

论著·实验研究

## 蟾蜍灵通过调节细胞间隙连接通讯抑制 PDGF-BB 诱导的系膜细胞增殖

韩瑛 张爱青 张俊 龚晶 李善文 甘卫华

(南京医科大学第二附属医院儿童医学中心儿肾科,江苏 南京 210003)

**[摘要]** 目的 探讨细胞间隙连接通讯(GJIC)在蟾蜍灵抑制肾小球系膜细胞(MC)增殖中的作用及可能的机制。方法 以体外培养的系膜细胞为研究对象,血小板衍生生长因子(PDGF-BB)诱导系膜细胞增殖,蟾蜍灵干预。MTT法测定细胞增殖, Lucifer Yellow 划痕标记染料示踪技术(SLDT)观察 GJIC 的改变, RT-PCR 法测定间隙连接蛋白(Cx) 43、45、40 基因在转录水平的改变情况,激光共聚焦显微术结合 Fura-3 染色法测定细胞内游离钙离子( $[Ca^{2+}]_i$ )浓度。结果 MTT 结果显示蟾蜍灵能够抑制 PDGF-BB 引起的系膜细胞增殖( $P < 0.01$ )。与正常组相比, PDGF-BB 刺激组 GJIC 受到抑制, Cx45 和 Cx40 mRNA 显著上调( $P < 0.01$ ),而 Cx43 mRNA 无明显变化( $P > 0.05$ ),同时伴有细胞  $[Ca^{2+}]_i$  浓度升高( $P < 0.01$ );蟾蜍灵干预则可改善 PDGF-BB 引起的 GJIC 的抑制,下调 PDGF-BB 引起的 Cx45 和 Cx40 mRNA 的表达( $P < 0.01$ ),同时降低细胞  $[Ca^{2+}]_i$  浓度( $P < 0.01$ )。结论 蟾蜍灵可能通过从转录水平调节系膜细胞 Cx45 和 Cx40 的表达,降低细胞  $[Ca^{2+}]_i$  浓度,改善 GJIC 从而抑制系膜细胞增殖。 [中国当代儿科杂志,2012,14(12):982-987]

**[关键词]** 间隙连接;蟾蜍灵;细胞交流;PDGF-BB;系膜细胞

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)12-0982-06

## Buflin inhibits PDGF-BB-induced mesangial cell proliferation via mediating gap junctional intercellular communication

HAN Ying, ZHANG Ai-Qing, ZHANG Jun, GONG Jing, LI Shan-Wen, GAN Wei-Hua. Medical Center of Pediatrics, Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003, China ( Gan W-H, Email: weihuagan@njmu.com)

**Abstract: Objective** To study the role and possible mechanisms of gap junctional intercellular communication (GJIC) involved in mesangial cell (MC) proliferation which could be inhibited by buflin. **Methods** Rat mesangial cells were cultured *in vitro*. The effect of buflin on platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)-induced MC proliferation was evaluated by MTT assay. The function of GJIC was detected by Lucifer Yellow scrape loading and dye transfer (SLDT). mRNA levels of Cx43, Cx45 and Cx40 were measured by RT-PCR. Intracellular calcium concentrations ( $[Ca^{2+}]_i$ ) were examined in laser scanning confocal microscopy after loading by Fura-3/AM. **Results** MTT indicated that buflin could inhibited PDGF-BB-induced MC proliferation ( $P < 0.01$ ). Compared with the hormonal control group, PDGF-BB inhibited GJIC function, increased the expression of Cx45 and Cx40 ( $P < 0.01$ ) without altering the Cx43 ( $P > 0.05$ ) in gene level and also increased  $[Ca^{2+}]_i$ . However, buflin treatment enhanced GJIC function, decreased Cx45 mRNA and Cx40 mRNA expression ( $P < 0.01$ ), and reduced  $[Ca^{2+}]_i$  ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Buflin inhibits PDGF-BB-induced MC proliferation, and its possible mechanisms may be related to regulation of Cx45 and Cx40 expression in the gene level, reduction of  $[Ca^{2+}]_i$  and enhancement of GJIC function. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(12):982-987]

**Key words:** Gap Junction; Buflin; Cell communication; PDGF-BB; Mesangial cell

随着当今生命科学研究的不断发展,间隙连接(gap junction)成为了新的研究热点。间隙连接,也称缝隙连接,是细胞之间的一种连接形式,由位于相邻质膜上的连接蛋白(connexin, Cx)构成。间隙连

接为细胞间通讯提供了直接而非特异性的信号传递通道,由这种通道进行信息和物质交换的方式称为间隙连接细胞间通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)。近年来研究发现, GJIC 在胚

[收稿日期]2012-07-05; [修回日期]2012-08-08

[基金项目]南京医科大学科技发展基金重点项目(2011NJMU251);南京市医学科技发展项目(QYK11226)。

[作者简介]韩瑛,女,硕士研究生。

[通信作者]甘卫华,主任医师。

胎发育、组织修复、维持内环境稳态以及控制细胞生长、分化等方面起着重要作用<sup>[1]</sup>,而且血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)在众多细胞系中被认为是 GJIC 的抑制剂<sup>[2-4]</sup>。本课题组前期研究发现,中药蟾酥的主要活性成分-蟾蜍灵(bufoalin)可以呈剂量依赖性抑制 PDGF-BB 诱导的系膜细胞增殖<sup>[5]</sup>。那么蟾蜍灵是否是通过改善 GJIC 从而发挥对 PDGF-BB 诱导的系膜细胞增殖的抑制作用以及蟾蜍灵改善 GJIC 的具体机制又如何?由此,本研究拟观察蟾蜍灵对 PDGF-BB 诱导的大鼠系膜细胞间隙连接蛋白 Cx43、Cx45、Cx40 基因表达,细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度以及 GJIC 的影响,探讨 GJIC 在蟾蜍灵抑制 PDGF-BB 诱导的系膜细胞增殖中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大鼠系膜细胞株 HYZB-1(中国典型培养物保藏中心);蟾蜍灵、PDGF、Lucifer Yellow、Fura-3/AM(sigma,美国);胎牛血清(hyclone,美国);低糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶(Gibco,美国);Trizol Reagent(Invitrogen,美国);逆转录试剂盒(Fermentas,立陶宛);DNA Maker(TaKaRa,日本);激光扫描共聚焦显微镜(LSM710,德国);荧光显微镜(Olympus,日本);梯度 PCR 仪(Eppendorf,德国)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 系膜细胞常规培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,当系膜细胞长至贴壁 80%~90% 时,25 mg/L 胰蛋白酶消化细胞、传代,选用第 3~8 代对数生长期细胞进行实验。将细胞分为正常组、PDGF 组(20 ng/mL PDGF-BB)、PDGF + 蟾蜍灵组(20 ng/mL PDGF-BB 刺激 12 h 后加入 0.08 μmol/L 的蟾蜍灵继续共同作用 24 h)和蟾蜍灵组(0.08 μmol/L 蟾蜍灵)。

1.2.2 MTT 法测定系膜细胞增殖 取生长良好的系膜细胞接种于 96 孔板(6 × 10<sup>3</sup> 个/孔),各孔总体积 200 μL,每组设 8 个复孔。用含 0.05% 胎牛血清的培养基同步化 24 h 进入休止期后,向各组加入相应试剂作用总计 36 h 后,加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL/孔,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养 4 h,弃去培养上清液,每孔加入 150 μL 二甲亚砜(DMSO),震荡约 10 min 使结晶完全溶解,在 492 nm 波长下应用 DG-5032 型酶联免疫检测仪检测各孔的吸光度值。

1.2.3 Lucifer Yellow 划痕标记染料示踪技术检测 GJIC 根据 el-Fouly 等<sup>[6]</sup>的方法并加以改进,将 4 × 10<sup>5</sup> 个/孔新鲜细胞接种在直径 35 mm 的塑料小平皿内,各组分别于蟾蜍灵刺激 24 h 后收集细胞,倒去培养基,用含钙镁的磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗 3 次,将细胞浸在含 0.05% 的荧光黄(lucifer yellow, LY)中,用刀片在细胞表面轻轻划痕 3 条,染料标记 3 min,吸除荧光染液,用 PBS 洗 3 次除净游离的剩余染料,立即于荧光显微镜下观察荧光黄的扩散速度及据划痕的距离,照相。每组重复 3 次独立实验。

1.2.4 细胞总 RNA 的提取 在六孔板中接种 4 × 10<sup>5</sup> 个/孔的细胞悬液,培养至 70%~80% 融合时用含 0.05% 胎牛血清的培养基同步化 24 h 进入休止期后,各组分别于蟾蜍灵作用 24 h 后收集细胞,用 PBS 缓冲液洗涤各组细胞 3 次,每孔中加入 1 mL Trizol RNA 提取液,按说明书步骤,提取细胞总 RNA,用紫外分光光度仪测定 260 nm、280 nm 的吸光度值,重复 3 次,计算 A260/A280 比值,根据 A260 值计算 RNA 浓度,将 RNA 逆转录为 cDNA 后加入引物扩增特异性片段。

1.2.5 引物设计及 RT-PCR 检测 Cx43 mRNA、Cx45 mRNA、Cx40 mRNA 表达 引物序列由美国 Invitrogen 上海分公司合成(表 1)。管家基因 GAPDH、CX43 两者反应条件均为:95℃ 预变性 1 min;95℃ 变性 30 s,57.5℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环;72℃ 终末延伸 7 min 结束反应。CX45 反应条件:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72℃ 终末延伸 5 min 结束反应。CX40 反应条件:95℃ 预变性 1 min;95℃ 变性 30 s,63.5℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 34 个循环;72℃ 终末延伸 7 min 结束反应。PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳、凝胶图像扫描系统成像并进行灰度扫描,以密度代表其表达量,用 GAPDH 的表达量校正,将两者吸光度的相对量进行分析,重复 3 次独立的半定量全过程。

1.2.6 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度测定 按 4 × 10<sup>5</sup> 个细胞密度传代至底部为玻璃材质的 6 孔板,各组分别于蟾蜍灵作用 24 h 后收集细胞,加入浓度为 5 μM Fura-3/AM 于 37℃ 培养箱中孵育 30 min,然后用 Buffer 充分洗涤未负载的 Fura-3/AM,立即于激光扫描共聚焦显微镜观察,设置激发波长为 488 nm,发射波长 525 nm。从与激光扫描共聚焦显微镜相连的电脑中直接获取荧光灰度值进行分析。重复 3 次独立实验。

表1 引物序列及目的片段长度

mRNA	引物序列	产物大小(bp)
GAPDH	上游 5'-CAAGTCAACGGCACAGTCAA-3'	149
	下游 5'-TGGTGAAGACGCCAGTACTC-3'	
CX43	上游 5'-TCTGCCTTTTCGCTGTAACACT-3'	117
	下游 5'-GGGCACAGACAGCAATATGAT-3'	
CX45	上游 5'-CTTTGCCCCGCTCTCCCACG-3'	308
	下游 5'-TGGGGGAGGGCGGAAGATGG-3'	
CX40	上游 5'-CTGGCCAACTCAGGCCAGGG-3'	824
	下游 5'-GGAGTCCCGATGGTCTACTGTT-3'	

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用  $q$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PDGF-BB 和蟾蜍灵对系膜细胞增殖的影响

与正常组相比, PDGF 组系膜细胞增殖明显, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 在 PDGF-BB 刺激 12 h 后加入  $0.08 \mu\text{mol/L}$  的蟾蜍灵继续共同作用 24 h 发现蟾蜍灵能够有效抑制 PDGF-BB 诱导的系膜增殖, 与 PDGF 比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 但细胞增殖程度仍高于正常组 ( $P < 0.01$ ); 此外, 蟾蜍灵组系膜细胞增殖低于 PDGF 组及 PDGF + 蟾蜍灵组, 差异均具有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ), 与正常组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表2 蟾蜍灵对 PDGF-BB 诱导的系膜增殖的作用

( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	OD 值
正常组	0.6802 ± 0.0212
PDGF 组	0.7267 ± 0.0115 <sup>a</sup>
PDGF + 蟾蜍灵组	0.6933 ± 0.0057 <sup>a,b</sup>
蟾蜍灵组	0.6798 ± 0.0100 <sup>b,c</sup>
$F$ 值	8.140
$P$ 值	< 0.01

a: 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 PDGF 组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与 PDGF + 蟾蜍灵组比较,  $P < 0.01$

### 2.2 蟾蜍灵对 PDGF-BB 诱导的系膜细胞 GJIC 改变的影响

荧光黄浓度沿划痕由近及远逐渐降低, 未划痕区细胞无荧光标记现象。判定 GJIC 是以荧光黄距划痕线的平均垂直距离 (处理组/正常组的百分率) 来计算。正常组系膜细胞间荧光染料迅速在细胞间传递, 且传输距离较远; PDGF 组系膜细胞间荧光传输速度减慢且局限, 与正常组形成鲜明对比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 而 PDGF + 蟾蜍灵组细胞间传输距离较 PDGF 组明显恢复, 但尚未恢复到正常组水平, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ); 蟾蜍灵组与正常组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而与 PDGF + 蟾蜍灵组相比, 荧光传输能力增强, 与 PDGF 组相比, 荧光传输能力明显增强, 差异均具有统计学意义 (分别  $P < 0.05$  和  $0.01$ )。见图 1。

### 2.3 蟾蜍灵对 PDGF-BB 诱导的系膜细胞 Cx43、Cx45、Cx40 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示正常系膜细胞表达 Cx43、Cx45、Cx40 mRNA, PDGF 组, Cx45、Cx40 mRNA 相对表达量较正常组显著提高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 用 PDGF-BB 刺激后加入蟾蜍灵干预, Cx45、Cx40 mRNA 的相对表达量与 PDGF 组比较明显减少, 但仍高于正常组, 差异均有统计学意义 (分别  $P < 0.01$  和  $0.05$ ); 蟾蜍灵组 Cx45、Cx40 mRNA 的相对表达量与正常组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而与 PDGF 组及 PDGF + 蟾蜍灵组相比, 差异均有统计学意义 (分别  $P < 0.01$  和  $0.05$ )。CX43 mRNA 相对表达量在各组之间比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

### 2.4 蟾蜍灵对 PDGF-BB 诱导的系膜细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的影响

正常系膜细胞  $Ca^{2+}$  负载, 胞内充满弥散分布的荧光物质; PDGF 组  $Ca^{2+}$  荧光强度 ( $56.8 \pm 1.4$ ) 较正常组 ( $27.3 \pm 0.6$ ) 明显增强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 而 PDGF-BB 刺激后加入蟾蜍灵干预,  $Ca^{2+}$  荧光强度 ( $42.1 \pm 1.5$ ) 较 PDGF 组明显减弱, 但仍高于正常组, 差异均具有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ); 蟾蜍灵组  $Ca^{2+}$  荧光强度 ( $27.9 \pm 2.1$ ) 低于 PDGF 组及 PDGF + 蟾蜍灵组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 但与正常组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3。

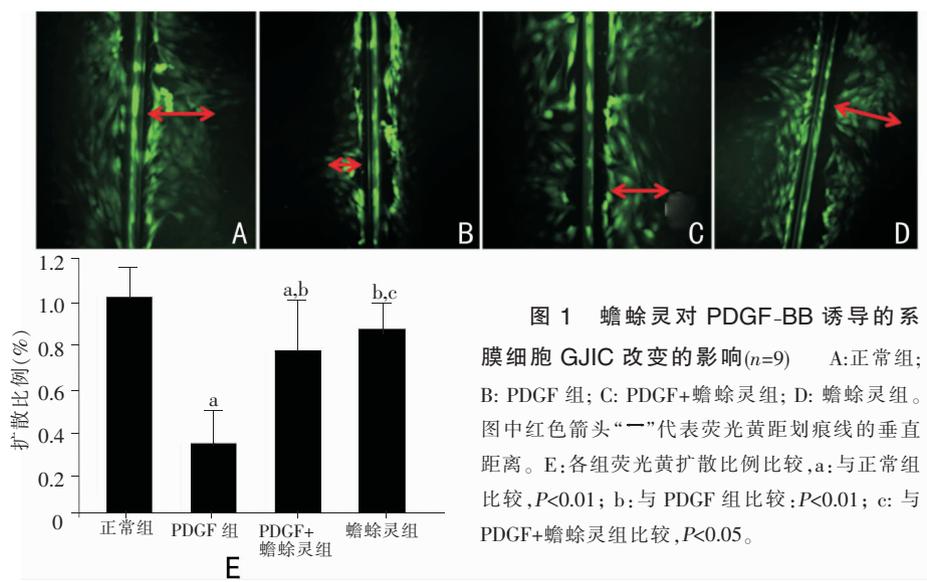


图1 蟾蜍灵对PDGF-BB诱导的系膜细胞GJIC改变的影响(n=9) A:正常组; B: PDGF组; C: PDGF+蟾蜍灵组; D: 蟾蜍灵组。图中红色箭头“—”代表荧光黄距划痕线的垂直距离。E: 各组荧光黄扩散比例比较, a: 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与PDGF组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与PDGF+蟾蜍灵组比较,  $P < 0.05$ 。

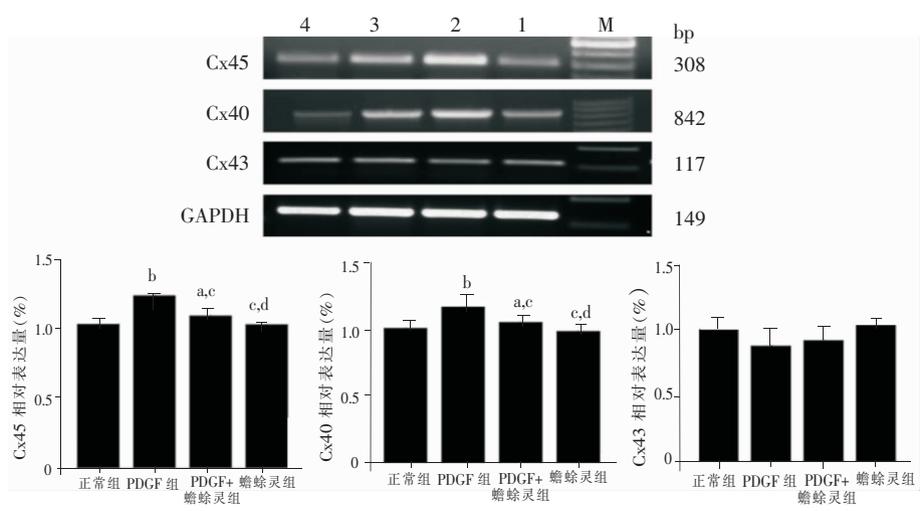


图2 蟾蜍灵对PDGF-BB诱导的系膜细胞Cx43、Cx45、Cx40 mRNA表达的影响(n=3) 上图为电泳图, M: Marker; 1: 正常组; 2: PDGF组; 3: PDGF+蟾蜍灵组; 4: 蟾蜍灵组。下图为各组Cx45、Cx40及Cx43 mRNA表达水平的比较, a: 与正常组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与PDGF组比较,  $P < 0.01$ ; d: 与PDGF+蟾蜍灵组比较,  $P < 0.05$ 。

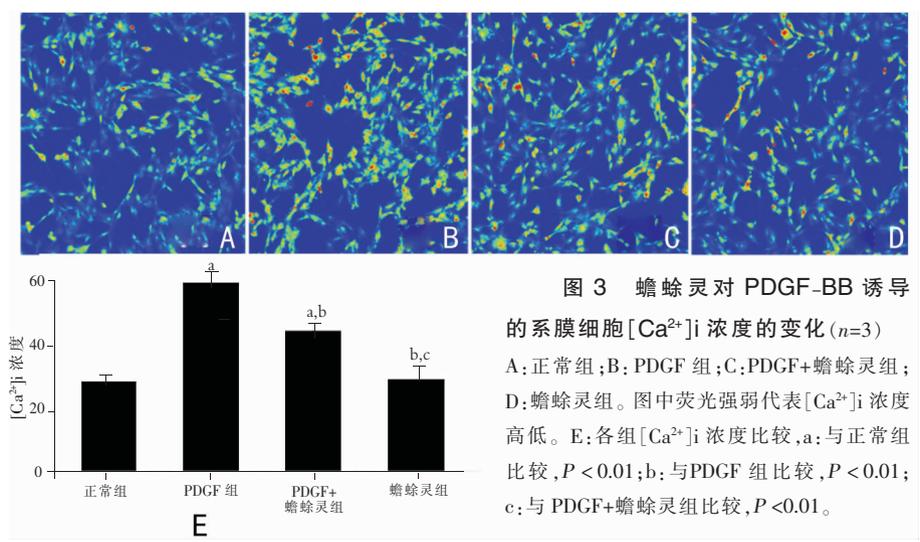


图3 蟾蜍灵对PDGF-BB诱导的系膜细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>浓度的变化(n=3) A: 正常组; B: PDGF组; C: PDGF+蟾蜍灵组; D: 蟾蜍灵组。图中荧光强弱代表[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>浓度高低。E: 各组[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>浓度比较, a: 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与PDGF组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与PDGF+蟾蜍灵组比较,  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

蟾蜍灵来源于中华大蟾蜍和黑框蟾蜍耳后腺及皮肤腺分泌的浆液,分子式为 $C_{24}H_{34}O_4$ ,具有多种生物活性,如强心、调节血压<sup>[7]</sup>、免疫<sup>[8]</sup>以及对子宫内肿瘤<sup>[9]</sup>、膀胱癌<sup>[10]</sup>等的抗肿瘤作用。近来研究发现,蟾蜍灵对人类黑色素瘤也有一定治疗疗效<sup>[11]</sup>,同时对大鼠离体肾脏具有直接的利尿、利钠、利钾作用<sup>[12]</sup>,也可以保护肾小球足细胞的损伤从而减轻阿霉素肾损害大鼠模型的蛋白尿<sup>[13]</sup>。本课题组前期研究发现,蟾蜍灵能够通过减少系膜细胞外基质分泌、聚积<sup>[14-15]</sup>,调节细胞周期相关蛋白的表达和活性<sup>[5]</sup>,实现对系膜细胞增殖的抑制作用。尽管如此,目前关于蟾蜍灵抑制系膜细胞增殖的机制尚没有明确定论。

通常认为,细胞增殖的调控是在外来信号刺激下引起细胞内外离子及小分子物质流动而实现的,这一过程需要细胞间隙连接通道进行精密调控。细胞间隙连接是由两个相邻细胞膜上的两个连接子组装而成的膜通道,允许分子质量1000~1600 Da的物质通过,如无机盐离子、第二信使 $Ca^{2+}$ 、cAMP、1,4,5-三磷酸肌醇、维生素、激素等,进行着信息和能量交流,从而实现GJIC。在人类组织中至少存在20种间隙连接蛋白分子,它们的表达既具有一定的组织特异性,又呈现交叉现象,其中Cx43是构成间隙连接中分布最广、研究最多的间隙连接分子。本研究发现正常系膜细胞表达Cx43、Cx45、Cx40,与文献报道一致<sup>[16]</sup>,且蟾蜍灵能够在转录水平降低PDGF-BB诱导后的Cx45、Cx40 mRNA的表达上调,提示蟾蜍灵可能通过在转录水平影响Cx45、Cx40基因的表达而改善GJIC;Cx43 mRNA表达无明显统计学意义,提示Cx43可能通过转录水平以外的其他途径参与了GJIC的功能调节,其具体调节途径和方式还待进一步研究。GJIC的调节可以发生在转录水平,也可能是翻译、翻译后蛋白修饰水平,同时又受到膜电位、细胞内 $H^+$ 、第二信使、氧自由基、蛋白激酶等多种因素的影响。Squecco等<sup>[17]</sup>、Solan等<sup>[18]</sup>证实,在许多细胞类型中,蛋白激酶C(PKC)通过增强Cx43蛋白特定位点的磷酸化抑制GJIC;Yao等<sup>[19]</sup>认为,PDGF-BB单独作用于系膜细胞并不引起GJIC、Cx43蛋白表达、定位及分布的改变,而提高胞内cAMP浓度,两者的协同作用能够改善GJIC。另有研究表明,Cx43的羧基末端还能够与膜相关鸟苷酸激酶蛋白家族(membrane-associated guanylate ki-

nase, MAGUK)的成员之一ZO-1蛋白的PDZ结构域相互结合引起连接通道开放<sup>[20]</sup>。然而,磷酸化的Cx43与原癌基因c-Src的SH2结构域结合却可引起连接通道关闭。不仅如此,同种细胞在不同异常条件下,如胞内酸中毒、化学缺血/缺氧等,Cx43与ZO-1、c-Src的相互作用也不尽相同<sup>[21]</sup>。总之,GJIC的调节是个多层次、多因素的复杂过程,从而实现对细胞的新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理过程的精密调控。

此外,本研究还发现蟾蜍灵干预引起第二信使游离 $Ca^{2+}$ 浓度的降低,与增强GJIC相一致,提示 $Ca^{2+}$ 参与了GJIC的功能调节。正常的细胞间隙连接是 $Ca^{2+}$ 内流的通道之一,胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度的变化又可以导致GJIC的增强或丧失。此外,在多条信号通路的参与下, $Ca^{2+}$ 能够与钙调蛋白(calmodulin, CaM)结合激活多种蛋白激酶、蛋白水解酶和核酸酶,引起间隙连接蛋白特定位点的磷酸化改变GJIC最终引起系膜细胞增殖与基质分泌增多。

总之,蟾蜍灵改善GJIC的调节途径、调节方式受多种因素影响,本研究发现蟾蜍灵能够调节不同间隙连接蛋白基因的表达,降低细胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度,从而改善GJIC可能是蟾蜍灵抑制系膜细胞增殖的重要机制之一。本实验的数据和结论都是建立在体外细胞模型上的,蟾蜍灵对系膜细胞增殖性肾病的治疗机制尚需体内实验进一步论证。但可以肯定的是,GJIC与系膜细胞增殖密切关联,本研究的发现为研究系膜增殖性肾小球疾病的发病机制有一定启示作用,为临床筛选有效的治疗药物提供了理论依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] Yao J, Morioka T, Oite T. PDGF regulates gap junction communication and connexin43 phosphorylation by PI 3-kinase in mesangial cells[J]. *Kidney Int*, 2000, 57(5): 1915-1926.
- [2] Postma FR, Hengeveld T, Alblas J, Giepmans BN, Zondag GC, Jalink K, et al. Acute loss of cell-cell communication caused by G protein-coupled receptors; a critical role for c-Src[J]. *J Cell Biol*, 1998, 140(5): 1199-1209.
- [3] Hossain MZ, Ao P, Boynton AL. Rapid disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 by platelet-derived growth factor in T51B rat liver epithelial cells expressing platelet-derived growth factor receptor[J]. *J Cell Physiol*, 1998, 174(1): 66-77.
- [4] Pelletier DB, Boynton AL. Dissociation of PDGF receptor tyrosine kinase activity from PDGF-mediated inhibition of gap junctional communication[J]. *J Cell Physiol*, 1994, 158(3): 427-434.
- [5] Wang B, Zhang A, Zheng J, Gong J, Li S, Zeng Z, et al. Bufalin inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced mesangial cell proliferation through mediating cell cycle progression[J]. *Biol*

- Pharm Bull, 2011, 34(7): 967-973.
- [6] el-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication [J]. *Exp Cell Res*, 1987, 168(2): 422-430.
- [7] Bagrov AY, Roukoyatkina NI, Fedorova OV, Pinaev AG, Ukhanova MV. Digitalis-like and vasoconstrictor effects of endogenous digoxin-like factor(s) from the venom of *Bufo marinus* toad [J]. *Eur J Pharmacol*, 1993, 234(2-3): 165-172.
- [8] Hauck CR, Lorenzen D, Saas J, Meyer TF. An in vitro-differentiated human cell line as a model system to study the interaction of *Neisseria gonorrhoeae* with phagocytic cells [J]. *Infect Immun*, 1997, 65(5): 1863-1869.
- [9] Meister GC, D'Angelo R, Owen M, Nelson KE, Gaver R. A comparison of epidural analgesia with 0.125% ropivacaine with fentanyl versus 0.125% bupivacaine with fentanyl during labor [J], *Anesth Analg*, 2000, 90(3): 632-637.
- [10] Corteggio A, Florio J, Roperto F, Borzacchiello G. Expression of gap junction protein connexin 43 in bovine urinary bladder tumours [J]. *J Comp Pathol*, 2011, 144(1): 86-90.
- [11] Hsiao YP, Yu CS, Yu CC, Yang JS, Chiang JH, Lu CC, et al. Triggering apoptotic death of human malignant melanoma a375. s2 cells by bufalin: involvement of caspase cascade-dependent and independent mitochondrial signaling pathways [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 591241.
- [12] Arnaud-Batista FJ, Costa GT, Oliveira IM, Costa PP, Santos CF, Fonteles MC, et al. Natriuretic effect of bufalin in isolated rat kidneys involves activation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-*Src* kinase pathway [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302(8): F959-F966.
- [13] Zheng J, Gong J, Zhang AQ, Li SW, Zeng ZF, Han Y, et al. Attenuation of glomerular filtration barrier damage in adriamycin-induced nephropathic rats with bufalin: an antiproteinuric agent [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012, 129(3-5): 107-114.
- [14] 李善文,甘卫华,陈荣华,张爱青,潘晓勤,费莉. 蟾蜍灵对脂多糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞凋亡的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2009(5): 673-677.
- [15] 曾智凤,甘卫华,龚晶,张爱青,李善文,王彬,等. 蟾蜍灵对高糖诱导大鼠系膜细胞过表达纤维连接蛋白和结缔组织生长因子的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(10): 1421-1424.
- [16] Hanner F, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, Peti-Peterdi J. Connexins and the kidney [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 298(5): R1143-R1155.
- [17] Squecco R, Sassoli C, Nuti F, Martinesi M, Chellini F, Nosi D, et al. Sphingosine 1-phosphate induces myoblast differentiation through Cx43 protein expression: a role for a gap junction-dependent and-independent function [J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(11): 4896-4910.
- [18] Solan JL, Marquez-Rosado L, Sorgen PL, Thornton PJ, Gafken PR, Lampe PD. Phosphorylation at S365 is a gatekeeper event that changes the structure of Cx43 and prevents down-regulation by PKC [J]. *J Cell Biol*, 2007, 179(6): 1301-1309.
- [19] Yao J, Kitamura M, Zhu Y, Meng Y, Kasai A, Hiramatsu N, et al. Synergistic effects of PDGF-BB and cAMP-elevating agents on expression of connexin43 in mesangial cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290(5): F1083-F1093.
- [20] Giepmans BN, Moolenaar WH. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein [J]. *Curr Biol*, 1998, 8(16): 931-934.
- [21] Li W, Hertzberg EL, Spray DC. Regulation of connexin43-protein binding in astrocytes in response to chemical ischemia/hypoxia [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(9): 7941-7948.

(本文编辑:王庆红)