

细胞核骨架

陈枫 翟中和
(北京大学生物学系)

细胞核骨架(nuclear skeleton)或称核基质(nuclear matrix)是继细胞质骨架系统之后,在真核细胞核内发现的细胞结构。它一般指细胞核内除核膜、lamina、染色质与核仁之外所存在的精细网架体系,以蛋白质成分为主,含有少量的RNA。

早在60年代, Busch 等人最先观察到细胞核内存在一个完整的核蛋白网架(ribonucleoprotein network), 70年代中期, Coffey 和 Berezney 等人明确提出核基质(nuclear matrix)的概念^[1]。但是直到近几年核骨架的研究才得到充分重视,其一是由于核骨架生化抽提、分析技术与特异的电镜技术的建立,带来方法学上的突破;二是由于核骨架在基因的复制、表达等核内事态中的作用引起人们的注意。

现在核骨架研究的深度与广度已有很大进展,但难度较大,有些问题仍处于探索阶段。本文拟简介核骨架研究的概况,并结合我们自己的研究课题侧重于介绍核骨架分子生物学方面的一些工作。

需要说明的是,目前尚无公认的核骨架的名词与概念,学者们常依据各自抽提方法所获得的结果来分别命名,如 nuclear skeleton (核骨架)、nuclear matrix(核基质)、nuclear cage 以及 nuclear scaffold 等等,中文译名更难确切,尽管其基本含义是一致的,我们拟暂用核骨架或核基质两个名称。

一、核骨架的基本成分与形态结构

在细胞核骨架的早期研究中,其基本成分与形态结构常常结合在一起分析, Coffey 实验室的工作是比较经典的^[1]。他们分离小鼠肝细胞的细胞核,用去垢剂溶去核膜,再先后用

DNase 和 RNase 抽提核酸,最后经高盐溶液除去组蛋白及其他可溶性蛋白,结果发现核内还残存有一种以纤维蛋白成分为主的基质,即核基质(nuclear matrix),其蛋白成分占98%以上,还残留着少量DNA和RNA。

此后,人们运用各种生化手段分析核骨架的组成成分。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳的研究结果表明,核基质的多肽成分很复杂,但有几种多肽比较恒定,约占核基质蛋白成分的40—50%,可能是主要成分^[2]。近年 Penman 等^[3]用温和的抽提方法除去核内98% DNA 与86% 组蛋白以后,制备出与胞质中间纤维(intermediate filament)相连的核内网架系统,双向电泳分析说明,核基质的蛋白成分与胞质骨架、染色质很不一样。有些学者发现癌变细胞的核基质成分与正常细胞相比较有明显变化^[4],并且发现一些癌基因表达的蛋白结合在核骨架上^[5]。人们也正在尝试获得核骨架蛋白的单克隆抗体,结合免疫电镜技术来分析确证核骨架的蛋白成分及其分布^[6]。

总之,核基质的成分复杂,各种细胞类型之间差异较大,并非由专一的蛋白成分构成,这一点不像胞质骨架与 lamina 蛋白成分的专一与稳定。目前已经测定核基质含有十余种蛋白,分子量多数为40 000—60 000,主要是非组蛋白的纤维蛋白。要想最后弄清这个问题,有待于核骨架提取分析技术的进一步提高和更专一的免疫化学手段的建立。早期报道核基质中含有DNA与RNA,但是近年的工作表明,严格地讲DNA不应算作核基质成分,而只是功能性的结合;RNA对于保持核骨架的三维网络的完整性则可能是必需的^[7]。

对间期核的形态研究发现,核基质纤维呈精细的三维网络结构,充满核内整个空间,与

lamina、核孔复合体均有连结。核基质纤维粗细不一，直径由 3 nm 到 30 nm，看来是以 3—4 nm 的单丝及其复合体形式存在的。由于生化抽提、样品制备及常规电镜技术的局限，对上述结果确是客观存在还是假象，一直有争议。

Penman 实验室建立了一种包埋-去包埋剂电镜技术，用 DGD(diethylene glycol distarate) 代替常规的环氧树脂作包埋剂，切片后溶去包埋剂，而且不需染色，经 CO₂ 临界点干燥即可观察，大大提高了网架纤维的可见度。他们又结合细胞成分的选择性抽提方法，十分成功地显示了核骨架-lamina-中间纤维系统的精细结构，认为它是真核细胞内另一独立的骨架体系^[8]。至此，核骨架的真实存在已经日益为人们所承认。Penman 等^[9]还观察分析了几种病毒分别感染细胞以后不同时期核骨架的变化，认为宿主细胞核骨架发生了重建以适应病毒的侵染增殖。Fey 和 Penman^[10]还发现促癌剂等(tumor promoters)能够诱导 MDCK(Madin-Darby canine kidney)细胞的核骨架-中间纤维支架的特殊形态特征。这些研究有可能为肿瘤诊治提供理论依据和手段。

二、核骨架与 DNA 复制

大约 20 年前，Jacob 等人就提出，对 DNA 复制而言，在细胞里有一个结构支架(structural framework)是十分重要的。而且人们已经用各种遗传学和生化技术证明原核细胞 DNA 复制的复合体结合在细胞膜上，但类似的结论却并不适用于真核细胞。近年的研究表明，真核细胞内 DNA 复制可能依靠核骨架作空间支架。

DNA 复制与核骨架关系的一个基本点是说明新复制合成的 DNA 与核骨架结合。早在 1975 年，Berezney 和 Coffey 就用同位素(³H-TdR)标记技术证实了这一点。80 年代初，Coffey 等^[11]分别以大鼠再生肝细胞和体外培养的 3T3 成纤维细胞为材料，经³H-TdR 脉冲

标记 30 秒时，发现与核骨架结合的 DNA 中 90% 是新合成的 DNA，结合电镜放射自显影技术以及对核骨架上结合的 DNA 片段大小的计算，深化了以前的工作，并设计对照实验排除了提取过程中产生非专一性结合的问题。据此他们提出模型，推想 DNA 复制的复合体锚定在核骨架上，DNA 复制时缠绕着这些复合体。Berezney 等^[12]进行了类似的实验，他们发现在核骨架抽提过程中使用蛋白酶抑制剂，减少核骨架的降解，则结合在核骨架上的新合成的 DNA 量有所增加；若用 DNase 处理，则与核骨架结合的 DNA 容易脱落下来，而我们知道新合成的 DNA 对 DNase 比较敏感，由此也可推断核骨架上结合的 DNA 是正在复制的，即 DNA 复制点是连续不断地结合在核骨架上的。作者提出固定与滑动模型(fixed and sliding matrix models)来说明 DNA 复制子亚单位(replicon subunits)内 DNA 复制具有固有的空间组织序列。上述模型都还只是假设，具体细节有待探讨与证实。

真核细胞染色体的 DNA 复制与其包装构建密切相关，这是一个非常复杂的问题，核基质究竟如何参与染色体构建目前并不明确。70 年代人们提出了染色体的三级结构形式，即核小体是染色质的基本单位，由核小体盘绕成螺线管(solenoids)，也就是形成复制环的丝；最后缠绕成超螺旋的复制环。显然，了解 DNA 包装过程中上述结构的功能意义是很重要的。提出 DNA 复制模型以后，Coffey 等^[13]又报道了真核细胞 DNA 超螺旋复制环的排列与复制方式的关系，指出在 3T3 细胞中，这些复制环可以解旋并观察到核骨架周围的 DNA 晕，并利用放射自显影技术表明 DNA 复制发生在复制环基部的固定位点上。McCready 等^[14]深入了前面的工作，他们抽提 HeLa 细胞得到拟核(nucleoid)，即裸露的线形 DNA 以超螺旋的完整复制环(loop)形式包装在蛋白质与 RNA 骨架中，并根据实验推测一个复制环中可能有几个复制起点，而且只有当复制起点结合到核

骨架上时, DNA 合成才能进行。在上述工作基础上, Painta 和 Coffey^[15]提出了 DNA 复制环与核基质共同构建染色体的模式图, 在此把核骨架与染色体支架等同起来, 这个模式图的细节还不清楚, 尤其是核骨架与染色体支架的确切关系。

对于分裂间期细胞, 一些学者认为虽然染色体结构不存在了, 但 DNA 复制环与核骨架相结合的结构形式依然存在, 这可能是适应间期核内基因复制与表达条件的^[19]。Laemmli 等曾报道细胞分裂间期核基质蛋白成分与染色体支架蛋白成分有相似之处, 并就核骨架与染色体关系提出很有意义的见解。

进一步的研究证明, DNA 复制起始点 (origin) 是永久结合在核骨架上的。Razin 等^[16]从鸡成红细胞中分离出含有 DNA 复制起始点的 DNA 片段 (oriDNA), 分别与成红细胞自身总 DNA、成熟红细胞总 DNA、核骨架上结合的 DNA (nmDNA) 进行复性动力学分析, 发现所有 oriDNA 序列都在 nmDNA 组分里出现。采用分子杂交技术定位 α -珠蛋白基因内部的复制起始点, 发现它们就是该段 DNA 与核骨架永久结合的位点。Peter A. Dijkwel 等^[17]分别对同步化与非同步化的 BHK 细胞进行“基质环结构 (matrix-halo structure)”放射自显影分析, 也支持上述结论。

在研究 DNA 复制与核骨架的空间关系时, 还发现 DNA 聚合酶 (polymerase α) 紧密结合在进行活跃 DNA 复制的小鼠再生肝细胞核骨架上的特殊位点^[18]。这提示我们 DNA 复制复合体可能动态组装在核骨架上。

三、核骨架与基因表达

对真核细胞转录调控因子的研究是分子生物学的重要领域之一, 核骨架与基因表达的关系是 80 年代才开始探讨的, 大致集中在两个方面。

一是注意到某些正在活跃转录的基因优先与核骨架结合, 人们推测这种结合可能是转录

造成的, 但是由于这些基因在它们存在的所有体细胞中都转录, 所以很难直接检验该结论。于是不少学者以鸟类的若干模式基因为材料取得了很有意义的结果。Vogelstein 等^[19]的工作表明鸡卵清蛋白的基因优先与输卵管细胞核骨架结合, 而与肝细胞核骨架则无此关系; 相反, β -珠蛋白基因不在输卵管细胞里转录, 所以也不与输卵管细胞核骨架优先结合, 作者提出了活性基因与核骨架结合的两种可能机制, 并指出超螺旋的复制环可能通过有活性的基因锚定在核骨架上。B. W. O'Malley 等^[20]利用雌性激素能促进鸡输卵管细胞卵清蛋白基因转录活性增高而且效应可逆这一典型实验材料, 发现只有活跃表达的基因定量结合在核骨架上; 而不转录的基因位于突出的环状结构 (loop) 上, 经过限制性内切酶消化就游离下来。他们通过对 11 个基因组序列的研究, 把上述结论推广到卵清蛋白基因之外的其他一些基因, 而不管它们的转录是否受激素调控都无例外。Hentzen 等^[21]以鸡红细胞为材料, 使用分子杂交和电镜技术也发现 β -珠蛋白基因序列大量富集在核骨架上, 可见, 核骨架可能在另一水平上对真核细胞基因表达起着调控作用。

另一方面的研究即人们发现同位素迅速标记的 RNA 几乎全部与核骨架结合, 而且强调聚合酶在核骨架上有结合位点, 进而发现 mRNA 与核骨架是通过一些特殊蛋白结合的。Ross 等^[22]利用珠蛋白基因在鸡的成红细胞里活跃转录这一材料, 发现抽提以后, 90% 以上的珠蛋白核 RNA 仍然与核骨架结合, 而在成熟红细胞核骨架里则很少或完全不存在, 故认为核骨架是核内 RNA 特异加工修饰的场所。

1985 年, Vogelstein 等^[23]总结前人的工作, 认为哺乳类和鸟类的许多基因只有锚定在核骨架上才具有转录活性。那么其他低等生物是否也遵循此规律呢? 为此他们用果蝇作材料, 以热休克 (heat shock) 调整转录活性的经典实验模型为基础, 研究两个相对的基因即热休克基因 (常温下不转录) 和胞质肌动蛋白基因 (高

温培养下不转录)与核骨架的关系,发现两个基因都与核骨架结合,并指出可能是通过基因5'-末端附近的多位点相互作用完成的。但是与哺乳类和鸟类细胞的研究不同,这些基因与核骨架的结合不依赖于其转录活性的高低,即果蝇在两种不同生长条件下,上述两个基因与核骨架结合的方式没有什么差异。这也许预示着果蝇在基因表达与核骨架的关系上遵循着不同规律。然而,生物学规律往往很复杂,后面将要介绍的我们实验室的工作又似乎说明病毒基因转录活性与核骨架的关系同高等生物相似。

近年的工作更加深入, Cockerill 等^[24]定位了小鼠免疫球蛋白 κ (Kappa)基因内部的一个核基质结合区域(nuclear matrix association region, 简称 MAR), 它包含两个拓扑酶 II 的位点, 靠近组织特异的增强子。作者认为细胞核内至少存在着 10,000 个类似的进化保守区域(MAR), 这些位置可能在染色体复制环的功能构建中起重要作用, 也是 DNA 活跃转录所需要的, 而且在这一过程中 MARs 可能与邻近的增强子相互作用。核基质蛋白可能对启动子作用也有影响。

在核骨架与基因表达之间关系的研究中, 由于实验材料与方法不同, 会得出不尽相同的结论, 有时甚至相反^[25]。这不仅是方法学问题, 也反映了课题本身的复杂性。尽管目前对一些现象尚存有争议, 但的确已经取得了很有意义的进展。

四、核骨架与病毒复制

病毒是最简单的生命体, 它必须在宿主细胞内才能表现其主要的生命活动。现已积累的大量资料说明: 病毒代谢——基因复制、转录、翻译以及病毒的装配并不是在宿主细胞的可溶性介质内进行的, 而是都与细胞骨架有关系。胞质内复制病毒的病毒 RNA 代谢、结构蛋白以及核壳体装配均与胞质骨架有关。核内 DNA 病毒与核骨架的关系是近年很有意义的

工作, 已经发现单纯疱疹病毒的核壳体在核骨架上装配, 疱疹病毒核衣壳蛋白是由胞质骨架运入细胞核内并结合在核骨架上作为核壳体装配的原料^[9]。也有文章报道腺病毒 hnRNA 拼接过程中能与核骨架结合, 腺病毒早期表达的蛋白质结合在核骨架上, 腺病毒 DNA 也有结合在核骨架上的现象^[26]。

在此基础上我们也做了一些工作, 并取得了令人感兴趣的初步结果。我们运用细胞分级提取与 DGD 包埋-去包埋剂电镜技术, 观察到腺病毒工厂是由核骨架纤维网架所支撑的, 病毒依靠核网架进行装配^[27]。双向电泳分析表明, 腺病毒感染能导致宿主细胞(HeLa)核骨架蛋白成分的变化^[28]。分别以腺病毒 DNA 的早期(E_{1a} 、 E_{1b} 、 E_3)和晚期(L_1 、 L_2 、 L_3)转录片段作探针, Northern 分子杂交的实验结果说明, 腺病毒早期和晚期转录的 mRNA 在修饰与拼接前均首先结合在核骨架上, 结合在核骨架上的 mRNA 分子量较大; 而核池内与胞质内的 mRNA 分子量较少, 是修饰之后的产物。进一步用 $^3\text{H-U}$ 标记细胞说明, 腺病毒 mRNA 首先在核骨架上合成, 然后转移到核池与胞质, 可见, 腺病毒 mRNA 的合成与拼接均与核骨架有关^[29]。我们还探讨了腺病毒 DNA 与核骨架的关系, 以腺病毒的早期(E_{1a} 、 E_{1b})与晚期(L_2)转录区 DNA 片段作探针进行 Southern 分子杂交, 结果分析说明, 腺病毒感染早期, 正在活跃转录的基因片段(E_{1a} 、 E_{1b})与宿主细胞核骨架紧密结合, 而非活性的基因片段(L_2)则不紧密结合, 从而推测宿主细胞核骨架可能对病毒 DNA 的转录有重要作用^[30]。以上工作初步表明, 作为外源性基因组的病毒 DNA, 其基因表达过程与高等生物细胞自身基因表达具有相似的规律, 即基因(或 DNA 片段)的活性与它是否结合在核骨架上有关。

综上所述, 核骨架的研究已经有了相当的进展, 但是由于方法学上的局限和问题本身的复杂, 目前许多课题还不能得出完全一致的定论, 更有不少很有意义又令人感兴趣的领域有

待探索。

摘 要

本文介绍了核骨架的概念、组成、形态、功能等基本概况。核骨架或称核基质是真核细胞核内的精细网架体系,以蛋白成分为主,含有少量RNA。核骨架不仅是维持细胞核形态的支架,而且在DNA复制、染色体功能构建、基因表达以及拓扑酶和增强子的作用等方面均起着重要作用,并与病毒复制关系密切。

参 考 文 献

- [1] Berezney, R., & D. S. Coffey, 1974, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60: 1410-1417.
- [2] Berezney, R., & D. S. Coffey, 1977, *J. Cell Biol.*, 73:616-637.
- [3] Capco, D. G., et al., 1982, *Cell*, 29:847-858.
- [4] Kuzmina, S. N., & T. V. Buldyaeva, 1983, *Biochem. (Biokhimiya)*, 48:844-850.
- [5] Eisenmen, R. N., & C. y. Tachibana, 1985, *Mol. Cell Biol.*, 5:114-126.
- [6] Turner, B. M. & L. Franchi, 1987, *J. Cell Sci.*, 87(2):269-282
- [7] Fey, E. G., et al., 1986, *J. Cell Biol.*, 102:1654-1665.
- [8] Fey, E. G., et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 98:1973-1984.
- [9] Penman S., 1985, In *Virology* (Fields, B. N., Ed), Raven, New York. pp. 169-182.
- [10] Fey, E. G., & S. Penman, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:4409-4413.
- [11] Pardoll, D. M., et al., 1980, *Cell*, 19: 527-536.
- [12] Berezney, R., & L. A. Bachholtz, 1981, *Exp. Cell Res.*, 132:1-13.
- [13] Vogelstein, B., et al., 1980, *Cell*, 22:79-85.
- [14] McCready, S. J., et al., 1980, *J. Cell Sci.*, 46:365-386.
- [15] Painta, K. J., & D. S. Coffey, 1984, *J. Cell Sci. Suppl.*, 1:123-135.
- [16] Razin, S. V., et al., 1986, *Nucl. Acids Res.*, 14:8189-8207.
- [17] Dijkwel, P. A., et al 1986, *Nucl. Acids Res.*, 14:3241-3249.
- [18] Smith, H. C., & R. Berezney, 1980, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97: 1541-1547.
- [19] Robinson, S. I., et al., 1982, *Cell*, 28: 99-106.
- [20] Ciejik, E. M., et al., 1983, *Nature*, 306: 607-609.
- [21] Hentzen, P. C., et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 81:304-307.
- [22] Ross, D. A., et al., 1982, *Biochem.*, 21: 764-771.
- [23] Small, D., et al., 1985, *Nucl. Acids Res.*, 13:2413-1431.
- [24] Cockerill, R. N., & W. T. Garrard, 1986, *Cell*, 44:273-282.
- [25] Razin, S. V., et al., 1985, *Nucl. Acids Res.*, 13:7421-7444.
- [26] Smith, H. C. et al., 1985, *Biochemistry*, 24:1197-1202.
- [27] Zhai Zhonghe (翟中和), et al., 1987, *J. Virology*, 61(41):1007-1018.
- [28] Zhai Zhonghe (翟中和), et al., 1988, *Cell Biology International Reports*, 12(2): 99-108.
- [29] Zhai Zhonghe (翟中和), et al., 1986, Beijing Symposium on Electron Microscopy, pp 75.
- [30] Zhai Zhonghe (翟中和), et al., 1988, *Scientia Sinica (B)*, 10:1052-1058.