

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!

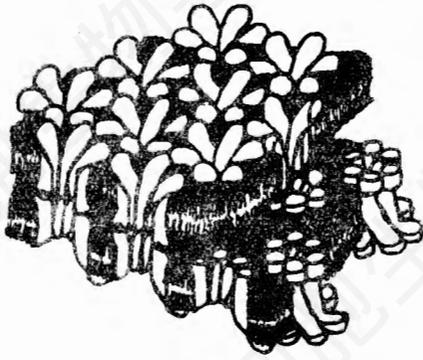


图1 间隙连接的结构模型

子和小分子有机物(≤ 900 道尔顿)在细胞间运输的通道部位。细胞内许多调节分子(如cAMP和其它第二信使)都小于这个极限,可以想象,由于它们在细胞间迅速扩散,导致这些细胞活动的协调。

在发育的很早时期就有间隙连接出现,它们使在生长控制、形态建成和组织分化中起调节作用的物质的细胞间转运成为可能。本文将着重讨论间隙连接与发育的关系。

二、生殖细胞的发育与间隙连接

1. 雄性生殖细胞

精子在睾丸的曲细精管中发育。观察大鼠睾丸的切片,可见曲细精管中排列着许多生殖细胞的发育波,一个发育波分为14个阶段,每个阶段都有一定的细胞组合,靠管壁的细胞较原始,越近管腔越成熟。生殖细胞的这种特殊分布,需要有相应的、适合其发育的微环境,这种微环境由支持细胞提供。研究表明,尽管相邻的生殖细胞之间以及生殖细胞和支持细胞之间均无间隙连接,但支持细胞之间却有连接发生,这些连接是形成血-睾屏障的主要结构成分,有效地阻碍着体液成分直接进入曲细精管管腔^[4]。支持细胞间的连接包括紧密连接和间隙连接。有趣的是,在未成熟睾丸中,血-睾屏障尚未形成,此时支持细胞间无紧密连接,但有典型的间隙连接;随着睾丸逐渐成熟,支持细胞间开始出现线性排列的颗粒,最初这些“线”是蜿蜒曲折、非定向的,以后慢慢

地成为平行而定向排列的紧密连接,血-睾屏障完全形成;同时,间隙连接的数量显著减少,连接子呈纵向排列^[6],这些间隙连接位于平行排列的紧密连接之间,外观呈矩形。发育过程中连接的变化反映出紧密连接和间隙连接间结构和功能的密切关系^[6],紧密连接是形成血-睾屏障必不可少的结构,而非典型间隙连接可能为精子发生周期中细胞活动的协调提供了结构基础,使支持细胞能够正常地执行功能。

2. 雌性生殖细胞

卵子发生可看成是个体发育的开始,整个发生过程都有间隙连接参加。在滤泡中,滤泡细胞之间通过间隙连接沟通,共同组成一个功能区;卵子也通过间隙连接从周围放射冠的滤泡细胞获得生长发育所需信息。在大鼠的滤泡生长期,雌激素促进间隙连接形成^[7],使卵子生长期与滤泡细胞保持着代谢的和生理的偶合,调控卵子成熟的分子经该通道进入卵子,促性腺激素LH和HCG则与外周滤泡细胞的细胞膜受体结合,引起细胞内cAMP水平升高,破坏卵子和滤泡细胞之间的连接通讯^[8],导致减数分裂恢复和卵子成熟^[9]。在这里,间隙连接起着一种将调控卵子成熟的分子输送到卵子,抑制卵子成熟的作用。在两栖类和昆虫卵子发生过程中,间隙连接也有类似的功能^[10,11]。最近,用冰冻-蚀刻方法对大鼠卵丘-卵子连接复合体的定量分析表明,在排卵刺激2—3小时后,卵丘细胞间的间隙连接减少了大约15倍,这种连接的丧失与胚泡破裂和卵丘膨胀有关^[12]。

三、早期胚胎发育和间隙连接

最早从事在胚胎中与间隙连接有关工作的是Potter及其合作者。1966年,他们发表了用电生理方法在枪乌贼胚胎中进行的工作,指出:在胚胎发育过程中,细胞电偶合范围逐渐缩小与细胞相互作用范围逐渐缩小有平行现象^[13]。此后,胚胎发育中间隙连接的作用越来越引起研究者们关注。

1. 卵裂和囊胚期

现已知道,在最初的几次卵裂中即出现间隙连接,已成为所有脊椎动物和大多数无脊椎动物胚胎的一般特征。Dorresteijn 等研究软体动物 *Patella* 胚胎时发现,在2细胞期已可用冰冻-蚀刻方法检测到间隙连接,然而,到32细胞期,这些连接才处于功能状态。此期恰恰是胚胎从辐射对称向两侧对称转变的时期。细胞割除实验表明,这一瞬间需要动物极4个中央小分裂球与一个植物极3-D大分裂球之间进行一种接触依赖性的相互作用,以便建立胚胎的背腹极。在这个时期向3-D大分裂球中注射荧光染料,可见染料有选择地进入中央小分裂球^[14]。中央小分裂球和3-D大分裂球之间的相互作用暗示着连接通讯的突然开始,促进了软体动物胚胎从辐射对称向两侧对称转变以及间隙连接可能参与了诱导讯息的传输。小鼠胚胎从8细胞期开始形成间隙连接,在此之前,通过细胞质间桥使姐妹卵裂球偶合,但是,连接蛋白的前体分子在4细胞期已经存在^[15]。有人推测,在8细胞期形成间隙连接,保证了以后卵裂产生的大量卵裂球间的代谢偶合,而细胞间桥则仅能维持少数细胞间的偶合^[16]。

连接通讯同样存在于那些不完全卵裂型的胚胎中。在硬骨鱼 *Fundulus* 胚胎的卵裂期和囊胚期,所有细胞间都存在电偶合和染料偶合;到晚囊胚期,囊胚的边界细胞与大卵黄细胞之间的偶合消失,它起因于通道的关闭,从而形成两个通讯区:多细胞囊胚区和卵黄细胞区。由于随后出现原肠形成运动,因此引起人们假设,此刻连接偶合消失对原肠形成和组织决定是重要的^[17]。这种非偶合还可能是促进囊胚细胞向卵黄细胞外包的一种机制。

2. 原肠胚期和神经胚期

关于原肠胚期和神经胚期间隙连接的变化也有一些工作。在东方蝾螈原肠胚早期,外胚层细胞间有间隙连接,但这些连接的连接子排列紧密,可能无通透功能^[18];从原肠形成到

神经管闭合这一发育阶段,间隙连接持续存在。其结构和早期细胞的明显不同,连接子排列松散,而且处于活跃的动态变化中^[19]。将早期原肠胚外胚层剥离,用豚鼠骨髓抽提液进行诱导处理,再结合图象分析仪计数,指出诱导后反应细胞的间隙连接处于活跃的功能状态。认为诱导作用之后,受了诱导作用的细胞在进一步分化的过程中,细胞间的相互作用是十分重要的,间隙连接很可能就在这里起作用^[20]。

四、组织分化与间隙连接

胚胎发育晚期,各种组织开始分化,在一些组织的分化期间,出现了间隙连接特征性消失现象,这种偶合功能的丧失常常与细胞分化的最后阶段相联系,有人推测,间隙连接参与了这些组织中细胞增殖控制和模式形成(Pattern Formation)。

在昆虫发育的研究中,人们提出了发育区假说,认为随着发育的进行,胚胎中形成一系列发育区,这些区由明显的界限所分隔,一旦一个发育区的区界被确立,这个区内细胞的命运就受到限定。这些细胞将按照不同于相邻区细胞命运的方向发育。关于果蝇翅芽发育已绘出发育区界图。值得注意的是,在区界线处,荧光标记物从一个细胞跨越这条线到另一细胞的通透性明显受抑^[21]。近期研究证明至少有9条这样的线存在。这种通讯区与发育区的范围是一致的^[22]。更细致的工作指出,染料穿越体节或翅芽区界转运的受阻抑,是因为存在着“界细胞”(border cell),这些细胞在区界处形成1—3个细胞宽的带。体外培养实验证明,虽然在整体情况下界细胞带处通透性被阻抑,但在一定的体外培养条件下,界细胞的连接对染料却有着几乎正常的通透性。很可能在发育期间界细胞通过调整不同时间内间隙连接通道孔径大小,进而调整分子从一个区到另一区的穿越速度^[23];当体节或发育区形成时,界细胞处间隙连接选择性关闭,为体节或发育区内环境的稳定提供了保障,利于其进一步分化,

并使相邻体节或发育区的发育保持有一定的自主性。

神经组织的发育与间隙连接的变化有一定的关系。间隙连接的存在是暂时的，通常在神经分化期间消失。以爪蟾蝌蚪脊髓的 Rohon-Beard 神经元发育为例，早在 Ca^{2+} 动作电位出现以前，细胞间就有电偶合，这种偶合有着电压依赖性，如果使细胞去极化或超极化超过一个阈值时，细胞间不再偶合。当偶合细胞产生 Ca^{2+} 动作电位时，一个细胞的动作电位可激发另一偶合细胞的动作电位，而那些不能引起偶合细胞达到兴奋阈值的 Ca^{2+} 动作电位则能在瞬间内降低细胞偶合强度，到尾芽期，Rohon-Beard 神经元已完成分裂并长出轴突，随着细胞内 Na^+ 动作电位出现，神经元之间的连接偶合特征性消失^[24]。鸡胚视网膜发育分化时也出现间隙连接的变化。在3天鸡胚中，间隙连接仅出现于神经视网膜外界膜下的一些细胞间；到5—6天，则不仅出现于外界膜区，还出现于神经视网膜较深部分的细胞中，其数量和大小显著增加；至孵化9天时，间隙连接基本消失^[25]。这些事例启示：连接偶合的消失可能触发胚胎组织分化的最后阶段。

脊椎动物骨骼肌的发育和分化过程也有间隙连接参加。将两栖类中期神经胚已决定的中胚层细胞在培养条件下解离一定时间再团聚培养，有正常的肌肉分化，冰冻-蚀刻可显示间隙连接^[26]。我们用爪蟾做的实验表明，在原肠末期，大规模形态发生运动基本结束，中胚层已形成完整的中胚层套，此时，中胚层细胞间开始出现间隙连接，在随后的肌节中胚层发育中，间隙连接持续存在，其数量和大小都有增长，直至脊髓的神经纤维伸达肌节肌肉细胞之间，神经肌肉传递和电兴奋性开始出现后，间隙连接才消失(王绳琦，未发表资料)。

五、间隙连接参与发育的直接证据

过去的十几年，由于没有专一性抑制细胞通讯的药物，对于间隙连接在发育中的作用，

只能根据形态和生理的检测进行推断。近来，间隙连接蛋白已被纯化，并制备了抗体，为直接检验间隙连接与发育的关系提供了新手段。

1984年，Warner等将抗间隙连接蛋白的抗体注入非洲爪蟾早期胚胎，从而提供了有关间隙连接在早期胚胎发育中起一定作用的第一个直接证据。他们选择8细胞期背侧分裂球注入抗体，以阻断连接通讯。结果，注射过抗体的分裂球发育出的区域表现出明显的形态缺陷：脑和眼发育不良或完全没有。这些缺陷可能是直接阻断了控制局部分化的讯息传递而造成的^[27]。进一步，当8细胞期注射的胚胎发育到原肠胚时，割下背部外胚层，进行中胚层诱导，发现抗体注射不影响诱导作用，但诱导出来的中胚层细胞的分化受阻^[28]，证明间隙连接为中胚层分化所必需，它提供分化所需的细胞间相互作用的一个途径。

六、结束语

从上述讨论可以看出，间隙连接在发育过程中普遍存在，并随发育和分化的进程而发生变化。它的出现、数量消长、通道开闭以及消失常常与特定的胚胎发育和分化事件相对应。它在发育中可能担负着多种功能。

间隙连接的一个明显功能是提供了细胞间物质交流和讯息传递的通道。在胚胎发育早期，神经系统和循环系统尚未建立或充分发育，长距离的讯息传递难以进行。然而，要使正常胚胎各部分细胞生长发育彼此协调，离不开细胞间化学讯息的交换。间隙连接在完成这一功能中可能起重要作用。间隙连接的另一功能可能是对细胞的直接的短距离通讯起生理调控作用，通过调控通道的开启和关闭，控制不同时期进出细胞的物质种类和数量，最终调控细胞生长和发育。在发育的特定时期，间隙连接的出现和消失，也强烈地暗示了它们在发育所需的重要讯息传输中的作用。

间隙连接与形态建成的关系，一直是引人注意的课题。有人曾提出一个具有启发性的形态发生概念，认为在胚胎组织中分子特殊的梯

度分布, 能影响细胞行为, 导致产生特殊模式的细胞类型(区域特殊性^[29])。近期工作表明, 间隙连接有助于建立这种化学梯度, 连接通讯的区域模式能决定在哪些细胞建立什么样的梯度^[30]。当一个简单的形态发生梯度借助于间隙连接扩散形成时, 一般认为就建立了决定周围细胞相关位置的浓度梯度。位置信息的确立限定了细胞的“身份”, 细胞将朝限定的方向分化。

间隙连接与分化过程有关的假设已得到一些实验证实。前已述及, 在可兴奋组织分化期间, 间隙连接从所有细胞的质膜上消失, 这是在细胞已具有相当的组织特异形态和分子同一性后发生的一个晚期胚胎事件, 它保证了已分化组织执行正常功能。尽管在有的物种中连接通讯的消失不是分化专一性的, 它存在的时间可能提供它在分化过程中担任什么角色的有意义的线索。

虽然间隙连接的研究还较年轻, 间隙连接在胚胎发生中的广泛存在和变化, 说明了它对发育的重要性。一个十分吸引人的假设是: 间隙连接调控着形态发生因子在细胞间的转运。如果这一假设最终得到证明, 将有助于解决高等生物有机体中细胞生长与分化的控制机制问题。

摘 要

本文讨论了间隙连接与发育的关系。间隙连接普遍存在于胚胎发育过程中, 并随发育和分化的进程而发生变化。它的出现、数量消长、通道开闭以及消失常常与特定的胚胎发育和分化事件相对应。间隙连接不仅在保持相邻细胞间代谢偶合和电偶合中起重要作用, 而且可能通过调控发育所需的重要信息的传输和分布, 最终调控细胞的发育和分化。

参 考 文 献

[1] Furshpan, E. J., et al., 1959, *J. Physiol.*

- 145: 289—325.
- [2] Revel, J. P., et al., 1967, *J. Cell Biol.* 33: 7—12.
- [3] Makowski, L., et al., 1984, *Biophys. J.* 45: 208—18.
- [4] Fawcett, D. W., et al., 1970, *J. Reprod. Fert. Suppl.* 10: 105—22.
- [5] Gilula, N. B., et al., 1976, *Dev. Biol.* 50: 142—68.
- [6] Nagano, T., et al., 1983, *Int. Rev. Cytol.* 81: 163—190.
- [7] Burghardt, R. C., et al., 1981, *Cell Tissue Res.* 214: 18193.
- [8] Dekel, N., et al., 1981, *Dev. Biol.* 86: 356—62.
- [9] Dekel, N., et al., 1980, *Dev. Biol.* 75: 247—54.
- [10] Maller, J. L., et al., 1980, *Curr. Top. Cell. Regul.* 16: 271—311.
- [11] Woodruff, R. I., 1979, *Dev. Biol.* 69: 281—95.
- [12] Larsen, W. J., et al., 1986, *Dev. Biol.* 113: 517—21.
- [13] Potter, D. D., et al., 1966, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55: 328—335.
- [14] Dorresteiin, A. W. C., et al., 1983, *Roux's Arch. Dev. Biol.* 192: 262—269.
- [15] Mclachlin, J. R. et al., 1986, *Dev. Biol.* 117: 146—155.
- [16] Goodall, H. et al., 1984, *J. Embrol. Exp. Morph.* 79: 53—76.
- [17] Kimmel, C. B. et al., 1984, *Dev. Biol.* 102: 483—487.
- [18] 曾弥白等, 1982, *实验生物学报*, 15 (2): 219—232.
- [19] 曾弥白等, 1984, *实验生物学报*, 17 (2): 219—243.
- [20] 曾弥白, 1986, *实验生物学报*, 19 (1): 53—66.
- [21] Weir, M. P., et al., 1982, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 3232—3235.
- [22] Weir, M. P. et al., 1984, *Dev. Biol.* 103: 102—146.
- [23] Blennerhassett, M. G., et al., 1984, *Nature* 309: 361—364.
- [24] Spitzer, C. N., 1982, *J. Physiol.* 230: 145—162.
- [25] Fujisawa, H., et al., 1976, *J. Cell. Sci.* 22: 585—596.
- [26] 蒋婉素等, 1986, 中国细胞生物学学会第三次会议论文摘要汇编, 117页。
- [27] Warner, A. W., et al., 1984, *Nature*,

311: 227—131.

[28] 曾弥白等, 1986, 中国细胞生物学会第三次会议论文摘要汇编, 120页.

[29] Sack, J. M. W., 1983, From Egg to

Embryo. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. 241 pp.

[30] Loewenstein, W. R., 1979, *Biochem. Biophys. Acta.* 560: 1—65.

植物组织培养的次生代谢产物 VII. 酶(过氧化物酶)*

小林 节夫

来自辣根(*Armoracia rusticana*)的过氧化物酶是用作临床检查用药剂, 此外, 由于酶反应灵敏的原故亦作为酶免疫测定及单克隆抗体的筛选测定(Screening assay)的检出用药剂, 成为工业上各种用途的重要酶类之一。我们为考察用辣根植物细胞培养生产过氧化物酶的可能性, 由辣根诱发出愈伤组织。

1. 愈伤组织的诱导

外植体取自辣根根部的形成层部分。因为根部横切时, 外皮形成层部位过氧化物酶活性比中心部位的高2—3倍。另外, 因为从根部采取外植体, 微生物污染的可能性很大, 故最好不使用受伤的根部。而要在注意不要擦伤根的情况下, 用流水洗去附在外皮上的泥土, 除去外皮将根横切成1cm厚的圆片, 然后进行灭菌处理。灭菌的条件是在70%乙醇溶液中浸10秒钟, 再分别浸入0.2%洁而灭溶液5分钟, 0.8%次亚氯酸钠溶液20分钟, 最后用无菌水洗净, 由这一操作所得的根部再用木塞穿孔器沿形成层打孔, 除去两端后用解剖刀间隔2mm切成外植体。

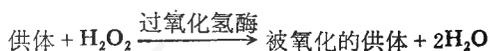
愈伤组织诱导培养基是LS培养基(含3%蔗糖、1%琼脂)。与其他MS、White、Gamborg培养基等相比较, LS培养基最适于诱发辣根的愈伤组织。植物激素是1-萘乙酸 10^{-5} mol/L— 10^{-6} mol/L和6-苄基氨基嘌呤 10^{-6} — 10^{-8} mol/L以及用激动素 10^{-6} mol/L代替6-苄基氨基嘌呤, 在这两种情况下愈伤组织诱导率高, 诱发愈伤组织是在25℃、黑暗下静置四周。

作者此次实验在约900个外植体片中诱导出83个愈伤组织。

2. 酶的活性

A. 活性测定法

过氧化氢酶的反应一般用下述方式表示, 作为供体的基质已有很多报道^[1]。



现在作者能以简便的测定方法, 用4-氨基安替比林(4-aminoantipyrin)和2,4-二氯苯酚作为基质。测定条件是将含有4mmol/L过氧化氢、1mol/L 4-氨基安替比林、2.5mol/L 2,4-二氯苯酚和50mmol/L磷酸缓冲液(pH6.7)的反应液加入酶溶液(全部反应液量为2ml), 在30℃下反应5分钟。反应结束时加入2ml乙醇, 然后测定505nm的吸光度。在上述反应条件下, 以1分钟分解1 μ mol的过氧化氢酶量作为酶单位(一个单位)。

B. 过氧化物酶的提取

将细胞破碎, 取其上清液来测定愈伤组织的过氧化氢酶活性。从正在生长的愈伤组织中在无菌条件下分离10—20mg(鲜重)的细胞块, 悬浮于1ml的0.01mol/L磷酸缓冲液(pH6.7)中。然后在水冷条件下用玻璃匀浆器(1000rpm, 1分钟)将细胞破碎, 离心分离(2500 \times g, 4℃下10分钟)获上清液。离心结束后立即测定酶活性(因为存在蛋白酶)。再将离心分离后的沉淀物在800mmol/L氢氧化钾溶液中悬浮, 即可将与细胞壁结合的过氧化物酶在溶液中分离出来^[2]。辣根愈伤组织在细胞壁上结合的过氧化物酶活性量大致与用磷酸缓冲液溶出的过氧化氢酶的量相等。

诱导的83个愈伤组织用上述方法提取过氧化物酶, 依据酶活性测定的结果, 在辣根的根部筛选出14个活性比较高的愈伤组织。

3. 细胞小块选择法

一般在次生代谢产品的生产中, 愈伤组织中产物的含量比原来的植物减低, 这是大多数不能用愈伤组织进行生产的原因^[3]。但是, 这里提及的辣根过氧化物酶, 在诱导愈伤组织过程中, 既然已在根部分离出

* 本文摘译自山田康之编著“植物细胞培养マニュアル”(1984)講談社サイエンティフィック, 第84—88页。