

心脏 connexin 基因变异与房颤的关系

丁媛媛 杨奕清

connexin 基因编码的缝隙连接通道是相邻细胞间的直接通道,具有亲水性、低选择性和低电阻等特点,允许离子、水分子及相对分子质量小于 1kDa 的多肽等在细胞间自由流动,是细胞间完成电化学信息交换的重要物质基础。connexins 是一个基因超家族,目前在人类已至少发现了 21 个 connexin 成员,而且 connexin 通道几乎存在于人体的所有组织细胞(可运动细胞如红细胞等除外)。但在人类心脏,主要缝隙连接通道是 connexin40、connexin43 和 connexin45 通道,这 3 种通道是维持心肌电活动的同步性和冲动在心肌快速传导的主要结构基础,它们的异常可导致心肌局部电活动的不平衡,增加动作电位传布的各向异性以及传导速度的异质性等,从而有利于心律失常的发生和维持^[1,2]。现结合近年来报道的有关文献和作者的科研实践对心脏 connexin 变异与心房纤颤的关系进行综述如下。

一、connexin 概述

1. connexin 通道的分子结构:目前在人类已发现了 21 个 connexin 基因,分别编码 21 种不同的缝隙连接蛋白,其相对分子质量在 26 ~ 60kDa 之间,平均长度为 380 个氨基酸,通常根据蛋白相对分子质量的大小来命名,如 connexin40 与相对分子质量为 40kDa 的蛋白质的电泳移动性相似。缝隙连接蛋白 connexin 是内质网合成的一种跨膜蛋白,每一蛋白分子由 1 个胞质内的 N 端、4 个跨膜域、1 个胞内环、2 个胞外环和 1 个胞质内的 C 端组成。6 个 connexin 连接蛋白 1 组,构成 1 个被称作连接子 connexon 的中空 6 聚体结构,也称为半通道,其中心孔径为 1.5nm,允许离子和低分子物质通过。邻近的 2 个细胞(细胞间隙为 2 ~ 3nm)各提供 1 个 connexin 半通道构成 1 个完整的细胞间 connexin 通道。由于不同组织类型的细胞往往

表达不同种类的 connexin 蛋白,甚至同一细胞也可以同时表达多种 connexin 蛋白,因此 connexin 通道既可能是由相同的 connexin 蛋白构成的同源纯合通道,也可能是由不同的 connexin 蛋白构成的异源杂合通道^[1]。在人类心脏表达的主要是 connexin40、connexin43 和 connexin45,因此心脏缝隙连接通道主要是由这 3 种连接蛋白单独或共同构成的纯合或杂合通道,多位于心肌细胞端端连接处的闰盘,而在细胞两侧分布较少,隙连接通道在心房肌两端的密度比在两侧的高约 10 倍,导致冲动沿心房肌细胞长轴方向的传导速度是横向传导速度的 10 ~ 20 倍,使窦性激动可以沿心房肌长轴快速下传导房室结,是形成心房肌传导各向异性的分子基础^[2]。由于新合成的 connexin 通道倾向于向原有的 connexin 通道聚集,形成缝隙连接“斑块”,所含的通道数目有十几个至上千个不等,所以不难理解,细胞间跨缝隙连接信息交换与缝隙连接通道的总数、缝隙连接通道的开放度和单个缝隙连接通道的传导率有关,connexin 基因变异可通过增加或减少 connexin 蛋白的表达、干扰 connexin 蛋白的定向运输或改变 connexin 蛋白的功能特性而影响 connexin 通道的功能^[3]。另外,缝隙连接蛋白 connexin 的半衰期较短,仅有 1 ~ 3h,所以 connexin 通道的更新速度快,也易受病理生理因素的影响^[4]。

2. connexin 通道的功能:connexin 通道的主要功能是介导细胞之间的电化学信息交换,包括一些重要的信号分子如 Ca^{2+} 、cAMP、cGMP、IP₃ 和 siRNA 等,因此具有广泛而重要的生理作用,与心脏节律性地收缩、神经信号的传导、激素的分泌、损伤的修复以及胚胎的正常发育组织细胞的分化等密切相关^[5]。在心脏,各种 connexin 蛋白的正常表达是心脏正常发育、心脏机械活动同步的重要保证,而心肌协调一致的电活动主要取决于兴奋冲动的传导速度和传导的各向异性。connexin 通道具有电阻低、传导速度快、延搁时间短等特点,在决定传导速度方面甚至发挥着比离子通道更大的作用。在心脏传导系统,His 束和 Purkinje 纤维具有较大的缝隙连接,每个缝隙连接所含的 connexin 通道数目较多,而且多数为传导性强、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570768;81070153);上海市自然科学基金(10ZR1428000)

作者单位:200031 上海市医学科学技术情报研究所(丁媛媛);200030 上海交通大学附属胸科医院心血管研究室(杨奕清)

通讯作者:杨奕清,研究员,教授,主任医师,硕士生导师,电子邮箱:dryyq@tongji.edu.cn

电压敏感性高的 connexin40 通道,因此 His 束和 Purkinje 纤维具有较快的传导速度。另外,兴奋冲动在心肌传导存在各向异性,如心房肌的纵向传导速度是横向传导速度的 10~20 倍,心室肌的纵向传导速度是横向传导速度的 3 倍左右。心肌电传导各向异性的重要分子基础之一是 connexin 通道在心肌表面的不均匀分布,心肌细胞端对端连接处有较多的缝隙连接且其总面积较大,侧对侧连接处只有较少的缝隙连接且其总面积较小,如 connexin43 连接通道在心室肌细胞端对端连接处的量约为侧对侧连接处的 3 倍。connexin 通道在心肌细胞不均匀分布所导致的电传导的各向异性是心律失常的潜在危险因素^[2]。

3. connexin 通道的调节:connexin 通道的门控调节受多种因素的影响,可分为跨缝隙连接电位和神经体液因素两大类。一般情况下,当两相邻细胞膜电位相等(跨细胞缝隙连接电位为 0)时,connexin 通道保持开放状态,随着两相邻细胞膜间电位差的增加,connexin 通道逐渐关闭^[3]。神经体液因素主要有胞内 pH 值、胞内 Ca^{2+} 浓度、磷酸化酶、蛋白激酶、cAMP 以及各种转录因子等^[6]。胞内 pH 值降低可致 connexin 通道功能障碍甚至关闭。胞内 Ca^{2+} 浓度降低时,connexin 通道的传导率呈剂量依赖性下降,而当胞内 Ca^{2+} 浓度与 pH 值同时下降时,connexin 通道的传导率则下降得更加显著。connexin 通道的功能也受 connexin 磷酸化的影响,在这方面尤以 connexin43 的研究最为深入。connexin43 蛋白羧基末端 241~382 氨基酸区域为主要的磷酸化区,也是多种酶的识别位点,如蛋白激酶 C 的磷酸化位点有第 368 位和第 372 位的丝氨酸,丝裂原激活蛋白激酶的磷酸化位点有第 255、279 和 282 位的丝氨酸。丝氨酸残基的磷酸化程度决定着 connexin 通道的通透性,connexin 去磷酸化使缝隙连接通道开放,而且是通道 connexin 解聚的关键点。connexin 一旦去磷酸化,该通道即开始解聚为 connexin 亚单位,而 connexin 亚单位可以进一步降解或转入胞内储存。此外,血管紧张素Ⅱ、环磷酸腺苷、转录因子如 NKX2-5、GATA4 和 TBX5 等也可剂量依赖性上调 connexin 通道表达,并影响通道的电导^[6]。

二、connexin40 基因变异与心房纤颤的关系

1. connexin40 基因的结构及表达特点:connexin40 基因是 connexin 基因家族中的重要一员,因其编码蛋白的相对分子质量为 40kDa 而得名,也被称为 GJA5,定位于 1q21.1^[7]。connexin40 基因有 2 个外显子,即外显子 1A (100bp)或 1B (132bp)和外显子 2。

外显子 2 是连接蛋白的编码序列,外显子 1A 与 1B 的差异在于 5'端非编码区,与蛋白表达的组织特异性有关,1A 型 connexin40 表达于内皮细胞,1B 型则表达于胚胎滋养层和恶性滋养层细胞,在心脏则两种 connexin40 都有表达,即特异性地表达于人类的心房肌、房室结、His 束、左右束支和近端 Purkinje 纤维,所表达的 connexin40 蛋白由 358 个氨基酸组成^[8]。

2. connexin40 基因变异与心房纤颤的关系 2003 年, Groenewegen 等^[9]在对家族性窦性停搏的研究中,最早发现了 connexin 40 基因启动子区域的两个单核苷酸多态:-44 (GA)和 +71 (AG)。该多态使 connexin 40 的表达量下降,增加心房的易损性,心房纤颤等心律失常的发生率增加^[10]。Juang 等^[11]也发现 connexin 40 基因 -44 (GA)和 +71 (AG)多态与 connexin 40 的表达量下降,心房纤颤的发生率升高有关。然而,Wirka 等^[12]则发现 connexin 40 基因启动子区域新的多态 rs10465885 可导致 connexin 40 的表达量下降,心房纤颤的发生率升高,而原先发现的 -44G→A (rs35594137)多态则与 connexin 40 的表达量和心房纤颤的发生率无关。这种报道差异可能与研究对象和研究方法不同有关。2006 年, Gollob 等^[13]对 15 例孤立性心房纤颤患者的 connexin40 基因进行了研究,在其中 4 例病人中发现了 4 种杂合错义突变,其中 3 种突变(p. G38D、p. P88S 和 p. M163V)仅存在于患者心肌组织标本而不存在于其外周血淋巴细胞,提示为体细胞突变,另一种突变(p. A96S)既存在于先证者心肌组织标本又存在于其外周血淋巴细胞。家系分析显示,p. A96S 突变不存在于先证者的配偶和 3 个同胞,但存在于其 2 个无心房纤颤的儿子,表明该突变为生殖细胞突变。同时,对 120 名健康对照者进行测序筛查后发现,其中 1 名对照者携带有 p. A96S 突变。随后的功能研究显示,这些突变或通过影响 connexin40 蛋白的胞内运输,导致蛋白无法到达细胞表面组装成足够数量的缝隙连接通道,或直接抑制缝隙连接通道的功能,显著降低电导,从而使心房的电活动异常,传导速度减慢,传导的各向异性增加,易使心房发生微折返而导致心房纤颤^[14]。2010 年, Yang 等^[15,16]对家族性心房纤颤患者的 connexin40 基因进行了遗传分析,发现 4 个 connexin40 基因新突变 p. Q49X、p. V85I、p. L221I 和 p. L229M 与心房纤颤有关。

三、connexin43 基因变异与心房纤颤的关系

1. connexin43 基因的结构及表达特点:connexin43 基因也常被称为 GJA1,定位于 6q21-q23.2,特

异性地表达于人类的心房肌、心室肌、左右束支远端和 Purkinje 纤维,所表达的 connexin43 蛋白由 396 个氨基酸组成。

2. connexin43 基因变异与心房纤颤的关系:2010 年,Thibodeau 等^[17]对 10 例因孤立性心房纤颤而接受肺静脉隔离手术治疗的患者进行了研究。他们获取了患者的心房组织和外周血淋巴细胞,分别抽提了基因组 DNA,对 connexin43 基因的整个编码区进行测序分析,在 1 例患者的心房组织标本发现了 connexin43 基因的 1 个新的杂合缺失移码突变,即其编码核苷酸序列第 932 位的胞嘧啶缺失,导致所编码肽链的 N 端 310 个氨基酸序列正常,随后出现 36 个异常氨基酸即终止,C 端较野生型肽链减少了 50 个氨基酸。这一突变不存在于患者的淋巴细胞,提示为体细胞突变。功能研究揭示该突变既导致 connexin43 蛋白的定向运输障碍,细胞对无电偶联,又对野生型 connexin43 和 connexin40 通道具有显性抑制作用,因而可诱发心房纤颤。另外,在眼齿指发育不良患者中发现的 connexin43 基因 p. G60S 突变也可能有致心房纤颤作用,因为携带该基因突变的小鼠容易发生心房纤颤^[18]。

四、connexin45 基因变异与房颤的关系

connexin45 基因也常被称为 GJC1 或 GJA7,定位于 17q21. 31,特异性地表达于人类的窦房结、房室结、His 束、和左右束支,所表达的 connexin 蛋白由 382 个氨基酸组成。有关 connexin45 基因变异与人类心房纤颤的关系目前尚未见报道。

在心脏发育早期,冲动并不是通过特化的传导系统传布,而是从一个细胞向另一个细胞传布。connexin45 是心脏早期唯一表达的缝隙连接蛋白,connexin45 基因敲除小鼠在心脏开始跳动后不久就死于心力衰竭,同时伴有心血管系统的其他缺陷如心内膜垫缺损、传导阻滞。条件性 connexin45 基因敲除小鼠表现类似,所不同的只是内膜垫发育尚正常。由 connexin45 基因敲除小鼠胚胎干细胞分化而来的心肌细胞往往表现出频发不规则的搏动。在 connexin40 双等位基因均被 connexin45 基因替换小鼠,P 波间期延长,QRS 复合波变宽碎裂。心外膜标测显示右心房、心室和房室结传导正常,左心房的传导速度显著下降。在杂合子小鼠,窦性心律时心室的激动时间延长,右束支传导时间延长。因此,在 connexin40 缺乏,connexin45 表达上调时,冲动仅在右心房、房室结和左束支传导正常。在心肌特异性过表达 connexin45

转基因小鼠,心肌细胞间物质交换异常,易于发生心律失常。所有这些结果表明,connexin45 是心脏正常发育、冲动在早期心肌细胞协调传导所必需的,是调节早期心脏节律性收缩的重要成分,无论表达增加或减少都会诱发心律失常。因此,connexin45 基因是特发性心房纤颤的重要候选基因之一,相信不久就会有 connexin45 基因变异与人类心房纤颤的关系报道。

综上所述,心脏 connexin 基因在心脏发育和心脏电生理方面发挥着重要作用,心脏 connexin 基因变异可导致心房局部电活动的不平衡,增加动作电位在心房传布的各向异性以及传导速度的异质性等,从而有利于心房纤颤的发生和维持。因此理论上讲,心脏 connexin 基因很可能是比离子通道基因更重要的心房纤颤致病基因,心房纤颤可能主要是一种缝隙链接通道病。对心房纤颤患者的 connexin 基因进行研究不仅有助于明确心房纤颤的分子机制,也有助于心房纤颤患者的早期预防、预后评估和基因特异性治疗。

参考文献

- 1 Rackauskas M, Neverauskas V, Skeberdis VA. Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)*, 2010, 46(1): 1 - 12
- 2 Jansen JA, van Veen TA, de Bakker JM, *et al.* Cardiac connexins and impulse propagation. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(1): 76 - 82
- 3 Pfenniger A, Wohlwend A, Kwak BR. Mutations in connexin genes and disease. *Eur J Clin Invest*, 2011, 41(1): 103 - 116
- 4 Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J*, 2006, 394(Pt 3): 527 - 543
- 5 Dbouk HA, Mroue RM, El - Sabban ME, *et al.* Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal*, 2009, 7: 4
- 6 Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, *et al.* Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*, 2003, 83(4): 1359 - 1400
- 7 Gelb BD, Zhang J, Cotter PD, *et al.* Physical mapping of the human connexin 40 (GJA5), flavin - containing monooxygenase 5, and natriuretic peptide receptor a genes on 1q21. *Genomics*, 1997, 39(3): 409 - 411
- 8 Dupays L, Mazurais D, Rucker - Martin C, *et al.* Genomic organization and alternative transcripts of the human Connexin40 gene. *Gene*, 2003, 305(1): 79 - 90
- 9 Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, *et al.* A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin 40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res*, 2003, 92(1): 14 - 22
- 10 Firouzi M, Ramanna H, Kok B, *et al.* Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res*, 2004, 95(4): e29 - e33
- 11 Juang JM, Chern YR, Tsai CT, *et al.* The association of human connexin 40 genetic polymorphisms with atrial fibrillation. *Int J Cardiol*, 2007, 116(1): 107 - 112
- 12 Wirka RC, Gore S, Van Wagoner DR, *et al.* A common connexin - 40

- gene promoter variant affects connexin - 40 expression in human atria and is associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2011, 4(1): 87 - 93
- 13 Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, *et al.* Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N Engl J Med*, 2006, 354(25): 2677 - 2688
 - 14 Chaldoupi SM, Loh P, Hauer RNW, *et al.* The role of connexin40 in atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*, 2009, 84(1): 15 - 23
 - 15 Yang YQ, Zhang XL, Wang XH, *et al.* Connexin40 nonsense mutation in familial atrial fibrillation. *Int J Mol Med*, 2010, 26(4): 605 - 610
 - 16 Yang YQ, Liu X, Zhang XL, *et al.* Novel connexin40 missense muta-

- tions in patients with familial atrial fibrillation. *Europace*, 2010, 12(10): 1421 - 1427
- 17 Thibodeau IL, Xu J, Li Q, *et al.* Paradigm of genetic mosaicism and lone atrial fibrillation: physiological characterization of a connexin 43 - deletion mutant identified from atrial tissue. *Circulation*, 2010, 122(3): 236 - 244
 - 18 Tuomi JM, Tyml K, Jones DL. Atrial tachycardia/fibrillation in the connexin 43 G60S mutant (Oculodentodigital dysplasia) mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(4): H1402 - H1411

(收稿:2011-05-05)

(修回:2011-05-09)

苯并[*a*]芘致癌机制研究新进展

李永红 金银龙

苯并[*a*]芘(BaP)是多环芳烃类代表性的致癌物,广泛存在于人们的生活环境中,大量人群流行病学研究表明 BaP 与肺癌、膀胱癌、皮肤癌和乳腺癌等多种肿瘤的发生有关。目前认为其致癌性主要是通过其代谢终产物二氢二醇环氧苯并芘[benzo(*a*)pyrene - trans - 7,8 - dihydrodiol - 9,10 - epoxide, BPDE]的致癌活性得以体现。BPDE 可以与生物高分子共价结合形成加合物,从而引起生物高分子的结构和功能的改变,引发 DNA 损伤修复、细胞周期校正等信号转导通路的激活及相关靶基因的表达改变。而基因表达改变,特别是调控细胞周期的基因表达改变,在细胞癌变的进展中起重要作用。本文就 BaP 对除 Ras 和 p53 以外的近年研究比较热门的部分癌基因和抑癌基因的影响综述如下。

一、苯并[*a*]芘的终致癌代谢物

BaP 只有经代谢活化变成终致癌物才具有致癌活性。BaP 的代谢产物有多种,其中反式二氢二醇环氧苯并芘(anti - BPDE)的致癌毒性最强。BaP 进入人体后,经细胞微粒体中 I 相代谢酶 P450 的催化在 7,8 碳位上形成环氧化物,然后被微粒体环氧化物水解酶水解为二氢二醇,二氢二醇化合物在细胞色素 P450 催化下,进一步形成 BPDE。BPDE 分子结构有亲电性碳原子活性基团,可与核酸碱基和蛋白质氨基

酸的亲核基团共价结合形成加合物,构成癌变的物质基础^[1]。

二、苯并[*a*]芘对癌基因和抑癌基因的影响

1. 人上皮生长因子受体 - 2(HER2/neu): HER2/neu 基因属原癌基因,是 HER 家族中 4 大在结构上相关的受体之一,定位于染色体 17q12 - 21.32,编码一种跨膜酪氨酸激酶受体。HER2/neu 蛋白与 HER 家族其他成员及其配体之间相互作用,通过细胞间的信号传导调节细胞生长、生存、分化和增生。HER2/neu 蛋白在胚胎发育中广泛表达,在成年正常组织中表达很低,而在约 30% ~ 40% 的肺癌组织和 85% 的乳腺癌组织中有高表达^[2-5]。HER2/neu 介导的信号转导途径主要包括 CaMK/PKC 途径、Ras/MAPK 途径、PI₃K/Akt/GSK 途径和 STATs 途径,通过这些途径可以不同程度的影响其他一些肿瘤相关基因的表达,因此,HER2/neu 基因可能在肿瘤发生中扮演重要角色^[6]。HER2/neu 是当前肿瘤治疗的热点靶基因,被认为是上皮细胞起源的肿瘤治疗最有效靶点之一。

傅娟等^[7]在研究 BPDE 对人支气管上皮细胞(16HBE)HER2/neu 基因表达影响的研究中发现,经 BPDE 诱发恶性转化的 16HBE 细胞中 HER2/neu 基因 mRNA 和蛋白的表达水平显著高于对照组未恶性转化的细胞($P < 0.05$),可见原癌基因 HER2/neu 的异常表达可能是 BaP 致癌作用的重要分子机制之一。

2. 真核生物翻译延长因子 1 α (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha, eEF1 α): eEF1 α 有两种具有 98% 同源性的异构体 eEF1 α 1 和 eEF1 α 2,分别定位于 6q14 和 20q13。eEF1 α 1 在体内广泛表达,而 eEF1 α 2 的表达具有组织特异性。eEF1 α 将氨基酸 -

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAI19B01);国家环境与疾病监测点项目;美国 NIH Fogarty 项目(5D43 TW007864 - 09)

作者单位:100021 北京,中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所

通讯作者:金银龙,电子信箱:jinyinlong1951@yahoo.com.cn