

镉诱导 HK-2 细胞信号通路的蛋白磷酸化变化及 缝隙连接蛋白 43 的作用

刁海鹏¹, 于茂辉², 刘庆平¹, 冀晓丽¹, 葛泽河¹, 杜柯贤¹, 吴庆¹

摘要: [目的] 探讨人肾近曲小管上皮细胞在镉(CdCl_2)染毒下的信号通路蛋白磷酸化变化及缝隙连接蛋白 43(Cx43)的作用。[方法] 选取人肾近曲小管上皮细胞系 HK-2, 给予 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CdCl_2 染毒 10 d。采用 RNA 干扰(siRNA)下调 Cx43 表达, 采用 Western blot 检测 Cx43 蛋白表达, 采用蛋白磷酸化芯片分析细胞信号通路蛋白磷酸化改变。[结果] 在 CdCl_2 染毒 HK-2 细胞 10 d 后, 蛋白磷酸化发生变化的位点有 61 个, 发生蛋白磷酸化改变的通路有 ErbB、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、T 细胞受体以及 B 细胞受体信号通路, 细胞增殖下降($P<0.05$), 凋亡上升($P<0.05$); 在未染毒时沉默 Cx43 后, 相对于 Cx43 未沉默组, 有 56 个磷酸化位点发生改变, 发生蛋白磷酸化改变的通路有焦点黏连、ErbB、MAPK 信号通路等, 细胞增殖下降($P<0.05$), 而细胞凋亡未发生变化($P>0.05$); 而染毒后再短暂下调 Cx43, 相较于镉染毒组, 有 102 个位点变化, 而焦点黏连、ErbB、MAPK、凋亡和趋化因子信号通路相关蛋白磷酸化水平发生变化, 细胞增殖未发生变化($P>0.05$), 而细胞凋亡下降($P<0.05$)。[结论] 镉较长时间染毒 HK-2 细胞, 可能会影响 ErbB、MAPK、T 细胞及 B 细胞受体信号通路, 抑制细胞增殖, 增加细胞凋亡; Cx43 表达下降可能会通过改变焦点黏连、ErbB、MAPK、凋亡和趋化因子等信号通路的蛋白磷酸化水平, 对细胞增殖与凋亡进行调控。

关键词: 氯化镉; 人肾近曲小管上皮细胞; 蛋白磷酸化; 缝隙连接蛋白 43; siRNA

Alteration of Protein Phosphorylation and Role of Connexin 43 in HK-2 Cells Following Cadmium Exposure DIAO Hai-peng¹, YU Mao-hui², LIU Qing-ping¹, JI Xiao-li¹, GE Ze-he¹, DU Ke-xian¹, WU Qing¹ (1.Key Laboratory of Public Health Safety of Ministry of Education/School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2.Pudong Hospital of Jimo, Jimo, Shandong 266200, China). Address correspondence to WU Qing, E-mail: qingwu@fudan.edu.cn · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To investigate the alteration of protein phosphorylation of signaling pathways and the role of connexin 43 (Cx43) in human renal proximal tubular cells following cadmium (CdCl_2) treatment. [Methods] Human renal proximal tubular cell lines (HK-2) were exposed to $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 for 10 days. Cx43 was silenced by RNA interference technique (siRNA). Western blot was used to detect protein expression of Cx43. The protein phosphorylation of signaling pathways was determined by phosphor explorer antibody array. [Results] After HK-2 cells exposed to CdCl_2 for 10 days, 61 phosphorylation proteins were altered, belonging to ErbB, mitogen-activated protein kinase (MAPK), T cells receptor, and B cells receptor signaling pathways. Decreased proliferation ($P<0.05$) and elevated apoptosis ($P<0.05$) in HK-2 cells were observed. After Cx43 was silenced prior to the exposure, 56 phosphorylation proteins were altered when compared with the control group, which belonged to Focal adhesion, ErbB, and MAPK signaling pathways. However, apoptosis did not change ($P>0.05$) with decreased cell proliferation ($P<0.05$). Compared with the CdCl_2 exposure group, 102 altered phosphorylation proteins involved in Focal adhesion, ErbB, MAPK, Apoptosis, and Chemokine signaling pathways were identified with decreased apoptosis ($P<0.05$) and no change in cell proliferation ($P>0.05$) in the Cx43 silencing posterior to CdCl_2 exposure group. [Conclusion] An extended cadmium exposure of HK-2 cells could decrease cell proliferation, increase apoptosis, and affect ErbB, MAPK, T cells receptor, and B cells receptor signaling pathways. Down-regulated expression of Cx43 may regulate the proliferation and apoptosis of cells by changing the protein phosphorylation of signaling pathways such as Focal adhesion, ErbB, MAPK, Apoptosis, and Chemokine.

Key Words: cadmium chloride; human renal proximal tubular cell; protein phosphorylation; connexin 43; siRNA

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.16209

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 21277033)

[作者简介] 刁海鹏(1989—), 男, 硕士生; 研究方向: 分子毒理学; E-mail: hdiao13@fudan.edu.cn

[通信作者] 吴庆, E-mail: qingwu@fudan.edu.cn

[作者单位] 1. 复旦大学公共卫生学院, 公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032; 2. 山东省即墨市普东卫生院, 山东 即墨 266200

镉是广泛分布于环境中的重金属,具有10~30年的生物半衰期^[1-2]。目前低剂量环境镉暴露人群的健康效应越来越受到重视。肾脏是镉慢性中毒的主要靶器官^[3-4]。

缝隙连接细胞间通讯是介导相邻细胞间电偶联以及小分子物质细胞间转移的跨膜通道^[5-6],是相邻细胞间物质和信息交换最直接形式,可以调控细胞的增殖、分化及凋亡^[7]。缝隙连接蛋白是缝隙连接细胞间通讯功能的物质基础^[8-9],不仅可以通道的形式介导细胞与细胞之间的信息交流,还能影响相关信号通路^[10-12]。已有研究报道,缝隙连接蛋白43(connexin43, Cx43)在细胞镉染毒中起到重要的调节作用,影响了猪肾LLC-PK1细胞对镉染毒的敏感性,沉默Cx43会增加LLC-PK1细胞对镉的抵抗性^[13]。镉高浓度染毒原代大鼠肾近曲小管细胞,会引起细胞乳酸脱氢酶和N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶增加,细胞损伤加重,同时缝隙连接细胞间通讯受到抑制^[14]。Cx43是人肾小管上皮细胞系HK-2的主要连接蛋白^[15]。然而,Cx43在氯化镉对人肾近曲小管上皮细胞毒效应中的作用尚不清楚。

蛋白质磷酸化修饰的调节贯穿几乎所有生命活动过程,在细胞信号转导过程中起重要作用。当正常细胞中蛋白磷酸化调控出现异常时,常常会引起生理或病理变化^[16]。有研究表明,Cx43的转运及合成GJIC通道受到Akt、PKA和CK1等磷酸化蛋白的调控,GJIC通道的开关也受到如CDC2、丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)、PKC和Src等磷酸化蛋白的调控^[17],但是,Cx43改变对这些磷酸化蛋白及其通路的影响尚未可知。

因此本研究首先在较长期(>3d)低剂量氯化镉染毒人肾近曲小管上皮细胞系HK-2中,检测蛋白磷酸化改变;然后通过RNA干扰技术下调Cx43表达,分析Cx43对细胞信号通路中蛋白磷酸化改变的作用。本研究旨在通过分析镉长时间染毒对肾小管上皮细胞的蛋白磷酸化影响,以及Cx43改变对镉效应的作用,为镉的毒效应机制及Cx43通路在环境化学物毒性机制中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

CdCl₂(Sigma,美国),RPMI-1640培养基、胎牛血清(GIBCO,美国),焦碳酸二乙酯(DEPC)水(天根生化科技,中国),Cell-Light EdU Apollo 488检测试

剂盒(广州锐博生物,中国),Annexin V-PI凋亡检测试剂盒(Becton, Dickinson and Company,美国),凝胶成像仪G:BOX(Syngene,英国),RNAiMAX(Life Technology,美国),RIPA、二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒(碧云天,中国),蛋白磷酸化芯片(Full Moon,美国),兔源Cx43抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(Cell Signaling Technology,美国)。

1.2 细胞培养及处理

选用人肾近曲小管上皮细胞系HK-2(上海博谷生物提供)用于实验。细胞培养条件:将细胞置于37℃、5%(体积分数)CO₂、95%空气饱和湿度培养箱中培养。将0、1 μmol/L浓度的CdCl₂染毒HK-2细胞并培养至第9天(细胞传4代),各分为2部分:一部分2组均加入siRNA阴性对照序列处理后继续培养至第10天,收集细胞蛋白分别记为对照组(即Cx43未沉默组)与镉染毒组;另一部分2组均加入siRNA-Cx43沉默序列后继续培养至第10天,收集细胞设为对照Cx43沉默组及染毒后Cx43沉默组。重复实验3次,各取100 μL细胞蛋白集合后进行后续蛋白磷酸化芯片检测。

1.3 细胞Cx43 siRNA转染

Cx43干扰序列由广州锐博生物生产,靶序列:GGCTAATTACAGTGCAGAA;引物序列:正义链5'GGCTAATTACAGTGCAGAA 3',反义链3'dTdTCCGAUUA AUGUCACGUCUU 5'。对照序列由广州锐博公司提供。

转染步骤如下:(1)将细胞消化后铺6孔板,在转染时细胞汇合度达到50%左右;(2)用DEPC水溶解siRNA,使其浓度为20 μmol/L;(3)铺板24h后,向板中加入siRNA-Cx43以及siRNA阴性对照序列进行转染。转染6h后,弃掉各孔内的培养液,用PBS清洗1~2次后,提取细胞蛋白,进行Western blot检测蛋白表达。

1.4 细胞增殖及凋亡检测

细胞按照1×10⁵个/mL浓度接种至96孔细胞培养板中,细胞贴壁后按上述操作染毒,每个剂量设3个复孔。细胞增殖按照Cell-Light EdU Apollo 488检测试剂盒说明方法进行检测。细胞凋亡用Annexin V-PI凋亡检测试剂盒进行检测。

1.5 蛋白表达水平检测

为了确认Cx43的RNA干扰效果,采用Western blot方法对Cx43蛋白表达进行验证。去除细胞培养液,用细胞裂解液RIPA于冰上裂解细胞,在4℃离心机

14 000 × g 离心 5 min, 取上清, 二喹啉甲酸蛋白定量后, 经蛋白变性获取蛋白样品。按照二喹啉甲酸蛋白定量的浓度, 计算蛋白上样体积, 上样后进行凝胶电泳; 恒压 100 V 转膜 1 h; 用 5% (质量分数) 脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h; 一抗杂交袋中 4℃ 冰箱过夜, 洗膜 3 次; 二抗室温摇床孵育 1 h, 洗膜 3 次; 于凝胶成像仪中进行化学发光检测。

1.6 蛋白磷酸化水平测定

使用美国 Full Moon BioSystems 抗体芯片委托专业公司测定完成。芯片流程主要包括: 蛋白标记、芯片封闭、芯片杂交和芯片检测。PEX100 芯片共计 16 个孔, 左右各 8 个, 芯片上的每种抗体为两次重复, 即左右对称。因此在进行数据归一化时, 考虑到左右信号整体可能会有差异, 对于左边的 8 个孔, 计算所有抗体荧光信号的中位数, 以此中位数进行校正, 对于右边的 8 个孔也同样操作, 然后计算两次重复的均值、标准差以及变异系数 (CV), 并使用该均值计算磷酸化位点的磷酸化水平。其中, 以 $CV \leq 0.3$ 的点不少于芯片数据量的 80% 作为两重复芯片数据的评价标准。4 个组质控如下: 对照组, $CV \leq 0.3$ 占整个检测指标的 88%; 镉染毒组, $CV \leq 0.3$ 占整个检测指标的 95%; 对照 Cx43 沉默组, $CV \leq 0.3$ 占整个检测指标的 89%; 染毒后 Cx43 沉默组, $CV \leq 0.3$ 占整个检测指标的 92%。以上 4 组均符合芯片数据评价标准。蛋白磷酸化芯片上含有 1318 种抗体, 覆盖多个信号通路 452 个关键蛋白 584 个磷酸化位点。通过比较位点磷酸化蛋白信号值与同一位点非磷酸化蛋白信号值, 计算每一个位点的磷酸化水平。

1.7 统计学分析

本实验为细胞实验, 每次试验每个剂量组均设 3 个复孔, 并重复 3 次。采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 双侧检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

差异蛋白磷酸化组间比较用增加二倍或下降二分之一作为差异有统计学意义。然后应用 DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 以及 KEGG 数据库进行通路富集分析。其中 P 值为应用 Fisher 确切检验对蛋白磷酸化位点进行富集分析得到的, P 值越小表明富集越显著。

2 结果

2.1 细胞的增殖和凋亡

氯化镉 1 $\mu\text{mol/L}$ 染毒第 10 天时, 相对于对照组,

细胞增殖下降 ($P<0.05$), 凋亡上升 ($P<0.05$); 对照组细胞培养至第 9 天沉默 Cx43, 相对于 Cx43 未沉默组, 细胞增殖下降 ($P<0.05$), 而细胞凋亡未发生变化 ($P>0.05$); 在镉染毒后沉默 Cx43, 相对于染毒后 Cx43 未沉默组, 细胞增殖未发生变化 ($P>0.05$), 而细胞凋亡下降 ($P<0.05$)。见表 1。

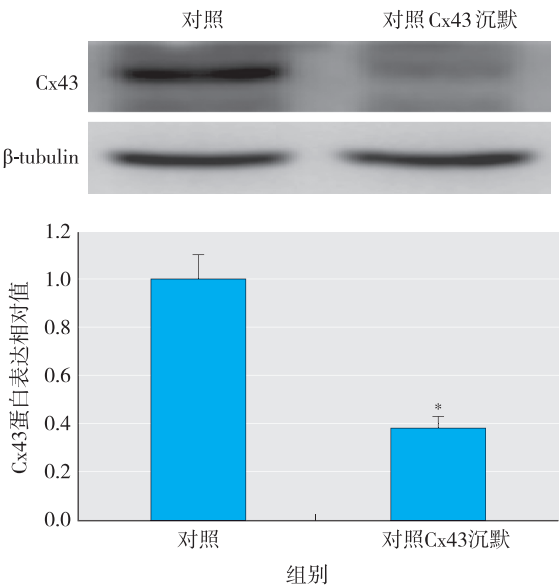
表 1 氯化镉染毒对 HK-2 细胞增殖、凋亡的影响

组别	增殖		凋亡	
	Cx43 未沉默组	Cx43 沉默组	Cx43 未沉默组	Cx43 沉默组
镉染毒组	$0.31 \pm 0.02^*$	0.28 ± 0.03	$1.26 \pm 0.06^*$	$0.97 \pm 0.04^{\#}$
对照组	0.42 ± 0.04	$0.34 \pm 0.06^{\#}$	1.00 ± 0.08	0.93 ± 0.09

[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$ 。#: 与 Cx43 未沉默组相比, $P<0.05$ 。

2.2 Cx43 干扰效果的 Western blot 确认

如图 1 所示, RNA 干扰后, Cx43 的表达下降至 38.9%。



[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$ 。

图 1 siRNA Cx43 前和后的蛋白表达

2.3 差异磷酸化蛋白 DAVID 富集分析和 Pathway 分析

镉染毒 HK-2 细胞 10 d 后, 相对于对照组, 61 个磷酸化位点出现改变。通过 DAVID 以及 KEGG 富集分析, 富集蛋白个数 ≥ 10 的信号通路共 4 条通路。如表 2 所示, ErbB、MAPK、T 细胞受体以及 B 细胞受体信号通路蛋白磷酸化水平发生改变。

细胞未染毒培养至第 9 天, 沉默 Cx43, 相对于未沉默组, 有 56 个蛋白磷酸化位点发生改变, 通过 DAVID 以及 KEGG 富集分析, 富集蛋白个数 ≥ 10 的信号通路共 3 条。如表 2 所示, 焦点黏连 (Focal adhesion)、

ErbB、MAPK 信号通路的蛋白磷酸化水平发生改变。

镉染毒后再沉默 Cx43，相对于镉染毒组，102 个磷酸化位点发生改变，通过富集，富集蛋白个数 ≥ 10 的信号通路共 5 条。如表 2 所示，炎症相关的一些通路位点的磷酸化位点，没有因为 Cx43 表达下调而改变，但 Focal adhesion、ErbB、MAPK、凋亡 (Apoptosis) 和趋化因子 (Chemokine) 信号通路相关蛋白磷酸化水平发生变化。

表 2 HK-2 细胞染毒后短暂沉默 Cx43 部分差异磷酸化蛋白富集分析

组间比较	信号通路	差异表达的磷酸化蛋白	P
镉染毒组 vs. 对照组	ErbB	HER2(ErbB-2), GAB1、Src、Raf、c-Jun、EGFR(ErbB-1), Ab1、MEK、PAK、JNKK、mTOR、Bad、p27、p21	3.8 × 10 ⁻¹³
	MAPK	Raf1、Tau、cPLA2、c-Jun、ATF-2、NFκB、EGFR、MEK2、RSK2、MKK7、PAK1/2、PAK1/2、Cdc42/Rac	4.9 × 10 ⁻⁷
	T 细胞受体	LAT、Raf、IKKγ、AP1、IκB、LCK、PAK、NFAT、MEK1/2、MKK7、IKKβ	3.3 × 10 ⁻⁸
	B 细胞受体	LYN、Raf、IKKγ、CD19、AP1、NFκB、Rac、MEK1/2、IKKβ、NFAT	1.8 × 10 ⁻⁸
对照 Cx43 沉默组 vs. Cx43 未沉默组	Focal adhesion	RTK、p130Cas、Bad、ITGB、Src、Akt/PKB、Raf1、MEK1、b-catenin、Elk1	3.6 × 10 ⁻⁶
	ErbB	ErbB-1、ErbB-2、Ab1、Bad、Src、Raf、MEK、Akt/PKB、p70S6K、Elk	2.3 × 10 ⁻⁸
	MAPK	EGFR、TPL2/Cot、NFAT4、NFκB、p38、Raf、AKT、MEK1、Elk-1、p53、HSP27	2.6 × 10 ⁻⁴
染毒后 Cx43 沉默组 vs. 镉染毒组	MAPK	c-Jun、PDGFR、PKA、PKC、RSK2、p38、p53、EGFR、RSK2、Raf-1、MKK4、AKT、Tau、SRF、IKKβ	1.9 × 10 ⁻⁶
	ErbB	HER2(ErbB-2), Jun、PLCγ、STAT5、FAK、Bad、PKC、EGFR(ErbB-1), JNKK、Shc、Raf、PKB/Akt、eIf-4EBP	4.6 × 10 ⁻¹²
	Focal adhesion	PKC、FAK、c-Jun、RTK、Bad、cIAP、Paxillin、PTEN、Akt/PKB、Raf-1、Shc	2.1 × 10 ⁻⁶
	Chemokine	STAT、PKA、FAK、Shc、Akt、Raf、IKK、NFκB、FOXO、Paxillin	1.4 × 10 ⁻¹⁰
	Apoptosis	IAP、PKA、Bad、p53、PKB/Akt、IKK、IL-3R、Bid、Casepase9、NFκB	1.6 × 10 ⁻⁸

3 讨论

已有研究用高浓度镉暴露 HK-2 细胞，在浓度超过 20 μmol/L 会对细胞造成损伤，致细胞形态破坏以及细胞存活率的降低^[18]，而且镉暴露 HK-2 细胞时间延长至 6d 后，镉浓度在 5~120 μmol/L 范围会对细胞产生明显的毒性作用^[19]。在受到镉污染的区域中镉弥散在土壤及水中的浓度可达到 0.21 mg/kg，大约相当于食物中 1.9 μmol/L 的浓度^[20]。本课题组前期研究中，曾对 0、0.01、0.1、1 μmol/L 4 个剂量组进行分组染毒，结果发现在 1 μmol/L 镉染毒 10 d 时，细胞增殖与凋亡发生改变。根据以上文献结果结合我们的前期研究，为观察较低剂量较长期染毒对 HK-2 的影响，本研究选用低于已有文献选用的浓度和低于食品中浓度的 1 μmol/L 镉对细胞染毒，并在镉染毒第 9 d 对 Cx43 进行沉默，以探索低剂量镉在长时间染毒对 HK-2 的作用及 Cx43 在其中的影响。

结果发现，在镉染毒 HK-2 细胞 10d 后，可以诱导细胞增殖抑制以及凋亡升高，而且 ErbB、MAPK、T 细胞受体和 B 细胞受体等信号通路的蛋白磷酸化水平发生改变。ErbB 家族属于跨膜酪氨酸激酶受体，在细胞信号转导中发挥重要作用，是细胞增殖、分化、移动、存活等的重要调节者，ErbB 家族信号通路的异常激活可引起细胞生长增殖失控、恶性转化及肿瘤浸润转移^[21]。MAPK 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，MAPK 信号转导途径是介导细胞反应的重要信号系统，参与

了细胞的生长、发育、分裂死亡等生理过程^[22]。因此结果提示，镉染毒 HK-2 细胞，会影响到细胞增殖及凋亡改变，这可能是因 ErbB、MAPK、T 细胞受体及 B 细胞受体等增殖及炎症通路相关蛋白磷酸化的激活而介导。

在未染毒细胞中沉默 Cx43 后，细胞增殖下降，Focal adhesion、ErbB 以及 MAPK 3 条信号通路也发生改变。Focal adhesion 蛋白可以整合来自胞外的营养、压力、细胞黏着等方面的信号，调节下游分子的活性，控制细胞的代谢、增殖，甚至是细胞的命运^[23]，Focal adhesion 通路中蛋白磷酸化改变会伴随着细胞密度下降及细胞周期的停滞^[24-25]，因此，Cx43 可能影响这些通路中蛋白磷酸化改变从而对细胞增殖进行调控。

镉染毒后 Cx43 短暂沉默，相对于镉染毒组，细胞凋亡下调，增殖未发生变化，Focal adhesion、ErbB 以及 MAPK 3 条信号通路的不同的磷酸化蛋白及位点发生改变，Apoptosis、Chemokine 等通路的蛋白磷酸化也发生改变。提示，在镉较长时间染毒后，细胞中 Cx43 的短暂沉默会影响到凋亡和 Chemokine 信号通路的改变，并影响细胞的凋亡。

综上所述，本研究通过磷酸化蛋白芯片对 HK-2 长期镉染毒及 Cx43 沉默后蛋白磷酸化进行差异比较，通过分析相关发生改变的磷酸化位点及其富集的信号通路，发现镉较长时间染毒 HK-2 细胞，可能会通过 ErbB、MAPK、T 细胞受体及 B 细胞受体信号通路对细胞增殖及凋亡进行调控；Cx43 表达下降可能会

通过改变 Focal adhesion、ErbB、MAPK、Apoptosis 和 Chemokine 等信号通路的蛋白磷酸化水平,对细胞增殖与凋亡进行调控。

本研究中我们没有对磷酸化位点做一一验证。在后续研究中,将着重对文中信号通路的关键磷酸化蛋白进行验证,并结合细胞增殖及凋亡变化,来探讨 Cx43 在镉长时间染毒下对细胞的作用机制。并进一步采用通路抑制剂,来探明镉染毒下 Cx43 对细胞影响的通路变化机制。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Nordberg G F, Jin T, Kong Q, et al. Biological monitoring of cadmium exposure and renal effects in a population group residing in a polluted area in China[J]. *Sci Total Environ*, 1997, 199(1/2): 111-114.
- [2] Rani A, Kumar A, Lal A, et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review[J]. *Int J Environ Health Res*, 2014, 24(4): 378-399.
- [3] 孔庆瑚. 环境镉污染对人体健康的影响[J]. *浙江省医学科学院学报*, 2001, 12(1): 1-2.
- [4] Masakatsu F, Toru K, Masayuki H, et al. Effect of cadmium on gap junctional intercellular communication in primary cultures of rat renal proximal tubular cells[J]. *Life Sci*, 2001, 69(3): 247-254.
- [5] Axelsen LN, Calloe K, Holstein-Rathlou NH, et al. Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification[J]. *Front Pharmacol*, 2013, 4: 130.
- [6] 朱有厚, 王飞. 缝隙连接通讯与认知功能障碍关系的研究进展[J]. *外科研究与新技术*, 2014, 3(2): 149-152.
- [7] Vinken M, Decrock E, De Vuyst E, et al. Connexins: sensors and regulators of cell cycling[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1815(1): 13-25.
- [8] Solan JL, Lamp PD. Connexin 43 phosphorylation: structural changes and biological effects[J]. *Biochem J*, 2009, 419(2): 261-272.
- [9] Sirnes S, Kjenseth A, Leithe E, et al. Interplay between PKC and the MAP kinase pathway in Connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(1): 41-45.
- [10] Li S, Zhang H, Li S, et al. Connexin 43 and ERK regulate tension-induced signal transduction in human periodontal ligament fibroblasts[J]. *J Orthop Res*, 2015, 33(7): 1008-1014.
- [11] Buo A M, Stains J P. Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(8): 1315-1321.
- [12] 于茂辉, 刁海鹏, 冀晓丽, 等. 苯并[a]芘对小鼠睾丸支持细胞连接蛋白表达及细胞增殖的影响[J]. *环境与职业医学*, 2015, 32(5): 471-475.
- [13] Fang X, Huang T, Zhu Y, et al. Connexin43 hemichannels contribute to cadmium-induced oxidative stress and cell injury[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(12): 2427-2439.
- [14] Fukumoto M, Kujiraoka T, Hara M, et al. Effect of cadmium on gap junctional intercellular communication in primary cultures of rat renal proximal tubular cells[J]. *Life Sci*, 2001, 69(3): 247-254.
- [15] Abed AB, Kavvadas P, Chadjichristos C E. Functional roles of connexins and pannexins in the kidney[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(15): 2869-2877.
- [16] 谢聪颖, 赵亮, 苏华芳, 等. 初发与复发鼻咽癌组织中磷酸化蛋白芯片的差异表达分析[J]. *肿瘤学杂志*, 2011, 17(10): 757-761.
- [17] Thévenin A F, Kowal T J, Fong J T, et al. Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2013, 28(2): 93-116.
- [18] 李芳林, 张凝宇, 李辉, 等. 氯化镉对人肾小管上皮细胞形态及生存率的影响[J]. *广西医学*, 2015, 37(3): 305-306.
- [19] 马静, 易建华, 李鑫等. 镉对人肾近曲小管上皮细胞毒性的实验研究[J]. *公共卫生与预防医学*, 2010, 21(4): 15-17.
- [20] Dexiao Y, Shuang Y, Yan P, et al. Long-term cadmium exposure leads to the enhancement of lymphocyte proliferation via down-regulating p16 by DNA hypermethylation[J]. *Mutat Res*, 2013, 757(2): 125-131.
- [21] 薛花, 吴强. 乳腺癌 c-erbB-2 研究进展[J]. *安徽医药*, 2005, 9(6): 407-410.
- [22] 刘婷婷, 张淑萍, 覃筱燕, 等. MAPK 信号转导通路与神经损伤研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2016, 32(2): 248-254.
- [23] 李树裕, 王志钢. 粘附斑激酶(FAK)及其信号通路研究进展[J]. *生物技术通报*, 2009(12): 6-10.
- [24] Samarakoon R, Helo S, Dobberfuhr A D, et al. Loss of tumour suppressor PTEN expression in renal injury initiates SMAD3- and p53-dependent fibrotic responses[J]. *J Pathol*, 2015, 236(4): 421-432.
- [25] McGinnis L K, Kinsey W H. Role of focal adhesion kinase in oocyte-follicle communication[J]. *Mol Reprod*, 2015, 82(2): 90-102.

(收稿日期: 2016-02-29)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 洪琪)