

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^{src}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⁽²⁰²⁾。最近已能显示出,用显微注射提纯的pp 60^{src}基因到正常细胞的方法,可获得肌动蛋白的转化作用⁽²⁰³⁾。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^(204,205)。这些不寻常的结构包含有Vinculin^(204,205)和talin,二者都大量存在于粘着斑⁽²⁰⁶⁾。pp 60^{src}引起肌动蛋白重新组织的机制还不清楚,但可能

包含着蛋白质的磷酸化作用, 因为 pp 60^{src} 是一种蛋白激酶, 它使蛋白质的酪氨酸残基磷酸化⁽²⁰⁷⁻²⁰⁹⁾。RSV 的 src 基因产物表现出与非离子去垢剂提取后获得的细胞骨架网络相结合, 并在分离的骨架网络上保留着它全部的磷酸激酶活性⁽²¹⁰⁾。应用不同的分离设计, Courtneidge 和 Bishop⁽²¹¹⁾ 表明 pp 60^{src} 的活性形式是结合在质膜上的。应用免疫电镜和免疫荧光显微术显示出 pp 60^{src} 是与细胞膜的内表面相结合的⁽²¹²⁾, 稍后又在含有 Vinculin 的焦点接触处鉴别出丰富的 pp 60^{src}⁽²⁰⁴⁾。这就提出了一种可能性, 即焦点接触的重要组成部分在酪氨酸残基处被与粘着斑同位的 pp 60^{src} 加以磷酸化, 由此引起焦点接触内的改变。而这也将使肌动蛋白纤维释放, 并导致转化细胞特征性的组织破坏(图 1)。Sefton 等通过分析一套骨架蛋白, 发现在正常细胞中只有 Vinculin 含有一些磷酸化的酪氨酸, 同时它的磷酸化水平在转化细胞中提高 20 倍⁽²¹³⁾。此外, 由癌基因 yes 和 abl 编码的另外两种蛋白质最近用免疫荧光显微镜曾被显示与粘着斑相结合^(214,215)。yes, abl 和 src 基因产物对细胞的转化作用, 极可能是通过细胞蛋白在酪氨酸残基上的磷酸化而进行的, 因为所有这三种蛋白都被鉴定为蛋白激酶^(216,217)。虽然这些研究对细胞转化作用中 Vinculin 酪氨酸磷酸化的作用给以高度的提示。但仅只是 Vinculin 的磷酸化也许并不足以引起肌动蛋白纤维的破坏。焦点接触包括其它的蛋白质, 例如 talin⁽²⁶⁾, 并且这些蛋白的磷酸化也可能是需要的。再者, 几种在粘着斑上缺乏 pp 60^{src} 的 RSV 突变株转化的细胞, 仍然能诱发动物的肿瘤, 并且是抛锚非依赖性的⁽²¹⁸⁾。利用从一合成的半抗原所产生的抗体, 它与磷酸化的酪氨酸有特异性的交叉反应, 三种其它的磷酸蛋白质已经用免疫印记分析方法(immunoblot analysis)鉴定出来⁽²¹⁹⁾。这种抗体在用于免疫荧光染色时, 也能染出粘着斑, 这提示在细胞与底面接触的区域内存存在着另外的磷酸蛋白质。这同时也表明, 一些癌基因产物可能作为细胞结构成分在粘着斑内起作用, 以此改变正常细胞功能的组织。在某些癌基因蛋白产物表现出与粘着斑结合的同时, 用免疫荧光染色可以测定出在转化细胞内癌基因 fms 的糖蛋白是与中等纤维同位置存在的。并且, fms 基因产物可与中等纤维共同分离出来, 在体外自装配检验中它们还能重新装配⁽²²⁰⁾。fms 糖蛋白与中等纤维网的结合, 是正如以前所提出的⁽²²¹⁾糖蛋白与骨架间物理性结合可能性的另一个例证。然而, 最近曾指出, fms 癌基因产物的一小部分, 是一种具有酪氨酸

特异的激酶活性的跨膜蛋白, 可能就是传递这种转化活性的部分。这种蛋白的一种截短的译本仍然保存着酪氨酸激酶活性, 并聚积在转染的细胞内, 但不达到质膜, 该译本是不能转化细胞的⁽²²²⁾。

fgr 癌基因产物的顺序最近已被确定。据报道, 这种蛋白是肌动蛋白的一部分与酪氨酸特异性蛋白激酶的一种杂种⁽²²³⁾。这种杂种蛋白的功能还不清楚, 但是设想它能干扰“正常的”细胞骨架的形成, 正如同对化学转化的人类细胞含有的突变 β -肌动蛋白所猜测的那样⁽¹¹⁷⁾。或者也可能, fgr 蛋白的肌动蛋白那一段当结合到细胞骨架时, 可能把磷酸化反应直接引导到那些在正常情况下不易达到的细胞骨架的靶子上。

B. P 36 一种酪氨酸磷酸化的靶子, 是与细胞骨架网络相结合的

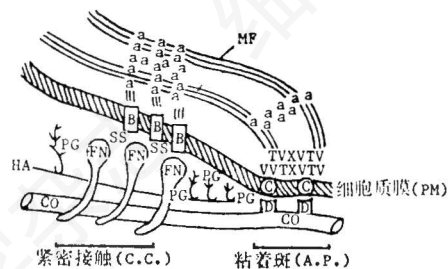
除了 Vinculin 外, 在转化细胞内由 pp 60^{src} 在酪氨酸上磷酸化的一种主要靶子, 它是一种分子量为 36 KDa 的细胞蛋白质(p36)⁽²²⁴⁻²²⁷⁾。当具有上皮生长因子(EGF)受体的细胞被暴露于这种激素时, 该蛋白(p36)就在酪氨酸上磷酸化^(228,229)。尽管当 EGF 加到细胞上时细胞内对 p 36 起磷酸化作用的蛋白激酶还不清楚, 这是可能的, 即诱导细胞分裂的信号是通过对酪氨酸的磷酸化作用, 从细胞表面传导到细胞的内部。从而, 这种特性可能在通过诸如 EGF 等生长因子诱导生长的正常细胞中, 以及在被某些癌基因病毒所转化的细胞中是共同的。p 36 在正常细胞中的功能, 以及它与在转化细胞中被诱导而发生的那些改变之间可能的牵连关系还不了解。对 p 36 所知的是它在小肠刷状缘的末端网(terminal web)中含量丰富⁽²³⁰⁾, 而穿入到微绒毛的肌动蛋白束正是抛锚于此(综述见参考文献 217)。这就提示出 p 36 可能具有细胞内的结构作用。有些学者曾鉴定出 p 36 与在质膜下的细胞骨架基质结合, 并抛锚在膜上^(227,231-236)。最近发现 p 36 的分布非常类似于非红细胞的血影蛋白(Spectrin), 后者是一种高分子量(230 KDa)蛋白, 也是分布在质膜下的网格状结构内⁽²³⁷⁾。在用去垢剂提取后, p 36 仍然与抗去垢剂的表面层(Surface lamina)相连接⁽⁹⁾, 这一表面层含有抗去垢剂的细胞表面蛋白和凝胶蛋白(cytoplasmalemmal proteins)⁽²³⁸⁾。

这种抗去垢剂的表面层是与其下面的细胞骨架紧密相连接的, 并且因此被认为是组成细胞骨架的外部边界⁽⁹⁾。非红细胞血影蛋白曾显示出与肌动蛋白交叉连接^(239,240)并且在调节细胞运动中以及与细胞表面相

关的其它活动方面具有功能^(238,241)。p 36 与血影蛋白的共同分布、以及转化时其酪氨酸磷酸化的增强, 提示出细胞骨架附属蛋白对于在转化细胞内所发生的结构变化的作用。

正常细胞与转化细胞内的细胞骨架与细胞外基质之间关系的比较

正常细胞(NORMAL CELL)



RSV转化细胞(RSV TRANSFORMED CELL)

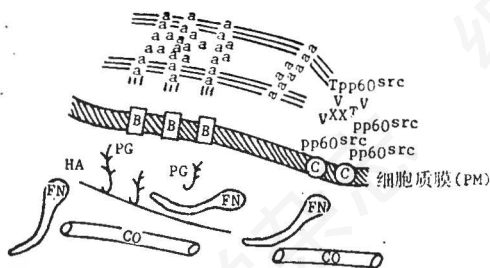


图 1 正常细胞中细胞骨架通过越膜反应与细胞外基质之间可能的关系, 及其在转化细胞中的瓦解(示意图)。粘着斑把细胞质膜(PM)固着到细胞外基质上。粘着斑包含微丝(MF), 它在膜的细胞质一侧通过 Vinculin(v)或 talin(T)结合于跨膜蛋白(C), 同时在膜的细胞外一侧通过未知成分(D)结合于胶原纤维。在粘着斑上找不到粘连蛋白(FN)。在细胞膜离底面稍远的紧密接触处, 微丝(MF)通过 α -辅肌动蛋白(α)连接到跨膜蛋白(β)上, 又以此侧向地与质膜连接。粘连蛋白交叉连接的基质被连接到这些越膜蛋白(β)上。胶原蛋白(CO), 透明质酸(HA)、蛋白多糖(PG)都是细胞外基质的组成成分。被 RNA 肿瘤病毒转化的细胞中, 在粘着斑上可检出 pp 60^{src} 蛋白。在 Vinculin 和其它焦点接触成分(x)的酪氨酸残基上的磷酸化作用可能破坏肌动蛋白与膜之间的连接, 由此造成在转化细胞内可观察到的肌动蛋白束的解体。这能将引起含有粘连蛋白的细胞外基质从膜上释放出来。

VII、转化细胞内的微管

在转化细胞内微管的组织仍然是一种争论的问题(综述见参考文献 242)。Puck 实验室早期的研究认为, 微管可能参与转化作用。Puck 及其同事发现了当把细胞置于双丁酰 cAMP 一段时间后, 细胞形状从球形又变成扁平及伸长的“逆转”(reverse transformation)现象^(243,244)。此种逆转作用, 可被秋水仙素或细胞松弛素 B 所抑制, 这提示出相关的细胞骨架成分对于细胞转化所诱发的形态改变的作用。这些最初的研究被 Fonte 和 Porter 的电镜工作所证实⁽²⁴⁵⁾, 他们报道在 Kirsten 肉瘤病毒转化的大鼠肾细胞内, 微管的数目比在对应的正常细胞内是减少了。

当单一特异性的抗管蛋白抗体成为可应用时, 几个实验室曾报道在 DNA 和 RNA 病毒转化细胞内, 微管的组织是与非转化细胞中是不同的^(33,34,246,247)。

另外一些研究者在荧光免疫前用不同方法加强细胞的穿透性, 他们得出结论说当粘着在表面上生长时, 发达的微管网在转化细胞和非转化细胞是一样的^(147,175,193)。这些学者认为, 在更为接近圆形的转化细胞内, 微管的重叠造成染色较为弥散或减少的印象^(248,249)。更近几年来, 用形态测量技术, 包括电镜研究, 几个研究组显示多种转化细胞与相应的正常细胞相比较, 只有一半数目的微管^(250,251), 而且在转化细胞中仅有较少的微管伸展到质膜下⁽²⁵¹⁾。这些提法得到另一研究的支持, 该研究把外源性管蛋白加到管蛋白缺乏的溶解细胞, 这些管蛋白在正常细胞中能重新组装成比在对应的 SV 40 转化细胞中长出 2 到 3 倍的微管⁽²⁵²⁾。

较早期的研究曾报道正常细胞要比转化细胞含有多达 2 倍的管蛋白^(253,254)。更近来的研究采用了一种非常敏感的放射免疫测定法, 仍不能测出在转化细胞和正常细胞之间管蛋白的水平有什么不同^(255,256), 但在一个研究中注意到, 钙结合蛋白—钙调蛋白(calm-odulin)在转化细胞内增加到 2 倍之多⁽²⁵⁶⁾。由于在体外微管的聚合—解聚可被钙调蛋白所调节, 故设想在转化细胞内钙调蛋白的浓度能够调节管蛋白的聚合水平⁽²⁵⁶⁾。因此, 转化细胞中钙调蛋白水平的提高能使转化细胞的微管不稳定, 同时引起微管数目的减少。由于非聚合的管蛋白的水平曾被显示可通过影响胞质中管蛋白 mRNA 的水平来调节新管蛋白合成的数量^(85,86), 所以钙调蛋白可能不仅直接作用于管蛋白聚合的调节, 而且也间接地通过细胞内管蛋白水平的调

节来实现。

双标记免疫荧光术^(59,258)，电镜超薄切片分析^(257,259,260)或整装电镜⁽¹⁰⁾的研究表明，微管和中等纤维之间有一种结构上的相互作用。这种结合可能通过包含高分子量(大约300 KDa)的MAP₂蛋白^(37,39)的横桥而传递的。微管和中等纤维的复合物被认为在成纤维细胞中具有决定细胞形状、细胞器的分布和细胞内运动^(122,259,261)以及在神经细胞中沿着轴突的分子传递的功能⁽²⁶²⁾。

被温度敏感的RNA肿瘤病毒转化的细胞内微管与中等纤维的结合，在允许温度下很快地被破坏，继而出现中等纤维向核周区域的收缩，而对微管则无任何影响⁽²⁵⁸⁾。这一发现导致这样一种可能性，即pp60^{src}能通过对酪氨酸残基的磷酸化，作用于一个参与连接微管和中等纤维的成分。值得注意的是，在MAP₂和cAMP依赖性蛋白激酶的调节亚单位及催化亚单位之间存在着结合⁽²⁶³⁾，MAP₂被认为是在微管和中等纤维之间形成交叉连接，这点提示MAP₂的磷酸化对于微管与中等纤维相互作用的调节来说是重要的。

IX、转化细胞内的中等纤维

一般说来，中等纤维在体内细胞转化时继续保持其超微结构和免疫学的特性(综述见参考文献264, 265)。中等纤维在形态上是相似的，但其生化成分非常不同，同时具有与其来源组织相关的抗原特性。恶性细胞仍保持其细胞类型特异性中等纤维的表达这一事实，已被证明在组织学和肿瘤分类上是一种非常有价值的工具(综述见参考文献264)。癌是以细胞角质蛋白为特征的，肌肉肉瘤是以结蛋白、非肌肉肉瘤是以波形纤维蛋白、神经胶质瘤是以神经胶质纤维酸性蛋白、从交感神经来的肿瘤是以神经纤维蛋白为特征的。由于角质蛋白纤维是由2—10种不同多肽组成的异聚体，所以通过用双向凝胶电泳观察它们的角蛋白的构成范围，可以进一步把癌分成与其来源的上皮组织相关的细类⁽⁴⁴⁾。实体肿瘤转移后仍表现其原来肿瘤的中等纤维特征。因此，对中等纤维成分特点确定能为诊断提供很有价值的信息^(44,266,267)。对于通过体液转移的肿瘤，曾报道在腹水中的某些癌细胞，对细胞角质蛋白和对波形纤维蛋白均是阳性的^(268,269)。相似地，在少数其它情况下，也曾报道来源于上皮的某些组织的恶性转化作用导致除细胞角质蛋白型纤维外，额外获得波形纤维蛋白(Vimentin)^(270,271)。细胞角质蛋白和波形纤维蛋白的共同表达在体内是很罕见的，

但对许多已建立的上皮来源的细胞株来说则是共同的特征^(45,46,272)。最近报道小鼠早期胚胎的壁层内胚层细胞同时表达细胞角质蛋白和波形纤维蛋白^(273,274)。这些细胞构成游动细胞的群体，它们能从上皮中迁移出并彼此分开地在Reichert膜上定居下来。因此，有可能从被组织结构所强加的三维束缚中自由出来会诱导出波形纤维蛋白的表达。值得注意的是，细胞角质蛋白在几种已建立的细胞株内的表达，在细胞与细胞广泛接触时得到加强，这种广泛接触是许多上皮组织的特点^(90,91,275,276)。在同一个上皮细胞中，波形纤维蛋白是与共同表达的细胞角质蛋白单独地调节的，并与细胞的形状改变⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾或与这些细胞在培养中的增长速度有关⁽²⁷⁶⁾。

X、结论和理论上的思考

肿瘤细胞的中心特征之一是它们不受控制地增殖。因此癌细胞看来是回避使正常细胞的生长受到调节的控制机制。在多细胞有机体中，细胞功能和结构是紧密相关的。因此可以相信，与生长有关的细胞功能是由通过有组织的细胞骨架所传递的信号来调节的。由于组织是具有遗传分布力量的构筑的集合，它们表现出某种物理力量，所以很可能这些力量是通过调节细胞形状来向生长调节发出信息的。这样，细胞骨架就将做为那些结构力量的传导装置，这些结构力量发出关于生长控制的信息⁽²⁷⁷⁾。生长控制的可溶性成分例如生长因子和它们的受体，它们也是细胞间信号的携带者，可能做为生长控制的精细调节。十分可能，生长因子通过它们的细胞表面受体与细胞骨架相互作用，而后者又负责传导这些生长信号到核，以导致生物的反应。确实，在最近的研究中，细胞骨架的快速重新组织已被确认是对某些生长因子和肿瘤启动子的反应(综述见参考文献112, 278—281)。

在细胞转化中，主要的改变发生在细胞骨架的组织以及细胞骨架不同成分之间的相互作用上。微管与中等纤维之间的相互作用是被破坏了，但在大多数转化细胞内充分发达的微管和中等纤维系统仍然是存在的。在肿瘤细胞内仍然维持的中等纤维的组织特异性分型，已被证明对外科病理学家去诊断和分类肿瘤是一种非常有用的工具。与此相反，肿瘤细胞中许多重要的改变是在微丝及其结合蛋白的组织结构上被检出的。这包括粘着斑的组织成分(Vinculin, talin)的瓦解，后者又导致细胞表面粘蛋白的释放，粘附减弱，更圆的细胞形态以及失去把肌动蛋白连接到质

膜上的能力,从而使张力纤维丧失。对焦点粘着斑内的附加成分,对把细胞间质成分(胶原蛋白、粘连蛋白等)连到肌动蛋白上的跨膜成分,以及最重要的,对于把肌动蛋白纤维通过 Vinculin 和 talin 连接到膜上的跨膜蛋白的鉴定,对于细胞形状相关的生长控制之分子剖析是必要的。不断积累的证据表明,一些属于酪氨酸激酶的癌基因产物蛋白可以诱导细胞骨架的改变,后者是在由粘着斑成分磷酸化引起的转化之后发

生的。阐明癌基因蛋白作用的机制,对于理解恶性转化过程中导致正常生长调控的信号传递系统破坏的机制具有极大的重要性。

汪望仁 译自 *Biochimica et Biophysica*

Acta, 780, 197—212(1985)

何大澄校

(完)

(译文内参考文献可查原文)

组织培养次生代谢产物 VI. 甾类化合物 (放射免疫测定法 Radioimmunoassay)*

获森 学

在植物界中所发现的甾类化合物,除普遍存在的固醇外,也特异地存在于有限的植物种中,如椰子油中所含的雌酮,蕨类和罗汉松目植物中所含有昆虫蜕皮激素(ecdysones),马铃薯所含的茄碱(solanine),甾体激素合成的重要原料——薯蓣属植物的甾类化合物皂角苷(saponin),作为重要的心脏功能不全的特效药毛地黄属植物所含的强心配糖体[毛地黄毒苷(digitoxin)和地高辛(digoxin)]等都可作为代表。

灵敏度高、特异性好的 RIA(放射免疫法),用于少量植物培养细胞中微量甾类化合物的定量时十分有效。本文即介绍甾类化合物的 RIA。

1. RIA 的原理

RIA 是利用抗原抗体反应进行定量的方法,首先制备需定量物质的抗体,因甾类化合物这样的低分子化合物不具有抗原性,将其原样注射到动物体内不会产生抗体。但若将其与蛋白质结合而注射这一结合体,就可获得与这一化合物特异性结合的抗体。此时这一化合物称为这一抗体的半抗原或不完全抗原(hapten)。定量的抗体中加入定量的同位素标记的半抗原和含有未知量非标记的半抗原,由于抗原抗体反应,标记半抗原和非标记半抗原与抗体竞争性的结合。此后,将抗体·半抗原结合体和游离的半抗原进行分离,测定抗体·半抗原结合部分的放射能。试验材料中半抗原含量少时,抗体·半抗原结合体中标记半抗

原的比例高,反之则低。用已知量非标记半抗原作出标准曲线,便可确定试验材料中半抗原的数量(图 1)。

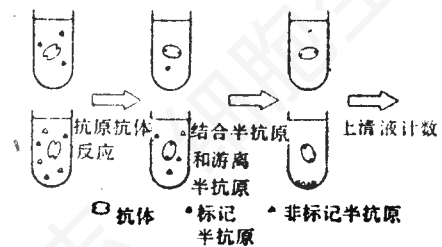


图 1 RIA 的原理

2. 测定方法

A. 抗原的制备

如上所述,为使甾类化合物具有抗原性须与蛋白质结合。作为载体蛋白质,最好用牛血清白蛋白。甾类化合物与蛋白质结合的有代表性的方法是利用甾类化合物的羰基或羟基作为与蛋白质结合的部位,在利用羟基时以半丁二酸盐(hemisuccinate)作中间体;用羰基时以肟(oxime)作为中间体。用氯甲酸异丁酯(isobutylchlorocarbonate)进行混合酐(mixed anhydride)反应,以此作为与蛋白质结合的方法^[1,2]。

* 本文摘释自山田康之编著“植物细胞培养マニエユル”一书的第78—84页