

- 575—579.
- [15] Finnegan, D. J., 1981, *Nature*, 292: 800—801.
- [16] Temin, H. M., 1983, In *Genes and proteins in carcinogenesis*. ed. by Weinstein, T. B. and Vogel, H. J., pp. 3—12, Academic Pr., New York.
- [17] Jaenisch, R., 1983, *Cell*, 32: 5—6.
- [18] Temin H. M. et al., 1983, In *Perspectives on genes and molecular biology of cancer*, ed by Roberson, D. L. and Saunders, G. F., pp. 243—254. Raven Pr., New York.
- [19] Fedoroff, N. O., 1984, *Sci. Am.*, 250: 65—74.
- [20] Doring, H. P. and Starlinger, P., 1984, *Cell* 39: 253—259.
- [21] Jelinek, W. R. and Haynes, S. R., 1983, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 47: 1123—1130.
- [22] Jagadeeswaran, P. et al., 1981, *Cell*, 26: 141—142.
- [23] Roberson, D. L. et al., 1983, In *Perspectives on genes and the molecular biology of cancer*. ed by Roberson, G. E. and Saunders, G. E., pp. 51—80. Raven Pr., New York.
- [24] Lewin, R., 1981, *Science*, 219: 1052—1054.
- [25] Van Arsdell, S. W. et al., 1981, *Cell*, 26: 11—17.
- [26] Bernstein, L. B. et al., 1983, *Cell*, 32: 461—472.
- [27] Proudfoot, N. J. and Maniatis, T., 1980, *Cell*, 21: 537—544.
- [28] Little, P. F. R., 1982, *Cell*, 28: 683—684.
- [29] Hollis, G. F., 1982, *Nature*, 296: 321—325.
- [30] Battey, J. et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 5956—5960.

应用免疫荧光细胞化学方法研究 src 基因产物 与细胞粘着斑的分子相互关系

何大澄 汪肇仁

(北京师范大学生物系细胞生物学研究室)

细胞癌变原理是肿瘤研究中的关键问题。虽然 1969 年已提出“癌基因”假说,但由于癌变过程的复杂性及技术上的限制,长期以来进展较慢。七十年代中期以后,由于分子生物学理论和技术的迅速发展,人们采用 DNA 重组技术、基因分离和转染技术、限制性内切酶图谱分析及核酸序列分析技术,直接深入到分子和基因水平来研究癌变,取得了令人瞩目的进展。其中“癌基因”(oncogene)的发现和研究的翻开了肿瘤分子生物学新的一页。但无论如何,肿瘤的发生是一个发生于细胞水平的事件。从癌基因到肿瘤的各种表型之间有着一系列复杂的环节。这里只介绍应用免疫荧光技术研究 src 基

因产物与细胞粘着斑分子相互关系的情况。这一研究结果,不仅对揭示肿瘤发生机制是很有价值的,而且在另一方面,它显示了传统的细胞化学技术在分子生物学这一新兴领域中仍然是一个重要的、难以取代的工具。

一、转化蛋白 pp60^{src} 及其在粘着斑 (adhesive plaque)的定位

“转化”(transformation)概念的真正含义迄今仍不甚明确。可以说,实际上我们就是用

本文在中国细胞生物学会于昆明举办的第一届细胞化学(4月19日—23日,1985年)讨论会上宣读。

这个不很确切的概念来描述一个我们尚不确切知道的过程。正常的细胞经历这一过程,即出现一些有典型性的,原来相应的正常细胞所不具备的特征。这些特征包括:①细胞形态改变(趋向圆形、高折光),②膜活动性加强,微绒毛增多,③生长的贴壁依赖性减弱或消失,④接触抑制丧失,⑤获得无限增殖的能力,⑥获得在软琼脂上生长的能力,⑦移植到同种系或经免疫抑制的动物体内具有成瘤性。除这些以外,还有细胞表面抗原和凝集行为的改变等。这些特征并不一定全部出现,通常认为这与转化的程度或过程有关。轻度的转化只表现较前面一些特征,随着程度的加深,依次表现出更多的特征。软琼脂的生长,特别是移植后的成瘤性则被认为是恶性转化(neoplastic transformation)的指标。但正如本文后面将提到的,这些转化特征实际上未必具有这种递进的关系,某些特征很可能是互相独立的。

转化除表现有不同程度外,也可有不同的途径。如化学诱导转化、病毒诱导转化及自然转化等。这里仅以大家所熟知的劳斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus 简称 RSV)诱导的转化为例。该病毒只有 4 个基因,其中一个是可以引起细胞转化作用的病毒癌基因即 src 基因,其转录产物是一种磷酸蛋白质(phosphoprotein, pp),分子量约 60 kDa,故命名为 pp 60^{src} 蛋白。它具有酪氨酸磷酸激酶活性,可使自身的或其它底物蛋白的酪氨酸磷酸化^[1]。实际上人们往往就是从磷酸化程度的变化来推测某一蛋白是否为 pp 60^{src} 的靶物^[2]。

关于 pp 60^{src} 的定位,最早的研究认为转化细胞的 pp 60^{src} 存在于细胞质中^[3],后来也有一些实验证实了这一点。用荧光免疫及免疫电镜技术进一步检测到 pp 60^{src} 在细胞与细胞接触处存在于细胞膜的内侧^[4]。而用免疫荧光显微术与反射相干显微术结合的研究进一步表明,在组织培养细胞的底面,pp 60^{src} 集中存在于某些特殊区域,即粘着斑(adhesive plaque)处^[5]。粘着斑是细胞膜与支持物表面最靠近的部位。

反射相干显微镜是直接观察粘着斑的有力工具^[6]。在这种显微镜中,样品在落射照明下产生的反射光线经过迭加干涉而呈现不同的明暗。根据不同的灰度,人们可以接近定量地判断出细胞底面各处与支持物之间的距离。粘着斑表现为颜色最深的黑色斑点。以抗 pp 60^{src} 抗体显示的荧光部位与这些黑色斑点恰相吻合(图 1—3)。此外,借助于粘着斑与基质紧密结合的性质,可获得分离的粘着斑结构^[5]。用荧光免疫或双向凝胶电泳方法都可显示这些分离的粘着斑中仍有 pp 60^{src} 存在。用 RSV 温度敏感突变株进行的研究发现,在许可性温度培养时,pp 60^{src} 可在粘着斑检出;在非许可性温度下则不能检测到。

然而粘着斑不是 pp 60^{src} 存在的唯一位点,在胞质、细胞膜内侧、细胞之间接触处都可检测到。特别是这几种分布形式在细胞的不同生长状态下和生长过程中是可以互相转变的^[7]。如当 RSV 转化的 NRK 细胞生长在不利于铺展的条件下时,pp 60^{src} 主要分布于质膜内侧。而细胞间接触点的结构有可能是以粘着斑为前身形成的。所以可能这几种分布是互相关联的,而它们又各自控制一些特定的转化表征。

二、正常细胞的粘着斑

粘着斑不仅是一种细胞附着的特殊位点,而且有其特定的结构、成份与功能。

1. 粘着斑是细胞骨架的一种主要成份——张力纤维的终止处。张力纤维是由肌动蛋白微丝及多种肌动蛋白结合蛋白形成的纤维束。通常在接近细胞底面处沿细胞的长轴分布。我们用含有丰富张力纤维及粘着斑的培养的印度黄鹿成纤维细胞(Indian Muntjac fibroblasts)做原位定向超薄切片及整装提取电镜观察,都可清楚看到张力纤维在粘着斑处轻微发散并伸展到细胞膜上^[8]。当用细胞松弛素 B(CB)处理时,由于其它部分的张力纤维逐步崩解和细胞收缩,粘着斑显得更为突出(图 4—6),此时进行离心去核,则在粘着斑处多形成

微胞质体(microcytoplasts)。张力纤维在细胞形态、铺展和运动方面的功能都需通过粘着斑而得以发挥。有人还认为粘着斑可能起张力纤维组织者的作用。

2. 用免疫荧光抗体技术可以检测出 vinculin 存在于粘着斑^[9]。这是一种 130kDa 的蛋白质, 虽然已有人认为是固着蛋白连接肌动蛋白丝于质膜, 但 vinculin 本身不是膜蛋白, 因此可认为它是肌动蛋白和膜内组成成分之间的连接物。平均每 1500—2000 个肌动蛋白分子有一个与 vinculin 结合的高亲和性位点。看来它似乎是结合在肌动蛋白微丝端点的一种封端蛋白(capping protein), 但是由于可能有少量其它蛋白的干扰, 其功能还不能十分确定。显微注射的 vinculin 也会聚集到粘着斑处^[10]。除 vinculin 外, 粘着斑处还有 α -辅肌动蛋白(α -actinin)等存在^[11]。

3. 在细胞内部, 粘着斑与细胞外基质, 特别是粘连蛋白(fibronectin)的空缺处相接触^[12]。粘连蛋白为线形的糖蛋白, 约 220kDa, 在细胞外呈纤维状分布, 并与细胞内张力纤维的分布相互吻合, 并有相互诱导排列的作用。粘连蛋白纤维在细胞表面的分布及走向, 似乎是以细胞膜内的张力纤维为“轨道”的。若以 CB 破坏张力纤维, 则粘连蛋白的纤维也被扰乱, 并从细胞表面脱落; 反之, 若以蛋白酶去除粘连蛋白时, 张力纤维也发生变化。而且, 不仅细胞内有序排列的张力纤维可诱导细胞外粘连蛋白发生定向排列。反过来, 事先得到有序排列的粘连蛋白纤维也可诱导细胞中张力纤维的有序排列。这种从细胞到细胞间质再到邻近细胞的有序性的传递, 肯定在细胞的群体行为, 特别是在组织形成等过程中, 起着重要的作用。

三、RSV 转化细胞的粘着斑

RSV 转化细胞的某些表型特征显示出与粘着斑有关:

1. 转化后细胞中部的张力纤维破坏, 细胞

变圆, 粘着斑形态变得更加不规则。

2. 粘着斑内 vinculin 的酪氨酸磷酸化增加(约比正常时增加 10 倍, 即约达 15—20%)。

3. 细胞外周部与支持面的粘着力下降, 粘连蛋白也不再聚集。此种蛋白之受到重视, 最初就是因为发现其在癌细胞上显著减少。这可能部分地由于转化细胞可增强分泌一种能够水解粘连蛋白的酶。有人把荧光标记的粘连蛋白与明胶混合做成基质, 当在其上培养正常细胞时, 荧光很少变化, 而当培养的是转化细胞时, 则可看到在粘连蛋白被分解的部位形成无荧光的黑斑^[13], 黑斑的位置恰与粘着斑相符, 也与 vinculin 的存在部位(可用带有另一种颜色荧光的抗体显示)相符[图 7—11]。外加粘连蛋白通常可使转化细胞形态趋向扁平, 贴壁铺展加强。

4. 转化后 pp60^{src} 主要存在粘着斑 为了研究 pp60^{src} 的功能, Anderson 等人除了使用野生型 RSV 外, 还采用了一系列 src 基因缺陷的突变株^[14], 它们丧失了 pp60^{src} 基因的部分功能, 故只能表现部分转化特征, 称为部分转化突变株。在许可性温度下只表现部分转化特征的温度敏感突变株, 称为部分转化温度敏感突变株。兹以上列四个与粘着斑有关的转化特征为指标, 各种突变株转化的结果^[15]归纳如表。

表中所列的几个指标, pp60^{src}、张力纤维、vinculin 和粘连蛋白的位置都是用免疫荧光法, 分别以兔抗 pp60^{src}, 兔抗 filamin, 豚鼠抗 vinculin 和兔抗人粘连蛋白抗体显示的。CEC 为正常鸡胚细胞, SR-CEC 为完全转化株, tsNY 68 为完全温度敏感株。其它几个则为部分转化及其温度敏感突变株。实验结果中最值得注意的是几个部分转化株的表现。仍按上述 4 个指标来看:

(1) pp60^{src} 在转化细胞应定位于粘着斑上。而 CU12 未检出, 细胞也未呈圆形, 而是梭形的。特别应当提到, 另外的一些实验表明, 凡粘着斑上无 pp60^{src} 检出的部分转化细胞, 也

各种 RSV 突变株感染正常鸡胚细胞(CEC)引起的转化作用表征

感染条件	转化表型	粘着斑内有无 pp60 ^{src}	张力纤维的完整性	vinculin 中酪氨酸磷酸化增加	细胞表面的连粘蛋白	细胞形态	软琼脂生长能力
正常细胞	CEC-37°	-	+	-	+	正常、扁平	-
部份转化株	CU2-35°	++	+	-	-	扁平、有泡	+(弱)
	tsCU11-35°	+	-	+	-	近乎正常	+++
	tsCU11-42°	-	+	-	+	正常	-
	CU12-35°	-	-	+	+	梭形	+++
	RD10-37°	++	+	+	-	扁平	+++
完全转化株	SR-CEC-37°	+	-	+	-	圆形,折光	+++
	tsNY 68-35°	+	-	+	-	圆形,折光	+++
	tsNY 68-42°	-	+	-	+	正常	-

多是梭形的。

(2) 张力纤维。转化细胞应无完整的张力纤维组织。而 CU2 和 RD10 都有较好的张力纤维, 虽然前者在软琼脂上生长很差, 而后者生长良好并有致瘤能力。

(3) vinculin 磷酸化, 在转化细胞应有增加, 但在 CU2 未被检出。CU12 也值得注意, 因为其 vinculin 磷酸化虽有增加, 但 pp60^{src} 并不同时存在于粘着斑上。

(4) 粘连蛋白, 在转化细胞应不积聚。但 CU12 细胞仍有积聚, 且细胞为梭形, 然而这不妨碍其具有软琼脂生长能力及其它转化细胞的行为。

如果我们集中对比 CU2 和 CU12 转化的细胞, 就会发现这种“不一致”现象更为明显, 即一方面在 CU12 转化细胞尽管 vinculin 中酪氨酸磷酸化程度很高, 在软琼脂内生长很好, pp60^{src} 却不结合在粘着斑上, 并且细胞是梭形的, 细胞外有粘连蛋白聚积。另一方面, CU2 转化的细胞却相反, pp60^{src} 存在于粘着斑, 但 vinculin 磷酸化未有增加。表中未列入的一些部分转化株的实验也证实有这种情况。

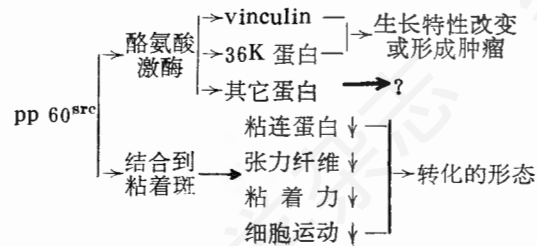
四、总 结

上述研究表明, 癌基因产物 pp60^{src}-粘着斑-转化表型之间, 确实是有密切关系的。在 pp60^{src} 与粘着斑之间, 至少具有二个独立的分

子事件。一个是 pp60^{src} 对 vinculin 上酪氨酸的磷酸化。这当然需要有磷酸激酶的活性, 同时 pp60^{src} 定位在粘着斑也应当是需要的。然而 CU12 转化的细胞中 pp60^{src} 不存在于粘着斑却仍能使 vinculin 磷酸化。说明可能有某些机制使后一点成为不必需的。第二个事件是 pp60^{src} 与粘着斑的物理性结合。从 CU2 转化的例子可以看到, 这种结合与 vinculin 的磷酸化及软琼脂生长能力无关, 而只是与粘连蛋白的丢失及细胞形态等有关。

由此可以认为, pp60^{src} 是一种多功能的蛋白质, 它的上述两个特性分别伴随着, 甚至可能是分别导致一系列独立的转化特征。src 基因应有特定的区段分别为之编码, 那些部分转化株即是损坏了有关区段的功能^[14]。实际上, 最近确实发现, pp60^{src}C-端的 52 K 具有酪氨酸激酶活性, 而 N-端的 8 K 段则是疏水性区段, 有利于定位在膜上^[16]。

pp60^{src} 对细胞转化表型的作用途径, 可以大致归纳成下面这样一个简图^[7]:



当然,这里还有许多问题尚未解决。如 vinculin 的磷酸化可能影响到肌动蛋白的聚合及其在膜上的停泊,从而也影响到细胞的形态;此外 pp60^{src} 尚可磷酸化另外的底物,如 filamin, vimentin, α -actinin 等,这对细胞的生长或形态是否和怎样产生影响等,都还有待进一步的探索。

参 考 文 献

- [1] Hunter, T. et al. 1980, *Cell*, 22:647.
 [2] Cooper, J. A. et al. 1981, *Mol. Cell Biol.*, 1:165.
 [3] Brugge, J. S. et al., 1978, *Virology*, 91:130.
 [4] Wellingham, M. C. et al., 1979, *Cell*, 18:125.
 [5] Rohrschneider, L. R., 1980, *PNAS*, 77:3514.
 [6] Izzard, G. S. et al., 1976, *J. Cell Sci.*, 21:129.
 [7] Rohrschneider, L. R., 1983, In progress in nucleic acid research and molecular biology. Vol. 29. ed Cohn, W. E. New York, P. 233.
 [8] 曾长青等, 1984, 电子显微学报, 3(3):13.
 [9] Softon, B. M. et al., 1981, *Cell*, 24:165.
 [10] Wildins, J. A. et al., 1982, *Cell*, 28(1):83.
 [11] Geiger, et al., 1980, *Cell*, 18:193.
 [12] Singer, I. I. 1982, *J. Cell Biol.*, 92:398.
 [13] Chen, W. T. et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 98:1546.
 [14] Anderson, D. D. et al., 1981, *J. Virol.*, 37:445.
 [15] Rohrschneider, L. R. et al., 1983, *Mol. Cell Biol.*, 3:731.
 [16] 柄崎脩一, 1983年, 蛋白质、核酸、酵素, 82(5):446.

编者按: 本文是 Sander 教授 85 年 10 月在上海细胞生物学研究所的学术报告的全文。从生机论和机械论讲起, 在谈论了对种质学说的争论以及所产生的影响之后, Sander 教授以昆虫为对象, 概括地论述了在那以后如何设想基因在发育中起作用。报告不仅有系统性, 并且包含着一些使人进一步思考的问题, 值得向读者推荐。对此有兴趣的读者还可参考本刊创刊号(1979年)刊登的“遗传和发育的研究分久必合”一文。

基因在个体发育中的作用——从 1885 发展到 1985 的历史性概述*

K. Sander

(富来堡大学生物系 I, 德意志联邦共和国)

1. 前 言

目前, 有很多生物学方面的工作着眼于实际应用, 但是不应该忽视的是, 纯理论研究曾经左右了人们对自然的看法, 进而影响了人类历史的形成。为此, 值得回顾一下生物学概念的发展过程, 以便在提出自己的实验设计时从中吸取经验教训——不管怎么说, 这是一个吸引人的题目, 尤其是随着年龄的增长, 能让

自己的思维从日常工作中的迫切问题解脱出去的时候

* 本文基于 1985 年 10 月在中国科学院上海细胞生物学研究所举行的“中国-联邦德国发育生物学进展讨论会”之后所做的报告。作者对细胞所尤其是庄孝德、曾弥白教授的热情好客表示衷心感谢。同时也分别向允许我使用插图 8、9、13、16 的 Springer/Heidelberg 出版社和允许使用图 10a 的 Thieme/Stuttgart 出版社表示谢意。