

经建立^[34]。Mack等^[34]制备的CD₃/17-1A为通过Gly-Ser连接子连接的两个不同的单链Fv片段(bispecific single-chain antibody),分子量为60KDa,与抗原结合能力好且易纯化,体外、动物模型及I期临床均显示了对17-1A阳性肿瘤强烈的细胞毒性。

随着以上问题的解决(抗体人源化及小型化),将把BSAb导向治疗推向一个新高度,使之成为继手术、化疗、放疗之后的新的肿瘤辅助治疗手段。

参考文献

- [1] Milstein C and Cuello A. C., 1983, *Nature*, 305:537-540.
- [2] Webb K S., et al., 1985, *Cancer Treat. Rep.*, 69(6):663-672.
- [3] Kroesen B J., et al., 1996, *Br. J. Cancer*, 73:721-727.
- [4] Kroesen B J., et al., 1995, *Cancer Res.*, 55:4409-4415.
- [5] Weiner, et al., 1995, *Cancer Res.*, 55(20):4586-4593.
- [6] French R R., et al., 1991, *Cancer Res.*, 51(9):2353-2361.
- [7] Sabrina S., et al., 1995, *Br. J. Haemat.*, 90:572-577.
- [8] French R R., et al., 1995, *Br. J. Cancer*, 71(5):986-994.
- [9] 董志伟等, 1995, 中国肿瘤生物治疗杂志, 2(2):99-103.
- [10] Negri D R M., et al., 1995, *Br. J. Cancer*, 72:928-933.
- [11] Shalaby, et al., 1995, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 74(2):185-192.
- [12] Moreno M B., et al., 1995, *Cancer Immunology Immunotherapy*, 40(3):182-190.
- [13] Davico B., et al., 1995, *Int. J. Cancer*, 61(4):509-515.
- [14] 董志伟, 1995, 中国肿瘤生物治疗杂志, 2(4):240.
- [15] Michon J., et al., 1995, *Europ. J. Cancer*, 31A:631-636.
- [16] David J., et al., 1995, *Haematological Oncology*, 13(4):185-200.
- [17] Silla, et al., 1995, *Br. J. Haemat.*, 89(4):712-718.
- [18] Ohta S., et al., 1995, *Immunology Letters*, 44(1):35-40.
- [19] Bakacs T., et al., 1995, *Int. J. Immunol.*, 7(6):947-955.
- [20] Kroensen B J., et al., 1995, *Int. J. Cancer*, 61(6):812-818.
- [21] Christophe P., et al., 1996, *Int. J. Cancer*, 65:377-382.
- [22] Knuth A., et al., 1994, *Europ. J. Cancer*, 30A(8):1103-1107.
- [23] Karine A S., 1995, *Cancer Res.*, 55:4383-4390.
- [24] Tutl, et al., 1995, *J. Immunol.*, 155(6):2960-2971.
- [25] Canevari S., et al., 1995, *J. Nat. Cancer Inst.*, 87(19):1463-1469.
- [26] Cor H J Lamers, et al., *Int. J. Cancer*, 60:450-457.
- [27] Valone Frank H., 1995, *J. Clin. Oncol.*, 13(9):2281-2292.
- [28] Kroesen B J., et al., 1994, *Br. J. Cancer*, 70:652-661.
- [29] Janssen R A J., et al., 1995, *Br. J. Cancer*, 72(3):795-799.
- [30] French Ruth R., et al., 1995, *Lancet*, 346(8969):223-224.
- [31] De Gast, et al., 1995, *Cancer Immunology Immunotherapy*, 40(6):390-396.
- [32] Hattori K., et al., 1995, *Bone Marrow Transplantation*, 15(2):193-198.
- [33] Gideon D M Beun, et al., 1994, *Immunology Today*, 15(1):11-15.
- [34] Mack M., et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92(15):7021-7025.

细胞凋亡与坏死的鉴别及研究方法进展

程尉新 金丽娟

(第一军医大学病理生理教研室 广州 510515)

1972年, Kerr等^[1]首次提出细胞凋亡的概念, 由于对这种细胞死亡的新模式研究有助于

理解胚胎发育、免疫耐受、细胞群体稳定等重要生命现象, 并对认识、治疗爱滋病、癌症这些威

助人类生存的疾患具有潜在价值,有关细胞凋亡的研究很快成为生物领域科研的热点。1980年,Wyllie 等对细胞死亡进行了新分类,把病理因素作用使细胞膜失去完整性导致的细胞溶解称为坏死(necrosis),生理或病理条件下基因控制的细胞死亡称为凋亡(Apoptosis)^[2]。已有学者认为 Oncosis(源于希腊字 *onkos*,意为肿胀)是与细胞凋亡相并存的模式,而坏死是两种模式细胞死亡的终末表现^[3]。这也许更精确,但为了与引用文献一致,本文仍将细胞凋亡与坏死作为细胞死亡的两 种模式使用。通常认为凋亡和坏死是细胞相互排斥的选择,即细胞要么凋亡,要么坏死。但大量实验表明,凋亡和坏死可相继发生;许多因素(如氧自由基)既可引起凋亡,也可引起坏死;在一定条件下,凋亡模式的死亡还可转化为坏死模式的死亡^[4];bc1-2 的过度表达不但抑制细胞凋亡的发生,而且可以保护细胞免受坏死因素的损伤作用;也有实验提示脑部缺血灶的中央是坏死,周围是凋亡^[5]。细胞凋亡的提出也促使人们对传统认为的坏死性细胞死亡重新审视,以便从新的角度进一步认识缺血性心、脑、肾等重要疾病,区分凋亡和坏死及对区分方法的认识或改进就显得尤为重要。本文综合有关文献对此作一初步探讨。

一、细胞凋亡和坏死的区别

细胞凋亡与坏死可以从概念、形态、生化等方面进行区分,为简明起见,以表1描述。

二、鉴别凋亡与坏死的有关方法

1. 检测细胞膜通透性改变的方法

拒染试验 台盼蓝、碘化丙啶(PI)、溴化乙锭(EB)等为膜不通透性染料,可使坏死细胞核着色、活细胞及凋亡细胞不着色。以台盼蓝拒染试验为最常用、且快速、价廉,但一次检测样本有限,且有主观性,难以定量凋亡或坏死的细胞数。另外,有实验发现非固定的凋亡细胞与正常细胞相比,乙酰乙酸盐保留量(表示细胞活力

及膜通透性的指标)下降,merocyanin540 荧光增强(反映脂质双分子层密度下降)^[6],因此,凋亡细胞(特别是晚期的凋亡细胞)膜通透性也是增加的,这种增加是逐步的,与坏死细胞的膜通透性急速增加不同,因而以这种拒染试验区分凋亡与坏死时要慎重排除晚期凋亡细胞。

表1 凋亡与坏死的比较

	细胞凋亡	细胞坏死
概念	形态表现为细胞缩小、核断裂、质膜出芽、凋亡小体形成的细胞死亡	以质膜丧失完整性和电化学梯度、胞浆内容物外泄为特征的细胞死亡
诱导刺激形态特征	生理或病理性膜出芽,芽内含细胞器,膜结构改变,膜完整性逐步丧失、染色质在核膜下半月状聚集	病理性膜起泡,泡内不含细胞器、膜完整性快速丧失 染色质呈絮状
生化特征	细胞缩小、凋亡小体形成、细胞器完整、周围组织正常	细胞肿胀、溶解,无凋亡小体形成,细胞器肿胀变性,周围组织炎症反应
生理意义	能量依赖,4℃不会出现,含高度受控的激活或酶解过程 DNA 断裂发生较早,非随机断裂成50/300kb,接着断裂成180bp 或其整数倍片段 核酸内切酶的作用,有时需大分子(蛋白质)的合成 有时需基因调节	非能量依赖,4℃亦可发生,离子分布稳态失衡 DNA 随机断裂,发生较迟(溶解后断裂) 溶酶体酶的作用,不需蛋白质合成 不需基因调节
	单个细胞死亡、巨噬细胞或邻近细胞吞噬、无炎症反应	细胞群体死亡、巨噬细胞吞噬、明显的炎症反应

拒染试验

Hoechst33342、Hoechst-33258 等为膜通透性染料,可使凋亡细胞着色浓密,这可能与凋亡细胞膜通透性增加有关,也有人认为是P糖蛋白膜泵失活,Hoechst染料从凋亡细胞运出减少所致^[6]。

双重染色

利用对正常和凋亡细胞跨膜通透性不同(也可能还与凋亡细胞DNA与染料结合能力不同有关)的两种DNA染料同时染细胞,为鉴别凋亡或坏死细胞提供了较好的方法。吖啶橙(AO,一种膜通透性较高的染料)和EB双重染色的方法就应用较多。对正常细胞,AO将其染为强绿色,EB染色较弱;对凋亡细胞,AO染色仍为阳性,EB红染轻度增加;对坏死细胞,EB红染明显增强,AO染色却变暗

(EB 诱导 AO 染色猝灭)。PI 和 Hoechst 33258 双染的流式细胞仪及荧光显微镜检查鉴别凋亡或坏死细胞也被广为应用。

释放试验 包括⁵¹Cr、³H-TdR、LDH 等的释放试验^[7-9]。前两者需放射性同位素在实验前标记细胞,仅适用于有增殖或代谢活性细胞。LDH 存在于所有细胞的线粒体,其释放量是较好的判断细胞群体坏死的指标。但是,激活的效应细胞(如细胞毒 T 淋巴细胞)LDH 释放量也增加,在判断其细胞毒性时意义不明确,且 LDH 半衰期短,只限于分析 2—8 小时内的高毒性试验。

2. 检测细胞膜表面标记改变的方法

凋亡细胞早期变化是细胞质膜表面的改变,但对这些改变至今认识不多,其中较肯定的是磷脂酰丝氨酸(PS)从细胞的内表面移位于细胞的外表面。Annexin V(膜联蛋白)是一种 Ca²⁺ 依赖性磷脂结合蛋白,与 PS 有高度亲和力,这种蛋白可作为一种检测 PS 暴露于细胞表面的敏感探针检测细胞凋亡,荧光或生物素标记的 Annexin V 已被使用^[9-10]。但由于细胞坏死时细胞结构破坏,PS 也暴露于细胞外表面,需结合膜通透性指标才能区别凋亡与坏死。但在同时出现凋亡和坏死的标本,即使结合膜通透性指标,晚期凋亡和坏死仍很难区分。

3. 检测细胞骨架改变的方法

细胞缩小、凋亡小体形成都牵涉细胞骨架改变。Grand 等^[11]发现一种与细胞凋亡时骨架改变明显相关的蛋白质,在活细胞及坏死的细胞中均检测不到,故特称为凋亡特异蛋白,用粘附式细胞仪检测凋亡特异蛋白可成为诊断或定量凋亡细胞的特异方法,结合形态指标有助于区分凋亡和坏死。

4. 检测细胞内死亡抗原

Fernandez 等^[12]分离出一种单克隆抗体——BV2,将 BV2 用荧光标记后只染凋亡或坏死的细胞,由此认为凋亡或坏死的细胞内存在一种死亡抗原,BV2 作为这种死亡抗原的特异抗体可用于研究细胞死亡机制。由于坏死细胞 BV2 的染色仅限于细胞浆内的特定部位(高尔

基复合体内),凋亡细胞的 BV2 染色没有这种限制,理论上可一次区分活细胞、凋亡或坏死细胞。

5. 检测染色质改变的方法

在许多(但不是所有)细胞系中,凋亡细胞的形态变化总伴随着内源性核酸内切酶激活介导的染色质的断裂,DNA 在核小体连接区被酶切断,降解为 180—200bp 或它的整数倍的各种片段,这种片段一直被当作凋亡细胞的生物化学标志(hallmark),尽管最近有关形态学和缩时摄影术的证据表明细胞凋亡可以在没有 DNA 断裂的情况下发生^[13-15],但不能否认这种独特的 DNA 断裂发生于绝大多数凋亡细胞,因此检测 DNA 片段的方法仍然是检测凋亡的主要手段^[16]。

(1) DNA 片段琼脂糖凝胶电泳法 从凋亡的细胞中提取的 DNA 由于有 DNA 片段的存在,在含 EB 的琼脂糖凝胶电泳上呈典型的“梯状”条带,坏死时 DNA 随机断裂伴组蛋白降解,在琼脂糖凝胶电泳上呈模糊的膜状条带。这种定性的鉴别方法需较大数目的凋亡细胞的存在,通过 Klenow 聚合酶在 DNA 粘性末端或 T4 多核苷酸激酶在 DNA 5' 端用³²P 标记后可大大提高其敏感性^[17-18],但凋亡和坏死共存时无法鉴别。

(2) DNA 片段的定量 凋亡细胞 DNA 断裂发生于质膜溶解之前,坏死细胞 DNA 的断裂发生于质膜溶解之后,提取具有完整质膜的细胞的 DNA 片段进行定量代表细胞凋亡的程度。DNA 片段的分离及定量方法较多,但都只能反映细胞总体情况,还未发现鉴别凋亡与坏死的较好方法。

(3) TUNEL 及 ISNT 凋亡细胞 DNA 断裂后,其 3' 端可在末端脱氧核苷酸转移酶作用下结合生物素、digoxigenin、或 FITC 等标记的 dUTP,利用这种原理的方法称为“terminal transferase deoxyuridine nick-end labelling”,缩为 TUNEL,这种方法可较容易地用于组织切片或培养细胞的检测,被戏称为检测凋亡的“石蕊试验”。另一种酶介导的 DNA

标记方法,原位缺口翻译(ISNT)是在DNA聚合酶I的作用下将生物素等标记的核苷酸原位掺入DNA缺口,再用免疫组化等方法使细胞染色。一般认为,凋亡细胞双链DNA断裂发生早于非特异性DNA断裂,且明显多于单链DNA断裂,坏死细胞早期亦可发生DNA随机断裂,但与凋亡细胞相比则相当弱;用于TUNEL的末端脱氧核苷酸转移酶既可标记双链DNA断裂,亦可标记单链DNA断裂,但没有核酸外切酶的活性,不能放大DNA断裂处的信号,因而不能分辨稀少的DNA断裂。用于ISNT的DNA聚合酶I具有核酸外切酶的活性,主要用于DNA单链断裂的检测。如果以上假设正确,TUNEL检测凋亡及总的死亡细胞就优于ISNT,但坏死细胞晚期DNA断裂明显增加,TUNEL染色也呈阳性,故不能鉴别凋亡与坏死。细胞坏死时DNA单链断裂较多,加之ISNT可放大DNA断裂处的信号,判断坏死ISNT应该较优,已有实验表明ISNT反应阳性与细胞坏死的形态指标的出现具有较好的相关性。对于机体而言,损伤刺激不可能象试管内实验那样同时作用于所有细胞,某一组织切片可能含有凋亡或坏死各期的细胞,凋亡晚期的细胞出现非特异性DNA断裂,ISNT检测呈阳性,坏死晚期的细胞DNA降解大大增加,没有核酸外切酶活性的末端转移酶也可将其标记,如果死亡机制未明,单靠一种方法就很难辨明是凋亡还是坏死。联合两种方法染系列切片,结合核形态检查就能确定主要的死亡模式而不会忽略次要的死亡模式,从而有利于认识死亡机制^[19]。

(4) 单细胞凝胶分析—彗星分析 单细胞凝胶分析,又称为彗星分析(the comet assay)^[20]是一种直接显示单个细胞DNA损伤的微电泳技术。将少量细胞悬浮于载玻片上的一薄层凝胶内,裂解后电泳,在电流的作用下,带电的DNA移出细胞核,受损DNA或DNA片段移动较快,用与DNA结合的荧光染料染色后,在紫外激发光照射下显示彗星样图案。细胞凋亡时DNA在质膜损伤以前断裂,这种断

裂很容易被这种方法显示,被称为“凋亡彗星”,凋亡彗星的数量可代表凋亡细胞的数量,其荧光强度的测量可用于DNA片段的定量。细胞凋亡时,DNA断裂一旦启动,很快结束,几乎不存在中等程度DNA的损伤;坏死时DNA被动降解,各种程度的损伤都可能存在,因此,这种方法有可能将凋亡和坏死分开。

(5) 流式细胞仪检测 用流式细胞仪定量凋亡细胞的方法多种多样,尽管对其检测原理都不完全清楚,但凋亡细胞染色质结构的改变在多种检测中都被使用,因此在此一并讨论。

经典方法:Nicoletti等^[21]介绍的用PI染色的方法被广泛采用,是流式细胞仪检测凋亡的经典方法。凋亡细胞经乙醇固定、低渗打洞、PI染色后,用流式细胞仪检测荧光标记的DNA含量,在DNA直方图上出现DNA含量减少的亚二倍体峰,经证实该区的细胞即凋亡细胞。而坏死时,细胞周期中的细胞均出现不同程度的减少,亚二倍体细胞量多少不等。但当凋亡和坏死共存时难于分辨。在光散射图谱上^[22],凋亡细胞出现低于正常的前散射(反映细胞大小)和高于正常的侧散射(反映细胞内的颗粒性),坏死时则呈较高的前、侧散射光谱,光散射特征可以和DNA含量联合应用检测凋亡。

多重染色法:经典PI染色遇到的问题可以用双重染色法解决。Hoechst33342和PI双染的方法较为多用^[23]。用TUNEL-FITC和PI双染等标记细胞在流式细胞仪检测,可测出不同细胞周期时相发生的凋亡。上述AnnexinV、BV2等标记细胞后均可用于流式细胞仪检测,结合上述双染法很可能既灵敏又特异,但因费用昂贵,其应用受到限制。

7-氨基放线菌素D(7-AAD)染色流式细胞仪检测^[24-25]:7-AAD是一种DNA插入型染料,它选择性地结合于胞嘧啶与鸟嘌呤之间。很多实验表明,用7-AAD染色在7-AAD荧光强度与前散射的散点图上一次就可分出活细胞(7-AAD染色阴性)、凋亡细胞(7-AAD染色弱)、坏死细胞(7-AAD染色强)三种细胞群,而

且,7-AAD的激发光波长为488nm、发射光波长为650nm,这种发射光波长与R-藻红蛋白只有较少重叠,用一般的流式细胞仪单激发光即可进行多色检测。7-AAD检测的细胞在2%多聚甲醛固定前染色,染色时细胞的形态或生理特性被保存,细胞渗透性没有改变,可反映凋亡或坏死细胞的早期变化。固定后进行流式细胞仪检测,可能感染的样本也不会对工作人员造成危害。该方法测定时并不依赖断裂的低分子量DNA片段的漏出,三群细胞很可能是反映细胞膜生理状况改变的不同,这有利于研究细胞死亡的机理。这种方法快速而且相对价廉,加之流式细胞仪本身的特性,是鉴别凋亡与坏死的较好方法。

6. 细胞形态指标及检测细胞死亡的“金标准”

相差显微镜、扫描电镜、荧光显微镜、透射电镜甚至普通光镜都可不同程度地区分凋亡或坏死在不同阶段的表现。Moffitt^[26]提出甲基绿-派诺宁染色区分凋亡和坏死的方法:凋亡细胞的细胞质内可见致密的派诺宁红染颗粒,坏死细胞的细胞质内由于RNA合成较少就没有这种颗粒。透射电镜是较可靠的方法,但费时、费力、不易定量,大量标本的检查几乎是不可能的。粘附式细胞仪具有多种用途,可将细胞各个切面的形态检查与大分子的定位结合起来,并具有统计的功能,可较好地鉴别不同细胞的凋亡与坏死。但组织或细胞标本通常含有包括凋亡或坏死不同阶段的各种细胞,单用某种手段就可能漏检,特别是某些小量的或短时间内发生的细胞死亡。不同的固定方法造成的某些人工假象使得形态指标不能重复因而更加不可靠。缩时摄影术(Time-lapse photography)可排除以上问题,被公认为检测细胞死亡的“金标准”^[27],但由于这种检测需要昂贵的设备及特殊的技能而并未广泛应用。

三、结 语

目前对细胞死亡的机制了解甚少,检测方

法的进展也就受到了限制,随着认识加深,某些方法很可能因不合理而被淘汰,同时,检测方法的改进也将加快对死亡机制的认识,而对死亡机制的认识有助于理解重要的生物现象,对诊断和治疗人类疾病将有深远意义。

摘 要

细胞死亡有两种模式:凋亡和坏死。本文从形态、生化指标等方面讨论两者的区别,并着重比较各种研究方法,包括检测凋亡的“金标准”、死亡抗原、凋亡特异蛋白、TUNEL和ISNT、彗星分析、流式细胞仪在鉴别凋亡和坏死中的作用,结合有关研究方法的进展寻求研究目的相关的优化选择。

参 考 文 献

- [1] Kerr, J. F. R. et al., 1972, *Br. J. Cancer*, **26**: 239-257.
- [2] Wyllie, A.H. et al., 1980, *Int. Rev. Cytol.*, **68**: 251-306.
- [3] Majino, G. et al., 1995, *Am. J. Pathol.*, **146**: 3-15.
- [4] Fernandes, R.S. et al., 1994, *Biochem. Pharmacol.*, **48**(4): 675-681.
- [5] Bär, P.R., 1996, *Life Sci.*, **59**(5-6): 369-378.
- [6] Ormerod, M. G., et al, 1993, *Cytometry*, **14**: 595.
- [7] Keiholz, U. et al., 1990, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **50**: 879-885.
- [8] Decker, T. et al., 1988, *J. Immunol. Methods*, **15**: 61-69.
- [9] Koopman, G. et al., 1994, *Blood*, **84**(5): 1415-1420.
- [10] Vermes, I. et al, 1995, *J. Immunol. Methods*, **184**: 39-51.
- [11] Grand, R. J. A. et al., 1995, *Exp. Cell Res.*, **218**: 439-451.
- [12] Fernandez, P.A. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. USA.*, **91**: 8641-8645.
- [13] Kulkarni, G. V. et al., 1994, *J. Cell Sci.*, **107**: 1169.
- [14] Cohen, G. M., et al, 1992, *Biochem. J.*, **286**: 331.
- [15] Cohen, J. J., 1994, *J. Lab. Clin. Med.*, **124**: 761.
- [16] 张亚历等, 1995, *细胞生物学杂志*, **17**: 127-129.

- [17] Rosl, F. A., 1992, *Nucleic Acid Res.*, **20**: 5243.
- [18] Huang, P. et al., 1992, *Anal. Biochem.* **207**: 163.
- [19] Gold, R., et al., 1994, *Lab. Invest.* **71**(2): 219-225.
- [20] Oliver, P. L. et al., 1993, *Radiat. Res.*, **136**: 130-136.
- [21] Nicoletti, I. et al., 1991, *J. Immunol. Methods*, **139**: 271-279.
- [22] Huschtscha, L. I. et al., 1994, *Exp. Cell Res.*, **212**: 161-165.
- [23] Darzynkiewicz, Z. et al., 1992, *Cytometry*, **13**: 795.
- [24] Schmid, I. et al. 1994, *J. Immunol. Methods*, **170**: 145-157.
- [25] Phipott, B. N. J. et al., 1996, *Blood*, **87**(6): 2244-2251.
- [26] Moffiti, P., 1994, *Cell Biol. Inter.*, **18**(6): 677-679.
- [27] Evan, G. I. et al., 1992, *Cell*, **69**: 119.

神经丝的结构与功能

佟向军 陈建国 翟中和

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

神经丝(Neurofilaments, 简称NFs)属于中间丝蛋白家族的第IV类型,广泛存在于动物的成熟神经元中。在有髓鞘的轴突中,神经丝是最为丰富的一种骨架成分,几乎充满整个轴浆^[1]。神经丝是典型的10nm纤维,轴突内的神经丝互相平行排列,神经丝之间以及神经丝与相邻微管之间存在直径3-6nm,长20-50nm的横桥连接,这些特征与其他类型的中间丝在组织形态上有显著不同^[2]。神经丝、微管连同轴突质膜下的带状微丝网一起构成轴浆细胞骨架,这一骨架网络与轴突形态的维持和轴浆运输有密切关系。在胞体内,神经丝呈随机分布,横桥结构较少,树突内神经丝沿微管束紧密排列^[2]。

一、神经丝的成分

在所有的中间丝类型中,神经丝可能是最为复杂的一类。研究表明,哺乳类的神经丝主要由三种蛋白组成,它们的电泳分子量分别为68KD(低分子量神经丝蛋白,简称NF-L),160KD(中等分子量神经丝蛋白,简称NF-M)和200KD(高分子量神经丝蛋白,简称NF-H),习惯上称之为神经丝蛋白三组分(Neurofilaments Triplet Proteins,简称NFTPs)^[3]。

与其它中间丝蛋白一样,神经丝蛋白在二级结构上由三部分组成:约含310个氨基酸的

α -螺旋杆状区,非螺旋的氨基末端和羧基末端。与NF-L及其他中间丝蛋白相比,NF-M和NF-H的分子量要大得多,这主要是因为它们的C端“尾巴”很长(分别有438和676个氨基酸)。用抗NF-M和NF-H的C端的抗体标记轴突中的神经丝,发现标记位点在神经丝间横桥以及横桥基部,核心纤维上没有标记;抗NF-L的C-末端或杆状区的抗体则标记在核心纤维上^[2]。用较温和的方法提取神经丝,金属投影法显示神经丝是一个灯刷状结构:主体是直径10nm的核心纤维,从核心纤维上每隔22nm向外伸出2-4根丝状侧臂(side arms),而仅由NF-L体外重组成的纤维则没有这些侧臂存在^[4]。抗NF-H和NF-M的C端抗体标记在侧臂上^[5]。以上事实说明,NF-M和NF-H的C-末端非螺旋区不参与10nm纤维的构建,而是突出于纤维表面,构成神经丝间横桥结构。

二、编码神经丝蛋白的基因

三种神经丝蛋白是由三个独立的基因分别编码的,习惯上分别记作nfl、nfm和nfh。其中nfl和nfm位于同一染色体上,紧密连锁^[6],nfh处于另外的染色体上。三个基因的同源性很强,并且前两个内含子的位置是完全相同的,它们可能起源于同一个原始基因^[7]。

神经丝蛋白基因在进化上是比较保守的。