

- 125: 1678.
- [2] Nadler, L. M. et al., 1981, *J. Immunol.*, 126: 1941.
- [3] Nadler, L. M. et al., 1985, *J. Immunol.*, 131: 244.
- [4] Takami, T. et al., 1985, *J. Immunol.*, 134: 828.
- [5] Ishii, Y. et al., 1985, *Clin. Exp. Immunol.*, 61: 624.
- [6] Ishii, Y. et al., 1984, *Clin. Exp. Immunol.*, 58: 183.
- [7] Brooks, D. A. et al., 1980, *Clin. Exp. Immunol.*, 39: 477.
- [8] Freedon, A. S. et al., 1985, *J. Immunol.*, 134: 2228.
- [9] Tedder, T. F. et al., 1984, *Fed Proc.*, 42: 415 A.
- [10] Weis, J. J. et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 81: 881.
- [11] Tedder, T. F. et al., 1984 *J Immunol* 133: 678.
- [12] Kokai, Y. et al., 1986, *Clin Exp. Immunol.*, 64: 382.
- [13] Thorley-Lawson, D. A. et al., 1982, *Cell.*, 30: 415.
- [14] Throley-Lawson, D. A. et al., 1985, *J. Immunol.*, 134: 3007.
- [15] Kansas, G. S. et al., 1985, *J. Immunol.*, 134: 3003.
- [16] Kehrl, J. H. et al., 1985, *Cell Immunol.*, 92: 391.
- [17] Haynes, B. F. et al., 1981, *J. Immunol.*, 126: 1409.
- [18] Haynes, B. F. et al., 1981, *J Immunol.*, 127: 347.
- [19] Tsudo, M. et al., 1984, *J. Exp., Med.*, 160: 612.
- [20] Ritz, J. et al., 1980, *Nature* 283: 583.
- [21] Tedder, T. F. et al., 1985, *J. Immunol.*, 134: 1539.
- [22] Tedder, T. F. et al., 1984, *Tissue Antigens.*, 24: 140.
- [23] Nadler, L. M. et al., 1981, *J. Clin. Invest.*, 67: 134.
- [24] Anderson, K. C. et al., 1984, *Blood.*, 63: 1424.
- [25] Anderson, K. C. et al., 1985, *J. Immunol.*, 134: 820.
- [26] Boyd, A. W. et al., 1985, *J. Immunol.*, 134: 1516.
- [27] Tedder, T. F. et al., 1985, *J. Immunol.*, 135: 973.
- [28] Hokland, P. et al., 1985, *J. Immunol.*, 135: 1746.
- [29] Nadler, L. M. et al., 1984, *J. Clin. Invest.*, 74: 332.
- [30] Nadler, L. M. et al., 1982, *J. Clin. Invest.*, 70: 433.

## 生物膜融合\*

杨万年

(武汉大学病毒学系)

### 一、导 言

生物膜融合一般分为两类：一类是融合中具有识别过程，表现出专一性，称之为专一性膜融合(specific membrane fusion)；另一类没有识别过程，融合具有广谱性，称之为非专一性膜融合(unspecific membrane fusion)。专一性膜融合主要存在于生物膜的自然融合过程中，如受精过程，高尔基体与质膜的相互作用

用，细胞的吞噬过程，成肌细胞形成肌小管过程等等。病毒诱导的细胞融合也属于专一性膜融合。生物膜的非专一性融合，主要是指人工诱导的膜融合过程(不包括病毒诱导的膜融合)，如由化学因子(无机离子、有机化合物融合剂)、物理因子(电场、渗透压差等)诱导的膜融合。在非专一性膜融合中，都有一个外

\* 本文承夏镇澳先生审阅并指正，特此致谢。

加的融合剂或融合因子。融合剂或融合因子对膜融合的诱导没有选择性,即无专一性。

## 二、生物膜的专一性融合

### 1. 生殖细胞受精过程的膜融合

精子与卵子膜融合的专一性表现在其亲和结合具有专一性。Glabe等人从两种海胆的精子顶体泡中提取出结合蛋白(bindin),这种蛋白可引起海胆卵的凝集并具有种间专一性。用蛋白酶除去卵表面一个带碳水化合物的组分,可抑制结合蛋白的凝集作用。低温也可抑制这一凝集作用。这表明海胆卵表面存在精子结合蛋白的专一性受体<sup>[1]</sup>。Peterson进一步证实了精子与卵子透明带受体的结合具有高度的专一性。他观察到猪精子质膜的单价抗体和稀释的抗血清可完全抑制精子与卵子透明带的结合。当精子质膜抗体去除后,精子与透明带的结合力恢复<sup>[2]</sup>。Bleil等人从小鼠卵透明带提取出三种糖蛋白ZP<sub>1</sub>, ZP<sub>2</sub>, ZP<sub>3</sub>,分子量分别为 $2 \times 10^5$ 、 $1.2 \times 10^5$ 、 $8.3 \times 10^4$ 。通过测定三种糖蛋白干扰精卵结合的能力,发现ZP<sub>3</sub>具有受体活性,并认为卵子受精后ZP<sub>3</sub>受到修饰,失去受体作用。因而受精后透明带丧失再结合精子的能力<sup>[3]</sup>。Shur等人发现小鼠精子表面具有半乳糖转移酶,该酶参与受精过程,它可使精子结合在卵子透明带的N-乙酰葡萄糖胺残基上<sup>[4]</sup>。

精子与卵子质膜的融合过程与精子的获能有关。有人用PXB(Polymyxin B)为探针,发现豚鼠精子顶体反应时专一性融合区对PXB的亲合力比非融合区更高。而精子的获能过程可明显增大顶体帽上的PXB敏感区域,表明获能过程可增大专一性融合区。而膜流动促进剂A<sub>2</sub>C(2-(2-methoxyethoxy)-ethyl cis-8-(2-octylcyclopropyl) octanoate)可增加豚鼠精子的获能状态。这说明精子的获能可影响膜的稳定性,而膜的稳定性则与膜的融合感受态直接相关。

### 2. 细胞器的膜融合

细胞器膜融合主要包括高尔基体膜的融合、细胞分泌颗粒膜的融合、吞噬泡与溶酶体膜的融合以及各种细胞器膜与质膜的融合。

目前,有一些实验事实说明高尔基体膜融合具有专一性过程。Paicment等人从大鼠肝细胞中提取出高尔基体,用UDP-[<sup>3</sup>H]-半乳糖培养,发现内源脂类和几种肽受体有半乳糖掺入。若用内源半乳糖苷转移酶检测液与高尔基体共育,则观察到大量的高尔基体小囊发生融合。他们用UDP-[<sup>3</sup>H]-半乳糖与高尔基体共育后作电镜放射自显影,发现半乳糖集中在大量融合的小囊上并且其数量与膜融合成正比。这表明高尔基体膜融合与半乳糖苷转移酶紧密相关<sup>[5]</sup>。其后,Bergeron等人观察到高尔基体的膜融合仅仅发生在半乳糖苷化区域<sup>[6]</sup>。这表明高尔基体膜融合可能受到半乳糖苷化过程的控制。

在其它细胞器膜融合中,是否具有专一性尚无定论。一些研究者认为溶酶体与吞噬泡之间的膜融合具有专一性识别过程。Jeon等人观察到溶酶体与吞噬泡的膜融合与膜蛋白组分直接相关,因而认为溶酶体和吞噬泡的某些膜蛋白可能具有控制膜融合的作用<sup>[7]</sup>。但目前这方面尚缺乏有说服力的实验事实。

细胞器膜与质膜经识别后,其融合部位发生在无蛋白颗粒的脂类区。Orci等人观察到B细胞及胰岛细胞的分泌颗粒膜与质膜相融的部位及分泌颗粒膜自身相互融合的部位均在无蛋白颗粒的脂类区<sup>[8]</sup>。Fujioka在研究吞噬体膜融合时,观察到吞噬体发生融合的部位富集不饱和脂类<sup>[9]</sup>。

### 3. 体细胞膜的融合

体细胞膜的专一性融合主要是指巨噬细胞形成巨细胞和成肌细胞形成多核肌小管的融合过程。

在巨噬细胞中,最先发现兔肺泡巨噬细胞的融合存在一个融合因子(macrophage fusion factor,简称MFF)。这个融合因子可使肺泡

巨噬细胞融合形成巨细胞。Abe等人用经过12 nM  $1\alpha, 25$ -二羟维生素 $D_3$ 处理的脾细胞或T细胞培养液通过Sephadex G-100柱分离得到一个分子量为37,000—70,000的MFF。他们分析认为, MFF是由 $1\alpha, 25$ -二羟维生素 $D_3$ 诱导脾细胞产生的<sup>[10]</sup>。其后, Rodriguez A等人对MFF作了进一步研究, 发现0.1 M $\alpha$ -D-甘露糖以及 $\alpha$ -甘露糖苷酶或 $\alpha$ -糖苷酶可完全抑制MFF的诱融作用。他们认为, MFF诱导巨噬细胞融合的机理在于MFF的蛋白部分能够识别吞噬细胞表面的一个专一性受体, 这个受体不同于其它淋巴因子, 它含有 $\alpha$ -甘露糖分子<sup>[11]</sup>。

成肌细胞融合形成肌小管的现象很早就引起人们的注意。Burstein等人观察到ConA可抑制成肌细胞的融合。Sandra用单层磷脂脂质体在其相变温度以下时与成肌细胞共同培养, 可抑制成肌细胞的融合。在扫描电镜下可观察到细胞膜上有脂质体状的颗粒。若用胰酶预先处理成肌细胞可解除脂质体的附着。因而认为脂质体之所以抑制成肌细胞的融合, 是因为其与膜上的蛋白相互作用, 使起融合识别作用的蛋白被封闭<sup>[12]</sup>。Kent在进行鸡胚成肌细胞融合中, 观察到溶酶体向性胺类(lysosomotropic amines)抑制成肌细胞的融合。但被抑制的细胞转入新鲜培养基中又可重新融合<sup>[13]</sup>。这暗示胺类化合物可能是与成肌细胞表面的融合受体发生作用而抑制融合的。

#### 4. 病毒诱导的细胞膜融合

病毒诱导细胞融合的现象发现较早。能够诱导细胞融合的病毒有很多。据有关文献统计, 已有近二十种病毒可以诱导细胞融合。其中常用的为仙台病毒、副粘液病毒、新城鸡瘟病毒等。

病毒诱导细胞融合主要是包膜糖蛋白起作用。在细胞融合中, 起诱导作用的包膜糖蛋白有两种。一种是分子量较大的包膜糖蛋白(MW 69000—76000), 具有神经氨酸酶和血凝活性, 称之为HN糖蛋白。另一种是分子量较

小的包膜糖蛋白(MW 53000—56000), 具有融合和溶血作用, 称之为F蛋白<sup>[14]</sup>。

若将仙台病毒分别放在卵胚和MDBK细胞或L细胞中生长, 可观察到在这两种环境中生长的病毒包膜HN糖蛋白是相同的。但在MDBK细胞或L细胞中生长的病毒包膜上缺乏F蛋白, 却具有一个较大分子量的糖蛋白 $F_0$ ,  $F_0$ 在感染细胞的质膜上被蛋白酶裂解成F。这一裂解过程取决于寄主细胞, 是细胞融合专一性的一个方面。

病毒诱导细胞融合专一性的另一个方面取决于HN糖蛋白与细胞表面受体的专一性结合。当包膜表面HN蛋白去除后, 病毒颗粒不能被细胞吸收, 缺乏结合在细胞上的能力, 因而不能诱导融合<sup>[14]</sup>。

细胞表面存在病毒包膜糖蛋白的专一性受体。Richardson等人用一个与副粘液病毒F蛋白N-末端区氨基酸序列相同的寡肽分子, 可抑制F糖蛋白的融合活性以及病毒的感染力和溶血作用。用放射性标记方法, 可证明这个寡肽是作用于细胞表面, 而不对病毒起作用<sup>[15]</sup>。这表明寡肽是结合在细胞表面的病毒F蛋白的专一性受体上而起抑制作用的。

近来, 人们发现包膜上的血凝素(Hemagglutinin, HA)也具有融合活性。一般来说, 具有裂解状态HA的病毒颗粒或脂质体均能与细胞相融。White等人克隆流感病毒的HA基因, 将其插入重组的猿猴病毒40中表达, 得到的新HA分子可在流感病毒其它分子均不存在的情况下表现出融合活性<sup>[16]</sup>。证明了病毒包膜上的HA具有融合活性。

病毒诱导的细胞融合中, 其包膜首先与细胞质膜相融。尔后病毒包膜在细胞之间形成桥, 具有包膜桥的细胞其膜透性发生变化, 整个细胞膨胀变大, 细胞膜间接触加强, 最后导致融合。在细胞膨大时, 包膜桥平面常常伴随有膜管(membrane tubules)形成。这些膜管产生于包膜与细胞膜相融合的地方, 并且随着细胞的膨大而膨大。最后膜发生断裂, 使膜管形

成多个小膜泡,细胞融合也即形成。

细胞质膜在病毒包膜蛋白作用后的透性变化可能是细胞发生融合和溶血的重要原因。Wyke等人研究发现,仙台病毒诱导Lettrec细胞或血红细胞融合时,细胞的透性发生变化。这些透性变化是由于细胞质膜上产生了1 nm左右的小孔引起的。并且这一变化是以病毒包膜与细胞膜融合为前提的<sup>[17]</sup>。

### 三、生物膜的非专一性融合

#### 1. 化学因子诱导的膜融合

(1) 无机化合物诱导的膜融合。在无机融合剂中,最重要的是 $\text{Ca}^{++}$ 。关于 $\text{Ca}^{++}$ 在膜融合中的作用机理,较为普遍的观点是 $\text{Ca}^{++}$ 的膜脂相分离学说。Papahadjopoulos等人用脂质体研究 $\text{Ca}^{++}$ 在膜融合中的作用后,提出:膜融合的决定因素是 $\text{Ca}^{++}$ 在膜上能诱导酸性磷脂的侧向分离,导致膜局部产生固化、晶化区域,形成膜相分离。这些区域的产生引起膜的高渗和不稳定,使膜易于融合。膜融合的部位在晶化区与非晶化区的相界面上,这个相界面是结构不稳定、自由能较高的区域,因而易于与邻膜类似区域相融<sup>[14]</sup>。

关于 $\text{Ca}^{++}$ 的作用还有一些其他观点。如有人认为 $\text{Ca}^{++}$ 吸附在膜上,影响膜的固有静电场,从而导致膜结构的变化,使膜易于融合。

其它的无机融合剂有 $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Cd}^{++}$ , 稀土金属离子等。

#### (2) 有机化合物诱导的膜融合

① 脂类化合物。脂类化合物对细胞融合有较高的诱导力,但溶胞、溶血作用也较强,对细胞有较严重的损害。

作为融合剂的脂类化合物很多。主要有溶血卵磷脂、磷脂酰丝氨酸、油酰甘油酯等。

关于脂类化合物的促融机理,Ahkong等人认为,脂类融合剂会改变细胞膜的透性,增加细胞膜的流动性,使细胞膜结构发生有利于融合的变化。他们观察到,在培养细胞中,不

膨大的卵状细胞不会融合。因而认为透性变化引起的细胞膨大是融合所必需的。他们还认为不饱和脂肪酸之所以易于诱导细胞融合,是因为其分子插入膜中,增加了膜的流动性。他们单纯用加热的方法增加膜的流动性,结果发现鸡血红细胞48℃时在显微镜台上迅速从卵形变成圆形,并产生融合。而且与脂类融合剂诱导的情形一样,部分细胞发生解体<sup>[18]</sup>。Martin等人用溶血卵磷脂的脂质体为融合剂,结果与Ahkong等人一致。他们认为脂类融合剂对细胞膜结构会产生剧烈的扰动,提高膜的自由能,使膜变得不稳定。而融合可使自由能降低,使膜恢复稳定状态<sup>[19]</sup>。

② 聚乙二醇(PEG)及有机高聚分子。PEG是目前应用最广泛、融合效果最好的融合剂。PEG诱导的细胞谱相当广,对动物、植物或微生物细胞均适用。诱导细胞融合的PEG分子量范围一般为1000—6000,其中PEG 6000应用最广。PEG的浓度通常为30—50%。

PEG的诱融机理目前尚不明了。Maggio等人认为PEG使膜表面电势下降导致膜易于相互接触,使细胞凝集在一起,是诱导细胞融合的根本原因<sup>[20]</sup>。Kao等人认为PEG含有醚键,带负电性,可与细胞表面正的极性基团相连形成细胞之间的“桥”,使细胞膜相互接触并融合<sup>[21]</sup>。融合介质渗透压的变化可能是PEG诱融作用的重要因素。用于诱融的PEG溶液是高渗的。在PEG溶液中,细胞会产生皱缩并聚集。若PEG溶液处理细胞期间不稀释,则细胞融合率很低。当用缓冲液稀释后,融合才大量发生。稀释过程中,皱缩的细胞重新变圆,使得集聚在一起的细胞相互间的膜接触加强。稀释带来的渗透冲击会造成细胞膜结构的不稳定,使膜易于相融。

PEG的诱融作用受 $\text{Ca}^{++}$ 的促进。一般认为 $\text{Ca}^{++}$ 会使细胞膜间形成PEG- $\text{Ca}^{++}$ 分子桥,从而加强细胞间的亲和。膜的流动性也促进PEG诱导的细胞融合。

葡聚糖、聚乙烯醇、聚类异戊二烯、聚氧

乙烯等许多有机高聚化合物也具有诱导细胞融合的作用。

③ 有机小分子化合物。甘油、山梨醇、蔗糖、二甲亚砜、苯甲醇、溴化烷等也可诱导细胞融合<sup>[20]</sup>。

## 2. 物理因子诱导的膜融合

### (1) 电场诱导的膜融合

1979年, Senda 等人首先用电场诱导细胞融合<sup>[22]</sup>。其后, Zimmermann 等人改进了这一方法, 使电融合方法操作简便, 融合细胞量大大增加。

电融合过程分为两步: 第一步为电介质电泳(dielectrophoresis), 即在融合小室电极上输出一个中频(1-10<sup>3</sup>KHz)、场强为200—400 v/cm的正弦电信号, 使极化的细胞在非均匀电场中排成“珠链”状(见图1)。第二步为瞬时可逆击穿(transient reversible electric breakdown), 即在第一步的基础上输出单个或多个方波脉冲(10—100 μs, 700—2000 v/cm), 使细胞质膜发生可逆击穿, 导致膜相互间融合<sup>[23]</sup>。

关于电场诱导细胞膜融合的机制, Zimmermann 提出了一个模型: 电介质电泳使细胞膜靠在一起, 并诱导膜接触区域产生蛋白游离区(proteinfree areas), 使相邻细胞膜的脂双层紧密接触(见图2a)。电击穿将导致膜结构的紊乱, 形成瞬时可逆的小孔, 从而在两膜的脂双层间形成“桥”, 两膜发生融合(见图2b)。融合后, 剩余膜形成小脂质体进入细胞质(见图2c)。

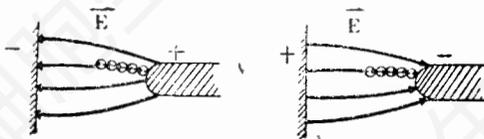


图1 电解质电泳示意图<sup>[24]</sup>

### (2) 其它物理因子诱导的膜融合

诱导膜融合的物理方法还有渗透压差法和加热法。

Cohen 等人用磷脂脂质体与平面脂双层膜

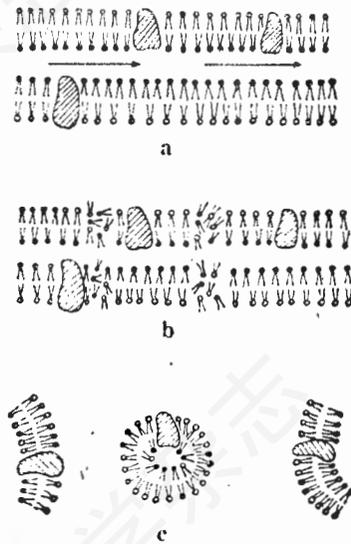


图2 电场融合膜分子模型图<sup>[23]</sup>

为材料, 当脂质体与平面膜接触时, 用可渗透的溶质置换出介质中不渗透的溶质, 脂质体因而膨大, 继而与平面膜融合<sup>[25]</sup>。

用加热法也可诱导膜融合。除前所述 Ahkong 的工作外, Chaudhury 等人观察到五种磷脂脂质体均可用加热法诱导融合, 并且在外界条件稳定的情况下, 每一种磷脂脂质体均有各自固定的融合温度<sup>[26]</sup>。

## 四、生物膜融合机理的统一性

生物膜的专一性融合和非专一性融合存在以下共同点:

1. 膜在融合前, 均需要一个连结因子(linking factor)将膜连结到一起。在专一性融合中, 起识别作用的受体分子就是连结因子。在非专一性的膜融合中, 融合剂或融合因子则为连结因子。膜的相互连结是融合的前提。

2. 融合时, 均需要一个膜结构的扰动因子(disturbance factor)对膜作用, 造成膜结构的不稳定, 使相互靠近的膜发生融合。在专一性膜融合中, 膜的扰动因子尚不清楚, 有些情况可能为连结因子兼具。在非专一性膜融合中, 诸如 Ca<sup>++</sup> 引起的膜相分离、PEG 稀释造成的介质渗透冲击, 电场融合中脉冲电场等等是为扰

动因子,有些也可能为连结因子所兼具。

3. 膜融合时,透性均会变大。在病毒、化学因子、电场诱导的细胞膜融合中均观察到这种现象,说明质膜透性变化与膜融合密切相关。

4. 膜的流动性有利于融合。

### 五、结 语

生物膜融合是一个非常复杂的生物学过程,目前不明之处尚多,其理论还较粗糙、零散,有待于进一步的探讨和研究。由于生物膜融合与生物工程技术密切相关,生物膜的专一性融合在细胞代谢中占重要地位,因此,今后生物膜融合的研究必定会得到迅速的发展。

### 摘 要

生物膜融合分为专一性膜融合和非专一性膜融合。专一性膜融合主要是指细胞膜的自然融合过程。病毒诱导的细胞膜融合也属于专一性膜融合。非专一性膜融合主要是指化学因子和物理因子诱导的膜融合过程。本文对上述两种膜融合作了较为全面的介绍,并对膜融合的机理作了简单的讨论。

### 参 考 文 献

- [1] Glabe, C. G., et al., 1979, *J. Cell Biol.*, 83(3): 595-604.
- [2] Peterson, R. N., 1980, *Science, (Wash.)* 207(4426): 73-74.
- [3] Bleil, J. D., et al., 1980, *Cell.*, 20(3): 873-882.
- [4] Shur, B. D., et al., 1982, *J. Cell Biol.*, 95(2): 574-579.
- [5] Paiement, J., et al., 1981, *J. Cell Biol.*, 92(1): 147-154.
- [6] Bergeron, J. J. M., et al., 1982, *Biophys. J.*, 37(1):121-122.
- [7] Jeon, K. W., et al., 1982, *Exp. Cell Res.*, 137(1): 253-268.
- [8] Orci, L., et al., 1981, *Methods in Cell Biology.*, 23: 283-300. Edited by A. R. Hand & C. Oliver, Academic Press.
- [9] Fujioka, A., et al., 1983, *Acta Histochem. Cytochem.*, 16(4): 321-334.
- [10] Abe, E., et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(18): 5583-5587.
- [11] Rodriguez A., F. A., et al., 1983, *Scand. J. Immunol.*, 18(5): 407-410.
- [12] Sandra, A., 1980, *Exp. Cell Res.*, 125(2):411-419.
- [13] Kent, C., 1982, *Dev Biol.*, 90(1): 91-98.
- [14] Papahadjopoulos, D., et al., 1979, *Methods in Membrane Biology* 10,1-121 Edited

## 肿瘤细胞内的细胞骨架 (续)

A. Ben-Ze'ev

### VI、癌基因产物和细胞骨架

#### A. 癌基因产物和粘着斑

为了理解细胞转化作用诱导细胞骨架变化的机理,其发展最快的研究途径之一,可能就是观察不同的癌基因产物的行为和它们对细胞骨架的关系。pp 60<sup>src</sup>或RNA肿瘤病毒RSV的Src癌基因已被认为是与这种病毒转化的细胞中的表型改变有关(综述见参考文献201)。起初曾经指出,作为RSV病毒转化特点

的,细胞骨架组织和细胞形状的改变,也可以通过向正常细胞显微注射RSV转化细胞的胞质而获得<sup>(202)</sup>。最近已能显示出,用显微注射提纯的pp 60<sup>src</sup>基因到正常细胞的方法,可获得肌动蛋白的转化作用<sup>(203)</sup>。在转化细胞内,肌动蛋白及其结合蛋白改变了的组织结构,是以聚集成“玫瑰花”的形状或聚集成C或S形为特征的<sup>(204,205)</sup>。这些不寻常的结构包含有Vinculin<sup>(204,205)</sup>和talin,二者都大量存在于粘着斑<sup>(206)</sup>。pp 60<sup>src</sup>引起肌动蛋白重新组织的机制还不清楚,但可能