

# 应力作用下骨细胞的缝隙连接通讯

叶 红综述 王 航审校

(四川大学华西口腔医院修复科 四川 成都 610041)

[摘要] 缝隙连接是细胞间直接进行物质交流的膜通道结构,其在骨组织中广泛存在。骨组织处于经常更新过程,并对机械应力发生反应,骨细胞感知机械应力后将信号传递给成骨细胞与破骨细胞,从而实现骨的改建或重建。缝隙连接在由力学信号转换为生物效应的过程中起着重要的作用。本文就缝隙连接的发现、结构特点、检测方法及骨细胞感知机械刺激后缝隙连接的改变和将力学信号通过缝隙连接传递给成骨细胞与破骨细胞的机制作一综述。

[关键词] 骨细胞; 成骨细胞; 破骨细胞; 缝隙连接

[中图分类号] R 782 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.05.023

**Gap junction intracellular communication of osteocyte under the mechanical stress** YE Hong, WANG Hang. (Dept. of Prosthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Gap junction is a kind of membrane channel. It is widely spreaded in the bone which is updated and responds to the mechanical strain. Osteocytes transmit the mechanical signals to osteoblast and osteoclast which realize bone remolded, after it sensing the signals. Gap junction plays a very important role in the process of converting mechanical signals into biological effects. This article reviewed the discovery and the testing methods of gap junction, structures and functions of it, the function of mechanism of how the mechanical signals turn into biological effects.

[Key words] osteocyte; osteoblast; osteoclast; gap junction

机械应力会导致骨组织的形成与重塑。骨细胞是骨组织中数量最多的细胞,且目前被认为是骨组织中主要的应力感受器。骨细胞在受到应力刺激后产生相应的生物信号通过细胞间联系来调节其他细胞(包括成骨细胞与破骨细胞)来实现骨组织的改建。细胞间联系方式有化学信号传递、突触传递,还有缝隙连接传递。其中,缝隙连接在由力学信号转换为生物效应的过程中起着重要的作用。

## 1 缝隙连接的发现和结构特点

缝隙连接是细胞间直接进行物质交流的膜通道结构。1958 年第 1 次发现该结构,后来有大量的相关研究。1967 年,学者们在心肌和肝细胞上观察到有 6 个对称亚单位构成的细胞间连接,命名为缝隙连接。缝隙连接是由 1 种横跨脂质双膜的蛋白质构成,这些蛋白质构成接合子(conne-

xon, CX), 一端嵌入单位膜内,另一端露在外面,与对侧单位膜伸出来的接合子在接头间隙中间相对接合,中央有一直径约 1.5~2 nm 的亲水孔道,沟通两个相邻细胞的细胞质。CX 具有 4 次跨膜的肽链,水、离子、糖类、第二信使、激素能透过,蛋白质、RNA、多糖等大分子物质不能透过。哪种物质能通过取决于连接蛋白的种类,后者决定通道的直径与选择性允许不同大小的物质通过,比如 CX43 允许较大的相对分子质量的分子通过,特别是带负电荷的;带正电荷相对分子质量小于 300 的分子易于通过 CX45。不同的连接蛋白在同一条件下会有不同的表现,体外成骨细胞的分化过程中 CX43 的表达有变化,但 CX45 没有发生任何改变。脊椎动物中已发现有 20 多种缝隙连接蛋白,其中 CX40<sup>[1]</sup>、CX43、CX45 与 CX46 存在于骨组织。CX43 是最主要的连接蛋白,基因定位于 6 号染色体<sup>[2]</sup>。

## 2 检测缝隙连接及其蛋白的方法

用透射电子显微镜可观察缝隙连接的各种形

[收稿日期] 2009-11-16; [修回日期] 2010-01-27

[作者简介] 叶 红(1983—),女,四川人,硕士

[通讯作者] 王 航, Tel: 15982183475

态；荧光显微镜下观察荧光染料向邻近细胞移动情况从而检测细胞间有无连接通讯功能<sup>[3]</sup>。将 CX 与荧光蛋白融合后的融合子转染到细胞中在荧光显微镜下观察，可观察其在细胞中的定位及动态变化<sup>[4]</sup>；用荧光染料 6-羧基荧光素乙酸乙酯盐对细胞进行染色，在激光扫描共聚焦显微镜下可以了解缝隙连接通讯功能的改变<sup>[5]</sup>。

以上方法都在蛋白的水平直接研究缝隙连接。蛋白的产生过程为基因→转录→翻译→蛋白。因此还可以从遗传物质这方面研究：多聚酶链式反应技术是在体外经酶促反应将某一特定的 DNA 序列进行高效快速的扩增到常规方法不可检测到的水平但其不能进行组织学定位；原位聚合酶链反应则可以避免这个缺点；Northern 杂交技术应用用于特定性状基因在 mRNA 水平上的动态表达，研究实验流程：RNA 混合物进行琼脂糖凝胶电泳→分离得到的 RNA 转膜→与放射性标记的探针杂交→结果分析。

### 3 应力作用骨细胞的细胞缝隙连接通讯

#### 3.1 缝隙连接在骨组织中广泛存在

缝隙连接广泛存在于骨细胞、成骨细胞与骨细胞间，尤其在骨细胞突起的末梢之间。Gu 等<sup>[6]</sup>用老鼠长骨碎片培养并分离骨细胞，用荧光显微镜法发现成骨细胞与骨细胞在 24 h 内建立缝隙连接，庚烷(缝隙连接阻滞剂)作用于细胞一段时间后荧光黄未在细胞间流动，洗脱后荧光黄流动于这些细胞间。根据现有的大量实验模型可以推测，每种特异的细胞会表达不同的连接通道，这些各异的连接蛋白允许不同信号在细胞间传播，并不是所有在通信网络中的细胞都会参与每个信号的传播，信号通过连接蛋白通道在细胞间分配，因此一些细胞的一些特定功能会受限。

#### 3.2 应力作用下缝隙连接的变化

在机械应力作用下骨组织会改建，其中含量最丰富的骨细胞被认为是应力感受器，它对骨的改建起着重要的作用<sup>[7]</sup>。骨组织细胞可能接受 3 种力学刺激，即压力、张力和流体剪切力。实验表明，流体剪切力是最有效的 1 种力学刺激，骨细胞处于骨陷窝小管系统中。对骨组织施加弯曲载荷后骨基质的形变量很小，但液体会从压缩侧流向拉伸侧，既而产生流体剪切力，这可能是骨细胞感受应力的来源。目前的大量实验就是建立在该基础上对骨细胞施加流体剪切力，关于骨细

胞受压力与张力的研究相对较少。MLO-Y4 骨样细胞在受到剪切力后，连接蛋白会发生重新排列，且应力大小的不同会带来不同的改变，通过免疫荧光显微镜法观察到未受力组中 CX43 一直集中在细胞突区域与细胞核的周围，而与之相对的区域细胞突有少量 CX45。骨细胞受力时细胞的外形有了明显的变化，胞突直径变小而数目增多，胞体变得小且圆，受到较小的力时胞突处的 CX43 就会轻微的减少，但在胞核周围的 CX43 增多；在胞核周围的 CX45 有明显的增加<sup>[8]</sup>。在对鼠下牙牵拉的过程中发现，受张力骨组织的骨细胞与受压力区域的骨细胞相比，前者表达 CX43 较多<sup>[9]</sup>，这个实验类似正畸过程。正畸中为改变牙齿原排列就对不同的牙施加不同的力，在这个过程中牙槽骨受到压力的一侧表现为吸收，受到张力的一侧牙槽骨则矿化增生，这提示连接蛋白与骨矿化存在可能的联系。实验显示，连接蛋白的表达与功能对于骨的正常形成与矿化是十分重要的<sup>[10]</sup>。在胚胎发育研究过程中发现缝隙连接起着重要的作用<sup>[11]</sup>，如果抑制缝隙连接通讯就会影响成骨细胞的分化，骨的矿化是在骨细胞的不断分化过程中进行的，那么最终影响胞外基质的矿化。连接蛋白是如何影响骨组织的形成与矿化的？如果能够彻底的弄清楚这个问题并将其应用于临床，可能会对常见的疾病如骨质疏松症有所帮助。

#### 3.3 应力作用下影响细胞缝隙连接通讯的机制

绝大部分连接蛋白的改变是受磷酸化调节，蛋白质磷酸化及脱磷酸化是细胞信号传递的主要方式。胞外信息分子如激素、神经递质与膜受体酪氨酸蛋白激酶激活调节膜磷脂，特别是肌醇磷脂代谢促进第二信使的产生分别激活或抑制丝氨酸蛋白激酶如 A 激酶、C 激酶、B 激酶等。活化的两类激酶分别催化细胞内多种功能蛋白如受体、蛋白激酶等磷酸化。丝氨酸残基磷酸化影响连接蛋白的合成、降解与功能，最终可能影响细胞缝隙连接通讯。机械应力作用于骨细胞丝氨酸残基磷酸化的 CX43 明显增加，并且激活细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)1/2 通路<sup>[12]</sup>。该信号通路是丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated prokinase, MAPK)通路中的 1 个支路。MAPK 属丝氨酸/苏氨酸激酶，它分布于胞浆中具有丝氨酸和酪氨酸双重磷酸化的能力。该信号转导通路基本过程为力刺激→骨细胞释放相应的信号分子(配体)→缝隙连接→受体→

鸟核苷酸交换因子趋化→三磷酸鸟苷与二磷酸鸟苷交换→激活 MAPK 通路→MAPK 转入核内→核内变化→效应事件<sup>[13]</sup>。在真核细胞中有几条 MAPK 信号转导通路：ERK1/2、P38、ERK5 通路和 P42/P44 等。ERK1/2 是 ERK 的上游激酶，ERK 一旦激活，可磷酸化不同的靶蛋白。在整个过程中缝隙连接就将细胞外的信号转换到细胞质内而 MAPK 就将细胞质内的信号转换到细胞核内。这些 MAPK 信号通路是如何相互影响的，激活它们有什么区别与联系需要进一步研究。Cherian 等<sup>[14]</sup>将流体剪切力作用于 MLO-Y4 后发现，前列腺素 E2 大量释放。前列腺素是 1 种自分泌因子，在各种动物实验中发现，加入前列腺素后骨组织量会增加，因而通常认为它是骨同化激素。但有实验发现，该激素促进破骨细胞进行骨吸收。前列腺素 E2 仅与其受体特异性结合后激活下游的环腺苷酸-激肽原酶，该细胞内信号途径使 CX43 的表达增加。前列腺素有 4 种常见的受体，它们都是 G 蛋白偶联受体，会分别激活不同的下游信号通路。由此可猜测，前列腺素在不同的实验中有不同的行为可能与激活哪个亚型的受体或者激活的哪种亚型受体在相应的环境中更占优势有关。

成骨有 2 种方式，即软骨内成骨和膜内成骨。前者是体内骨形成的主要方式。成骨细胞通过合成与沉积胞外复合基质，这些胞外基质主要包括 I 型胶原蛋白和非胶原蛋白如骨桥蛋白、骨涎蛋白、降钙素等。在胞外基质矿化的过程中一些成骨细胞就会被包埋于其中最后成为骨细胞<sup>[15]</sup>。骨细胞的细胞突起在骨小管内延伸并与骨组织表面的细胞相联系形成缝隙连接。骨细胞与相距甚远的骨组织表面的细胞就通过缝隙连接进行高效的信号传递。骨细胞在感知到应力后突起伸长并释放一些可溶性因子如  $\text{Ca}^{2+}$ 、前列腺素 E2 等来调节成骨细胞的行为从而实现骨的改建<sup>[16-17]</sup>。通过骨细胞与成骨细胞的共同培养提示，骨细胞通过缝隙连接把应力信号传递给成骨细胞，并且有实验表明，MLO-Y4 骨样细胞通过缝隙连接依靠 ERK1/2 将感受到的应力信号传递给成骨细胞<sup>[18]</sup>。

目前，对骨细胞与破骨细胞间相互关系的研究较少。破骨细胞来源于骨髓基质，由单核样前体细胞融合而来的多核细胞，具有特殊的吸收功能，在吸收骨基质的有机物和矿物质的过程后造成基质表面不规则，形成近似细胞形状的陷窝<sup>[19]</sup>。破骨细胞能表达 CX43，缝隙连接在破骨细胞形

成与行使其功能上起着复杂的作用，用 CX43 的特异阻滞剂处理后，破骨样细胞的数量就会明显减少，未融合的细胞增多，融合的细胞减少，破骨细胞的骨吸收能力明显降低。骨细胞可能是通过一些可溶性因子来控制破骨细胞的活动<sup>[20]</sup>。

#### 4 结束语

随着研究的不断深入，对骨细胞在应力下缝隙连接的适应性改变已有初步了解，但具体机制并不很清楚。骨细胞将力学信号传递给成骨细胞后对骨的重建有重要作用。骨细胞与破骨细胞间的通讯中缝隙连接的作用如何。缝隙连接与其他的信号通道如敏感离子、通道整合素-细胞骨架复合体等的交互关系的报道较少。目前很多的实验都是在体外进行的，这些实验结果和体内的情况是否一致？骨的形成、重建与骨细胞、破骨细胞有着密切的联系，这 2 种细胞又通过缝隙连接与骨组织中广泛存在的骨细胞进行通讯，在接受应力刺激后骨细胞是如何协调这两者的，目前还不是很清楚。这些需要更进一步研究，弄清楚这些问题对骨重建与修复有重要的意义。

#### 5 参考文献

- [1] Pizard A, Burgon PG, Paul DL, et al. Connexin 40, a target of transcription factor Tbx5, patterns wrist, digits, and sternum[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(12): 5073-5083.
- [2] Vitiello C, D'Adamo P, Gentile F, et al. A novel GJA1 mutation causes oculodentodigital dysplasia without syndactyly[J]. *Am J Med Genet*, 2005, 133A(1): 58-60.
- [3] Mackms SC. Limitations of the scrape-loading/dye transfer technique to quantify inhibition of gap junctional intercellular communication[J]. *Cell Biol Toxicol*, 1992, 8(1): 89-103.
- [4] Martin PE, Blundell G, Ahmad S, et al. Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels[J]. *Cell Sci*, 2001, 114(21): 3845-3855.
- [5] Carruba G, Webber MM, Bello-Deocampo D, et al. Laser scanning analysis of cell-cell communication in cultured human prostate tumor cell[J]. *Anal Quart Cytol Histol*, 1999, 21(1): 54-58.
- [6] Gu G, Nars M, Hentunen TA, et al. Isolated primary osteocytes express functional gap junctions *in vitro*[J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 323(2): 263-271.
- [7] Hedgecock NL, Hadi T, Chen AA, et al. Quantitative regional associations between remodeling, modeling, and osteocyte apoptosis and density in rabbit tibial midshafts [J]. *Bone*, 2007, 40(3): 627-637.

- [8] Thi MM, Kojima T, Cowin SC, et al. Fluid shear stress remodels expression and function of junctional proteins in cultured bone cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 284(2) :C389–C403.
- [9] Su M, Borke JL, Donahue HJ, et al. Expression of connexin 43 in rat mandibular bone and PDL cells during experimental tooth movement[J]. *J Dent Res*, 1997, 76(7) :1357–1366.
- [10] Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, et al. Connexin 43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction[J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(4) :931–944.
- [11] Franchesca D. Role of gap junctions during early embryo development[J]. *Reproduction*, 2005, 129(2) :129–135.
- [12] Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, et al. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(8) :7317–7325.
- [13] Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone[J]. *Gene*, 2006, 367 :1–16.
- [14] Cherian PP, Cheng B, Gu S, et al. Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(44) :43146–43156.
- [15] Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 473(2) :201–209.
- [16] Zayzafoon M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(1) :56–70.
- [17] Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, et al. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes : A novel mechanism for the release of prostaglandin[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 6(7) :3100–3106.
- [18] Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, et al. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(1) :C545–C552.
- [19] Nielsen RH, Karsdal MA, Sorensen MG, et al. Dissolution of the inorganic phase of bone leading to release of calcium regulates osteoclast survival[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(4) :834–839.
- [20] Tan SD, de Vries TJ, Kuijpers-Jagtman AM, et al. Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption[J]. *Bone*, 2007, 41(5) :745–751.

(本文编辑 李 彩)

(上接第575页)

- line update for perioperative cardiovascular evaluation for noncardiac surgery—executive summary a report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines (committee to update the 1996 guidelines on perioperative cardiovascular evaluation for noncardiac surgery)[J]. *Circulation*, 2002, 105(10):1257–1267.
- [8] 张国英, 李晓玉, 邓 薇. 糖尿病患者术前血糖控制水平的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2000, 8(6) :372.
- [9] Burnier M, Zanchi A. Blockade of the rennin-angiotensin-aldosterone system :A key therapeutic strategy to reduce renal and cardiovascular events in patients with diabetes [J]. *J Hypertens*, 2006, 24(1) :11–25.
- [10] Schmeltz LR, DeSantis AJ, Thiagarajan V, et al. Reduction of surgical mortality and morbidity in diabetic patients undergoing cardiac surgery with a combined intravenous and subcutaneous insulin glucose management strategy[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(4) :823–828.
- [11] 李伟忠, 李晨钟, 卢志云. 老年口腔肿瘤合并糖尿病患者的围手术期处理[J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2008, 6(3) :146–148.
- [12] Vanhorebeek I, Langouche L, Van den Berghe G. Tight blood glucose control with insulin in the ICU :Facts and controversies[J]. *Chest*, 2007, 132(1) :268–278.
- [13] Wilson M, Weinreb J, Hoo GW. Intensive insulin therapy in critical care :A review of a 12 protocols[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(4) :1005–1011.
- [14] Hoogwerf BJ. Perioperative management of diabetes mellitus :How should we act on the limited evidence[J]. *Cleve Clin J Med*, 2006, 73(Suppl 1) :S95–S99.
- [15] Lugli AK, Wykes L, Carli F. Strategies for perioperative nutrition support in obese, diabetic and geriatric patients [J]. *Clin Nutr*, 2008, 27(1) :16–24.
- [16] Ghezzi EM, Chávez EM, Ship JA. General anesthesia protocol for the dental patient :Emphasis for older adults [J]. *Spec Care Dentist*, 2000, 20(3) :81–92.
- [17] 史春霞, 李立环. 高龄心血管手术病人围术期的麻醉处理[J]. *中华麻醉学杂志*, 2005, 25(10) :789–791.

(本文编辑 李 彩)