The Cx43 expression of refractory epilepsy[J]. china practical medicine, 2012,7(10):40-42.
- [45] Huang D M, Li C L, Zhang W, et al. Dysfunction of astrocytic connexins 30 and 43 in the medial prefrontal cortex and hippocampus mediates depressive-like behaviours[J]. Behav Brain Res, 2019, 372: 111950.
- [46] 韩远山, 杜青, 赵洪庆, 等. S100B、AQP4 和 CX43 表达紊乱对糖尿病并发抑郁症大鼠海马血脑屏障功能的影响[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(12):1663-1667.
- [47] 曹敏玲, 邱飞, 王慧. 酸枣仁汤对抑郁大鼠大脑皮质星形胶质细胞和缝隙连接蛋白 43 的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 268-271.
- [48] Shen F, Huang W L, Xing B P, et al. Genistein Improves the Major Depression through Suppressing the Expression of miR-221/222 by Targeting Connexin 43[J]. Psychiatry Investig, 2018, 15: 919-925.
- [49] Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, et al. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia[J]. Am J Hum Genet, 2003, 72:408–418.
- [50] Paznekas W A, Karczeski B, Vermeer S, et al. GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype[J]. Human Mutation, 2009, 30(5):724-733.
- [51] Ann M, Flenniken, Lucy R, et al. A Gjal missense mutation in a mouse model of oculodentodigital dysplasia[J]. Development (Cambridge, England),2005,132(19):4375-4386.
- [52] Gong X Q, Shao Q, Langlois S, et al. Differential Potency of Dominant Negative Connexin43 Mutants in Oculodentodigital Dysplasia[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(26):19190-19202.
- [53] Mclachlan E, Plante I, Shao Q, et al. ODDD-Linked Cx43 Mutants Reduce Endogenous Cx43 Expression and Function in Osteoblasts and Inhibit Late Stage Differentiation[J]. 2008, 23(6):928-938.
- [54] [1]Radoslaw, Dobrowolski, Philipp, et al. The conditional connexin43G138R mouse mutant represents a new model of hereditary oculodentodigital dysplasia in humans[J]. Human molecular genetics,2008,17(4):539-554.
- [55] Roscoe W, Veitch G I L, Gong X Q, et al. Oculodentodigital Dysplasia-causing Connexin43 Mutants Are Non-functional and Exhibit Dominant Effects on Wild-type Connexin43[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(12):11458-11466.

- [56] Watkins M, Grimston S K, Norris J Y, et al. Osteoblast connexin43 modulates skeletal architecture by regulating both arms of bone remodeling[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2011, 22(8):1240-1251.
- [57] Tang B, Peng Z H, Yu P W, et al. Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric cancer and metastatic lymph nodes[J]. *Medical Oncology*, 2011, 28(2):502-508.
- [58] Cédric P, Buser L, Roudnicky F, et al. Connexin 43 expression predicts poor progression-free survival in patients with non-muscle invasive urothelial bladder cancer[J]. *Journal of clinical pathology*, 2015, 68(10):819-824.
- [59] Conklin C, Huntsman D, Yorida E, et al. Tissue microarray analysis of connexin expression and its prognostic significance in human breast cancer[J]. *Cancer Letters*, 2007, 255(2):284-294.
- [60] Stoletov K, Strnadel J, Zardouzian E, et al. Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization[J]. *Journal of Cell Science*, 2013, 126(4):904-913.
- [61] Tsai C F, Cheng Y K, Lu D Y, et al. Inhibition of estrogen receptor reduces connexin 43 expression in breast cancers[J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2017, 338:182-190.
- [62] Bišćanin A, Ljubičić N, Boban M, et al. CX43 Expression in Colonic Adenomas and Surrounding Mucosa Is a Marker of Malignant Potential[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36: 5437-5442.
- [63] Tang B, Peng Z H, Yu P W, et al. Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric cancer and metastatic lymph nodes[J]. *Medical Oncology*, 2011, 28(2):502-508.
- [64] Nesmiyanov P P, Tolkachev B E, Strygin A V. ZO-1 expression shows prognostic value in chronic B cell leukemia[J]. *Immunobiology*, 2016, 221: 6-11.
- [65] Tanaka T, Kimura M, Ishiguro H, et al. Connexin 43 expression is associated with poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 4: 989-993.
- [66] 吴传璋. 间隙连接蛋白 Cx26、Cx43 在膀胱癌的表达及意义: [硕士学位论文]. 湖南衡阳: 南华大学, 2006.
- [67] 艾晓林. Cx43 在膀胱尿路上皮癌中的发生发展中的作用及机制: [硕士学位论文]. 河北承德: 承德医学院, 2017.
- [68] 刘凡, 李彤, 秦文, 等. 间隙连接蛋白 43 在肾细胞癌中的表达及意义[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2005(02):104-106.
- [69] 朱景振. CX43 蛋白磷酸化在大鼠逼尿肌过度活动症中的作用: [硕士学位论文]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
- [70] 刘绍华, 陈勇, 邹音, 等. 肾盂输尿管连接部狭窄段缝隙连接蛋白 43 表达及其临床意义研究[J]. *中国实用儿科杂志*, 2009, 24(10):795-797.
- [71] Beyer EC, Kistler J, Paul DL, et al. Antisera directed against connexin43 peptides react

- with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues[J]. *Journal of Cell Biology*, 1989, 108(2):595-605.
- [72] Barajas L, Liu L, Tucker M. Localization of connexin43 in rat kidney[J]. *kidney international*, 1994, 46(3):621-626.
- [73] Hillis G S, Duthie L A, Brown P A, et al. Upregulation and co-localization of connexin43 and cellular adhesion molecules in inflammatory renal disease[J]. *J Pathol*, 1997, 182: 373-379.
- [74] Sawai K, Mukoyama M, Mori K, et al. Redistribution of connexin43 expression in glomerular podocytes predicts poor renal prognosis in patients with type 2 diabetes and overt nephropathy[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2006, 21(9):2472-2477.
- [75] Guo Y N, Wang J C, Cai G Y, et al. AMPK-mediated downregulation of connexin43 and premature senescence of mesangial cells under high-glucose conditions[J]. *Experimental Gerontology*, 2014, 51:71-81.
- [76] Hills C E, Bland R, Wheelans D C, et al. Glucose-evoked alterations in connexin43-mediated cell-to-cell communication in human collecting duct: a possible role in diabetic nephropathy[J]. *Ajp Renal Physiology*, 2006, 291(5):1045-1051.
- [77] Haefliger J A, Krattinger N, Martin D, et al. Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(2):405-413.
- [78] Takenaka T, Inoue T, Kanno Y, et al. Expression and role of connexins in the rat renal vasculature[J]. *Kidney International*, 2008, 73(4):415-422.
- [79] Theis M, Wit C D, Schlaeger T M, et al. Endothelium-specific replacement of the connexin43 coding region by a lacZ reporter gene[J]. *genesis*, 2001, 29(1):1-13.
- [80] 孙小鸿, 黄凯鹏, 黄河清. Connexin43 通过 SIRT1-HIF1- α 通路改善糖尿病肾小管间质纤维化的研究[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(09):718.
- [81] 连红梅. Cx43 和 Cx37 在多囊卵巢综合征大鼠卵巢中的表达及意义: [硕士学位论文]. 河南郑州: 郑州大学, 2009.
- [82] 赵金燕, 薛翔, 陈庆, 等. CX43 蛋白在子宫内膜息肉中的表达及意义[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2016, 37(05):693-696.
- [83] 陈卓, 陈晓玲. Cx43 蛋白在子宫内膜癌组织的表达及临床意义[J]. *贵州医药*, 2004(9):797-799.
- [84] 于海帆, 郭传辉, 李当当, 等. 缝隙连接蛋白 43 对小鼠子宫基质细胞蜕膜化的影响[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(04):635-639.
- [85] 何宜静. 子宫平滑肌 Cx43 磷酸化水平改变与小鼠分娩发动的关系:[硕士学位论文]. 湖南长沙: 中南大学, 2010.

致谢

时光荏苒，白驹过隙，回忆刚踏上新疆这块土地的那一刻，转眼间自己三年的研究生生涯已经走到了结尾。回过头看，三年的时间内我成长了很多，也收获了很多。从刚刚进入研究生阶段学习时的迷茫，到最后顺利毕业，在这个看似平凡却不简单的过程中，除了自己的坚持和努力，更少不了大家的支持和帮助。在此对三年来帮助过我的老师、师兄弟和同学们表示由衷的感谢！

首先要感谢我的导师王勤章教授。从论文选题、内容修正到顺利完成论文开题，直至今日论文答辩，这一路走来的途中，都少不了您百忙之中的指导和帮助。您发现的每一个细节、指出的每一个错误、提的每一个建议，都是我不断学习和进步的助力。厚德载医，您就是我的榜样。在您身上，除了严谨的科研态度和高超的专业水平，更难能可贵的是与人为善、妙术仁心的美好品德，这是做一名好医生的前提，也是您作为榜样带给我最宝贵的精神财富。感谢您一直以来对我学习上的支持和生活中的关心。教诲如春风，师恩似海深，铭记于心，莫不敢忘，愿师生情谊永存！

感谢钱彪副教授对我论文开题的指导，从开题内容的修改、技术路线的设定到论文开题的完成，您的宝贵意见对我顺利完成开题工作至关重要。从第一篇综述开始，到独立完成文章的撰写和投稿，在您的严格要求下我得到了进步和成长，也为我日后发表论文积攒了基础和经验，衷心感谢您对我的教诲和培养。还要感谢李强老师、倪钊老师、李应龙老师在我进入科室进行临床学习期间给予的支持和指导。感谢高存祥、刘志立、李晨、曾凯、马路平、欧阳松等各位老师对我的临床知识和技能进行的细心传授和认真指导，感谢黄和平护士长和各位护理老师对我的关心和照顾，让我感受到了泌尿外科这个大家庭的温暖。

感谢徐浩、钱成、申茂磊、郝志强、郝雨、耿永光、章林明等各位师兄弟以及我的舍友梁汝江、刘家庆，感谢他们在学习和生活中对我的支持和帮助，也很幸运在研究生期间能结识到他们这些好朋友和好兄弟，虽以后天南海北，愿我们友谊长存！

作者简介

李朋, 男性, 生于 1994 年 11 月, 籍贯山东。2017 年毕业于滨州医学院临床医学专业, 获医学学士学位。2017 年 9 月起在石河子大学医学院泌尿外科学专业学习。

在学期间主要参与的研究项目

1. 参加了国家自然科学基金项目《SCL 慢病毒转染重塑膀胱 ICC 治疗 DCP 的实验研究》的部分研究工作。

2. 参加了国家自然科学基金项目《纳米细菌在泌尿系结石形成过程中的作用及其机制的研究》的部分研究工作。

在学期间发表的文章

1. 李朋, 钱彪, 申茂磊, 等. 缝隙连接蛋白-43 在糖尿病膀胱豚鼠模型中的表达及意义[J]. 天津医药, 2020, 48(01): 25-29.

2. 李朋, 王勤章, 钱成, 等. 钙敏感受体在大鼠肾草酸钙结石形成中的作用[J]. 解放军医学院学报, 2018, 39(07): 633-635.

3. 李朋, 高存祥, 王勤章, 等. 探讨钙敏感受体及紧密连接蛋白-14 在大鼠肾草酸钙结石形成中的作用[J]. 川北医学院学报, 2018, 33(06): 811-814.

4. 干细胞白血病基因药物对 DCP 豚鼠膀胱 ICCs 细胞 c-kit 蛋白表达的影响 (医药导报; 已录用)

获奖情况

2018 年荣获石河子大学医学院优秀学术成果奖

石河子大学硕士研究生学位论文

导师评阅表

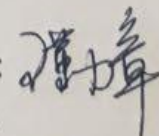
研究生姓名	李朋	学制	3 年
专业	外科学	研究方向	尿动力学相关研究

学术评语:

该生根据本课题组前期相关研究经验,通过链尿佐菌素诱导糖尿病豚鼠模型,利用尿动力学检测筛选 DCP 豚鼠,运用 HE 染色鉴定 DCP 模型制作成功,采用免疫荧光染色、Western blot 技术检测各组豚鼠膀胱中缝隙连接蛋白 43 分布和表达的变化。结果显示 DCP 豚鼠膀胱中 Cx43 分布异常, Cx43 蛋白表达明显下降。考虑具体机制可能是 Cx43 表达降低使逼尿肌细胞间缝隙连接减少,缝隙连接细胞间通讯功能受损,电信号传输异常,动作电位无法正常传导,导致兴奋无法广泛产生,逼尿肌细胞兴奋性减低,逼尿肌收缩活动障碍,伴随后期膀胱的失代偿作用,最终导致了 DCP 的形成。Cx43 表达水平的变化与 DCP 的发展有着密切关系, Cx43 作为构成膀胱逼尿肌缝隙连接通讯功能的主要蛋白,其可能通过影响膀胱逼尿肌的收缩功能在 DCP 的形成过程中起重要作用, Cx43 相关研究可能成为 DCP 发病机制和未来临床治疗的新的切入点。

本研究立意新颖,为本学科前沿,对 DCP 的发病机制及临床治疗有重要意义;技术路线设计合理,采用的实验方法及产生的临床意义是目前相关领域的研究热点。学位论文符合各学科的学术规范,材料翔实,推理严密,文字表达准确;论文材料真实,结论合理可信,具有一定的创新性。论文写作条理层次清晰,达到硕士研究生毕业论文的要求。

指导教师签字:



2020年6月4日

