

# 鼠胚成纤维细胞中间丝-核纤层-核骨架结构体系的研究\*

高健刚\*\* 李秀玲 韩贻仁  
(山东大学生物系 济南 250100)

中间丝-核纤层-核骨架(Intermediate Filament-Lamina-Nuclear Matrix, IF-L-NM)体系是当前细胞生物学研究中受到重视的一个领域,从形态结构、组成到功能多方面都得到了广泛的研究,并已取得了较大的进展。已有资料表明,中间丝-核纤层-核骨架体系不仅对维持细胞的形态起重要作用,还参与了细胞内诸如DNA复制、基因表达及调控等一系列重要的生命活动<sup>[1,2]</sup>。目前中间丝-核纤层-核骨架体系的研究多是以培养细胞(HeLa细胞, BHK 21细胞等)、植物细胞和低等动物细胞为研究对象<sup>[3-6]</sup>,而对动物胚胎发育中IF-L-NM结构体系的研究工作做得比较少,主要是用免疫荧光和电泳技术研究中间丝蛋白的变化,形态结构的显示仍局限于使用常规树脂包埋,结果一直不理想<sup>[7]</sup>。本文首次把选择性抽提和整装细胞电镜制样技术应用于小鼠胚胎成纤维细胞IF-L-NM的研究,其结果可以对哺乳动物胚胎发育中IF-L-NM的工作有新的补充。

实验中使用12.5天小鼠胚胎成纤维细胞,利用电子显微镜、间接免疫荧光、SDS-PAGE电泳和Western-blot技术对其IF-L-NM的形态结构和蛋白成分进行了研究。

## 材料和方法

### 一、细胞培养

使用129品系小鼠,从12.5天小鼠胚胎中制备成纤维细胞,参考Doetschman等的方法制备和培养<sup>[8]</sup>。

### 二、鼠胚成纤维细胞扫描电镜样品的制备

取洁净的小玻片,涂上一层多聚赖氨酸,使成纤维细胞长在玻片上。细胞先用2.5%戊二醛固定1hr, PBS洗3次,再用1%锇酸固定30min, PBS洗,梯

度乙醇脱水,转移到乙酸异戊酯中。CO<sub>2</sub>临界点干燥,真空喷镀金膜,在S-520扫描电子显微镜下观察。

### 三、整装细胞中间丝-核纤层-核骨架结构电镜样品的制备

参照Wolosewick和Porter的方法<sup>[9]</sup>,在覆有Formvar膜并喷镀一层碳膜的镍网上,涂一层多聚赖氨酸,使鼠胚成纤维细胞长在镍网上,当细胞覆盖约为60%时,对网上的细胞进行分级抽提,基本参考Fey和Penman的方法<sup>[10]</sup>,先用含0.5%Triton X-100的细胞骨架缓冲液(CSK液)处理5min,再用含1%Tween 40和0.5%脱氧胆酸钠的RSB-Magik液处理5min,以上步骤在4℃进行,然后用含DNase I (300 μg/ml)的消化液在37℃作用30min,最后加入(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>使其终浓度达0.25 mol/L,处理4min,存留的即为核骨架-核纤层-中间丝结构体系。抽提后的细胞在CSK液中漂洗后,用2.5%戊二醛固定30min, PBS洗,锇酸固定20min,梯度乙醇脱水,然后用乙酸异戊酯置换,CO<sub>2</sub>临界点干燥,不经任何染色,在JEM-100 CX透射电镜下观察。

### 四、鼠胚成纤维细胞的间接免疫荧光实验

参照Osborn等的方法<sup>[11]</sup>,长在玻片上的细胞经甲醇-20℃固定10min,丙酮-20℃固定5min, PBS漂洗,与第一抗体(分别为波形蛋白单抗、角蛋白单抗和LaminA单抗)在37℃反应1hr, PBS洗净后,加入第二抗体(FITC标记的羊抗鼠IgG), 37℃温育30min, PBS洗,用Gelvator封片, Olympus BH-2荧光显微镜观察,落射光照明。对照组以正常鼠血清代替第一抗体。

### 五、鼠胚成纤维细胞的SDS-PAGE电泳和Western-blot分析

\* 山东省自然科学基金资助课题。本文的大部分工作在北京大学生命科学院程中和教授实验室完成,在此表示感谢。

\*\* 现在中科院上海细胞生物研究所, 200031。

刮取培养的成纤维细胞,离心收集,抽提和未经抽提的细胞分别加入样品溶解液中,煮沸3 min, SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳参考 Laemmli 的方法<sup>[12]</sup>,按8.5%分离胶,3%浓缩胶制胶板,恒流25 mA,3 hrs,考马斯亮蓝 R 250 染色。

鼠胚成纤维细胞蛋白的 Western-blot 分析参考 Towbin 等的方法<sup>[13]</sup>。细胞总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,电转移至硝酸纤维素膜上(转移条件:恒压30 V,13 hrs),用 TBS-BSA 封闭1 hr后,与第一抗体(波形蛋白单抗、LaminA 单抗和 LaminB 单抗)37℃反应3 hrs,TTBS 漂洗3次,再用第二抗体(碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG)37℃反应1 hr,TTBS 洗净后,用氯化硝基四氮唑兰(NBT)和5-溴-4-氯吲哚磷酸(BCIP)作为底物显色。

#### 六、实验中使用的抗体的来源

鼠抗波形蛋白单克隆抗体, Sigma 公司产品。

鼠抗角蛋白单克隆抗体 AF<sub>6</sub>, 由重庆医科大学病理生理教研室提供。

鼠抗 LaminA 单克隆抗体,能与 LaminC 交叉反应,由美国 Iowa 大学 J. J. Lin 教授惠赠。

鼠抗 Lamin B 单克隆抗体,由德国癌学研究中心 Krohne 教授惠赠。

FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 军事医学科学院微生物流行病研究所产品。

碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG, Bio-Red 公司产品。

## 结 果

### 一、鼠胚成纤维细胞的扫描电镜观察

在扫描电镜下观察12.5天鼠胚的成纤维细胞,有的细胞成梭形,有的细胞为多角形,细胞有许多突起伸出,细胞长度约为30 μm(图版 I, 图1)。

### 二、鼠胚成纤维细胞中间丝-核纤层-核骨架结构体系的形态

IF-L-NM 对高盐和非离子去垢剂有较好的稳定性。在 Triton X-100 作用下,细胞膜系统被去除,细胞内可溶性物质随之流出,存留的是细胞的骨架系统,再用 RSB-Magik 处理,细胞内微丝和微管及其他细胞质结构被破坏,只有胞质中间丝和核的基本结构(除核膜外)得以保留,最后的 DNase I 和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

处理,去除了细胞核中的染色质,存留的即为 IF-L-NM 结构体系。

在经选择性抽提的鼠胚成纤维细胞内可以看到精细发达的 IF-L-NM 结构体系,由于采用了整装细胞的电镜制样技术,骨架更加具有真实感和立体感。IF-L-NM 骨架体系仍然保持成纤维细胞多角形或梭形的形态。细胞核较小,胞质纤丝所占比例较大。胞质内中间丝直径为10 nm,远核区和近核区均较致密,没有纤丝的极性分布现象,纤丝之间互相连接,形成一发达的中间丝骨架系统。我们还观察到一个现象,胞质内中间丝在核周围是沿着同一方向平行走向,平行的纤丝之间有横向的纤维连接起来。在核的边周可以观察到核纤层结构,它是核膜下的蛋白质片层结构,也是由纤丝组成,核纤层外与胞质中间丝相连,内与核骨架相连。核骨架是分布在核内的纤维蛋白网络,充满整个核空间,纤维粗细不一,在核内没有观察到有核仁骨架结构。中间丝、核纤层和核骨架三者的形态、结构和物理性质相似,结构上相互连接,形成统一的网络系统(图版 I, 图2)。

### 三、鼠胚成纤维细胞的间接免疫荧光实验

由于成纤维细胞来源于中胚层,我们首先认为胞质中间丝可能由波形蛋白组成,用抗波形蛋白单克隆抗体做的免疫荧光染色表明,细胞对波形蛋白单抗有明显的阳性反应,而且可以看到核周围的中间丝网络。象我们在整装细胞制样电镜样品上看到的一样,纤丝沿核呈一定的平行走向。在核区可以看到较弱的荧光,这是整体细胞观察造成的结果,因为虽然成纤维细胞较薄,在上面看核区仍然覆盖着一层细胞质,核区的荧光要明显弱于细胞质区域(图版 II, 图3)。由于我们在过去所做胚胎干细胞实验中,发现其中间丝结构由角蛋白组成,本实验所用的材料为胚胎期成纤维细胞,使我们想到了细胞中是否含有角蛋白。使用角蛋白单克隆抗体 AF<sub>6</sub> 做免疫荧光检测,结果表明 AF<sub>6</sub> 呈阴性反应,仅可以看到非特异性的很微

弱的荧光染色,说明细胞内只含有波形蛋白,不含有角蛋白成份。用抗 Lamin A 单抗做鼠胚成纤维细胞的免疫荧光实验,可以看到呈环状的荧光染色,显示的是细胞内的核纤层结构(图版 II,图 4)。一些对照组均呈阴性反应。

#### 四、鼠胚成纤维细胞的 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 分析

在 SDS-PAGE 电泳图谱上可以看到,鼠胚成纤维细胞总蛋白在 43 KD、54 KD 处条带较深,这两种蛋白在细胞内含量较高。经 CSK-Triton, RBS-Magik, DNase 抽提后细胞内只剩下 IF-L-NM 结构,它的电泳图谱同细胞的总蛋白相比少了许多条带,少的条带可能代表细胞内的膜蛋白、各种可溶性蛋白、组蛋白、微管蛋白、肌动蛋白以及各种结构蛋白。54 KD 多肽在总蛋白中含量较高,经抽提后条带染色仍然很深,是 IF-L-NM 结构的主要成分之一,用 Western-blot 分析技术证明这条多肽是波形蛋白。成纤维细胞是中胚层来源的细胞,从理论上讲,中胚层来源的细胞应该含有波形蛋白,本实验结果同这种观点是一致的。在 IF-L-NM 电泳图谱上还可以看到,在 67 KD 处有几条多肽,从分子量上判断,其中可能有 Lamin 成分,经 Western-blot 分析证明有三种多肽分别为 Lamin A(69 KD)、Lamin B(67 KD)和 Lamin C(64 KD)。在细胞的总蛋白中 43 KD 多肽染色最深,说明这是一种在细胞内含量最大的多肽,经选择性抽提后,这种多肽的量有减少,但染色仍然较深。我们前面所做的 ES 细胞 IF-L-NM 蛋白电泳,43 KD 条带也较明显,表明这可能是一种各类细胞共有的多肽,它可能是源自核的 Actin。已有文献报道,Actin 参与了细胞核内骨架的组成<sup>[14]</sup>。在 IF-L-NM 电泳图上还可以看到一些条带,这些条带可能与细胞核内骨架成份有关,由于核骨架成份非常复杂,而对它们的研究目前还处在初步的阶段,所以我们还不能对每个条带进行具体分析(见图)。

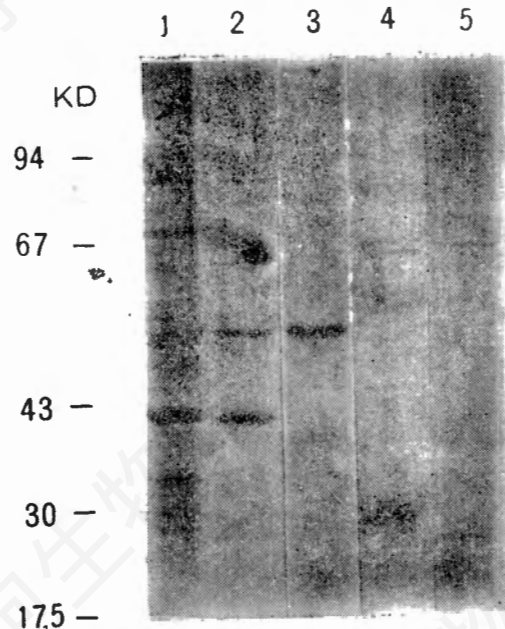


图 鼠胚成纤维细胞的 SDS-PAGE 电泳 (Lane 1,2) 和 Western-blot 分析 (Lane 3-5)。

1. 细胞的总蛋白。2. 细胞的核骨架-核层纤-中间丝结构。3. 显示细胞内蛋白与波形蛋白抗体的阳性反应条带,分子量为 54 KD。4. Lamin A 抗体的两个阳性反应条带,两条带分别是 Lamin A 和 Lamin C。5. Lamin B 抗体的阳性反应条带。

## 讨 论

一、过去是用免疫荧光技术研究细胞的中间丝结构,发现它们总是密集在核周围,不能直接观察到其单丝。本实验应用细胞的分级抽提技术,在各步抽提中分别去掉了细胞膜蛋白、各种可溶性蛋白、微管、微丝和染色质等,只留下细胞的 IF-L-NM 结构体系,能清晰地观察到中间丝单丝。我们使用了整装细胞的制样技术,显示的 IF-L-NM 结构更具有立体感、真实感,有利于获得三维信息。我们曾用同样方法做了 HeLa 细胞的 IF-L-NM 体系,显示出中间丝在胞质中互相交织成网状,而鼠胚成纤维细胞的中间丝沿核呈一定的平行走向,这种排列方式在鼠胚成纤维细胞中是否具有普遍意义,它有没有什么特殊功能,目前仍

然不清楚。

二、比较鼠胚成纤维细胞和我们过去所做的小鼠胚胎干细胞<sup>[15]</sup>的IF-L-NM结构,可以看出,两者存在较大差别,ES细胞核较大,核骨架很发达,胞质中间丝相对不发达,而鼠胚成纤维细胞核较小,核骨架相对不发达,胞质中间丝很发达。两种细胞核骨架发达程度的差别可能同它们各自的功能是有关系的,ES细胞是胚胎干细胞,细胞分裂速度很快,也就是DNA复制很旺盛,它还要为将来的细胞分化做物质上的准备,核内基因表达也很活跃,这些都需要一个发达的核骨架,使DNA复制、基因表达调控等有条不紊地进行。

鼠胚成纤维细胞分化程度要比胚胎干细胞更高,在胚胎发育,干细胞逐渐向终末细胞的分化过程中,是不是存在核骨架由发达向不发达的转变过程,细胞内中间丝的发达程度是否同它们的分化程度有关系,有待于今后进一步的研究和探讨。

三、一般上皮型细胞的中间丝由角蛋白组成,间充质和中胚层来源的细胞中间丝成份是波形蛋白,肌肉细胞中是结蛋白,神经组织有神经丝蛋白和GFAP,少数一些细胞可同时存在两类或两类以上的IF蛋白,但这种现象大多出现在分化程度较低的细胞中。我们使用的材料是胚胎期的成纤维细胞,自然使我们想到细胞中会不会存在一种以上的IF蛋白,间接免疫荧光和Western-blot分析结果证明,细胞中有波形蛋白。使用角蛋白抗体对鼠胚成纤维细胞进行间接免疫荧光检测,结果表明细胞中没有角蛋白。

### 摘 要

本文以12.5天小鼠胚胎成纤维细胞为材料,使用选择性抽提和整装细胞电镜制样技术,显示了鼠胚成纤维细胞的中间丝-核纤层-核骨架(IF-L-NM)结构体系。细胞质中有非常发达的中间丝,有的纤丝结合为束状存在,纤丝沿着核呈一定方向平行排列。细胞中也可以观

察到核纤层和核骨架结构,但胞质中间丝相比,核骨架不发达。整装细胞电镜制样使观察到的IF-L-NM更具有真实感和立体感。应用间接免疫荧光技术检测细胞内的中间丝,波形蛋白抗体呈阳性反应,可以观察到由核发出的纤维状免疫荧光染色。角蛋白抗体不同细胞内成份发生反应,说明细胞中没有角蛋白。使用Lamin抗体可以观察到细胞内呈环形的核纤层结构。通过SDS-PAGE电泳和Western-blot分析,细胞经抽提后大部分蛋白被去掉,剩余条带中54KD蛋白最明显,这是细胞内的波形蛋白。成纤维细胞的核纤层结构由三种Lamin共同构成,分子量分别为69KD、67KD和64KD。

### 图 版 说 明 ( I 、 II )

1. 扫描电镜下观察的鼠胚成纤维细胞。4500 ×
2. 整装抽提的鼠胚成纤维细胞,可见核骨架-核纤层-中间丝形成一个相互连接的三维网络体系,其中胞质中间丝较发达。10000 ×
3. 鼠胚成纤维细胞抗波形蛋白抗体的间接免疫荧光。细胞内有纤维形的荧光染色,可见纤丝沿着核呈一定方向排列,核区有很微弱的荧光,这是由于胞质中间丝在核区有一定重叠效应。1500 ×
4. 鼠胚成纤维细胞抗Lamin单抗的间接免疫荧光。可以看到呈环带状的荧光染色,环带状区域是细胞内的核纤层结构。2000 ×

### 参 考 文 献

- [1] Berezney, R. et al., 1981, *Exp. Cell Res.*, 132: 1-13.
- [2] Jackson, D. A., et al., 1981, *Nature*, 292: 552-555.
- [3] Jiao, R. J. et al., 1991, *J. Electron Microsc. Tech.*, 18(2): 126-34.
- [4] 吴冬兰等, 1990, 电子显微学报, 9(2): 1-6.
- [5] 邢力等, 1991, 科学通报, 36(8): 623-626.
- [6] 蔡树涛等, 1991, 实验生物学报, 24(1): 33-43.
- [7] Lehtonen, E. et al., 1983, *Dev. Biol.*, 100: 158-165.
- [8] Doetschman, T. C. et al., 1985, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 87: 27.

- [9] Wolosewick, J. J., 1979, In *Practical Tissue Culture Application*, pp. 59—85, Academic Press, New York.
- [10] Capco, D. G. et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 98: 1978—1885.
- [11] Franke, W. W. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5034—5038.
- [12] Laemmli, U. K. et al., 1970, *Nature*, 213: 421—422.
- [13] Towbin, H. et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350—4354.
- [14] Miller, C. A. et al., 1991, *Carcinogenesis*, 12(2): 269—276.
- [15] 高健刚等, 1994, *实验生物学报*, 27(4): 463—474.

## LTD<sub>4</sub> 对系膜细胞促增殖作用机制的研究

吴升华 林致华 练棣华

(南京医科大学第一附属医院 南京 210029)

花生四烯酸 5 脂氧化酶产物白三烯 D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) 可使血管、支气管及胃肠道平滑肌收缩, 增加血管壁对大分子物质的通透性, 在免疫炎症反应中起重要作用。近来发现 LTD<sub>4</sub> 可使肾小球毛细血管及肾小球系膜细胞收缩, 促进系膜细胞增殖, 因此参与肾小球疾病的发病<sup>[1]</sup>。本文应用 [<sup>3</sup>H] 胸腺嘧啶核苷 ([<sup>3</sup>H]TdR) 掺入法测定 LTD<sub>4</sub> 对大鼠系膜细胞增殖的作用, 测定系膜细胞二脂酰甘油 (DAG) 及磷酸肌醇 (IP) 的合成量, 对 LTD<sub>4</sub> 的促增殖作用机制作一探讨。

### 材料与方 法

#### 一、系膜细胞的培养及鉴定

用系列过筛的方法从 SD 雄性大鼠 (体重 80—100g) 的肾皮质中分离肾小球。将肾小球混悬液与 IV 型胶原酶共孵育后, 用磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤混悬液, 将肾小球在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养于 RPMI-1640 培养液中 (15% 小牛血清, 0.75 U/ml 胰岛素)。每两周细胞传代一次, 在第 4 次传代后得到较纯的系膜细胞, 该细胞在相差显微镜下呈卫星状或纺锤状, 用抗系膜细胞 Thy1 抗原的抗体进行间接免疫荧光染色, 95% 以上的细胞呈阳性。

#### 二、[<sup>3</sup>H]TdR 掺入法测定细胞增殖<sup>[2]</sup>

将系膜细胞培养于 24 孔培养盘中, 每孔细胞数 1 × 10<sup>4</sup>。在细胞生长再汇合 (Subconfluence) 时除去培养液, 加入含 0.5% 小牛血清的培养液。细胞生长停

滞 48 h 后, 加入不同浓度的 LTD<sub>4</sub> (Cayman Chemical), 再孵育 18 h, 然后加入 [<sup>3</sup>H] TdR (2 μCi/孔, 84.8 Ci/mmol, NEN)。6 h 后去除培养液, 细胞经收集及洗涤后在 LKB 1217 液闪计数器测定 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入量。每试验组由 6 孔组成, 对照组中细胞仅与培养液及 [<sup>3</sup>H]TdR 共孵育。结果表示为:

$$\frac{\text{实验组 cpm}}{\text{对照组 cpm}} \times 100\%$$

#### 三、蛋白激酶 C (PKC) 抑制试验

在荧光灯源下, 生长停滞的系膜细胞与特异性 PKC 抑制剂 Calphostin C (0.6 μmol/L, Biomol) 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中共孵育 3 h<sup>[3]</sup>。然后加入 LTD<sub>4</sub> 孵育 18 h, 再测定 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入量, 如上述。

#### 四、系膜细胞 DAG 定量

将系膜细胞培养于 60 mm 的培养皿中 (1 × 10<sup>6</sup> 细胞/皿), 在生长停滞 48 h 后加入 LTD<sub>4</sub> (1 μmol/L)、表皮生长因子 (EGF, 10 nmol/L) 或 10% 小牛血清, 在对照组中仅加入 PBS。在 37℃ 下孵育 15 min 后收集细胞, 用 Bligh 法抽提细胞脂质<sup>[4]</sup>, 有机相用于 DAG 定量及总磷脂定量<sup>[5]</sup>。在干燥脂质中加入携带溶液, 在超声水浴中振荡 5 min 后加入 DAG 激酶 (Amersham)、反应缓冲液、Dithiothreitol 及 [<sup>32</sup>P]ATP 进行反应。将抽提后的脂质点加于 Silica Gel 60 薄层色谱板上层析。将 [<sup>32</sup>P] 磷酸斑块置于闪烁液中测定其放射性。用标准底物二油酸脂按上述方法层析并制备

本研究得到美国威斯康辛医学院的 Dimitris P. Kelefiotis 博士支持, 特此致谢。