

间隙连接和细胞间物质交流

方思明

(中山大学生物系)

一、前言

细胞通讯是多细胞生物的一个基本需要。多细胞生物的细胞不是一个自主单位，而是整体系统的一部分。有机体的细胞分化，胚胎和胚后的生长发育都要求各细胞、组织、器官和系统处于高度的协调状态，而首先要求每个细胞必须能够接受来自机体的各种信息，并对这些信息产生恰切的反应，使每个细胞的活动得到控制和调节，这就涉及细胞之间的通讯。

细胞通讯通过细胞间分子和离子的传递或交流来进行。这种通信有长距离的，由可以扩散的调节物质(如激素)起作用；也有由直接接触的相邻细胞借助细胞之间的连接来传递信息。细胞连接是相邻细胞细胞膜特化形成的连接装置，但这种连接的区域很小，光学显微镜难以分辨，超薄切片作电镜观察也很难对其结构作深入的研究。冰冻断裂技术是研究细胞连接的重要技术，示踪性物质如胶态氢氧化铜、焦锑酸盐和钨红的应用，也为这方面的研究提供新的手段。

现已发现的细胞连接有多种，如紧密连接(tight junction)、隔板连接(Septate junction)、桥粒(desmosome)和间隙连接(gap junction)等。紧密连接相邻的质膜并没有完全粘合在一起，而是一系列点的融合，点与点之间有间隙、融合点处细胞膜完全密合，故显示出有五层的结构。按照 Branton 等^[1]的命名，冰冻劈裂复型的 PF 含有嵴状或点状突起，EF 为互补的凹沟^[2]。隔板连接首先发现于无脊椎动物，但类似隔板连接的结构在脊椎动物也有报道，这种连接在超薄切片中看起来成“铁轨”状。桥粒在动物界广泛存在。上面这几种细胞连接有使细

胞粘连、加固和作为屏障以防止营养物质和离子自由扩散等作用，但不是可透性的连接，与细胞间物质交流关系不大，下面只重点讨论作为细胞通讯结构基础的间隙连接。

二、间隙连接的结构成分

绝大多数多细胞动物的细胞都形成间隙连接。1962年 Dewey 和 Barr^[3]首先描述了细胞之间存在这种连接结构，把它称为“nexus”，后来 Revel 和 Karnovsky^[4]也描述了这一结构形式，把它叫做“gap junction”，故实际上 nexus 和 gap junction 只是同物异名。

1、超薄切片中间隙连接的微细结构

现在一般认为间隙连接有7层结构，每边细胞单位膜各有三层，再加两单位膜之间的间隙层。当组织用戊二醛固定后再用锇酸复固定或只用锇酸固定，脱水前用醋酸双氧铀一次染色即能显示这一结构。示踪物渗入法也显示二单位膜之间有宽度为20—30 Å 的间隙层。在正切的切片上可以看到许多直径为70 Å 的六角形颗粒(也称筛格)相连着，最近有研究说明它是由六个亚基构成的圆柱体。筛格中央有一直径约15 Å 的圆点，这就是传递分子和离子的低阻抗亲水小管。两筛格中央之间的距离大概90—100 Å^[5]。

2、冰冻断裂复型的微细结构

冰冻断裂技术已被用于研究单个间隙连接的大小、形状和超微结构及其在大片膜区上的分布。间隙连接可因其断裂面的特点的不同而分成不同类型：颗粒的大小，附着情况，颗粒之间的距离，颗粒和坑的排列等。一般分A、B两型，A型的颗粒只留在PF，EF是互补的坑^[6]。脊椎动物的间隙连接差不多都是A型的，

除节肢动物外的其它已研究过的无脊椎动物的间隙连接也属A型,常称A-1型,颗粒直径通常80—100 Å,也有只60 Å的,相邻两颗粒中央之间的距离90—100 Å。连接的大小和分布随组织以及细胞的生理状态而不同。A-2型间隙连接只见于大白鼠小肠的上皮细胞,颗粒较大,直径约100—110 Å,距离较宽,190—200 Å,结构排列较不规则。所有节肢动物的间隙连接属于B型,从超薄切片看与A型很相似,只是细胞间的间隙较大,30—40 Å,颗粒直径也稍大,约110 Å(但也有小至80 Å者)。从冰冻断裂的复型来看,两者结构的差异相当明显,PF上为凹陷的坑,EF反而附着颗粒,并聚集成斑块,不像A型那样高度规则的多角型排列^[7]。

3、间隙连接的生化分析

有关间隙连接生化方面的资料不多,现已报道的资料多涉及连接的蛋白质——多肽的数量和分子量,且多局限于某些器官、组织,如肝、眼的晶体等。至于不同组织的间隙连接成分是否相同,还有待更多的资料来证实。

Goodenough^[5]第一个从肝分离出一种连接的蛋白质,并在后来把它称为“Connexin”。Henderson等^[8]用分离和电泳显示小白鼠肝间隙连接的蛋白质由二种主要的多肽(分子量26,000和21,000)组成,推测后者可能是被酶降解的产物。最近有人通过用酶和不用酶处理作比较,认为分子量26,000的多肽是多种动物肝细胞间隙连接的主要成份,其它分子量47,000以至更高的可能是主要多肽成份的聚合物。

连接的成份除蛋白质外还有类脂(但从未发现有碳水化合物)。连接的类脂易受分离时所用洗涤剂的影响,分离所得的成分其比例不稳定,主要的两种成份是磷脂和胆固醇^[8]。

三、连接形成和细胞通讯

1、间隙连接的形成

在形成这种可透性连接之前,细胞必须先形成一种稳定的相互粘着,因此,间隙连接的形

成至少分二步:首先是相邻细胞之间宽松的粘着,然后再形成紧密的结合。间隙连接形成的最初线索来自胚胎的研究。鸡胚和两栖类胚胎的研究发现,刚开始形成的间隙连接很小,只有6—10个颗粒,成疏松或紧密的聚合体,这些小聚合体可能与附近的聚合体长合,或由新的颗粒直接插入膜中而扩大。有人研究小牛眼晶体的上皮细胞,当它们伸长分化成晶体纤维时,间隙连接的膜内颗粒形成交错的行列,以后颗粒继续增加,直至膜的大部分地区为这种颗粒聚合体充满。间隙连接常与紧密连接混集一起,研究其形成有时容易混淆,有人用缺少紧密连接但有典型间隙连接的Novikoff肝肿瘤细胞作研究材料,观察了连接形成的细胞间和细胞内的变化^[9]。形成初期先出现“形成斑块”(formation plaque),直径只有几百nm,最早的形成斑块出现在细胞再聚合后5分钟,相邻细胞每一侧的相对位置各有一个,因而斑块是成对的。冰冻断裂研究发现,连接形成过程一般有如下几个阶段:(1)形成斑块出现;(2)细胞外空间缩窄(至约10nm),出现大的直径10nm的“前体”颗粒;(3)相继出现小的成多角形排列的颗粒,大的前体颗粒减少;(4)连接扩大。用微电极研究表明低阻抗通道的形成和电传递的程度也是逐渐增大的,与间隙连接形成有相应的关系。

不同组织,不同有机体以及胚胎发育的不同时期,每个间隙连接区以及每个界面总连接区的大小是不同的。这种差异对血清有惊人的依赖性;培养液中含5%的小牛血清对形成最合适,10%反而降低连接的形成。用含2%—0.5%血清培养液,形成有逐渐下降的趋势。高pH和低CO₂都明显减少连接的形成,有些作者也报道过间隙连接的大小和多少可能受激素、蛋白酶、维生素和肝切除等的影响。

影响已形成连接的透过性最明显的因子是细胞内Ca⁺⁺的浓度。在正常情况下游离Ca⁺⁺在细胞内的浓度很低,约为10⁻⁷—10⁻⁵M,细胞外液则为10⁻³M左右,比细胞内高出1000倍

以上。去除培养液中的 Ca^{++} 可以降低某些细胞类型的透过性。注射 Ca^{++} 入细胞, 被注射的细胞很快不与其邻近细胞偶联。有人认为间隙连接对 Ca^{++} 的敏感性是组织损伤修复所必需的, 细胞损伤外面的 Ca^{++} 进入, 导致损伤细胞的间隙连接关闭, 以减少组织因损伤而受到的影响。

2、形成连接的专一性

许多类型的细胞都可形成间隙连接, 既可连接同类的细胞, 也可连接异类的(诸如小肠分泌粘液的和吸收的)细胞。但也有些类型的细胞, 如不再分裂的骨骼肌纤维, 某些分化了的神原, 循环系统的红血球和淋巴细胞等没有或很少这类连接。现已发现若干类型的细胞系在形成可透性连接方面有缺陷, 为什么不能形成连接现在还不知道, 可能它们缺少某种基因产物, 该产物为两种细胞偶联所必需。有人发现 L- 细胞之所以不能形成间隙连接是因为 L- 细胞不能把岩藻糖结合入细胞表面膜的糖蛋白中, 如果把 L- 细胞与人的正常成纤维细胞或淋巴细胞融合, 就可使“杂种”具有合成含岩藻糖的糖蛋白的功能, 因而能与其它细胞形成连接^[10], 这就把连接的形成与细胞表面起粘着和识别的重要分子——糖蛋白联系起来。实验更进一步表明, 恶变细胞膜糖蛋白的改变降低了形成通讯连接的能力^[11]。但究竟糖蛋白在细胞连接形成中有多大的作用, 其普遍性如何, 有待更多的资料来加以说明。

从大量的实验结果来看, 凡能形成连接的细胞之间似乎都可通讯, 但节肢动物则有其特有的通讯特点。培养的节肢动物细胞不与非节肢动物的细胞形成连接, 即使同是节肢动物但来自分类上不同目的细胞也不形成连接^[12], 这可能与它们间隙连接的超微结构不同有关。可能由于组织类型的不同, 其它细胞也有形成连接专一性的例子, 上皮细胞和成纤维细胞各自都能在自身的群体之间迅速而有效地形成连接, 但两类细胞彼此就不易形成。异源细胞形成的连接与同源细胞形成的似乎没有差别, 只

是异源细胞细胞膜之间接近至足以形成连接的可能性要小得多, 所以, 形成连接的专一性可能与膜的其它特性有关。

与上述形成连接专一性相反的例子也有所发现。培养的晶体上皮细胞与其它上皮细胞和成纤维细胞都能很好形成间隙连接, 差不多成了“万能的偶联者”。有报道指出, 乳腺癌的某些上皮细胞系, 若干种因病毒感染而转化了的成纤维细胞, 色素网膜上皮细胞和角膜细胞等也都缺乏这种专一性^[13]。细胞形成连接的专一性目前只有一些例子, 还没有摸索到其基本规律。

3、细胞通讯

间隙连接这种特殊装置给细胞之间的物质交流提供了结构基础, 相邻细胞颗粒中央的低阻抗渠道直接沟通两个偶联细胞的细胞质, 使细胞的小分子和离子能自由通过, 大分子(如核酸、蛋白质和多糖等)则不能通过这些渠道转移, 现已证明, 分子量小于 1,200 的细胞成份都可自由通过连接^[14]。

离子传递 在许多动物活体中和体外培养的细胞都可形成低阻抗的途径, 这种途径其电阻与细胞质中的电阻相似, 只有 $10-100\Omega/\text{cm}^2$, 而在连接外的其它细胞膜表面则为 $10^6-10^8\Omega/\text{cm}^2$ 。传递可能是以无机离子 Na^+ 、 K^+ 和 Cl^- 等的形式通过低阻抗的亲水小管, 从一个细胞传至另一个。海绵细胞连接在一起后 1-40 分钟就可建立这种传递。除离子外, 低分子量的染料也可透过。用荧光素作示踪性物质证明, 某些培养的细胞接触后 2 小时就能转移荧光素, 而两栖类非洲爪蟾的原肠胚和神经胚的细胞再聚后 20 分钟即能交换荧光素。

代谢产物传递 体外培养细胞之间其代谢产物也可通过连接传递。这种类型的物质交流可以用不同遗传性状的细胞, 通过放射性标记物的转移来证实, 即使用一种有某种代谢能力的野生型细胞作为带放射性的供体, 和另一种没有该代谢能力的突变型细胞作为受体。典型的实验是使用次黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基

酶缺陷型(HGPRT⁻)的受体,供体则用外源的³H-次黄嘌呤预先标记,然后把两种细胞共同培养于含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的HAT培养基中,氨基蝶呤抑制嘌呤和胸苷进一步合成,受体细胞则由于缺少HGPRT,本来不能利用次黄嘌呤合成5'-单磷酸次黄苷,在这种培养基中会导致死亡,但通过与供体细胞连接通讯,接受这种核苷酸而“拯救”了受体细胞^[16]。这即所谓“生存之吻”。与此相反的是由于连接交流物质而致死的所谓“死亡之吻”。

离子传递和代谢产物传递之间有着密切的关系,把两种有通讯能力,即能形成连接的细胞共同培养,两种传递必然都发生。但只要其中的一类细胞有通讯缺陷,两种传递就不能存在。

连接通讯的结果,偶联群体(即一种组织或细胞的培养物)的所有细胞共同享有它们的小离子和代谢产物,因而不同代谢能力(即由于基因型不同或基因表达的不同而使酶的活性不同)的细胞混合体在表现型上变得毫无区别,但偶联群体的各个细胞的大分子仍然保持不同,基因型并没改变,只要细胞一分开,特异的表现型又会马上再现。

四、连接通讯在生物体功能中的可能作用

细胞之间通过间隙连接建立的这种通讯必然在有机体的生理过程中起一定的作用。但到目前为止,由于专一性地抑制细胞通讯的药物尚未筛选出来,直接检验细胞通讯只靠有限的缺陷型的突变细胞株,所以多数还是通过电生理和同位素标记的方法来推断细胞之间的通讯。这就限制了使我们不可能对细胞通讯在生物体功能方面的作用作出肯定性的结论。

1、细胞通讯与机体活动的协调

有机体细胞之间可透性连接的普遍存在说明机体统一地使用它们的某些或全部低分子量的代谢产物,使各部分的活动得以协调。细胞通讯使可兴奋组织,如心肌细胞、小肠平滑肌

细胞的收缩同步化。妊娠期的子宫肌层缺少间隙连接,但在妊娠将结束时连接明显增加,这可能对子宫开始收缩起一定的作用。睾丸中精子的产生也存在着这种代谢协调的情况。精小管中不同部位生殖细胞的发育阶段是不同的,但相对来说,可以区分出发育阶段相同或相似的若干节段,虽然生殖细胞本身或与管壁的足细胞(Sertoli cell)并不形成连接,但相邻的足细胞之间的确有连接发生^[16],这说明是细胞之间通过连接取得的协调,给生殖细胞的发育提供合适的微环境。

2、细胞通讯与生长控制

动物细胞的生长和分化当然受基因表达的控制。细胞通讯与生长控制的关系目前虽然没有直接的证据,但有一些事实可以为细胞通讯对生长控制起作用这种推测提供一定的依据。

Loewenstein^[17]提出了如下的一些证据:(1)所有有细胞分裂能力的组织,细胞之间都有间隙连接;(2)某些来自肿瘤组织的细胞系不形成间隙连接,或者组织类型的选择性已经改变;(3)所有不形成间隙连接的细胞系都有肿瘤发生性,或缺少依赖于密度的生长抑制,或兼有两者;(4)通讯缺陷和肿瘤发生性都是隐性性状,有通讯缺陷的细胞与有通讯能力的细胞系通过融合产生的“杂种”,既有通讯能力,肿瘤发生性也低,可以猜想生长控制是由细胞间通过连接的物质交流起作用的,不形成连接控制生长的信息就不能达到肿瘤细胞。但有些肿瘤细胞也形成连接,这类肿瘤细胞可能在对信息的反应上有缺陷。

组织培养中的细胞有接触抑制现象,这是细胞密度高导致的结果,可能也与细胞通讯有关。有人认为这种抑制依赖于环状核苷酸的交流,环状核苷酸类似物可以通过间隙连接传递并在代谢协调中起作用已为Lawrence等^[18]所证实,但环状核苷酸的改变是否就是接触抑制的原因,尚有待实验证实。

3、细胞通讯与发育

胚胎发育给人们提供了通过细胞-细胞相

互作用来调节的最好例子。细胞分化,细胞迁移,胚胎诱导,胚层、组织和器官的形成等都与细胞-细胞的相互作用有关。

作为细胞间相互作用渠道之一的间隙连接已在各种发育系统,如鸡、两栖类、软体动物和棘皮类的早期胚胎中普遍发现,但研究其与发育关系首先是在哺乳类进行的。小白鼠胚胎早在8细胞期就已发现分裂球之间有间隙连接存在。有人检验小白鼠胚胎在着床前和着床后的通讯^[10]。把荧光素和辣根过氧化物酶注入小白鼠着床前胚胎,然后监测其离子传递以检验

通讯的开始,发现在2、4和8细胞阶段的胚胎,姐妹分裂球存在离子传递和被注射物的转移,但相反,来自不同姐妹对的分裂球之间没有这种通讯。至胚泡期,胚泡的滋养层细胞通过连接与其它滋养层细胞及内细胞团的细胞连接,着床后鼠胚的体外观察表明,这些细胞都有离子传递和染料的转移,但后来,离子传递虽然继续着,染料的转移却变得有限。这表明随着胚胎的发育,间隙连接的通讯也跟着发生了。

(下转第6页)

植物离体培养中染色体的变异

商效民

(北京农业大学农学系)

随着植物细胞和组织培养的迅速发展,不断发现植物离体培养细胞中的染色体数目和组型与供体植物不同^[1-3]。这些变化包括染色体数目变异、结构变异和有丝分裂异常,与长期培养的动物细胞、动植物肿瘤细胞中染色体的各种变异类似^[1,4]。这意味着植物细胞和组织在离体培养期间,基因型发生了突变。目前,这些变异现象已受到普遍重视。现将有关在离体培养中植物染色体变异的普遍性;变异发生的原因及演化趋向等研究近况和有关利用这些变异的一些成果和展望,简介如下。

一、变异发生的普遍性

据报道,至少有近60种植物经离体培养后发生了染色体变异(见表1、表2)。

1、不同外植体来源的培养物的染色体变异

烟草是组织培养中常用的植物之一,有关它在离体培养中染色体研究的报道已有20多篇。无论是用髓薄壁细胞^[6]、叶柄细胞^[1]、叶肉原生质体培养^[9],还是用花药培养,所发生

的愈伤组织品系中^[7],均产生了大量多倍化和非整倍化的细胞。在 *Nicotiana glauca* 根尖细胞分裂间期的异染色质中心是中期近端着丝点染色体长臂的异染色质区,但在叶肉细胞原生质体产生的6周龄愈伤组织中,染色体加倍为四倍体,而染色中心数则是混倍的。培养时间较长的愈伤组织中也观察到类似变化。因此, Banks 等^[7]提出染色体数目尽管能显示分裂细胞的染色体构成,但并不是以反映离体培养中整个核的变异情况。显然,这个种在组织培养中产生了多倍体和混倍体。

Guerri 等^[8]报道了烟草组织培养未去分化和去分化过程中染色质的变化情况。在未去分化的外植体髓中,染色质模板活性很低,而在愈伤组织中,染色质模板活性变得相当高。

用蚕豆未成熟的子叶、种子、胚和根瘤等不同来源的外植体进行培养,愈伤组织中均出现了多倍体、混倍体和染色体结构发生了变异的细胞。而且,核碎片或无丝分裂产生了各种DNA含量非整倍性的突变细胞^[9]。

在马铃薯叶愈伤组织^[10]和茎原生质体培