

细胞生物学进展

(第二卷)

郑国锷 翟中和 主编

ADVANCES IN
CELL BIOLOGY
Vol. 2. 1990

细胞生物学进展

(第二卷)

高等教

6.3

高等教育出版社

细胞生物学进展

第二卷

高等教育出版社

(京) 112号

细胞生物学进展

第二卷

郑国锷 翟中和 主编

李茂国 责任编辑

*

高等教育出版社出版

新华书店总店北京科技发行所发行

国防工业出版社印刷厂印装

*

开本 787×1092 1/16 印张 23.5 字数 540 000

1991年10月第1版 1991年10月第1次印刷

印数0001—2 155

ISBN 7-04-003245-7/Q · 174

定价11.95元

《细胞生物学进展》编辑委员会

(以姓氏笔划为序)

顾 问	庄孝德	陈阅增	汪堃仁	汪德耀
	罗士韦	施履吉	姚 鑫	
主 编	郑国锜	翟中和		
编 委	王亚辉	王永潮	刘树森	许智宏
	吴 旻	李宝健	李靖炎	周 嫦
	杨福愉	郝 水	曾弥白	
秘 书	丁明孝	何大澄	谷祝平	李茂国

本卷作者

(以文章出现先后为序)

曾弥白	仝允栩	汤雪明	蔡树涛	翟中和	李靖炎
王永潮	苑 颀	徐 芸	薛京伦	张 云	薛绍白
陈慰峰	王 智	李士锷	尚克刚	李宝健	简令成
张锦珠					

目 录

间隙连接研究的新进展.....	1
细胞外基质和形态发生.....	18
高尔基体的结构与功能.....	51
Nuclear Lamina (核纤层) —— 一种重要的细胞核结构.....	74
染色质结构的进化 I. 原核生物类核体.....	89
着丝点的组成、结构与机能的研究进展.....	118
人体基因定位及其进展.....	132
钙和细胞功能.....	160
T细胞分化研究的新焦点——早期T细胞及其在胸腺内的分化.....	211
癌基因与细胞癌变.....	250
EK(ES)细胞与哺乳动物遗传工程.....	265
植物生物技术的概况与展望.....	282
植物抗寒性的细胞及分子生物学研究进展.....	296
现代物理学方法在活细胞研究中的应用.....	321

间隙连接研究的新进展

曾 弥 白

(中国科学院上海细胞生物研究所)

1. 引言.....	1
2. 间隙连接通道的结构.....	1
3. 间隙连接的分子生物学.....	2
4. 间隙连接的通透性和启闭.....	5
4.1 连接的通透性	5
4.2 连接的启闭	6
5. 功能方面.....	8
5.1 间隙连接在发育中的作用	8
5.2 间隙连接和肿瘤	13

1. 引 言

自从1967年J. P. Revel和 M. J. Karnovsky^[1]发现细胞外的标记物可以通透这个连接之间的区域,提出了间隙连接(gap junction)这一名称,一直沿用至今。但是这一结构的重要性远远不是这一名称所能表达的。间隙连接被认为是多细胞动物细胞之间离子和其它小分子物质主要的通道。虽然有不少有力的事实指出它在细胞通讯中的重要性,如像所有偶合的细胞在它们的质膜上都有间隙连接,不偶合的细胞就没有,而且,偶合的强度可以和间隙连接的多少有关联等。但是,还没有人看到过任何一个分子在必要的分辨水平通过间隙连接的通道。

从1967年到现在的20多年中,各个方面对间隙连接所积累的资料是可观的。这些资料包括各个水平的,从组织、细胞到分子;同时也涉及到许多学科,如细胞生物学、生物物理学、生物化学、肿瘤生物学、发育生物学等等。下面将从4个方面叙述间隙连接研究的最新进展。

2. 间隙连接通道的结构

间隙连接的结构单位是连接子(connexon)。每一个连接子的直径是6—7 nm,它是一个跨越质膜由蛋白质构成的中空圆筒,和相邻细胞的另一个连接子在细胞间的一端相接。这样

连接起来的一对连接子形成通道。在细胞表面这种通道不是单个的，而是簇聚成斑块状。在电子显微镜下可以从超薄切片或冰冻断裂复型膜观察它们的结构。在超薄切片上它是相邻两细胞靠得很近的并列的质膜，隔开这两层质膜的是一个2—4nm的间隙，它的名称就是因此而得到的。冰冻断裂复型膜的观察指出，间隙连接的斑块可以由几对乃至成千上万对连接子组成。

间隙连接在多种去垢剂和碱性溶液中都能保存它特有的斑块状结构，这一性质对于进行

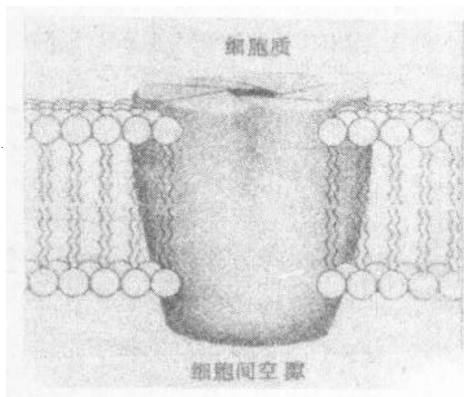


图1 连接子三维构型的示意图
由6个亚单位组成，位于质膜中。
(自Unwin和Henderson 1984^[5])

生化分离是十分有利的。分离的间隙连接的连接子常常比完整细胞中的聚集得更紧密而且呈现一种特有的类似晶体六角状的排列。X光和电子衍射技术利用这种分离的材料研究了连接子的精细结构^[2,3,4]。这些分析指出，连接子是由6个相似，也可能是相等的亚单位环绕一个2nm充满水的通道(图1)。每一个亚单位像是一个棒状结构，相当于20 000—30 000Mr蛋白质。由于分辨力的限制，确切的大小，每一亚单位的跨膜区或者蛋白质的次级结构都还无法认定。但是，已经知道^[3,4]，每一个亚单位和连接子的长轴之间稍有倾斜，而且，至少在分离的连接子，倾斜的角度可以由外界因素的改变(如Ca²⁺的增加)而减小，因而引起扭转使通道在细胞质一端关闭。这种构型的改变可能

是在位的连接子通道开启和关闭机理的基础。

Markowski(1985)^[6]报导的X光衍射的结果与上述不同，指出间隙连接通道包括3个区段：跨膜区、细胞质区和启闭区。启闭区位于近细胞质的一端，虽然还没有资料可以说明通道开启的情况，但是根据启闭结构的位置可以肯定要使通道开启它必须首先被去除。他认为通道启闭的机理和Unwin等^[3,4]提出的整个通道构型的改变是不同的。

3. 间隙连接的分子生物学

虽然用生化分离的方法研究间隙连接的工作开始得很早，但是直到最近它的结构蛋白质才被认定。许多年来，一些分离得到的样品在电子显微镜检查下观察到间隙连接结构，在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide)凝胶电泳(SDS-PAGE)图谱上，总是看到许多大小不同而且毫无关系的蛋白质。1979年才在3个不同的实验室分别从鼠类肝脏细胞得到了一个27 000Mr的蛋白质，被认为是间隙连接的主要组成成份^[7,8,9]。

过去各个实验室从不同的材料(大、小鼠的肝或心)提取间隙连接蛋白质所采用的步骤，除了选用一些去除污染的辅助方法外基本相同。首先分离质膜，用去垢剂(如Sarkosyl,

deoxycholate, Triton X-100等)提取,再用蔗糖密度梯度超速离心进一步分离。为了克服培养细胞为原初分离材料时量上的困难,Finbow等(1983)^[10]省去了质膜分离的一步,直接用Triton X-100处理单层培养细胞。结果得到一个16 000Mr蛋白质。当时认为这个分子量较小的蛋白质可能是27 000Mr蛋白质的一个重要片段,但是随即免疫学的实验证明,抗27 000Mr的抗体和16 000Mr不起反应;而且双向多肽图谱也指出27 000Mr和16 000Mr是不相关的两个蛋白质。此外从小鼠肝、心、肾和脑间隙连接的制备中分离得到的16 000Mr蛋白质的多肽图是完全一致的。因此认为16 000Mr是一个独立的蛋白质。还有一些研究也说明组成肝间隙连接有两个分子量明显不同的蛋白质,26 000Mr和21 000Mr。究竟这些蛋白质在间隙连接的结构和功能上起什么作用还待进一步研究。

另外一个受到关注的问题是不同组织之间连接蛋白质的异同。哺乳类的心肌和肝细胞的间隙连接的超微结构和它们的蛋白质组成都不相同^[11]。在电镜超薄切片的图片上,在位于心肌细胞质的一面可以看到一层绒毛状物质。速冻断裂深度刻蚀的样品,在细胞质面也显示颗粒状结构。在分离心肌间隙连接蛋白质时,发现抑制碱性丝氨酸蛋白酶的活力对于保持其结构十分重要。苯甲磺酰氟(phenyl methyl sulfonyl fluoride, PMSF)能最有效地抑制蛋白酶。当PMSF存在时,大鼠心肌连接蛋白在SDS-PAGE上的一条主带为Mr 44 000—47 000,在PMSF不存在时,主带为Mr 29 500。甚至未经蛋白质水解的心肌连接蛋白在8mol/L尿素中温浴(37℃)后,SDS-PAGE上也只显示一条Mr 44 000—47 000的主带。在PMSF存在时超薄切片上有绒毛状层,冰蚀样品上有颗粒,而PMSF不存在时则没有。根据以上结果认为PMSF不存在时而丢失的Mr 14 500—17 500是心肌间隙连接通道蛋白的一部分,在脂类双层之间并和通道蛋白质相结合。

脊椎动物的晶体细胞中,间隙连接既大又多,占有细胞表面膜的很大面积。虽然它们和其它组织中的间隙连接有许多共同之处,但是根据抗体结合和蛋白质序列分析的结果,对晶体连接的性质和功能提出了疑问。从晶体分离得到的主要连接蛋白是26 000Mr,被认为是晶体连接的组成成份,而用免疫标记技术发现它的抗体并不结合到晶体所有的连接上。有报导指出,在牛晶体中存在两种连接类型,它们在超薄切片上的厚度为16—17nm和12nm。最近从晶体中得到了另一70 000Mr的蛋白,定位于晶体纤维细胞的间隙连接上。免疫荧光显微术和免疫电镜术都指出,它只定位于16—17nm的晶体连接上,它的抗体不结合到12nm的膜结构上。分别从晶体外皮层、内皮层和中央晶核区,分析膜蛋白的含量,发现70 000Mr蛋白在晶体的外皮层特别丰富,在晶体内部较老的纤维细胞中则明显减少^[12,13]。当时对晶体连接蛋白提出的疑问,近年来已积累了不少资料,但是,究竟在晶体中发现的这些蛋白在细胞间通道的构建上是否起作用,或者起什么作用还没有弄清楚。

从无脊椎动物组织也可分离出间隙连接。在龙虾肝胰腺的连接中分离得到了一个18 000Mr蛋白质^[14],这个分子量比16 000Mr的脊椎动物的连接蛋白质稍大一些。龙虾肝胰腺18 000Mr和鼠肝16 000Mr的连接蛋白质具有共同的抗原决定簇,这些似乎说明连接蛋白质的保守性不但存在于脊椎动物间隙连接蛋白质之间,而且延伸到无脊椎动物。

对于间隙连接蛋白质的研究,主要是哺乳类的,分子结构的研究已取得了一些进展。不同

实验室进行了人肝和大鼠肝间隙连接蛋白质的cDNA分子克隆和定性的工作^[15,16],都发现它编码的是32 000Mr的蛋白质。曾经认为32 000Mr和生化分离得到的27 000Mr蛋白质的不一致,可能有不同的原因,如种间的差异、翻译后的修改、分离过程中连接蛋白的水解、SDS凝胶上异常的迁移或者核苷酸序列分析的错误等等,这个问题最近得到了初步澄清^[17]。用不同浓度丙烯酰胺进行分离,指出虽然制备凝胶的方法如凝胶中SDS或者加入蛋白质的量都会影响迁移的行为,但是丙烯酰胺的浓度是主要引起分子量变化的因素(表1)。在10%丙烯酰胺凝胶上,间隙连接蛋白质分成两条主条,单体在27 000Mr,双体在47 000Mr。当浓度增加到12.5%,双体变成54 000Mr,单体仍在27 000Mr。在15%凝胶上,单体的位置也改变了,单体在32 000Mr,双体仍在54 000Mr。浓度再增加到17.5%,单体仍位于32 000Mr而双体几乎和66 000Mr的牛白蛋白的标准液并行。

表1 用不同浓度丙烯酰胺间隙连接蛋白质的分子量

丙烯酰胺 %	单体 Mr	双体 Mr
10	27 000	47 000
12.5	27 000	54 000
15	32 000	54 000
17.5	32 000	64 000

(取自N. M. Kuma 与N. B. Gilula^[16])

此外,凝胶的组成成份并不是唯一影响间隙连接蛋白质的因素。在分离过程中蛋白质的降解产物出现在凝胶电泳上也是常有的。当然,最简单的结论是肝间隙连接蛋白质是32 000Mr,双体是64 000Mr,就像cDNA序列分析所预测的^[15,16]。究竟这是不是间隙连接的唯一蛋白质还有待进一步工作的验证。

关于肝细胞和心肌细胞间隙连接蛋白质,过去的工作指出它们是有关的,可能是属于同一家族的,但不是等同的蛋白质。为什么两个出现在同一个体不同组织中的蛋白质,除了共性,又有不少区别?Beyer等^[18]对这一问题提供了有启发性的结果。

他们应用多种技术,如RNA分离、Northern印迹法、cDNA文库的建造和筛选以及DNA顺序分析等,对心肌和肝细胞的两个间隙连接蛋白质进行了分析和比较。发现肝间隙连接蛋白质mRNA在肝、胃和脑中较丰富,而心肌间隙连接蛋白质mRNA则在心肌、分娩子宫、用促性腺激素准备好了的卵巢和晶体中比较丰富。两者在肾脏中含量都相当高。cDNA序列分析预测的结果,心肌间隙连接蛋白质是一个含有382个氨基酸的多肽,分子量为43 036Mr,这和前面到Page和Manjunath^[11]得到的44 000—47 000Mr很相似。这个心肌连接蛋白质预测的氨基酸顺序和肝细胞连接蛋白具有同系的区段(图2),心肌连接蛋白1—105残基中61(58%)和肝连接蛋白1—104残基相同。心肌连接蛋白142—246残基中44(42%)和肝连接蛋白122—227残基相同。根据这些和其它结果,在第一个间隙连接蛋白质分子空间构型模式图^[19]的基础上,他们提出了自己的模式图(图3)。图中两条平行线分别代表肝和心肌细胞间隙连接蛋白质,其间黑点表示共有氨基酸的位置。这两个蛋白质的细胞膜间区域和细胞外区域是保守的结构,

43	1	EGDPSAIGKMLDQKQAYSTAGCKQWLSVYFYFRILLGLTIVE SAHGDECSAFRCNTLQPGCENVCYDKSFFISHV	75
32	1	EN-ETGQVYTLISGVNRHSTADICRQWLSVYFYFRIMVILVVAESVMGDDKRSFTICNTLQPGCNSVCYDHPFISHV	74
43	76	RFNVLQRIIFVSMPTLLYLAVFYVMRMEERLNKKEEDAKVAQTGGVNVEMHLKQIEDKKFKYGIIEELKVKMNGG	150
32	75	RQMSLQRIIFVSMPTLLYLAVFYVMRMEERLNKKEEDAKVAQTGGVNVEMHLKQIEDKKFKYGIIEELKVKMNGG	130
43	151	LLRTYHLSIIEPKSVFENAFLLI-QLWFL-EGFSLSAVNTKRDPCFMCVDCNLSRPTEKIDFIIFPHVVLVSLA	222
32	131	LWVYVMSVVERLIEFAVENHYVYLLIPGAM-VRLM-KGEAFPCENTVDCNLSRPTEKIMETVEMLAASGICII	203
43	223	LNIIELEHYVFFKGVKIDVVKRSLDHYHATTGPLSPÉKDCGSPKYAYFNGCSSPTAFLSPRSPPGYKLVTDORNMS	297
32	204	LNVAEVYVLIIPACARFAQRRSNÉPSRKGSGFGHRLSPEYKQNEINKLLEEQGSLKDIILRRSPGTCAGLAESV	278
43	298	CRNYNKQASEQNWANYSAEQNRMGQAGSTISNSHAQPFDPDDNQNAKKVAAGHELQPLAIVDQRPSSRASSRAS	372
32	279	RCSÁC	283
43	373	SRPRPDDLEI	382

图 2 连接蛋白 43 和连接蛋白 32 的氨基酸序列的比较

框格表示最佳排列时两者相同的残基，虚线表示最佳排列时出现的间隙。(取自 E. C. Beyer^[18])

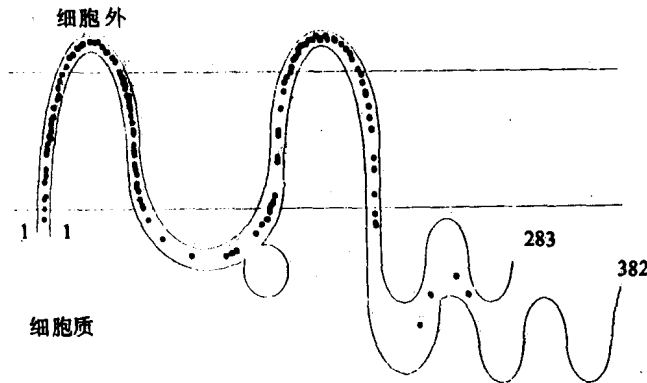


图 3 显示间隙连接蛋白质和质膜相互关系的构型模式图

肝间隙连接蛋白质(1—283)和心肌间隙连接蛋白质(1—382)分别以两条平行线代表,在心肌间隙连接蛋白质分子的中部和COOH端有外加的部分。两线之间的黑点表示共有氨基酸的位置。(取自 E. C. Beyer 等^[18])

而细胞质部分是各异的,后者可能和不同生理功能有关,心肌间隙连接在心肌细胞间传导电兴奋而肝细胞则没有这种功能。究竟这种功能的差异能不能在专一的蛋白质的结构领区定位,还待进一步证实。比较其它连接蛋白也得到了相同的结论。序列分析的结果证明,晶体 70 000Mr 的氨基端和跨膜的多肽部分是保守的,而其后的羧基端也在细胞质一侧^[20],说明各个连接蛋白的区域图(topology)具有共同性。

4. 间隙连接的通透性和启闭

4.1 连接的通透性

一定大小范围内的离子和分子可以通过间隙连接的通道。关于能够通过通道分子的大小,从以下两个方面预测计算得到了相当一致的结果。

一方面根据功能的分析,这又包括代谢合作 (metabolic cooperation)和染料注射。代谢合作的早期工作^[21]是利用一种哺乳类细胞的突变株,这种突变株缺乏整合外源次黄嘌呤 (hypoxanthin)为核酸的次黄嘌呤转磷酸核糖基酶 (hypoxanthin phosphoribosyl transferase),统称为HPRT⁻细胞。当这些突变株细胞和野生型(HPRT⁺)细胞一起培养,在这两种细胞间已形成间隙连接时,它们都能整合外源次黄嘌呤。后来证实,这是由于嘌呤核苷酸从连接通道自野生型细胞转到了HPRT⁻细胞。进一步的工作^[22]指出,HPRT⁻细胞和缺乏胸苷激酶 (thymidine kinase)的TK⁻细胞的混合培养能在HAT培养液中生长。HAT培养液含有阻止嘌呤核苷酸和胸苷酸的新合成的氨嘌呤 (aminopterin),又含有次黄嘌呤和胸苷。两者的外源供应使野生型得以正常生长。但是,两种突变型细胞分别地用它培养都不能存活。这是因为,在混合培养中,HPRT⁻细胞依赖TK⁻细胞通过连接通道喂以嘌呤核苷酸,而相反TK⁻细胞则依赖HPRT⁻细胞获得胸腺嘧啶核苷酸。这个生长相互依赖的实验系统说明,核苷酸大小的分子是可以通过连接通道的。

注射荧光染料是另一个通过功能分析以检测通道大小的方法。把合成的分子量、形状和电荷都不同的荧光染料注射到各种不同的细胞。最早用摇蚊的唾腺细胞进行注射,因为这些细胞特别巨大,后来使用了其它节肢动物、各类脊椎动物包括哺乳类的细胞。注射后根据荧光染料是否能通过间隙连接而转运到相邻细胞,以判断通道的大小。能通过哺乳类细胞通道的分子约为900Mr^[23],能通过节肢动物细胞的约为1500Mr^[24]。

另一方面根据前面已经提到的三维成像技术测算通道的大小为1.5—2.0nm。因为对通道内壁的性质还没有确切的资料,所以可以让分子自由通过的空间的精确大小也还无法估算。但是,测算所得通道的大小和可以通过最大分子的大小是相当一致的。

离子和分子通过间隙连接在细胞间的运行速度,曾经在各种体系中估算过。小分子在偶合细胞群体中的流动应该是细胞间通道传导力和连接通道数目的函数。在大多数组织和培养细胞中,这个函数是未知的。但是,有一些实验结果对不同分子在细胞间的运行速度提供了资料^[22]。将荧光染料lucifer yellow (LY)(440Mr)注射到小鼠皮肤真皮层中的一个细胞,在不到5分钟内它通过连接通道转运到邻近500个细胞,大约包括了0.5mm的距离。在上面提到的两株突变纤维母细胞的混合培养中,其中一株不能合成嘌呤核苷酸、另一株不能合成胸腺嘧啶核苷酸,而混合培养后由于通过间隙连接互相交换核苷酸,生长速度和野生型一样。据估算,要达到上述这种成功的“互喂”每对细胞间最低的转运速度每秒钟也要超过 10^7 个核苷酸分子。很可能其它代谢产物和小分子也以类似的速度在细胞间来回运转。

4.2 连接的启闭

连接的启闭是对细胞内环境改变的一种反应,对组织生存有重要作用。如,对死亡或将要死亡细胞的封闭,既避免有害物质进入邻近细胞,也阻止离子或小分子从邻近细胞外流而遭受损失。

细胞内Ca²⁺的水平是影响启闭的一个因素。上面已经提到分离的间隙连接可以两种不同

的构形存在^[3,4],一种显然是开启的,另一种则是关闭的。改变 Ca^{2+} 的浓度可以引起构形的改变, Ca^{2+} 的影响似乎是使连接子发生扭曲,而引起细胞质一端通道关闭。目前还不知道,在位的情况下是否也发生同样运动。一对连接子中的每一个是否能够独立行动也还不知道。已经知道,蛋白亚单位的细胞质一端运动范围较大,而细胞外区域较小,后者正是相邻两个连接子相连接的部位,提示独立关闭的可能性。

关于细胞内pH的作用首先在两栖类早期胚胎细胞中被发现,以 CO_2 处理可以降低细胞内pH,而细胞的电偶合也明显降低。后来证明这似乎是间隙连接通道的一个普遍的性质,如小鼠肝细胞和龙虾轴突用 CO_2 处理引起细胞内pH降低,都证实了细胞去偶合的现象。

细胞内 Ca^{2+} 和pH在调控间隙连接通道启闭的作用是已被证实了的,但是它们的作用是直接的,还是通过中间因素还不完全清楚。近年来,有些实验的结果提示,调钙蛋白(calmodulin, CaM)在间隙连接通道启闭中起重要作用^[25]。已经证实,CaM和晶体蛋白26 000Mr的结合并不依赖 Ca^{2+} ,而 Ca^{2+} 活化的CaM在26 000Mr能引起构形的改变。CaM抑制剂能够阻止通道的关闭,进一步支持CaM参与通道启闭的调控。另外,在重建的晶体连接通道,去偶合离子引起通道关闭必需CaM的存在,因此,在这一系统中,通道的启闭除了去偶合离子,还需要通道蛋白、CaM和磷脂,说明通道启闭是活化CaM和26 000Mr的直接作用。

cAMP(3'-5'环腺苷磷酸, 3'-5'cyclic adenosine phosphate)在间隙连接启闭中起调节作用的事例大多来自组织培养的细胞。最早试图说明第二信使,如cAMP,在细胞间的传送起着协调组织反应的实验是在两种哺乳类的培养细胞进行的^[26]。在这一实验的基础上,为了进一步证明cAMP的作用,在两种哺乳类细胞(猪卵巢颗粒细胞和小鼠肾上腺皮质肿瘤细胞, Y-1)的共同培养中,进行了蛋白激酶离解的检测^[27],因为,cAMP的作用要通过蛋白激酶的解离。卵巢颗粒细胞和Y-1细胞各对一种激素起专一的反应,而两者的激素反应又都依赖同一第二信使——cAMP。在这两种细胞的共同培养中,促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)刺激引起颗粒细胞中蛋白激酶的解离,稍后Y-1细胞中也会发生这一现象。但是,Y-1细胞必需是和颗粒细胞有直接接触的,如果Y-1细胞靠近颗粒细胞而和后者没有直接接触,就不会发生这一反应。同样,促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)的刺激引起Y-1细胞的蛋白激酶解离,和Y-1细胞直接接触的颗粒细胞也同样发生反应。放射自显的结果指出, ^{125}I -FSH只和颗粒细胞结合,即使它们紧靠颗粒细胞也从未发现和Y-1细胞结合,细胞融合的可能性也被排除了。这些结果提示,通过间隙连接,cAMP从具有激素受体的一种细胞被传送到另一种对cAMP水平改变也是敏感性的细胞,因而引起后者本身专一的激素反应。虽然,还没有事实证实直接通过通道的信号。

第二信使在细胞间传送不但起协调细胞对外界刺激反应的作用,而且能调控通道的传导性。在果蝇唾液腺的培养液中加入cAMP将增高通道的传导性,而在萤粉甲(Tenebrionolitor)上皮它却起相反的作用^[28]。在脊椎动物的培养细胞中,cAMP也能通过新连接的形成以增加通道的传导性。最引人注目的例子是从小鼠L细胞诞生出来的 C_1-1D 细胞株,在标准的培养条件下它缺乏通透性连接。当这些细胞的培养液中加入低量的cAMP,间隙连接形成,染料和电偶合就可以测到。还有实验证明,给细胞通讯缺陷型的突变细胞株加添cAMP依赖

的蛋白激酶的一个亚单位,这些细胞的通透性得以纠正^[29]。这种改变的发生需要延缓一定时间,而且依赖于蛋白质的合成,因此cAMP的作用发生在那一个环节还有待证明。

一般认为启闭机理主要有两种:(1)全或无:以单个通道为单位,完全开启或者完全关闭。在一定情况下并不是所有通道都处于开启的状态,在适当刺激下,它们才开启。(2)分级:在同一情况所有的通道都处于开启状态,但不是完全的开启。在适当刺激下,所有通道可以开启得大一点,可能经过一系列中间状态,直到完全开启。这两种机理都发生在极为短暂的时间中,而且实际上情况更为复杂,它们也可以混合存在。

5. 功能方面

关于间隙连接在非兴奋性组织的功能方面所起的作用,有过不少设想^[30,31,32],但是,具体的知道得并不多。

5.1 间隙连接在发育中的作用

5.1.1 间隙连接和卵母细胞

间隙连接在卵子生长和成熟中所起的作用早就引起重视。哺乳类卵母细胞被多层卵泡细胞(统称为卵丘)所围绕。这些细胞伸出细长突起,穿过透明带和卵表面接触,在接触的部位有间隙连接。生长中的卵母细胞和它周围的卵泡细胞之间存在着染料转运和离子偶合。在排卵前夕,卵母细胞的第一次成熟分裂中止在核网期。在适当的激素刺激下,卵丘细胞分散瓦解,细胞间偶合消失,同时卵子成熟,排卵发生。因此,认为第一次成熟分裂是在卵丘和卵母细胞保持完整的情况下中止进行的。结合体外实验的结果提出了卵母细胞成熟的假设:cAMP在卵丘细胞中合成,通过间隙连接转送给卵母细胞,使成熟分裂停留在中止的状态。在促性腺激素升高的作用下,间隙连接消失,通讯中断,cAMP的供应也受阻,成熟分裂得以继续,卵子成熟。是否还涉及其它抑制因素的作用,还待进一步研究^[33]。

两栖类的卵母细胞和围绕它的卵泡细胞之间有间隙连接,和哺乳类相似,连接通讯很可能也受激素的调控。已经知道,蛙类卵母细胞的成熟是受孕酮启动的,它引起卵母细胞cAMP明显的下降,很可能是通过对卵母细胞腺苷酸环化酶(adenylate cyclase)的专一抑制起作用的^[32]。而且,卵母细胞的成熟和它与卵泡细胞之间的连接偶合的消失在时间上是吻合的^[35]。但是,间隙连接在这一过程中的调节作用也还缺乏直接的证据。

在某些昆虫和在两栖类一样,卵母细胞周围有一层卵泡细胞,通过间隙连接与它们相通,而且两者之间既有离子偶合,也有染料偶合。卵母细胞和卵泡细胞之间间隙连接的存在,使卵泡细胞除去直接完成营养的供应之外,还有可能和脊椎动物一样,参与卵子成熟的调控。

5.1.2 发育分隔和通讯分隔

间隙连接在卵裂早期的出现是所有脊索动物和大多数无脊椎动物的一个普遍现象。除个别在2—4细胞时就可以用冰冻断裂法显示间隙连接的例子之外,在多数间隙连接的出现是在8细胞或者这之后。已经知道,有些物种在以后的发育中,细胞偶合的范围逐渐有所局限,在枪乌贼(*Loligo pealii*)胚胎发现得最早^[36]。在枪乌贼早期胚胎的细胞之间普遍有低阻抗的通道相连,在发育进程中表现电偶合的范围逐渐变小,有兴趣的是细胞相互作用的范围也随之变小。在枪乌贼胚胎发现的这一事实后来在其他胚胎得到证实,并且更有发展。

这种在发育中胚胎细胞被划分为不同区域并各自形成不同结构的现象称为发育分隔(developmental compartment)。由于发育分隔的形成,在分隔范围之内胚胎细胞发育的命运逐渐受到限制。这些分隔有清晰的界限。分隔界限一旦形成以后,分隔内的细胞以及它们后代的发育命运就决定了,而且不同于相邻分隔的命运。虽然分隔形成的机理还不完全清楚,但是有一些事实指出,这和间隙连接之间有一定的关系。

小鼠胚胎发育中也存在着发育分隔的现象。小鼠胚胎是所谓高度调整型的,直到8细胞期所有的裂球都具有发育为完整胚胎的能力。Lo和Gilula(1979)^[37,38]检测了早期胚胎的离子偶合和染料偶合。直到8细胞期,8个裂球才通过间隙连接相互偶合,在这之前没有发现间隙连接。到胚泡期,胚胎中形成了两个不同发育命运的部分。胚泡的外层是滋养层,将来成为部分胚外结构。内细胞团细胞,位于胚泡腔的一端,将来发育为胚胎本身。从8细胞期到胚泡期,胚胎所有的细胞都是偶合的,既是离子偶合也是染料偶合的。但是,胚胎着床以后,进一步发育时,偶合就逐渐发生改变。首先,当滋养层细胞形成巨细胞时,滋养层细胞之间以及它们和内细胞团之间不再是染料偶合的,但是内细胞团的细胞之间却仍是染料偶合的。这种内细胞团的细胞之间相互偶合而且和邻近的细胞不偶合的现象,称为通讯分隔(communication compartment)。出乎意料的是,当离子偶合和染料偶合同时进行检测时,发现滋养层细胞和内细胞团细胞却是离子偶合的。这就说明通讯分隔对于细胞间通讯来说,只是部分受到局限。再往后,当内细胞团中出现具有明显特点的两种细胞——胚外内胚层和外胚层、胚外外胚层时,内细胞团进一步形成多个不同的通讯分隔。

卵管期是原肠形成,也就是胚胎奠定体形的时期。这时注射荧光染料,发现在3个胚层之内细胞是相互偶合的,各个胚层是一个独立的通讯分隔,而胚层之间偶合受到限制。为了检测3个胚层之间是否可能也和早期一样还存在着一定的偶合,注射染料的同时进行了离子偶合的测试,发现3个胚层之间是离子偶合的。这就说明,染料不偶合的“胚层分隔”是以离子偶合的形式实现连接通讯的^[39]。

这些发现证实,在小鼠胚胎中细胞间的通讯模式和发育事件之间存在着时空的关系。从而指出,连接通讯在调控小鼠胚胎发育中起重要的作用。

在昆虫果蝇也发现有发育分隔的现象^[40,41],情况更为复杂,但是原理是类似的。果蝇成体很多角质层结构是由幼虫时的成簇细胞,所谓的成虫盘发育而成,如从翅成虫盘长成成体翅。最先发现的是在前后翅之间有一条界线,界线之前的细胞只形成前方的结构,之后的

只形成后方的结构，而这条界线对染料转运有限制作用。大量的分析工作发现，在果蝇翅成虫盘至少有9条界线对连接通讯是有限制的。

在果蝇翅成虫盘发现的这些间隔界线似乎是由于所谓“界限细胞(border cell)”的存在，这些细胞在间隔边缘形成1—3细胞宽的条带，一般通透性较低，因而阻断注射的染料从一个间隔转运到相邻间隔。这种限制并不是恒定的，在发育的不同阶段可以发生变化。

上面谈到的两个发育系统，哺乳类和昆虫，都属于高度调整类型的，它们的裂球间有广泛存在的间隙连接。即使在通讯间隔形成以后，通讯只是受到局限，也并没有完全阻断。裂球间通过间隙连接的相互作用，可能为调整型胚胎的可塑性提供了条件。

最近，在无脊椎软体动物的胚胎发育中，更全面地研究了间隙连接在胚胎发育中的调整作用^[42]。软体动物，静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)胚胎的发育命运以及细胞在胚胎中的位置都已有比较详尽的描述。已经知道这种软体动物胚胎也划分发育分隔。注射荧光染料的观察指出，不论将来发育为什么结构，在24细胞期所有的细胞都是相互耦合的。24细胞期后的细胞分裂的结果形成所谓的十字形期，十字形的中心是动物极，具有四臂，将来形成胚胎的头部，臂间是成纤毛细胞，将来发育为幼虫的运动器官。给动物极一个细胞注射荧光染料，看到染料转运到除成纤毛细胞外的所有细胞。在这时期成纤维细胞和胚胎其它细胞没有耦合，是椎实螺早期胚胎细胞通讯模式最早的变化。由于成纤维细胞的位置在十字形的臂间，由此，荧光标记的细胞成为十字形(图4)。十字形细胞仍具有多潜能，在这种潜能逐渐被局限以前

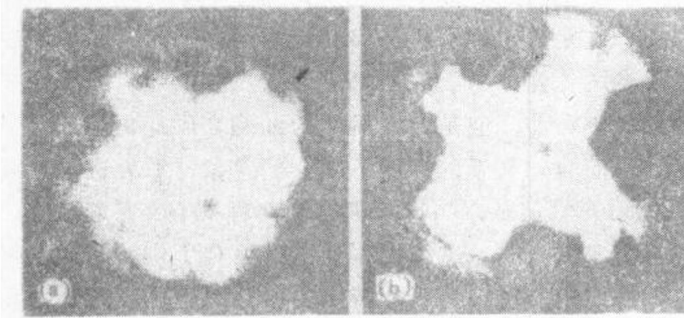


图4 静水椎实螺生活胚胎在注射LY后20分钟的荧光图片

(a) 24细胞期(第一次卵裂后10小时),染料耦合出现在所有细胞之间,没有任何局限。

(b) 82细胞期的动物极观(第一次卵裂后15小时),染料沿十字形的4条臂运转,臂间无荧光染料的部分相当于成纤毛细胞。

* 示注射细胞。×460。

它们仍旧是相互联通的。在十字形进一步发育中形成不同的通讯间隔，它们和具有不同发育命运的发育间隔是一致的。染料转运受到通讯界线的阻挡，而不得进入具有不同发育命运的相邻间隔中。这些间隔是逐渐形成的。也就是，原来没有任何阻挡的一个完整的通讯单位(24细胞期)逐渐分划成多个通讯间隔的嵌合体，和胚胎逐渐形成发育间隔的嵌合体是一致的。

看来，细胞通讯模式的变化和通讯间隔的形成并不是调整型发育所独有的。

5.1.3 水螅的形态建成实验

大量实验事实指出，相邻细胞间的相互作用在组织模式的形成中是至关重要的。间隙连接普遍存在于发育中的组织，又能在相邻细胞间传递1 000Mr大小的分子。但是，直接验证它们在发育过程中对连接通讯影响的工作，还是在利用抗连接蛋白抗体以后。Warner等

(1984)^[43]给爪蟾8细胞期的一个动物极细胞注射抗大鼠肝间隙连接蛋白,这个被注射细胞的后代中包括形成间脑和眼球的物质,待胚胎发育到蝌蚪时发现眼睛有缺陷。两栖类胚胎发育是一个复杂的过程,如何解释整体注射抗体引起眼睛的缺陷是有困难的。利用离体培养的爪蟾外胚层外植块,外植块是取自早期注射过抗连接蛋白抗体的胚胎,再结合中胚层诱导物质的处理,发现中胚层结构的分化受到了不同程度的干扰^[44]。类似的实验更明确地证实了注射抗体使膜间颗粒聚集而形成间隙连接的过程受到明显的阻抑^[45]。

最近,在水螅(*Hydra attenuata*)进行的实验^[46]也很说明问题。水螅,一种淡水腔肠动物,具有简单的圆筒状体形,一端是头,上有触手,另一端是足。从水螅身体任何一部分割取的片断能够重新形成一只小水螅,片断原来的顶端形成头,而原来基底端形成足。这样的结果提示,水螅筒形的身体中存在着内在的位置信息(positional information)^[47],而再生片断细胞之间的相互作用决定再生水螅的最终模式。用这种片断进行的嫁接实验的结果进一步指出,两个发育梯度确定再生头的位置——头激活梯度和头抑制梯度。前者在体筒的上端比以下部位具有更强的形成头的能力,形成这一梯度的分子认为是11-氨基酸多肽;后者来源于一个已形成的头,一旦头部形成,它沿体筒被往下转运,作用强于头激活梯度,阻止另一个头的形成。已经分离到具有这种抑制能力的分子,它的性质还需进一步肯定,它似乎是分子量500Mr或更小的嗜水的非肽类。另一方面,电镜观察看到水螅的上皮细胞间有很多的间隙连接,电生理和染料注射的实验证实了它们之间离子和染料的偶合。因此,认为从水螅分离得到的抑制因子既是嗜水的,又是小分子,很可能是通过间隙连接通道运送的。

嫁接与应用抗间隙连接蛋白抗体相结合的实验^[46],对间隙连接通讯在组织模式形成中所起的作用提供了进一步的佐证。

所用抗体是亲和层析纯化的抗大鼠肝间隙连接蛋白(27 000Mr)的多抗抗体,虽然分类关系如此遥远,给水螅上皮细胞注射抗体可以阻止染料偶合,说明所用抗体对阻断水螅上皮细胞的连接通讯是有效的。嫁接实验(图5)是将体筒顶端割下的一小圈组织嫁接到寄主动物头和芽区(参看图6)之间,结果得到两种类型的动物(图6)。在进行单纯的嫁接实验(如图5A)时,大多数例子寄主头的抑制作用抑制了次级体轴的形成,而嫁接块将被吸收(图6(a))。假如先去头(如图5C),嫁接块不受抑制作用,将形成头,并诱导次级体轴的形成,所谓次级体轴是完整头部包括2—5个触手(图6(b))。为了检测间隙连接通讯在头抑制过程中的作用,将未经处理的组织嫁接到抗体处理过的寄主。如果头抑制因子是通过间隙连接沿体筒转运的话,抗体处理应阻碍运输,会使嫁接处的抑制效应减弱,以致形成次级体轴的频率增加。实验共分3组:(1)寄主是未经处理的正常动物;(2)寄主经抗体或正兔IgG处理;(3)寄主是去头动物。结果见表2。嫁接到未经处理的正常动物只在11%形成次级体轴,嫁接到先去头的寄主形成次级体轴的达80%。嫁接到抗体处理过的寄主,次级体轴的频率增加到22%,抗体对照(正兔IgG处理)的结果和正常对照相似。

次级体轴的出现频率,在抗体处理组没有增加到去头一组的水平。在分析上述结果时,首先考虑到了技术上的原因。抗体阻断间隙连接通讯在8小时内有效,很可能当抗体引起的去偶合随抗体的衰变而逐渐衰退时,嫁接块中抑制因素的水平会有所增加。因此,要在实验