

植物微管和微丝骨架研究的进展

简 介

(北京,中国科学院植物研究所 100044)

自从1963年Ledbetter和Potter以及Slau-therback几乎同时分别在植物和动物细胞的超薄切片中发现微管骨架以来,细胞骨架一直是细胞生物学中活跃的前沿研究领域,每年有大量的论文发表,并不断有许多综述和专著^[1-3]。由于种种原因,植物细胞骨架研究在它的进程中落后于动物细胞骨架,但是近年来也取得一些新进展。本文仅就植物微管和微丝骨架研究的进展作一个简要的介绍。

一、植物微管蛋白的分离及化学特性

微管是由专一性的微管蛋白组成。动物微管蛋白的分离在60年代末就取得了成功,但植物细胞中由于其含量少,给分离提取工作带来很大困难。直到80年代初,由于应用了动物微管蛋白与植物微管蛋白的共同聚合,才使得植物微管蛋白的分离获得成功^[4]。这种情况再次证明,动植物微管蛋白有着相同的化学特性和聚合机制。继而又应用植物碱—紫杉酚(Taxol)从植物中直接分离微管蛋白获得成功^[5]。Mizuno等^[6]从6种高等植物中分离出来的微管蛋白发现,不同种植物的微管蛋白有着不同的电泳移动速度;并揭示植物微管蛋白与动物微管蛋白有着明显的区别,例如从豇豆中分离出来的植物微管蛋白与从兔脑中分离出来的动物微管蛋白是不一致的。在植物中, α -微管蛋白所含酸性氨基酸比 β -微管蛋白多一些;同时, α -微管蛋白比 β -微管蛋白的电泳移动速度也快些。

近年来,由于采用单克隆抗体技术,结果无论在动物或植物细胞中均发现微管蛋白的异

型(Isotypes),例如从胡萝卜悬浮培养细胞中分离出来的微管蛋白,包含4种 α -微管蛋白和2种 β -微管蛋白异型。从菜豆根尖和茎尖中分离出来的微管蛋白包含4种 α 和4种 β 异型。已经初步查明,微管蛋白异型可能是由于不同微管蛋白基因的表达,或者是由于转译后修饰的结果^[7]。微管蛋白的异型性对于微管结构与功能的进一步研究具有重要意义。

二、植物细胞内微管的组织中心

在细胞周期和个体的整个生长发育过程中,微管的分布和功能处于不断的动态变化之中。超微结构的研究表明,无论是动物或植物,微管的组装依赖于微管的组织中心(MTOC)。中心粒在组建微管体系中的作用已在低等植物、真菌和动物方面有大量的报道。然而高等植物细胞内没有中心粒,它们的MTOC是什么,位于什么部位,是什么结构?如何建立和保持十分复杂和动态的微管结构?这是植物细胞骨架的一大特点。业已查明,蕨类植物满江红(Azolla)根尖细胞间期周质微管的组织中心位于细胞的边角区^[8]。这种MTOC的结构是一种由微管、不规则的小泡和浓密基质构成的复合物,其中的小泡与微管的形成有专一性的联系。这种MTOC在玉米、豇豆、梯牧草、铁线蕨的气孔保卫细胞中,以及沙草的根尖细胞中也被观察到。在烟草和小麦叶片细胞分离原生质体膜的铜网粘附-负染色制片中,也清晰地显示出周质微管的组织中心^[9]。

近年来,通过免疫荧光细胞化学的观察,对MTOC的精确定位有许多新发现,揭示植

物细胞的间期微管,除周质微管外,还与动物细胞一样存在着胞质微管。这种微管从核膜呈辐射状伸展到质膜,核膜可能是它的组织中心^[10]。从间期末开始逐渐形成的早前期带微管,其组织中心也可能是核膜。

大量的观察结果指出,有丝分裂中的纺锤体微管是起源于染色体的着丝粒和纺锤体极。在胞质分裂过程中形成的成膜体也是微管的组织中心,在成膜体的边缘聚集着不定形的物质和小泡,类似于其他MTOC的结构^[2]。

三、植物微管的异质性

业已揭示,植物周质微管对影响因子有着不同的稳定性。例如在化学固定剂的作用下,细胞内的微管表现不同的稳定性。植物不同发育阶段中的微管对低温和咖啡碱的作用也存在不同的稳定性。关系到初生壁沉淀的微管比关系到次生壁形成的微管稳定性小。一些实验结果指出,在秋水仙素和低温处理后,只有一部分微管被破坏。近些年来,本文作者对多种不同抗寒性植物的微管在低温处理后的动态进行了大量的工作,结果发现,不同抗寒性植物的微管对低温的反应有着显著的差别,不抗寒植物的微管对低温是敏感的,而抗寒植物的微管则具有抗冻性能,其抗冻程度(微管的冷稳定性)与植物种类的抗寒性成正相关;并发现抗寒植物的微管在低温锻炼后,其冷稳定性获得提高^[11,12]。

关于调节微管稳定性的因子目前尚知之甚少,可能与微管蛋白本身的化学特性的变异有关,但微管蛋白的异型性与微管的稳定性有何内在联系目前尚无实验证据。已知在动物体系中,微管连接蛋白(MAPs)对微管的聚合作用和稳定作用有极大的影响^[3]。Lachney和Lonergan(1985)的试验结果是有启示性的,他们用去污剂抽提 *Euglena gracilis* 的细胞后,其微管对冷和秋水仙素的解聚作用的抵抗力就消失^[13]。这说明,被去污剂抽提出来的物质是同微管的稳定性相联系的。

四、微丝分布广泛性的新发现

O'Brien 和 Thimann最先在非肌细胞——燕麦胚芽鞘细胞中发现微丝结构,测出其纤维丝的直径为7 nm,它们成束地分布在细胞质中^[14]。此后,Parthasarathy 和 Muhlethaler广泛调查了12种植物的根、茎细胞(正处于伸长中的细胞)中的微丝的分布,结果在所有被观察的植物细胞中均有微丝的存在,因此他们得出结论,“微丝普遍存在于植物细胞中”,并描述了几种重要的分布特征:(1)微丝通常是成束地分布于细胞的周缘细胞质中;(2)其走向一般平行于细胞长轴;(3)在等径细胞中,一般见不到微丝的存在^[15]。

微丝体系的分布位置与其在胞质川流中的作用是一致的。在 *Heracleum mantegazzianum* 植物的叶柄毛细胞中观察到微丝束与胞质川流颗粒具有特异性的联系,各种细胞器常附着在微丝索上^[15]。在周缘细胞质及穿越液泡的细胞质带中常常可以找到微丝束的存在,这里恰是胞质川流的部位。

近年来,通过荧光标记,特别是通过荧光素标记的鬼笔环肽(phalloidin)的研究,揭示微丝在植物细胞内有着广泛的分布:(1)它与微管一起形成一个从核膜到质膜的辐射状的网络体系;(2)在早前期带、纺锤体及成膜体中也有大量微丝的存在^[16]。还在不少实验中发现,植物细胞的周质中,微丝与微管形成精确的平行排列^[16]。这二者之间可能还存在相互作用的关系,有实验指出,周质微管的破坏会引起周质微丝的重组;相反,微丝的破坏会引起微管的重组^[2]。

五、微管与微丝骨架的功能

已知细胞骨架具有许多重要的生理功能,例如维持细胞的形态,执行细胞的各种运动(如染色体运动、胞质流动、纤毛和鞭毛运动等),细胞的有丝分裂,胞质分裂、胞内物质运输,以及细胞壁构建和形态发生等。本文只

就植物细胞骨架的两个特征性功能：即控制细胞壁的构建和细胞质运动作一个评述。

1. 关于微管骨架与细胞壁构建的关系

迄今，已有大量的研究结果揭示和证实，微管骨架与细胞壁纤维素的沉淀有密切的关系。研究的模式材料是导管分子和气孔保卫细胞。从这些材料中观察到：(1) 微管的定位部位与细胞壁纤维素沉淀部位呈现一致的相关性；(2) 质膜是纤维素微纤丝合成组装的部位；(3) 微管与微丝骨架在靠近质膜的内侧形成一个网络体系；(4) 药物处理后，微管骨架的改变与细胞壁微纤丝沉淀的变化相一致。

细胞壁的多层次加厚与微管排列的一致性进一步证明纤维素微纤丝沉淀与微管骨架的密切关系。绿藻 *Oocystis* 是研究这种关系的极好的模式材料。*Oocystis* 的细胞壁由 20—30 层微纤丝构成，每层为一层微纤丝，各层的方向彼此成直角交叉。质膜内侧中的周质微管的排列方向总是与正处于新合成中的纤维素层相平行^[17]。

棉花纤维细胞壁也是由多层不同平行排列方向的微纤丝层组成的。在棉花纤维细胞壁次生加厚过程中，周质微管数量显著增加，同时其排列方向与新形成的微纤丝层方向是一致的^[18]。

关于控制机理的细节目前尚未深入了解，但已提出多种假设^[2]：(1) 认为微纤维素的排列方向是直接由微管连接微纤维合成酶决定的；(2) 认为微纤维合成酶桥连在微管上，并通过与微管相连的微丝肌动蛋白的作用，使合成酶沿着微管移动，因此合成的微纤维的方向与微管相平行；(3) 认为微管与质膜发生连接后，改变了膜的流动性，通过这种改变了的膜流动性控制微纤维合成酶沿着微管平行移动。

2. 关于微丝骨架与细胞质流动的关系

研究的模式材料是轮藻 (*Chara*) 和丽藻 (*Nitella*)；在高等植物方面是萌发中的花粉管。业已证明，丽藻细胞质中的微丝与胞质环

流有密切关系。电镜观察表明，成束的微丝出现在内质与外质的交界面上，与环流方向平行。

细胞松弛素 B 的处理可以停止环流的实验，为微丝的肌动蛋白性质作了进一步的验证。界面上的各微丝束有着相同的极性，说明各种细胞质颗粒为什么在环流中均朝着一个方向流动。还从丽藻细胞质中分离出肌球蛋白，并通过与肌动蛋白的结合，证明它具有 Mg-ATP 酶的性质。肌动蛋白和肌球蛋白在内外质的界面上形成三维的网络结构。肌动蛋白是位于外质中，肌球蛋白是位于内质中。同时，肌球蛋白与流动的细胞质颗粒相连接的。在有 ATP 存在的条件下，细胞质颗粒可以沿着肌动蛋白移动，运动的方向是和肌动蛋白纤维的极性是一致的^[19]。

这些研究结果表明，环流的机制是由于内外质界面上存在着肌动蛋白和肌球蛋白的三维网络体系；肌球蛋白连结着胞质颗粒，并水解 ATP 释放出能量，使肌球蛋白-胞质颗粒结合体沿着肌动蛋白微丝束滑动，从而带动了整个细胞质进行环流。

对高等植物萌发花粉管的研究证明，花粉管中原生质的流动是肌动蛋白和肌球蛋白相互作用的结果，并且是花粉管生长的动力^[20]。通过电镜观察、重酶解肌球蛋白的标记及肌动蛋白的分离等多方面的测试，发现绿豆、玉米及花椰菜等植物线粒体中确实存在肌动蛋白的微丝结构，揭示肌动蛋白和肌球蛋白的结合体系可能是线粒体膨胀与收缩运动的分子基础^[21]。

六、微管与微丝骨架的基因调节

1. 关于植物微管蛋白 (Tubulin) 基因的研究

多数工作是集中在单细胞衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 的研究^[22]。已经查明 mRNA 合成和 Tubulin 合成之间的相关性，每合成一个分子的 Tubulin 需要先合成 4 种 Tubulin

mRNA, 即两种 β -Tubulin mRNA 和两种 α -Tubulin mRNA。在 α -和 β -Tubulin mRNA 之间不产生交叉杂交, 表明它们是分离的基因。并揭示鞭毛微管蛋白和纺锤体微管蛋白之间的任何异质性都是由于转译后修饰的结果。通过绿藻与动物和真菌体系 Tubulin 基因之间基本序列的比较, 显示 Tubulin 基因的高度保守性, 并阐明了 Tubulin 高度保守性的原因^[22]。

近年来, 也对一些高等植物的微管蛋白基因进行了分离鉴定。以衣藻的 β -Tubulin 的 cDNA 为探针, 从棉花中分离出两种 β -Tubulin 基因, 并分析了这些基因的序列^[23]。用鸡的 β -Tubulin cDNA 为探针, 也从豇豆中分离出 β -Tubulin 基因。通过基因组的限制性消化指出, α -和 β -Tubulin 基因是一前一后交替纵向排列的, 每个单倍体基因组具有 20 个拷贝^[24]。这种结构与早先在动物和真菌中发现的很分散的 Tubulin 基因结构是有差别的。

在拟南芥菜的研究中^[25], 发现一个相当大的 β -Tubulin 基因家族。分析了 5 个明显的 β -Tubulin 基因, 其中两个是紧密连锁在一起的; 其他 3 个在基因组中是散开分布的。在这些基因之间, 没有观察到交叉杂交现象, 这表明, Tubulin 基因在进化中是一个很古老的分支。

2. 关于植物肌动蛋白(Actin)基因的研究

像 Tubulin 基因一样, 植物 Actin 基因也是多基因家族的^[26]。已从棉花和玉米中分离出 Actin 基因, 并进行了序列分析^[27]。从这些植物基因中演绎出来的肌动蛋白氨基酸序列很类似于动物肌细胞的肌动蛋白。DNA 的序列分析表明, 植物 Actin 基因与动物和真菌之间有着惊奇的异质性。在植物与动物之间, 或植物与真菌之间, Actin 基因的 DNA 序列分别只有 10—14% 及 17—18% 的氨基酸编码是可以相互取代的^[28]。

在植物 Actin 基因当中, 某些区域是高度保守的, 特别是对那些为植物特有的 Actin 基因所编码的蛋白质 NH_2 -末端序列是高度保

守的。在植物 Actin 基因中, 内含子 (intron) 序列的位置也是高度保守的, 这与动物、真菌及原生动物的 Actin 基因中内含子的差异替换是相反的^[27]。

在对棉花的研究中, 已鉴定出 6 个 Actin 基因, 分为 3 种类型, 每种类型含一对基因^[28]。由于植物 Actin 异型尚无报道, 因此有关 Actin 基因的不同类型的功能意义尚不能了解。目前仅仅知道的是, 这些不同类型的 Actin 基因是在植物不同器官的分化中表达出来的。因此, 它们可能与发育的调节有关。以下的可能性也是存在的, 即 Actin 基因的多类型性可能与 Actin 具有多种功能有关^[28]。

摘 要

从以上叙述的资料中可以看出, 近年来在植物微管蛋白的分离及其化学性质、微管的组织中心、微管的异质性、微丝的分布, 以及微管和微丝骨架的功能及基因调节等方面的研究取得不少新的进展; 特别是从植物中直接分离微管蛋白取得成功、以及微管蛋白异型、微管冷稳定性与植物抗寒性的关系及微丝分布广泛性等的发现, 对植物细胞骨架的进一步研究具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Lloyd, C. W. (Ed), 1982, *The Cytoskeleton in Plant Growth and Development*, Academic Press, New York.
- [2] Seagull, R. W., 1989, *CRC Critical Rev. in Plant Sciences*, 8(2): 131.
- [3] Shay, D. G., 1986, *Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton*. Plenum Press, New York.
- [4] Slabas, A. R. et al., 1980 *FEBS Lett.*, 110:77.
- [5] Morejohn, L. C. & D. E. Fosket, 1982, *Nature*, 297: 426.
- [6] Mizuno, K., 1985, *Cell Biol. Int. Rep.* 9: 13.
- [7] Cleveland, D. W. & K. F. Sullivan, 1985, *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 331.
- [8] Gunning, B. E. S., 1980, *Eur. J. Cell*

- Biol.*, 23:53.
- [9] 简令成等, 1984, 实验生物学报, 17: 149.
- [10] Falconer, M. M. et al., 1988, *protoplasma*, 144: 46.
- [11] 简令成等, 1989, 植物学报, 31: 737.
- [12] Jian Ling-cheng et al., 1984, Abstracts of the Papers Presented at the Third International Congress on Cell Biology, Tokyo, Japan, P. 490.
- [13] Lachney, C. E. & T. A. Lonergan, 1985, *J. celi Sci.*, 74: 219.
- [14] O'Brien, T. P. & K. V. Thimann, 1966, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 56: 888.
- [15] Parthasarathy, M. V. & Muhlethaler, K., 1972, *J. Ultrastruct. Res.*, 38: 46.
- [16] Seagull, R. W. et al., 1987, *J. Cell Biol.*, 104: 995.
- [17] Sachs, H. et al., 1976, *Cytobiologie*, 14: 49.
- [18] Seagull, R. W., 1986, *Can. J. Bot.*, 64: 1373.
- [19] Shimmen, T. & M. Yano, 1986, *Protoplasma*, 132: 129.
- [20] 马永泽, 阎隆飞, 1988, 植物学报, 30: 285.
- [21] 阎隆飞等, 1984, 生物化学与生物物理学报, 16: 399.
- [22] Cleveland, D. W., 1987, *J. Cell Biol.*, 104: 381.
- [23] Gultinan, M. J. et al., 1987, *Plant Mol. Biol.*, 10: 171.
- [24] Raha, D. et al., 1987, *Plant Mol. Biol.*, 9: 565.
- [25] Marks, M. D. et al., 1987, *Plant Mol. Biol.*, 10:91.
- [26] Hightower, R. C. & R. B. Meagher, 1986, *Genetics*, 114: 315.
- [27] Shah, D. M. et al., 1983, *J. MOL. Appl. Genet.*, 2:111.
- [28] Hightower, R. C. & R. B. Meagher, 1984, *EMBO J.*, 3[2]: 403.

研究工作

云南宣威肺腺癌细胞系 SLC-89 的建立及其生物学特性

陈志龙 朱玉琨 阎伟 马世兴 莫宽 黄丽娜

(昆明, 成都军区昆明总医院单克隆室 650032)

云南宣威是我国肺癌的高发地区^[1], 建立宣威肺癌细胞系对于肺癌的研究有着较为重要的意义。我们从1989年2月开始建立了一株宣威肺癌细胞系, 现报告如下:

材料和方法

一、病例 患者曾××, 男, 42岁, 宣威县人。1989年2月10日手术切除左上肺癌组织, 病理诊断为肺低分化腺癌, 部分呈透明细胞腺癌改变, 并肺门淋巴结转移。

二、建系经过

1. 取材 从肺癌病灶中选取出血坏死较少的癌组织, 用GKN液洗去血液, 剪至约1mm大小, 接种于35mm培养皿中培养。培养液为RPMI 1640,

含小牛血清20%, 青链霉素各100单位/ml, 谷氨酰胺400μg/ml, 用5%碳酸氢钠调pH至7.0—7.2。放入含5%CO₂培养箱于37℃静止培养。

2. 培养经过 培养物每2—3天换液1次, 6天后肺癌组织周围有上皮样细胞长出, 并伴有巨噬细胞和成纤维细胞, 还可见淋巴细胞和红细胞。培养15天后, 把培养皿中生长的细胞转入24孔塑料板中, 培养到第27天, 悬浮的组织细胞大部死亡, 上皮样细胞活性较好, 贴壁生长, 其上可见单个或3—4个一起的透亮圆细胞, 此时细胞开始增殖, 但很缓慢。至培养第61天, 细胞增殖加快, 进行传代培养, 半个月后又传1代, 至培养第95天已传4代。此后细胞生长旺盛, 形态仍为上皮样, 平铺生长, 其上圆细胞较多。此时上皮样细胞贴壁较紧, 需要用胰蛋白酶消化