

微丝骨架蛋白分子重组与细胞转化

林 仲 翔

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物室)

微丝骨架蛋白又称收缩蛋白,是包括肌动蛋白、肌球蛋白和许多种连接蛋白的泛称;它们组成肌肉细胞的肌丝——粗丝、细丝和Z带,行使收缩功能;它们的异构分子在非肌肉细胞内组成束状应力纤维网架,与细胞贴壁及张力的维持有关。

许多研究资料提示,细胞转化后微丝骨架蛋白分子进行重组(reorganization),这种现象很可能与细胞的恶性行为如浸润、转移等活动相关^[1,2]。因此,研究微丝骨架蛋白分子重组的结构和调节与细胞转化的相关性,可能了解肿瘤细胞的恶性行为、预测其转归及治疗的研究提供依据,有理论和应用意义。国外对微丝骨架分子组装的研究十分重视,与细胞转化的关系的研究也已经有不少报道。本文介绍微丝骨架组装(assembly)的变化,与细胞运动、贴壁、转化及细胞恶性行为的关系,希望有助于国内这方面研究工作的进一步开展。

一、应力纤维的形成与细胞贴附性生长

应力纤维是由微丝组装形成的束状结构,它的基本成分是F-肌动蛋白。在培养的细胞内,应力纤维发达,但在整体组织细胞内很少见,只在创伤肉芽组织细胞、脾窦和血管内皮细胞,耳蜗螺旋韧带细胞内曾有观察记载^[3]。

培养的细胞内应力纤维的多少与细胞的贴壁状态有关;静止的成纤维细胞贴壁牢,胞质铺展,应力纤维多,呈粗壮而直的纤维束相互平行排列,与细胞纵轴方向一致。反之,运动活跃的细胞、分裂期的细胞和转化细胞等,细胞贴壁较弱,胞质铺展较差,细胞近似圆形,其应力纤维减少或消失。在细胞贴附的过程中,细胞与底质(cell-substrate)的接触点形成

一种贴附结构,即粘着斑(adhesion plaques)。在膜内面,粘着斑与粘着斑之间分布的微丝收缩,产生张力。沿张力方向的微丝组装形成束状应力纤维。已知这个过程需要 Ca^{++} , ATP和肌球蛋白^[2]。

二、细胞运动时微丝组装的动态变化

在细胞运动时,应力纤维能迅速解体,变成无定形的微丝网架。当细胞贴壁时,贴附的胞质区又形成新的应力纤维。微丝通过这样不同组装形式的动力学变化,不断调整其在细胞内的排列和分布,以执行功能。实验性研究观察到运动的内皮细胞^[3]和成纤维细胞^[4],其应力纤维的消失与重现和粘着斑的破坏与形成的动态变化一致。这个过程是肌动蛋白与连接蛋白分子组装和去组装的调节过程,可能与粘着斑的蛋白激酶活性表达相关。应力纤维荧光标记后非常显著,与其他蛋白成分的免疫荧光染色相结合,能从分子定位水平研究微丝蛋白分子组装变化与细胞活动的关系。

三、微丝骨架的蛋白成分与分子组装^[2]

1. 肌动蛋白 已知有 α -、 β -、 γ -三种异构体,分子量为42KD。其分子聚合体为纤维状肌动蛋白(F-actin),组成微丝。phalloidin是专一性结合肌动蛋白的分子。以荧光标记的phalloidin作为分子探针,可以从分子水平追踪肌动蛋白组装结构的变化。 α -肌动蛋白是肌丝I带的成分, β -、 γ -肌动蛋白是应力纤维的成分。

2. 肌球蛋白 220KD,是肌丝A带成分。其分子头部重链部分突出,以相反的方向组成粗丝的两端。肌球蛋白重链与肌动蛋白交联,

裂解 ATP, 产生能量, 通过交联分子之间的滑动而执行收缩功能。在非肌肉细胞内肌球蛋白分子异构体也以类似方式与肌动蛋白交联, 裂解 ATP, 行使收缩功能。肌球蛋白是应力纤维的组成成分^[6]。

3. α -辅肌动蛋白 (α -actin, 简称 α -A) 100 kD, 又称 Z 蛋白, 最先发现在肌丝 Z 带。其分子异构体在非肌肉细胞内分布于致密斑 (dense bodies), 连接 F-肌动蛋白组成应力纤维。 α -A 又是肌动蛋白与粘着斑之间的连接分子。在肌丝组装和应力纤维组装过程中, α -A 分子起着中心作用^[2, 5-7]。

4. 调节蛋白 指 Tropomyosin 和 Troponin, 又称辅肌球蛋白, 是调节肌球蛋白/肌动蛋白交联的分子。这个过程与细胞内 Ca^{++} 水平变化相关。当细胞内 Ca^{++} 水平低时, Tropomyosin 与 Troponin 形成复合物, 抑制肌球蛋白与肌动蛋白分子间滑动; 当 Ca^{++} 水平升高时, Ca^{++} 与 Troponin 结合, 释放出的 Tropomyosin 与肌动蛋白结合, 改变分子构型, 肌球蛋白/肌动蛋白分子间滑动而收缩。在静止的非肌肉细胞内, Tropomyosin 与肌动蛋白定位相同, 沿应力纤维和褶皱膜 (ruffling membrane) 分布, 与保持细胞形状有关。非肌肉细胞内的 Troponin C 可能与肌肉细胞的 Troponin 相似, 其与 Ca^{++} 离子结合或解离, 起着调节细胞运动的“开-关”作用^[2]。

5. 其他连接蛋白^[4] Profilin 与肌动蛋白分子聚合有关。Fimbrin 在试管内证明是诱导肌动蛋白组装成束的分子, 在细胞内沿应力纤维分布。

6. 微丝组成的多角网架 (polygon structures) 结构^[7, 8] 在培养的成纤维细胞内, 荧光 Phalloidin 染色所显示的肌动蛋白组成的网架结构, 类似三维空间的多角形, 由许多三角形和四角形亚单位组成, 最早被称为微丝多角网架结构^[7] (图版图 1)。以实验方法使培养细胞脱壁后再重新贴壁, 细胞在贴壁过程中, 由圆形逐渐恢复为扁平形, 可见胞质铺展和新的应

力纤维形成, 此时微丝多角网架最多见; 在已完全铺展的细胞内较少见。因此多角形网架被认为是一种微丝组装的过渡性结构。其功能意义仍有待于阐明。免疫荧光细胞化学证明多角形网架含有微丝骨架的各种蛋白成分, 且各有其定位特征。多角形网架结构单位三角形或四角形的“边线”含有肌球蛋白, 辅肌球蛋白和肌动蛋白, 而“顶点”则含有 α -辅肌动蛋白和肌动蛋白。由“顶点”向四周胞质区发射出许多应力纤维, 故“顶点”被认为是应力纤维的组织中心^[7]。有趣的是最近发现心肌细胞的肌丝在特定条件下也形成多角网架结构^[8]。以胰酶处理, 分离心肌细胞, 种植在平皿内, 心肌细胞在贴壁过程中, 肌丝多角网架最多见。免疫荧光细胞化学证明肌丝多角网架的“边线”含有肌肉特异性肌球蛋白和肌动蛋白; “顶点”含有肌肉特异性 α -辅肌动蛋白 (Z 带蛋白) 和肌动蛋白 (图版图 2)。肌丝多角网架表现为严格的“等边性”, 由许多等边三角形和四角形亚单位组成。等边的边长相同于一个肌节 (sarcomere) 的长度^[8]。从“顶点”向四周胞质发出的肌丝结构象是边线肌节的延伸。在展平的心肌细胞内, 肌丝多角网架结构少见, 被分化的肌丝纤维取代。以上表明 (1) 非肌肉细胞和肌细胞内不同的异构体收缩蛋白分子组装形式的相似性, 形成相似的多角网架结构; (2) 收缩蛋白分子的组装又受细胞内特定分化程序的控制, 因此心肌细胞的肌丝收缩蛋白以特化的肌节长度组成等边性多角网架, Z 带蛋白定位在顶点。

四、微丝与质膜的连接

微丝分布在细胞质的外周区, 靠近质膜, 微丝束应力纤维的末端终止于粘着斑。粘着斑位于细胞质膜与底质接触点的内面, 它的形成与底质 (substrate) 内的纤粘蛋白 (Fibronectin, 简称 FN 蛋白) 有关。细胞附着后, 底质内 FN 与细胞表面 FN-受体结合, 诱导对应区质膜内电子致密斑块形成, 即粘着斑。FN 受体又称 Integrin^[9, 10], 被列入粘着斑的蛋白成分之一;

是一种跨膜分子。FN 的单抗或含 FN 有效氨基酸序列(Arg-Gly-Asp-Ser)的多肽与 FN 受体竞争结合, 阻断细胞向底质的贴附, 破坏应力纤维的结构。故粘着斑是微丝与质膜的连接点^[2,9], 其蛋白成分包括:

1. **Vinculin (纽蛋白)** 主要分布在粘着斑, 心肌的间盘, 上皮细胞的桥粒连接和平滑肌细胞的致密斑, 是连接微丝与质膜的蛋白成分。它是一个单体分子, 130 kD, 在溶液内有自身连接形成斑块的倾向。实验证明 Vinculin 可能直接地、或通过另一个连接蛋白 Talin 分子与质膜相连。连接的方式根据实验资料比较公认的模式如图所示。

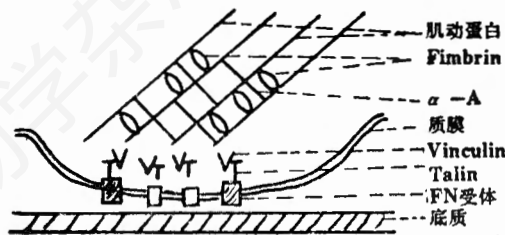


图 微丝与质膜的连接模式示意图(参考[2])

2. **Talin** 为 220 kD 单体, 主要分布在粘着斑, 连接 Vinculin 和 FN-受体。还分布在褶皱膜的边沿^[2]。

3. **α-辅肌动蛋白(α-A)** 在粘着斑区的

致密斑分布, 与微丝相连。

五、转化细胞内微丝蛋白分子重组装与重分布——肌动蛋白小体结构

1. 转化细胞内的肌动蛋白小体^[2,11-13]

Rous 肉瘤病毒(RSV)转化细胞内应力纤维和粘着斑受到破坏, 其蛋白成分经重组装形成“小体”结构, 大小(0.2—2 μm)数目不等。肌动蛋白、α-A 免疫荧光染色显示“小体”为实体。Fimbrin 免疫荧光染色“小体”也是实体。以 Vinculin 或 Talin 免疫荧光染色, 显示为中空的环形。小体位于细胞质膜与底质接触点内面, 故被认为是转化后细胞与底质间不稳定的粘着斑结构。在不同转化因素——病毒、化学因子、物理因子所转化的细胞内曾观察到^[12], “小体”的大小、数目、外形、分布等常因细胞类型或转化病毒株的不同而有差异(表 1), 并以不同的名称进行描述, 如肌动蛋白小体^[12](本文通用)、花环小体(rosette)^[11]、点状小体(dot-like bodies)^[13]、焦点接触(focal contacts)^[2]、片块物(aggregate)^[2]等(见表 1, 2)。用温度敏感 RSV 病毒突变株诱发成纤维细胞转化实验证明, 应力纤维与粘着斑的解体或破坏, 以及肌动蛋白小体的形成发生在转化基因表达的早期。

表 1 转化细胞内肌动蛋白组装形式(小体, 束状)^[12]

细胞系	肌动蛋白小体分布	肌动蛋白小体直径(平均)μm	平均每 10 个细胞内含有小体数目	平均每 10 个细胞内含有肌动蛋白束数目
B 77-NRK	分散, 中央	0.5—2(~2)	40	0—5
P _r -NRK	中央	0.5—1(~1)	30	5—10
B 77-NRK(S)	中央, 分散	0.2—1(~1)	30	10—20
K-NRK	边沿, 分散	0.2—2(~1)	>100	0—5
Neuroblastoma	中央	2—4(~4)*	20	5—10
SR-b-CEF	中央	0.2—1(~1)	40	5—10
SV ₄₀ -3 T 3	中央	0.5—2(~1)	20	5—10
F ₀	遍布	0.2—1(~1)	60	>20
F ₁₀	遍布	0.2—1(~1)	110	10—20

注: 小体直径按最小—最大直径。平均大小指 70% 以上小体的大小。

小体数目按 10 个细胞统计, 变异在 40%。

* 小体直径大, 有一个内陷或中空, 很象花环状。

表2 转化细胞内肌动蛋白小体的报道资料

作者	年代	细胞系	肌动蛋白小体所用的名称	期刊
David-Pfeuty 等	1980	RSV 转化细胞	rosette, 花环	<i>P.N.A.S.USA</i> , 77:6687-91
Carley, ww 等	1981	RSV 转化细胞 神经母细胞瘤(化学转化) 黑色素瘤(UV 诱导)	Aggregates, 小体	<i>J.Cell Biol.</i> , 90:797-802
Carley, ww 等	1985		同上	<i>Eur.J.Cell Biol.</i> , 39: 313-20
Wang, E. 等	1984	RSV 转化细胞	细胞-底质接触点	<i>J. Cell Biol.</i> 93:761-71
Tarone, G 等	1985	同上	Podosome, 伪足体	<i>Exp. Cell Res.</i> , 159:141-57
Marchisio, P.C. 等	1984	同上	同上	<i>Exp. Cell Res.</i> 154:112-24
Marchisio, P.C. 等	1987	同上	同上, dot-like bodies	<i>Exp. Cell Res.</i> 169:202-214
Wang YL 等	1987	同上	Aggregates, 小体	<i>J. Cell Biol.</i> 104:1521-26
Lin, ZX. 等	1990	人高转移癌 DNA 转化细胞	Aggregates, 小体	<i>Cell Res.(Chira)</i> (in press)

表3 病毒癌基因产物蛋白激酶活性、底物及定位在肌动蛋白小体上的资料^[2]

病毒癌基因产物蛋白激酶	底物					定位
	Vinculin	Talin	FN-受体	焦点接触	伪足小体、花环	
src	+	+	+	+	+	
abl	+	?	?	+	+	
yes	+	?	+	+	+	
fps	±	-	+	±	?	
ros	±	?	?	?	?	

2. 肌动蛋白小体与癌基因表达 有实验证据^[14,16]表明,RSV 癌基因的蛋白产物 PP^{60src} 定位在转化细胞质膜内面小斑块区,即肌动蛋白小体上。Vinculin 是 pp^{60src} 酪氨酸蛋白激酶的专一性底物。细胞转化后, Vinculin 酪氨酸磷酸化水平比转化前升高 10—20 倍^[16]。这可能是导致粘着斑和应力纤维解体的重要原因。其他病毒癌基因产物也有定位在肌动蛋白小体的(表3),表明肌动蛋白小体是癌基因蛋白表达的定位特征。

3. 肌动蛋白小体是高度动力学变化的结构^[17] 活细胞显微注射和显微缩时摄影记录资料表明,RSV 转化细胞的肌动蛋白小体成分, α -A 蛋白分子的转换速率比正常细胞粘着斑内 α -A 分子转换率明显增快。显微注射标记荧光的 α -A 分子进入转化细胞,显示出小体结构,其大小、数目和分布变动频繁,反映

出小体成分的高度动力学变化性和不稳定性,这种现象可能与转化细胞活跃的运动,贴壁不依赖性和浸润、转移特性有关^[1,2,11,12,17]。

六、癌细胞转移能力与微丝骨架变化的关系

根据微丝骨架在正常细胞运动和贴附功能中的作用,以及细胞转化后,肌动蛋白分子重组形成的小体位于细胞与底质接触点等现象,学者们推测,肌动蛋白的重组可能与转化细胞的浸润、转移等恶性行为有关。这方面已有的直接证据分为以下三方面:

1. 同一肿瘤细胞系的高转移与低转移亚系细胞内微丝骨架组装表现的明显差别 前人^[12,18,19]分别比较了小鼠黑色素瘤、纤维肉瘤的高转移和低转移亚系细胞的微丝-膜骨架特征、细胞活动能力与贴壁能力、细胞在动物

体内形成实体瘤的特点。以免疫荧光染色、干涉反映显微术(Interference Reflection Microscopy, IRM)及显微缩时摄影术相结合的资料提示:(1)细胞内应力纤维和粘着斑的完善及发达程度与细胞的转移能力呈负相关;(2)高转移系癌细胞表面FN网架消失,与细胞的高活动力,不易贴壁特性相关。低转移系细胞表面有精细的FN纤维网,与该细胞的低活动性和贴壁牢固相关;(3)高转移系细胞种植在动物体内,形成松散的瘤团,细胞与细胞之间连接少。低转移系细胞在动物体内形成实体瘤块,细胞之间连接多而紧密;(4)高转移系细胞内的肌动蛋白与Vinculin重组,形成片块状物,定位于细胞与底质接触点处。这种片块可能是另一些报道^[12]中所描述的肌动蛋白小体(表1)。我们最近在人的高转移性瘤组织DNA所转化的细胞(LM-51)内,观察到应力纤维和粘着斑破坏的现象及肌动蛋白, α -A/vinculin 荧光阳性的小体结构。这种现象可能与LM-51细胞明显的转移特性相关^[20]。

2. 转化细胞表面蛋白水解酶活性^[21]与血纤蛋白酶原激酶(plasminogen)、尿激酶(Urokinase)定位^[22]与肌动蛋白小体组一致。这一资料支持关于肌动蛋白小体的形成与细胞浸润、转移恶性行为有关的分析。

3. 动物体内的巨噬细胞和破骨细胞的胞质内有肌动蛋白小体样结构。小体的蛋白成分的免疫荧光及分布特点与RSV转化细胞内的小体相似^[13], 更加支持有关肌动蛋白小体结构与细胞浸润、转移活动相关的分析。

以上三方面线索值得更进一步研究和证实。

七、研究方向与展望

1. 促癌剂TPA诱导微丝肌动蛋白分子重组——实验研究模型。TPA是一种多环二萜酯分子,已证明有促癌作用。在没有诱癌剂(Carcinogen)作用的条件下,TPA处理的培养细胞内微丝骨架蛋白重组,类似在病毒转化

细胞内的改变,是研究微丝蛋白重组的动力学过程及其调节的理想实验模型^[23,24], TPA还能引起成肌细胞内的肌丝肌动蛋白重组,形成小体结构,其所含蛋白成分及定位特征与转化细胞内的很相似,但直径约大10倍,有利于光学和电镜观察^[25],是研究微丝骨架蛋白异构分子组装调节的实验体系。

2. 利用细胞转化前后,或同一瘤株的高转移和低转移亚株的对比,分析细胞转移特性与微丝骨架蛋白组装变化在不同层次上的相关性。

3. 探索诱导微丝骨架组装改善的因素和对癌细胞转移性的逆转效应。

4. 分析手术后肿瘤标本中瘤细胞的微丝骨架表达特征,追踪患者术后转归,积累和提出预测肿瘤细胞恶性行为的综合指标。

摘 要

本文介绍正常细胞微丝骨架组装特点和与细胞贴壁及运动的关系;细胞转化后,应力纤维和粘着斑破坏,微丝骨架蛋白分子重组,肌动蛋白小体形成等变化与转化细胞恶性行为的相关性。本文并提出今后有关本领域的研究方向。

图 版 说 明

1. a—鸡胚成纤维细胞原代培养。正在铺展的细胞内微丝多角网架。罗丹明荧光Phalloidin染色($\times 1337$)
b—为图1a的投影描图,示多角网架结构。
c—多角网架亚单位四角形示意图。1为边长。
2. a—鸡胚心肌细胞原代培养早期。心肌细胞在贴壁过程中胞质内肌丝形成的多角形网架,肌动蛋白荧光染色。 $(\times 842)$
b—为图2a的投影描图,示肌丝多角网架结构。N为核区。
c—肌丝多角网架亚单位等边三角形示意图。边长1相当于一个肌节长度,已在电镜观察中证实。电镜资料见参考文献^[8]。

以上图片、描图、示意图为作者的研究资料,

参考文献

- [1] Ben-Ze'ev, A., 1985, *Biochim. Biophys. Acta*, 780: 197—212.
- [2] Burrige, K., 1986, *Cancer Rev.*, 4: 18—78.
- [3] Wong, M. K. K., and A. I. Gotlieb, 1988, *J. Cell Biol.*, 107: 1777—1783.
- [4] Rinnerthaler, G., et al., 1988, *J. Cell Biol.*, 106: 747—760.
- [5] Langanger, G. et al., 1986, *J. Cell Biol.*, 102: 200—209.
- [6] Holtzer, H. et al., 1986, *Bibliothca Anat.*, 29: 109—125. (Karger, Basel).
- [7] Lazarides, E. 1976, *J. Cell Biol.*, 68: 202—219.
- [8] Lin, Z. X. et al., 1989, *J. Cell Biol.*, 108: 2355—2367.
- [9] Chen, W. T. et al., 1986, *J. Cell Biol.*, 103: 1649—1661.
- [10] Akiyama, S. K. et al., 1989, *J. Cell Biol.*, 109: 863—875.
- [11] David-Pfeuty, T. and S. J. Singer, 1980, *Proc. Natl. acad. Sci. USA.*, 77: 6687—6691.
- [12] Carley, W. W. et al., 1981, *J. Cell Biol.*, 90: 797—802.
- [13] Marchisio, P. C. et al., 1987, *Exp. Cell Res.*, 169: 202—214.
- [14] Rohrschneider, L. R. 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 3514—3518.
- [15] Sefton, B. M. et al., 1981, *Cell*, 24: 165—174.
- [16] Hunter, T., and J. A. Cooper, 1983, *Progr. Nucl. Acid Res. & Molecular Biol.*, 29: 221—232.
- [17] Stickel, S. K. and Y. L. Wang, 1987, *J. Cell Biol.*, 104: 1521—1526.
- [18] Raz, A. and B. Geiger, 1982, *Cancer Res.*, 42: 5183—5190.
- [19] Volk, T. et al., 1984, *Cancer Res.*, 44: 811—824.
- [20] Lin, Z. X. et al., 1989, *Cell Res.*, (Submitted).
- [21] Chen, W. T. et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 98: 1546—1555.
- [22] Hebert, C. A. and J. B. Baker, 1988, *J. Cell Biol.*, 106: 1241—1247.
- [23] Schilwa, M. et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 99: 1045—1059.
- [24] Meigs, J. B. and Y. L. Wang, 1987, *J. Cell Biol.*, 102: 1430—1438.
- [25] Lin, Z. X. et al., 1989 *J. Cell Biol.*, 108: 1079—1091.

血小板衍生生长因子对细胞的生物学效应

李敏 孙芝琳

(华西医科大学生化教研室)

七十年代初, Balk^[1]首次报道在血小板中存在生长因子活性, 在血小板众多组份中, 最主要也最为人熟悉的是血小板衍生生长因子 (Platelet-derived growth factor, PDGF)。人血小板 PDGF 是分子量约 30 KD 的阳离子糖蛋白^[2-4], 由 A 链和 B 链两条多肽链通过二硫键连接形成, 还原二硫键将破坏其促细胞分裂活性, 产生分子量 14-17 KD 的多种蛋白质, 对这些蛋白质序列分析的结果, 揭示出存在两种性质不同但却相关的顺序^[5,6]。猪血小板 PDGF 是由 B-B 链均二聚体组成^[7], 而由骨肉瘤细胞产生的 PDGF 则是 A-A 链均二聚

体^[8], A 链和 B 链这两种均二聚体同样具有促细胞分裂作用。

血小板是 PDGF 的主要来源, 但近几年也观察到其他种类的细胞产生 PDGF。内皮细胞在调节 PDGF 基因转录的因子的控制下产生 PDGF^[9,10]; 巨噬细胞在应答受伤组织和出现炎症情况时, 也是 PDGF 的重要来源^[11]。在正常发育过程中, PDGF 存在于胎盘^[12]、早期鼠胚^[13]以及视神经的星形胶质细胞^[14]。人 PDGF 的结构和猴肉瘤病毒 (Simian Sarcoma Virus, SSV) 癌基因 V-sis 产物——P²⁸⁵¹⁸ 的同源关系, 则第一次指出了在正常生长调节和