

## ·方法学研究·

## 过表达及定点突变缝隙连接蛋白 Cx43 小鼠黑色素瘤细胞模型的构建

李 玢, 张广献, 刘 娟, 赵 青, 谭宇蕙, 吴映雅, 易 华, 杜标炎(广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006)

**摘要:** 目的 构建小鼠黑色素瘤细胞(B16)过表达野生型及点突变型缝隙连接蛋白 43(Connexin43, Cx43)细胞模型, 为以缝隙连接(Gap Junction, GJ)为靶点的中药复方、中药单药及药物单体的研究提供可靠阳性对照和阴性对照。方法 构建野生型 Cx43、突变型 Cx43G21R、突变型 Cx43G138R 重组荧光蛋白融合慢病毒表达质粒, 用定点突变技术获得 Cx43G21R 和 Cx43G138R 突变体, 对上述 3 种质粒进行双酶切和测序鉴定, 并分别包装病毒感染 B16 细胞, 使 B16 细胞过表达野生型 Cx43、突变型 Cx43G21R、突变型 Cx43G138R。Western blot 检测 Cx43 蛋白表达水平变化, 荧光示踪法观察缝隙连接通讯(Gap Junction Intercellular Communication, GJIC)功能变化。结果 ①酶切及测序证明, 成功构建 pLVCx43-mCherry、pLVCx43-mCherryG21R、pLVCx43-mCherryG138R 重组荧光蛋白融合慢病毒表达质粒。②成功感染 B16 细胞并筛选稳定过表达 Cx43、Cx43G21R、Cx43G138R 细胞株, Western blot 检测显示上述细胞株 Cx43 蛋白表达均高于对照组。③过表达野生型 Cx43 后 B16 细胞 GJIC 功能较对照组增强; 过表达突变型 Cx43 后 B16 细胞 GJIC 功能较对照组减弱。结论 过表达野生型 Cx43 可增强 B16 细胞 GJIC 功能, 过表达突变型 Cx43 可抑制 B16 细胞 GJIC 功能。

**关键词:** 黑色素瘤细胞; 小鼠; 缝隙连接蛋白 43; 定点突变; 慢病毒载体; 缝隙连接通讯

**中图分类号:** R34-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0373-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.034

### Construction of Mouse Melanoma Cell Models of Wild-type Overexpression Connexin 43 and Site-specific Mutant Connexin 43

LI Bin, ZHANG Guangxian, LIU Juan, ZHAO Qing, TAN Yuhui, WU Yingya, DU Biaoyan (School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To construct mouse B16 melanoma cell models of wild-type overexpression Cx43 and site-specific mutant Cx43, thus to provide reliable positive and negative control for the study of gap junction targeted Chinese herbal formula, Chinese medicine ingredient, and drug monomer. **Methods** We constructed the recombined fluorescent protein (mCherry) infused with Lentivirus expression plasmid of wild-type Cx43 (pLVCx43-mCherry), mutant R (pLVCx43G21R-mCherry) and mutant Cx43G138R (pLVCx43 G138R-mCherry). The Cx43G21R and Cx43G138R mutants were obtained by site-specific mutagenesis. The three kinds of plasmid were performed double restriction enzyme digestion and sequencing, and then were packaged to infect B16 cells. The B16 cells overexpressed the protein of wild-type Cx43 and mutants of Cx43G21R and Cx43G138R, and then western blotting was applied for the detection of protein level. The functional changes of gap junction intercellular communication(GJIC) were assayed by fluorescent tracer under fluorescence microscope. **Results** The results of digestion and sequencing demonstrated that the recombined Lentivirus-fluorescent protein expression plasmids of pLVCx43-mCherry, pLVCx43-mCherryG21R and pLVCx43-mCherryG138R had been constructed successfully. We also successfully transfected the mouse B16 cells and selected transfected cell lines with stable overexpression of wild-type Cx43, site-specific mutant Cx43G21R and site-specific mutant Cx43G138R. The results of Western blotting showed that Cx43 expression level of the three kinds of cell lines was higher than that in control group. The GJIC function of B16 cells with wild-type Cx43 overexpression

收稿日期: 2014-01-14

作者简介: 李玢, 女, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合肿瘤防治与肿瘤药理学。Email: sissilibin@aliyun.com。通讯作者: 杜标炎, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合肿瘤防治与肿瘤药理学。Email: dubiaoyan@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072906, 30973811)。

was dramatically higher, while that of B16 cells with site-specific Cx43 mutants overexpression was lower than the control group. **Conclusion** Wild-type overexpression Cx43 can promote the GJIC function in mouse B16 melanoma cells, and conversely the GJIC function can be inhibited by site-specific mutants of overexpression Cx43G21R and Cx43G138R.

**Keywords:** Melanoma cell (B16); Mice; Connexin 43; Site-specific mutant; Lentivirus vector; Gap junction intercellular communication

大多数肿瘤组织中存在缝隙连接蛋白(Connexin, Cx)表达和功能异常<sup>[1-5]</sup>, 这将影响肿瘤自杀基因疗法的旁杀伤效应。增强缝隙连接通讯(Gap Junction Intercellular Communication, GJIC)功能是肿瘤自杀基因疗法增效的主要机制之一<sup>[6-10]</sup>, 也成为了肿瘤自杀基因疗法增效的作用靶点。Cx43 既是一种最主要的细胞 Cx, 也是一种最广泛分布的 Cx<sup>[11]</sup>。本实验选择 Cx43, 构建了 pLVCx43-mCherry、pLVCx43-mCherry G21R、pLVCx43-mCherryG138R 重组荧光蛋白慢病毒融合表达质粒; 感染小鼠黑色素瘤细胞(B16)获稳定过表达细胞株, 进一步检测了过表达野生型和突变型 Cx43 对 B16 细胞 GJIC 功能的影响, 为中药方药及其主要成分对肿瘤自杀基因治疗系统增效作用及其机制研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 细胞** B16 细胞, 人胚肾 HEK293 细胞, 人胚肾 293T 细胞, 为本实验室前期冻存; pLVmCherry 质粒为广东药学院张文峰博士惠赠。

**1.2 试剂** 小牛血清、胎牛血清、RPMI1640、DMEM 细胞培养基、胰酶(美国 Gibco 公司); TRIzol 总 RNA 提取试剂盒、PrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒、高保真酶及各种内切酶及连接酶(大连宝生物公司); DNA 凝胶回收试剂盒(北京天根公司); 引物合成及测序(美国 Invitrogen 公司); 荧光染料 Calcein-AM(美国 Invitrogen 公司, 批号: C3099); Cx43 抗体(美国 abclonal 公司, 批号: A0084); Cx32 抗体(美国 EMD millipore 公司, 批号: MAB3069); Cx26 抗体(美国 epitomics 公司, 批号: 3813-1); 鼠抗  $\beta$ -actin、羊抗兔及羊抗鼠二抗(武汉博士德公司, 批号分别为 BM0627, BA1003, BA1001)。

**1.3 仪器** 细胞培养箱(BNA-321D, 日本 Espec 公司); 倒置显微镜(XDS-1B 型, 重庆 COIC 公司); 超净工作台(JH 型, 苏州净化设备厂); 电动离心机(XYJ-801 型, 江苏省金坛市医疗仪器厂); 流式细胞仪(FACSJazz, 美国 BD 公司); 荧光显微镜(IX71, 日本 Olympus 公司); 电泳仪(PowerPac Basic, 美国

Bio Rad 公司); 免疫印迹设备(Mini 型, 美国 Bio Rad 公司); 影像工作站 4000R (Carestream Molecular Imaging, 美国 New Haven 公司)。

### 1.4 重组慢病毒载体质粒的构建与鉴定

**1.4.1 RT-PCR 扩增人 Cx43 读码框** 按 Pubmed 基因库提供人 Cx43 的 cDNA 全序列(NCBI ACCESSION: NM\_000165), 通过引物设计软件设计全序列引物, 上游引物: GCTCTAGAATGGGTGACTGGAGCGCCTTA, 其内切酶为 Xba I; 下游引物: CGGGATCCGTAGATCTCCAGGTCATCAGG, 内切酶 BamH I。两对引物均由 Invitrogen 公司合成。按 TRIzol 说明书提取 HEK293 细胞总 RNA, 按 PrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书操作, PCR 反应条件为 98 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 30 s, 30 个循环。扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 使用 DNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 RT-PCR 产物。

**1.4.2 pLVCx43-mCherry 载体质粒的构建及鉴定** 用 Xba I 和 BamH I 限制性内切酶对 Cx43 PCR 扩增产物及 pLVmCherry 质粒分别进行双酶切, 酶切产物切胶回收后用 T4 DNA 连接酶, 16 °C 连接 16 h; 将连接产物转化大肠杆菌 DH5  $\alpha$ , 涂含氨苄霉素抗性平板, 挑取克隆, 摇菌过夜, 提取质粒。重组质粒用 Xba I 和 BamH I 限制性内切酶双酶切初步鉴定正确后, 测序进一步验证。所构建的质粒命名为 pLVCx43-mCherry。

**1.4.3 pLVCx43-mCherryG21R 和 pLVCx43-mCherryG138R 定点突变重组慢病毒载体质粒的构建与鉴定** 利用定点突变技术, 设计包含一对突变位点的引物, G21R 上游引物: 5'-CCTACTCAACTGCTAGAGGGAAGGTGTGGCTGTCAG-3'; 下游引物: 5'-CTGACAGCCACACCTTCCCTCTAGCAGTTGAGTAGG-3'。G138R 上游引物: 5'-GAAGTTCAAGTACAGGATTAAGAGCATGG-3'; 下游引物: 5'-CCATGCTCTTCAATCCTGTACTTGAAGTTC-3'。按 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 说明书操作, 以前期构建的 pLVCx43-mCherry 为模版, PCR 扩增质粒全长。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s, 52 °C

退火 15 s、72 °C 延伸 60 s，30 个循环。将 PCR 产物用 Dpn I 消化并用乙醇沉淀，转化大肠杆菌 DH5 α。挑克隆测序鉴定，所得点突变阳性克隆质粒命名为 pLVCx43-mCherryG21R、pLVCx43-mCherry G138R。

**1.5 重组慢病毒的包装与转染** 常规复苏 293T 细胞，以 DMEM+10 %FBS 培养液培养，按  $4 \times 10^6$  个细胞的密度接种 10 cm<sup>2</sup> 细胞培养皿。提取 pLVCx43-mCherry、pLVCx43-mCherryG21R、pLVCx43-mCherryG138R 重组慢病毒质粒。参照 Lipofectamine2000 说明书，转染 8 h 后给 293T 细胞换新鲜的培养基，转染 48 h 和 72 h 分别收获病毒。吸取病毒上清，加入终浓度  $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 Polybrene，0.45 μm 滤膜过滤，感染 B16 细胞 2 次，5 d 后观察 mCherry 表达，放大培养后用 BD 公司 FACSJazz 型流式细胞仪分选红色荧光细胞，获得稳定转染重组质粒细胞株。

**1.6 Western blot 检测 Cx43 表达**<sup>[12]</sup> 提取普通型、过表达野生型、过表达突变型 B16 细胞总蛋白，经 SDS-PAGE 电泳分离后转印至 PVDF 膜。转印好的 PVDF 膜封闭后依次加入相应一抗和二抗，膜放入 ECL 液中孵育后用影像工作站 Image Station 4000R 对图像进行扫描和分析。

**1.7 荧光示踪法分析 GJIC 功能** 参考 Goldberg 方法<sup>[13]</sup>进行。供体细胞用  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Calcein-AM 孵育 30 min。将供体细胞按 1 : 100 比例接种到受体细胞上，继续培养 6 h，待形成稳定的 GJ 后，用荧光显微镜观察分析 GJIC 功能。实验组与对照组平均每个供体细胞周围发绿色荧光的受体细胞个数的比值，作为评价 GJSC 功能的指标。

**1.8 统计学处理方法** 所有数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，应用 SPSS13.0 软件，组间比较采用单因素方差分析方法。

**2 结果**

**2.1 重组慢病毒载体质粒 pLVCx43-mCherry 的鉴定** RT-PCR 扩增 Cx43 基因开放读码框 ORF 序列，1 % 琼脂糖凝胶电泳分析在约 1 kbp 处出现单一条带，与目的片段 1166 bp 大小相符。用 Xba I 和 BamH I 对质粒 pLVCx43-mCherry 的 DNA 进行双酶切后，1 % 琼脂糖凝胶电泳，可见约 8 kbp(空载体 pLVmCherry 大小 8.2 kbp)和 1 kbp 大小两条带，符合预期结果(见图 1)。pLVCx43-mCherry 中 Cx43 测序结果与 NM\_000165 序列完全一致(见图 2)，表明质粒构建成功。

**2.2 重组慢病毒载体点突变质粒 pLVCx43-mCherry-G21R、pLVCx43-mCherryG138R 的鉴定** Xba I 和 BamHI 对质粒 pLVCx43-mCherryG21R、pLVCx43-

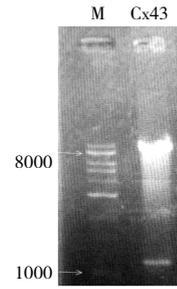


图 1 pLVCx43-mCherry 电泳结果  
Figure 1 The electrophoresis results of pLVCx43-mCherry

```

ATGGGTGACTGGAGCGCCTTAGGCAAACCTCTTGACAAGGTTCAAGCCTACTCAACTGCTGGAGGGAAG
GTGTGGCTGTCAGTACTTTTCATTTCGAACTCTGCTGCTGGGACAGCGGTTGAGTCAGCCTGGGGA
GATGAGCAGTCTGCCCTTCGTTGTAACACTCAGCAACTGGTGTGAAAATGCTGCTATGACAAGTCT
TTCCCAATCTCTCATGTGCGCTTCTGGTCTCAGATCATATTTGTGTGTACCCACACTTTGTAC
CTGGCTCATGTGTTCTATGTGATGCGAAAGGAGAGAAGTGAACAAGAAAGAGGAAGAAGTCAAGGTT
GCCCAACTGATGGTGTCAATGTGGACATGCACCTTGAAGCAGATTGAGATAAAGAAGTCAAGTACGGT
ATTGAAGAGCATGGTAAGGTGAAAATGCGAGGGGGTGTGCGAACCTACATCAGTATCCTCTTTC
AAGTCTAATCTTGAAGGTGCGCTTCTGTGCTCATCCAGTGGTACATCTATGGATTACGTTGAGTGTGT
TACACTTGCAAAAAGAGATCCCTGCCACATCAGGTGGACTGTTCTCTCTCGCCACGGAGAAAACC
ATCTTCATCATCTTCATGCTGGTGGTCTTGTGTCCCTGGCCTTGAATATCATTGAACCTTCTTAT
GTTTCTTCAAGGGCGTTAAGGATCGGGTTAAGGGAAGAGCGACCCCTTACCATGCGACAGTGGTGGC
CTGAGCCCTGCCAAAGACTGTGGTCTCAAAAATATGCTTATTTCAATGGTGTCTCTCACCAACCGCT
CCCTCTCGCTATGCTCTCTCTGGGTACAAGTGGTACTGGCGACAGAAAACAATCTTCTTGGCCG
AATTACAACAAGCAAGCAAGTGAAGCAAACTGGGCTAATTACAGTGCAGAACAAAATCGAATGGGCGAG
GCGGGAAGCACCATCTCACTCCATGCACAGCCTTTTGAATCCCCGATGATAACCAAGAAATCTTAAA
AAACTAGCTGCTGCATGATGAATTACAGCCACTAGCCATTGTGGACCAGCGACCTTCAAGCAGAGCCAGC
AGTCGTGCCAGCAGACCTCGGCTGATGACCTGGAGATCTAC
    
```

图 2 pLVCx43-mCherry 读码框测序结果  
Figure 2 The ORF sequencing results of pLVCx43-mCherry

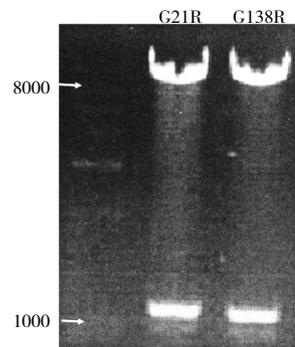


图 3 重组点突变质粒 pLVCx43-mCherryG21R、pLVCx43-mCherry G138R 双酶切电泳结果  
Figure 3 The electrophoresis results of pLVCx43-mCherryG21R and pLVCx43-mCherryG138R by double enzyme cleavage

mCherryG138R 的 DNA 进行双酶切，1 % 琼脂糖凝胶电泳，均可见约 8 kbp 和 1 kbp 大小两条带(见图 3)。重组质粒 pLVCx43-mCherryG21R、pLVCx43-mCherry-G138R 测序结果与预期一致(见图 4)，质粒构建成功。

**2.3 重组慢病毒载体质粒的包装与感染** 重组慢病毒分别感染 B16 细胞 5 d 后，荧光显微镜下即可见细胞有 mCherry 表达。mCherry 的表达随着时间的延长而逐渐增多、荧光增强，见图 5。

**2.4 Western Blot 检测 Cx43 蛋白表达** B16 细胞过表达野生型 Cx43、突变型 Cx43G21R、突变型

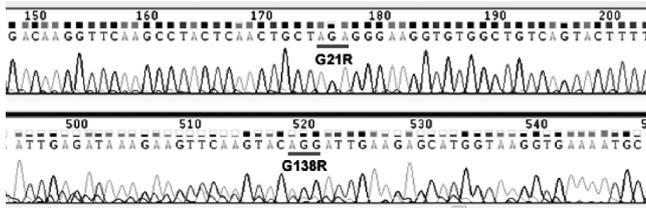


图4 重组点突变质粒 pLVCx43-mCherryG21R、pLVCx43-mCherry G138R 测序结果

Figure 4 The ORF sequencing results of pLVCx43-mCherryG21R and pLVCx43-mCherryG138R

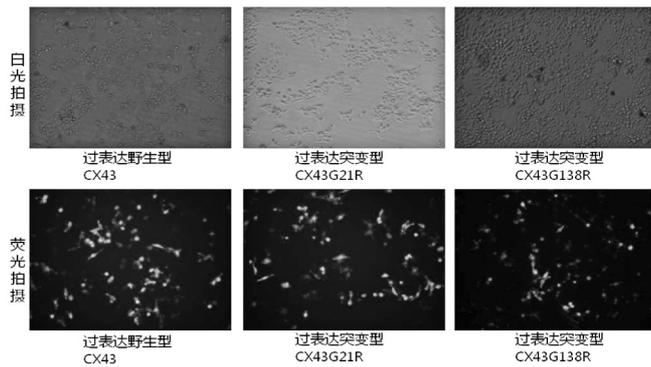
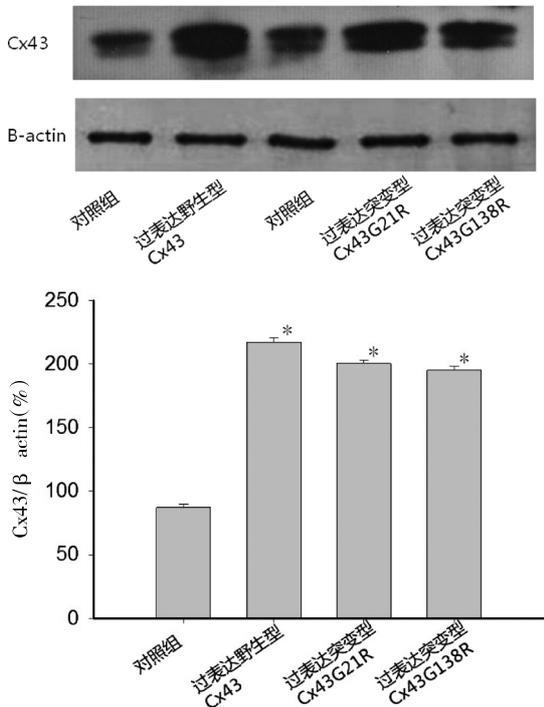


图5 感染 B16 细胞 5 d 后荧光表达情况

Figure 5 The expression of mCherry protein 5 days after transfection



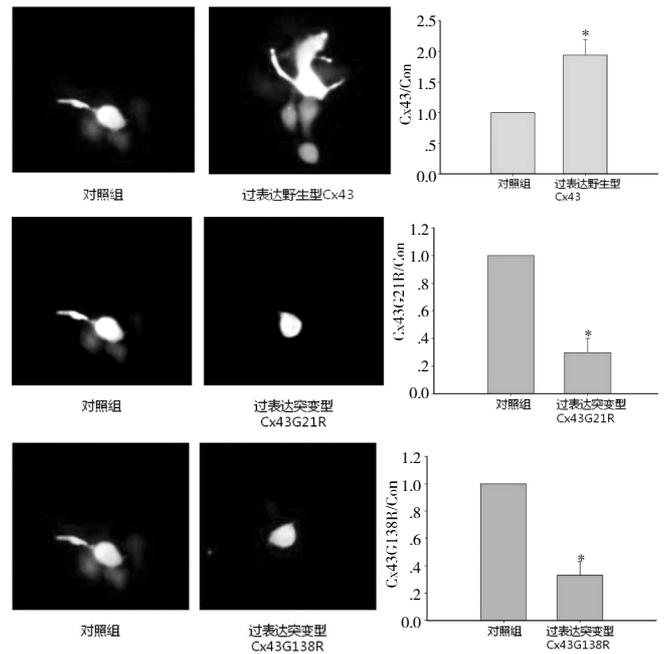
注：与对照组比较，\* $P < 0.05$ 。

图6 B16 细胞过表达野生型 Cx43、突变型 Cx43G21R、突变型 Cx43G138R 后 Cx43 蛋白表达水平( $n=3$ )

Figure 6 The expression of wild-type Cx43, site-specific mutant Cx43G21R and site-specific mutant Cx43G138R in B16 cells detected by Western blot

Cx43G138R, 其 Cx43 蛋白表达量均明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。见图 6。

**2.5 荧光示踪法分析 GJIC 功能** 荧光显微镜观察各实验组细胞 GJIC 功能的情况, 实验组与对照组平均每个供体细胞周围发绿色荧光的受体细胞个数的比值, 作为评价 GJIC 功能的指标。结果显示, 过表达野生型 Cx43 后 B16 细胞间 Calcien 传递较正常组增强, 过表达突变型 Cx43G21R、Cx43G138R 后 B16 细胞间 Calcien 传递较正常组减弱, 见图 7。



注：与对照组比较，\* $P < 0.05$ 。

图7 B16 细胞过表达野生型 Cx43、突变型 Cx43G21R 组、突变型 Cx43G138R 后荧光传递情况及分析( $n=3$ )

Figure 7 Calcien spread through GJ of wild-type Cx43, site-specific mutant Cx43G21R and site-specific mutant Cx43G138R in B16 cells observed under a fluorescence microscope

### 3 讨论

缝隙连接为细胞间通讯提供结构基础, 可允许如无机离子、第二信使分子、细胞代谢次生产物等分子质量 1000 ~ 1600 Da 以下的小分子通过<sup>[14]</sup>。由于小分子物质能通过 GJ 在细胞间相互传递, 对组织中细胞群的代谢和生长具有一定的均衡和协调作用, 从而使细胞间产生代谢协同现象, 即建立代谢偶联, 在细胞的新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理病理过程中发挥着关键的调节作用<sup>[15]</sup>。Cx43 是一种最主要的 Cx, 几乎所有组织均能检测到表达<sup>[5]</sup>。Cx43 不但可以与自身形成同源性对接, 还可与其他 Cx 形成异源性对接。理论上, 过表达野生型 Cx43 能增强 GJIC 功能, 而过表达突变型 Cx43 则能抑制

GJIC 功能。

本实验成功构建 pLVCx43-mCherry、pLVCx43-mCherryG21R、pLVCx43-mCherryG138R 重组荧光蛋白融合慢病毒表达质粒；感染小鼠黑色素瘤 B16 细胞，获得稳定过表达细胞株；病毒感染并筛选后的 B16 细胞，Cx43 蛋白表达均明显增高；荧光示踪法观察分析，证实了过表达野生型 Cx43 可增强 B16 细胞 GJIC 功能，过表达突变型 Cx43G21R 和 Cx43G138R 可抑制 B16 细胞 GJIC 功能。

本课题组前期研究了以中药方药通过改善肿瘤细胞 GJIC 功能对肿瘤自杀基因疗法的增效作用<sup>[16-18]</sup>，采用能促 Cx 表达的维甲酸作为阳性对照，能阻断 GJIC 功能的药物(如甘草次酸)作为阴性对照。但药物易出现失活现象，且维甲酸和甘草次酸都不是 Cx 表达或 GJIC 功能特异的增强剂和抑制剂，影响实验的科学性和准确性。为了使结果更加严谨可靠，构建过表达野生型及突变型 Cx 的肿瘤细胞模型可能是更好的阳性对照和阴性对照。该细胞模型的成功构建，为 Cx43 蛋白亚细胞定位，Cx43 蛋白形成 GJ 或作为膜受体功能研究提供了便利条件；可观察分析体外 B16 细胞 GJIC 功能的改变，为中药方药及其主要成分对肿瘤自杀基因治疗系统增效作用及其机制研究奠定了更好的实验基础。本课题组已制作 B16 细胞过表达 Cx43 及过表达突变型 Cx43G21R、Cx43G138R 的动物模型，以便进一步开展相关研究。

由于 GJIC 具有重要的生理病理作用，许多疾病与 Cx 蛋白异常表达密切相关。不同 Cx 的突变与缺失，可以引起包括肿瘤、畸形、白内障、听力障碍、心血管疾病等细胞异常生长和疾病<sup>[19-20]</sup>。目前，研究 GJ 的特异性工具的缺乏严重阻碍了该领域的研究进展。因此，野生型 Cx43 和突变型 Cx43 病毒载体质粒的构建，也将为 Cx 异常相关疾病的研究提供有用的实验工具。

#### 参考文献：

- [1] Chen YD, Chen XX, Shen LN, et al. Expression of A-kinase anchor protein 95, cyclin E2, and connexin 43 in lung cancer tissue, clinical significance of their expression, and their expression correlation [J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2012, 30(10): 725-729.
- [2] Vinken M, de Kock J, Oliveira AG, et al. Modifications in connexin expression in liver development and cancer[J]. Cell Communication and Adhesion, 2012, 19(3-4): 55-62.
- [3] Finegold DN, Baty CJ, Knickelbein KZ, et al. Connexin 47 mutations increase risk for secondary lymphedema following breast cancer treatment[J]. Clinical Cancer Research, 2012, 18(8): 2382-2390.
- [4] Sirnes S, Honne H, Ahmed D, et al. DNA methylation analyses of the connexin gene family reveal silencing of GJC1 (Connexin45) by promoter hypermethylation in colorectal cancer[J]. Epigenetics, 2011, 6(5): 602-609.
- [5] Naus CC, Laird DW. Implications and challenges of connexin connections to cancer[J]. Nature Reviews Cancer, 2010, 10(6): 435-441.
- [6] Du BY, Guo YR, Yi H, et al. The preliminary research on the gap junction mechanisms for synergistic effects of *liuwei di-huang* pill containing serum on suicide gene therapy of melanoma [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2013, 33(5): 651-658.
- [7] Li S, Gao Y, Pu K, et al. All-trans-retinoic acid enhances bystander effect of suicide-gene therapy against medulloblastomas [J]. Neuroscience Letters, 2011, 503(2): 115-119.
- [8] Garcia-Rodriguez L, Abate-Daga D, Rojas A, et al. E-cadherin contributes to the bystander effect of TK/GCV suicide therapy and enhances its antitumoral activity in pancreatic cancer models[J]. Gene Therapy, 2010, 18(1): 73-81.
- [9] Matuskova M, Hlubinova K, Pastorakova A, et al. HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells[J]. Cancer Letters, 2010, 290(1): 58-67.
- [10] Kandouz M, Batist G. Gap junctions and connexins as therapeutic targets in cancer[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2010, 14(7): 681-692.
- [11] Laird D W. Life cycle of connexin in health and disease[J]. Biochem J, 2006, 394(3): 527-543.
- [12] 杜标炎, 张小贺, 谭宇蕙, 等. 六味地黄丸含药血清调控黑色素瘤 B16 细胞缝隙连接蛋白表达的作用[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(2): 152-156.
- [13] Goldberg GS, Bechberger JF, Naus CC. A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer[J]. Biotechniques, 1995, 18(3): 490-497.
- [14] Sohl G, Willecke k. Gap junctions and the connexin protein family [J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(2): 228-232.
- [15] Burra S, Jiang JX. Regulation of cellular function by connexin hemichannels[J]. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 2(2): 119.
- [16] 王苏萍, 张广献, 杜标炎, 等. 人参总皂苷增强小鼠黑色素瘤 B16 细胞缝隙连接功能[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(5): 437-440.
- [17] 张广献, 杜标炎, 谭宇蕙, 等. 薯蓣皂苷对人肾癌 786-0 细胞缝隙连接功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6): 778-782.
- [18] 易华, 杜标炎, 谭宇蕙, 等. 从 Cx26 探究六味地黄丸增效肝癌自杀基因治疗的机制[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(9): 1200-1204.
- [19] Danik SB, Rosner G, Lader J, et al. Electrical remodeling contributes to complex tachyarrhythmias in connexin43-deficient mouse hearts[J]. Faseb J, 2008, 22(4): 1204-1212.
- [20] Naus CC. Gap junctions and tumour progression[J]. G and J Physiol Pharmacol, 2002, 80(2): 136-141.

(编辑：梁进权)