

曾 弥 白

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

1980年8月底到10月底有机会到西德等国家进行了两个月的参观访问。先在西柏林参加了第二届国际细胞生物学会议,会后参观访问了西德的九个城市以及瑞士的苏黎世(Zürich)和荷兰的乌得勒支(Utrecht)的一些研究单位,并着重了解了它们的电镜实验室。

国际会议的内容和在各个电镜实验室所看到的都说明,在细胞的研究中离不开对结构的了解,因此,在细胞生物学的各个方面电镜技术的应用是十分普遍的。这同时也说明电镜技术对细胞生物学的发展起了重要的作用。

这次国际会议把细胞生物学的内容分为以下七个方面:(一)基因组、转录、RNA加工和有关结构;(二)膜、蛋白质合成、分泌和细胞相互关系;(三)收缩和细胞骨架,细胞内运动和细胞行动;(四)分化的细胞和细胞分化;(五)特化的细胞系统和细胞代谢的一般问题;(六)细胞病理学和疾病的细胞学方面;(七)细胞生物学的新方法。在前六个方面,无一例外,都或多或少地应用了电镜技术,取得了重要进展。在这里当然不可能一一予以介绍,下面将按第二届国际细胞生物学会议划分的七个内容,在各个内容中选择一些应用电镜技术而取得比较有意义结果的例子,分别加以叙述。

(一)在这一方面,染色质的结构和细胞核骨架的发现都是在电镜技术发展的基础上取得的。

关于染色质的结构,现在已经知道,在真核细胞中是以核小体的形式存在的。在电镜下,核小体为直径大约10毫微米的小珠;在

电镜技术的铺展制备中,染色质常被拉长伸展,表现为串珠状结构;在活细胞中,核小体相互连接,成10毫微米的纤维。每一个核小体包含一个组蛋白的8聚体,由 H_2A , H_2B , H_3 和 H_4 各2个组成, DNA盘绕其外, H_1 则位于相邻核小体之间。关于 H_1 的作用,离子强度对完整染色质的效应和去掉 H_1 的染色质的效应的系统研究提供了资料。增加离子强度,染色质的折叠随之增加;去掉 H_1 的染色质也随离子强度的增加而浓缩,但是浓缩的程度不如完整的染色质,也不形成固定结构。如果离子浓度降低,染色质伸展,核小体显现,而去掉 H_1 的染色质就只能形成散开的纤维。在离子浓度稍稍增高的情况下,在含有 H_1 和去掉 H_1 的染色质上都可以看到核小体,但是精细结构不同,含有 H_1 的染色质其DNA进出位点位于核小体一侧,而去掉 H_1 的就没有规律。因此认为, H_1 具有稳定核小体结构并维持染色质的高度折叠的作用。还有工作证实,在不同种类的细胞中,包括海胆精子、小鸡红细胞和病毒感染的细胞,在生理离子浓度下染色质成球珠状,在低盐度下就伸展为串珠状的核小体结构。

铺展制备的观察不但对染色质的结构提供了重要的资料,而且,在研究染色质的活动状态方面也是极其有用的方法。

在海德堡德国肿瘤研究中心的实验病理学研究所, Trendelenburg 教授介绍了他的工作。他用铺展的方法观察了冬眠豹蛙长足的卵母细胞扩增核仁的核仁染色质。在核仁染色质铺展

的制备上,可以清楚地区分单个核仁中转录活跃和不活跃的基因区段。他发现在同一细胞中按照转录活力,核仁可以区别为三种不同的类型:1.几乎所有 r-RNA 基因区都布满侧丝,指示转录活跃;2.染色质呈串珠状,没有侧丝,指示转录不活跃;3.有的区域有侧丝,其他区域没有。而且,在同一染色质条索上既有活跃的,也有不活跃基因。

关于细胞核骨架成分的研究,在电镜技术和其他方面研究的结合下,也取得了显著的进展。继 Laemmli 等(1977)提出染色体骨架的报道以来,关于核骨架的研究已有不少工作。从离体培养的哺乳类细胞分离到一个能抗高盐浓度的结构,并进一步指出,主要是这个结构的蛋白质成分维持了结构的稳定性。用再生肝做材料也得到了蛋白质性质的支架,并且发现新复制的 DNA 以环状结构附着在支架上。核骨架结构在真核细胞中普遍存在的可能性,由于在粘菌的发现而得了进一步的证实。从多头绒毛菌(*Physarum polycephalum*)的核中也得到了一个蛋白质支架, DNA 附着其上,核膜及核膜孔和核内纤维相连,后者又和核仁相连接。这种结构主要由两种多肽(分子量 23,000 和 36,500 道尔顿)组成。虽然在细胞周期中,蛋白质支架和核仁结构的形态是有变化的,但是在电泳上却很难看出多肽图象有什么质的差别。很可能在细胞周期中的形态变化只是通过极少几种组成支架的多肽的不同组合而实现的。这有力地说明了超微形态与生化分析相辅相成的重要性。

(二)在细胞之间有各种连接结构,对它们的了解离不开电镜技术的应用。桥粒是上皮细胞之间的连接区域,它们具有机械的功能。紧密连接是相邻细胞膜触合的区域,是一种没有空隙的密封结构,起渗透屏障的作用。间隙连接是细胞间交通的主要通道,离子和分子可以通过它们在细胞间流通。在间隙连接处相邻细胞之间的间隙约为 2—4 毫微米,有 8—9 毫微米直径成六角形排列的颗粒,每一颗粒中央

是一个 1.5—2 毫微米直径的通路。

对于桥粒已进行了分离和定性的工作。在透射电镜下观察,桥粒的核心部分主要是夹在相邻细胞质膜之间的成分和少量细胞内纤维物质。SDS 凝胶电泳指出,核心部分有两个高分子量的二体和一个低分子量的带,都呈碳水化合物染色的阳性反应,证明是糖蛋白。但是,分析完整的桥粒,包括相邻细胞内纤维状物质聚集成的桥粒小斑,就至少有 15 个清楚的蛋白质带。比较两者可以区别出哪些蛋白质是属于桥粒小斑的。看来,核心部分的糖蛋白是使桥粒成为粘着细胞器(adhesive organelle)的主要成分。

应用超薄切片和冰冻断裂的方法,在豹蛙(*Rana pipiens*)观察到神经管形成过程中,紧密连接有规律地进行解聚。虽然调节这种解聚的机理还不清楚,但是可以看到紧密连接的解聚包括组成成分的减弱,并在原来光滑的凹面出现颗粒。然后连接裂开,失去渗透屏障的作用,逐渐形成间隙连接。

(三)这方面的工作,特别是细胞骨架成分的定位和形态结构的观察很多是电镜技术应用的结果。

在组成细胞骨架的各种纤维中,微管蛋白和肌动蛋白表现了种间稳定性。许多工作都指出,中间纤维在不同动物种类中有较大的差异,而且,在不同细胞类型中也不一样,它以不同的结构状态存在。在成纤维细胞和神经细胞中,它们常平行排列,有时可能是交错的,在细胞的形状决定和细胞器的运动中起作用。在上皮细胞中,它是一个从核到细胞表面,遍布整个细胞的细胞骨架。在细胞周期各个时期所特有的活动中,中间纤维的结构形态发生变化。并且发现在成纤维细胞中这些变化和中心粒的位置有关。根据细胞类型的不同,中间纤维一般由 1—6 或更多的主要多肽构成。

免疫电镜术在这方面起了很重要的作用。虽然结合生化的工作知道在同一种细胞中两种免疫性不同的纤维可以同时存在,但是,由于

有限的分辨力在光镜下很难辨认这些结构的相互关系。应用间接铁蛋白标记法,在电镜下就可明确辨别。在两种培养的上皮细胞株,都观察到两种中间纤维同时存在的情况。在 HeLa 细胞中,桥粒上附着有成束的中间纤维,这些中间纤维被抗前角蛋白(Prekeratin)抗体标记,其它前角蛋白纤维在细胞的内表面形成网状结构;波形纤维蛋白(Vimentin)型的中间纤维集中在细胞质上部,在核周围形成笼状结构。在 PtK₂ 细胞,在细胞质中央部位这两种中间纤维同时存在,有时可以看到混合的纤维束,在细胞边缘前角蛋白纤维占优势。至于不同中间纤维之间的相互作用还待进一步研究。

(四)在细胞的终末分化中,超显微结构的研究是一个不可缺少的部分。譬如,对于大鼠肾脏的发育,有从妊娠 20 天、到出生、到出生后成为成年肾脏的比较系统的观察。用离体培养的方法,对人胎儿垂体在妊娠不同时期超显微结构和 ACTH 产生的关系也有报道。

生殖细胞的决定和分化,特别是不同种类(从果蝇到鳄鱼)精子形成的超显微结构的观察有不少报道。另外,还应该提到一个有兴趣的工作:在大鼠睾丸的保育细胞(Sertoli cell)中观察到大量的微管,特别是在精子生成的某些时期,它们的存在似乎和精子的释放有关。如果在生精细管中注入秋水仙素等微管抑制剂,微管就消失或者严重受到扰乱,结果引起精子的释放。可见,保育细胞的微管系统在精子释放中起了重要的作用。

在荷兰,我们访问了乌得勒支大学的动物系,这里继承了 Chr.P.Raven 关于软体动物发育研究的传统。在 N.H.Verdonk 的领导下,对于极叶在形态发生和背腹极的决定方面进行了系统的研究。在所有研究过的种类中极叶的大小不等,在 *Bithyria* 极叶很小,小于卵体积的 1%。超显微结构的研究指出,在这种极叶中发现了一个特化的结构,由无数深色囊泡组成,含有 RNA。实验结果进一步指出,这个结构和皮质层有紧密的连接,它包含形态

发生的因素。至于这种因素位于表层还是在细胞质中还不清楚。目前,扫描电镜的观察指出,极叶具有特化的表面结构,在有些种类这一区域的表面折叠密集,另一些有带有微绒毛的突起,至于这些表面的变化和形态发生因子的关系,也还是有待进一步探索的课题。

(五)电镜技术在细胞代谢的一般研究方面也起了一定的作用。

目前,甲壳类的鳃在血液透性的调控中所起的作用已被充分证实。但是,有事实说明各对鳃在形态和功能上都可能不同。电镜和生理、生化的观察都证实,中国蟹(*Eriocheir sinensis*)的前三对和后三对鳃在超微结构上有重要的区别。后三对鳃真正具有典型“盐类运输上皮”的特点,上皮细胞的质膜在顶端和基底部显示折陷,沿着这些折陷集聚着大量线粒体。在稀释的培养液中上皮的顶部形成一层深深的折陷,和细胞质之间有明显的间隔;在培养液浓缩的情况下,间隔就消失了。前三对鳃的上皮细胞层很薄,线粒体稀少,结合离子运输性质、跨越上皮的电位、脂类含量和 Na、K 磷酸酶活力等测定,可以肯定它没有“盐类运输”的功能。

围绕着细胞中 Na-K 泵的存在形式,关于 K⁺ 究竟是作为游离的阳离子存在,还是吸附在细胞质的固定的阴离子上,一直存在着争论。后一论点认为 K⁺ 很可能是位于横纹肌的 A 带上,因为在肌球蛋白上有高浓度 β 和 α 羧基。最近几年来,由于电镜技术结合其他新技术的发展, K⁺ 和其他碱性金属离子在横纹肌中分布的研究取得了进展,看到 K⁺ 和其他碱性金属离子主要聚集在 A 带和 Z 带上。

(六)在肿瘤研究方面,超显微结构的研究不但对诊断而且对肿瘤的发生也提供了资料。

对成骨细胞肉瘤的细胞形态变化虽然有过一些描述,但是对细胞核的重要特点还缺乏报道。有人发现在许多细胞核内有好几个类晶体的结构,应用 X 射线扫描微量分析仪等已肯定这些结构包含 RNA 蛋白质。

正常大鼠膀胱上皮具有一种高度特化的结构,是由六角形排列的亚单位所组成的膜小板。这些亚单位和膜小板的装配是在高尔基体所产生的盘状囊泡膜层中完成的。在癌变过程中,这种膜结构发生了变化。最近用冰冻断裂的方法比较观察了正常和癌变的膀胱表面上皮细胞高尔基体和有关的膜层。在肿瘤细胞的高尔基体中看到两种类型的膜分化:一种在一定区域内有膜内颗粒,有肿瘤细胞表面膜的特点;另一种是不含膜内颗粒的光滑型,在正常膀胱上皮细胞的高尔基体中也是存在的,而且,认为是生产盘状囊泡的一个时期。因为高尔基体保留了产生某一阶段的正常膜系能力,肿瘤细胞中膜结构的改变可能反映了到达高尔基体某种膜层进行装配的成分的质或量的改变,而不是高尔基体本身的功能障碍。

电镜技术对纤毛病理的研究起了极其重要的作用。在健康的哺乳类动物,纤毛在纤毛上皮处于有氧的情况下持续不断而协调地运动着。这一事实使得因纤毛不活动或者不能正常协调运动而致成的功能失调很容易被观察到。电镜观察指出,“纤毛不活动综合症”的患者的纤毛是有缺陷的,某一些纤毛的组成成分有缺陷或者移位。如果这种综合症是先天性的遗传缺陷,可以预料在身体的所有具有纤毛的组织 and 细胞都将发现同样的缺陷。事实证明的确是,而且可以进一步预期,其它纤毛型结构也将受到影响,如像精子的尾部,眼和内耳的感觉毛等。对于精子尾部已经证实它的结构畸形和纤毛的缺陷是同一类型的,因此,可以根据精子的检查对“纤毛不活动综合症”下诊断。另外,在这一综合症中,细胞质微管也可能受到影响,因为患者的白血球在受到刺激后定向运动的能力减弱了,这些还有待进一步研究。

(七) 细胞生物学的新方法在第二届国际细胞生物学会议上占的比重不大,占全部摘要的5%。其中电镜技术方面,很多工作是力求使观察到的细胞尽可能地保持生活时的状态。关于快速冰冻和冰冻代替方法报道较多。是在

原有方法的基础上提出了进一步的改进,并介绍了新设计的仪器。

为了更好地结合生化和免疫技术,有的报道推荐用树脂低温(-35°C—-70°C)包埋的方法,不但能保持精细结构,而且也维持了细胞成分的抗原性。在观察精子发生上得到了很好的结果。

高压电镜术在细胞生物学中的应用也取得新的进展。对于分析细胞结构,它的优越性主要表现在同时观察细胞表面和内部的细胞器。在适当的条件下,还可以在整封的材料中看到细胞骨架的结构。

西德海德堡大学生理系和瑞士苏黎世大学脑研究所对冰冻蚀刻技术都有丰富的经验,他们认为这方面进一步的工作是探索如何做到深度蚀刻,使膜的表面结构能更好地显示出来。这在使用常用冰冻保护剂(甘油)的情况下,由于甘油蒸压极低而不升华,是不可能做到的。他们已经分别取得了一定的结果。前一实验室发现乙醇是有适当挥发性的冰冻保护剂,用乙醇不需要特别仪器可以达到深度蚀刻。后一实验室在高压(2,100巴)下用液氮进行冰冻,可以防止冰晶的出现,也取得了良好的深度蚀刻的效果,当然,要达到这样的高压就需要特殊的设备。

以上这些例子已足够说明电镜技术在细胞生物学中应用的广泛性。这也是必然的,因为在细胞生物学的研究中,对于某一结构的了解,不论是静态的还是动态的,知道它的成分当然重要,但是,对形态的认识也是不可缺少的,要知道形态就要通过眼睛的观察,这就必须借助于电镜技术。正因为如此,在我们所参观的单位电镜实验室都得到了足够的重视。

从以上的叙述还可以看到,一种电镜技术并不是放之四海皆准的,就拿细胞连接的研究来说,超薄切片的观察只可能提供三向结构的某些方面,在冰冻蚀刻的图象上,可以看到膜层的内部结构,扫描电镜下看到的是细胞间表面的结构,对细胞连接结构组成成分的进一步了

解就必须应用免疫电镜和生化的方法。因此,研究某种结构凭单一的电镜技术常常是不够的,必须结合多种技术,才能对这种结构有一个比较全面的微观概念。可以预期,随着细胞生物学研究的日益深入,对各种技术会不时提出新的要求,这就对电镜技术的发展起了促进作用,而电镜技术的发展必然会更好地解决细

胞生物学的问题。这种相互促进、相互推动的事实科学技术的发展史上是屡见不鲜的。

参 考 文 献

- Abstracts of The Second International Congress on Cell Biology, 1980, *European Journal of Cell Biology* 22(10).

细 胞 骨 架

潘 玉 芝

(中国科学院上海细胞生物研究所)

真核细胞的超微结构的早期研究就指出,在细胞质中含有错综复杂的胞质纤维网。根据纤维直径的大小,将其分为微丝(5—6毫微米),微管(20—25毫微米)和中等纤维(7—11毫微米)。由于观察的样品必须切得很薄,电子才能穿过,因此尽管电镜能够详细观察细胞切片的结构,但对细胞内成分之间的关系很难重组出完整概念。因此对上述三种纤维的立体概念是不清楚的。这方面多年没有什么重大的进展。近来,生物学家有条件去观察完整细胞的纤维网,应用免疫荧光技术标记细胞内纤维的结构蛋白,研究单一纤维的分布、结构和功能,发现细胞中有三种类型网状系统即:微丝系统、微管系统和中等纤维系统。这种纤维研究术被称为蛋白质化学解剖术。与此同时生物学家还利用高压电子立体显微镜新技术来观察完整细胞,除了看到上述三系统之外,还发现细胞基质中有一个比微丝还细的纤维系统称为微梁系统^[1],纤维直径为3—6毫微米。我们将细胞内的这些纤维系统总称为细胞骨架(图版I,图1)。细胞骨架能把分散在细胞质中的细胞器的膜层结构组织起来,并固定在一定的位置,使它们能执行自己的功能。倘若纤维重新组织和排列,也可使细胞内部的结构成分移动位置,所以细胞骨架也具有肌肉系统的功能。

(一) 微 丝

培养的上皮细胞和纤维母细胞具有一个共同特点,就是它们能够贴在玻璃底物上,并变得扁平。在相差显微镜下观察这种细胞,它显示出很多致密的直纤维,沿细胞长轴方向平行排列,在上皮样细胞中平行排列纤维可集中于局部区域^[2]。通过电镜、免疫荧光标记(图版I,图2)和生化方法鉴定,证实这纤维相当微丝束,经常在细胞膜下方被发现,其主要成分是肌动蛋白,分子量为42000。肌动蛋白有纤维型和球型,微丝是由两列球型肌动蛋白单体联合而成,并相互扭缠成双螺旋形。在非肌肉细胞中,肌动蛋白纤维履行许多细胞功能,包括细胞分裂、内吞、外排、细胞附着底物、细胞运动、胞质分裂、细胞形状的维持和褶皱膜的形成。

关于肌动蛋白纤维在培养的非肌肉细胞中介导的特殊细胞功能的机制尚不能清楚解说,由于对这些纤维在细胞中的结构和对调节这些纤维聚合的其他结构蛋白都缺乏认识。近年,在免疫荧光技术中应用肌动蛋白抗体,研究了肌动蛋白在肌肉和非肌肉细胞中的分布。从而开辟了利用肌肉各种结构蛋白的抗体来研究相关抗原在非肌肉细胞中的分布和功能的可能性。目前知道,肌肉的结构蛋白如原肌球蛋白(tropomyosin)、辅肌动蛋白(α -actinin)和肌