

- [8] R. W. Young, 1978, *Vision Res.*, 18: 573.
- [9] M. L. Fishman et al., 1977, *Exp. Eye Res.*, 24: 341.
- [10] B. K. Fung & W. L. Hubbell, 1978, *Biochemistry*, 17: 4403.
- [11] J. Rosenkranz, 1978, *Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.*, 111: 228.
- [12] P. Brown, I. R. Gibbons & G. Wald, 1963, *J. Cell Biol.*, 19: 79.
- [13] E. W. Spira & G. G. Milman, 1979, *Am. J. Anat.*, 155: 319.
- [14] B. Brown & M. Hollenberg, 1973, *J. Morphol.*, 140: 405.
- [15] G. Walls, 1963, In "The vertebrate eye and its adaptive radiation" p 163.
- [16] T. Nakao, 1964, *Tohoku J. Exp Med.*, 82: 349.
- [17] 黄春发、汪德跃, 1985, 第四届动物学会显微和亚显微形态科学讨论会, 桂林, p 158.
- [18] R. W. Young, 1967, *J. Cell Biol.*, 33: 61.
- [19] F. B. Krasen & P. A. Lawrence, 1966, *J. Cell Sci.*, 1: 239.
- [20] D. S. Papermaster et al., 1978, *J. Cell Biol.*, 77(1): 156.
- [21] B. Borwein, 1983, *Anat. Record.*, 205: 363.
- [22] D. Mac, G. Fyre & B. K. Hall, 1981, *J. Morphol.*, 167: 201.
- [23] N. G. F. Cooper et al., 1983, *J. Ultrastruct., Res.*, 82: 172.
- [24] B. Barry & R. Mathies, 1982, *J. Cell Biol.*, 94: 479.
- [25] N. Katagriri, 1984, *J. Electron Microsc.*, 33: 140.

包被小泡——一种新的细胞器

杨维才 郑国辑
(兰州大学细胞研究室)

在近二十年细胞生物学研究中,关于包被小泡(Coated vesicle, 简称 CV)结构功能及其有关的受体介导的内吞作用(Receptor-mediated endocytosis)的研究一直是十分活跃的领域。1964年 Roth 和 Porter^[1]首先在蚊虫卵母细胞中发现细胞表面存在“毛状包被结构”(Bristle-coated structure),同年, Rosenbluth 和 Wissig^[2]发现蟾蜍脊神经细胞中铁蛋白的内吞与“包被”小泡有关,并首次用包被陷窝(Coated pit, 简称 CP)和包被小泡来描述与铁蛋白吸收有关的细胞表面内陷和小泡结构。事实上在此之前人们已观察到了类似的结构,只是叫法不同,如“复合小泡”(Complex vesicle),“刺状体”(Acanthosome),“无定形包被结构”(Amorphous-coated structure)或“Rhopheosome”等,尽管名字不同,但都是描述细胞质膜内陷区被致密的细胞质包被这一事实。1969年 Kanaseki 和

Kadota^[3]首先从神经组织中部分地纯化到 CV,并用电镜负染色技术第一次直接观察到了包被呈五边形和六边形的网格特征。七十年代中期, Crowther 等人^[4]确定了 CV 多边形包被结构的几何特征和多态性。同时 Pearse^[5,6]改良了 Kanaseki 和 Kadota 的纯化方法,使人们能够获得大量 CV 用于生化和结构分析,并发现了包被结构的主要蛋白——笼形蛋白(Clathrin)。除此笼形蛋白之外,人们^[7,8]还发现了其它附加蛋白(Mr. 110, 55, 33, 36 kd)。随后许多人对笼形蛋白的组成、结构特征及其形成多边形笼形包被结构的机制进行了深入的研究,提出了一些有意义的模式。免疫细胞化学研究揭示细胞内可能存在游离笼形蛋白池^[9],很可能分布在细胞核周围。解被 ATPase (Uncoating ATPase)^[10,11,12]活性的发现为了解 CV 的功能和包被机制提供了线索,下面简要

介绍这方面的研究情况。

1. CP与CV的关系及其结构特征

自从Roth和Porter^[1]发现包被膜以来,又相继发现包被膜内陷形成CP并从质膜上脱落下来进入细胞质,形成CV,这一过程通常伴随受体介导的大分子吸收。大量证据表明CV是许多真核细胞中普遍存在的一种亚细胞结构,已证明包被物质主要是笼形蛋白。一般认为笼形蛋白有两个主要功能:(1)从CP上选择或排除分子;(2)为细胞膜内陷提供一个结构骨架。Heuser等^[13,14]用深冻蚀刻揭示CV大小变化是通过包被亚单位加到正在形成的CP边缘上,而不是CV与正在形成的CP的边缘融合,这与细胞中存在笼形蛋白池的观点是一致的。包被形成首先是平面构型的六边形包被附着到质膜平面上,为了使膜向内凹陷形成CP,需要加入五边形以获得一定的曲度,这是通过在边缘形成五边形,并经一系列的位移扩散到六边形排列中产生CP;或是在六边形排列内部发生重排和位移,由两个六边形重排成一个五边形和一个七边形,七边形最终经一系列位移变动被消除,只留下五边形^[15]。这种重排和位移是耗能的,因为代谢抑制剂或0℃冷冻处理可以阻止重排发生。也有人认为包被膜的内陷可能与该区膜的流动性和特殊的脂组成有关^[16]。Unanue^[17]等发现笼形蛋白三聚体分子与包被小泡膜上特异的蛋白酶敏感蛋白(Mr. 110 kd)结合,说明CP的形成与其特异的膜蛋白有关。但CP形成后是怎样从细胞膜上脱落下来的仍不清楚,很可能与细胞骨架有关。

CP形成后不久即从膜上脱落下来,形成CV。CV外径一般在50—250 nm范围内,通常是由12个五边形和不同数目的六边形组成的多边形网格包被一个膜泡结构而成(图2,C)。目前只发现较大外径的CV内有膜泡结构,较小的CV中还未发现有膜泡结构存在,其原因并不清楚,可能较小的CV只是一种过渡形式。由于所用方法的不同,测得的数据稍有差异,

一般负染色法测得的结果约大于深冻蚀刻法。包被多边形边长约为14—18 nm。不同类型的细胞和组织中,CV的大小和数目是有差异的,如在植物细胞中一般为72—96 nm。其大小差异主要在于包被中六边形数目的多少,五边形的数目基本上是恒定的。这也说明膜表面包被的增加是由于包被亚单位的加入而不是通过CP的融合来实现的。

CV膜泡有其特殊的结构和功能。膜的脂组成分别为:磷脂酰胆碱43%,磷脂酰乙醇胺30%,磷脂酰丝氨酸4%,鞘磷脂12%,磷脂酸肌醇11%,没有溶血卵磷脂^[6],其胆固醇/磷脂比值(0.1—0.3)低于普通膜(0.3—1.2)。冰冻断裂发现其膜内有大量比普通膜大约20%的膜内颗粒,而且数量也更多些,这些大颗粒可能代表了特异的跨膜蛋白。CV膜泡内含物随其功能不同而有差异,这一点后面将要谈到。

要了解CV的独特包被结构必须先了解其结构蛋白——笼形蛋白的特殊性质。

A. 笼形蛋白三聚体的特性

七十年代中期,Pearse^[6]从猪脑CV提取物中分离到一种蛋白质(180 kd),在前面已经提到,她称之为笼形蛋白,也就是指能形成笼状结构的蛋白质。后来发现各种CV中都存在这种蛋白,占CV总蛋白的70%,并且是高度保守的。如用高浓度伯胺^[7],2 mol/L尿素,高pH(7.5)或低离子强度的Tris^[18]等处理可以把它从包被上解离下来,这说明笼形蛋白和CV膜之间是非共价结合的。在离体条件下,解离下来的笼形蛋白在适当条件下(pH 6.0—6.5, Ca²⁺或Mg²⁺存在)可以重新组装成类似体内CV的笼状结构。组成笼状结构的基本单位是笼形蛋白三聚体(8.6 S)^[15],每个三聚体由三个笼形蛋白分子(重链)和三个小分子(轻链,33.36 kd)所组成。笼形蛋白三聚体不仅能重组成笼状结构,而且还能和CV膜上特殊的蛋白酶敏感位点结合。用蛋白酶局部水解发现重链由两组多肽组成;即与笼状结构连结的多

肽(110–125 kd)和可溶性蛋白部分(53, 41 kd)^[19], 免疫细胞化学证明重链有五个不同的抗原决定簇。轻链一般为32–38 kd, 其大小因来源不同稍有差异, 大的为LCa, 小的为LCb, LCa比LCb大2–3 kd。轻链比重链易于水解, 除轻链和重链外还有一个末端区。用负染色法发现笼形蛋白三聚体是由三条弯曲的腿组成的风车状结构, 称为三联体骨架(Triskelion)^[17, 19, 20], 每条腿宽约3–4 nm, 长约40–50 nm, 在距中心约16–18 nm处有一拐点, 把每条腿分成近轴端和远轴端两部分, 末端区长约5–7 nm, 呈耳垂状或钩状。由于末端区弯曲与伸展的关系, 使得测得的腿长有所变化, 电镜下有时可看到钩状结构, 有时看不到^[14]。每条腿是由一条重链和一条轻链组成(图1, A)。正是由于笼形蛋白三聚体的这种特殊几何结构使得它具有形成笼状结构的能力。

B. 从三联体骨架到笼状包被

体外重组实验表明, 笼形蛋白组装成多边形笼状结构的过程可能是一个浓缩过程。当高于某一临界浓度时, 笼形蛋白倾向于自我组装形成笼状包被结构, 与低浓度的单体三联体骨架保持平衡。免疫细胞化学研究证实体内确实存在类似单体三联体骨架的笼形蛋白池^[9]。体内可能有某种因素参与包被的解聚与组装过程, 以调节二者之间的功能关系。推测可能与肌动蛋白和TMV病毒的组装模式相似。最近Schmid和Rothman^[11]及Chappell等人^[12]发现的解被ATPase(Uncoating ATPase)可能在包被解聚与组装过程中起调节作用。Zaremba和Keen^[18]从CV提取物中分离到一种由三种多肽(~52, 100和110 kd)组成的复合物, 它能使纯化的笼形蛋白三聚体在体外重新组装成平均直径为 78 ± 5 nm的包被结构, 把它们叫做“组装多肽”(Assembly peptide, AP)。仅由笼形蛋白组装成的包被比由AP-组装成的包被要大些, 而且大小不均一(101 ± 15 nm), 这些物理特性表明AP-组装的包被是不同于仅由三联体骨架形成的包被的。在无任何其它因子参与

的情况下, AP-组装的包被可以解离和重组, 这一过程说明重组所需的所有信息存在于包被连结的多肽(Coat-incorporated polypeptide)内。另外AP存在时, 包被重组在很低笼形蛋白浓度(0.06 mg/ml)下就可发生, 并可在4℃、22℃, 及37℃下进行, 在细胞内pH(7.2–7.5)范围内也能形成包被, 而无AP存在时, pH>6.7时则不能发生组装。AP重组的包被和体内高尔基体区的包被膜之间大小相似, 很可能AP是体内包被重组所必需的。

前面谈到笼形蛋白三聚体呈三联体骨架的特殊几何构型, 不难想象它具有形成多边形的能力。现在一般认为包被多边形的每个点上都有一个三联体骨架分子, 它的每条腿可以围绕多边形的相邻两边, 参与这两边的形成, 这样多边形的每条边就由两条反向平行的近轴部分和两条反向平行的远轴段组成, 目前还不能确定远轴段和近轴段谁在里谁在外。推测可能有边边平行和交叉两种方式(图1, B, C, D)。在B和D中, 两个相对三联体骨架的腿不是直接指向相邻三联体骨架的中心, 而是稍有旋转, 相对于两中心连线而言, 转角约为6度。C中没有旋转现象。电镜下有时可观察到多边形边由两条或三条带状构成。在两条带的边中, 带间距约为3–4 nm, 与图1D相似; 在三条带的边中, 中间的一条比两边的要致密些, 这与图1C相似。目前各种模型争论的焦点在于测得的边长和三联体骨架近轴段长度间数据不太一致。Crowther-pearse模型^[21]认为每条腿是在达到邻近的顶点之后就弯曲了, 而且有旋转(图2, A); 而Heuser-Kirchhausen模型^[14]则认为每条腿是在其到达邻近顶点之后才弯曲, 没有旋转现象, 并且认为每条腿的末端钩状结构可能伸入包被内部和膜泡相连, 成为连结包被与膜泡之间桥梁。后者是由深冻蚀刻结果提出的模型, 可能更接近真实情况。

2. CV的功能

最初Roth和Porter推测包被结构可能与特异大分子的选择吸收有关^[1]。近年的研究发

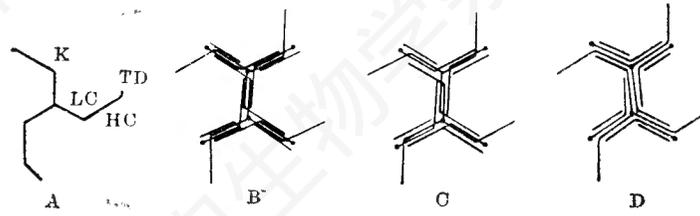


图 1 A. 笼形蛋白三联体骨架

LC: 轻链, HC: 重链, TD: 末端区, K: 拐点; B.C.D. 三联体组成多边形边的可能方式, 详见前文。(据 Crowther and Pearse 1981)

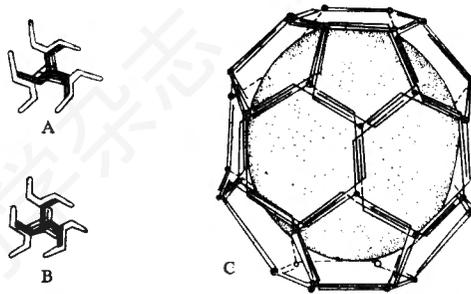


图 2 示三联体骨架组装成多边形边的两种形式

A. Crowther—Pearse 模型, 有旋转现象; B. Heuser—Kirchhausen 模型, 无旋转现象, 详见前文^[14]。C. 由十二个五边形和八个六边形形成的 CV。(据 Alberts, et al., 1983)

现 CV 可能有以下几种作用: (一)受体介导的内吞作用^[16]。1976 年 Anderson 首先发现大分子的受体都聚集在一些特定的区域, 这些区域凹陷形成 CP, CP 形成后几分钟内即从膜上脱落下来形成 CV, 从而把特异大分子带入细胞中, 并首次用“受体介导的内吞作用”来描述这一过程。“受体介导的内吞作用”被认为是细胞吸收大分子的主要机制。由于受体不同, 大分子在细胞内的命运也不同, 主要有以下几种: (1) 细胞生长所需大分子(如低密度脂蛋白: LDL, 转铁蛋白, 转钴胺素蛋白等)的内吞作用。大分子和其在 CP 内的受体结合, 通过 CV 进入细胞, CV 形成后不久就失去包被成为无被小泡, 无被小泡之间或与非 CV 小泡之间融合形成大的小泡, 叫内吞泡 (Endosome) 或受体泡 (Receptosome), 可能由于内吞泡内 pH 值发

生变化, 大分子和受体分离, 受体脱离内吞泡返回到质膜完成受体的再循环, 而被吞噬的大分子则被溶酶体降解。降解产物可以通过反馈调节来控制受体的新合成和细胞的代谢活动。图 3 中 I 表示低密度脂蛋白 (LDL) 进入细胞后被降解成胆固醇和氨基酸 (Aa), 胆固醇反过来调节 LDL 受体的合成和胆固醇代谢。在家族性高胆固醇血症 (FH) 患者中, 由于缺少有功能的 LDL 受体 (受体不能和 LDL 结合或结合后不能被内吞), 血液中 LDL 大量积累, 最终导致动脉粥样硬化等病而死亡。(2) 跨细胞运输的大分子(如 IgG) 的运输。Brambell 等人发现在胎盘中母体的抗体 (IgG) 被选择性地吸收入 CV, 再经过 CV 转移到胎儿血液中。在这个过程中, 大分子和受体通过 CV 进行跨细胞运输, CV 并不与溶酶体或其他细胞器相作用 (图 3、III)。(3) 被溶酶体降解的大分子的内吞作用。大分子-受体复合物经 CV 进入细胞后, CV 与初级溶酶体 (Lys) 融合, 大分子和受体同时被降解, 受体不再循环, 这样大分子内吞伴随有受体数目的减少, 这种现象叫受体减少调节 (Receptor down regulation) (图 3, II)。(二) 参与质膜循环。有人发现 CV 在乳腺上皮的蛋白分泌和神经突触细胞表面多余膜的回收中起作用。在蛙神经肌肉联结中, 人为刺激引起大量突触小泡和突触前膜融合, 释放神经递质, 突触前膜的重吸收是通过 CV 来完成的。(三) 外吞作用及胞内运输。在动植物细胞中都发现 CV 和质膜、高尔基体和内质网

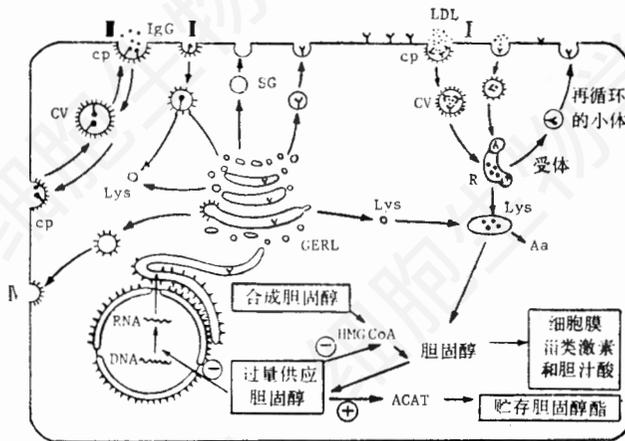


图3 CV的功能(详见文中所述)。I. LDL受体介导的内吞作用及其与细胞代谢之间的关系；II. 被溶酶体降解的大分子的内吞作用；III. 大分子的跨细胞运输；IV. 外吞作用。R: 内吞泡或受体泡；Lys, 初级溶酶体；GERL: 高尔基体内质网溶酶体系统；SG: 分泌颗粒；N: 细胞核；⊕: 激活；⊖: 抑制。(据[22,23]改画)。

等细胞器有联系，其功能可能是把体内合成的分子从一种膜泡结构向另一膜泡结构运输。这可能与：(1)高尔基体分泌物的外吞作用，(2)从高尔基体中把水解酶运到溶酶体及(3)其它胞内运输有关。一般认为CV来自高尔基体并和质膜融合从而完成外吞作用(图3, IV)。(四)病毒(如泡状疱疹病毒等)进入细胞的途径。

3. 结束语

关于CV结构和功能的研究进展十分迅速，可以认为CV是一种新的细胞器。但关于体内CV包被组装与解组装的调节机制及其与特异受体之间的作用机制，形成包被的机制及其与细胞骨架之间的相互作用等方面仍缺乏了解，相信不久的将来，这些问题都能得到满意的解决。

摘要

本文简要介绍了包被小泡的结构和功能。包被小泡是由笼形蛋白三联体骨架组成的多边形网格内含一个膜泡所构成，它参与细胞受体

介导的内吞作用、质膜循环、细胞外吞作用和病毒进入细胞等过程，是一种新的细胞器。

参考文献

[1] Roth, T. F. and K. R. Porter, 1964. *J. Cell Biol.* 20: 303—312.
 [2] Rosenbluth, J. and S. L. Wissig, 1964. *J. Cell Biol.* 23: 307—325.
 [3] Kanaseki, T. and K. Kadota, 1969. *J. Cell Biol.* 42: 202—220.
 [4] Crowther, R. A. et al. 1976. *J. Mol. Biol.* 103: 785—798.
 [5] Pearse, B. M. F. 1975. *J. Mol. Biol.* 97: 93—98.
 [6] Pearse, B. M. F. 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 1255—1259.
 [7] Keen, J. H. et al. 1979. *Cell.* 16: 303—312.
 [8] Woodward, M. P. and T. F. Roth. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 4394—4398.
 [9] Goud, B. C. et al. 1985. *J. Cell Biol.* 100: 521—527.
 [10] Braell, W. A. et al. 1984. *J. Cell Biol.* 99: 734—748.
 [11] Schlossman, D. M. et al. 1984. *J. Cell Biol.* 99: 723—733.
 [12] Chappell, T. G. et al. 1986. *Cell.* 45: 3—13.
 [13] Heuser, J. and 1980. *J. Cell Biol.* 84: 560—583.
 [14] Heuser, J. and T. Kirchhausen. 1985. *J. Ultrastruct. Res.* 9: 1—27
 [15] Kirchhausen, T. and S. C. Harrison. 1981. *Cell.* 23: 755—761.
 [16] Anderson, R. G. W. and J. Kaplan. 1983. Receptor—mediated endocytosis. In: *Modern Cell Biology* (Satir, B. H. ed.). Vol. I. pp. 1—53. Alan R. Liss Inc. New York.
 [17] Unanue, E. R. et al. 1981. *Cell.* 26: 439—446.
 [18] Zaremba, S. and J. H. Keen. 1983. *J. Cell Biol.* 97: 1339—1347.
 [19] Kirchhausen, T. and S. G. Harrison, 1984. *J. Cell Biol.* 99: 1725—1734.
 [20] Ungewickell, E. and D. Branton. 1981. *Nature (Lond.).* 289: 420—422.
 [21] Crowther, R. A. and B. M. F. Pearse. 1981, *J. Cell Biol.* 91: 790—797.
 [22] Brown, M. S. and J. L. Goldstein. 1984.

科学, 1985. 3. 20—29.

[23] Maelicke, A. H. Prinz. 1983. Membrane biogenesis, enveloped RNA viruses, and

epithelial polarity. In: *Modern Cell Biology* (Satir, B. H. ed.). Vol. I. pp 53—118. Alan R. Liss, Inc., New York.

一九八七年细胞生物学自然科学基金评议结果

王 钦 南

《国家自然科学基金委员会, 生物科学部, 北京》

一九八七年度生物科学基金评议工作已经结束, 评议结果已揭晓。本年生物科学部受理自然科学基金申请 3341 项, 申请总金额 18734 万元。资助率为 27%, 强度为 2.7 万元。

细胞生物学受理 101 项, 申请金额为 658 万元。其中获准资助 28 项, 计 82 万元。资助率为 28%, 强度为 2.93 万元。此外, 有 5 个研究内容好, 设计思想先进, 技术路线可行, 可予期达标的项目, 应属资金之列。但由于本基金数额太少, 通过其它途经可获经费, 经考虑暂不资助。尽管如此, 还有一批相当好的申请课题, 仍无法资助。

今年申请的内容, 本学科有如下特点:

1. 细胞生物学向分子生物学方面深入, 从课题的设计思想, 采用技术路线和手段直至到达的目标皆有所体现。
2. 细胞生物学向其它学科渗透, 如向遗传学、生理学和生物化学等, 使的一些课题在分类上很难肯定属于哪个学科。
3. 所申请的项目集中在几个中心问题, 如细胞分化, 细胞器的结构和功能以及细胞骨架系统等学科围绕着生命现象的基本规律。

从近几年来本学科的发展情况, 明年很可能着重资助: i 细胞识别; ii 染色体构建与基因表达; iii 细胞周期调控; iv 细胞骨架系统等研究方向的课题。

间 隙 连 接 与 发 育

王 绳 琦

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

一、概述

早在 1959 年, Furshpan 等研究螯虾运动神经时已发现, 进入一个神经元的电流能直接扩散到相邻神经元, 其间不需经过突触的化学传递过程^[1]。这种电偶合的存在, 使得神经冲动可以毫不延迟地在神经元间传递。后来, 从形态上证实质膜上有一种当时称之为“nexus”的特殊结构, 这种结构与电偶合相关联, 1967 年由 Revel 等^[2]定名为“gap junction”, 中文译作间隙连接。

早期进行的形态学观察和细胞间电偶合的研究已确认间隙连接处是偶合的位点。注射荧光染料和其它极性标记物的实验进一步证明它有一个亲水的通道。现在, 关于间隙连接结构特征的资料正逐渐积累起来。由于 X-射线衍

射技术和分离膜的电子显微镜检测技术的应用, 已可望在更高层次上重现它的结构。结合许多新发现, Makowski 提出间隙连接模式图(图 1)。图 1, 示间隙连接的结构模型, 它由分布于两相邻细胞质膜上的连接子接合形成, 每个连接子包含六个穿越细胞脂质双分子层的蛋白质亚单位, 这些亚单位和它们所围成的通道的轴之间稍有倾斜(引自 Makowski 等 1984^[3])。

间隙连接几乎存在于所有类型的动物组织中。不论是兴奋性组织还是非兴奋性组织, 成体组织还是胚胎组织, 其细胞间都有间隙连接。它为细胞通讯提供了结构基础, 是无机离

本文承蒙曾弥白教授指导和审阅, 特此致谢!