

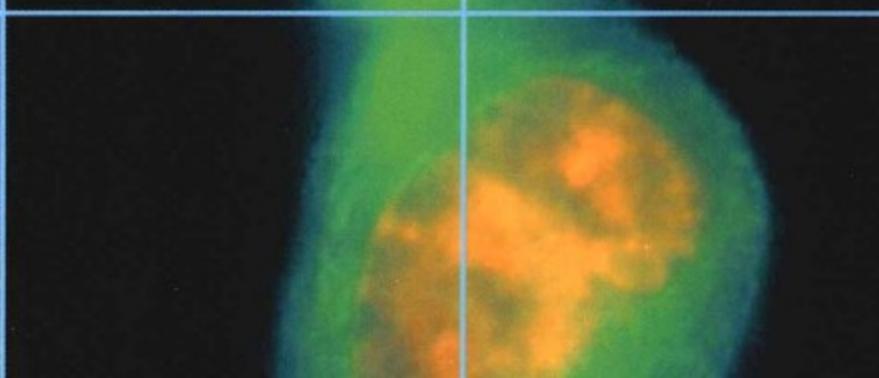
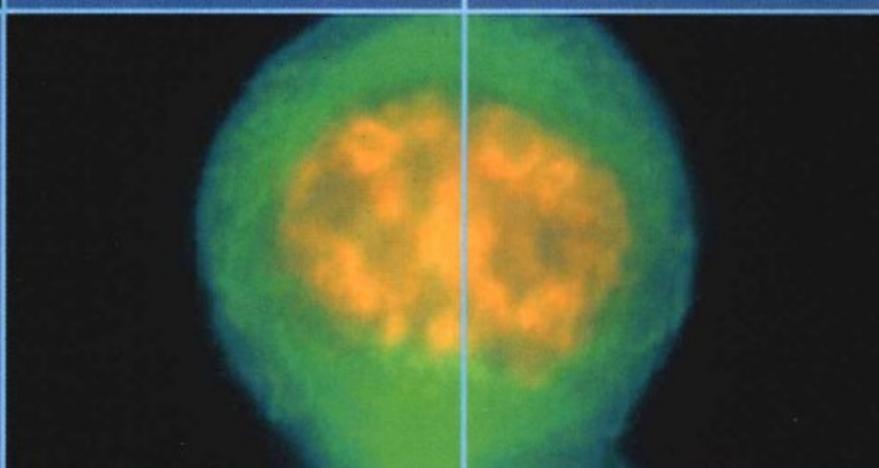
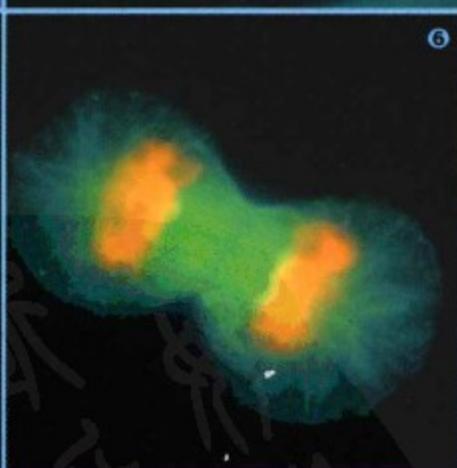
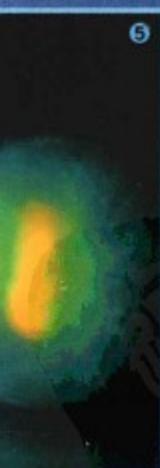
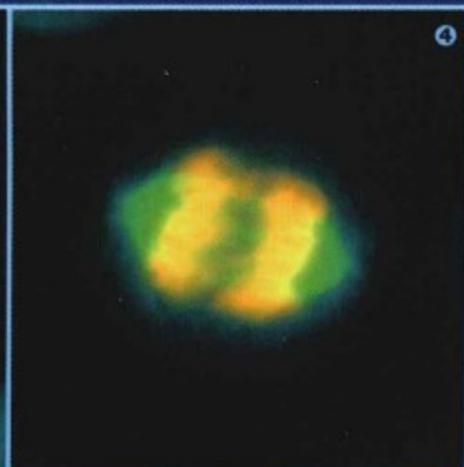
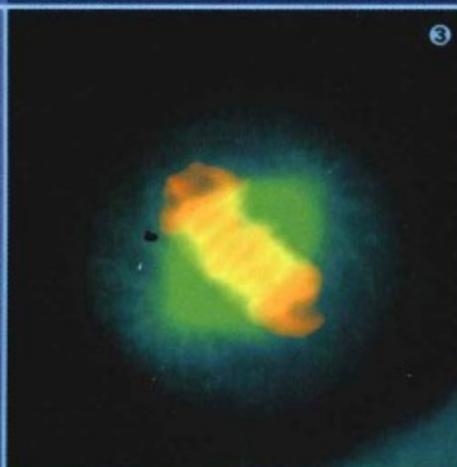
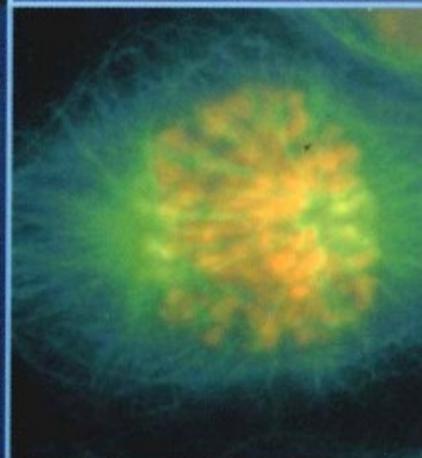
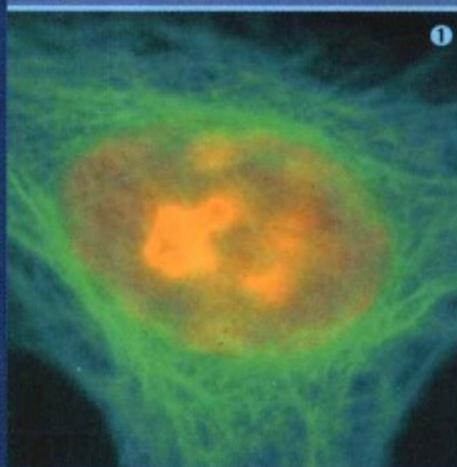


普通高等教育“十一五”国家级规划教材

主编 翟中和 王喜忠 丁明孝

# 细胞生物学

(第4版)



# Cell Biology

## 细胞生物学

(第4版)

- 第1版1998年获教育部科技进步一等奖，1999年获国家科技进步三等奖（著作类）。
- 第2版入选普通高等教育“九五”国家级重点教材和教育部“面向21世纪课程教材”，2002年获国家级优秀教材一等奖和国家级教学成果奖二等奖。
- 第3版入选普通高等教育“十一五”国家级规划教材和高等教育出版社“百门精品教材”，2009年获国家级教学成果奖二等奖。

### 数字课程网站

网 址：<http://res.hep.com.cn/32175>  
<http://res.hep.edu.cn/32175>

数字课程账号：

明码 8122 7313 8713 0891

密码 J2 9114 3866

使用说明详见书内数字课程说明页

ISBN 978-7-04-032175-3



9 787040 321753 >

定价 78.00 元



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

# 细胞生物学

## (第4版)

主 编 翟中和 王喜忠 丁明孝

编著者 (按姓氏笔画排序)

丁明孝 王喜忠 苏都莫日根

佟向军 邹方东 张传茂

陈丹英 陈建国 焦仁杰

翟中和

XIBAO SHENGWUXUE

 高等教育出版社·北京  
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING



## 内容提要

《细胞生物学》第4版是一本全彩色印刷、图文并茂的教材。全书共17章,内容包括细胞的统一性与多样性、细胞生物学研究方法、细胞质膜、物质的跨膜运输、线粒体、叶绿体、细胞质基质与内膜系统、蛋白质分选与膜泡运输、细胞信号转导、细胞骨架、细胞核与染色质、核糖体、细胞周期与细胞分裂、细胞增殖调控与癌细胞、细胞分化与胚胎发育、细胞死亡、细胞衰老、细胞的社会联系等。

本次修订以细胞重大生命活动为主线,以分子机制为视点,对教材结构体系进行了调整,由第3版的15章调整为17章,对全书约1/3的内容进行了修订、改写和补充。对基本概念、基础知识和基本理论进行了删繁就简,对学科发展前沿和研究新成果严谨引用、准确修正、及时更新,力争保持教材内容的基础性、科学性和前沿性。全书共有图片370余幅,其中照片120余幅,全部插图均为作者自主设计、绘制,全部照片源自作者科研成果或授权使用。

本书可供综合性大学、师范院校和农林、医学院校的本科生、研究生使用,也可供有关科研工作者参考。

## 图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学 / 翟中和, 王喜忠, 丁明孝主编. —4版.

北京: 高等教育出版社, 2011.6

ISBN 978-7-04-032175-3

I. ①细… II. ①翟… ②王… ③丁… III. ①细胞生物学—高等学校—教材 IV. ①Q2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第102738号

策划编辑 王莉 吴雪梅 责任编辑 孟丽 王莉 封面设计 王凌波  
版式设计 张楠 插图绘制 李刚 赵晓媛 责任印制 朱学忠

出版发行	高等教育出版社	网 址	<a href="http://www.hep.edu.cn">http://www.hep.edu.cn</a>
社 址	北京市西城区德外大街4号		<a href="http://www.hep.com.cn">http://www.hep.com.cn</a>
邮政编码	100120	网上订购	<a href="http://www.landraco.com">http://www.landraco.com</a>
印 刷	涿州市星河印刷有限公司		<a href="http://www.landraco.com.cn">http://www.landraco.com.cn</a>
开 本	889×1194 1/16	版 次	1995年1月第1版
印 张	25		2011年6月第4版
字 数	760 000	印 次	2011年6月第1次印刷
购书热线	010-58581118	定 价	78.00元
咨询电话	400-810-0598		

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换  
版权所有 侵权必究  
物料号 32175-00

细胞生物学既是生命科学的基础学科，也是前沿学科；细胞的研究既是生命科学的出发点，又是生命科学的汇聚点。审视学科发展现状，探索学科内在规律和发展趋势，可明显看出细胞生物学是当前生命科学中发展最快的领域之一。细胞生物学与分子生物学、发育生物学、神经科学等其他学科相互渗透与交融，研究的重点已明显转向细胞重大生命活动及其分子机制的探秘。生物学大师 Wilson 所预言的“一切生命的关键问题都要到细胞中去寻找答案”正在成为现实。

自 2007 年第 3 版《细胞生物学》教材问世以来，在国内 200 余所高校的使用过程中，我们得到了许多师生的关心、鼓励与厚爱，也收到一些学生和老师的意见与建议。我们衷心地感谢他们，因为这些鼓励和意见为我们第 4 版教材的修订起到重要的鞭策作用。第 4 版修订工作始于 2009 年春季，历时两年多时间，现即将与广大读者见面。在回首辛勤的付出与无私奉献的同时，我们略感欣慰的是，第 4 版《细胞生物学》教材在如下四个方面有不同程度的突破性进展。

(1) 鉴于细胞生物学研究的迅猛发展，对细胞重大生命活动及其分子机制的研究已渐成学科领域的重点。因而本次修订仍以细胞重大生命活动为主线，以分子机制为视点，对教材结构体系进行了调整，由第 3 版的 15 章 52 节调整为 17 章 51 节，对全书约 1/3 的内容进行了修订、改写和补充。对基本概念、基础知识和基本理论进行了删繁就简，对学科发展前沿和研究新成果，采取“化”而不是“贴”的办法，严谨引用、准确修正、注意更新，力图保持教材内容具有基础性、科学性和前沿性的特点；同时集成和升华细胞生物学国家精品课程建设、改革和研究成果，注意把握好拓宽知识、更新内容的分寸，以期使第 4 版修订教材更有助于增强学生的个性化学习与自学能力，调动学生的学习主动性而避免使学生不堪重负。

(2) “图文并茂”一直都是我们教材编者的追求目标，同时作为专业基础课教材也理应有“活泼”的面孔，可读性强。因此，编者在这方面花了很大工夫，全书共有图片 370 余幅，其中照片 120 余幅，全部插图均为自行设计或修改绘制，全部照片或由作者提供，或得到出版社授权或个人友情惠赠。第 4 版教材采用彩色印刷，希望通过我们辛勤而积极的努力，让第 4 版给读者一个崭新的面孔，增强教材的趣味性和可读性，有助于学生想象与理解复杂的细胞和分子过程，训练学生洞幽查微、抽象思维的能力。

(3) 作为生物类专业基础课教材应具有良好的教学适用性。“细胞生物学”是生物科学、生物技术、生物工程专业及农、林、医药类专业本科生一门必修的专业基础课。在现行教学计划中，细胞生物学理论课教学 3 学分，48~54 学时不等。根据细胞生物学课程的定位和教学基本要求，教材篇幅不宜过长。第 4 版教材篇幅共 17 章，76 万字。教材越编越厚不是良策，也无助于创新教育教学理念，实际上编厚容易，精简较难，作为教材应该考虑到教学适用性，内容上首先应该给学生一个基本知识范畴，同时引导他们关注前沿。我们认为，第 4 版《细胞生物学》教材的篇幅和内容，加之教师“少而精”地讲课，能较好地实现预定教学目标，而不会让学生望而生畏。

(4) 第 1 版《细胞生物学》(1995 年)曾获教育部科学技术进步奖一等奖(1998)、国家科学技术进步奖三等奖(著作类, 1999); 第 2 版《细胞生物学》(2000 年)是教育部推荐的“面向 21 世纪课程教材”，同时也是“九五”国家级重点教材，2002 年获国家级优秀教材一等奖和国家级教学成果奖二等奖；第 3 版《细胞生物学》是高等教育出版社“百门精品教材”，并得到教育部和国家自然科学基金委基础科学人才培养基金的资助，2009 年获北京市精品教材一等奖和国家级教学成果奖二

等奖，被国内 200 余所高等院校采用，成为国内生物类教材发行量大面广的教材之一。第 4 版的修订仍由北京大学和四川大学合作，编写团队老、中、青结合，队伍基本保持稳定，这是一个确保教材质量并不断延续的好班子，只是原编写“线粒体和叶绿体”一章的周青山教授由于年龄原因不再参编，改由北京大学苏都莫日根教授承担相应任务，这无疑给本书修订增添了新的活力。

第 4 版《细胞生物学》教材的编写与修订，旨在与国内出版的同类教材起到相得益彰的作用。然而，尽管我们付出极大努力，但细胞生物学是一门发展迅速的学科，知识结构在不断地拓展，许多概念与内容不断地更新，我们深感自己知识和能力有限，所以这版教材难免仍有错漏之处，敬请专家和读者指正。

在《细胞生物学》第 4 版教材即将与读者见面的时候，我们全体成员内心充满了感激之情。首先要感谢纽约大学医学院细胞生物学系孙同天教授和纽约大学医学院电镜室梁凤霞博士，他们极其热情地提供了许多帮助，为本版教材图片的征集付出了极大努力；同时还要特别感谢美国国立卫生研究院 Bechara Kachar 教授，纽约大学医学院孔祥鹏博士、任敏东博士、David Stokes 教授、周铭博士、Devrim Acehan 博士、Andrea Nans 博士，纽约大学医学院 Skirball 研究所王大能教授、Dan Littman 教授，瑞士巴塞尔（Basel）大学 Ueli Aebi 教授，华盛顿大学医学院 John Heuser 教授，H. Lee Moffitt 肿瘤研究所程锦全教授，*Molecular Cell* 杂志编辑部陈枫博士，得克萨斯大学 Potu N. Rao 教授、刘俊博士，威斯康星大学 Hans Ris 教授，日本东京大学医学院 Nobutaka Hirokawa 教授，德国乌尔姆（Ulm）大学 G. Klotz 教授等。以上各位朋友有些是友情惠赠照片、绘制图片，有些是帮助审订书稿，他们的友情支持和帮助为本书增色

和顺利出版起到了关键作用。

在本次修订过程中，也得到国内许多教授和专家的友情支持，他们为本书提供了不少珍贵的照片，或对本书某些章节进行认真地审订与修改。特别是浙江大学洪健教授为了提供高质量肌肉超微结构照片，为我们花了许多时间、不厌其烦地做了大量工作，直到满意为止，令我们十分感动。北京师范大学何大澄教授，复旦大学马红教授，浙江大学管敏鑫教授，中山大学张景强教授，同济大学祝建教授，第二军医大学杨勇骥教授，南开大学胡俊杰教授及其好友 Yoko Shibata，山东大学医学院李伯勤教授，中国农业大学袁明教授，东北师范大学黄百渠教授、曾宪录教授，中国科学院生物物理研究所李国红研究员，北京生命科学研究所以何万中研究员，清华大学俞立教授，北京大学赵进东教授、孙育杰研究员、程和平教授和杜立颖老师等，他们从不同方面为我们提供了友情帮助，这是本版教材顺利完成的重要保障。

最后，在本版教材修订过程中，责任编辑王莉女士、责任绘图李刚博士始终兢兢业业、精益求精、忘我付出，令本书编者深受感动；刘春香老师对本书稿件的收集整理和繁杂的联系工作给予了许多帮助；孟丽、赵晓媛、潘超编辑在图、文加工等方面给予了大力帮助。高等教育出版社生命科学与医学出版事业部林金安先生、吴雪梅女士给予了无私的帮助和指导；北京大学和四川大学生命科学学院对本书修订和顺利完稿给予许多保障性支持。对上述诸多方面的支持与帮助，我们深表诚挚谢意！

翟中和 王喜忠 丁明孝  
于 2011 年 4 月

<b>第一章 绪论</b> .....	<b>1</b>		
<b>第一节 细胞生物学研究的内容与现状</b> .....	<b>1</b>		
一、现代生命科学中的一门重要的基础前沿学科.....	1		
二、细胞生物学的主要研究内容.....	2		
<b>第二节 细胞学与细胞生物学发展简史</b> .....	<b>5</b>		
一、细胞的发现.....	5		
二、细胞学说的建立及其意义.....	5		
三、细胞学的经典时期.....	6		
四、实验细胞学与细胞学的分支及其发展.....	6		
五、细胞生物学学科的形成与发展.....	7		
思考题.....	9		
参考文献.....	9		
<b>第二章 细胞的统一性与多样性</b> .....	<b>10</b>		
<b>第一节 细胞的基本特征</b> .....	<b>10</b>		
一、细胞是生命活动的基本单位.....	10		
二、细胞的基本共性.....	11		
<b>第二节 原核细胞与古核细胞</b> .....	<b>12</b>		
一、原核细胞.....	12		
二、最小最简单的细胞——支原体.....	13		
三、原核细胞的两个代表类群——细菌和蓝藻.....	13		
四、古核细胞（古细菌）.....	17		
<b>第三节 真核细胞</b> .....	<b>19</b>		
一、真核细胞的基本结构体系.....	19		
二、细胞的大小及其影响因素.....	19		
三、原核细胞与真核细胞的比较.....	21		
四、植物细胞与动物细胞的比较.....	22		
<b>第四节 非细胞形态的生命体——病毒</b> .....	<b>23</b>		
一、病毒的基本知识.....	23		
二、病毒在细胞内增殖.....	26		
三、病毒与细胞在起源与进化中的关系.....	29		
思考题.....	29		
参考文献.....	29		
<b>第三章 细胞生物学研究方法</b> .....	<b>30</b>		
<b>第一节 细胞形态结构的观察方法</b> .....	<b>30</b>		
一、光学显微镜.....	30		
二、电子显微镜.....	34		
三、扫描隧道显微镜.....	38		
<b>第二节 细胞及其组分的分析方法</b> .....	<b>39</b>		
一、用超离心技术分离细胞组分.....	39		
二、细胞成分的细胞化学显示方法.....	40		
三、特异蛋白抗原的定位与定性.....	40		
四、细胞内特异核酸的定位与定性.....	41		
五、定量细胞化学分析与细胞分选技术.....	41		
<b>第三节 细胞培养与细胞工程</b> .....	<b>42</b>		
一、细胞培养.....	42		
二、细胞工程.....	43		
<b>第四节 细胞及生物大分子的动态变化</b> .....	<b>45</b>		
一、荧光漂白恢复技术.....	45		
二、单分子技术与细胞生命活动的研究.....	45		
三、酵母双杂交技术.....	46		
四、荧光共振能量转移技术.....	47		
五、放射自显影技术.....	48		
<b>第五节 模式生物与功能基因组的研究</b> .....	<b>48</b>		
一、细胞生物学研究常用的模式生物.....	48		
二、突变体制备技术.....	50		
三、蛋白质组学技术.....	51		
思考题.....	53		
参考文献.....	53		

<b>第四章 细胞质膜</b> .....	<b>54</b>	一、线粒体的基本形态及动态特征.....	85
<b>第一节 细胞质膜的结构模型与基本成分</b> .....	54	二、线粒体的超微结构.....	89
一、细胞质膜的结构模型.....	54	三、氧化磷酸化.....	90
二、膜脂.....	56	四、线粒体与疾病.....	94
三、膜蛋白.....	58	<b>第二节 叶绿体与光合作用</b> .....	94
<b>第二节 细胞质膜的基本特征与功能</b> .....	62	一、叶绿体的基本形态及动态特征.....	95
一、膜的流动性.....	62	二、叶绿体的超微结构.....	98
二、膜的不对称性.....	63	三、光合作用.....	100
三、细胞质膜相关的膜骨架.....	64	<b>第三节 线粒体和叶绿体的半自主性及其起源</b> .....	106
四、细胞质膜的基本功能.....	66	一、线粒体和叶绿体的半自主性.....	106
<b>思考题</b> .....	67	二、线粒体和叶绿体的起源.....	108
<b>参考文献</b> .....	67	<b>思考题</b> .....	110
<b>第五章 物质的跨膜运输</b> .....	<b>68</b>	<b>参考文献</b> .....	110
<b>第一节 膜转运蛋白与小分子物质的跨膜运输</b> .....	68	<b>图片版权说明</b> .....	111
一、脂双层的不透性和膜转运蛋白.....	68	<b>第七章 细胞质基质与内膜系统</b> .....	<b>112</b>
二、小分子物质的跨膜运输类型.....	70	<b>第一节 细胞质基质及其功能</b> .....	113
<b>第二节 ATP驱动泵与主动运输</b> .....	73	一、细胞质基质的含义.....	113
一、P型泵.....	74	二、细胞质基质的功能.....	114
二、V型质子泵和F型质子泵.....	76	<b>第二节 细胞内膜系统及其功能</b> .....	117
三、ABC超家族.....	77	一、内质网.....	117
四、离子跨膜转运与膜电位.....	78	二、高尔基体.....	125
<b>第三节 胞吞作用与胞吐作用</b> .....	79	三、溶酶体.....	130
一、胞吞作用的类型.....	79	四、过氧化物酶体.....	135
二、胞吞作用与细胞信号转导.....	83	<b>思考题</b> .....	137
三、胞吐作用.....	83	<b>参考文献</b> .....	137
<b>思考题</b> .....	84	<b>第八章 蛋白质分选与膜泡运输</b> .....	<b>138</b>
<b>参考文献</b> .....	84	<b>第一节 细胞内蛋白质的分选</b> .....	138
<b>第六章 线粒体和叶绿体</b> .....	<b>85</b>	一、信号假说与蛋白质分选信号.....	138
<b>第一节 线粒体与氧化磷酸化</b> .....	85	二、蛋白质分选转运的基本途径与类型.....	141

三、蛋白质向线粒体、叶绿体和过氧化物酶体的分选	141	四、Notch信号通路	187
第二节 细胞内膜泡运输	145	五、细胞表面整合蛋白介导的信号转导	188
一、膜泡运输概观	145	第六节 细胞信号转导的整合与控制	189
二、COP II包被膜泡的装配与运输	147	一、细胞的应答反应特征	189
三、COP I包被膜泡的装配与运输	148	二、蛋白激酶的网络整合信息	190
四、网格蛋白/接头蛋白包被膜泡的装配与运输	150	三、信号的控制:受体的脱敏与下调	191
五、转运膜泡与靶膜的锚定和融合	152	思考题	192
六、细胞结构体系的组装	153	参考文献	192
思考题	155	<b>第十章 细胞骨架</b>	<b>193</b>
参考文献	155	第一节 微丝与细胞运动	194
<b>第九章 细胞信号转导</b>	<b>156</b>	一、微丝的组成及其组装	194
第一节 细胞信号转导概述	156	二、微丝网络结构的调节与细胞运动	196
一、细胞通讯	156	三、肌球蛋白:依赖于微丝的分子马达	201
二、信号分子与受体	158	四、肌细胞的收缩运动	203
三、信号转导系统及其特性	161	第二节 微管及其功能	206
第二节 细胞内受体介导的信号传递	164	一、微管的结构组成与极性	206
一、细胞内核受体及其对基因表达的调节	164	二、微管的组装和去组装	207
二、NO作为气体信号分子进入靶细胞直接与酶结合	165	三、微管组织中心	209
第三节 G蛋白偶联受体介导的信号转导	165	四、微管的动力学性质	211
一、G蛋白偶联受体的结构与激活	166	五、微管结合蛋白对微管网络结构的调节	211
二、G蛋白偶联受体所介导的细胞信号通路	167	六、微管对细胞结构的组织作用	212
第四节 酶联受体介导的信号转导	176	七、细胞内依赖于微管的物质运输	213
一、受体酪氨酸激酶及RTK-Ras蛋白信号通路	176	八、纤毛和鞭毛的结构与功能	217
二、PI3K-PKB(Akt)信号通路	179	九、纺锤体和染色体运动	220
三、TGF- $\beta$ 受体及其TGF- $\beta$ -Smad信号通路	180	第三节 中间丝	221
四、细胞质因子受体与JAK-STAT信号通路	181	一、中间丝的主要类型和组成成分	222
第五节 其他细胞表面受体介导的信号通路	183	二、中间丝的组装与表达	223
一、Wnt- $\beta$ -catenin信号通路	183	三、中间丝与其他细胞结构的联系	224
二、Hedgehog受体介导的信号通路	185	思考题	226
三、NF- $\kappa$ B信号通路	186	参考文献	226

<b>第十一章 细胞核与染色质</b> .....	<b>227</b>	<b>第十二章 核糖体</b> .....	<b>262</b>
<b>第一节 核被膜</b> .....	228	<b>第一节 核糖体的类型与结构</b> .....	263
一、核膜.....	228	一、核糖体的基本类型与化学组成.....	263
二、核孔复合体.....	229	二、核糖体的结构.....	264
三、核纤层.....	233	三、核糖体蛋白质与rRNA的功能.....	265
<b>第二节 染色质</b> .....	234	<b>第二节 多核糖体与蛋白质的合成</b> .....	266
一、染色质DNA.....	235	一、多核糖体.....	266
二、染色质蛋白.....	237	二、蛋白质的合成.....	267
三、核小体.....	238	三、核糖体与RNA世界.....	270
四、染色质组装.....	239	<b>思考题</b> .....	271
五、染色质类型.....	241	<b>参考文献</b> .....	271
<b>第三节 染色质的复制与表达</b> .....	244	<b>第十三章 细胞周期与细胞分裂</b> .....	<b>273</b>
一、染色质的复制与修复.....	244	<b>第一节 细胞周期</b> .....	273
二、染色质的激活与失活.....	245	一、细胞周期概述.....	273
三、染色质与基因表达调控.....	248	二、细胞周期中各不同时相及其主要事件.....	275
四、染色质与表观遗传.....	251	三、细胞周期同步化.....	276
<b>第四节 染色体</b> .....	253	四、特殊的细胞周期.....	278
一、染色体的形态结构.....	253	<b>第二节 细胞分裂</b> .....	281
二、染色体的功能元件.....	255	一、有丝分裂.....	281
三、染色体带型.....	256	二、减数分裂.....	290
四、特殊染色体.....	257	<b>思考题</b> .....	297
<b>第五节 核仁与核体</b> .....	258	<b>参考文献</b> .....	298
一、核仁的结构.....	258	<b>第十四章 细胞增殖调控与癌细胞</b> .....	<b>299</b>
二、核仁的功能.....	259	<b>第一节 细胞增殖调控</b> .....	299
三、核仁的动态周期变化.....	259	一、MPF的发现及其作用.....	299
四、核体.....	260	二、p34 <sup>cdc2</sup> 激酶的发现及其与MPF的关系.....	301
<b>第六节 核基质</b> .....	260	三、周期蛋白.....	302
<b>思考题</b> .....	261		
<b>参考文献</b> .....	261		

四、CDK和CDK抑制因子	303	第二节 细胞衰老	356
五、细胞周期运转调控	304	一、细胞衰老的概念及特征	356
六、其他因素在细胞周期调控中的作用	310	二、细胞衰老的分子机制	357
第二节 癌细胞	310	三、细胞衰老与个体衰老的关系	359
一、癌细胞的基本特征	311	思考题	359
二、癌基因与抑癌基因	312	参考文献	360
三、肿瘤的发生是基因突变逐渐积累的结果	314	第十七章 细胞的社会联系	361
四、肿瘤干细胞	315	第一节 细胞连接	361
思考题	317	一、封闭连接	361
参考文献	317	二、锚定连接	362
第十五章 细胞分化与胚胎发育	318	三、通讯连接	363
第一节 细胞分化	319	第二节 细胞黏着及其分子基础	367
一、细胞分化的基本概念	319	一、钙黏蛋白	368
二、细胞的全能性与多能干细胞	321	二、选择素	369
三、影响细胞分化的因素	324	三、免疫球蛋白超家族	370
第二节 胚胎发育中的细胞分化	327	四、整联蛋白	371
一、生殖细胞的分化	327	第三节 细胞外基质	372
二、早期胚胎发育过程中的细胞分化	333	一、胶原	372
三、果蝇胚胎早期发育中的细胞分化	338	二、弹性蛋白	374
思考题	339	三、糖胺聚糖和蛋白聚糖	375
参考文献	340	四、纤连蛋白和层粘连蛋白	376
第十六章 细胞死亡与细胞衰老	341	五、基膜与细胞外被	377
第一节 细胞死亡	341	六、植物细胞壁	378
一、细胞凋亡	341	思考题	379
二、细胞坏死	352	参考文献	380
三、自噬性细胞死亡	353	附录 细胞生物学相关领域诺贝尔奖获奖情况	381
四、植物细胞与酵母细胞的程序性死亡	354	索引	383

# 绪论

## 第一节 细胞生物学研究的内容与现状

### 一、现代生命科学中的一门重要的基础前沿学科

细胞生物学是研究和揭示细胞基本生命活动规律的科学，它从显微、亚显微与分子水平上研究细胞结构与功能，细胞增殖、分化、代谢、运动、衰老、死亡，以及细胞信号转导，细胞基因表达与调控，细胞起源与进化等重大生命过程。细胞工程及其相关的组织工程和再生医学是 21 世纪生物工程发展的重要组成部分。可以看到，细胞的结构与功能、细胞重大生命活动及其分子机制的研究日趋深入，已经成为 21 世纪生命科学研究的重要领域，并以空前的广度和深度，直接和强有力地影响和改变人类的生活。这种趋势在长时间内仍将继续。

无论是单细胞的有机体还是多细胞的有机体，生命体都显现出多层次、非线性的复杂体系的性质，是高度动态的耗散性的结构体系，而细胞是生命体结构与功能的基本单位，有了细胞才有完整生命活动。所以毫不奇怪，细胞是生命活动的枢纽层次，细胞生物学成为生

命科学的枢纽学科和前沿学科。细胞的研究既是生命科学的出发点，又是生命科学微观和宏观研究的汇聚点，也因之成为当前生命科学中发展最快的领域之一。早在 1925 年，生物学大师 Wilson 就提出“一切生命的关键问题都要到细胞中去寻找答案”。重温这句名言，至今仍感内涵深刻。

生物的生殖发育、遗传、神经（脑）活动等重大生命现象的研究都要以细胞为基础。多细胞生物的生长发育是依靠细胞增殖、细胞分化与细胞凋亡来实现的。人脑的复杂活动是靠  $10^{12}$  个神经细胞相互协调整合完成的。一切疾病发病机制也是以细胞病变为基础。以基因工程和蛋白质工程为核心的现代生物技术主要是以细胞操作为基础而进行的。因此，细胞生物学与农业、医学、生物技术的发展有密不可分的关系，它将在解决人类面临的重大问题、促进经济和社会发展中发挥重要的作用。

由于分子生物学概念、方法与技术的引入，细胞生物学在近 30 年取得了突破性的进展，产生了许多新的生长点，并逐渐形成新的概念与新的学科方向。很多科学家认为，在 21 世纪，细胞生物学将继续迅猛发展，成为揭示生命奥秘不可缺少的“主角”。然而，细胞生命活动过程是如何有序且自我调控的机制还远未清楚，生物大分子如何逐级有序地组装成行使生命活动的细胞基本结构体系也相当朦胧。因此，细胞生物学的研究势必影响 21 世纪生命科学的整体发展。

概括地说，细胞生物学的学科范畴，就是应用现代物理学与化学的技术成就和分子生物学的概念与方法，

研究细胞的结构、功能和细胞生命活动的学科。侧重从细胞作为生命活动的基本单位的思维为出发点，探索并揭示生命活动规律。应当指出，细胞生物学是一门迅速发展的前沿学科，其研究内容与范畴往往与生命科学的其他学科特别是分子生物学交错在一起，甚至目前很难为细胞生物学划出一个明确的范围。

当前细胞生物学的课题归纳起来包括 3 个根本性的问题：

(1) 基因组是如何在时间与空间上有序表达的？与体外实验不同，在细胞内环境中基因表达程序受到严格的调节与控制，其调控网络的复杂性是迄今任何超级计算机都无法比拟的。这也正是细胞作为生物体结构与功能基本单位的奥妙所在。

(2) 基因表达的产物是如何逐级组装成能行使生命活动的基本结构体系及各种细胞器的？这种自组装过程的调控程序与调控机制是什么？这又是一个极富挑战性的研究领域。它应是结构生物学和新兴的纳米生物学研究的重要组成部分，很多生命活动的本质问题可能在这里找到答案。

(3) 基因及其表达的产物，特别是各种信号分子与活性因子，是如何调节诸如细胞的增殖、分化、衰老与凋亡等细胞最重要的生命活动过程的？这些问题不仅涉及细胞生物学中诸多的核心问题，而且与人类的健康和生产实践密切相关。

细胞生物学与分子生物学相互渗透与交融是总的发展趋势。无论是对细胞结构与功能的深入研究，还是对细胞重大生命活动规律的探索，都需要采用分子生物学的新概念与新方法，在分子水平上进行研究。换句话说，细胞分子生物学或分子细胞生物学将是今后相当一段时间的主流学科方向。

## 二、细胞生物学的主要研究内容

细胞生物学研究与教学内容一般可分为细胞结构与功能和细胞重要生命活动两大基本部分，但它们又是不可割裂的。从 20 世纪 50 年代开始，细胞超微结构研究积累的大量资料，大大充实与拓宽了细胞结构与功能的知识范畴，反映在细胞生物学教科书中，与细胞结构和功能相关的知识占较大比重。从 70 年代中期开始，由于分子生物学概念、内容与方法的引入，细胞生物学面貌发生了深刻的变化，不仅使细胞结构和功能的研究更为深入，对细胞重大生命活动规律及其调

控机制的研究也取得了巨大进展，极大地丰富并更新了细胞生物学的知识结构。因此，现代细胞生物学教科书中细胞生命活动及其分子机制的相关知识所占比例也越来越大。

当前细胞生物学的研究内容大致可归纳为以下 10 个方面：

### (一) 生物膜与细胞器

生物膜是细胞重要的结构基础，细胞质膜出现之后，才有了真正意义上的生命体。包括细胞核在内的绝大部分细胞器也是以生物膜为基础构建而成的。近 10 年来，人们发现哺乳动物细胞基因组中约 1/3 的基因是用来编码膜蛋白的，其种类之多超乎人们的想象。由此，了解膜蛋白在物质的跨膜运输，信息跨膜传递，能量转换和细胞识别等诸多过程中的功能，以及解析膜蛋白的结构，特别是膜蛋白的三维结构等成为研究的热点并取得了巨大进展，发展成为膜生物学。磷脂双分子层与膜蛋白的相互关系依然是研究生物膜结构与功能的重要内容，生物膜的脂筏模型 (lipid raft model) 就是这方面研究的重要成果之一。

细胞器的研究历来是认识细胞结构与功能的重要组成部分。线粒体与叶绿体结构与换能机制的研究日益深入，线粒体与叶绿体半自主性的研究及其在细胞中的动态变化，使人们对这两种细胞器有了新的认识。近年对内质网、高尔基体与溶酶体在结构与功能上的相互关联特别是膜蛋白和分泌性蛋白的合成、加工与分选，细胞内膜泡类型及其运输机理等方面的知识也不断更新。

### (二) 细胞信号转导

细胞信号的识别与跨膜转导的研究涉及生命科学中的许多重要问题，它已成为了解错综复杂的生命现象的主要切入点，并成为生命科学多领域、多层次联系的纽带。细胞信号转导的研究对了解细胞基本生命活动的分子机制和揭示生命的本质有重要的理论意义。

当前细胞信号转导研究的基本内容是：① 细胞间信号传递：重点是信号分子与受体相互作用的机制。② 受体与信号跨膜转导：G 蛋白及一系列受体的发现与深入的研究，使受体作为转换器的概念及对其结构与功能的认识更加具体化。③ 细胞内信号传递途径与网络调控，其中包括在不同细胞中的多种生物学效应。

应该指出，细胞信号转导是通过复杂的信号转导网络系统而实现的，呈现高度的非线性关系，具有发散、

收敛和交叉对话的网络特征，而不是单一的或简单的信息叠加。细胞信号转导的基础是蛋白质与蛋白质之间的复杂的相互作用。因此，在相当长的一段时间里，细胞信号转导通路及其调控网络的研究将依然是细胞生物学乃至生命科学研究的热点。

### （三）细胞骨架体系

细胞骨架体系作为一类特殊的连续相的细胞器，在细胞生物学中是一个重要的研究领域。广义的细胞骨架概念应该包括细胞质骨架与核骨架两大部分。

细胞骨架体系的研究愈来愈受到重视，因为细胞骨架除了在细胞运动、维持细胞形态及保持细胞内部结构的合理布局中起主要作用之外，其还与一系列重要生命活动，诸如细胞内大分子的运输与细胞器的运动、细胞信息的传递、基因表达与生物大分子加工等有密切关系。同时也是细胞内蛋白质机器自组装以执行特定细胞功能的典型范例。因此，研究细胞骨架纤维自身的成分、结构，在执行不同功能中的动态变化，特别是细胞骨架的结合蛋白与调控蛋白的功能等就成为人们重点关注的问题。核骨架包括核基质、核纤层等，目前虽然对核基质还不甚明了，但实验表明核骨架不仅参与染色体的构建，而且与基因表达关系密切。

### （四）细胞核、染色体及基因表达

细胞核是遗传物质 DNA 储存与复制的场所，也是 RNA 转录与加工的场所。染色质（染色体）是遗传物质的载体，核仁是转录 rRNA 以及组装核糖体亚单位的具体部位，核孔复合体是核质之间物质交换与信息交流的门控通路。细胞核与染色体历来是经典细胞学研究的重点，也是细胞遗传学的核心部分。而现代细胞生物学的核心课题之一就是研究染色体结构动态变化与基因表达及其调控的关系，它是目前细胞生物学、遗传学与发育生物学在细胞水平与分子水平上相结合的最活跃的热门课题，也是后基因组时代生命科学主要的研究内容之一。

近年来染色体的概念有很大的改变。染色体是由一条巨大的 DNA 分子与其结合蛋白形成的动态复合结构。染色质和染色体分别代表间期和分裂期细胞的不同存在状态，两者在细胞周期中交替与转换。DNA 是遗传密码的分子载体，蛋白质是调节 DNA 复制与转录活性并参与染色体构建的组分。DNA 结合蛋白可分为组蛋白与非组蛋白，它们在染色体高层次构建中的作用，特别

是在 DNA 复制、基因组有序表达过程中的作用及动态结构变化是目前所研究的核心问题。同时，DNA 分子甲基化与组蛋白的修饰在基因表达调控中的作用，即表观遗传学的研究也越来越受到人们的关注。

### （五）细胞增殖及其调控

一切动植物的生长与发育都是通过细胞的增殖与分化来实现的。研究细胞增殖的基本规律及其调控机制，不仅是了解生物生长与发育的基础，而且是研究细胞癌变及逆转的重要途径。目前研究细胞增殖的调控主要从两方面进行：一是从环境中和有机体中寻找控制细胞增殖的因子，并阐明它们的作用机制。各种生长因子的发现及其作用机制的揭示是这一领域中重要的进展。二是深入研究控制细胞周期进程的主要检验点相关的周期蛋白与依赖于周期蛋白的激酶的调控机理，其中包括多种调控因子的协同作用，以及蛋白质磷酸化和泛素依赖性的蛋白酶体降解途径对调控因子活性的影响。细胞的癌基因与抑癌基因的产物往往是细胞增殖调控中重要的调控因子，也是深入了解肿瘤发生机制和探索肿瘤治疗的重要途径。

### （六）细胞分化及干细胞生物学

细胞分化是生物发育的基础，细胞分化的实质在于信号介导下由组合调控引发的组织特异性基因的表达。细胞分化问题是细胞生物学、发育生物学与遗传学的重要汇合点。

一个受精卵通过分裂与分化如何发育为复杂的有机体，是生命科学中引人入胜的课题之一。近年来，哺乳动物克隆技术的建立，人胚胎干细胞的体外建系，在体外将体细胞诱导成为诱导多能干细胞（induced pluripotent stem cell, iPS cell）的成功，以及在此基础上进行的胚胎干细胞定向分化为各种细胞类型的研究和体细胞“去分化”即重编程的研究，使人们对细胞分化机理的了解达到了前所未有的深度。由此产生了干细胞生物学，并开辟了“再生医学”这一新的生物医学领域。

目前，细胞分化及干细胞生物学的研究集中在细胞定向分化的调控机制、干细胞的基本生物学属性、细胞所处的微环境对干细胞及其分化的影响，以及与组织工程和再生医学相关的一些问题。与此同时，人们也提出了关于肿瘤干细胞的理念并且进行了相应的基础与应用方面的探索。

## (七) 细胞死亡

对于多细胞生物个体,细胞的死亡在整个生物体的正常生长发育、自稳态的维持、免疫耐受的形成、肿瘤监控等过程中均发挥重要作用,其重要性不亚于细胞的增殖。因此,近20年来对细胞死亡的研究已成为生命科学中发展起来的热点课题之一。细胞死亡的方式包括细胞凋亡、坏死和自噬性细胞死亡等。细胞死亡往往受到细胞内由遗传机制决定的“死亡程序”控制,需要特定的基因表达,是“主动”而非“被动”的过程,所以这一类细胞死亡常常被称为凋亡或程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),它在细胞增殖、分化及多种生理、病理过程中具有重要作用。另一方面,细胞凋亡能力的丧失也是致癌的重要因素。人们已经通过促进细胞凋亡来为癌症治疗提供依据及手段。

当前,对细胞死亡过程分子机制的解析和调控机理的研究及其生物学意义的阐述,依然是该领域研究的主要内容。植物细胞与单细胞生物有无类似动物细胞的凋亡现象仍是一个值得探索的问题。

## (八) 细胞衰老

细胞衰老的研究是研究人与动植物寿命的基础。细胞的衰老与有机体的衰老是两个相关但又不同的概念。随着人口的老龄化和老年性疾病的增多,细胞衰老的研究将成为21世纪的热门课题之一。

目前多数科学家是以体外培养细胞为模型来研究细胞衰老的规律。大量实验说明,动物二倍体细胞在体外分裂与传代的次数是有限的,从而推测体内细胞的寿命也会受分裂次数的限制。围绕复制性衰老和胁迫诱导性衰老的机制,人们已经提出诸如端粒衰老学说和氧化损伤学说等理论,但体内细胞衰老的机制仍所知甚少。近年人们力图寻找细胞中的“衰老基因”及相关信号转导途径,而细胞与个体衰老之间的关系还是一个更深的谜。

## (九) 细胞工程

细胞工程是细胞生物学与发育生物学和遗传学的交叉领域,也是生物工程的重要组成部分。它不仅对工农牧业和医学实践有重要意义,而且也是认识生命活动规律的一条重要途径。

细胞工程是用人工方法使不同细胞的基因或基因组重组形成杂交细胞,或者将基因或基因组由一种细胞转移到另一种细胞中,使之跨越种间障碍,产生新的遗传

性状。动植物体细胞杂交实验曾是细胞工程非常活跃的领域。通过动物体细胞杂交而获得单克隆抗体技术的建立,是细胞工程中最富创造性的工作范例。目前在世界范围内兴起的用哺乳动物体细胞克隆而获得无性繁殖的胚胎与个体,是细胞工程中引人瞩目的进展之一。人胚胎干细胞系的建立与体外定向分化研究的快速进展,又为实施细胞工程中“干细胞工程”这一个新领域的研究打下基础。

## (十) 细胞的起源与进化

细胞起源与进化的研究是重要的理论问题,也是一个难度很大的研究课题。先驱们在这一领域虽然积累了丰富的研究成果,但距离问题的解决仍有相当大的距离。

根据古微生物的证据,原始细胞大约在35亿到38亿年前就在地球上出现。生命的物质只有当其以细胞形式出现时才能稳定地在地球上存活下去,但是这个进程已成为历史,在现在实验室条件下模拟30多亿年前的地球环境,研究细胞的起源过程几乎是不大可能的。目前有关细胞起源学说在很大程度上是推理性的,还需要补充更多的事实证据。

关于真核细胞的起源与进化研究已取得了较多的成果,近年来分子生物学方法的引入,为细胞进化与细胞器演化的研究增添了很多新的内容。但限于篇幅和资料等原因,本书没有专章撰写。

应当指出,上述诸领域与课题尚不能完全概括细胞基本生命活动的所有重大问题。诸如细胞社会学、免疫细胞生物学、神经细胞生物学以及肿瘤细胞生物学等都是对细胞基本生命活动规律认识的重要内容。

十几年前,美国国立卫生研究院(NIH)发表的一份题为《什么是当今科研领域的热门话题?》(*What is popular in research today?*)的调查报告(1998)中指出,目前全球最热门的研究方向是:①细胞周期调控(cell cycle control),②细胞凋亡(cell apoptosis),③细胞衰老(cellular senescence),④信号转导(signal transduction)和⑤DNA的损伤修复(DNA damage and repair)。2004年,NIH提出的生物医学发展规划中,更是把细胞信号转导网络作为今后10年研究的主要内容,而细胞信号转导是了解细胞增殖、分化、凋亡、衰老及细胞代谢活动的调控机制的重要基础。

由于细胞是生命活动的基本单位,又是生命的缩影,它不仅体现了生命的多样性和统一性,更体现了生

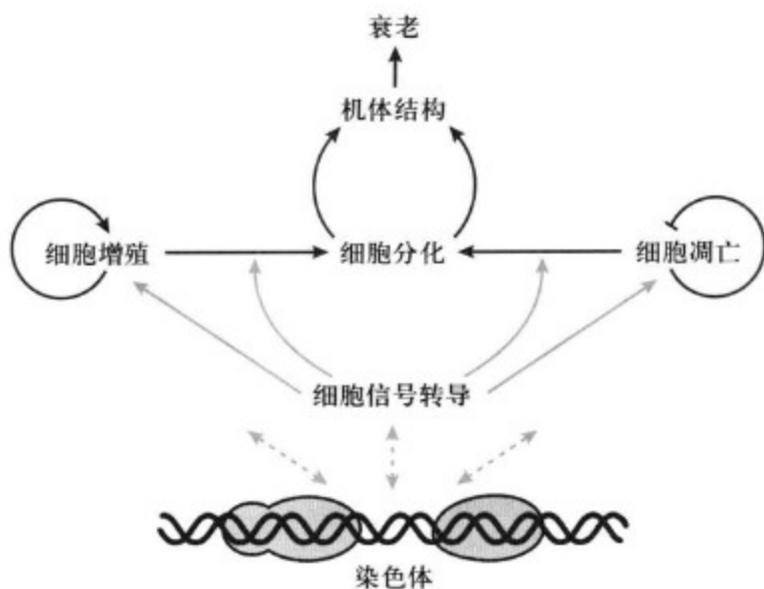


图 1-1 细胞重大生命活动及其相互关系示意图

命的复杂性。显然，我们对细胞重大生命活动的认识，必须建立在新思维的基础上，着力探索它们彼此之间的关系，以及这些重大生命活动与求解人类所面临的诸多问题之间的关系。为此，我们给出有关细胞重大生命活动及其相互关系的图示（图 1-1），可能有助于思考和研究这些问题。

## 第二节 细胞学与细胞生物学发展简史

现在许多科学家认为，可以把生物科学的发展划分为 3 个阶段：① 19 世纪以及更早的时期，是以形态描述为主的生物科学时期；② 20 世纪的前半个世纪，主要是实验生物学时期；③ 20 世纪 50 年代以来，由于 DNA 双螺旋结构的发现与中心法则的确立，开始进入了精细定性与定量的现代生物学时期。细胞学的发展史和细胞生物学学科建立与发展，大致是符合这一历史进程的。

细胞生物学的发展已远非经典细胞学可以比拟，但遵循科学发展的规律，我们仍有必要重温一下细胞学与细胞生物学的发展简史，这将有助于我们了解细胞生物学学科形成的历史条件及发展趋势。

### 一、细胞的发现

英国学者胡克（Robert Hooke）于 1665 年用自制

的显微镜（放大倍数为 40~140 倍），观察了软木（栎树皮）的薄片，第一次描述了植物细胞的构造，并首次借用拉丁文 *cellar*（小室）这个词，来描述他所看到的类似蜂巢状结构（实际上只是观察到纤维质的细胞壁）。后来英文用 *cell* 这个词，中文译为“细胞”。胡克有关细胞的首次描述，出现在他 1665 年发表的著作《显微图谱》中。因此，人们也就认为细胞是在 1665 年由胡克发现的。

此后不久，荷兰学者列文虎克（Antony van Leeuwenhoek）用设计更好的显微镜，观察了许多动植物的活细胞与原生动动物，并于 1674 年在观察鱼的红细胞时描述了细胞核的结构。在同一时期，意大利的 M. Malpighi 与英国的 N. Grew 注意到了植物细胞中细胞壁与细胞质的区别。此后对细胞观察的资料虽然不断增加，但是在长达 170 多年的历史中，对细胞的认识及其与有机体的关系，人们并没有进行科学的概括，也没有上升到具有普遍指导意义的理论高度。

### 二、细胞学说的建立及其意义

1838 年，德国植物学家施莱登（M. J. Schleiden）发表了《植物发生论》，指出细胞是构成植物的基本单位。1839 年，德国动物学家施旺（T. Schwann）发表了《关于动植物的结构和生长的一致性的显微研究》论文，指出动植物都是细胞的集合物。施旺和施莱登两人共同提出：一切植物、动物都是由细胞组成的，细胞是一切动植物的基本单位，这就是著名的“细胞学说”（cell theory）。细胞学说对细胞及其功能有了一个较为明确的定义，细胞学说的建立对现代生物学的发展具有重要的意义。恩格斯把细胞学说、能量转化与守恒定律和达尔文进化论并列为 19 世纪自然科学的“三大发现”。进化论解释了生物的多样性，而细胞学说提出了生物同一性的细胞学基础，因而大大推进了人类对整个自然界的认识，有力地促进了自然科学和哲学的进步。

当时“细胞学说”的基本内容是：① 细胞是有机体，一切动植物都是由细胞发育而来，并由细胞和细胞产物所构成。② 每个细胞作为一个相对独立的单位，既有它“自己的”生命，又对与其他细胞共同组成的整体的生命有所助益。③ 新的细胞可以通过已存在的细胞繁殖产生。除此以外，施莱登还认识到了细胞核作用的重要性。施旺曾经指出：细胞现象有两类，一类是“造型现象”，另一类是“生理现象”，并首次称后者为“代谢过程”。这说

明他已经正确地估计到细胞不仅是构成单位，而且是功能单位。施旺还提出了机体的各类组织（骨骼、血液、肌肉等）之间以细胞类型及其相互关系为基础的区别。

“细胞学说”提出后的十几年中，迅速推广到许多领域的研究，对当时生物学的发展起了巨大的促进和指导作用。这一学说本身也迅速得到充实、发展而日臻完善。如 Sichel 等通过对原生动物的研究证明，不仅动植物，而且原生动物也是由细胞组成的，它就是只含一个细胞的动物，它能独立地进行全部生命活动。Albert Kolliker 通过对胚胎学的研究，证明了生物个体发育的过程就是细胞不断繁殖和分化的连续过程，而施莱登和施旺在不少细节上的谬误则被纠正。如施莱登曾认为，细胞的繁殖是新细胞在老细胞的核中产生，通过细胞崩解而完成的。这种看法到 1840 年即被一系列学者的研究所修正，认识到细胞的繁殖是通过某种形式的“分裂”而完成的，尤其是德国医生和病理学家魏尔肖（Rudolf Virchow）1858 年指出，“细胞只能来自细胞”，“正如动物只能来自动物，植物只能来自植物一样”。此外，他还提出有机体的一切病理表现都是基于细胞的损伤。魏尔肖关于细胞来自细胞的观点，进一步指明了细胞作为一个相对独立的生命活动基本单位的性质，通常被认为是对细胞学说的一个重要补充。因此，有些人建议细胞学说应当是在 1858 年才最后完成的。

细胞学说的提出对生物科学的发展具有重大的意义。恩格斯说：“有了这个发现，有机的有生命的自然产物的研究——比较解剖学、生理学和胚胎学——才获得了巩固的基础”。人们通常称 1838—1839 年施旺和施莱登确立的细胞学说、1859 年达尔文确立的进化论和 1866 年孟德尔确立的遗传学为现代生物学的三大基石。实际上，可以说细胞学说又是后两者的“基石”。对细胞结构与功能的了解是对生物学、医学及其各个分支进一步发展所不可缺少的。

### 三、细胞学的经典时期

细胞学说建立后，很自然地掀起了对多种细胞进行广泛的观察与描述的高潮，各种细胞器和细胞分裂活动相继被发现，构成了细胞学的经典时期，主要是指 19 世纪的最后 25 年。

#### （一）原生质理论的提出

1840 年普金耶（J. E. Pukinje）和 1846 年冯·莫尔

（H. von Mohl）首次将动物和植物细胞内的均匀、有弹性的胶状物质称为“原生质”（protoplasm）。1861 年，舒尔策（Max Schultze）提出了原生质理论，认为组成有机体的基本单位是一小团原生质，这种物质在各种有机体中是相似的。1880 年，Hanstein 提出“原生质体”（protoplast）概念，因此细胞的概念进一步演绎成具有生命活性的一小团原生质。protoplast 显然比 cell（小室）对细胞的理解更为确切，但由于 cell 一词已经通行，所以就沿用下来。然而，这一重要的基本概念的深化，极大促进了人们对细胞研究的进程。

#### （二）细胞分裂的研究

1841 年 R. Remak 发现鸡胚血细胞的直接分裂，其后 W. Flemming 在动物细胞中，E. Strasburger 在植物细胞中发现有丝分裂（mitosis），并证实有丝分裂的实质是核内丝状物（染色体）的形成及其向两个子细胞的平均分配。E. van Beneden（1883 年）和 Strasburger（1886 年）分别在动物与植物细胞中发现减数分裂，至此已发现了细胞分裂的主要类型。

#### （三）细胞器的发现

这一时期，随着显微镜技术的重大进步，显微镜的分辨能力大为提高，并发明了石蜡切片方法和各种染色方法，继而各种细胞器相继被发现。如 1883 年 van Beneden 和 T. Boveri 发现中心体，1894 年 R. Altmann 发现线粒体，1898 年 C. Golgi 发现了高尔基体。

由于上述一系列重要的发现，使人们对细胞的认识大大丰富起来。这一时期的研究方法，主要还是显微镜下形态学的观察与描述。

### 四、实验细胞学与细胞学的分支及其发展

1876 年，O. Hertwig 发现受精后两个细胞核合并的现象。1892 年在《细胞和组织》一书中，他提出生物学的基础在于研究细胞的特性、结构和机能，以细胞为基础，对所有生物学现象进行归纳与综合，从而使细胞学成为生物科学的一个独立分支。同时，由于他采用实验方法研究海胆和蛔虫卵发育中的核质关系，实际上创立了实验细胞学。此后，人们广泛应用实验的手段与分析的方法来研究细胞学中的一些重要问题，为细胞学的研究开辟了一些新的领域，并与生物学其他领域相结合，形成了一些重要的分支学科。特别是在后期，由于组织

与细胞体外培养技术的建立与应用,使实验细胞学得到迅速的发展。

### (一) 细胞遗传学

1876年 Hertwig 发现了动物的受精现象。1883年 van Beneden 发现了蛔虫的卵和精子的染色体只有体细胞的一半。1888年 E. A. Strasburger、1893年 Overton 等在植物体中也发现受精现象,并证明生殖细胞的染色体数是体细胞的一半。1900年,孟德尔(G. Mendel)在34年前发现的遗传法则被重新提出。1905年 E. B. Wilson 发现性别与染色体的关系,魏斯曼(Weissman)推测遗传单位有序地排列在染色体上。在这些研究的基础上,德国的 T. Boveri 同美国的 W. Sutton 不谋而合地提出遗传的染色体学说,把染色体的行为同孟德尔的遗传因子联系起来。1910年,摩尔根(T. H. Morgan)做了大量的实验遗传学工作,证明基因是决定遗传性状的基本单位,而且直线排列在染色体上。1926年《基因论》一书出版,从而建立了基因学说。上述的工作使细胞学与遗传学结合起来,奠定了细胞遗传学的基础。

细胞遗传学主要从细胞学角度,特别是从染色体的结构和功能,以及染色体和其他细胞器的关系来研究遗传现象,阐明遗传和变异的机制。其核心就是染色体-基因学说。直至现代生物学的崛起,特别是细胞生物学与分子遗传学学科的建立,细胞遗传学的研究始终沿着染色体结构与基因关系这一主题前进。但染色体和基因的概念与研究内容已发生了根本的变化,基因在染色体上的定位、人工染色体与染色体工程、基因的人工诱变与点突变、基因打靶(gene targeting)与显性负效应(dominant negative effect)突变等层出不穷的技术的发展,可以认为已把细胞遗传学的研究推向新的高峰。染色体结构功能与基因表达关系的研究,在今后相当长时间仍是细胞遗传学乃至整个生命科学研究的主题。

### (二) 细胞生理学的研究

19世纪末叶以来,对活细胞的变形运动、细胞质流动、纤毛与鞭毛运动和肌肉收缩等方面进行了研究。随着生理学技术的发展,在细胞膜及其通透性、细胞的应激性与神经传导等方面开展了大量研究。

1909年, R. Harrison 和 A. Carrel 创立了组织培养技术,为研究细胞生理学开辟了一条重要途径。1943年, A. Claude 用高速离心机从活细胞内把核和各种细胞器,

如线粒体、叶绿体分离出来,在体外研究它们的生理活性,这对研究细胞器的功能和化学组成,以及酶在各细胞器中的定位等起了很大的作用。

细胞生理学的主要研究内容是:细胞对其周围环境的反应,细胞生长与繁殖的机制,细胞从环境中摄取营养的能力,细胞的兴奋性、收缩性、分泌性,生物膜的主动运输和能量传递与生物电等。随着现代生物学的快速发展,细胞生理学这一分支学科似乎在逐渐淡化。但其研究内容却不断延伸,如物质跨膜运输、信号跨膜转导等已成为当前细胞生物学的重点。因此,也可认为这是细胞生理学研究与其他学科交融发展的结果。

### (三) 细胞化学

早期对生物体化学成分和基本生化反应的研究,是脱离细胞的形态结构进行的。1924年, R. Feulgen 等首先建立了对细胞内脱氧核糖核酸(DNA)特异性的定性检测方法,这就是众所周知的福尔根反应(Feulgen reaction)。此后,1940年 J. Brachet 用甲基绿-派洛宁染色方法来测定细胞中的DNA与RNA, T. Casperson 用紫外显微分光光度法测定DNA在细胞中的含量。细胞组分分离技术、放射自显影技术和超微量分析等方法的广泛运用,对细胞内核酸与蛋白质的代谢研究也有很大的促进作用。细胞化学这一分支学科一直保持着强劲的发展趋势,由显微分光光度法到流式细胞术,由福尔根反应到核酸分子原位杂交技术,由免疫荧光技术到激光扫描共聚焦显微技术等,使人们对细胞成分,特别是核酸与蛋白质的定性、定位、定量以及动态变化研究达到前所未有的精确性与专一性。

上述实验细胞学分支学科并没有停步不前,其内容与内涵也在不断发展与演变,直至现在依然还是细胞生物学的重要组成部分。

## 五、细胞生物学学科的形成与发展

20世纪50年代以来,随着电子显微镜超薄切片技术的发展,在人们眼前呈现出一个崭新的细胞微观世界——细胞超微结构,不仅已知的细胞结构,诸如线粒体、高尔基体、细胞膜、核膜、核仁、染色质与染色体等结构以新的面貌展现在人们的面前,而且还发现了一些新的重要的细胞结构,如内质网、核糖体、溶酶体、核孔复合体与细胞骨架体系等,从而为细胞生物学学科早期的形成奠定了基础。那么,这些精细的细胞结构是

怎样组成的？确切的功能是什么？它们又是如何相互协同作用，完成各种复杂的代谢活动和生命过程呢？这些问题仅靠超微形态学的研究是难于回答的。1953年 J. Watson 和 F. Crick 发现了 DNA 分子双螺旋结构，随后，又提出了遗传中心法则，标志着分子生物学这一新兴学科的问世。正是由于分子生物学概念与技术的引入，分子生物学、生物化学、遗传学等学科与细胞学之间相互渗透与结合，使人们对细胞结构与功能的研究水平达到了新的高度。20 世纪 70 年代以后，细胞生物学这一学科最后得以形成并确立。

20 世纪 70 年代建立的转基因技术和单克隆抗体技术，80 年代各种模式生物的建立及其大量突变株的分析，特别是 90 年代以来，基因打靶技术的广泛应用，DNA 测序技术与生物芯片技术的快速发展，都极大地促进了人们在分子水平上对细胞的基本生命活动规律的探索。近年来人类基因组计划及随后的蛋白质组等“组学”的兴起和快速发展，极大地拓展了对生物分子研究的视野，使人们能够“认识”并能以实验手段加以研究的基因和蛋白质的种类有了爆炸性的增加，从而也使得过去相对孤立的调控因子或通路的研究，日益趋于迅速细化的网络式系统。而细胞生物学自身也成为一门学科综合性很强、特别是与分子生物学密不可分的前沿学科。正因如此，自 80 年代以来，人们开始赋予细胞生物学以“分子细胞生物学”或“细胞分子生物学”等名称。诺贝尔奖最能集中地反映当代生物科学的重大成就。综观近 50 年来荣获诺贝尔生理学或医学奖与化学奖的课题内容，很多都是与细胞生物学密切相关（见附录及配套数字课程）。

进入 21 世纪以来，生命科学以更快的速度发展。目前每年 SCI 收录的约 100 万篇研究论文中近一半与生命科学有关，生命科学已成为自然科学领域的带头学科，这也进一步促进了探索细胞生命活动和揭示生命本质的研究。

人们对生命的认识过程是从个体→细胞→分子逐渐深入，这也是学科发展的基本趋势。但如果从生命的层次或从生物进化的角度来看，细胞则是产生和决定生命活动的枢纽层次。从 20 世纪 50 年代初 DNA 双螺旋模型的建立至 2003 年人类基因组计划的完成，分子生物学从建立发展到了登峰造极的程度。同时，也为深入了

解细胞的生命活动打下了基础。而多莉羊的诞生、人胚胎干细胞的建系和诱导性多潜能干细胞技术的建立等，则可以看出是生命科学研究从分子水平回归到细胞水平，深入探索生命奥秘的几个最新的重要标志，显示出细胞生物学的发展进入了一个新的阶段。这个新阶段的基本特点可大致归纳如下：

(1) 以细胞（及其社会），特别是活体细胞为研究对象。

(2) 以细胞重大生命活动为主要研究内容。

(3) 在揭示细胞生命活动分子机制方面，以细胞信号调控网络为研究重点。

(4) 在多层次上特别是纳米尺度上揭示细胞生命活动本质为目标。

(5) 多领域、多学科的交叉研究成为细胞生物学研究的重要特征。

总的特点是从细胞静态的分析到细胞生命活动的动态综合，这在很大程度上也反映了生命科学研究的趋势，因此从这个意义上讲，也许用“细胞科学”来描述细胞生物学的发展趋势会更恰当一些。

细胞生物学的发展速度与发展趋势，从细胞生物学教科书的内容及其版本更新之快也可以明显地反映出来。在此，我们推荐下面 6 本教材作为主要参考书：

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, *et al.* Molecular Biology of the Cell. 5th ed. New York: Garland Publishing, Inc., 2008.

2. Alberts B, Bray D, Hopkin K, *et al.* Essential Cell Biology. 3rd ed. New York: Garland Publishing, Inc., 2009.

3. Karp G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. 6th ed. New York: John Wiley and Sons, Inc., 2009.

4. Lodish H, Berk A, Kaiser C A, *et al.* Molecular Cell Biology. 6th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

5. Becker W H, Kleinsmith L J, Hardin J, *et al.* The World of the Cell. 7th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2009.

6. Cassimeris L, Lingappa V R, Plopper G. Lewin's Cells. 2nd ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 2010.

## ● 思考题 ●

1. 根据细胞生物学研究的内容与你所掌握的生命科学知识，恰当地评价细胞生物学在生命科学中所处的地位以及它与其他生物学科的关系。
2. 如何认识细胞学说在细胞学乃至生物学发展简史中的重要意义？
3. 试简明扼要地分析细胞生物学学科形成的客观条件以及它今后发展的主要趋势。
4. 当前细胞生物学研究的热点课题中你最感兴趣的是哪些？为什么？

## ● 参考文献 ●

1. 郑国铝. 细胞生物学. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1992.
2. 庄孝德. 细胞学(中国大百科全书·生物学). 北京: 中国大百科全书出版社, 1988, 1-11.
3. Darnell J, *et al.* Molecular Cell Biology. New York: Scientific American Books, Inc., 1986.
4. Wilson E B. The Cell in Development and Heredity. 3rd ed. New York: The Macmillan Company, 1925.



# 细胞的统一性与多样性

地球上的生命形式千差万别，已经命名的物种超过200万种，实际存在的物种估计数以千万计，但作为生命基本单位的细胞，则有显著的基本共性，诸如相似的化学组成、基本一致的结构形式、类似的遗传语言和相似的代谢调控机制。同时，细胞又有明显的多样性，种类繁多、形态各异、功能多样的细胞形成不同的物种或构建同一生物体的不同组织。形态结构与功能的统一是各类生物所共同遵循的基本原则。

## 第一节 细胞的基本特征

### 一、细胞是生命活动的基本单位

细胞对于生命的重要性不言而喻，它是有机体形态、结构、生理的基本单位，也是生命功能的基本单位。概括而言，细胞是生命活动的基本单位。可以毫不夸张地说，细胞=生命。

#### (一) 细胞是构成有机体的基本单位

地球上的生命形式估计有几千万种，尽管它们的形态结构和生活习性大相径庭，但无一例外均由细胞构成，只有病毒是非细胞形态的生命体，但病毒本身并非生命，而是需要严格寄生于细胞，才会体现出生命的特

征。有些生物仅由一个细胞构成，另一些生物则由数百乃至万亿计的细胞构成。人体内的细胞大约分为200多种不同的类型（图2-1），成年人大约含有 $10^{14}$ 个细胞，刚出生的婴儿约由 $2 \times 10^{12}$ 个细胞组成，人的大脑是由 $10^{12}$ 个细胞构成的复杂体系。

#### (二) 细胞是代谢与功能的基本单位

有机体一切代谢活动最终要靠各种细胞来完成。单细胞生物依靠一个细胞完成运动、呼吸、排泄和生殖等一系列生理活动，多细胞生物则更多地依靠细胞之间的



图2-1 人体由200多种不同的细胞组成（董巍博士惠赠）

相互合作——机体根据生理状态，分泌各种信号（神经递质、激素、细胞因子等），作用于靶细胞，通过调整细胞的状态来调节细胞的功能，以适应整个机体的需求。细胞的形态结构与功能的相关性与一致性是细胞的共同特点，尤其在分化程度较高的细胞中更为明显，这是生物经历漫长进化的必然结果。

### （三）细胞是有机体生长与发育的基础

有机体的生长与发育是依靠细胞的分裂、分化与凋亡来实现的，这是自然界最为复杂的过程之一，我们对其中的很多机理还不甚了解，但毋庸置疑，细胞是生长与发育的基本单位。

### （四）细胞是繁殖的基本单位，是遗传的桥梁

单细胞生物的繁殖表现为细胞一分为二，多细胞生物依靠细胞分裂形成特殊形式的生殖细胞——孢子或配子，上一代的遗传信息存在于生殖细胞的核中。孢子萌发或配子结合为合子，是下一代生命的开始，细胞核中的遗传信息指导下一代生命的构建。

### （五）细胞是生命起源的归宿，是生物进化的起点

生命是经过漫长的化学进化，由非生命的物质形成的，而含有遗传物质的原始细胞的形成，标志着生命的出现，此后便由化学进化进入生物进化阶段，最终形成了纷繁多样的生命世界。

### （六）关于细胞概念的一些新思考

细胞是一切生命活动的基本单位，对细胞的认识与理解是一切生命科学的基础。现代自然科学的蓬勃发展，使得细胞生物学与生命科学其他学科的相互渗透越发深入，与化学、物理和数学显著交叉，吸引了各个领域的众多研究者参与进来。学科的融合促进了我们对细胞的再认识——细胞是多层次、非线性与多层面的复杂结构体系：

#### 1. 细胞是物质（结构）、能量与信息过程精巧结合的综合体

细胞的结构，特别是细胞的亚显微结构的研究方面已经积累了很多资料，所以人们对这一问题有比较深入的认识，而细胞分子结构的研究是当前的热点。细胞的各种生命活动都需要能量，关于细胞供能的研究，人们早已比较清楚线粒体与叶绿体在能量代谢中的中心地位，但能量转移过程中尚有许多问题有待阐明。细胞对

外界信号的应答决定细胞的分裂、分化和凋亡等重大生命活动，这是一个以蛋白质与蛋白质间的非共价相互作用为基础的信息传递过程。信号转导与结构的关系，结构、能量、信号与基因表达的关系，更是一个值得深入研究的问题。

#### 2. 细胞是高度有序的，具有自组装能力的自组织体系

细胞中分子的自组装能力，对研究细胞的起源有很大的意义。染色体、核糖体、细胞骨架、核孔复合体，甚至整个核膜都是生物大分子自组装形成的。生物分子的自组装能力，依靠生物分子间的非共价相互作用。

写到这里，读者一定会觉得言犹未尽，我们本来想在以上诸小题中做一些延伸与说明，然而在本书的大部分章节中，都将贯穿着对细胞这些概念的思考，不妨留给读者自己进一步思考这些问题的余地。

## 二、细胞的基本共性

构成各种生物机体的细胞种类繁多，形态结构与功能各异，但作为生命活动基本单位的所有细胞却又有共同的基本点：

### （一）相似的化学组成

各种细胞的基本构成元素都是碳（C）、氢（H）、氧（O）、氮（N）、磷（P）、硫（S）等几种，这些化学元素所形成的氨基酸、核苷酸、脂质和糖类，是构成细胞的基本构件。

### （二）脂-蛋白体系的生物膜

所有的细胞表面均有主要由磷脂双分子层与镶嵌蛋白质构成的细胞质膜，细胞质膜使细胞与周围环境保持相对的独立性，形成相对稳定的细胞内环境，并通过细胞质膜与周围环境进行物质交换和信号传递。在真核细胞内，细胞质膜内陷演化为细胞的内膜体系，构建成各种以膜为基础的功能专一的细胞器。生物膜也是细胞能量转换的基地。

### （三）相同的遗传装置

所有的细胞都以DNA储存和传递遗传信息，以RNA作为转录物指导蛋白质的合成，蛋白质的合成场所都是核糖体，几乎所有的细胞都使用一套相同的遗传密码。这说明，所有的细胞都起源于共同的祖先。

#### (四) 一分为二的分裂方式

所有细胞的增殖都以一分为二的方式进行分裂，遗传物质在分裂前复制加倍，在分裂时均匀地分配到两个子细胞内，这是生命繁衍的基础与保证。所有现存细胞，都是由其祖先通过分裂产生。从进化的观点看，现存的所有细胞都来源于共同的祖先。

## 第二节 原核细胞与古核细胞

生物圈的成员数以千万计，而我们的肉眼能看到的成员，包括已发现的 150 万种以上的动物、50 万种左右的植物和接近 8 万种真菌，它们形态结构都大相径庭，表现出明显的不连续，这也是生物分类的基础。但在显微镜下，从大象到小鼠，从参天巨树到高不盈寸的小草，它们的细胞结构却大致相同：都由细胞膜、细胞质和细胞核组成；细胞质内都有内质网、线粒体、溶酶体等细胞器；细胞核内都有染色体。另一方面，我们肉眼看不到的细菌、放线菌、支原体等微生物，它们的细胞结构则表现出很大的不同，它们没有细胞核，也没有内质网等细胞器。由此看来，生物界最显著的差异表现在细胞层次，而不是大象和小鼠的区别，甚至不是大象和小草的不同。

根据结构的这种差异，可以把细胞分为真核细胞 (eukaryotic cell, *eu* 是希腊语“真实”的意思, *karyon* 是希腊语“核”的意思) 与原核细胞 (prokaryotic cell) 两大类。这一概念最早是在 20 世纪 60 年代由著名细胞生物学家 H. Ris 提出来的，它不仅对细胞生物学，而且对整个现代生命科学均具有深远影响，由此延伸而把整个生物界划分为原核生物 (prokaryote) 与真核生物 (eukaryote)。原核生物几乎都由单个原核细胞构成，而真核生物却可以分为单细胞真核生物与多细胞真核生物。随着研究的深入人们发现，原核细胞与真核细胞的区别，远不止有无细胞核，它们在代谢方式、遗传信息传递方式、基因表达调控、信号转导等各个方面都存在显著差异。

分子生物学的进展使人们对细胞的认知逐渐深入到基因和基因组的层次。通过对细胞遗传信息表达系统的深入研究，人们发现，原来的原核细胞中有一类群，它

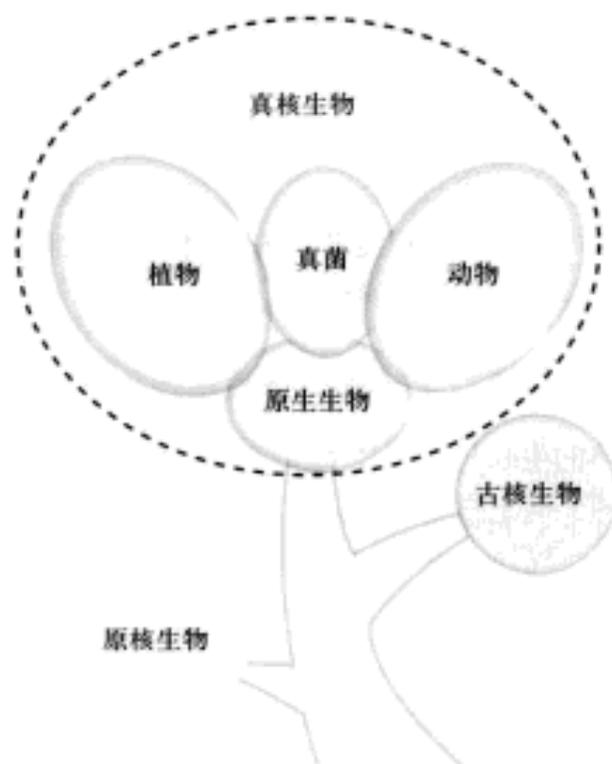


图 2-2 生物界的基本类群

所有细胞起源于共同的祖先，然后原核细胞的祖先首先与古核细胞与真核细胞的共同祖先分离，接着古核细胞与真核细胞分离，形成了 3 种主要的细胞类型。

们的遗传信息表达系统与其他的原核细胞差异相当大，反而与真核细胞更为接近。于是人们把这类细胞从原核细胞中分离出来，另立一个类群 (域, domain), 称为古核细胞。

这样，整个生物界最基本的类群包括 3 个域：原核生物、古核生物和真核生物。相应地，生物被分为 6 个界：由原核生物组成的原核生物界，由古核生物组成的古核生物界，以及由真核生物组成的原生生物界、真菌界、植物界和动物界 (图 2-2)。

### 一、原核细胞

顾名思义，原核细胞因没有典型的核结构而得名。人类认识原核细胞是从细菌开始的，而近代分子生物学的知识也主要是由细菌获得的，因此细菌成为原核细胞的主要代表。然而应该指出，原核细胞的范畴比我们通常所称的细菌更广泛、更多样，它包括支原体、衣原体、立克次氏体、细菌、放线菌与蓝藻等多个庞大的家族。

与真核细胞相比，原核细胞的基因组很小，仅为  $10^6 - 10^7$  bp，大部分原核细胞的主要遗传物质仅为一个环状 DNA；它们细胞内没有以膜为基础的各种细胞器，也没有细胞核膜；细胞体积一般很小，直径由 0.2 至 10  $\mu\text{m}$  不等。原核细胞的进化地位显然比较原始，然

而自然选择显然更钟情于体积小、繁殖快、利用环境物质能力强的它们——原核生物在 30 亿~35 亿年前就在地球上出现了，现在在地球上的分布广度及对生态环境的适应性比真核生物大得多。另一方面，原核生物取得的选择优势是有代价的——它们的基因量少，基因表达调控简单，无法进行复杂的细胞分化，也就无法形成多细胞生命体。因此它们虽然选择优势明显，却只能占据非常有限的生态位，导致物种数目远少于真核生物。

## 二、最小最简单的细胞——支原体

支原体 (mycoplast, 又译为霉形体) 是目前发现的能在无生命培养基中生长繁殖的最小最简单的细胞, 具备细胞的基本形态结构与功能 (图 2-3)。支原体没有细胞壁, 只有细胞膜, 所以支原体的形态可以随机变化, 支原体的细胞膜含有胆固醇, 比其他原核生物的质膜更坚韧, 具有原核细胞膜所具有的多功能性。支原体的环状双螺旋 DNA 较均匀地散布在细胞内, 没有像细菌一样的核区; mRNA 与核糖体结合为多核糖体, 指导合成约几百种蛋白质, 这可能是细胞生存和增殖所必需的最低数量的蛋白质。支原体以一分为二的方式分裂繁殖。以上这些特征与非细胞形态的生命体——病毒是根本不同的。

最早发现的支原体为拟胸膜肺炎病原体——PPLO, 后来又从动物、植物体和环境 中分离出很多支原体, 它们中不少是致病的病原体, 尤其是一些慢性病 (呼吸道病、胸膜肺炎、关节炎与尿道炎等) 的病原体很多都是支原体。支原体的体积很小, 直径一般是  $0.1 \sim 0.3 \mu\text{m}$ , 仅为细菌的  $1/10$ , 可以通过细菌滤器; 很多支原体能寄生在细胞内繁殖, 因此支原体是细胞培养中常见又难以去除的污染源。

目前再没发现比支原体更小的细胞了, 与它们的体积和结构近似的是立克次氏体与衣原体, 但它们是细胞内寄生的。支原体基因组是迄今为止发现的能独立生活的生物中最小的, 生殖道支原体 (*Mycoplasma genitalium*) 的基因组仅 580 kb, 约 482 个基因, 大都是生命活动所必需的基因, 如: tRNA、rRNA 和其他非编码 RNA; 催化 DNA 复制、转录和翻译的酶; 参与能量代谢和基本生物合成与降解的酶; 转运蛋白和通道蛋白; 调控细胞分裂的蛋白。支原体除了具有作为细胞所必需的结构外, 几乎没有什么称得上结构复杂的装置, 核糖体是在电镜下唯一可见的细胞内结构。我们曾对山羊胸膜肺炎支原体细胞内的核糖体进行过数量统计, 每个细胞含 800~1 500 个核糖体。支原体的基本结构与机能似乎已简单到极限, 可是人们还是要问, 作为细胞独立生存所需要的空间 (细胞体积) 的最小极限应是多大? 支原体是最小最简单的细胞吗?

一个细胞生存与增殖必须具备的结构装置与机能是: 细胞膜、DNA 与 RNA、一定数量的核糖体以及催化主要酶促反应所需要的酶。从保证一个细胞生命活动运转所必需的条件看, 维持细胞基本生存 的基因应该在 200~300 个, 这些基因产物进行酶促反应所必须占有的空间直径约为 50 nm, 加上核糖体 (每个核糖体直径 10~20 nm), 细胞膜与核酸等, 我们可以推算出来, 一个细胞体积的最小极限直径为 140~200 nm, 而现在发现的最小支原体细胞的直径已接近这个极限。因此, 比支原体更小更简单的结构, 似乎不可能满足生命活动的基本要求, 也就是说支原体应该是最小最简单的细胞。

## 三、原核细胞的两个代表类群——细菌和蓝藻

从 20 世纪 60 年代开始, 细菌与蓝藻一直是研究原核细胞的两个典型代表, 我们对原核细胞的深入了解,

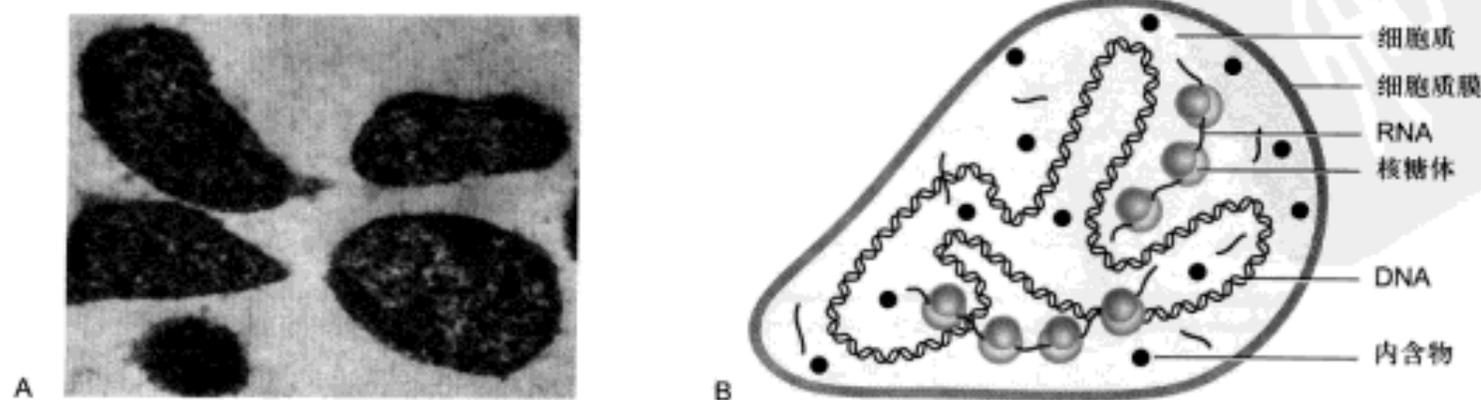


图 2-3 支原体 (A) 及其模式图 (B) (丁明孝提供)

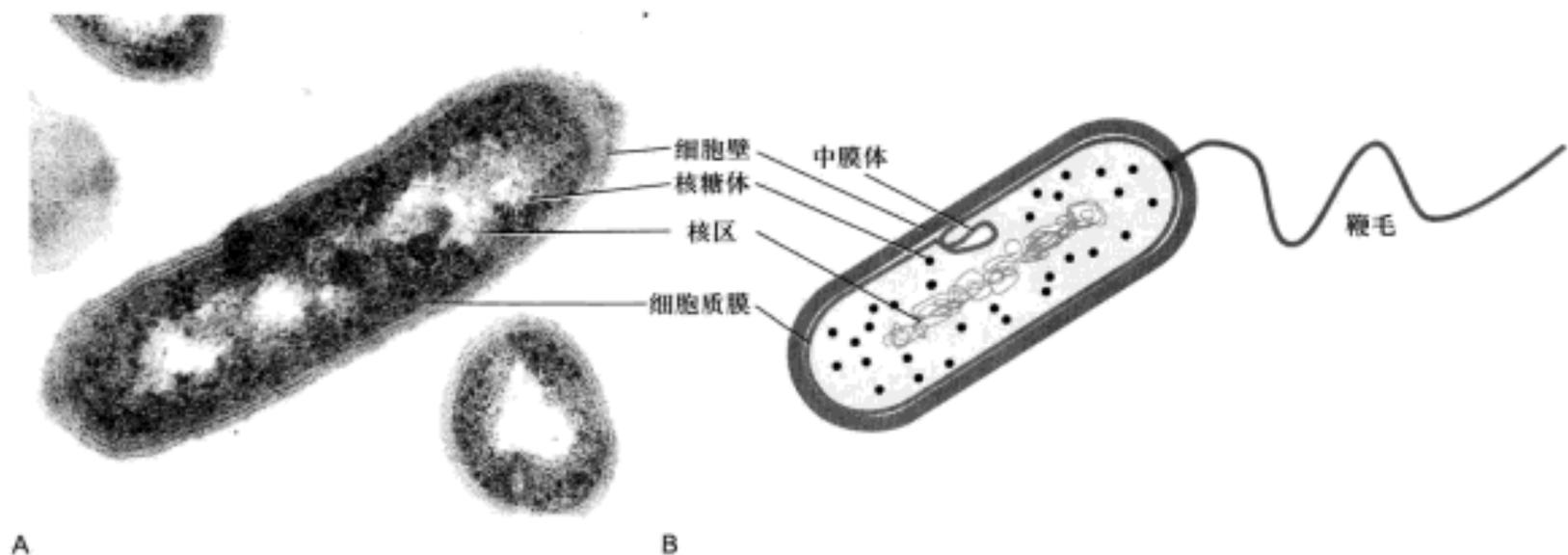


图 2-4 细菌的结构

A. 猪丹毒杆菌 ( $G^+$ ) 电镜照片。B. 细菌结构的模式图。(A 图由丁明孝提供)

也主要依靠细菌与蓝藻的细胞生物学与分子生物学研究资料的积累。本节主要从细胞生物学角度来介绍细菌与蓝藻的知识。

### (一) 细菌细胞

细菌是自然界分布最广、个体数量最多、与人类关系极为密切的有机体，在大自然物质循环过程中处于极重要的地位。绝大多数细菌的直径大小在  $0.5 \sim 5.0 \mu\text{m}$  之间，当然还有极少的巨型细菌。细菌细胞没有典型的核结构，但绝大多数细菌有明显的核区或称类核 (nucleoid)，主要由一个环状 DNA 分子盘绕而成。核区四周是较浓密的胞质物质，除了核糖体外，没有类似真核细胞的细胞器。细菌细胞质膜是典型的生物膜结构，但它具有多功能性 (图 2-4)。

#### 1. 细菌细胞的表面结构

细菌细胞的表面主要是指细胞质膜、细胞壁及其特

化结构：中膜体、荚膜与鞭毛等。细胞质膜是细胞表面的最重要结构。

(1) 细胞壁 细胞壁 (cell wall) 是位于细胞质膜外的一层较厚、较坚韧并略具弹性的结构。所有细菌的细胞壁都具有的共同成分是肽聚糖，由乙酰氨基葡萄糖、乙酰胞壁酸与四五个氨基酸短肽聚合而成的多层网状大分子结构。革兰氏阳性菌与阴性菌的细胞壁成分与结构差异很明显 (图 2-5)，也是细菌呈革兰氏阳性反应与阴性反应的重要原因。革兰氏阳性菌 ( $G^+$ ) 细胞壁厚  $20 \sim 80 \text{ nm}$ ，层次不清楚，壁酸含量高达 90%；革兰氏阴性菌 ( $G^-$ ) 细胞壁厚约  $10 \text{ nm}$ ，层次较分明，壁酸含量仅占 5%。青霉素的抑菌作用主要是通过抑制壁酸的合成，从而抑制细胞壁的形成。阳性菌因细胞壁的壁酸含量极高，故对青霉素很敏感；反之，阴性菌由于壁酸含量极少，对青霉素不敏感。

细胞壁机械强度很高，对细胞有保护作用。革兰

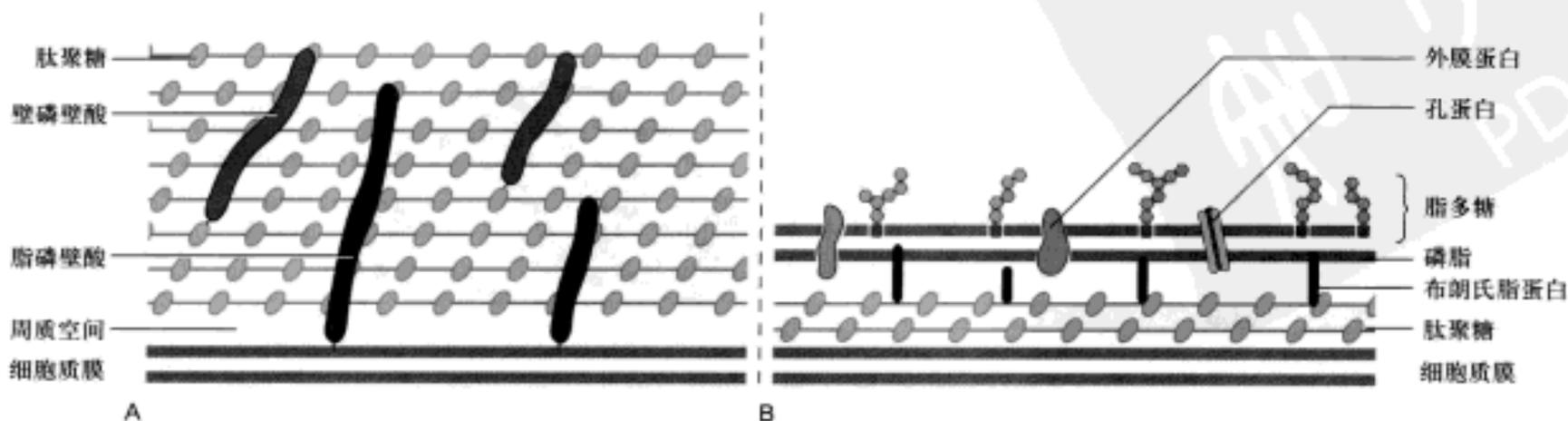


图 2-5 革兰氏阳性菌 (A) 与革兰氏阴性菌 (B) 的细胞壁

氏阳性菌胞壁能耐受约 2 MPa 的压力, 革兰氏阴性菌的细胞壁外还有一层由脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)、磷脂和蛋白质组成的外膜, 可以阻止或减轻胆汁盐、抗体等对细菌有害的物质的进入, 对细菌起保护作用。细胞壁的成分与抗原性、致病性及对病毒的敏感性均有关系。

(2) 细胞质膜 又称细胞膜, 是包围细菌原生质的典型生物膜, 由磷脂双分子层与镶嵌蛋白质构成富有弹性的半透性膜。膜厚 8~10 nm, 外侧紧贴细胞壁。除了具有选择性交换物质等功能外, 细菌细胞质膜含有丰富的酶系, 执行许多重要的代谢功能: 如细胞质膜内侧含有电子传递与氧化磷酸化的酶系, 可进行有氧呼吸; 细胞质膜内侧含有一些酶, 与核糖体共同执行合成向外分泌蛋白质的功能; 细胞质膜上还含有细胞色素酶与合成细胞壁成分的酶。因此, 细菌的细胞质膜可以完成内质网、高尔基体和线粒体所承担的大部分工作。此外细菌细胞膜外侧有受体蛋白, 参与细菌对周围环境的应答反应。

(3) 中膜体 (mesosome) 中膜体又称间体或质膜体, 由细胞膜内陷形成的囊泡状、管状或包层状膜结构, 每个细胞内有一个或数个中膜体, 在革兰氏阳性菌中更明显。中膜体常见于分裂期细菌的隔或横壁旁边, 似乎与 DNA 有联系, 推测中膜体可能起 DNA 复制的支点作用。也有人认为中膜体上含有细胞色素和琥珀酸脱氢酶, 功能类似线粒体。

此外, 某些细菌表面具有荚膜, 是位于细胞壁表面的一层由葡萄糖与葡萄糖醛酸组成的松散的黏液状聚合物, 也有的含多肽与脂质。荚膜具有一定程度的保护作用, 如保护细胞免受干燥的影响, 保护病原菌免受细胞的吞噬。荚膜本身还可作为细胞的营养物质, 在营养缺乏时能被细菌所利用。某些细菌具有鞭毛, 做为运动器官。鞭毛的结构与真核生物的鞭毛完全不一样, 是由一种称为鞭毛蛋白 (flagellin) 的弹性蛋白所构成, 运动机理也不相同。

## 2. 细菌细胞的核区与基因组

细菌细胞只具有 DNA 聚集的核区, 结构简单, 形态不规则, 没有核膜, 更没有核仁。为了与真核细胞典型的核有所区别, 称为拟核或类核。核区主要由一个环状的 DNA 分子组成, 在高分辨率电镜下, 可以看到核区是丝状结构。某些原核细胞的 DNA 为线形, 而某些细菌, 如霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 含有不止一条 DNA 分子。核区没有强的 Feulgen 阳性反应, 说明它与

真核细胞核不一样, 然而习惯上人们延用了真核细胞的染色体概念, 也把细菌的核区 DNA 称为染色体, 实际上它没有真正的染色体结构, 但 DNA 也在 RNA 和拟核蛋白 (不同于组蛋白) 的协助下进行了高效包装: 在不到  $1 \mu\text{m}^3$  的核区空间内, 折叠着长达 1 200~1 400  $\mu\text{m}$  的环状 DNA, 所含的遗传信息量足够编码 2 000~5 000 种蛋白质, 因此细菌 DNA 的空间构建是十分精巧的。

细菌的基因组一般作为具有一个复制起始点的独立单位而进行复制, 遵循半保留复制规律, 最终由一个 DNA 环复制为两个子环。复制时, 细菌 DNA 环附在细菌质膜上作为支持点。复制不受细胞分裂周期的限制, 可以连续进行, 不像真核细胞 DNA 复制仅局限在细胞周期的特定阶段 (S 期)。

细菌细胞没有核膜把核与细胞质绝对地分开, 因此 DNA 复制、RNA 转录与蛋白质合成的结构装置没有空间上分隔, 可以同时进行, 这是细菌乃至整个原核细胞与真核细胞最显著的差异之一。电镜分子形态图可以显示, DNA 分子边复制边转录, 转录的 mRNA 在没有脱离 DNA 的状态下, 又与核糖体结合翻译肽链。转录与翻译在时间与空间上是连续进行的 (图 2-6)。

## 3. 细菌细胞核外 DNA

在细菌细胞内除核区 DNA 外, 还存在可进行自主复制的质粒 (plasmid), 它们是裸露的环状 DNA 分子, 所含遗传信息量为 2~200 个基因。质粒可以传递给后代, 有时质粒能整合到核 DNA 中去。质粒基因可以赋予细菌以新的性状, 如大肠杆菌性因子 (*f* 因子)、大肠杆菌素因子 (*col* 因子) 与抗药因子 (*r* 因子) 等都是由质粒基因编码的。细菌可以失去质粒 DNA 而无妨于正常代谢活动。质粒 DNA 在遗传工程研究中很重要, 常用作基因重组与基因转移的载体。

## 4. 细菌细胞的核糖体

每个细菌细胞含 5 000~50 000 个核糖体, 充满于细胞中, 少部分附着在细胞膜内侧, 合成运输到胞外

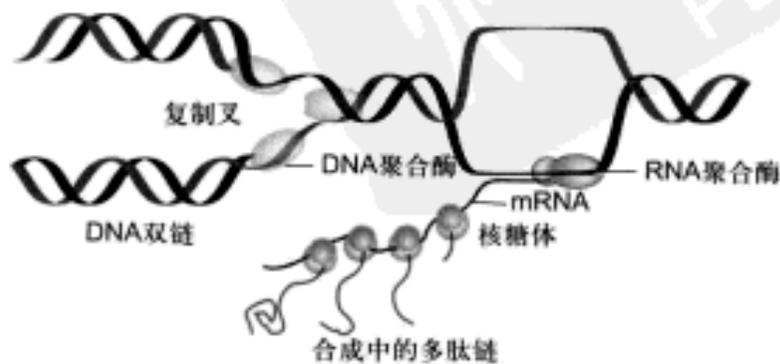


图 2-6 细菌的复制、转录和翻译同时进行

的蛋白质或质膜蛋白。核糖体与 mRNA 形成多核糖体，是翻译肽链的结构。细菌核糖体的数量与细胞生理状态的关系极为密切，细菌分裂旺盛时，如在指数生长期，核糖体数量激增，总质量可达细胞干重的百分之几十，而细菌处于极度“饥饿”状态时，每个细胞内核糖体的数量可减少到几百个。细菌核糖体的沉降系数为 70 S，由大亚单位 (50 S) 与小亚单位 (30 S) 组成。关于细菌细胞核糖体的成分、结构及其在多肽链翻译过程中的具体作用，在本书有关核糖体一章中将有详细的叙述，在此不拟赘述。

### 5. 细菌细胞内生孢子

很多  $G^+$  细菌处于不利的环境或耗尽营养时，容易形成内生孢子，又称芽孢，是对不良环境有强抵抗力的休眠体。细菌细胞内的重要物质，特别是 DNA，积聚在细胞的一端，在特殊结合蛋白的协助下形成一种含水量较丰富的致密体，外被很厚的壁。内生孢子折光性很强，不易染色，具有渡过恶劣环境的能力，可以在杀死普通细菌或营养型细菌的条件下依然存活。

### 6. 细菌细胞的增殖及其调控

(1) 细菌细胞的增殖 细菌的细胞分裂方式比真核生物简单。细胞分裂前，首先是 DNA 复制。DNA 复制始于复制起点，复制起点处的 DNA 复制完成后，可能依附于质膜上将来发生分裂的位置左右，继续完成 DNA 其余部分的复制。随着细胞的伸长，在一些蛋白质的协助下，复制完成的两个 DNA 分子分开，形成两个核区，细胞质膜在两个核区之间凹陷、延伸，将两个子细胞分隔开，最后形成新的细胞壁。抑制蛋白质的合成，两个 DNA 分子会停留于母细胞中央，无法完全分开。

细菌的增殖非常快速，在适宜的培养条件下，大肠杆菌每 20 min 就增殖一代，而其 DNA 复制则需要 40 min，是细胞周期长度的两倍。为什么细胞周期比 DNA 复制的时间还短呢？原来在迅速增殖的细菌中，上一次 DNA 复制尚未完成时，下一次 DNA 复制就已经开始了。在刚刚分开的子细胞中，DNA 已经完成了部分复制（详见本书第十三章）。

(2) 细菌细胞增殖的调控 一般来说，细菌必须长到一定的大小后，DNA 才开始复制；细菌也必须伸长到一定的长度，复制的 DNA 才能分开，进而细胞分裂。这说明细菌的细胞分裂受到严格调控。

DnaA 蛋白是复制起点 (OriC) 的结合蛋白，大约 10 个 DnaA 蛋白携带 ATP 结合于 OriC，ATP 的水解促使此处富含 AT 碱基对的区域解链，开启 DNA 复制。

DNA 复制开始后，复制起点随即发生甲基化，使得下一轮复制不会立即启动。

复制完成后，细胞的分裂依赖于 DNA 复制完成的信号、DNA 是否受到损伤以及两个 DNA 分子是否分离。FtsZ (filamenting temperature-sensitive mutant Z) 是起始 DNA 分离的关键蛋白。FtsZ 与真核细胞的管蛋白 (tubulin) 是同源物，在细菌 DNA 复制完成后，FtsZ 蛋白聚集到将来细胞分开的位置，沿着质膜装配成环状，称为 Z 环；随后 Z 环收缩，并招募与细胞壁形成有关的蛋白聚集于此，最终细胞分裂。由此看来，FtsZ 的功能类似于动物胞质分裂中的微丝，只是现在仍然不清楚它的马达蛋白是什么。也有人认为，Z 环的主要功能是招募导致细胞横隔形成的蛋白，而不是收缩缢裂。

综上所述，虽然人们已经克隆到与细菌细胞分裂相关的很多重要基因，但细菌细胞周期调控的确切机制尚待进一步研究。

## (二) 蓝藻细胞

蓝藻又称蓝细菌 (cyanobacteria)，是自养型原核生物，能进行与高等植物类似的光合作用。它们的光合作用系统中具有叶绿素 a 和光系统 II，以水为电子供体，放出  $O_2$ ，而其他光合细菌的电子供体一般是  $H_2$ 、 $H_2S$  和 S，不产生  $O_2$ 。蓝藻产生于约 30 亿年以前，其放  $O_2$  的光合作用，改变了地球大气圈的组成，使原始地球的还原型大气变成富含氧气的氧化型大气，为真核生物和后生生物的起源创造了条件。

蓝藻分布十分广泛，在淡水、海洋、高山、极地、沙漠、草原与森林都有蓝藻生活的足迹，它们能生长在极为贫瘠的环境下。蓝藻细胞内含有丰富的色素，如藻蓝素与叶绿素，使细胞呈绿色。有些种类的蓝藻还含有黄色色素、红色色素，随细胞内各种色素含量不同，细胞也呈现各种颜色，虽都属于蓝藻，却不一定是蓝绿色。

蓝藻细胞的体积比其他原核细胞大得多，直径一般在 1~10  $\mu m$ ，有的可达 60  $\mu m$ （如颤藻，*Oscillatoria princeps*）。虽然属于单细胞生物，但有些蓝藻经常以丝状、片状或中空球状的细胞群体存在，“发菜”就是蓝藻的丝状体，对固定沙漠有重要作用。

### 1. 细胞结构

蓝藻细胞膜外有细胞壁和一层胶质的鞘。蓝藻的细胞壁与革兰氏阴性菌十分相似，肽聚糖层薄，外面包有外膜；所不同的是，细胞壁内层含有纤维素层。蓝藻的

细胞质部分有很多同心环样的膜片层结构，称为类囊体 (thylakoid)，光合色素和电子传递链均位于此。类囊体膜上还有大量藻胆蛋白，负责将光能传递给叶绿素 a。蓝藻细胞中央部位在光镜下较周围原生质明亮，是遗传物质 DNA 所在部位，相当于细菌的核区，称为中心质或中央体。“中心质”经常不位于中央，与周围胞质无明确界限。蓝藻的 DNA 也几乎为裸露的，复制也可连续进行。与细菌的核区不同，中心质 DNA 的拷贝数在不同种类和不同个体变动很大，有些种类含有多个 DNA 拷贝，DNA 的平均含量比高等动物细胞还多 (图 2-7A)。

### 2. 细胞分裂

蓝藻细胞分裂时，细胞中部向内生长出新横隔壁，将中心质与原生质分为两半。一般情况下，两个子细胞在一个公共的胶质鞘包围下保持在一起，并不断分裂而形成丝状、片状等多细胞群体。除此之外，蓝藻还可以通过出芽、断裂和复分裂等方式增殖。

### 3. 异形胞

丝状蓝藻 (如念珠藻与项圈藻) 在氮源不足时，群体中 5%~10% 的细胞转化为异形胞 (heterocyst) (图 2-7B)。异形胞个体大，细胞壁厚，并且丢弃了光系统 II，合成固氮酶。固氮酶以光系统 I 制造的 ATP 为能量，将  $N_2$  还原为  $NH_3$ 。固氮酶对  $O_2$  敏感，异形胞的厚壁阻止了  $O_2$  的侵入，光系统 II 的关闭阻断了  $O_2$  的生成，而呼吸作用消耗了少量存在的  $O_2$ ，由此创造了一个严格厌氧的环境。

## 四、古核细胞 (古细菌)

所有生物均从同一祖先进化而来，进化过程中，DNA 序列的逐渐改变最终造成生物性状的改变和新物种的形成。共同祖先距今越近的生物，其 DNA 序列越相似，亲缘关系也越近，反之亦然。因此，可以通过直系同源基因 (orthologous gene) 序列相似性的比较，确定物种间的进化关系。应用这种方法，人们赫然发现，形态结构非常相似的原核生物并不是统一的类群，而是在极早的时候就演化为两大类：古细菌 (原细菌 archaeobacteria) 与真细菌 (eubacteria)。

古细菌又称为古核生物 (archaeon)，常常发现于极端特殊环境中，过去把它们归属为原核生物是因为其形态结构、DNA 结构及其基本生命活动方式与原核细胞相似。最早发现的古细菌是产甲烷细菌类，接着陆续又发现盐细菌 (halobacteria，生长在浓度大的盐水中)、热原质体 (thermoplasma，生长在煤堆中)、硫氧化菌 (sulfolobus，生长在硫黄温泉中) 等几百种古细菌。后来发现古细菌的分布其实很广泛，在温和环境和冷环境中也有它们的踪迹，如温带的土壤、食草动物的消化管和南极海岸水域 (约占此处生物量的 1/3)。

因为很多古细菌生存在极度特殊的，非一般生物能生存的高温或高盐的环境中，似乎与人类关系不大，更被认为是进化过程中极度特化的盲支，所以长期不为人们所重视。后来发现在海洋深处的热泉口很高温的环境

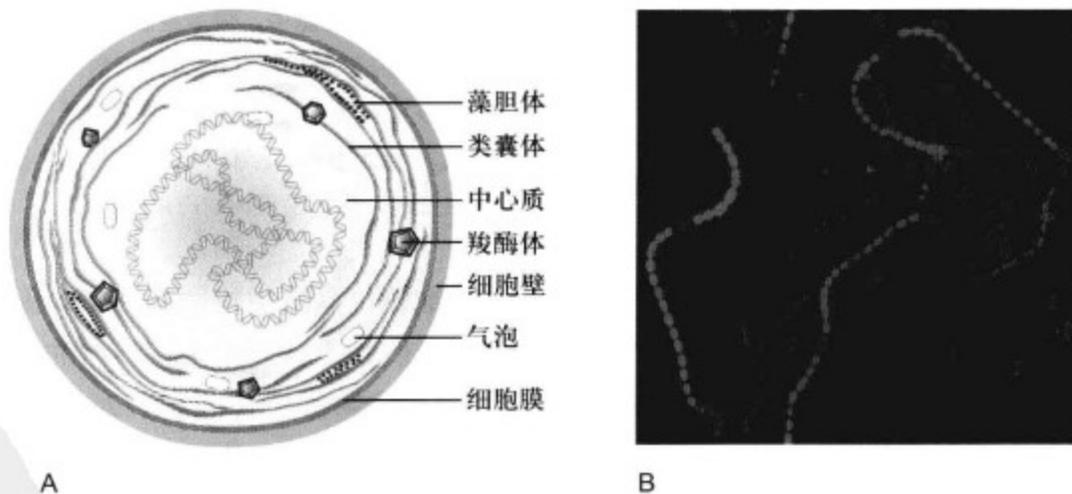


图 2-7 蓝藻

A. 蓝细菌的细胞结构，类囊体组成同心环绕的囊膜，是光合作用光反应的场所。核区常常含有多个拷贝的环状 DNA，所以蓝藻中的许多株系是多倍体 (polyploid)。细胞中有许多内含物，如脂滴、聚磷酸盐颗粒、羧酶体 (光合作用固定  $CO_2$  的酶)、藻蓝素 (天冬氨酸和精氨酸的多聚体，储存 N 元素) 和气泡 (由多列排成柱状的小气泡组成，外被蛋白质鞘，调节细胞在水中的位置) 等。B. 荧光显微镜下的丝状蓝藻鱼腥藻 (*Anabaena*) 红色显示细胞中叶绿素的自发荧光，蓝色显示被标记的细胞中的  $Ca^{2+}$ 。个体较大，具有固氮作用的异形胞呈蓝色，钙离子在异形胞分化中起重要的调控作用。鱼腥藻属项圈藻的一类。(B 图由赵进东博士惠赠)

中存在众多嗜热细菌，人们很自然联想到它们可能代表了原始地球环境中生命存在与繁衍的特定形式，在细胞起源与进化中扮演过重要角色而非进化盲支。正因为如此，近十多年对古核细胞的研究，引起进化生物科学工作者的很大关注，成为细胞起源与进化研究领域的热点。1996年，对古核生物詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*) 基因组全序列的测定完成，为研究古核生物的分子进化奠定了良好的基础。

古细菌形态多样，具有细胞壁，染色为  $G^+$  或  $G^-$ ；细胞大小在  $0.1 \sim 15 \mu\text{m}$  不等，分裂方式有二分分裂、出芽等多种。

### (一) 古细菌的细胞壁

真细菌的壁主要由含壁酸的肽聚糖构成，古细菌也有细胞壁，但没有胞壁酸和 D-氨基酸，因此溶菌酶以及抑制肽聚糖前体合成的环丝氨酸、抑制肽聚糖合成的青霉素与万古霉素等对古细菌没有作用。

### (二) 古细菌的质膜

虽然古细菌的质膜也是由脂质与蛋白质构成，却与细菌和真核生物都不同：脂质由带有分支的 C-H 链末端以醚键，而不是酯键与甘油结合；膜脂中还有 7%~30% 为非极性脂质——鲨烯衍生物；极端耐热菌的质膜甚至是由  $C_{40}$  四乙醚组成的单层膜 (图 2-8)。

### (三) DNA 与基因结构

古细菌的遗传装置往往介于原核细胞和真核细胞之间。与细菌相似的地方有：DNA 为环状、有操纵子结构、大部分基因无内含子、有多基因 mRNA 存在。另外一些特征与真核细胞类似，如 DNA 和组蛋白结合成类似核小体结构；tRNA 和 rRNA，甚至部分编码蛋白质的基因中有内含子；RNA 聚合酶为复杂多聚体；翻译起始的氨基酸为 Met (细菌是 fMet) 等。还有一些特性是古核细胞所特有的，如 tRNA 的 T $\psi$ C 臂上无胸腺嘧啶。已经测序的詹氏甲烷球菌的 1700 多个编码蛋白质的基因中，有接近 60% 是特有的。

### (四) 核糖体

多数古细菌类的核糖体虽然也是 70 S，但含有 60 种以上的蛋白质，介于真核细胞与真细菌之间，而且其中的 RNA 与蛋白质的性质更接近于真核生物。Husysman 与 Wachter (1986) 根据对 5 S rRNA 的分子进化分析，

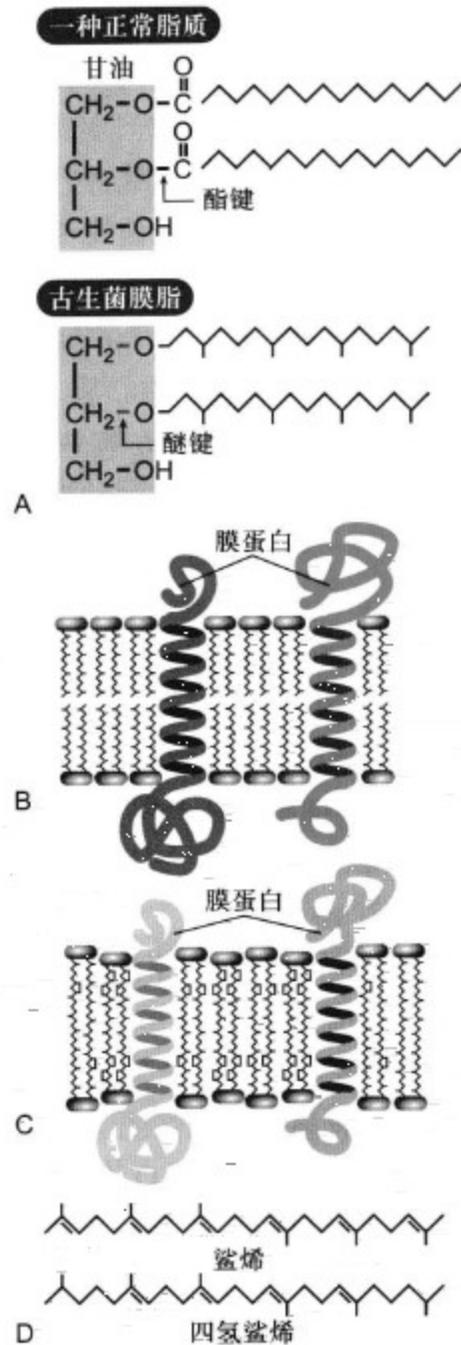


图 2-8 古细菌的细胞膜脂

A. 古细菌的膜脂中，很多是由 C-H 链以醚键与甘油结合形成，C-H 链通常由 20C 组成。B. 古细菌的脂双层膜，由双层  $C_{20}$ -二乙醚组成，镶嵌蛋白质。C. 嗜热古细菌的膜是由膜蛋白和  $C_{40}$  四乙醚组成的单层膜，十分坚硬，能够对抗高温。D. 古细菌膜中常常含有一定量的非极性脂质，它们是鲨烯的衍生物。

认为古细菌与真核生物同属一类，而真细菌却与之差距甚远。我们知道针对细菌核糖体的抗生素都不能与真核细胞 80 S 核糖体结合而起到对真核细胞蛋白质合成的抑制作用，同样它们也不能抑制古核细胞核糖体的蛋白质合成。因此，古核细胞的核糖体显然与真细菌的差异很大。

由此可见，古核生物细胞的形态结构与遗传结构装置和原核细胞相似，但有些分子进化特征更接近真核细胞。根据对基因组相关序列的对比，人们发现古核细胞与真核细胞的亲缘关系更近 (见图 2-2)。

## 第三节 真核细胞

真核细胞是遗传信息量大、结构更加复杂的细胞，原始的真核细胞在 12 亿~16 亿年前在地球上出现，或者更早一些。现存的真核生物种类繁多，既包括大量的单细胞原生生物，又包括全部多细胞生物（一切动植物、大部分真菌）。本节仅就真核细胞的最基本知识作概要介绍，有关真核细胞的结构与功能，以及重要生命活动将在本书中用专门的章节进行介绍。

### 一、真核细胞的基本结构体系

真核细胞在内部构建成许多更为精细的具有专门功能的结构单位。在亚显微结构水平上，真核细胞可以划分为 3 大基本结构系统：① 以脂质及蛋白质成分为基础的生物膜结构系统；② 以核酸与蛋白质为主要成分的遗传信息传递与表达系统；③ 由特异蛋白质装配构成的细胞骨架系统。这些由生物大分子构成的基本结构体系，尺度均为 5~20 nm，它们构成了细胞内部结构精密、分工明确、职能专一的各种细胞器，并以此为基础保证了细胞生命活动具有高度程序化与高度自控性。

#### （一）生物膜系统

生物膜的厚度基本在 8~10 nm 范围之内。细胞表面的细胞质膜及其相关结构，主要功能是进行选择性的物质跨膜运输与信号转导。细胞内部由双层核膜将细胞分成两大结构与功能区域——细胞质与细胞核，使得基因表达得以精密调控。在细胞质内以膜围绕形成很多重要的细胞器：线粒体与叶绿体是主要的供能与产能结构；内质网是生物分子合成的基地，脂质、糖类与很多蛋白质分子是在内质网表面合成并分选运输；高尔基体是对内质网上合成的物质进行加工、包装与运输的细胞器；溶酶体是细胞内的消化系统。生物膜还为生命的化学反应提供了表面，很多重要的酶定位在膜上，大部分生化反应在膜的表面进行。

#### （二）遗传信息传递与表达系统

遗传信息的储存、传递与表达系统是由 DNA、RNA

和蛋白质组成的复合体。DNA 与组蛋白构成了染色质的基本结构——核小体 (nucleosome)，它们的直径为 10 nm；由核小体盘绕与折叠成紧密程度不同的常染色质与异染色质，在细胞分裂阶段又进一步包装形成染色体。染色质结构，连同 DNA 的修饰酶和转录因子等共同调控了基因的转录。核仁主要是转录 rRNA 与核糖体亚单位装配的场所。核糖体是由 rRNA 与数十种蛋白质构成的颗粒结构，其功能是将 tRNA 携带的氨基酸根据 mRNA 的指令连接成肽链。

#### （三）细胞骨架系统

细胞的骨架系统是由一系列特异的结构蛋白装配而成的网架系统，对细胞形态与内部结构的合理排布起支架作用。细胞骨架可分为胞质骨架与核骨架，实际上它们又是相互联系的。胞质骨架主要由微丝、微管与中等纤维（也叫中间丝）等构成。微丝直径 5~7 nm，主要功能可能是信号传递与细胞运动；微管直径为 24 nm，其主要功能是为细胞内物质的运输提供通道，以及形成有丝分裂的纺锤丝；中等纤维直径为 10 nm，分为多种类型，具有组织特异性，主要对细胞起支撑作用。

核骨架包括核纤层 (nuclear lamina) 与核基质 (nuclear matrix)。核纤层的成分是核纤层蛋白 (lamin)，核基质的成分则颇为复杂。它们与基因表达、染色质构建与排布有关系。

从上述 3 种基本结构体系的分析，我们可以在亚显微尺度上找到一个基本共同点，不论是生物膜的厚度，遗传信息表达体系中颗粒与纤维结构的大小，还是骨架纤维的直径都是在 5~20 nm 的尺度范围。苏联著名科学家 G. Frank 在 20 世纪 50 年代末曾说过：生命的奥妙可能蕴含在 5~50 nm 的大分子复合体中。几十年来对生物结构在亚显微水平到分子水平的深入研究，证实了这一论点的合理性。近年，纳米生物学 (nanobiology) ——在纳米尺度上的生物分子结构与功能的研究，可能为在更深层次上揭示纳米尺度的大分子复合体与生命现象的关系提供更有力的证据。

## 二、细胞的大小及其影响因素

细胞的大小是细胞的重要特征，各类细胞的大小有一定规律（图 2-9A）。一般而言，按细胞平均直径的粗略计算，支原体细胞比最小的病毒大 10 倍，细菌细胞比支原体大 10 倍，而多数动植物细胞大小约

20~30  $\mu\text{m}$ ，比细菌大 10 多倍，一些原生动细胞又比一般动植物细胞大 10 倍。

对于高等动植物，不论物种的差异多大，同一器官与组织的细胞，其大小总是在一个恒定的范围之内，这是由细胞作为生命基本单位的功能所决定的。合适的细胞体积，能够保证细胞与周围环境进行正常的物质与信息交换，保证细胞内物质运输和信号传递的正常进行，对于细胞行使正常的生物学功能至关重要。那么细胞的体积受什么因素控制呢？

细胞由各种生物分子和包括水在内的无机分子组成，细胞的大小，简单来说主要是由每个细胞内所含的蛋白质与核糖体 RNA 的量所决定的，其中蛋白质是更为主要的因素。糖类、脂质和 DNA、mRNA 以及 tRNA 等有机分子在细胞体积上所占权重很小，而无机盐的量对细胞大小更无足轻重。水虽然占到细胞湿重的 80% 以上，但细胞内水分的量是由细胞内所含有有机生物分子的量所决定，水本身并不直接决定细胞的大小（成熟的植物细胞是个例外，它们的大小主要由中央液泡决定）。因此，细胞的尺寸可以说取决于核糖体的活性，因为蛋白质的量由核糖体来决定。酵母和果蝇中已经得到几种核糖体蛋白质发生突变的突变体，它们的细胞大小都发生了变化。

从果蝇到哺乳类的各种生物，都应用一套几乎完全相同的信号网络来调控细胞大小（图 2-9B）。哺乳动物中这一网络的中心是一个叫做 mTOR (mammalian target of rapamycin) 的蛋白激酶，因其能被雷帕霉素 (rapamycin) 抑制而得名，果蝇等生物中也存在同源蛋白质 TOR。在小鼠或果蝇中，该蛋白质的失活会导致细胞体积变小。

mTOR (或 TOR) 接受上游信号，对细胞外部的氨基酸、葡萄糖等营养物质以及胰岛素等生长因子做出反应。胰岛素类生长因子调控 mTOR 的信号通路已经研究得比较清楚：胰岛素类生长因子 (insulin/IGF) 与细胞膜上的受体结合后，使磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol 3-OH-kinase, PI3K) 活化，进一步激活肌醇磷脂信号转导途径 (详见第九章细胞信号转导)，通过蛋白激酶 B (PKB, 又名 AKT) 和一些中间信号传递分子，最终激活 mTOR。

活化的 mTOR 有两个功能：它一方面活化核糖体蛋白 S6 (rpS6) 的激酶 (S6K)，导致 rpS6 磷酸化，从而可能加强核糖体的翻译效率，因而使细胞增大。S6K 基因缺陷的果蝇和小鼠，细胞都显著减小，细胞数量则没有变化，因而身体变小。rpS6 磷酸化位点的缺失，也会导致一些组织的细胞变小；另一方面，活化的 mTOR

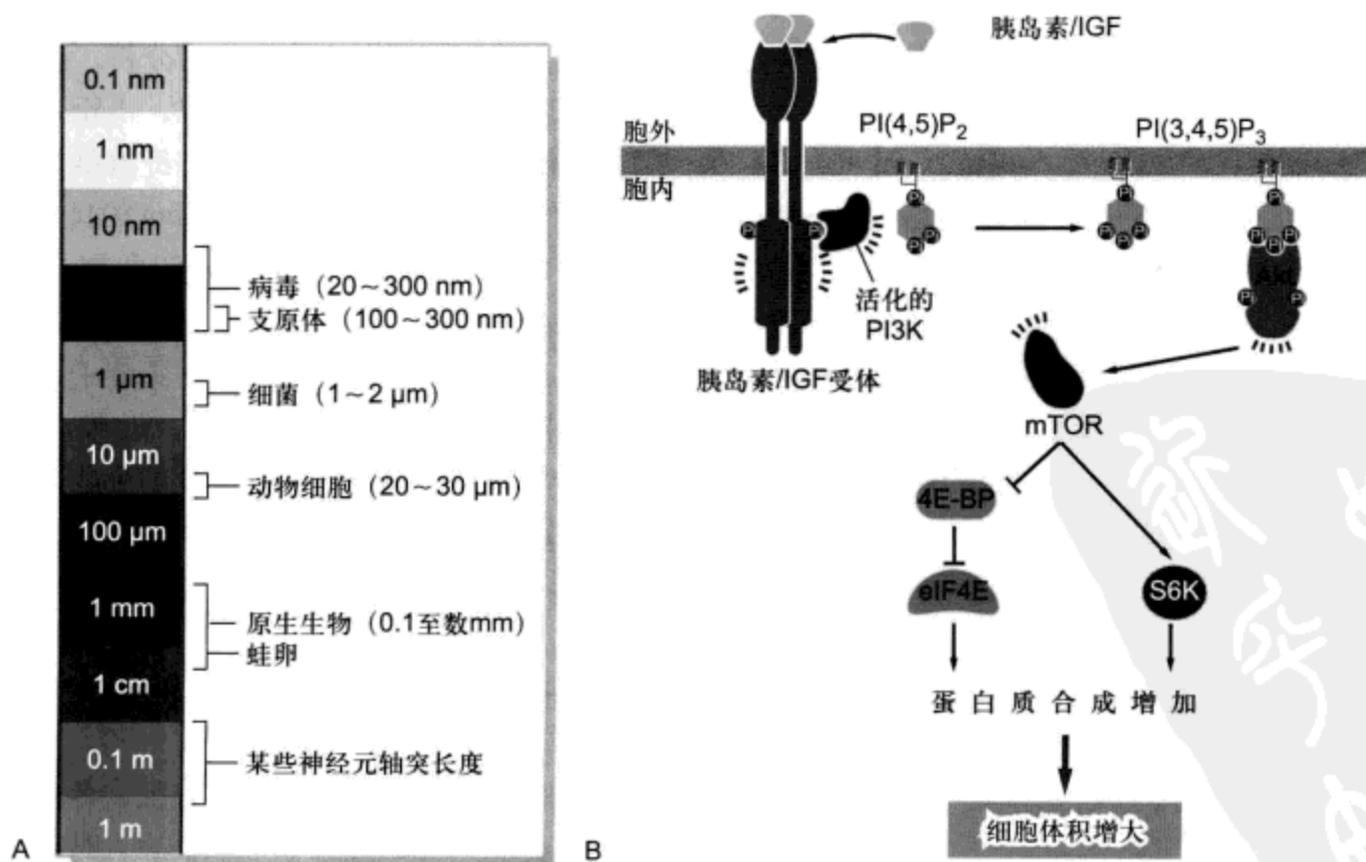


图 2-9 细胞的大小及其调控

A. 各类细胞直径的比较。B. 多细胞生物主要通过 PI3K-mTOR-S6K 及 4E-BP 调控细胞的体积。

将翻译抑制因子 4E-BP (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein) 磷酸化, 解除其对翻译起始因子 4E (eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E) 的抑制, 增强蛋白质的翻译, 促使蛋白质积累, 细胞体积增加。此外, PI3K 和 mTOR 还会激活固醇调控元件结合蛋白 (sterol-regulatory-element-binding proteins, SREBPs), 加强脂质的合成。

细胞大小的决定是复杂的, 还受到其他多种因素的影响。例如, 植物细胞在旺盛分裂期的大小, 也是取决于蛋白质等生物分子的积累, 但在完成分裂后, 植物细胞有一个伸展 (expansion) 的过程, 细胞体积会增加数倍甚至成千上万倍, 这个过程依赖的不是有机物的积累, 而主要是中央液泡的膨胀。细胞核 DNA 的含量也与细胞大小有关, 植物多倍体细胞的体积一般显著大于二倍体细胞。DNA 含量如何决定细胞大小还不清楚, 可能与核糖体数量有关——DNA 控制核糖体的合成, DNA 量越大, 核糖体越多, 因而翻译的蛋白质越多, 细胞就越大。DNA 含量影响细胞大小的另一个原因可能是多倍体细胞的代谢旺盛, 所有基因的表达和蛋白质的合成都加速, 因此细胞内有机物积累增加, 细胞体积随之增加。

### 三、原核细胞与真核细胞的比较

原核细胞与真核细胞是生物圈两个最重要的细胞类群, 它们最根本的区别可以归纳为两条 (表 2-1):

(1) 细胞膜系统的分化与演变 真核细胞以膜系统的分化为基础, 首先分为两个独立的部分——细胞核与细胞质, 细胞质内又以膜系统为基础分隔为结构更精细、功能更专一的单位——各种重要的细胞器。细胞内部结构与职能的分工是真核细胞区别于原核细胞的重要标志。

随着细胞体积的增大与细胞内部结构的复杂化, 细胞内部需要有空间上的合理布局, 必然需要有一个精密的支架。细胞骨架可能主要担任了这个角色。

(2) 遗传信息量与遗传装置的扩增与复杂化 这与第一点密切关联。建立在细胞内膜系统分化基础上的内部结构与功能的区域化与专一化, 是细胞进化过程中的一次重大飞跃, 导致了遗传装置的扩增与基因表达方式的相应变化。真核细胞的基因组一般远远大于原核细胞的, 作为遗传信息载体的 DNA 也由原核细胞的环状单倍性变为线状多倍性; 基因数量大大增加, 由几千个发展到 2 万~3 万个; 细胞核的存在, 使真核细胞基因表达实现了多层次调控, 远比原核生物精细与复杂, 为完成复杂的生命活动提供了基础。原核细胞基因表达的调控主要以操纵子的形式来进行, 难以完成细胞的复杂分化; 而另一方面, 原核细胞的这种简单的调控方式能适应多种不利环境, 进行快速调节。此外, 真核生物除了编码基因外, 还有不编码任何蛋白质或 RNA 的基因间隔序列和内含子, 其比例占整个基因组的 90% 以上。内含子的出现, 使同一个 RNA 可以通过可变拼接, 翻译出多种不同的蛋白质。哺乳动物的 20 000 多个基因

表 2-1 原核细胞与真核细胞基本特征的比较

特征	原核细胞	真核细胞
细胞质膜	有 (多功能性)	有
核膜	无	有
染色体	由一个 (少数多个) 环状 DNA 分子构成的单个染色体, DNA 不与或很少与蛋白质结合	2 个染色体以上, 染色体由线状 DNA 与蛋白质组成
核仁	无	有
核糖体	70 S (包括 50 S 与 30 S 的大小亚单位)	80 S (包括 60 S 与 40 S 的大小亚单位)
膜质细胞器	无	有
核外 DNA	细菌具有裸露的质粒 DNA	线粒体 DNA, 叶绿体 DNA
细胞壁	主要成分是氨基糖与壁酸	动物细胞无细胞壁, 植物细胞细胞壁的主要成分为纤维素与果胶
细胞骨架	无	有
细胞增殖 (分裂) 方式	无丝分裂 (直接分裂)	以有丝分裂 (间接分裂) 为主

估计能够翻译出 100 000 多种蛋白质，大大增加了生物的复杂程度。在此基础上，很多真核生物成为多细胞生物，细胞有了显著而复杂的分化。

由于真核细胞拥有多条 DNA 分子，并且 DNA 与蛋白质形成交替存在的染色质和染色体等高级结构形式，加之核膜的存在以及真核细胞内部结构的庞大与复杂性，给遗传物质的准确复制与均等无误地分配到子细胞增加了“难度”。真核细胞发展出一整套由酶和调控蛋白组成的复杂精密的体系，严格调控细胞增殖。真核细胞的细胞周期可以明显地划分为细胞间期与细胞分裂期，整个间期可看做是细胞增殖所需物质的合成期，DNA 复制仅限于 S 期。为了准确无误地将遗传物质分配给两个子细胞，真核细胞分裂时，核膜崩解消失，染色质转变为紧密包装的染色体，并借助有丝分裂器（纺锤体）的牵拉而均等分配给子细胞。真核细胞的分裂因出现纺锤丝而称为有丝分裂或间接分裂。原核细胞的增殖没有严格阶段，也没有染色质与染色体结构的交替，更无纺锤体的出现，所以将原核细胞的分裂叫做无丝分裂或直接分裂。

原核细胞和真核细胞已经在地球上共同存在了近 20 亿年。长期的共存，使两者之间形成了复杂的相互关系，这种关系很多时候对双方都是至关重要的。例如，脊椎动物消化管中存在由数以百计的微生物组成的肠道菌群，宿主为它们提供栖息地和营养物质，而菌群的定殖对宿主的正常生命活动，尤其是免疫系统的正常发育与维持必不可少。图 2-10 显示定殖于小鼠回肠末端的分节丝状菌（*Candidatus arthromitus*; segmented filamentous bacterium, SFB) 与肠上皮细胞紧密接触的



图 2-10 定殖于小鼠回肠末端的分节丝状菌（如箭头所示）与肠上皮细胞的相互作用。通过这种作用，能够刺激宿主 T 辅助淋巴细胞 Th17 的增殖，分泌 IL-17 等细胞因子，加强宿主对致病菌的抵御能力。（梁凤霞、Ivaylo Ivanov 和 Dan Littman 博士惠赠）

情形。这种密切相互作用，不会引起肠细胞的损伤，反而能够刺激 T 辅助淋巴细胞 Th17 的增殖，并分泌白介素 17 (IL-17) 等细胞因子，加强宿主对鼠类柠檬酸杆菌 (*Citrobacter rodentium*) 等条件致病菌的抵御能力。

#### 四、植物细胞与动物细胞的比较

构成动物体与植物体的细胞均有基本相同的结构体系与功能体系。大部分重要的细胞器与细胞结构，如细胞膜、核膜、染色质、核仁、线粒体、高尔基体、内质网与核糖体、微管、微丝等，在不同细胞中不仅其形态结构与成分相同，功能也一样（图 2-11）。

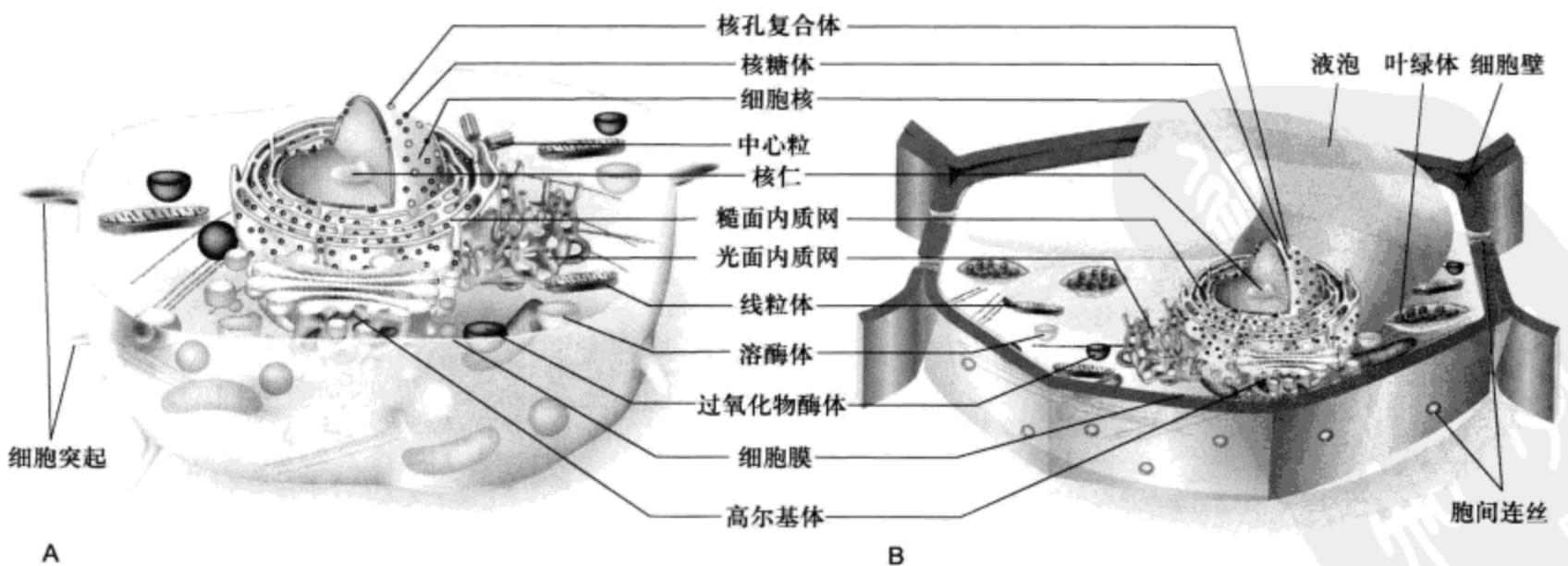


图 2-11 动物细胞 (A) 和植物细胞 (B) 模式图

## 第四节 非细胞形态的生命体 ——病毒

另一方面，植物细胞有一些特有的细胞结构与细胞器是动物细胞所没有的，如细胞壁、液泡、叶绿体及其他质体；也有一些动物细胞的结构，如中心粒，是植物细胞内不常见到的。植物细胞在有丝分裂以后，普遍有一个体积增大与成熟的过程，这一点比动物细胞表现明显。在这一过程中，细胞的结构要经历一个发育的阶段，如细胞壁的初生壁与次生壁的形成，液泡的形成与增大，有色体的发育等。下面我们简单介绍一下植物细胞所特有的结构。

### (一) 细胞壁

细胞壁是在细胞分裂过程中由原生质体分泌形成的。分裂后期，残留的纺锤体微管在细胞赤道板中央聚集为圆柱形的成膜体 (phragmoplast)，中间围有高尔基体和内质网囊泡。这些囊泡彼此融合，形成膜质平板——细胞板 (cell plate)。囊泡中富含多糖，形成细胞板后，多糖用来制造初生壁 (1~3 μm) 和果胶质的胞间层。随着囊泡的加入，细胞板不断向外延伸，最终与质膜融合，新生细胞壁也和原来的细胞壁连接起来。

细胞壁的主要成分是纤维素，还有果胶质、半纤维素与木质素等。植物细胞壁产生了地球上最多的天然聚合物：木材、麻与棉的纤维。由于分隔子细胞的细胞膜来自共同的一群囊泡，囊泡融合时留下间隙，所以两个膜之间有许多管道相通，形成胞间连丝，原生质可以由此沟通。

### (二) 液泡

液泡是由单层脂蛋白膜包围的封闭系统，内部是水溶液，溶有盐、糖、氨基酸、生物碱与色素等物质，溶液的浓度可以达到很高的程度。中央大液泡是随着细胞的生长，由小液泡合并与增大而形成的。液泡是植物细胞的代谢库，起调节细胞内环境的作用。液泡中还有水解酶，能够破坏衰老的细胞器，起着类似溶酶体的功能。此外液泡的膨压对维持幼嫩植物组织的刚性有重要作用。植物缺水时发蔫，就是液泡膨压下降的结果。

### (三) 叶绿体

叶绿体是植物细胞内最重要、最普遍的质体，它是进行光合作用的细胞器。叶绿体利用其叶绿素将光能转变为化学能，把 CO<sub>2</sub> 与水转变为糖，是世界上成本最低，创造物质财富最多的“生物工厂”。

病毒是非细胞形态的生命体，是迄今发现的最小、最简单的有机体。但所有的病毒必须要在细胞内才能进行繁殖并表现出它们的基本生命活动。因此，有关病毒的知识不仅有助于加深我们对细胞与生命概念的理解与认识，而且也涉及人们所面临的诸多重大的医学实践问题。

### 一、病毒的基本知识

作为非细胞形态的生命体，病毒与细胞的区别主要表现在以下几个方面：

(1) 病毒很小，结构极其简单。绝大部分病毒的大小只有 20~200 nm，可以通过细菌滤器。因此必须在电子显微镜下才能清楚地看到 (图 2-12)。

(2) 遗传载体的多样性。所有细胞中，都含有 DNA 与 RNA。并以双链 DNA 分子作为遗传物质的载体。然而，不同种类的病毒却显现出其遗传载体的多样性：不仅有 DNA 病毒，还有 RNA 病毒。这两种病毒均有双链和单链之分。但每一种病毒粒子中只含有 DNA 或 RNA，而非二者兼有。

(3) 彻底的寄生性。病毒虽然具备了生命活动的最基本特征 (增殖与遗传)，但只是一类不“完全”的生命体。病毒自身没有独立的代谢与能量转化系统，必须利用宿主细胞结构、“原料”、能量与酶系统进行繁殖，因此，有人称之为分子水平上的寄生。

(4) 病毒是以复制和装配的方式进行增殖。病毒的增殖过程，如同生产汽车，在细胞这个生产病毒的工厂中，首先合成大量的病毒核酸以及各种病毒蛋白，然后由这些“部件”装配成新的子代病毒。因此，一般把病毒的增殖称为复制，而细胞只能以分裂的方式增殖。

自 1892 年人们首次发现烟草花叶病毒以来，目前已发现 4 000 多种病毒。绝大多数病毒是由核酸与蛋白质构成的核酸-蛋白质复合体，称之为真病毒 (euvirus)。还有一类为数极少的更简单的生命体，称为亚病毒

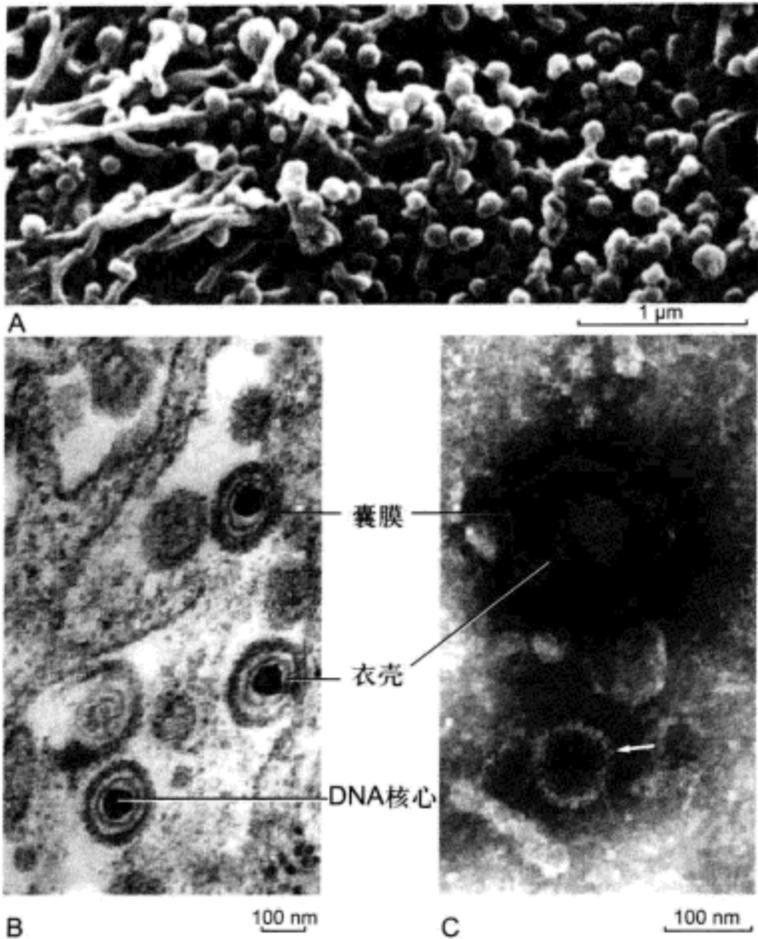


图 2-12 牛传染性鼻气管炎病毒的超微结构

牛传染性鼻气管炎病毒属疱疹病毒科，是一种双链 DNA 病毒。

A. 扫描电镜下，可观察到大量释放到细胞外的病毒粒子。B. 超薄切片样品中，可以清晰地观察到病毒内电子密度的 DNA 核心，蛋白衣壳和囊膜等结构。C. 在负染色样品中甚至可以分辨出组成病毒衣壳的衣粒结构（箭头所指）。（翟中和和丁明孝提供）

(subvirus)，目前只发现几十种。如类病毒 (viroid)，它们仅由一个有感染性的环状 RNA 分子构成，其大小仅有几百个核苷酸，而且，只感染植物，如最早发现的马铃薯纺锤块茎病类病毒 (potato spindle tuber viroid, PSTV) (图 2-13)。

1982 年 S. B. Prusiner 从患有羊瘙痒病的羊体中，分离出一种蛋白感染因子，命名为 prion (pr 意为 protein, i 意为 infectious, on 意为因子)。因为这是一类具有感染性的蛋白质，故有人译为朊病毒。但它与前面所提到的两类病毒的根本区别在于，朊病毒不是入侵者，而仅仅是机体自身某一种蛋白质的构象改变所致，其一级结构即蛋白的氨基酸序列与正常蛋白相同。但 prion 可使正常蛋白的构象发生改变，成为 prion，从这个意义上讲，prion 具有复制能力和感染性，但与病毒的复制机理和感染方式完全不同。因此，有人认为将 prion 译为“朊粒”更为合适。从酵母菌到人体均发现朊粒的存在，它能够侵染哺乳动物的神经组织，引起羊瘙痒病，

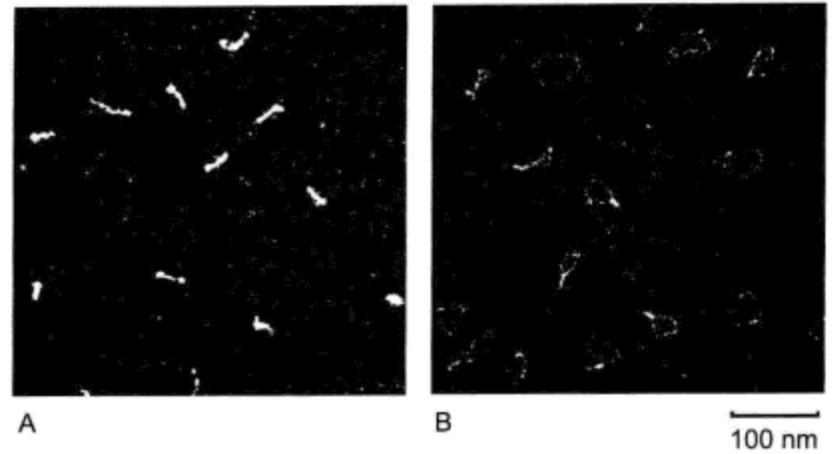


图 2-13 类病毒的电镜图片

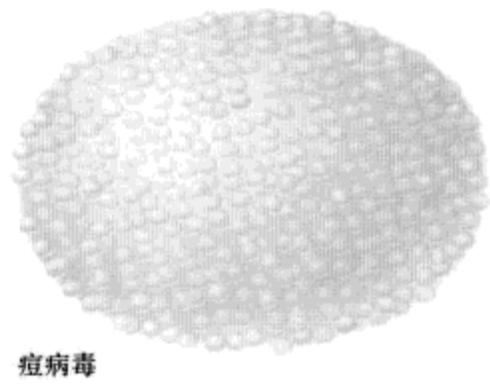
A. 类病毒仅由环状的 RNA 分子构成，因为分子间部分碱基相互配对，其形态呈棒状。B. 经变性处理后，可观察到环形的类病毒分子。（G. Klotz 博士惠赠）

牛海绵状脑炎（又称疯牛病）、人类克-雅氏症等慢性神经系统退行性疾病的发生。目前已证明，上述疾病均与一种在神经细胞质膜上含量较高的膜蛋白 PrP (prion protein) 构象发生改变相关。众所周知，食用患疯牛病牛肉的人，有可能被朊粒感染。输血也可以导致朊粒在人群中的传播。由于在 prion 研究中的贡献，Prusiner 于 1997 获诺贝尔生理学或医学奖。

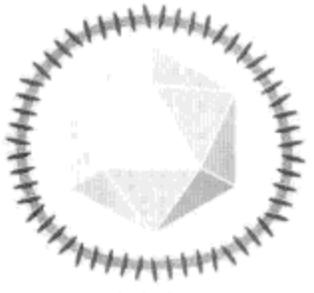
根据病毒感染的宿主范围，可以分为动物病毒、植物病毒与细菌病毒（噬菌体）等。还可以按病毒的核酸类型、形态大小、有无囊膜，以及理化性质等特征进行分类。根据核酸类型的不同，病毒可以分为 DNA 病毒与 RNA 病毒两大类。DNA 病毒又可分为双链 DNA 与单链 DNA 病毒；而 RNA 病毒也可分为单链 RNA 与双链 RNA 病毒（图 2-14）。在单链 RNA 病毒中又有正链 RNA 病毒和负链 RNA 病毒之分。前者的病毒基因组 RNA 如同细胞中的 mRNA，可直接作为模板，指导病毒蛋白质的合成。而负链 RNA 病毒侵染细胞后，必须以其基因组 RNA 为模板，在自身携带的 RNA 聚合酶的作用下合成 mRNA，进而翻译病毒的蛋白。

病毒的基本结构是由病毒的核酸和蛋白质组成（图 2-15）。蛋白质构成了包裹病毒核酸的衣壳 (capsid)，衣壳又由更小的形态单位衣粒 (capsomer) 所组成。衣壳与核酸构成病毒的核壳体 (nucleocapsid)，病毒的衣壳有保护核酸的作用。有些病毒在核壳体之外，还围有脂双层的囊膜 (envelope)，其主要成分为脂质与蛋白质。脂双层来自于细胞膜，而蛋白质由病毒基因编码。应该指出，病毒的囊膜与细胞质膜在结构与功能上都有很大差异。凡是有囊膜的病毒对有机溶剂都很敏感，在

DNA病毒

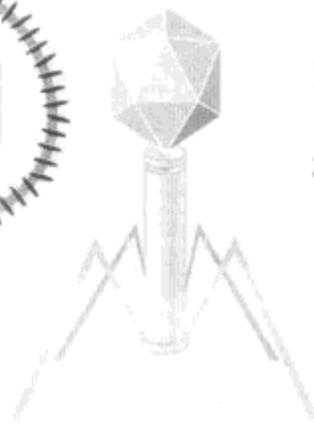


痘病毒



疱疹病毒

噬菌体



乙肝病毒



小DNA病毒



腺病毒

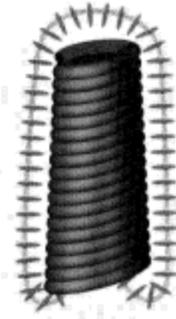
RNA病毒



流感病毒



轮状病毒



弹状病毒



HIV



脊髓灰质炎病毒



SARS病毒



烟草花叶病毒



披膜病毒



类病毒

100 nm

图 2-14 病毒的基本类型

有机溶剂作用下易灭活。此外，多数病毒还带有病毒特异的酶和数量不等的其他蛋白。病毒与宿主细胞的识别以及病毒的免疫原性主要是由其囊膜蛋白（有囊膜的病毒）或衣壳蛋白（无囊膜的病毒）所决定的。冷冻电镜技术可清晰地显示病毒表面蛋白的精细结构（图 2-16）。

根据核壳体的形态，病毒可分为立体对称与螺旋对称两种基本类型（图 2-15）。立体对称型病毒的核衣壳呈正 20 面体，每一个面又呈三角形，核酸折叠在衣壳之内。立体对称型的病毒有些有囊膜，如疱疹病毒、披膜病毒等；有些无囊膜，如腺病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒等。螺旋对称型病毒的核酸不是简单地填充在衣壳内，而是核酸与衣壳的衣粒按特殊的方式结合在一起形成核壳体，如烟草花叶病毒。除烟草花叶病毒外，多数螺旋对称型的病毒都具有囊膜，如流感病毒、

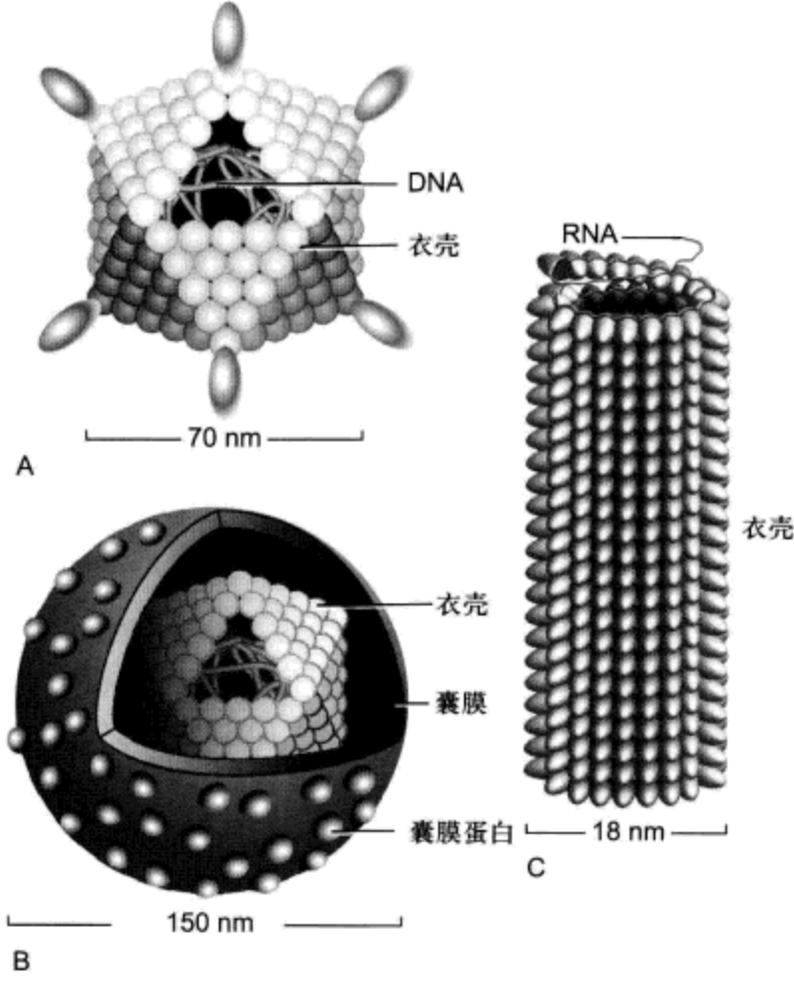


图 2-15 病毒结构的示意图

A. 腺病毒呈 20 面体立体对称，由 DNA 核心和衣壳组成。B. 疱疹病毒的衣壳呈 20 面体对称，衣壳外包被一层脂双层囊膜。C. 烟草花叶病毒的衣壳蛋白与内部的基因组 RNA 相结合，病毒呈螺旋对称。

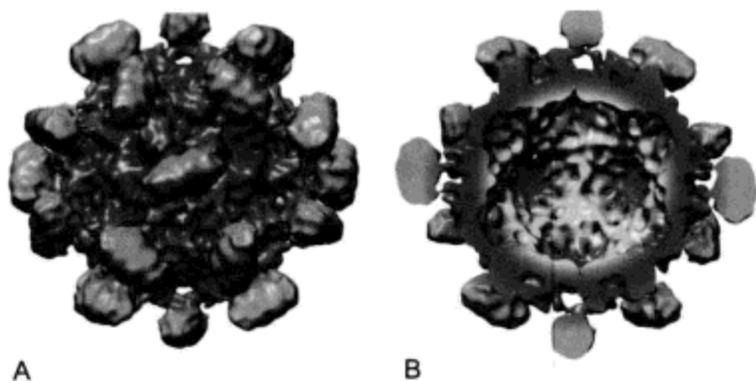


图 2-16 戊型肝炎病毒的冷冻电镜图片

A. 病毒表面的衣壳蛋白。B. 病毒的内部图。(柳正和张景强博士惠赠)

弹状病毒以及自身携带反转录酶的反转录病毒等均为有囊膜的螺旋对称型病毒(见图 2-14, 图 2-15)。

病毒可引起人类和动物的许多严重疾病。DNA 病毒中痘病毒科(Poxviridae)的天花病毒曾经给人类带来过极大的灾难; 1917—1918 年的西班牙流感是由正黏病毒科(Orthomyxoviridae)中的流感病毒引起, 近年来流行的 H5N1 型禽流感、甲型 H1N1 型流感, 其病原体也属于这一科, 它们的基因组以 8 个片段负链 RNA 的形式存在; 2003 年暴发于我国的 SARS (severe acute respiratory syndrome), 是由冠状病毒科(Coronaviridae)的一个成员引起, 属正链 RNA 病毒; 引起世纪瘟疫艾滋病(AIDS)的 HIV, 属于反转录病毒科(Retroviridae)。有些病毒的感染还有可能导致肿瘤的发生, 如人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)可引起妇女的宫颈癌。豪森(Harald zur Hausen)因研制出有效抑制宫颈癌发生的抗 HPV 疫苗, 获 2008 年诺贝尔生理学或医学奖。

## 二、病毒在细胞内增殖

如前所述, 病毒的增殖又称病毒的复制, 以区别细胞一分为二即细胞分裂的增殖方式。病毒的增殖必须在细胞内进行。病毒在宿主细胞内分别合成病毒核酸与病毒蛋白, 然后装配成子代病毒粒子(图 2-17)。

病毒在宿主细胞内的增殖是病毒生命活动与遗传性的具体表现。病毒的增殖过程首先是病毒识别并侵入宿主细胞, 病毒“篡夺”了细胞 DNA 对代谢过程的“指导”作用, 利用宿主细胞的全套代谢机构, 以病毒核酸为模板, 进行病毒核酸的复制与转录, 并翻译病毒蛋白质, 进而装配成新一代的病毒颗粒, 最后从细胞中释放

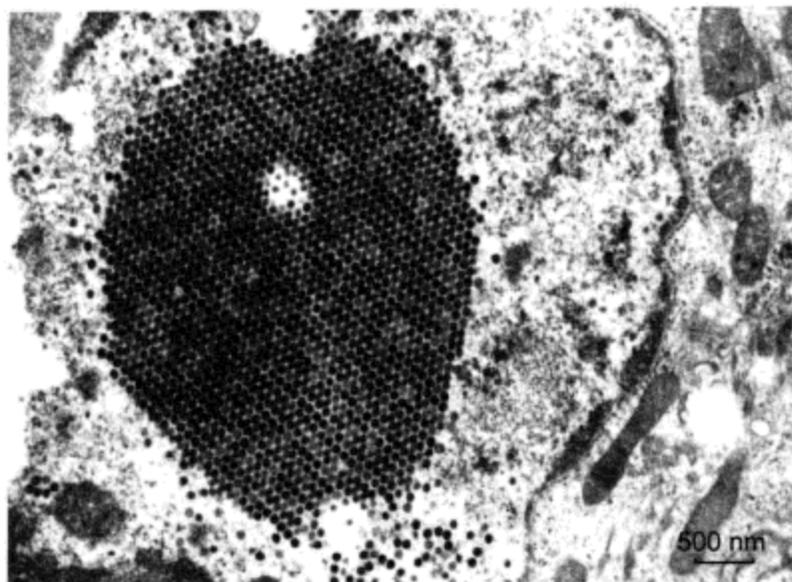


图 2-17 在细胞核内增殖的腺病毒

人腺病毒(adenovirus)属腺病毒科, 是典型的无囊膜的立体对称型 DNA 病毒, 在细胞核内复制与装配。电镜超薄切片显示出已装配好的腺病毒在核内呈晶格样排列。一个细胞内可繁殖数万个病毒。(翟中和提供)

出来, 再感染其他的细胞, 开始下一轮的增殖周期。结构完整的, 并具有感染性的病毒称为病毒粒子或成熟病毒(virion)。

病毒在细胞中的增殖过程简要叙述如下(图 2-18):

### (一) 病毒识别和侵入细胞

由于病毒表面的蛋白质与细胞表面特异受体的相互作用, 病毒与细胞发生特异性的吸附。这是病毒感染宿主细胞的第一步, 也是生物体所产生的抗病毒抗体得以抑制病毒感染细胞的关键的一步。动物病毒进入细胞主要有两种方式: 一是细胞以主动“胞饮”的方式使病毒进入细胞, 如腺病毒。二是某些有囊膜的病毒, 通过其囊膜与细胞质膜融合的方式进入细胞, 如 HIV, 或通过胞饮作用进入细胞, 然后再与胞饮囊泡的膜融合进入细胞质中, 如流感病毒、辛德毕斯病毒等。噬菌体侵染细菌时, 仅将其核酸注入细胞, 衣壳则留在细菌的细胞壁外。植物病毒难以穿越坚韧的细胞壁, 常常借助于昆虫进食过程侵染植物细胞。

病毒进入细胞后, 在细胞内的蛋白水解酶的作用下, 衣壳被裂解, 释放出病毒的核酸。除反转录病毒外, RNA 病毒的核酸一般是在胞质内复制与转录的。多数 DNA 病毒的核酸则转移到核内进行复制与转录。但是最大的一类病毒如痘病毒(poxvirus)却在细胞质中繁殖(图 2-19)。

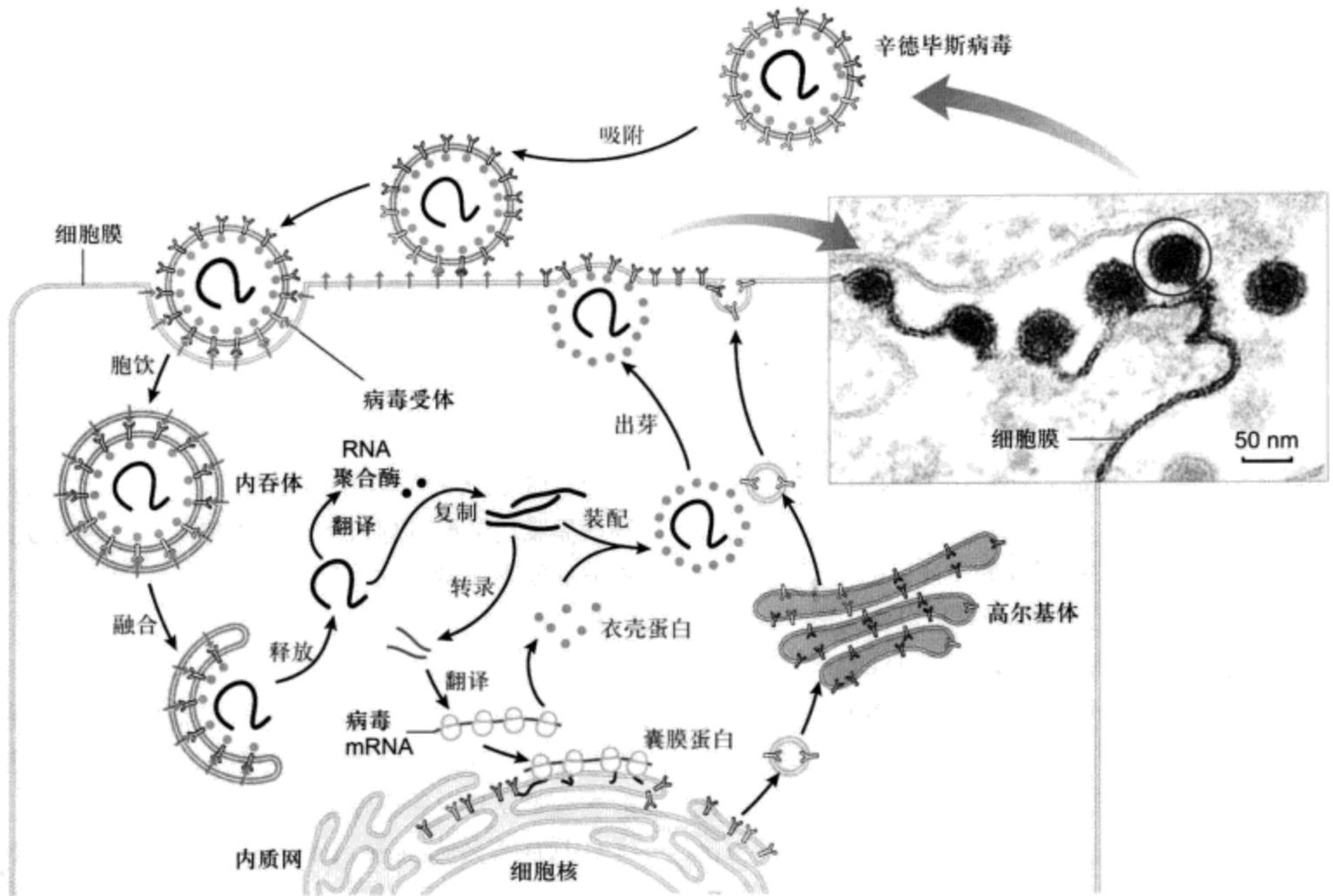


图 2-18 病毒在细胞中的增殖过程

辛德毕斯病毒 (Sindbis virus) 是一种昆虫病毒, 属披膜病毒科, 由正 20 面体立体对称的核衣壳和脂蛋白囊膜组成。病毒在细胞质中复制与装配。电镜图片显示病毒出芽、释放的过程。(梁凤霞博士惠赠)

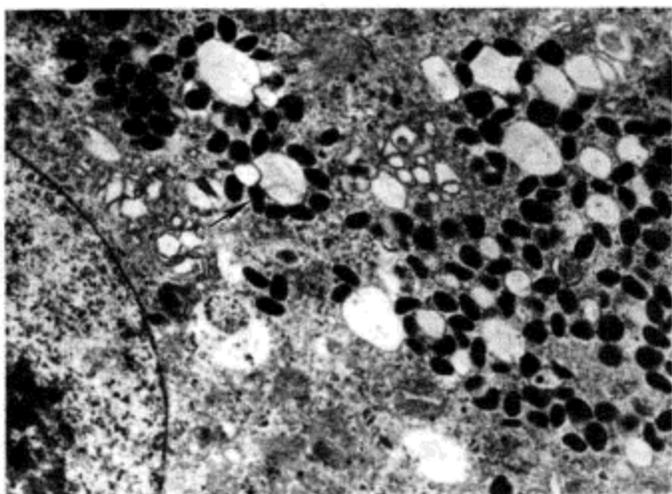


图 2-19 电镜超薄切片下的山羊痘病毒

山羊痘病毒 (goat poxvirus) 属痘病毒科, 是最大的一类病毒, 可以在细胞质中完成其 DNA 复制和 RNA 转录并最终装配成子代的病毒粒子 (箭头所指)。(丁明孝和翟中和提供)

## (二) 病毒核酸的复制、转录与蛋白质的合成

不同核酸类型的病毒, 其复制与转录的方式也各不相同。病毒的核酸类型大致可分为 7 种基本类型: 双

链 DNA、单链 DNA、双链 RNA、单链 RNA。其中单链 RNA 病毒又分为侵染性 RNA 病毒, 即正链 RNA 病毒。非侵染性 RNA 病毒, 即负链 RNA 病毒。此外, 还有病毒粒子中携带反转录酶的单链 RNA 病毒和复制过程中涉及反转录的, 部分双链 DNA 的病毒 (表 2-2)。以上 7 种核酸类型的病毒, 其复制的方式与过程显然是不同的。我们仅选几种有代表性的, 如双链 DNA 病毒、单链 RNA 病毒与单链 RNA 反转录病毒为例加以扼要的叙述。

### 1. DNA 病毒

当 DNA 病毒 (如疱疹病毒) 侵染细胞后, 其 DNA 进入细胞核, 在病毒 DNA 的指导下, 利用宿主细胞的代谢系统先后转录和翻译病毒的“早期蛋白”和“晚期蛋白”并进行病毒 DNA 的复制。一般称病毒 DNA 复制之前所表达的蛋白质为早期蛋白质, 病毒 DNA 复制之后所表达的蛋白质为病毒的晚期蛋白。早期蛋白的主要功能是调节病毒基因的表达以及病毒 DNA 的复制。同时, 也在不同程度上影响宿主细胞的 DNA 复制与

表 2-2 病毒的核酸类型及其代表科

	核酸类型	病毒所带的转录酶	病毒的科
DNA 病毒	双链 DNA 单链 DNA 不完整的双链 DNA		疱疹病毒、腺病毒、多瘤病毒、痘病毒 小 DNA 病毒 嗜肝病毒
RNA 病毒	双链 RNA 侵染性单链 [RNA (+)] 非侵染性单链 [RNA (-)] 反转录病毒 [单链 RNA (+)]	转录酶 转录酶 反转录酶	呼肠孤病毒 小 RNA 病毒、披膜病毒 黏液病毒、副黏液病毒、弹状病毒等 反转录病毒

RNA 转录。病毒的晚期蛋白主要是病毒包装过程中所需要的蛋白，它们是子代病毒的装配物质基础。

## 2. RNA 病毒

对于侵染性单链 RNA [又称 RNA (+)] 病毒如辛德毕斯病毒，病毒 RNA 分子本身就可以作为模板，利用宿主细胞的代谢系统，翻译出病毒的“早期蛋白”（见图 2-18）。对于非侵染性单链 RNA [又称 RNA (-)] 病毒，如流感病毒，首先必须以病毒 RNA 为模板，利用病毒本身携带的 RNA 聚合酶合成病毒的 mRNA。这种早期蛋白的功能与上述 DNA 病毒的“早期蛋白”类似，一方面抑制宿主细胞 DNA 的复制与转录，同时催化病毒基因组 RNA 的合成。此后，带有病毒遗传信息的 mRNA 与宿主细胞的核糖体相结合，翻译病毒的结构蛋白等晚期蛋白。新复制的负链 RNA 与病毒蛋白装配成子代病毒颗粒。以上过程一般都是在细胞质内进行的。

## 3. 反转录病毒

反转录病毒的复制过程与上述病毒完全不同。首先以病毒 RNA 分子为模板，在病毒自身所携带反转录酶的作用下，合成病毒的 DNA 分子。随后病毒 DNA 整合到宿主细胞染色质的 DNA 链上。进而，以整合在细胞 DNA 上的病毒 DNA 片段为模板，合成新的病毒基因组 RNA 与病毒 mRNA，后者与核糖体结合，翻译出各种病毒蛋白，其中包括病毒的反转录酶。最后，装配产生新的子代病毒。在上述过程中，有可能导致细胞发生转型，成为肿瘤细胞。

由 RNA 为模板，通过反转录合成 DNA 是在研究肿瘤 RNA 病毒与宿主细胞相互作用时所取得的一项重大发现。David Baltimore 等也因此于 1975 年荣获诺贝尔生理学或医学奖。

## (三) 病毒的装配、成熟与释放

病毒的装配与成熟是完成繁殖过程的最后环节，无囊膜的病毒，当其核酸与蛋白质装配成核壳体后，就成

为具有感染性的完整病毒粒子。对这些病毒来说，装配的过程就是成熟的过程。对于有囊膜的病毒，当其核酸与衣壳蛋白装配成核壳体后，还需要以出芽的方式包上囊膜而发育成成熟的子代病毒，囊膜实际上是嵌有病毒囊膜蛋白的特化的细胞膜。

许多无囊膜的动物病毒，如腺病毒、小 RNA 病毒等，当病毒释放时，常常引起细胞的崩解，所以释放的速度往往很快。有囊膜的病毒多以出芽的方式释放，一般病毒是逐步向细胞外释放的。

从病毒侵入细胞到子代病毒的成熟释放称为一个增殖周期（或复制周期），不同的病毒的增殖周期长短不一。病毒在体外培养细胞中增殖时，小 RNA 病毒仅需 2 个多小时。某些疱疹病毒需 10~15 h，腺病毒需 14~25 h。那么每一个动物细胞内究竟能够产生多少个病毒粒子呢？不同种病毒，甚至同一种病毒不同的株系也有很大的区别。根据电镜观察的结果统计，小 RNA 病毒与腺病毒在每个宿主细胞内能产生数以万计的病毒，而疱疹病毒与黏液病毒在每个宿主细胞内只能产生数千个病毒，痘病毒更少一些。应该指出，并不是所观察到的每个病毒颗粒都具有感染性。通过活性检测，有感染性的病毒粒子常常只占其中较少的一部分。

病毒在细胞内的增殖过程是病毒与细胞相互作用的极为复杂的过程，也是宿主细胞结构功能进行重大改组的过程。绝大多数病毒在体外培养的细胞内复制时，可以在显微镜下见到宿主细胞发生了明显的形态上的变化，称细胞病变（cytopathic effect, CPE），也有少数病毒（如猪痘病毒），虽在细胞内复制装配并释放，但并不见细胞明显的变化，甚至细胞可以带毒分裂繁殖。当病毒侵入细胞后，以一个核酸分子为模板复制大量的子代病毒时，首先要关闭或改变细胞的基因表达调控系统，“篡夺”细胞 DNA 的指导作用，同时改装宿主细胞的结构与代谢“机器”，以适应病毒的复制。因此被感染的细胞，必然要发生一系列重大结构的变化，

甚至发生细胞凋亡现象。有趣的是某些病毒蛋白起到抑制细胞凋亡的作用，使病毒得以完成其繁殖过程。以病毒为“探针”或以病毒基因组作为外源基因，研究病毒与细胞的相互关系，在理论与实践上都是十分重要的。病毒癌基因致细胞癌变过程的研究，是非常引人注目的研究课题之一。这方面的研究，不仅促进了细胞原癌基因的发现，也极大地推动了细胞生物学研究的进展。

### 三、病毒与细胞在起源与进化中的关系

病毒是非细胞形态的生命体，其生命活动只能在细胞内实现。因此，病毒与细胞在起源上的关系一直是人们很感兴趣的问题，目前存在3种主要观点：



在半个多世纪前，第一种观点占优势，过去长期认为病毒是生物与非生物之间的桥梁，病毒具有生物与非生物的两重性，按此逻辑的推理，显然是生物大分子先组装成病毒，再由病毒进化为细胞。然而，由于病毒彻底的寄生性，所有病毒必须在细胞内增殖，所以，没有细胞的存在，很难想象会有病毒的生存。因此，病毒的起源不可能先于细胞。

目前，第二与第三种观点比较容易接受。在生物起源过程中，由生物大分子分别演化出细胞与病毒这两种不同类型的生命体。但由于尚不能发现病毒的化石，因此，第三种观点即病毒是由细胞或细胞组分演化来的假说，得到了更多的实验结果的支持，例如：

(1) 在原核细胞中，环形DNA分子的附加体(episome)可以质粒(plasmid)的形式在细胞中复制，也可以整合在细菌的染色体中。其行为与细菌病毒λ噬菌体类似。

(2) 真核生物中，尤其是脊椎动物中普遍存在的第二类反转录转座子(retrotransposon或retroposon)的两端具有长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)，其结构与整合于细胞基因组上的反转录病毒十分相似。二者可能有相同的起源。

(3) 已有的证据表明，有些病毒(如腺病毒)的核酸与哺乳动物细胞DNA某些片段的碱基序列十分相似。癌基因的发现及其研究的深入加强了这种观点，因为细胞原癌基因(cellular oncogene)与反转录病毒的病毒癌基因(viral oncogene)具有相似的序列，从而普遍认为病毒癌基因起源于细胞癌基因。

由此推测：病毒可能是细胞在特定条件下“扔出”的一个“病毒基因组”，即具有复制与转录能力的DNA或RNA。这些游离的基因组，只有回到它们原来的细胞内环境中才能进行复制与转录，表现出它们作为生物体的基本属性。而一些结构复杂的大型病毒，如痘病毒很可能是细胞退化经长期演化而来，不同种类的病毒可能有不同的起源途径。

#### ● 思考题 ●

1. 如何理解“细胞是生命活动的基本单位”这一重要概念？
2. 为什么说支原体可能是最小、最简单的细胞存在形式？
3. 怎样理解“病毒是非细胞形态的生命体”？请比较病毒与细胞的区别并讨论其相互的关系。
4. 试从进化的角度比较原核细胞、古核细胞及真核细胞的异同。
5. 细胞的结构与功能相关是细胞生物学的一个基本原则，你是否能提出更多的论据来说明之。

#### ● 参考文献 ●

1. Alberts B, et al. Essential Cell Biology. 3rd ed. New York: Garland Publishing Inc., 2008.
2. Ruvinsky I, Meyuhos O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2006, 31(6): 342-348.
3. Young J K. Introduction to Cell Biology. Singapore: World Scientific Publishing Co., 2010.

# 细胞生物学研究方法

同生物学其他分支学科一样,技术的进步在细胞生物学的建立与发展中起着巨大的作用。没有显微镜的发明就不会有细胞的发现,也就不可能提出细胞学说;同样,如果没有电子显微镜技术的建立及其与分子生物学技术的相互结合,也难以想象细胞生物学会有今天这样的长足进展。那么,究竟哪些技术属于细胞生物学研究方法的范畴呢?一般来说,凡是用来解决细胞生物学问题所采用的方法都应属于细胞生物学研究方法。然而,随着学科的交叉与融合,当今几乎没有哪些生物学问题与细胞和细胞生物学无关。虽然对生物大分子结构与功能的分析是了解细胞结构与细胞生命活动的基础,在目前细胞生物学研究中也常常使用这些实验方法与技术,如基因的克隆、表达与DNA序列测定,研究特异DNA、RNA片段或蛋白质所常用的Southern杂交、Northern杂交和蛋白免疫印迹技术等。但这些技术在生物化学、分子生物学和遗传学等学科中已有介绍,本教材不再过多重复。着眼于细胞生物学的学科特点、发展历史及当前所研究的内容,本章拟从细胞形态的结构观察、细胞及其组分的分析、细胞培养与生物工程、细胞及生物大分子的动态变化等几个方面介绍有关细胞生物学研究方法,侧重于实验方法的基本原理及所能解决的问题。具体的操作步骤详见相关参考书。

## 第一节 细胞形态结构的观察方法

肉眼的分辨率一般只有0.2 mm,很难识别单个细胞;光学显微镜的分辨率能力达到0.2  $\mu\text{m}$ ,借此发现了细胞;电子显微镜分辨率高达0.2 nm,将细胞的超微结构展现在人们面前。图3-1比较了光学显微镜、电子显微镜和扫描隧道显微镜适宜观察的样品大小及分辨率。有趣的是,光学显微镜、电子显微镜和扫描隧道显微镜,除了它们因提高分辨率而称之为显微镜这一共性外,在其成像原理、仪器构造以及使用和操作等方面,几乎没有任何共同之处。

### 一、光学显微镜

17世纪,光学显微镜(light microscope)的发明使人们第一次看见了细胞,进而建立了细胞学说,为细胞学的兴起和发展打下基础。光学显微镜至今仍然是细胞生物学研究的重要工具。随着光学显微术与图像技术的快速发展,光学显微镜在研究细胞的结构与功能,特别是生物大分子在活细胞中的定位及其动态变化和相互作用等方面展示出了新的活力。

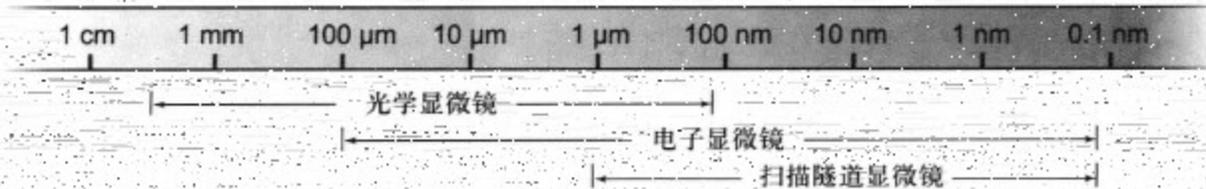


图 3-1 几种显微镜可观察的样品大小 (箭头之间的范围) 及其分辨能力 (右侧箭头所指位置)

### (一) 普通复式光学显微镜

光学显微镜主要由 3 部分组成: ① 光学放大系统 (图 3-2), 为两组玻璃透镜: 目镜与物镜; ② 照明系统: 包括光源和聚光镜, 有时另加各种滤光片以控制光的波长范围; ③ 镜架及样品调节系统。1872 年, 德国科学家阿贝 (Ernst Karl Abbe) 等研制了第一台复式显微镜, 其完美程度几乎可与现代显微镜媲美。

显微镜最重要的性能参数是分辨率 (resolution), 而不是放大倍数。分辨率是指能区分两个质点间的最小距离。分辨率的高低取决于光源的波长  $\lambda$ , 物镜镜口角  $\alpha$  (标本在光轴上的一点对物镜镜口的张角) 和介质折射率  $N$  (图 3-3), 它们之间的关系是:

$$D = \frac{0.61 \lambda}{N \cdot \sin(\alpha/2)}$$

通常  $\alpha$  最大值可达  $140^\circ$ , 空气中  $N = 1$ , 最短的可见光波长  $\lambda = 450 \text{ nm}$ , 此时分辨率  $D = 292 \text{ nm}$ , 约  $0.3 \mu\text{m}$ 。若在油镜下,  $N$  可提高到 1.5, 分辨率  $D$  值则可达  $0.2 \mu\text{m}$ ,

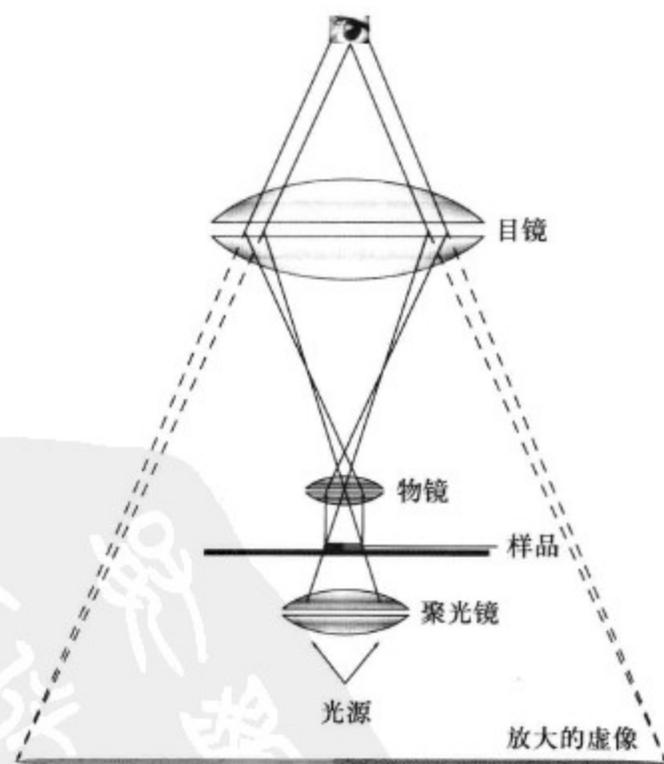


图 3-2 普通光学显微镜成像示意图

所以普通光学显微镜的最大分辨率是  $0.2 \mu\text{m}$ 。

光学显微镜可以直接用于观察单细胞生物或体外培养细胞。如果观察生物组织样品, 则通常需要对所观察的材料进行固定和包埋 (常用的固定剂如甲醛, 包埋剂如石蜡等), 再将包埋好的样品切成厚度约  $5 \mu\text{m}$  的切片, 最后进行染色 (图 3-4)。如苏木精和伊红染色 (又称 H-E 染色) 就是一种常用的染色方法。碱性染料苏木精和酸性染料伊红分别与细胞核和细胞质的某些成分特异性地结合, 从而改变透射光线的波长, 我们就可以清晰观察到蓝紫色的细胞核和红的细胞质的形态。

### (二) 相差显微镜和微分干涉显微镜

生物样品一经固定就失去了生物活性, 活细胞显微结构的细节可以借助相差显微镜 (phase-contrast microscope) 来观察。光波的基本属性包括波长、频率、振幅和相位等。可见光的波长和频率的变化表现为颜色的不同, 振幅的变化表现为亮暗的区别, 而相位的变化却是人眼不能觉察的。当两束光通过光学系统时, 会发

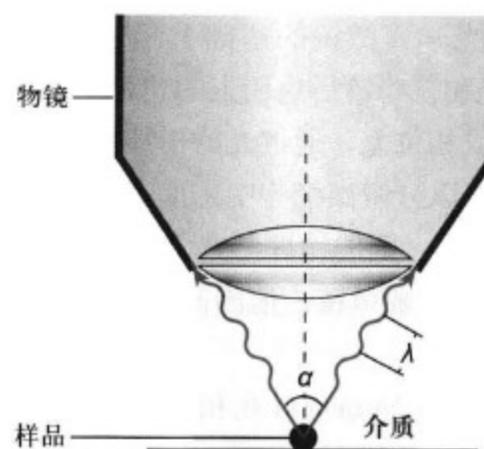


图 3-3 决定光学显微镜的分辨率的要素: 物镜的镜口角 ( $\alpha$ )、入射光的波长 ( $\lambda$ ) 以及介质的折射率 ( $N$ )

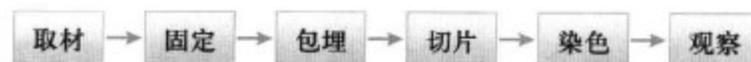


图 3-4 石蜡切片的制备程序

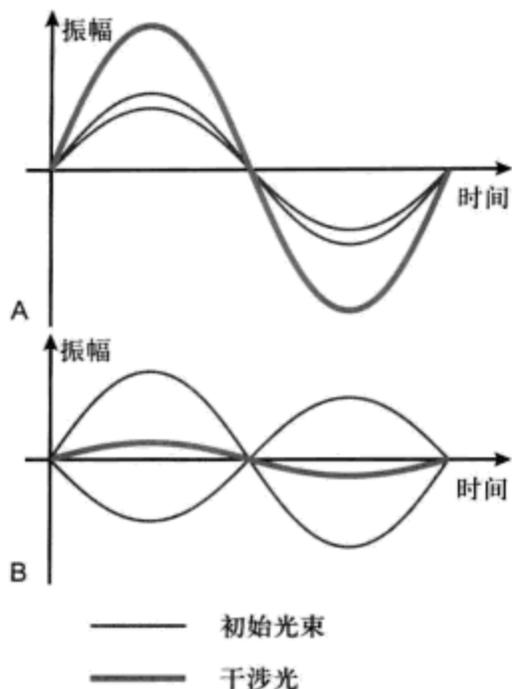


图 3-5 两束光波之间的相互干涉

- A. 当两束光的相位相同时，相互干涉的结果使光波的振幅增加。  
 B. 当两束光的相位相反时，则导致光波的振幅降低。

生相互干涉。如果它们的相位相同，干涉的结果是使光的振幅加大，亮度增强。反之，就会相互抵消而亮度变暗（图 3-5）。相差显微镜和干涉差显微镜就是利用这样的原理增强样品的反差，从而实现对非染色活细胞的观察。

光线通过不同密度的物质时，其滞留程度也不同。密度大则光的滞留时间长，密度小则光的滞留时间短，因而，其光程或相位发生了不同程度的改变。相差显微镜是在普通光学显微镜的基础上，添加两个元件，即“环状光阑”和在物镜后焦面上的“相差板”，从而可将这种光程差或相位差，通过光的干涉作用，转换成振幅差，因此，可以分辨出细胞中密度不同的各个区域（图 3-6）。1932 年，德国物理学家泽尼克（P. Zernike）制备出第一台相差显微镜，他因此项发明在 1953 年获诺贝尔物理学奖。

1952 年，G. Nomarski 在相差显微镜的基础上，发明了微分干涉显微镜（differential-interference microscope），又称 Nomarski 相差显微镜。微分干涉显微镜是以平面偏振光为光源。光线经棱镜折射后分成两束，在不同时间经过样品的相邻部位，然后再经过另一棱镜将这两束光汇合，从而使样品中厚度上的微小区别转化成明暗区别。微分干涉显微镜更适于研究活细胞。

如果将微分干涉显微镜接上高分辨率录像装置，就可以用来观察并记录活细胞中的颗粒及细胞器的运

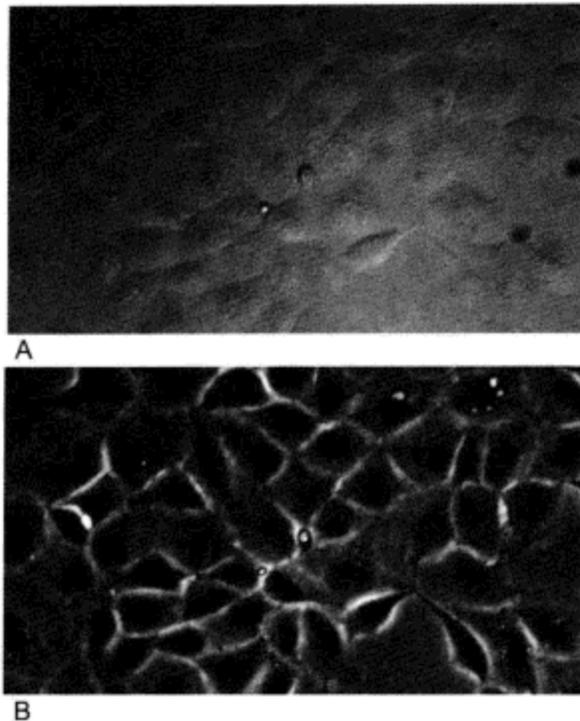


图 3-6 两种不同类型的光学显微镜所拍摄的图像比较

- 体外培养的 MDCK 细胞在普通（明视场）光学显微镜（A）和相差显微镜（B）下拍摄图像效果的比较。（梁凤霞博士惠赠）

动。计算机辅助的微分干涉显微镜可以进一步提高样品的反差并降低图像的背景“噪音”，使一些常规光学显微镜难于观察的一些显微结构，如单根微管（直径约 24 nm）等也可以在光镜下分辨出来。其分辨率比普通光镜提高了一个数量级。从而为在高分辨率条件下研究活细胞提供了必要的工具。应用这一原理制备的录像增强显微镜（video-enhance microscope）可以用来直接观察颗粒物质沿着微管运输的动态过程。

### （三）荧光显微镜

荧光显微镜（fluorescence microscope）是在光镜水平上，对细胞内特异的蛋白质、核酸、糖类、脂质以及某些离子等组分进行定性定位研究的有力工具。荧光显微镜采用的光源和光学系统均与普通光学显微镜有所不同，其核心部件是滤光片系统以及专用的物镜镜头（图 3-7A）。滤光片系统由激发滤光片（安装在光源和样品之间，只允许特定波长的激发光通过）和阻断滤光片（安装在物镜和目镜之间，只容许荧光染料所发出的荧光通过）组成。这样，通过激发滤光片的短波长的激发光，照射标记在样品中的荧光分子上，使之产生一定波长的可见光即荧光（图 3-7B）。由于荧光显微镜的暗视野为荧光信号提供了强反差背景，非常微弱的荧光信号亦可得以分辨。

荧光显微镜样品制备技术包括免疫荧光技术（见本

章第二节) 和荧光素直接标记技术。荧光染料 DAPI 特异性地直接与细胞中的 DNA 相结合, 从而显示出细胞核或染色体在细胞中的定位。这是一种常用的直接标记技术。目前, 荧光显微术得到了广泛的应用, 特别是细胞内动态变化的研究。例如, 用显微注射器将标记荧光素的肌动蛋白注射到培养细胞中, 可以看到肌动蛋白分子组装成肌动蛋白纤维的过程。又如, 将在激发光

作用下, 可产生荧光的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的基因与编码某种蛋白质的基因相融合, 利用荧光显微镜, 就可以在表达这种融合蛋白基因的活细胞中, 观察到该蛋白的动态变化。由于不同荧光素所激发出的荧光波长不同, 同一样品可以用两种以上的荧光素标记, 从而同时显示不同成分在细胞中的定位 (图 3-7C)。

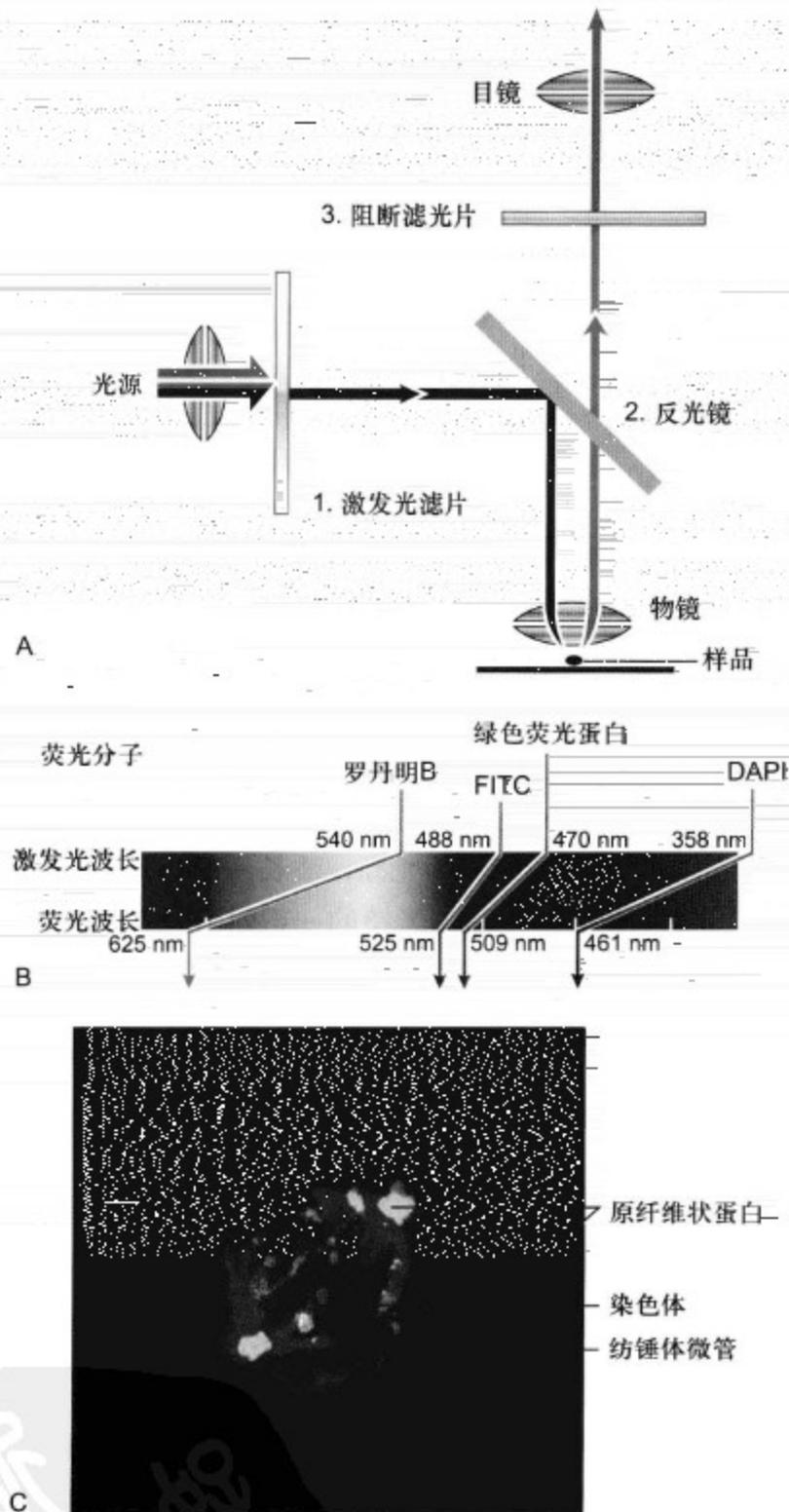


图 3-7 荧光显微镜的基本原理及其应用  
A. 荧光显微镜的工作原理与光路示意图。B. 不同荧光素所需激发光波长与所产生的荧光波长的比较。C. 荧光显微镜显示出在有丝分裂中期细胞中, 纺锤体微管 (绿色)、中期染色体 (蓝色) 和原纤维状蛋白 (fibrillar) (红色) 等结构成分。(C 图由郭焱和陈建国博士提供)

#### (四) 激光扫描共焦显微镜

在普通荧光显微镜下, 许多来自样品中焦平面以外的荧光会使观察到的图像反差减小、分辨能力降低。而激光扫描共焦显微镜 (laser-scanning confocal microscope, LSCM, 简称共焦显微镜) 相当于在荧光显微镜上安装了一套激光共焦成像系统, 并以激光 (可见或紫外激光) 为光源, 从而, 极大地提高了图像的分辨率 (图 3-8)。所谓共焦, 是指聚光镜和物镜同时聚焦到同一点上, 因而只有聚光镜聚焦在样品中的某一位点上所产生的激发荧光才能清晰成像, 而来自焦平面以外的散射光则被小孔或狭缝挡住, 再利用激光扫描装置和计算机高速采集与处理汇聚每一个点上的信息, 形成

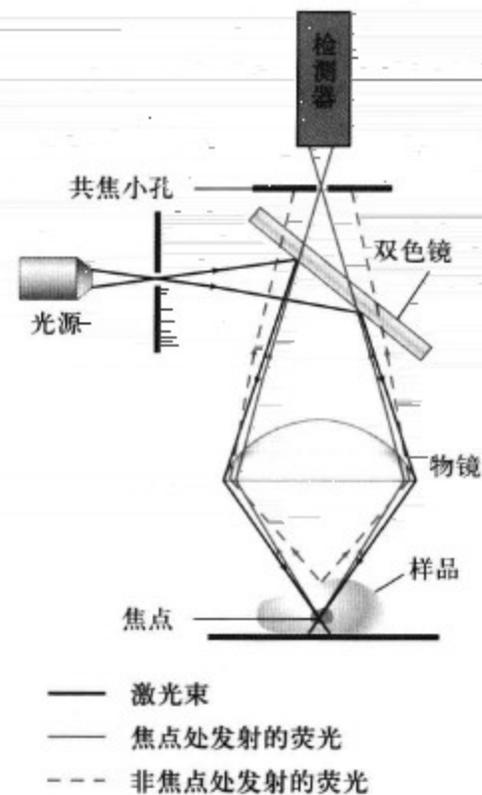


图 3-8 激光扫描共焦显微镜的原理图  
激光束 (光源) 经双色镜反射后, 通过物镜汇聚到样品某一焦点; 从焦点发射的荧光 (样品一般经免疫荧光标记) 经透镜汇聚成像, 被检测器检出; 样品其他部位发射的荧光不会聚焦成像, 因而检测器不能检出。

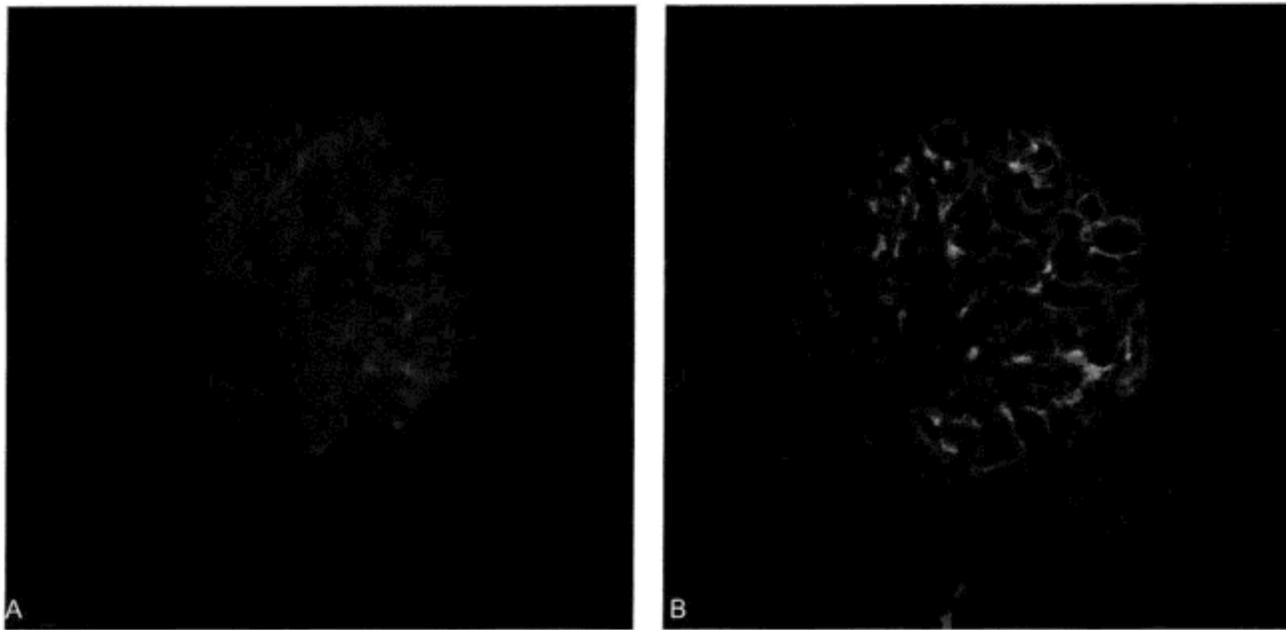


图 3-9 荧光显微镜 (A) 和激光扫描共焦显微镜 (B) 所观察图像的比较

图中显示小鼠肾小球的厚切片 (厚度  $20\mu\text{m}$ ) 中, 用不同的标记方法和不同的荧光染料, 分别显示其凝集素 (绿色), 微丝 (红色) 和细胞核 (蓝色) 的分布。激光扫描共焦显微镜所获得的图像更为清晰。(梁凤霞博士惠赠)

一幅清晰的二维图像。激光扫描共焦显微镜的分辨率可以比普通荧光显微镜的分辨率提高 1.4~1.7 倍。其纵向分辨率 (axial resolution) 也得到很大的改善。由于可自动调节并改变观察的焦平面, 所以可以通过“光学切片”即改变焦点获得一系列不同切面上的细胞图像, 经叠加后重构出样品的三维结构。早在 1955 年, 马尔文·明斯基 (Marvin Minsky) 就发明了扫描共焦显微镜。但是直到 30 年后, 随着激光光源的应用和一系列的改进, 这种新型的显微镜才得以问世。目前, 它在研究亚细胞结构与组分的定位及动态变化等方面的应用越来越广泛, 其中包括本章后面所谈到的荧光共振能量转移技术、荧光漂白恢复技术以及单分子成像技术等, 都离不开激光扫描共焦显微镜 (图 3-9)。

## 二、电子显微镜

光学显微镜技术在细胞生物学研究中起着极为重要的作用。但由于光波波长的限制, 光镜的分辨率难以得到进一步提高。只有借助分辨率更高的电子显微镜 (electron microscope, EM, 简称电镜), 才可能观察到细胞内部的精细结构。电子显微镜经过了多位科学家共同努力, 最终由德国科学家 E. Ruska 于 1932 年制作而成, Ruska 因此于 1986 年获诺贝尔物理学奖。

### (一) 电子显微镜的基本知识

电子显微镜的基本原理与光学显微镜完全不同, 构造也要比光学显微镜复杂得多。但电子显微镜的光路却与光学显微镜具有相似性 (图 3-10)。

#### 1. 电子显微镜与光学显微镜的基本区别

电子显微镜的高分辨率主要是因为使用了波长比可见光短得多的电子束作为光源, 波长一般小于  $0.1\text{ nm}$ 。光源的差异决定了电镜与光镜的一系列不同点 (表 3-1): 比如电子显微镜需要通过电磁透镜聚焦; 电镜镜筒中要求高度真空; 图像需要通过荧光屏或感光胶片进行

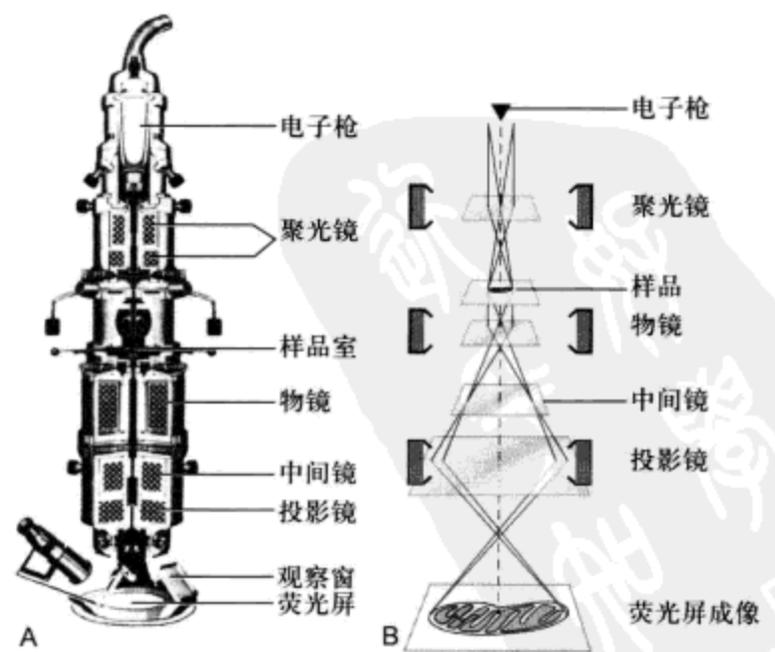


图 3-10 电子显微镜的基本结构 (A) 和成像原理 (B)

表 3-1 电子显微镜与普通光学显微镜的基本区别

	分辨本领	光源	透镜	真空	成像原理
光学显微镜	200 nm	可见光 (波长 400~700 nm)	玻璃透镜	不要求真空	利用样本对光的吸收形成明暗反差和颜色变化
电子显微镜	0.2 nm	电子束 (波长 0.01~0.9 nm)	电磁透镜	$1.33 \times 10^{-3}$ ~ $1.33 \times 10^{-5}$ Pa	利用样品对电子的散射和透射形成明暗反差

显示和记录等。

## 2. 电子显微镜的分辨本领与有效放大倍数

如前所述,人眼的分辨率一般为 0.2 mm,光学显微镜的分辨率为 0.2  $\mu\text{m}$  左右,其放大倍数为 0.2 mm/0.2  $\mu\text{m}$ ,即 1 000 倍。而电子显微镜的分辨率可达 0.2 nm,其放大倍数为  $10^6$  倍。上述放大倍数称之为有效放大倍数。如果通过光学手段继续放大,再也不会得到任何有意义的信息,因此称之为“空放大”。

电镜的分辨率与分辨本领并不等同,电镜的分辨本领是指电镜处于最佳状态下的分辨率。实际情况下,电镜的实际分辨率常常受到生物制样技术本身的限制,如在超薄切片样品中其分辨率约为超薄切片厚度的 1/10,即通常超薄切片厚度若为 50 nm,则实际分辨率约为 5 nm,远低于电镜的分辨本领 0.2 nm。

## 3. 电子显微镜的基本构造

电子显微镜主要由以下 4 部分组成(图 3-10):

(1) 电子束照明系统 包括电子枪和聚光镜。由高频电流加热钨丝发出电子,通过高电压的阳极使电子加速(这一装置称电子枪),射出的电子经聚光镜汇聚成电子束。

(2) 成像系统 包括物镜、中间镜与投影镜等。它们是经过精密加工的中空圆柱体,里面装置线圈,通过改变线圈的电流大小,调节圆柱体内空间的磁场强度。电子束经过磁场时发生螺旋式运动,最终的结果如同光线通过玻璃透镜时一样,聚焦成像。

(3) 真空系统 用两级真空泵不断抽气,保持电子枪、镜筒及记录系统内的高度真空,以利于电子的运动。

(4) 记录系统 电子成像须通过荧光屏显示用于观察,或用感光胶片或 CCD(charge coupled device)记录下来。

## (二) 主要电镜制样技术

### 1. 超薄切片技术

由于电子束的穿透能力有限,为获得较高分辨率,切片厚度一般仅为 40~50 nm,即一个直径为 20  $\mu\text{m}$  的

细胞可切成几百片,故称超薄切片(ultra thin section)。这需要样品既要有一定刚性又要有一定韧性,而生物样品并不具备这些特性,为此,样品往往需要包埋在特殊的介质中。但包埋的过程会破坏样品的细微结构,所以超薄切片样品制备的第一步就是样品的固定,以期更好地保存细胞的精细结构(图 3-11)。

(1) 固定 固定是保持样品的真实性的一个最重要的环节。固定不仅要求保持样品的形态和精细结构不发生改变;有时还要求细胞内部的成分保持在原来的位置上,甚至其免疫原性尽可能的不发生改变。透射电镜常用化学法进行样品的固定,固定剂为戊二醛和四氧化钼( $\text{OsO}_4$ ,常称为钨酸)等(表 3-2)。同时,为了更好地保存细胞的超微结构,还可以利用物理方法,如超低温冷冻等方法进行固定。在固定操作过程中,动物的处死和取材都要快速进行,并通常在低温下进行,以防细胞自溶作用造成的损伤。固定的样品块直径一般小于 1 mm,以便固定剂迅速渗透。

(2) 包埋 包埋的目的是保证在切片过程中,包埋介质能均匀良好地支撑样品,以便获得连续、完整并有足够强度的超薄切片。包埋介质要求具有良好的机械性能(如刚度和韧性等)以利于切片;在聚合过程中,不发生明显的膨胀与收缩;观察样品时,易被电子穿透并能耐受的电子轰击;在高倍放大的图像中不显示本身结构等特征。目前常用的包埋剂是各种环氧树脂。生物样品固定后含有大量水分,而包埋剂多具疏水性质。因此固定的样品在包埋前通常要经过一系列的脱水处理。

表 3-2 几种固定剂对细胞不同成分的固定效果的比较

固定剂	核酸	蛋白质	磷脂	多糖	不饱和脂肪酸
钨酸	+	++	+++	+	+++
戊二醛	+	++	+	+	+
高锰酸钾	+	+++	+++	+	+++

“+”表示固定剂对不同细胞成分的相对固定效果。

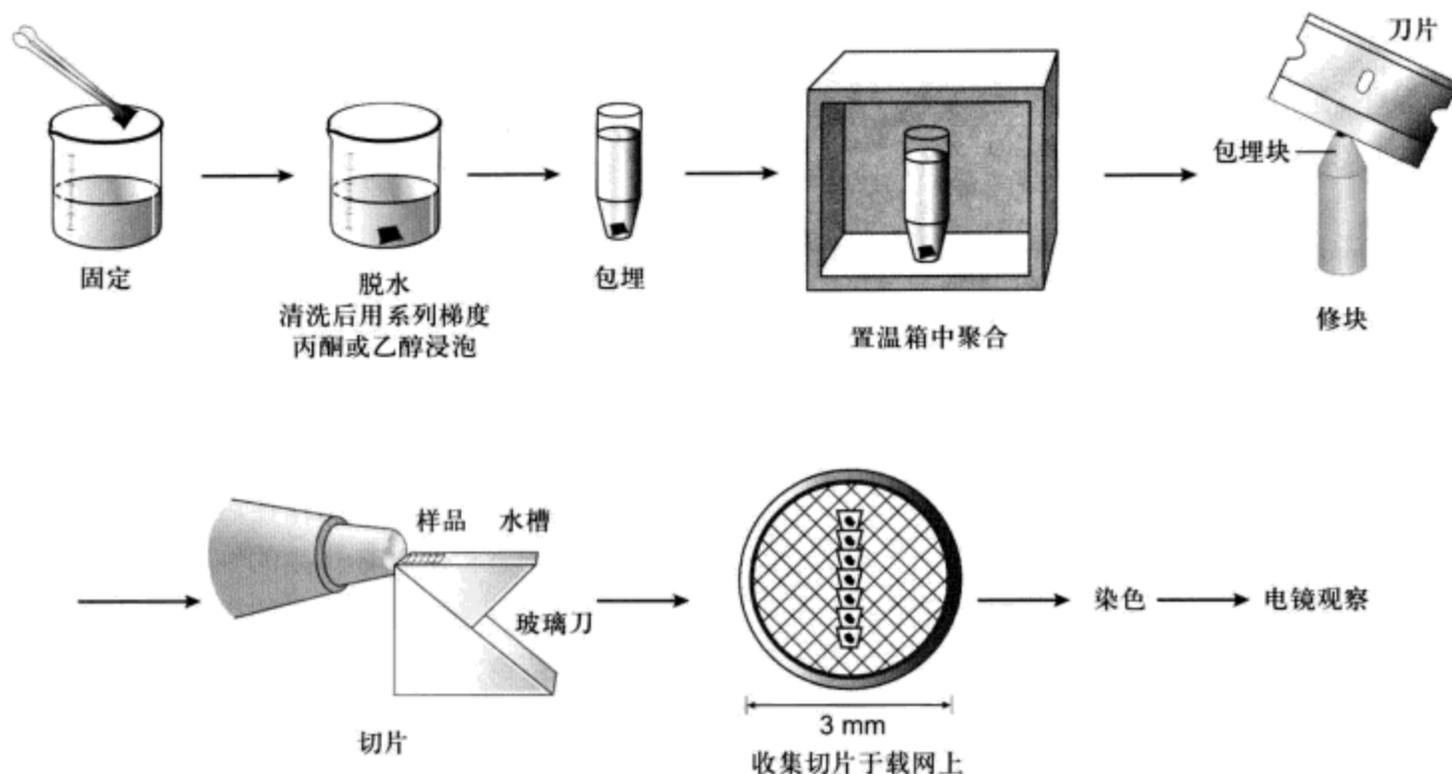


图 3-11 电镜超薄切片样本制备示意图

电镜超薄切片样本的制备包括固定、脱水、包埋、切片和染色等基本步骤。

(3) 切片 超薄切片的制备过程如图 3-11 所示。切片厚度通常是 40~50 nm。切片厚度可通过样品杆的金属热膨胀或机械伸缩来控制。切片刀以玻璃或钻石为材料，最常使用的是玻璃刀。切片须捞在覆有支持膜（如 Formvar 膜）的载网（铜网或镍网，一般直径 3 nm）上，用于染色和电镜观察。

(4) 染色 电镜样品用重金属盐进行染色。样品中的不同成分对各种重金属盐“染料”有不同的亲和性，如钨酸宜染脂质、柠檬酸铅易染蛋白质、乙酸双氧铀用以染核酸等。当电子束穿过样品时，样品中的金属离子不同程度地散射和吸收电子，在样品上形成明暗差别。因此，电镜下观察到图像只能为黑白图像。

应用超薄切片技术，几乎可以观察各种细胞的超微结构。图 3-12 即是动物细胞的超薄切片电镜图片。此外，超薄切片技术还可以与放射同位素自显影、细胞化学、免疫化学和原位杂交等技术结合，在超微结构水平上完成蛋白质与核酸等组分的定性、定位和半定量研究。

## 2. 负染色技术

经纯化的细胞组分或结构，如线粒体基粒、核糖体、蛋白颗粒及细胞骨架纤维甚至病毒等可以通过电镜负染色技术（negative staining）显示其精细结构，分辨率可达 1.5 nm 左右。负染色是用重金属盐，如磷钨酸或醋酸双氧铀溶液对铺展在载网上的样品进行染色。吸去多余染料，样品自然干燥后，整个载网上都铺上了一薄层重金属盐，从而衬托出样品的精细结构（图 3-13）。

## 3. 冷冻蚀刻技术

冷冻蚀刻技术（freeze etching）的样品制备过程包括冰冻断裂与蚀刻复型两步，因此又称冰冻断裂-蚀刻复型技术。用快速低温冷冻法，在液氮或液氩中将样品迅速冷冻，然后在低温下进行断裂。这时冷冻样品往往从其结构相对“脆弱”的部位（即膜脂双分子层的疏水端）裂开，从而显示出镶嵌在膜脂中的蛋白质颗粒。经过一段时间冰的升华（又称蚀刻），进一步增强图像“浮雕”样的效果。再用铂等重金属进行倾斜喷镀，以形成对应于凹凸断裂面的电子反差。接着，用碳进行垂直喷镀，在断裂面上形成一层连续的碳膜。最后用消化

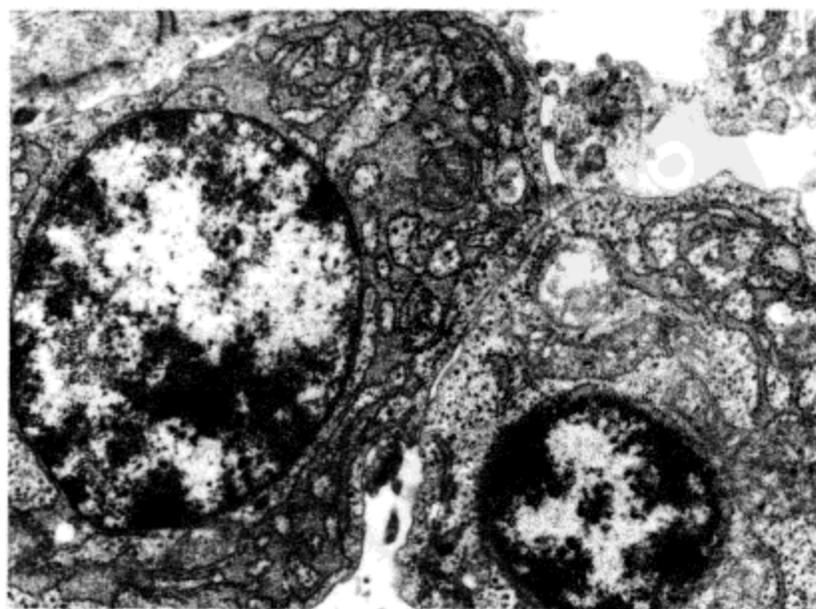


图 3-12 超薄切片技术显示的动物细胞超微结构（洪健博士惠赠）

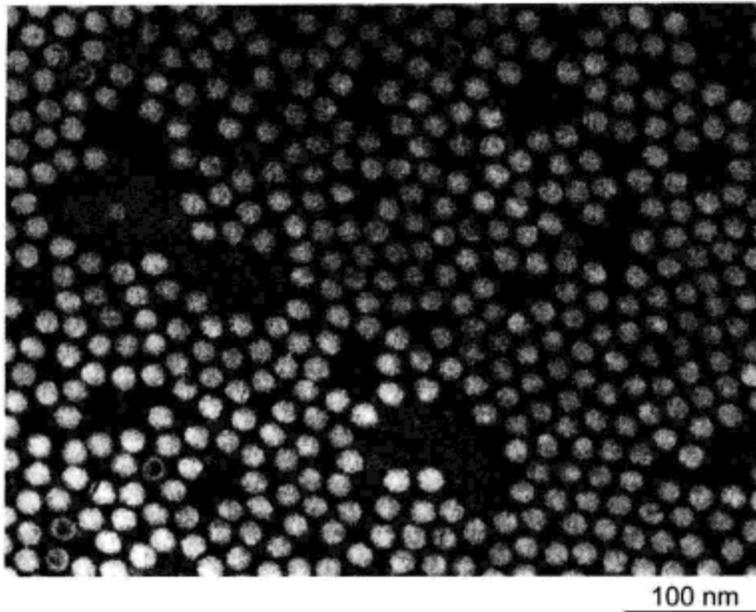


图 3-13 家蚕细小病毒负染色电镜照片 (病毒直径 20 nm)  
(陈丽华和翟中和提供)

液把生物样品消化掉, 将复型膜 (碳膜及其被碳膜包裹的, 含有图像信息的金属微粒膜) 移到载网上, 并在电

镜下进行观察 (图 3-14A)。

冷冻蚀刻技术主要用来观察膜断裂面上的蛋白质颗粒和膜表面形貌特征, 图像富有立体感, 样品不需包埋甚至也不需要固定, 因而能更好地保持样品的真实结构 (图 3-14B)。在此基础上又发展了快速冷冻深度蚀刻技术 (quick freeze deep etching), 该技术主要用于观察胞质中的细胞骨架纤维及其结合蛋白, 从而拓宽了这一技术的应用范围。

#### 4. 电镜三维重构与低温电镜技术

生物大分子的三维结构是当今生命科学研究中的核心课题之一。电镜三维重构技术是电子显微术、电子衍射与计算机图像处理相结合而形成的具有重要应用前景的一门新技术, 尤其适用于分析难以形成三维晶体的膜蛋白以及病毒和蛋白质-核酸复合物等大的复合体的三维结构。

电镜三维重构技术基本步骤是对生物样品 (如蛋白质二维晶体) 在不同的倾角下进行拍照, 得到一系列电

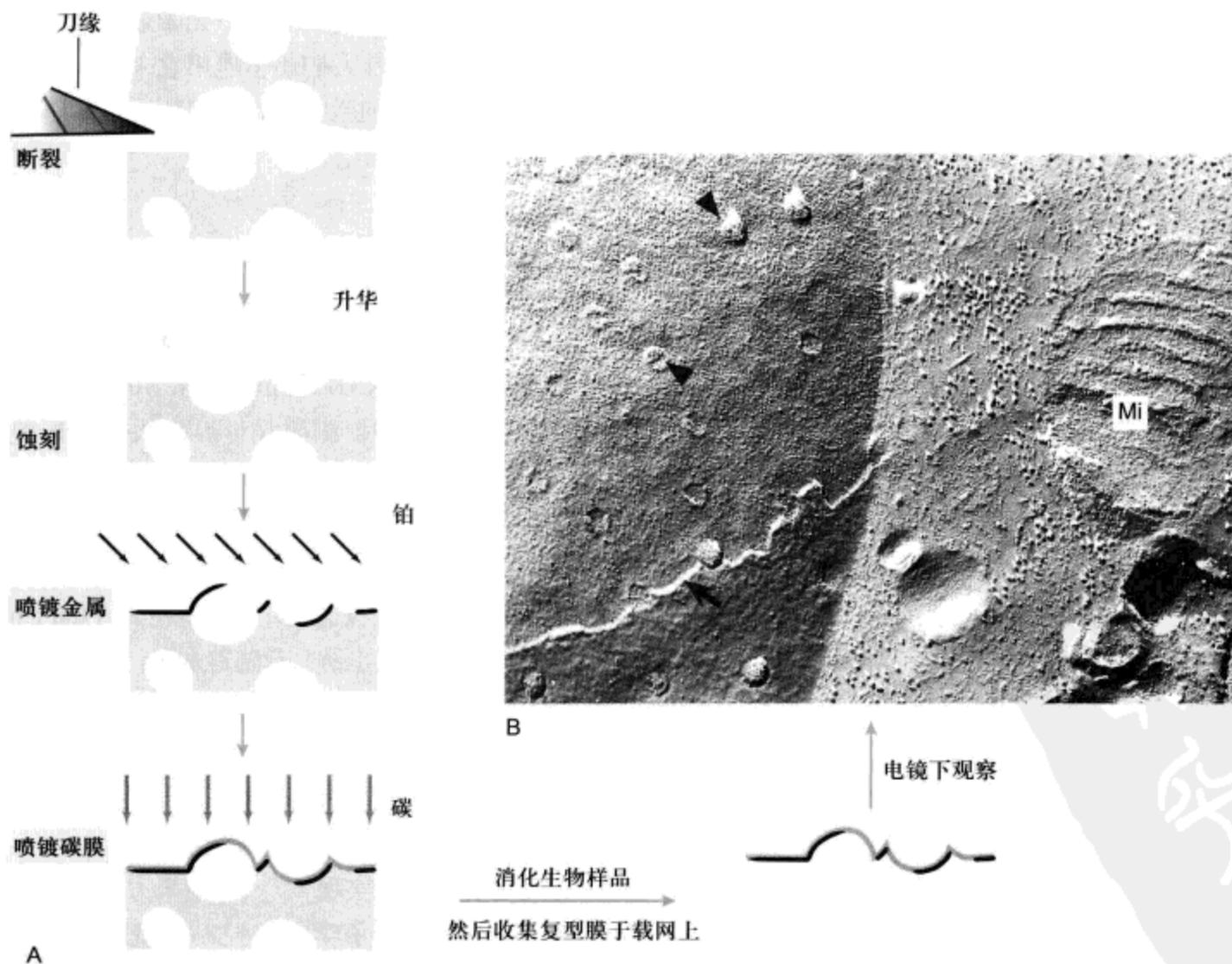


图 3-14 冷冻蚀刻技术示意图

A. 样品制备流程图。B. 牛肾原代细胞的冷冻蚀刻电镜图片, 显示双层核膜 (如箭头所示)、核孔复合体结构 (如三角所示) 以及线粒体 (Mi) 和细胞质中的囊泡等结构。(B 图由王梅和丁明孝提供)

镜图片后再经傅立叶变换等数学处理，从而展现出生物大分子及其复合物三维结构的电子密度图。

最早建立并发展这一技术是英国生物物理学家克卢格 (A. Klug)，并因此获得 1982 年诺贝尔化学奖。近年来，在此基础上发展了低温电子显微镜技术 (cryo-electron microscopy)，其样品不经固定、染色和干燥，直接包被在约 100 nm 厚的冰膜中，在电镜内 -160 °C 低温下利用相位衬度成像。该技术不仅更真实地展示出生物大分子及其复合物表面与内部的空间结构，而且还具有更高的分辨率。近年来，随着低温电镜技术的日趋完善，建立和发展了诸如研究核糖体的三维结构及在蛋白质合成中的动态变化的单颗粒 (single particle) 技术，研究细胞和细胞器三维精细结构的电子扫描断层成像技术 (electron tomography) (图 3-15) 等，它们在细胞的结构与功能的研究中，发挥着其他生物学技术所不可替代的作用。

电镜三维重构技术与 X 射线晶体衍射技术及核磁共振分析技术相结合，是当前在结构生物学 (structural biology) 领域用于研究生物大分子空间结构及其相互关系的主要实验手段。

### 5. 扫描电镜技术

扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 问世于 20 世纪 60 年代。其电子枪发射出的电子束被磁透镜汇聚成极细的电子“探针”，在样品表面进行“扫描”，激发样品表面放出二次电子。二次电子由探测器收集并被闪烁器转变成光信号，其产生的多少与样品表面的形貌相关。这样，通过扫描电镜可以得到样品表面的立体图像信息 (图 3-16)。

为了保证样品在扫描观察前不发生表面变形，通常需要利用 CO<sub>2</sub> 临界点干燥法对样品进行干燥处理。此外，为了得到正确的二次电子信号，样品表面需有良好

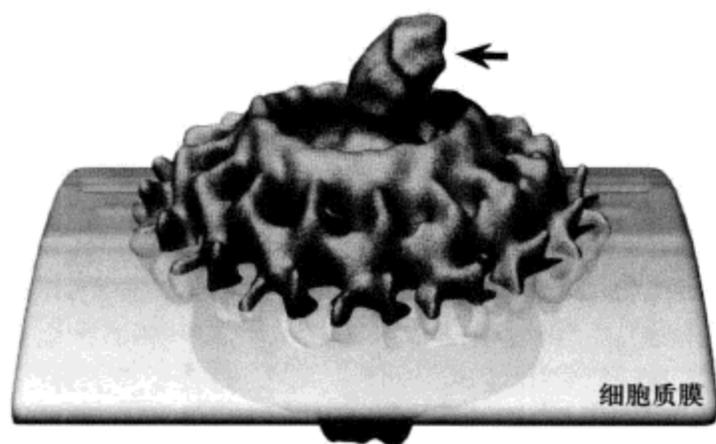


图 3-15 电子扫描断层成像技术显示细菌的部分鞭毛及其复杂的 (箭头所指) 基部结构 (刘俊博士惠赠)

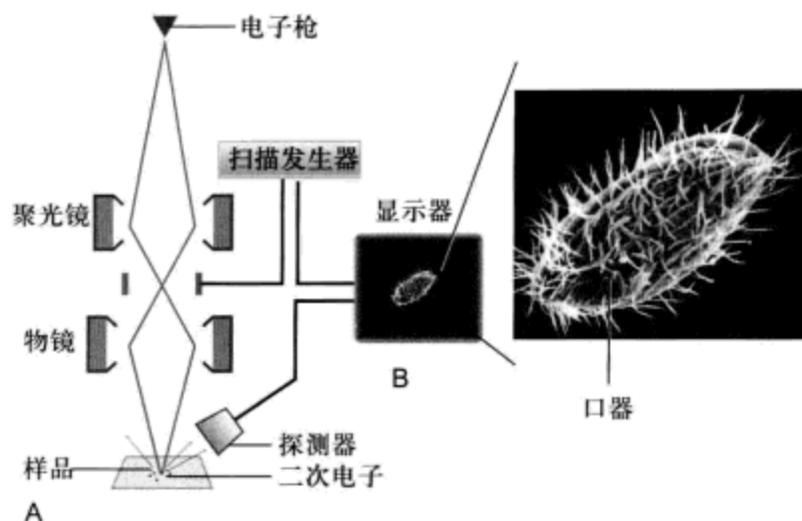


图 3-16 扫描电镜原理示意图 (A)，扫描电镜下可清晰地显示原动物四膜虫表面的纤毛和口器 (B) (B 图由韩飞和丁明孝提供)

的导电性。所以样品在观察前还要喷镀一层金膜。

扫描电镜景深长，成像具有强烈的立体感，一般扫描电镜的分辨本领仅为 3 nm。近些年研制的低压高分辨扫描电镜分辨本领可达 0.7 nm，可用于观察核孔复合体等更精细的结构。

尽管电子显微镜具有分辨率高这一光学显微镜无可比拟的优越性，但直至目前人们还不能用它来观察活的生物样品，而且难以观察细胞的全貌，因此在很多研究中仍需要光镜与电镜技术相结合。

## 三、扫描隧道显微镜

扫描隧道显微镜 (scanning tunnel microscope, STM) 是 IBM 苏黎世实验室的 G. Binnig 和 H. Rohrer 等于 1981 年发明的，它是一种探测微观世界物质表面形貌的仪器。此项发明获得 1986 年的诺贝尔物理学奖。

STM 的主要原理是利用量子力学中的隧道效应，即通常在低电压下，二电极之间具有很大的阻抗，阻止电流通过，称之为势垒。当二电极之间近到一定距离 (100 nm 以内) 时，电极之间产生了电流，称隧道电流；这种现象称隧道效应。并且隧道电流 ( $I$ ) 和针尖与样品之间的间距 ( $d$ ) 呈指数关系 [一维近似  $I \propto \exp(-2Kd)$ ,  $K$  为常数]，这样  $d$  可转化为  $I$  的函数而被测定，针尖的位置就可以确定，由此样品的表面形貌也可确定。

STM 的主要装置包括实现  $x$ 、 $y$ 、 $z$  3 个方向扫描的压电陶瓷，逼近装置、电子学反馈控制系统和数据采集、处理、显示系统。

STM 的主要特点有：① 具有原子尺度的高分辨本领，侧分辨率为 0.1~0.2 nm，纵分辨率可达 0.001 nm；

② 可以在真空、大气、液体（接近于生理环境的离子强度）等多种条件下工作，这一点在生物学领域的研究中尤其重要；③ 非破坏性测量。因为扫描时不接触样品，又没有高能电子束轰击，基本上可避免样品的形变。

目前，STM作为一种新技术，已被广泛应用于生命科学各研究领域。人们已用STM直接观察到DNA、RNA和蛋白质等生物大分子及生物膜、病毒等结构。与其功能类似的还有原子力显微镜（atomic force microscope）。原子力显微镜，顾名思义，是利用微小的探针来操纵和测量样品的形貌和力学性质。这个微小的探针在一个悬梁臂弹簧的末端，在与样品直接作用时，悬梁臂的微小位移通过“光杠杆”效应得以放大上千倍投射到光电探测器上，并通过一个反馈通路来控制探针和样品之间的相互作用。原子力显微镜不仅可以精确地测量出样品的形貌，而且，还可以测量样品的微观力学性质。其作用力范围在10 pN（皮牛）到几十个纳牛之间，恰恰适合于细胞信号分子与配体结合以及蛋白质分子的折叠和展开等研究。

可以预料，STM将在纳米生物学乃至纳米科学各领域研究中将发挥越来越重要的作用。

## 第二节 细胞及其组分的分析方法

形态学观察与细胞组分分析相结合是当代细胞生物学研究中常常采用的实验方法。它为揭示生物大分子在细胞内的空间定位、相互关系及其功能的研究提供了有力的工具。

### 一、用超离心技术分离细胞组分

用低渗匀浆、超声破碎或研磨等方法可使细胞质膜破损，形成细胞核、线粒体、叶绿体、内质网、高尔基体、溶酶体等细胞器和细胞组分组成的混合匀浆，再通过差速离心，即利用不同的离心速度所产生的不同离心力，将各种质量和密度不同的亚细胞组分和各种颗粒分开（图3-17）。

密度梯度离心是将要分离的细胞组分小心地铺放在含有密度逐渐增加的、高溶解性的惰性物质（如蔗糖）形成的密度梯度溶液表面，通过重力或离心力的作用使样品中不同组分以不同的沉降率沉降，形成不同的沉降带。各组分的沉降率与它们的形状和大小有关，通常以沉降系数（S值）表示。超速离心机可达转数 $1 \times 10^5$  r/min，产生60万倍重力场。在这巨大离心力的作用下，甚至相当小的tRNA（沉降系数4 S）和单一的酶都可根据其沉降系数相互分离开。密度梯度离心又可分为速度沉降和等密度沉降两种。常用的介质有蔗糖和氯化铯等。

速度沉降主要是用于分离密度相近而大小不一的细胞组分。离心前，将要分离的细胞匀浆物放置在蔗糖浓度梯度（通常为5~40 g/100mL）溶液的上层，各种细胞组分根据它们的大小以不同的速度沉降，形成不同的沉降带（图3-18），然后分别收集不同的沉降带中的组分，用于分析。

等密度沉降用于分离不同密度的细胞组分。细胞组分在连续梯度的高密度介质中经离心力场长时间的作用沉降或漂浮到与自身密度相等的位置，形成不同的密度区带。这种方法非常灵敏，甚至可以将掺入重同位素

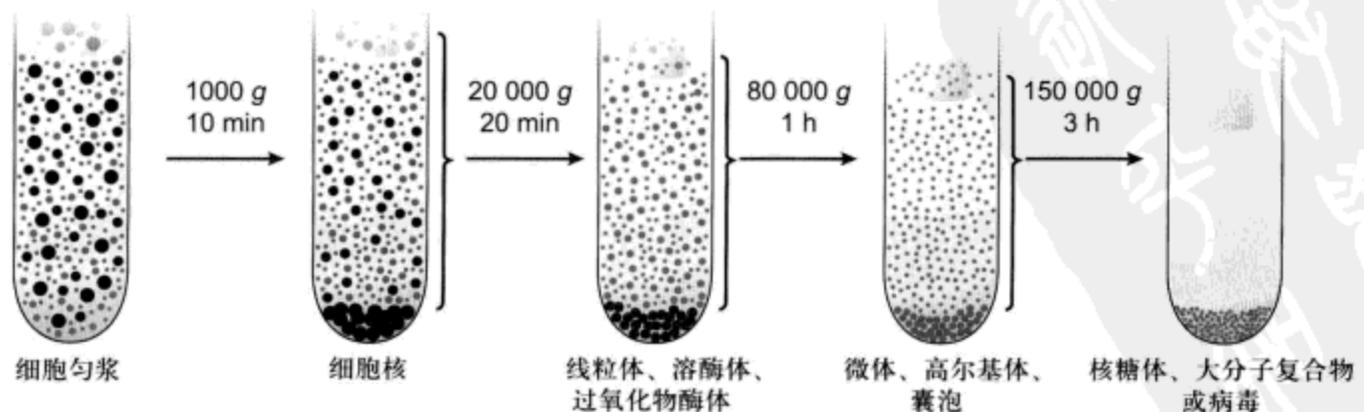


图3-17 用差速离心法分离细胞匀浆中的各种细胞组分

图中显示，随着离心力（g）大小和离心时间的不同，各种细胞组分沉淀在不同的离心管中。

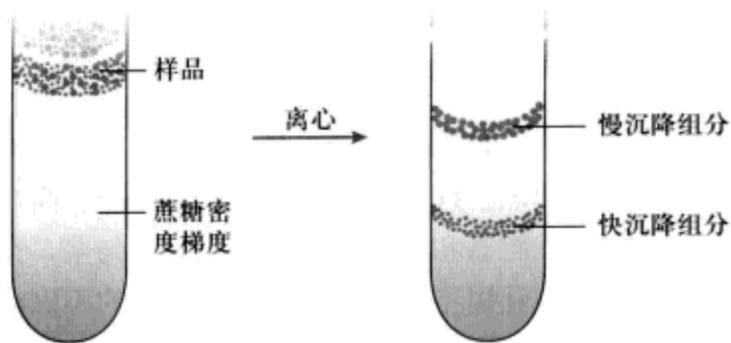


图 3-18 用密度梯度离心分离细胞组分示意图

如  $^{14}\text{C}$  或  $^{15}\text{N}$  的生物大分子和未标记物分开。1957 年, Meselson 和 Stahl 利用  $^{15}\text{N}$  标记大肠杆菌 DNA, 并用氯化铯等密度沉降法直接证明了 DNA 的半保留复制。

## 二、细胞成分的细胞化学显示方法

为了测定蛋白质、核酸、多糖和脂质等细胞组分, 通常利用一些显色剂与所检测物质中一些特殊基团特异性结合的特征, 通过显色剂在细胞中的定位及颜色的深浅来判断某种物质在细胞中的分布和相对含量。

例如福尔根反应可以特异显示呈紫红色的 DNA 的分布。其原理是: 酸水解可以去除 RNA, 仅保留 DNA, 并除去 DNA 上嘌呤脱氧核糖核苷键的嘌呤, 使脱氧核糖的醛基暴露。所暴露的自由醛基与希夫试剂 (Schiff's reagent) 反应呈紫红色。PAS 反应则利用过碘酸氧化作用生成醛基, 醛基与碱性品红反应产生紫红色化合物, 用于确定多糖的存在。

四氧化钼与不饱和脂肪酸反应呈黑色, 用以证明脂滴的存在。而苏丹 III (深红色) 染色则通过扩散进入脂滴中, 使脂滴着色。

样品中的蛋白质成分也有多种检测方法。在米伦反应 (Millon reaction) 中, 氮汞试剂与组织中的蛋白质侧链上的酪氨酸残基反应, 形成红色沉淀。在重氮反应中, 氢氧化重氮与酪氨酸、色氨酸和组氨酸起反应形成有色的复合物。蛋白质中的  $-\text{SH}$  基可用形成硫醇盐共价键的试剂进行检测。

由于大多数固定剂对酶都有失活或称钝化作用, 所以, 在进行细胞中某种酶的定性研究时, 样品制备常采用冰冻切片, 或以冷丙酮、甲醛进行短时间固定, 以尽量保持酶的活性, 然后将样品 (细胞或组织切片) 与适宜底物共同温育。例如检测碱性磷酸酶的格莫瑞 (Gomori) 方法, 是用甘油磷酸酯做底物, 由于酶水解

释放的磷酸根, 在钙离子存在的情况下转变成不溶性的磷酸钙, 进而转变成金属银或硫化铅、硫化钴或其他有颜色的化合物, 金属沉淀或颜色的存在部位, 即碱性磷酸酶在细胞中存在的部位。

## 三、特异蛋白抗原的定位与定性

20 世纪 70 年代以来, 免疫学的迅速发展为细胞生物学的研究提供了强有力的手段, 特别是在细胞内特异蛋白的定位与定性方面, 单克隆抗体与其他一些检测手段相结合发挥了重要作用。免疫荧光与免疫电镜是最常见的研究细胞内蛋白质分子定位的重要技术, 而对蛋白质组分进行体外分析定性通常则采用免疫印迹 (Western blotting)、放射免疫沉淀 (radioimmuno-precipitation) 和蛋白质芯片、质谱分析等技术, 这里不再一一介绍。

### (一) 免疫荧光技术

前面已经介绍了荧光显微镜技术, 其中也提到免疫荧光技术。所谓免疫荧光技术就是将免疫学方法 (抗原-抗体特异结合) 与荧光标记技术相结合用于研究特异蛋白抗原在细胞内分布的方法, 它包括直接和间接免疫荧光技术两种 (图 3-19)。实验步骤主要包括荧光抗体的制备、标本的处理、免疫染色和观察记录等过程。标本处理有多种方法, 组织切片、冷冻切片、整装细胞都可应用, 其宗旨只有一个, 即要尽量完好地保持被检测蛋白质的抗原性; 免疫染色就是抗原-抗体反应的过程, 这里要注意设立各种实验对照以保证结果的可靠性。除免疫荧光技术外, 还可用免疫酶标记技术, 即以酶 (如辣根过氧化物酶) 代替荧光素与抗体偶联, 因此可在普通显微镜下观察。近年来, 激光扫描共焦显微镜的应用使免疫荧光技术在细胞生物学研究中发挥了越来越大的作用。

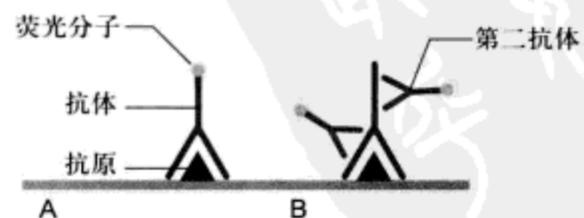


图 3-19 直接免疫荧光标记与间接免疫荧光标记技术

A. 直接免疫荧光标记技术: 将荧光分子与抗体偶联后直接用于免疫标记技术。B. 间接免疫标记技术: 先将抗体 (称第一抗体) 与抗原反应, 然后加入与荧光分子相偶联的抗第一抗体的抗体 (称第二抗体)。

## (二) 免疫电镜技术

免疫荧光技术快速、灵敏、特异性强，但其分辨率有限。免疫电镜技术则能有效地提高样品的分辨率，在超微结构水平上研究特异蛋白抗原的定位。

免疫电镜技术可分为免疫铁蛋白技术、免疫酶标技术与免疫胶体金技术，其主要区别是与抗体结合的标志物不同，这在一定程度上也反映了免疫电镜技术的发展过程。目前，免疫铁蛋白技术几乎已无人问津，而免疫胶体金技术则受到越来越多的青睐。胶体金本身具有许多优点，如：在电镜下金颗粒容易识别，并可以制成 5 nm、10 nm 或 20 nm 等不同直径的金颗粒，用以双重标记或多重标记。

免疫电镜技术的样品制备程序与免疫荧光技术类似(图 3-20)，包括样品的固定、包埋、超薄切片制备、免疫标记和染色等步骤。其技术关键是既要保持样品中蛋白的抗原性，又要尽量保存样品的精细结构。免疫电镜技术至今已得到广泛应用。

## 四、细胞内特异核酸的定位与定性

细胞内特异核酸(DNA 或 RNA)的定性及定位的研究，通常采用原位杂交(*in situ hybridization*)技术。用标记的核酸探针通过分子杂交确定特异核苷酸序列在染色体上或在细胞中的位置的方法称为原位杂交。

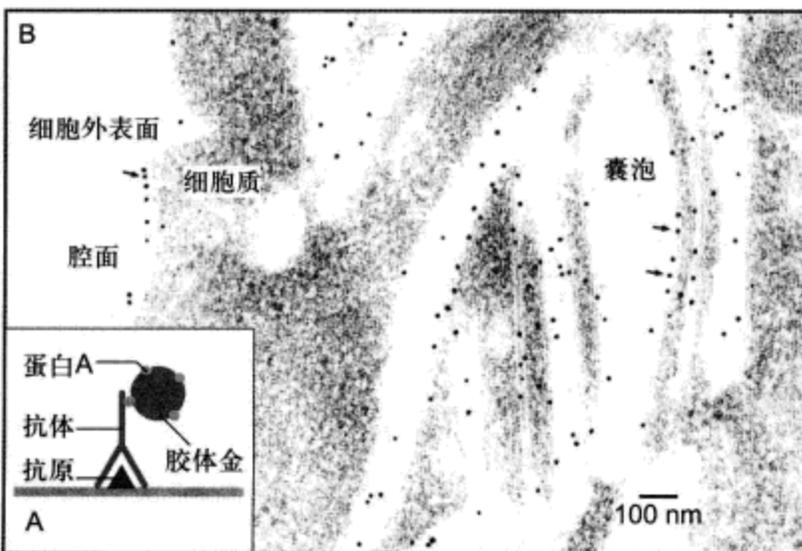


图 3-20 免疫胶体金电镜技术的基本原理与应用

A. 免疫胶体金标记技术原理的示意图：细菌蛋白 A 可与胶体金结合，也可以与抗体(如 IgG)的 Fc 端特异结合。B. 免疫胶体金标记显示膀胱上皮细胞膜蛋白的分布(箭头所指)。(B 图由梁凤霞和丁明孝提供)

原位杂交技术首先是在光镜水平上发展起来的，放射性同位素标记的探针与样品中的 DNA 或 RNA 杂交后，用显微放射自显影的方法显示杂交物的存在部位；或用荧光素标记的探针进行杂交，在荧光显微镜下直接显示细胞中与探针杂交的特异核酸。近年来，以生物素等生物小分子代替同位素或荧光素标记探针，使原位杂交技术得到了更为广泛的应用发展。电镜原位杂交技术可将特异序列核苷酸的定位与细胞的超微结构结合起来，其基本原理与光镜原位杂交类似，只是探针标记物不同，杂交反应的检测常常是通过与抗生物素抗体相连的胶体金颗粒显示出来的。

原位杂交技术在显微与亚显微水平上研究基因定位、特异 mRNA 表达等问题的研究中具有重要作用(图 3-21)。

## 五、定量细胞化学分析与细胞分选技术

前面介绍了细胞内不同成分的细胞化学定性及定位方法，然而蛋白质或核酸等生物大分子在某个细胞中或细胞群体中的含量分析对了解该物质的生物学功能是十分重要的。从前人们常用显微分光光度测定技术，目前流式细胞术得到了越来越广泛的应用。

流式细胞术(flow cytometry)可定量地测定某一细胞中的 DNA、RNA 或某一特异的标记蛋白的含量，以及细胞群体中上述成分含量不同的细胞的数量，它还可

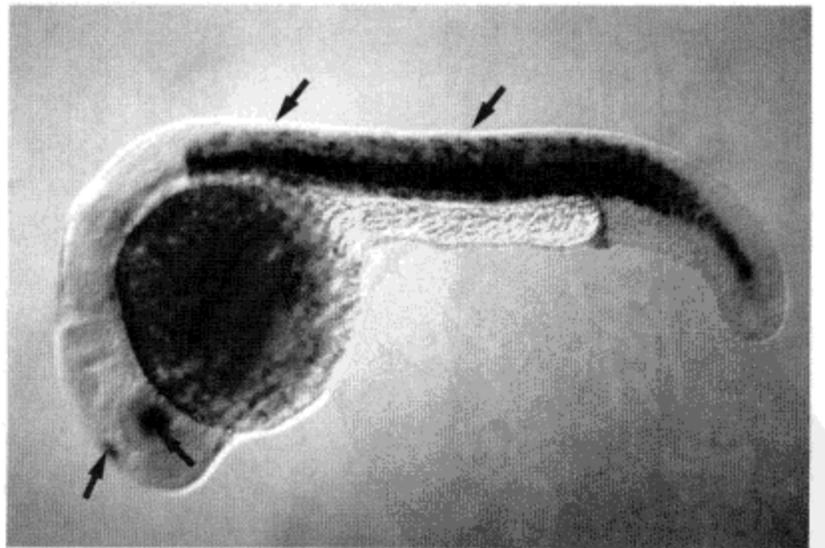


图 3-21 用原位杂交技术显示 Z13 基因在受精后 1 d 的斑马鱼胚胎的体节、眼和松果体中的表达(箭头所指)。(张博博士惠赠)

将某一特异染色的细胞从数以万计的细胞群体中分离出来，以及将 DNA 含量不同的中期染色体分离出来，甚至可用于细胞的分选。

细胞群体一般需要分散后对待测的某种成分进行特

异的荧光染色，然后便悬液中的细胞一个个快速通过流式细胞仪（每秒可达几万个细胞）。当含有单个细胞的液滴通过激光束时，带有不同荧光的细胞所在的液滴被充上正电荷、负电荷，或不被充电，同时检测器可测出并记录每个细胞中的待测成分的含量。因带有不同表面标志的细胞所带的电荷的种类不同，当液滴通过高压偏转板时，带不同电荷的液滴发生偏转，从而达到将细胞分选的目的（图 3-22）。如果染色过程不影响细胞活性，那么分离出来的细胞还可以继续培养。

## 第三节 细胞培养与细胞工程

### 一、细胞培养

细胞培养是当前细胞生物学乃至整个生命科学研究与生物工程中最基本的实验技术。干细胞生物学的发展及其应用在很大程度上基于细胞培养技术的发展。细胞培养包括原核生物细胞（如大肠杆菌）、真核单细胞（如酵母菌、四膜虫等）、植物细胞与动物细胞的培养以及与此密切相关的病毒的培养。本节扼要介绍动植物细胞培养技术以及与细胞培养直接相关的一些技术。

#### （一）动物细胞培养

体外培养的动物细胞可分为原代细胞（primary culture cell）与传代细胞（subculture cell）。原代细胞是指从机体取出后立即培养的细胞，进行传代培养后的细胞即称为传代细胞。也有人把传至 10 代以内的细胞统称为原代细胞培养。适应在体外培养条件下持续传代培养的细胞称为传代细胞。

任何动物细胞的培养均需从原代细胞培养做起。动物很多组织的细胞，如幼年动物的肾、肺、卵巢、精巢、肌肉及肿瘤等组织的细胞较易培养，而神经细胞等则较难培养。原代细胞培养步骤如下：首先取出健康动物的组织块，剪碎，用浓度与活性适中的胰酶或胶原酶与 EDTA（整合剂）等将细胞连接处消化分散，给予良好的营养液与无菌的培养环境（接近体温与体内 pH），在培养中进行静止或慢速转动培养。但不论用何种培养液一般都要加一定量的小牛（或胎牛）血清，这样细胞才能很好地贴壁生长与分裂（图 3-23）。

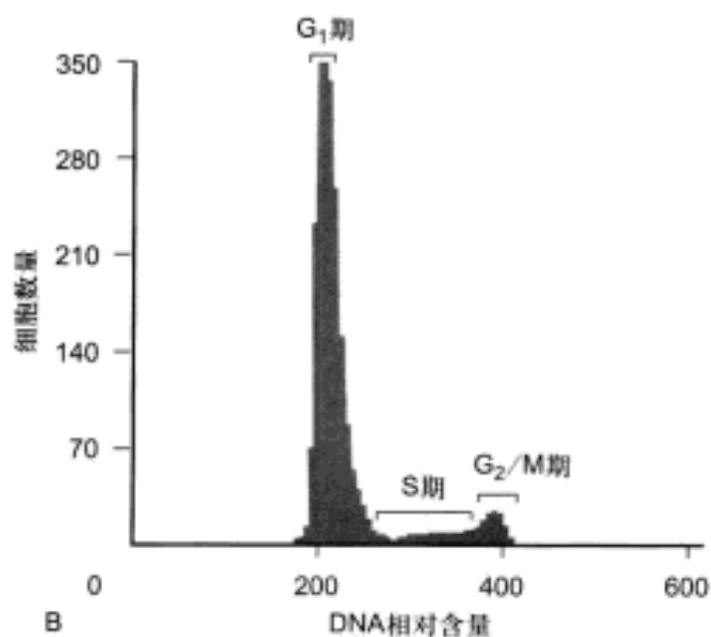
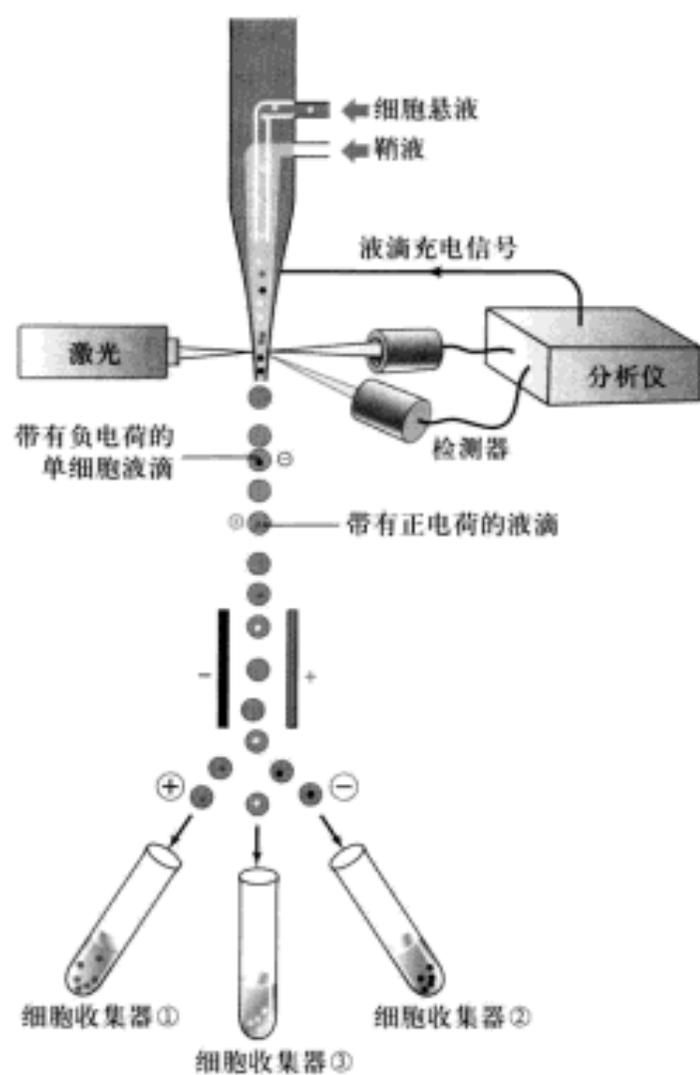


图 3-22 流式细胞仪的工作原理

A. 流式细胞仪分选原理示意图。B. 显示流式细胞仪分析处在不同时期的 HeLa 细胞的实验结果。（B 图由杜立颖老师惠赠）

分散的细胞悬液在培养瓶中很快（在几十分钟至数小时内）就贴附在瓶壁上，称为细胞贴壁。分散呈圆球形的细胞一经贴壁就迅速铺展并开始有丝分裂，逐渐形成致密的细胞单层，称为单层细胞（single layer cell），这种培养方法称为单层细胞培养。

原代培养的细胞一般传至 10 代左右就不易传下去了，细胞生长出现停滞，大部分细胞衰老死亡，但有极少数细胞可能渡过“危机”而传下去。这些存活的细胞一般又可顺利地传 40~50 代次，并且仍保持原来染色体的二倍体数量及接触抑制的行为，很多学者把这种传代细胞称作细胞系（cell line）。一般情况下（胚胎干细胞等除外），当细胞传至 50 代以后又要出现“危机”，难以再传下去。这种传代次数有限的体外培养细胞通常称为有限细胞系（finite cell line）。但在传代过程中如有部分细胞发生了遗传突变，并使其带有癌细胞的特点，有可能在培养条件下无限制地传代培养下去，这种传代细胞称为永生细胞系（infinite cell line），或连续细胞系

（continuous cell line）。该细胞系细胞的根本特点是染色体明显改变，一般呈亚二倍体或非整倍体，失去接触抑制，容易传代培养。HeLa 细胞系（来自宫颈癌细胞）、BHK21（baby hamster kidney）细胞系与 CHO（chinese hamster ovary）细胞系等都是常用的连续细胞系。依靠这些细胞系做了大量卓有成效的研究工作。

用单细胞克隆培养或通过药物筛选的方法从某一细胞系中分离出单个细胞，并由此增殖形成的，具有基本相同的遗传性状的细胞群体称为细胞克隆。该细胞群体经过生物学鉴定，如具有特殊的遗传标记或性质，这样的细胞系可以称为细胞株。

体外培养的细胞，不论是原代细胞还是传代细胞，一般不能保持体内原有的细胞形态。但大体可以分为两种基本形态：成纤维样细胞（fibroblast like cell）与上皮样细胞（epithelial like cell）。此外还有一些可移动的游走细胞。

某些传代细胞还可用悬浮方法培养。其培养条件比较复杂，悬浮培养的最大优点是在有限的培养液中获得大量细胞。

## （二）植物细胞培养

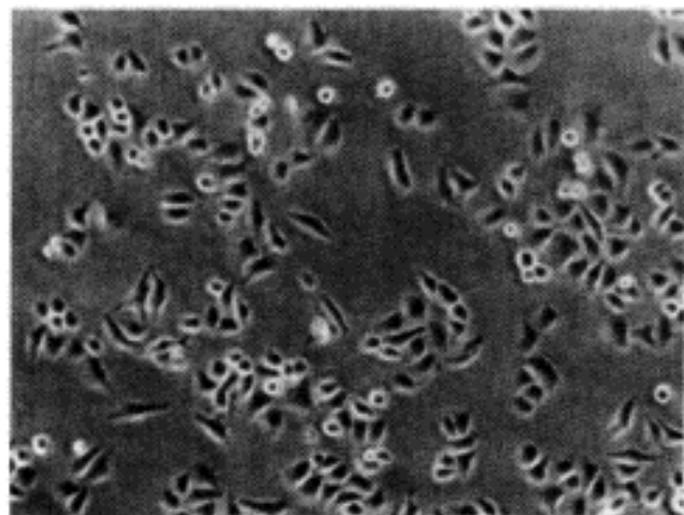
目前植物细胞培养主要有两种类型：

（1）单倍体细胞培养 这种培养方法主要用花药在人工培养基上进行培养。可以从小孢子（雄性生殖细胞）直接发育成胚状体，然后长成单倍体植株；或者通过愈伤组织诱导分化出芽和根，最终长成植株。单倍体细胞培养在植物育种中已取得了很大成就。

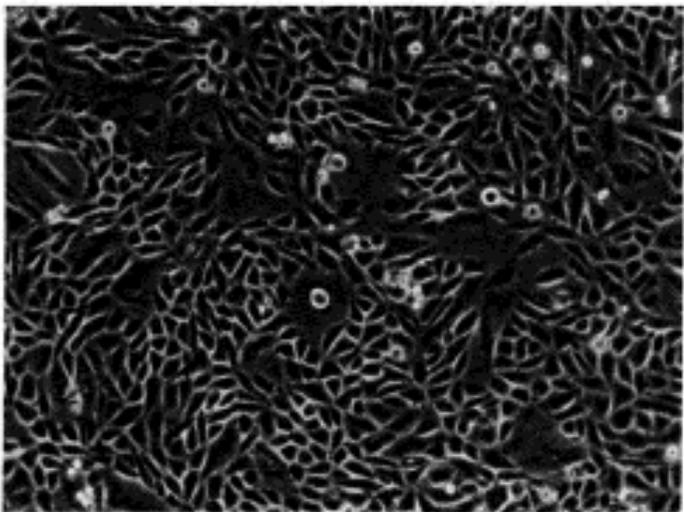
（2）原生质体培养 一般用植物的体细胞（二倍体细胞），先经纤维素酶处理去掉细胞壁，去壁的细胞称为原生质体（protoplast）。原生质体在无菌培养基中可以生长与分裂，经过诱导分化最终可长成植株。也可以用不同植物的原生质体进行融合与体细胞杂交，由此而获得体细胞杂交的植株。转基因植物细胞的培养与分化的研究是植物基因工程的基础。

## 二、细胞工程

细胞工程是生物工程的重要领域之一。细胞工程所涉及的主要技术包括细胞培养、细胞分化的定向诱导、细胞融合和显微注射等。通过细胞融合技术发展起来的单克隆抗体技术已取得了重大成就。细胞工程与基因工程结合，前景尤为广阔。



A



B

图 3-23 体外培养的细胞

A. 正在生长分裂的 HeLa 细胞。B. 长满单层的 CHO 原代细胞。

（任显辉和邱殷庆博士惠赠）

## （一）细胞融合与单克隆抗体技术

两个或多个细胞融合成一个双核或多核细胞的现象称为细胞融合 (cell fusion)。介导动物细胞融合常用的促融剂有灭活的病毒 (如仙台病毒) 或化学物质 (如聚乙二醇, PEG); 植物细胞融合时, 要先用纤维素酶去掉细胞壁, 然后才便于原生质体融合。20 世纪 80 年代又发明了电融合技术 (electrofusion method)。将悬浮细胞在低压交流电场中聚集成串珠状细胞群, 或对相互接触的单层培养细胞, 再施加高压电脉冲处理使其融合。

细胞融合可以在基因型相同的细胞间进行, 也可在基因型不同的种内细胞间甚至种间细胞间进行。基因型相同的细胞形成的融合细胞称为同核体 (homokaryon); 基因型不同的细胞形成的融合细胞称为异核体 (heterokaryon)。含有两个核的同核体可通过同步有丝分裂产生含有异常核的单核子细胞, 其染色体数为正常数目的两倍, 这些染色体是从原来两个核承袭而来的。通过细胞杂交形成的单核子细胞称为合核体 (synkaryon)。种间异核体也可有繁殖能力。杂交细胞在培养过程中会发生染色体丢失现象。实验表明, 在种内杂交的例子中, 凡是亲本细胞亲缘关系比较近的, 则所得的杂交细胞的核型比较稳定, 在连续培养中染色体丢失的速度很慢。在人、鼠杂交细胞中, 人的染色体丢失很快。单克隆抗体技术就是基于细胞融合研究的基础上建立的细胞工程技术。

1975 年, 英国科学家 C. Milstein 和 G. J. F. Köhler 将产生抗体的淋巴细胞同肿瘤细胞融合, 成功地建立了 B 淋巴细胞杂交瘤技术 (B-lymphocyte hybridomas techniques) 用于制备单克隆抗体 (monoclonal antibody), 他们因此而获得 1984 年的诺贝尔生理学或医学奖。动物受到外界抗原刺激后可激发 B 淋巴细胞活化, 产生相应的抗体, 但 B 淋巴细胞在体外难以增殖, 而一些骨髓瘤细胞 (TK 或 HGPRT 缺陷型) 不分泌抗体, 但在体外培养条件下可以无限传代。Milstein 和 Kohler 为了大量制备纯一的单克隆抗体, 他们把小鼠骨髓瘤细胞与经绵羊红细胞免疫过的小鼠脾细胞 (B 淋巴细胞) 在聚乙二醇或灭活的病毒的介导下发生融合。融合后的杂交瘤细胞具有两种亲本细胞的特性, 一方面可分泌抗绵羊红细胞的抗体, 另一方面像肿瘤细胞一样, 可在体外培养条件下或移植到体内无限增殖。由于骨髓瘤细胞缺乏 TK 或 HGPRT, 在含氨基蝶呤的培养液内不能成活。只有融合细胞才能在含 HAT (次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺

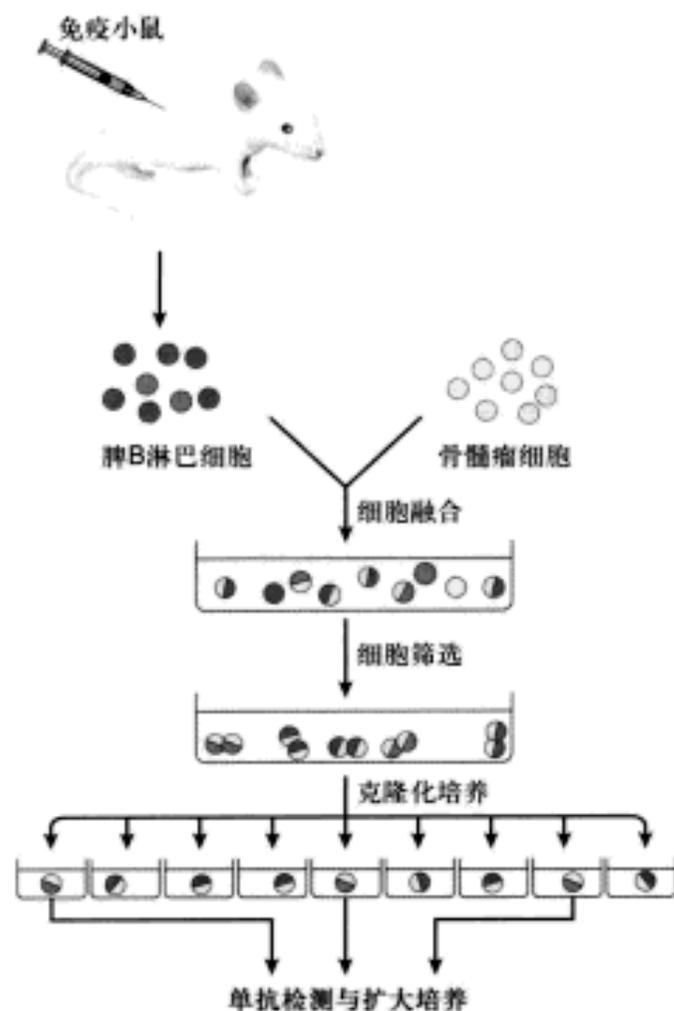


图 3-24 单克隆抗体制备过程示意图

嘧啶核苷) 的培养液内通过旁路合成核酸而得以生存。通过 HAT 选择培养和细胞克隆, 可以获得能大量分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。单克隆抗体的制备过程如图 3-24 所示。

单克隆抗体技术最主要的优点是可以利用混合性的异质抗原制备出针对某单一性抗原分子上特异决定簇的同质性单克隆抗体。单克隆抗体技术与基因克隆技术相结合为分离和鉴定新的蛋白质和基因开辟了一条广阔途径。而且在临床诊断与肿瘤等疾病的治疗中也具有重要作用。

## （二）显微操作技术与动物的克隆

真核细胞是由细胞核和细胞质两大部分组成的, 为了探明核质相互作用的机制, 科学家们创建了细胞拆合技术。所谓细胞拆合就是把细胞核与细胞质分离开来, 然后把不同来源的胞质体 (cytoplast) 和核体 (karyoplast) 相互组合, 形成核质杂交细胞。

细胞拆合可以分为物理法和化学法两种类型。物理法就是用机械方法或短波光把细胞核去掉或使之失活, 然后用微吸管吸取其他细胞的核, 注入去核的细胞

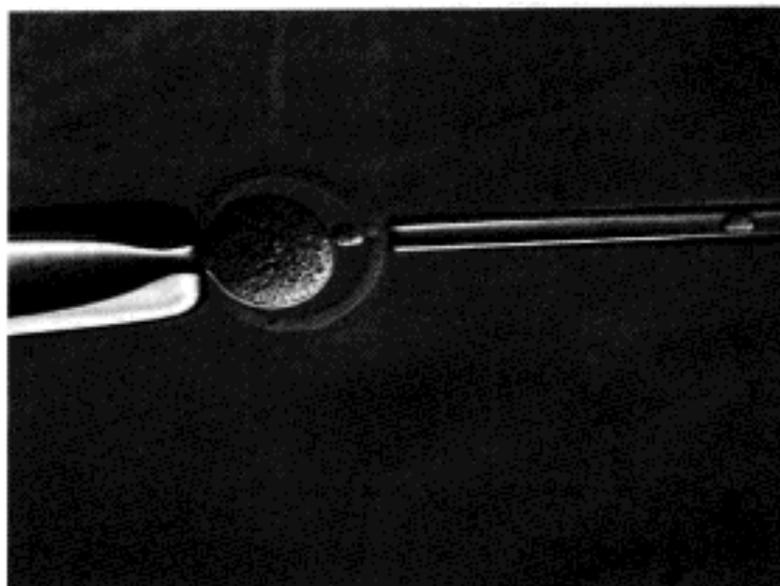


图 3-25 应用显微注射技术进行细胞核移植 (邓宏魁博士惠赠)

质中,组成新的杂交细胞。这种核移植必须用显微操纵仪进行操作。化学法是用细胞松弛素 B (cytochalasin B) 处理细胞,细胞出现排核现象,再结合离心技术,将细胞拆分为核体和胞质体两部分。显微操作 (micromanipulation) 技术是早期建立的一种实验胚胎学技术,即在显微镜下,用显微操作装置对细胞进行解剖和微量注射 (microinjection) 的技术。现在显微操作装置的设计愈来愈精密,不仅用于核移植,而且亦可对细胞核进行解剖和向核内注入基因 (图 3-25)。

细胞拆合、显微注射与现代分子生物学技术相结合使这些经典的胚胎学技术展现出极大的潜力,它不仅成为核质关系、细胞内某种 mRNA 或蛋白质功能等基础研究的重要手段,而且在转基因动物、高等动物的克隆方面的理论与实践研究中取得了重大的突破。

## 第四节 细胞及生物大分子的动态变化

### 一、荧光漂白恢复技术

荧光漂白恢复 (fluorescence photobleaching recovery, FPR) 技术是使用亲脂性或亲水性的荧光分子,如荧光素、绿色荧光蛋白等与蛋白或脂质耦联,用于检测所标记分子在活体细胞表面或细胞内部的运动及其迁移速率。FPR 技术的原理是:利用高能激光束照射细胞的某

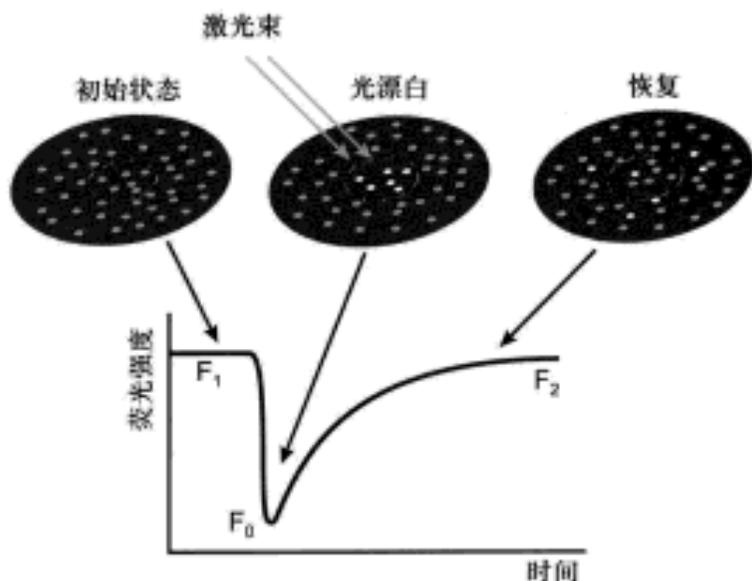


图 3-26 荧光漂白恢复技术原理示意图

一特定区域,使该区域内标记的荧光分子发生不可逆的淬灭,这一区域称光漂白 (photobleaching) 区。随后,由于细胞中脂质分子或蛋白质分子的运动,周围非漂白区的荧光分子不断向光漂白区迁移。结果使光漂白区的荧光强度逐渐地恢复到原有水平。这一过程称荧光恢复 (fluorescence recovery)。荧光恢复的速度在很大的程度上反映荧光标记的脂质或蛋白质在细胞中运动速率 (图 3-26)。FPR 技术不仅能给出活细胞内脂质或蛋白质运动的定性的结果,而且还可以获得某些定量的信息。如膜脂分子的扩散系数和蛋白质的迁移率等,从而有助于解决细胞内脂质和蛋白质分子的动态变化以及与其他成分相互作用等一系列问题。

### 二、单分子技术与细胞生命活动的研究

与生命科学相关的单分子技术是在细胞内实时观测单一生物分子运动规律的技术,它可以在纳米空间尺度和毫秒时间尺度上精确测量单分子的距离、位置、指向、分布、结构以及各种动态过程。单分子技术的优点是:实时直接观测单个分子的反应动力学路径,测量单一分子及分子间相互作用,捕捉单分子随机过程和分子构象变化的中间态,测量稀发但重要的信号和分布,测量非平衡态和不同步的体系等。这些都是先前所提到的实验技术包括各种细胞分子生物学技术所难以实现的。单分子技术不仅可以验证以前的实验成果,而且可以在分子水平上了解生理条件下的细胞生命过程。

单分子技术可以从其工作原理或测量参数等角度

进行分类。从工作原理上,可分为单分子光谱及成像和单分子操纵及力学性质测量。单分子光谱及成像基于分子的内禀光谱以及与周围环境和分子的作用来测量单分子对光的响应(荧光、共振能量转移、散射和吸收等)或对化学条件的响应(如酶催化和电子转移等)。目前常见的单分子光谱及成像技术有单分子荧光、暗场成像、近场成像和 Förster 共振能量转移等。

单分子操纵及力学性质测量则是使用高精度、高灵敏度的操纵和检测仪器直接或间接对单分子进行力学操纵和测量的技术。目前常见的方法有光镊(optical trap/optical tweezers)、磁镊(magnetic tweezers)和原子力显微镜(atomic force microscopy)等。针对不同的研究体系,可以在皮牛到微牛的作用力区间对单分子做到精确的力学控制和测量。顾名思义,光镊和磁镊是由激光或磁场对单分子进行力学操纵和测量的技术,光镊的作用力范围在 0.1~100 pN 之间,恰好对应细胞内很多单分子层次的力学过程(图 3-27),磁镊的作用力范围更广,在几十个飞牛到几百个皮牛之间,但它的空间和时间精度都要比光镊差 1 到 2 个数量级。原子力显微镜不仅可以精确地测量出样品的表面形态,而且同样可以测量样品的微观力学性质。其作用力范围在 10 pN 到几十个纳牛之间,适合于研究配体结合作用和蛋白分子的折叠和展开。各种单分子技术常常组合使用,比如单分子荧光和单分子操纵的实验体系相结合。因为细胞中的很多过程并不是简单的生化反应,而是生物力学和生物化学信号的相互作用。

20 世纪 70 年代末,Neher 和 Sakmann 对膜单离子通道的电流检测被认为是第一个真正意义上的单分子研究。随着显微镜和检测器的改进以及一些新技术的

出现,单分子研究进入高速发展阶段。特别是近十年来,单分子研究方法其中包括空间超分辨率光学显微技术(分辨率可达 10 nm 左右)的不断涌现,极大地推进了生命科学各个研究领域的发展。

目前单分子技术已经广泛的应用于细胞分子生物学多个研究领域中,其研究内容包括:分子马达,如细胞骨架马达蛋白(肌球蛋白、动力蛋白等)和旋转马达(线粒体中的  $F_0F_1$ -ATP 酶、细菌鞭毛等)等;核酸马达,如 RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、解旋酶和拓扑异构酶等;细胞信号通路,如钾离子通道、神经突触等;细胞器以及细胞骨架、染色质等精细结构以及特异蛋白的分布;细胞的分裂、迁移、胞吞、胞吐等过程。特别是在蛋白质和 DNA 单分子力学,如折叠、展开、螺旋、解旋等构象变化以及配体作用的力学强度和生物大分子的动态作用过程,如蛋白质-核酸、蛋白质-蛋白质、蛋白质复合物、蛋白质-膜脂等方面的研究,单分子技术具有其他技术不可替代的优越性。可以预计单分子技术在细胞分子生物学领域的应用将极大地推动生命科学的发展。

### 三、酵母双杂交技术

酵母双杂交系统(yeast two-hybrid system)是一种利用单细胞真核生物酵母在体内分析蛋白质-蛋白质相互作用的系统。该技术由 Fields 等人于 1989 年首次建立,目前已得到广泛地应用。酵母双杂交系统的建立得益于对真核生物调控转录起始过程的认识和 DNA 重组质粒的构建技术。细胞基因转录起始需要转录激活因子的参与,转录激活因子一般由两个或两个以上相互独立的结构域构成,即 DNA 结合域(DNA binding domain, DB)和转录激活域(activation domain, AD)。前者可识别 DNA 上的特异转录调控序列并与其结合;后者可与其他成分作用形成转录复合体的,从而启动它所调节的基因的转录。酵母双杂交系统正是利用这个原理来研究蛋白质-蛋白质的相互作用。如果要证明蛋白 A 是否与蛋白 B 在细胞内相互作用,或寻找与蛋白 A 可能发生作用的蛋白,则可分别制备 DB 与蛋白 A 的融合蛋白(又称“诱饵”, bait),以及 AD 与蛋白 B 或可能与蛋白 A 发生作用蛋白的融合蛋白(又称“猎物”, prey)。如果蛋白 A 与蛋白 B 或其他蛋白在细胞内相互结合,则可形成与转录激活因子类似的具有的 DB 和 AD 结构域的复合物,从而启动报告基因的表达。反之,则报告基因不

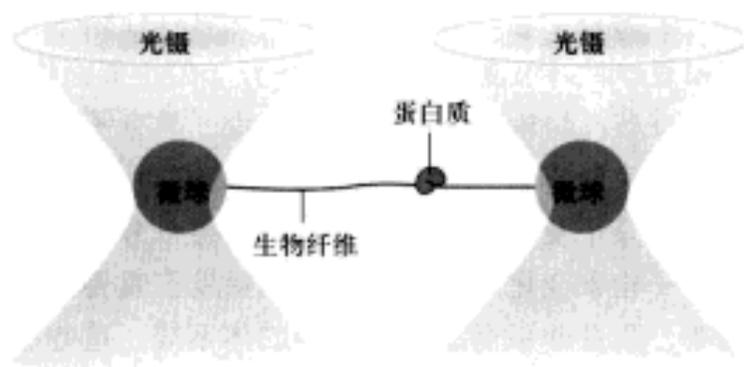


图 3-27 利用光镊来研究生物单分子体系

图中显示光镊分别束缚着两个微球,微球之间连接着一段生物纤维(如 DNA 或微丝)。光镊可以精确地操纵和测量 DNA 与核酸马达或微丝与马达蛋白之间相互作用的生物力学特征。

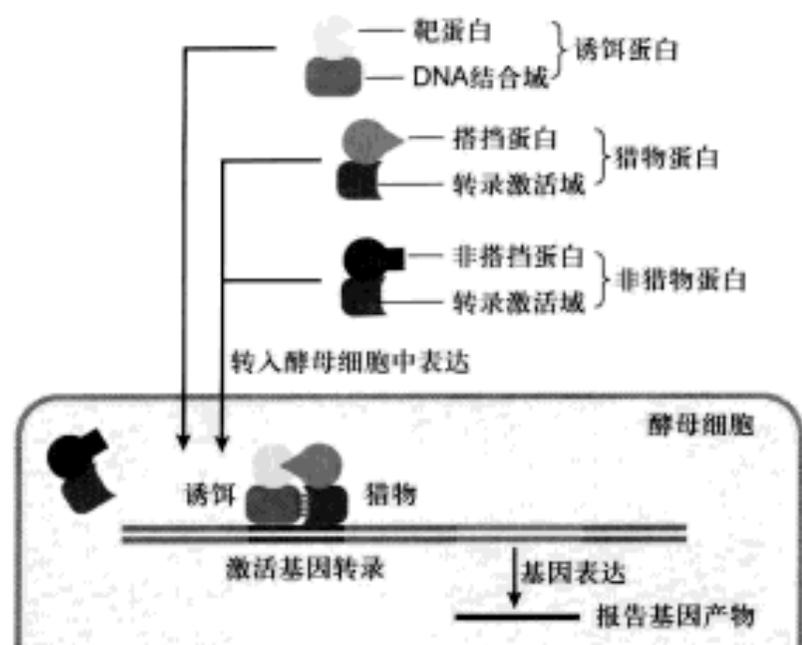


图 3-28 用于检测蛋白质-蛋白质互作的酵母双杂交技术原理示意图

表达。这样就可以分析蛋白质-蛋白质之间的相互作用(图 3-28)。

酵母双杂交系统是一种具有高灵敏度的,在活细胞内研究蛋白质相互作用的实验技术。该技术既可以用来研究哺乳动物,也可以用来研究高等植物蛋白质之间的相互作用。因此,它在许多的研究领域诸如细胞信号转导网络中各种蛋白质的相互关系等方面有着广泛的应用。值得提出的是由于“猎物”蛋白可能与“诱饵”蛋白存在非特异性结合等原因,所以该实验系统有可能存在假阳性的问题。目前,酵母双杂交技术还在不断完善,并由此衍生出一些相关的新技术。

#### 四、荧光共振能量转移技术

荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术是用来检测活细胞内两种蛋白质分子是否直接相互作用的重要手段。其基本原理是:在一定波长的激发光照射下,只有携带发光基团 A 的供体分子可被激发出波长为 A 的荧光,而同一激发光不能激发携带发光基团 B 的受体分子发出波长为 B 的荧光。然而,当供体所发出的荧光光谱 A 与受体上的发光基团的吸收光谱 B 相互重叠,并且两个发光基团之间的距离小到一定程度时,就会发生不同程度的能量转移,即受体分子的发光基团吸收了供体所发出的荧光,结果受体分子放出了波长为 B 的荧光,这种现象称为 FRET 现象(图 3-29)。在体内,如果两个蛋白质分子的距离

在 10 nm 之内,就可能发生 FRET 现象,由此认为这两个蛋白质存在着直接的相互作用。

FRET 技术用于检测体内两种蛋白质之间是否存在直接的相互作用。例如,选择蓝色荧光蛋白 (CFP) 和黄色荧光蛋白 (YFP) 的基因分别与目的蛋白(或称供体蛋白和受体蛋白)的基因融合表达。如果这两个融合蛋白之间的距离大于 10 nm 时,在一定波长的激发光照射下,只有供体蛋白中的 CFP 被激发,放出蓝色荧光。如果这两个融合蛋白之间的距离在 5~10 nm 的范围内时,供体蛋白中 CFP 发出的荧光可以被受体蛋白中的 YFP 所吸收,并激发 YFP 发出黄色荧光。此时可以通过测量 CFP 的荧光强度的损失量来判断这两个蛋白是否存在相互作用。两个蛋白距离越近,CFP 所发出的荧光被 YFP 接收的量就越多,检测器所接收到的蓝色荧光就越弱,而黄色荧光就越强。反之就不会出现 FRET 现象。荧光共振能量转移的效率在很大程度上,反映了细胞内两种蛋白相互作用的可能性与作用的强弱。

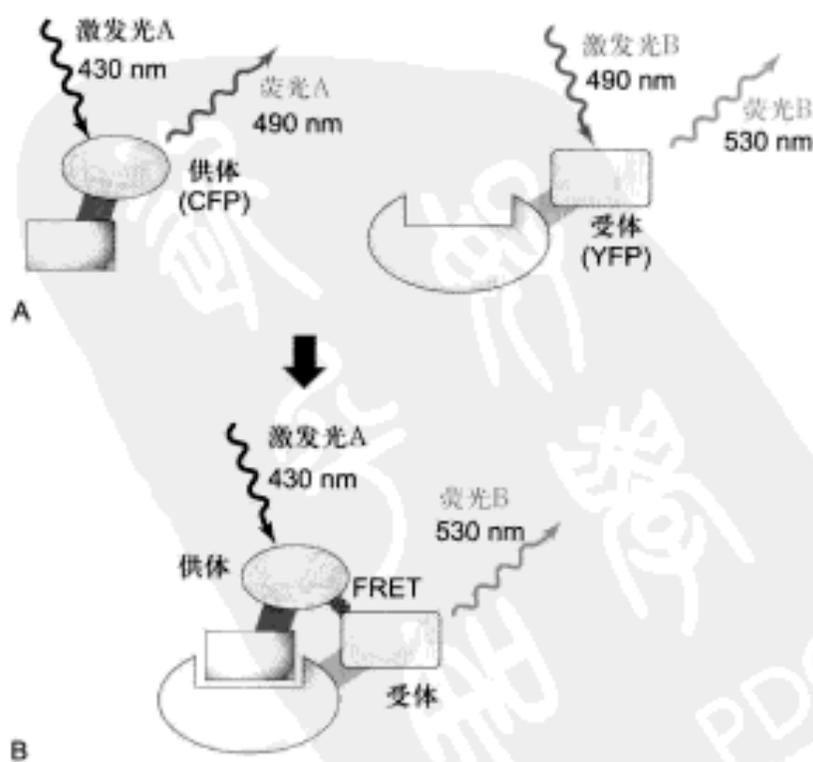


图 3-29 荧光共振能量转移原理图

A. 携带 CFP 的供体蛋白与携带 YFP 的受体蛋白分子之间的距离大于 10 nm 时,在一定波长的紫外激发光(430 nm)的照射下,只有供体蛋白中的 CFP 被激发,放出波长为 490 nm 的蓝色荧光,而受体中的 YFP 不会被激发出黄色荧光。B. 如果这两个蛋白质之间的距离在 1~10 nm 的范围内,供体蛋白中 CFP 发出的蓝色荧光可以被受体蛋白中的 YFP 所吸收,并激发 YFP 发出波长为 530 nm 的黄色荧光。

## 五、放射自显影技术

放射自显影技术是利用放射性同位素的电离射线对乳胶(含 AgBr 或 AgCl) 的感光作用, 对细胞内生物大分子进行定性、定位与半定量研究的一种细胞化学技术。对细胞或生物体内生物大分子进行动态研究和追踪(pulse-chase) 是这一技术独具的特征。放射自显影技术包括两个主要步骤: 即同位素标记的生物大分子前体的掺入和细胞内同位素所在位置的显示。常用于生物学研究的同位素及其性质如表 3-3 所示, 根据实验要求可选择合适的同位素。

表 3-3 常用放射性同位素的基本特点

同位素	放射性粒子	在乳胶内的射程	半衰期
$^{32}\text{P}$	硬 $\beta$	数 mm	14.2 天
$^{14}\text{C}$	中等能量 $\beta$	平均 $10\ \mu\text{m}$	5 760 年
$^3\text{H}$	软 $\beta$	$0.8\ \mu\text{m}$	12 年
$^{35}\text{S}$	中等能量 $\beta$	$10\ \mu\text{m}-1\ \text{mm}$	87 天

研究 DNA 合成时通常用氚 ( $^3\text{H}$ ) 标记的胸腺嘧啶脱氧核苷 ( $^3\text{H-TdR}$ ), 研究 RNA 合成用氚标记的尿嘧啶核苷 ( $^3\text{H-U}$ ); 在研究含硫蛋白分子代谢时, 可用  $^{35}\text{S}$  标记的蛋氨酸和半胱氨酸,  $^3\text{H}$  或  $^{14}\text{C}$  标记的蛋氨酸、亮氨酸等也是常用于蛋白合成的前体化合物。

显微放射自显影的基本实验步骤如下: 首先用合适的放射性前体分子标记机体或细胞, 根据实验的需要, 按标记的持续时间分为持续标记和脉冲标记。标记后的组织与细胞可按常规方法制片, 在暗室中向样品表面均匀地敷一层厚  $3\sim 10\ \mu\text{m}$  的乳胶膜, 然后在暗盒中曝光(或称自显影) 数天, 再经显影、定影后于显微镜下观察。细胞中银颗粒所在的部位即代表放射性同位素的标记部位。

电镜放射自显影技术的基本原理与显微放射自显影相同, 实验操作过程亦相似。与显微放射自显影不同之点是对样品制备与敷乳胶的要求更为严格, 曝光时间一般长达数月(图 3-30)。

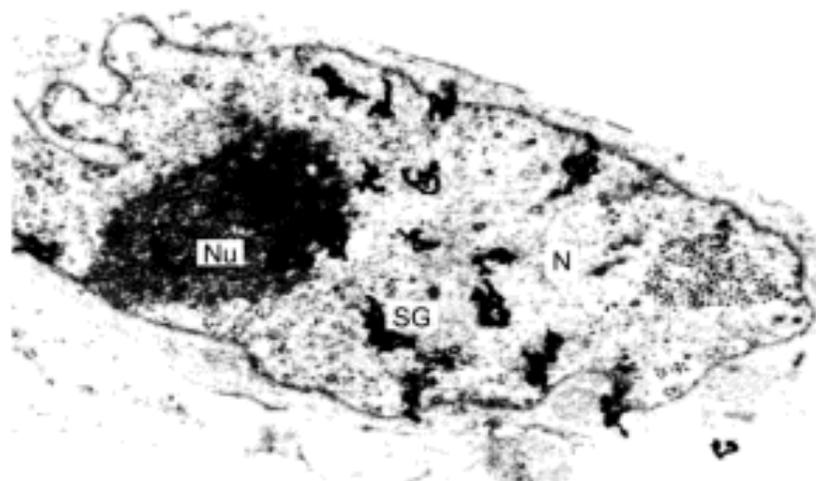


图 3-30 电镜放射自显影图片

鸭瘟病毒感染鸡胚成纤维细胞 24 h 后, 用  $^3\text{H}$ -尿嘧啶核苷脉冲标记 10 min 的电镜放射自显影图片, 显示 RNA 在细胞内合成的部位。SG: 银颗粒; N: 细胞核; Nu: 核仁。(丁明孝和霍中和提供)

## 第五节 模式生物与功能基因组的研究

如前所述, 显微镜和电子显微镜技术的建立与发展极大地开拓了人们的视野, 发现了细胞内各种复杂的精细结构。然而对其成分的了解, 特别是数以万种的基因及其表达产物的功能, 以及它们在细胞代谢与细胞生长、分化、衰老、凋亡等生命活动的协同作用与调节机制, 则更多地需要通过各种模式生物, 借助于生物化学与分子生物学的技术手段, 综合当今迅速发展功能基因组学(functional genomics)、蛋白质组学(proteomics)以及生物信息学(bioinformatics), 进行研究。当然, 即使各种基因及其产物的功能业已明了, 距离对生命活动本质的认识也还有相当的距离。所获得的大量有关信息是如何浓缩到小小的细胞中建立生命活动, 从这一角度来看, 细胞生物学的研究已成为对生命现象与本质认识的瓶颈。

### 一、细胞生物学研究常用的模式生物

理想的研究系统往往是实验成功的关键, 现代细胞生物学乃至生物科学的研究进展, 在很大程度上是依赖于选择合适的生物材料。如大肠杆菌与操纵子学说的建立及现代分子生物学的发展, 豌豆和果蝇与遗传学定律

的发现, 酵母和海胆与对细胞周期调控机制的认识, 线虫与对细胞凋亡机制的揭示, 小鼠与对哺乳动物功能基因组学的研究等等。由于基因在进化上的保守性以及遗传密码的通用性, 从一种实验生物得到的有关基因性质或功能方面的信息往往也适用于其他生物。

模式生物通常具有个体较小, 容易培养, 操作简单, 生长繁殖快的特点。细胞生物学乃至整个生命科学的研究中常用的模式生物有: 噬菌体、大肠杆菌、酵母、四膜虫、黏菌、爪蟾、海胆、拟南芥、线虫、果蝇、斑马鱼和小鼠等。下面简要介绍几种目前在生物学研究中应用最广的模式生物。

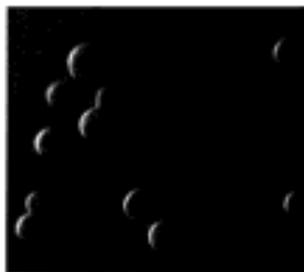
### (一) 大肠杆菌

大肠杆菌作为原核生物的代表已经被广泛应用于分子生物学的研究。其基因组序列已于1997年测定完毕, 一条环状DNA只有 $4.6 \times 10^3$  kb, 大约编码4 288个基因。它培养方便, 生长快, 基因结构简单, 突变株的诱变, 分离和鉴定容易, 转基因技术成熟, 进行基因定位简便易行。早期关于基因表达调控的一些研究成果大多是以此为材料取得的。



### (二) 酵母

作为单细胞真核生物的代表, 用于生物学的酵母主要有两种: 芽殖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)。酵母不仅具有与细菌类似的一些优点, 而且具有真核细胞的组织结构, 即有细胞核和各种细胞器。它是一个非常简单的单细胞真核生物, 生长迅速并且易于遗传操作。芽殖酵母 (单倍体) 含有16条线性的染色体, 其基因组全长为 $1.2 \times 10^4$  kb, 具有约6 000个可读框。裂殖酵母的基因组大小与芽殖酵母相近, 但仅分布在3条染色体上, 编码约4 800个蛋白质。酵母染色体的结构与所有的真核生物一样具有自主复制序列、着丝点序列和端粒序列。利用这3个结构元件可以构建酵母人工染色体用于大片段DNA序列的克隆和分析。



20世纪60年代以来, 以L. Hartwell和P. Nurse等为代表的酵母遗传学家利用温度敏感突变技术筛选并分析了200多个与细胞分裂及周期调控相关的基因, 从而

为揭示细胞周期调控的分子打下基础。不仅如此, 作为模式生物, 酵母基因突变库也为诸如蛋白质相互作用、基因表达调控、膜泡运输、细胞分化和衰老等研究领域提供了非常重要的研究材料。

### (三) 线虫

在实验室常用的是秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*), 它的基因组序列也已经测定完成, 全长为 $9.7 \times 10^4$  kb, 大约编码19 000个基因。线虫成体长仅1 mm左右, 由959个体细胞组成。线虫繁殖快, 生命周期 (life cycle) 仅为3天, 在显微镜下通体透明, 可以追踪体内每一个细胞的形成。胚胎发育过程中细胞分裂、分化以及细胞的死亡具有高度的程序性, 便于对其进行遗传学分析。基于上述原因, 秀丽隐杆线虫已经成为现代发育生物学、遗传学、细胞生物学研究的重要模式生物。



### (四) 果蝇

在实验室常用的是黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*), 其基因组序列测定已经完成, 全长为 $1.8 \times 10^5$  kb, 大约编码13 600个基因。果蝇作为经典遗传学的模式生物已经有100多年的历史, 它具有丰富的表型特征, 易于进行遗传学操作, 曾在遗传分析、染色体特性研究、胚胎发育的基因调控和细胞分化机制的研究、神经退行性疾病和学习、认知等领域的研究发挥重要的作用。果蝇基因组中许多基因在进化上很保守, 与人类基因有很高的同源性。



### (五) 斑马鱼

斑马鱼 (*Danio rerio*) 属小型脊椎动物, 因全身分布有褐色斑纹而得名。斑马鱼的基因数目大约为30 000个, 与人类的相近。它的许多基因与人类的基因存在一一对应的关系。斑马鱼很容易饲养, 一般在孵化后3个月就可以到达性成熟, 每次可产卵200个左右。斑马鱼的整个胚胎发育过程在体外完成, 鱼卵产出以后仅1天即可完成胚胎早



期发育。透明的鱼卵和胚胎使对其胚胎发育过程中细胞行为的观察与研究极为便利。近年来，人们借助“饱和诱变”筛选突变体的策略，得到了大量单基因突变的斑马鱼。

## (六) 小鼠

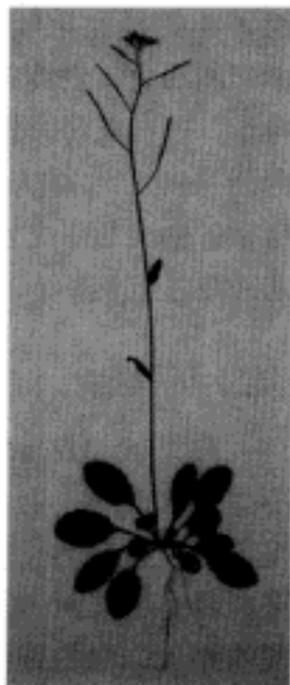
作为小型哺乳动物，在上述所有的模式生物中，小鼠 (*Mus musculus*) 在进化方面最接近人类。其基因组全长为  $3.0 \times 10^6$  kb，大约编码 30 000 个基因，与人类的非常相近。小鼠作为实验材料已有 100 多年的历史，第一个小鼠近交系——DBA 于 1909 年诞生于哈佛大学，直至今日，它仍然是遗传学实验的重要材料。人们已经建立了近千个小鼠品系。作为模式生物，小鼠常常作为哺乳动物遗传学、组织学、胚胎学和细胞生物学等的研究材料。



由于小鼠与人类更为接近，因此可用于建立人类疾病的小鼠模型，它不仅可用于相关疾病分子机制的研究，而且也为疾病治疗的临床前研究提供了极为重要的动物模型。近年来，转基因小鼠、基因打靶、条件基因打靶及 RNA 干涉等技术在小鼠中的建立与发展，极大地促进了高等动物功能基因组学的研究。

## (七) 拟南芥

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 是一种十字花科的植物，广泛用于植物遗传学、发育生物学、细胞生物学和分子生物学的研究。拟南芥的个体小，高度只有 30 cm 左右；生长周期快，从播种到收获种子一般只需 6 周左右；种子多，每株每代可产生数千粒种子；生活力强，用普通培养基就可做人工培养。拟南芥有 5 对染色体，基因组全长  $1.25 \times 10^5$  kb，共编码约 26 000 个基因，是目前已知最小的植物基因组。此外，拟南芥是自花授粉植物，容易获得各种突变株。由于上述优点，拟南芥成为植物功能基因组研究的理想材料，被科学家誉为“植物界的果蝇”。



其研究结果对水稻、蔬菜等其他经济作物

的研究均有重要的借鉴作用。

除了上述常用的模式生物以外，四膜虫、黏菌、海胆、爪蟾和鸡等在细胞生物学和发育生物学研究中也曾并依然发挥重要作用。如对端粒的研究，原生动四膜虫存在“片段化”的染色体，这样，一个细胞中就含有数万个端粒。关于端粒结构的发现与功能研究很大程度上得益于此。

## 二、突变体制备技术

作为人类基因组计划的重要补充，多种模式生物基因组序列分析，特别是突变体的制备和基因功能的研究，为人类功能基因组的研究提供了重要的可借鉴资料。同时，也对细胞生物学、发育生物学等学科的发展，甚至是人类自身疾病的研究与防治起了巨大的推动作用。

制备突变体的方法主要从 DNA 与 RNA 两个层次上进行。在 RNA 水平主要是 RNA 干扰的方法，这里包括瞬时的与永久的干扰。RNAi 是指利用一段特异的双链 RNA 或单链反义 RNA 通过注射、转染或转基因的方法导入到细胞或模式生物体中，这样的 RNA 可以启动一套信号通路来最终降解与这段 RNA 对应的，通常是包含这段序列的 mRNA，使该 mRNA 无法翻译成相关的蛋白质 (图 3-31)。从而在 mRNA 层面上中断了对应基因的功能，达到了制备某一基因突变体的目的。RNAi 方法的优点是实验周期较短，但有时特异性不够

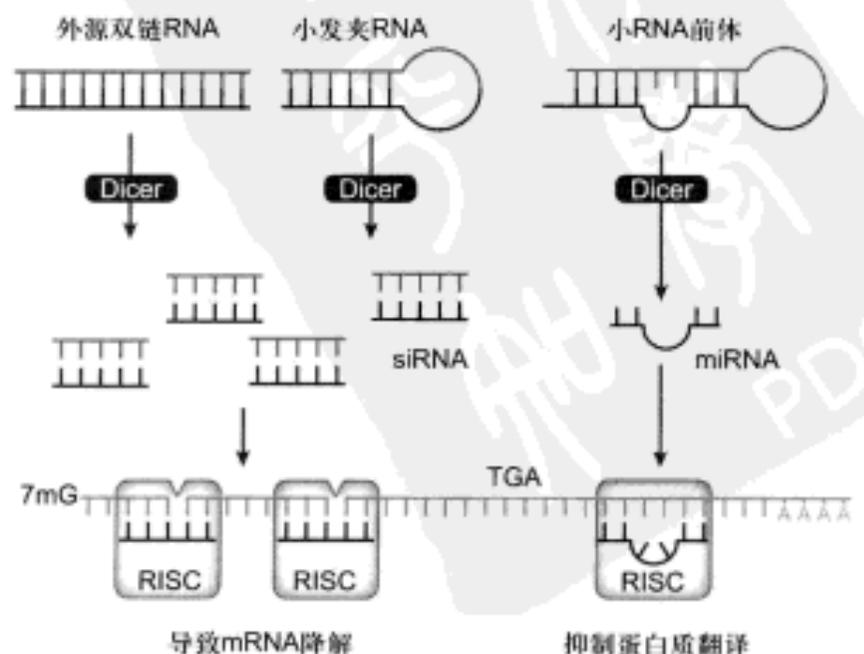


图 3-31 RNAi 原理的示意图

不同形式的双链小分子 RNA 在细胞中经特异的酶处理后，与 mRNA 专一地结合。结果导致该 mRNA 降解或抑制其翻译活性。

强。RNAi 的现象是 Rich Jorgensen 等在矮牵牛中首先发现的。后来 (1995—1998 年) Su Guo 和 Kemphues 等人在线虫中证实了这一现象。现在, 在绝大多数模式生物中都是可以通过 RNAi 的方法实现某一基因功能的失活。为此, 这一技术在 2006 年获得了诺贝尔奖。

在 DNA 水平制备突变体的方法通常也叫基因敲除 (knock out)。基因敲除技术在小鼠中的建立与应用为动物功能基因组的研究起到了极大的推动作用, 同时也为建立人类疾病的小鼠模型作出了重要贡献。为此, 这一技术的发明也在 2007 年获得了诺贝尔生理学或医学奖。通常 DNA 水平突变体的制备方法有三种 (以果蝇为例): 化学诱变法、P 因子介导的突变和基于同源重组的定点突变。前两种方法属于正向遗传学 (forward genetics) 的方法, 而后一种方法和上面提到的 RNAi 的方法则属于反向遗传学 (reverse genetics) 的方法。化学诱变是一种传统的突变技术, 主要通过给果蝇喂食添加有化学诱变剂的食物而造成果蝇配子染色体的突变。这种突变往往是随机发生的点突变 (或者是染色体 DNA 小片段的缺失), 其诱变的效率很高, 但诱变的基因往往难以克隆定位。然而, 在基因组序列清楚的今天, 辅以大量果蝇缺失库 (deficiency library), 定位未知诱变剂造成的突变已经比十年前容易得多。甲基磺酸乙酯 (ethyl methane sulfonate, EMS) 和乙基亚硝基脲 (ethyl nitroso urea, ENU) 是较为常用的化学诱变剂。P 因子介导的突变利用转座子的转座特性及转座子的移动过程中可以带走部分基因组 DNA 序列的特性改变基因的表达或结构。这种方法的优点在于 P 因子携带有显性标记, 如眼色、体色、药物抗性等, 通过观察这些显性标记就可以判断 P 因子整合或跳出成功与否; 利用 P 因子的已知 DNA 序列, 通过质粒挽回 (plasmid rescue)、反向 PCR (inverse PCR) 以及果蝇全基因组序列可以很轻松地确定 P 因子整合的基因位点。其缺点就是突变的效率较低, 并且突变的位点有较强的选择性。基于同源重组的定点突变技术在果蝇中的建立只是在不到十年前才由容益康和 Kent Golic 发展起来的。此方法的建立立刻得到了广泛的应用。用这种方法制备基因突变的优点是: 受基因位置的限制少, 特异性高, 能在 DNA 水平上产生可遗传的任何想要的定点突变。缺点是相对较耗时、耗力。

通过研究双突变体的表型比较, 还可以了解同一信号通路中两个基因的上下游关系。基因组中的基因按其重要性大体可分为两类: 致死基因 (essential gene, 突变后机体不能存活) 与非致死基因 (non-essential gene,

突变后机体可以存活, 只是存在部分缺陷, 包括可见的与不可见的, 或没有缺陷)。体细胞克隆 (somatic clones) 技术可以用来研究那些突变后致死的基因的功能。这一技术与小鼠中的条件敲除技术 (conditional knock-out) 类似。

后基因组时代 (post genomic era) 的生命科学工作者的任务早已不是寻找新的基因, 而是在全基因组水平研究基因的功能, 最终完成对全部基因组功能的诠释, 也就是细胞生命活动的机制的认识。为此, 科学家们正在整合所有信息, 建立各种各样的文库: 如突变体库、基因表达模式库、各种蛋白组学库、非编码 RNA 文库等等。其中, 突变体库对基因组功能的诠释将会发挥至关重要的作用。目前诸多模式生物中的各种突变体库都已存在, 已经逐渐形成了生命科学研究的宝贵资源。相关信息可以从相关模式生物的数据库中查询:

*Escherichia coli*: PortEco;

*Saccharomyces cerevisiae*: SGD;

*Caenorhabditis elegans*: WormBase;

*Drosophila melanogaster*: FlyBase

*Mus musculus*: MGI;

*Danio rerio*: ZFIN;

*Arabidopsis thaliana*: TAIR;

*Homo sapiens*: GOA @ EBI.

### 三、蛋白质组学技术

一般来讲, 基因是生物体遗传信息的载体, 而蛋白质是各种复杂生理功能的具体执行者。对生命活动的认识最终依赖于对细胞内各种蛋白质功能及其相互协同作用的了解。1994 年, M. Wilkins 和 K. Williams 等第一次提出了蛋白质组 (proteome) 概念。proteome 是由蛋白质 (protein) 与基因组 (genome) 两个词组合而成, 意指“一种基因组所表达的全部蛋白质”。蛋白质组学 (proteomics) 是全面研究细胞、组织乃至整个生命体内蛋白质组成及其活动规律的科学。采用大规模、高通量、高速度的技术手段, 通过全局性研究基因组所表达的所有蛋白质在不同时间与空间的表达谱和功能谱, 全景式地揭示生命活动的本质。

蛋白质组学技术主要包括蛋白质分离技术 (双向凝胶电泳、多维液相色谱、毛细管电色谱等) 和蛋白质鉴定技术 (如质谱、蛋白质芯片技术等)。同时, 生物信息技术也是蛋白质组学研究技术中不可或缺的重要部分。

## (一) 双向凝胶电泳

1975年,意大利生化学家 O'Farrell 发明了双向凝胶电泳 (two-dimensional electro-phoresis, 2-DE) 技术,它是一种高分辨率的蛋白质分离技术。双相凝胶电泳的第一相是等电聚焦 (IEF) 电泳,采用 pH 梯度,根据蛋白质等电点的不同进行分离。第二相是 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),根据蛋白相对分子质量的大小进行分离。2-DE 分辨率高,一般能分辨到 1 000~3 000 个蛋白质点,最佳可分离得到 11 000 个左右的蛋白质样点。同时,2-DE 具有一定的局限性,强酸性、强碱性的蛋白质,相对分子质量过大、过小的蛋白质,疏水性的蛋白质(如膜蛋白)以及一些低丰度蛋白质难以分离,且实验的重复性差。

## (二) 色谱技术

色谱技术是利用各种物质在固定相和流动相之间不同的分配系数,使其在相对运动的两相间经反复多次分配,以不同速度移动,从而获得分离的方法。多维液相色谱是采用两种或两种以上不同的分离机制组合,利用样品的不同特性(如分子大小、等电点、亲水性等)将复杂的混合物分离成单一组分。多维液相色谱具有快速、高通量、自动化的特点。毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 是经典电泳技术和现代微柱分离技术相结合的产物,具有极高的分辨率。毛细管电色谱 (capillary electrochromatography, CEC) 通过在毛细管柱内填充液相色谱固定相或在柱壁键合固定相,使带电物质在高压电场和固定相介质的共同作用下分离。该技术集成了毛细管电泳的高效分离性与 HPLC 的高选择性。毛细管电色谱和多维液相色谱由于分辨率高,所需样品量少,易于和电喷雾离子化质谱 (electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS) 联用而成为蛋白质组分析的重要手段。

## (三) 质谱

质谱 (mass spectrometry, MS) 技术能鉴定蛋白质并准确测量肽段和蛋白质的相对分子质量、氨基酸序列及翻译后的修饰。其工作原理是通过离子化装置将分子转化为气态离子,根据不同离子间的质荷比 ( $m/z$ ) 的差异来分离并确定相对分子质量。根据蛋白质样品分子离子化的方式的不同可分为电喷雾离子化质谱和基质辅助的激光解吸质谱 (matrix assisted laser desorption ionization

mass spectrometry, MALDI-MS)。ESI-MS 采用串联质谱的方法可以进行肽段测序。MALDI 产生的离子用飞行时间检测器 (TOF) 检测,因此常见的是基质辅助的激光解吸飞行时间质谱 (matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)。MALDI-TOF-MS 可以得到酶解肽段的相对分子质量,获得蛋白质的肽质量指纹图谱 (peptide mass fingerprint, PMF),然后通过检索相应的数据库来鉴定蛋白质。质谱技术能灵活地与多种蛋白分离技术联用,且灵敏度(某些情况下仅需 10~15 fmol 的蛋白质)、准确度高。

## (四) 蛋白质芯片

与基因芯片类似,蛋白质芯片 (protein chip, protein microarray) 将蛋白质结合到固相基质上,然后与要检测的组织或细胞“杂交”,从而对未知蛋白进行分离和鉴定。蛋白质芯片的基本原理是利用蛋白质间以及蛋白质与其他小分子间的相互作用。蛋白芯片具有其高通量、高特异性和高灵敏度(检测水平达纳克级)的优点,适用于蛋白质表达谱分析。

## (五) 生物信息学

生物信息学 (bioinformatics) 已广泛应用到现代生命科学的各个领域。目前,在蛋白质组学方面的应用主要有:构建与分析蛋白质双向凝胶电泳图谱数据库;蛋白质氨基酸序列、蛋白质结构域、蛋白质相互作用等数据库的建立和检索;蛋白质结构的预测;各种软件,如蛋白结构和功能预测、蛋白质双向电泳图谱分析、蛋白质鉴定等软件的开发与应用。

最后,应当指出的是,当今生物学各学科之间的交叉性较强,特别是在研究方法上,所以除了本章介绍的一些方法外,其他实验技术,如基因操作技术、各种生物化学技术、生理学技术、微生物学技术和遗传学技术等也常应用于细胞生物学,特别是在细胞分子生物学的研究中,更需各种技术的巧妙结合。

在运用各种技术进行细胞生物学研究的同时,对实验技术进行必要的改进是非常重要的。由于实验条件不同,可以说运用好任何一项实验技术都不仅仅是简单的重复。在原有实验技术的基础上如果能够有所改进或建立新的实验方法和研究模式,其本身就是一项具有创新性的研究工作。它不仅对于已选定的研究课题,而且对本学科的发展也可能产生重大的影响。这种例子即使在科学落后的古代中国也是不胜枚举的。

## ● 思考题 ●

1. 试举1~2例说明电子显微镜技术与细胞分子生物学技术的结合在现代细胞生物学研究中的应用。
2. 光学显微镜技术有哪些新发展？它们各有哪些突出优点？为什么电子显微镜不能完全代替光学显微镜？
3. 为什么说细胞培养是细胞生物学研究的最基本的实验技术之一？
4. 研究细胞内生物大分子之间的相互作用与动态变化涉及哪些实验技术？它们各有哪些优点和不足之处？
5. 什么是模式生物？举例说明模式生物的使用在细胞生物学研究中的作用。
6. 功能基因组学的基本研究思路与基本方法是什么？为什么说它与细胞生物学的发展密切相关？

## ● 参考文献 ●

1. Abelson J N, Simon M I. Single Molecule Tools, Part B: Super-Resolution, Particle Tracking, Multiparameter, and Force Based Methods. New York: Elsevier, 2010, 475: 1-663.
2. Ausubel F M. Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley and Sons Inc., 1996.
3. Hayat M A. Principles and Techniques of Electron Microscopy Biological Applications. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
4. Spector D L, *et al.* Cells: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.



# 细胞质膜

细胞质膜 (plasma membrane) 曾称细胞膜 (cell membrane), 是指围绕在细胞最外层, 由脂质、蛋白质和糖类组成的生物膜。

细胞质膜不仅在结构上作为细胞的界膜, 使细胞具有一个相对稳定的内环境, 同时在细胞与环境之间的物质运输、能量转换及信息传递过程中也起着重要的作用。

真核细胞内部存在由膜围绕构建的各种细胞器。细胞内的膜 (internal membrane) 系统与细胞质膜统称为生物膜 (biomembrane), 它们具有共同的结构特征, 因此本章对质膜结构与功能的阐述亦有助于对整个生物膜的结构与功能有一个基本的了解。

## 第一节 细胞质膜的结构模型与基本成分

### 一、细胞质膜的结构模型

人们借助光学显微镜发现了细胞, 但在此后的几百年里却一直没有观察到细胞质膜, 甚至有人怀疑细胞是否有一个确切的边界结构。20 世纪 50 年代初随着电子显微镜技术的发展, 质膜的超微结构才得以显示。但是,

人们也并未因此感到惊奇, 因为在此几十年前, 细胞生理学家在研究细胞内渗透压时就已证明质膜的存在。

1925 年, E. Gorter 和 F. Grendel 用有机溶剂抽提人的红细胞质膜的膜脂成分, 以便测定膜脂单层分子在水面的铺展面积, 发现它是红细胞表面积的二倍, 这一结果提示了质膜是由双层脂分子构成的。随后, 人们发现质膜的表面张力比油-水界面的表面张力低得多, 已知脂滴表面如吸附有蛋白成分则表面张力降低, 因此 Davson 和 Danielli 推测, 质膜中含有蛋白质成分并提出“蛋白质-脂质-蛋白质”的三明治式的质膜结构模型。这一模型影响达 20 年之久。

1959 年, J. D. Robertson 根据电子显微镜观察的结果提出了单位膜模型 (unit membrane model), 发展了三明治模型, 并大胆地推断所有的生物膜都由蛋白质-脂质-蛋白质的单位膜构成。这一模型得到 X 射线衍射分析结果的支持。如果用高锰酸钾或锇酸固定细胞时, 电镜超薄切片中的细胞质膜显示出暗-亮-暗三条带, 两侧的暗带厚度约 2 nm, 推测是蛋白质, 中间亮带厚度约 3.5 nm, 推测是脂双层分子, 整个膜的厚度约 7.5 nm (图 4-1)。随后的一些实验, 如细胞融合结合免疫荧光标记技术证明, 质膜中的蛋白质是可流动的, 电镜冰冻蚀刻技术显示了双层膜脂中存在膜蛋白颗粒。

在此基础上, S. J. Singer 和 G. L. Nicolson 于 1972 年提出了生物膜的流动镶嵌模型 (fluid mosaic model)。流动镶嵌模型得到各种实验结果的支持, 奠定了生物膜的结构与特征的基础 (图 4-2), 从而激发人们对膜

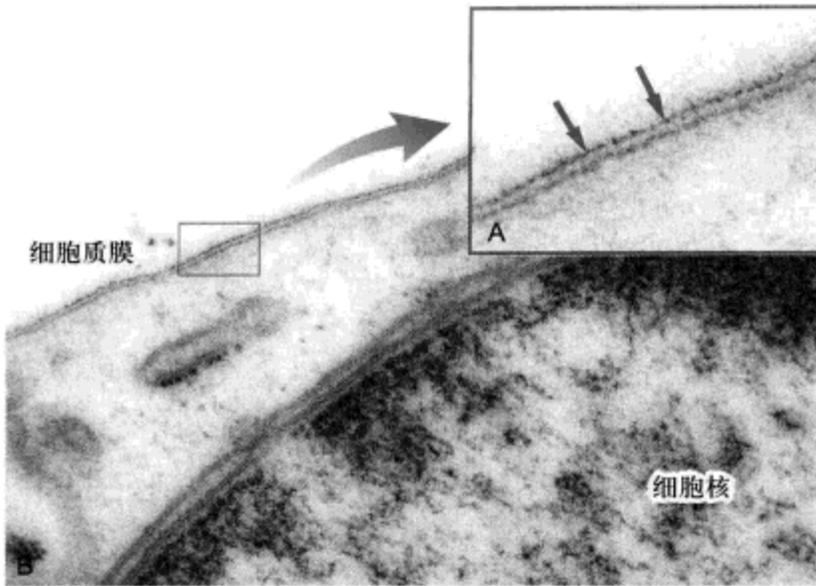


图 4-1 电镜超薄切片技术显示的细胞质膜结构

A. 动物细胞细胞质膜 (箭头所指), 中间亮带厚约 3.5 nm, 两侧暗带厚约 2 nm。B. 细胞核膜及胞质中囊泡膜也都由单位膜组成 (箭头所指), 核膜及胞质中囊泡膜也由单位膜组成。(Bechara Kachar 博士惠赠)

蛋白与膜脂的相互作用及其功能的深入探索。1975 年 N.Unwin 和 R.Henderson 首次报道了古核生物盐细菌的质膜蛋白——菌紫红质 (bacteria rhodopsin) 的三维结构。它是一个跨膜 7 次的膜蛋白, 通过蛋白质的疏水结构域“镶嵌”在脂双层中, 利用光能完成质子的转运。流动镶嵌模型主要强调: ① 膜的流动性, 即膜蛋白和膜脂均可侧向运动; ② 膜蛋白分布的不对称性, 有的结合在膜表面, 有的嵌入或横跨脂双分子层。

近些年提出的脂筏模型 (lipid raft model, Simons 1988) 是对膜流动性的新的理解。该模型认为在甘油磷脂为主体的生物膜上, 胆固醇、鞘磷脂等富集区域形成相对有序的脂相, 如同漂浮在脂双层上的“脂筏”一

样载着执行某些特定生物学功能的各种膜蛋白 (图 4-3)。脂筏最初可能在高尔基体上形成, 最终转移到细胞质膜上, 有些脂筏可在不同程度上与膜下细胞骨架蛋白交联。据推测, 一个直径 100 nm 的脂筏可载有 600 个蛋白质分子。目前已发现几种不同类型的脂筏, 它们在细胞信号转导、物质的跨膜运输及 HIV 等病原微生物感染细胞过程中起重要的作用。脂筏模型虽然还不尽完善, 但得到了越来越多的实验证据的支持。

目前对生物膜结构的认识可归纳如下 (图 4-2B, 图 4-3):

(1) 具有极性头部和非极性尾部的磷脂分子在水相中具有自发形成封闭的膜系统的性质, 磷脂分子以疏水性尾部相对, 极性头部朝向水相形成脂双分子层, 每层磷脂分子称为一层小叶 (leaflet)。脂分子是组成生物膜的基本结构成分, 尚未发现在生物膜结构中起组织作用的蛋白质。但在脂筏中存在某些有助于脂筏结构相对稳定的功能蛋白。

(2) 蛋白质分子以不同的方式镶嵌在脂双层分子中或结合在其表面, 蛋白质的类型, 蛋白质分布的不对称性及其与脂分子的协同作用赋予生物膜各自的特性与功能。

(3) 生物膜可看成是蛋白质在双层脂分子中的二维溶液。然而膜蛋白与膜脂之间、膜蛋白与膜蛋白之间及其与膜两侧其他生物大分子的复杂的相互作用, 在不同程度上限制了膜蛋白和膜脂的流动性。同时也形成了赖以完成多种膜功能的脂筏、纤毛和微绒毛等结构。

(4) 在细胞生长和分裂等整个生命活动中, 生物膜在三维空间上可出现弯曲、折叠、延伸等改变, 处于不断的动态变化中。从而保证了诸如细胞运动、细胞增殖

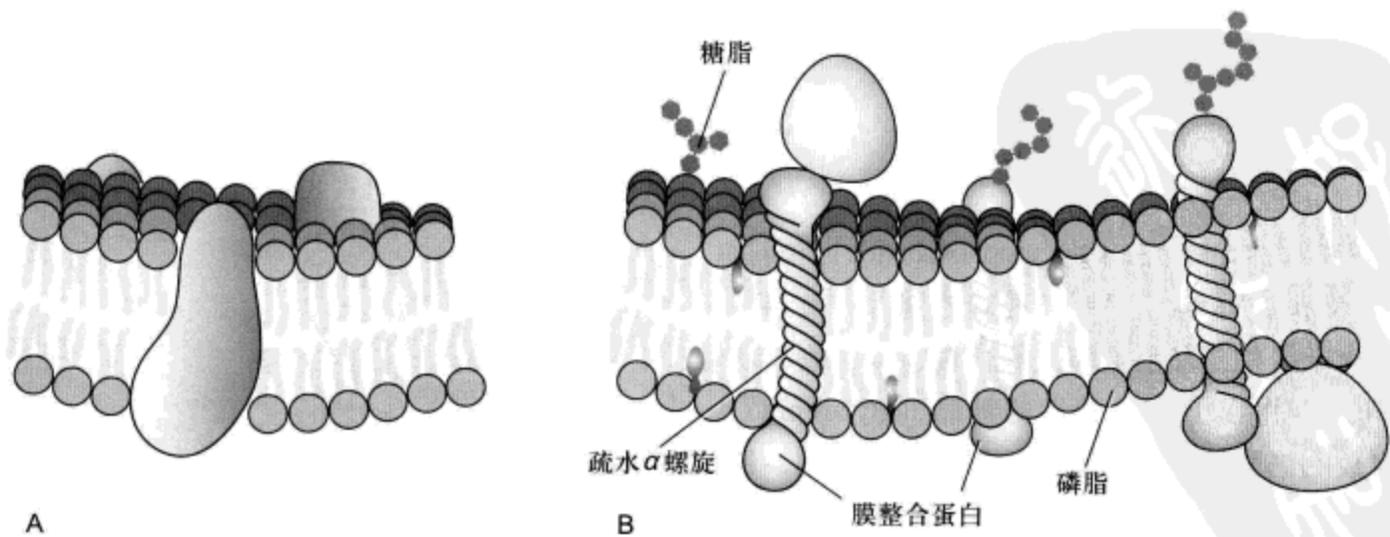


图 4-2 生物膜的模型

A. 流动镶嵌模型示意图。B. 生物膜结构示意图。

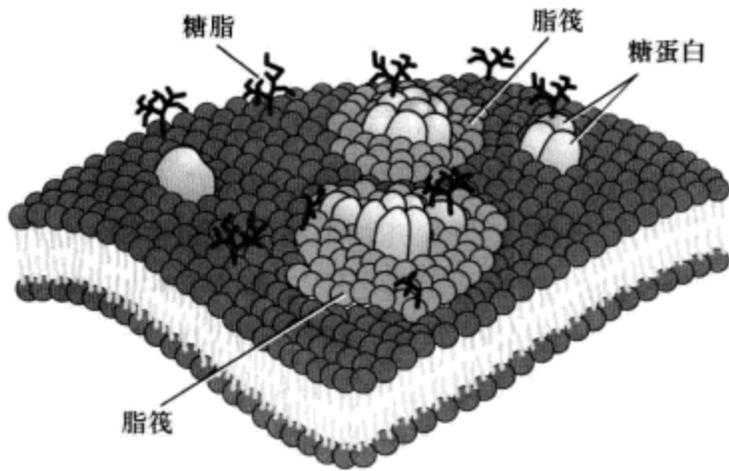


图 4-3 细胞膜的脂筏模型示意图

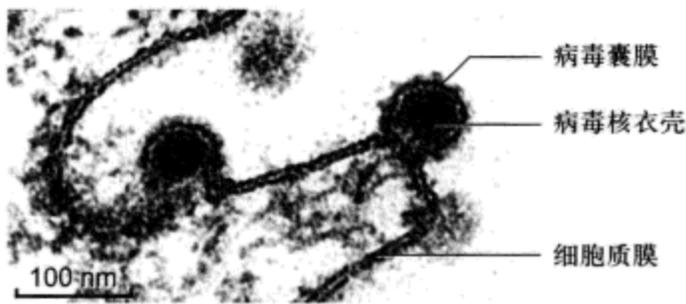


图 4-4 病毒出芽过程中细胞质膜的动态变化

电镜图片显示了凸凹不平的脂双层细胞质膜以及 SbV 以出芽的方式在宿主细胞质膜上的组装和释放的过程。(梁凤霞博士惠赠)

等各种代谢活动的进行。某些有囊膜的病毒如 HIV 和辛德毕斯病毒 (Sindbis virus, SbV) 等,也是通过从细胞质膜上“出芽”的方式,组装与释放到细胞外(图 4-4)。

## 二、膜脂

膜脂是生物膜的基本组成成分,每个动物细胞质膜上约有  $10^9$  个脂分子,即每平方微米的质膜上约有  $5 \times 10^6$  个脂分子。

### (一) 成分

膜脂主要包括甘油磷脂 (glycerophosphatide)、鞘脂 (sphingolipid) 和固醇 (sterol) 三种基本类型 (图 4-5)。它们的化学结构、在生物膜上的含量以及生物学功能各不相同。生物膜上还有少量的糖脂 (glycolipid), 鉴于绝大多数的糖脂都属于鞘氨醇的衍生物, 因此, 目前人们多将糖脂归于鞘脂质。

#### 1. 甘油磷脂

甘油磷脂构成了膜脂的基本成分, 占整个膜脂的

50%以上。甘油磷脂为 3-磷酸甘油的衍生物, 包括磷脂酰胆碱 (卵磷脂, phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)、磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE) 和磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 等 (图 4-5A), 主要在内质网合成。组成生物膜的甘油磷脂分子的主要特征是: ① 具有一个与磷酸基团相结合的极性头和两个非极性的尾 (脂肪酸链), 但存在于线粒体内膜和某些细菌质膜上的心磷脂除外, 它具有 4 个非极性的尾部; 极性头的空间占位可影响脂双层的曲度 (图 4-6), 如与 PC 比较, PE 更倾向于形成曲面膜。② 脂肪酸碳链为偶数, 多数碳链由 16 或 18 个碳原子组成。③ 除饱和脂肪酸 (如软脂酸、硬脂酸) 外, 常常还有含 1~2 个双键的不饱和脂

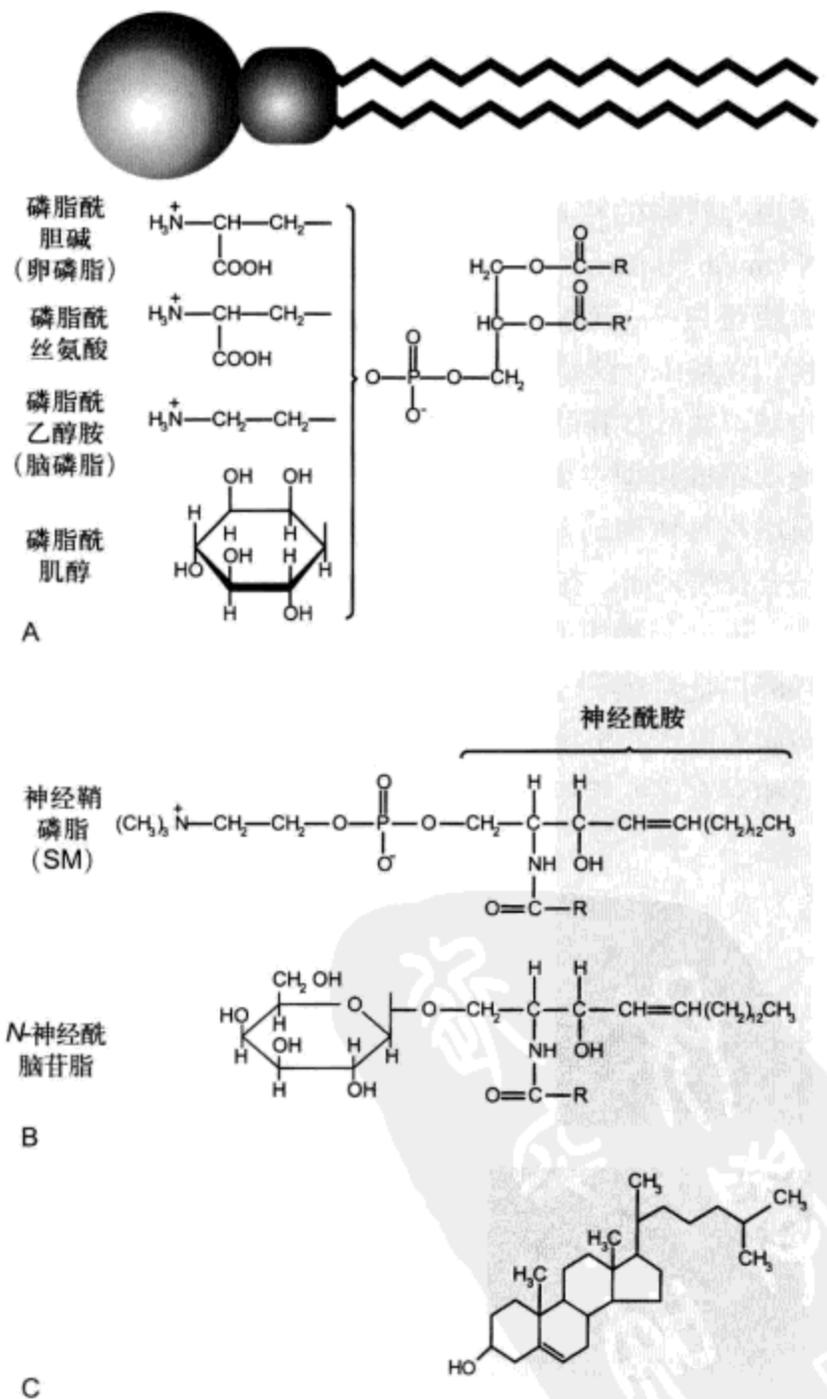


图 4-5 膜脂的基本类型

A. 甘油磷脂。B. 鞘磷脂与糖脂。C. 胆固醇。

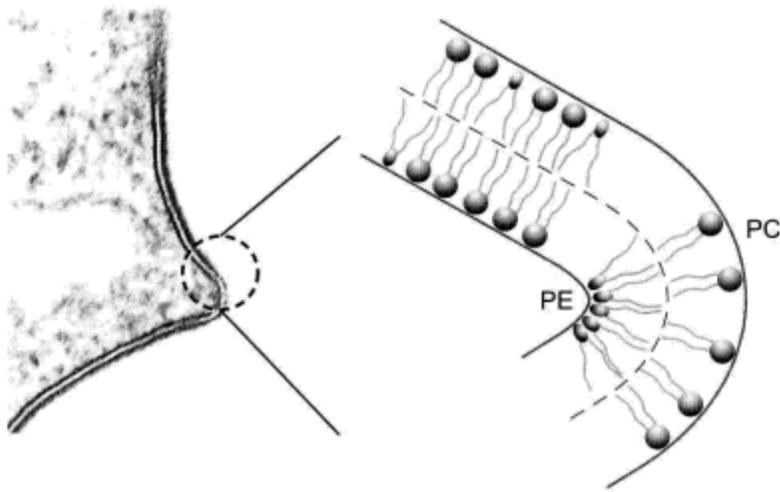


图 4-6 脂分子极性头的空间占位对脂双层曲度的影响

PE 极性头较小，更多地分布在脂双层曲度较小的一侧。右侧为电镜图片，左侧为示意图。

肪酸（如油酸），不饱和脂肪酸多为顺式，顺式双键在烃链中产生约  $30^\circ$  角的弯曲。甘油磷脂不仅是生物膜的基本成分，而且其中的某些成分如 PI 等在细胞信号转导中起重要作用。

## 2. 鞘脂

鞘脂均为鞘氨醇的衍生物，主要在高尔基体合成。它具有一条烃链，另一条链是与鞘氨醇的氨基共价结合的长链脂肪酸。其头部，可能是一个类似于甘油磷脂的基于磷酸基团的极性头部，称为鞘磷脂 (sphingomyelin, SM)，如神经鞘磷脂，是丰度最高的一种鞘磷脂，它的头部是一个与鞘氨醇分子末端的羟基共价结合的磷酸胆碱。其分子结构与甘油磷脂非常相似，可以与甘油磷脂共同组成生物膜（图 4-5B）。鞘磷脂形成的脂双层的厚度较甘油磷脂的厚度更大，如 SM 为  $4.6 \sim 5.6 \text{ nm}$ ，而 PC 约  $3.5 \text{ nm}$ （图 4-7A, B）。

另一类鞘脂为糖脂，也是两性分子，它的极性头部是直接共价结合到鞘氨醇上的一个糖分子或寡糖链。糖脂普遍存在于原核和真核细胞的细胞质膜上，其含量不足膜脂总量的 5%，在神经细胞质膜上糖脂含量较高，占 5%~10%。目前已发现 40 余种糖脂。不同的细胞中所含糖脂的种类不同，如神经细胞含有神经节苷脂，人红细胞表面含有 ABO 血型糖脂等，它们均具有重要的生物学功能。

在动物细胞中，最简单的糖脂是脑苷类，只有一个葡萄糖或半乳糖残基与鞘氨醇连接（图 4-5B），较复杂的神经节苷脂可含多达 7 个糖残基，其中含有不同数目的唾液酸。

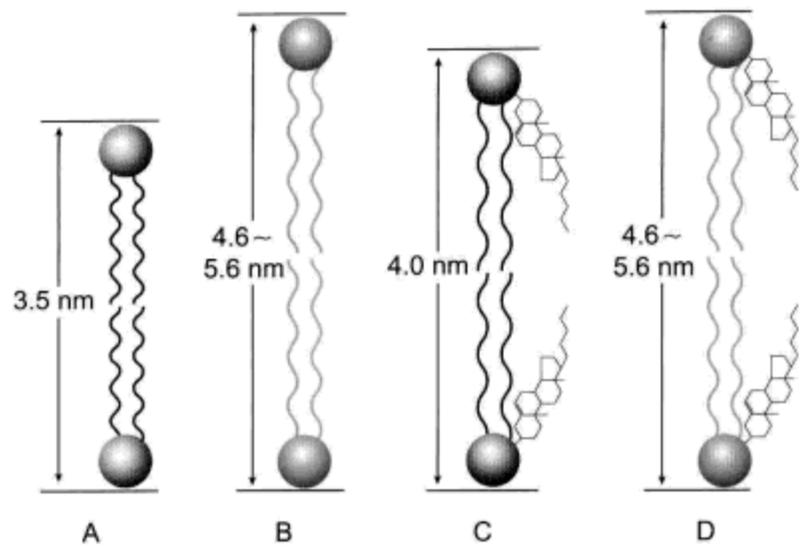


图 4-7 不同膜脂成分的脂双层厚度的比较

A. 卵磷脂。B. 鞘磷脂。C. 卵磷脂和胆固醇。D. 鞘磷脂和胆固醇。

## 3. 固醇

胆固醇及其类似物统称固醇，它是一类含有 4 个闭环的碳氢化合物，其亲水的头部为一个羟基，是一种分子刚性很强的两性化合物（图 4-5C）。与磷脂不同的是其分子的特殊结构和疏水性太强，自身不能形成脂双层。只能插入磷脂分子之间，参与生物膜的形成。胆固醇与甘油磷脂相互作用会增加磷脂分子的有序性及脂双层的厚度，但对鞘磷脂没有明显的影响（图 4-7C, D）。胆固醇存在于动物细胞和极少数的原核细胞中，在哺乳动物的细胞质膜中，尤为丰富。其含量一般不超过膜脂的 1/3。在多数细胞中，50%~90% 的胆固醇存在于细胞质膜和相关的囊泡膜上。胆固醇的合成是在动物细胞的胞质和内质网完成的，但动物体内胆固醇多数来自于食物。它在调节膜的流动性，增加膜的稳定性以及降低水溶性物质的通透性等方面都起着重要作用。同时，它又是脂筏的基本结构成分。缺乏胆固醇可能导致细胞分裂的抑制。植物细胞和真菌细胞中都有各自的固醇化合物，如植物中的豆固醇 (stigmasterol) 和真菌中的麦角固醇 (ergosterol)。植物细胞质膜中的固醇含量高达膜脂总量的 30%~50%，多数细菌质膜中不含有胆固醇成分，但某些细菌的膜脂中含有甘油酯等中性脂质。

胆固醇除了作为生物膜的主要结构成分外，还是很多重要的生物活性分子的前体化合物，如固醇类激素、维生素 D 和胆酸等。人们还发现胆固醇可以与发育调控的重要信号分子 Hedgehog 共价结合。

膜脂作为生物膜的基本结构成分，其组成的分子类型对生物膜的结构和功能有很大的影响。实际上，细胞质膜和其他生物膜都具有各自特异的膜脂和膜蛋白成

分。不同种类的细胞，同一细胞中不同类型的生物膜，甚至同一细胞的质膜的不同部位，其膜的组分也可能有明显的差别。如高尔基体膜上的鞘磷脂的含量为内质网膜的6倍，小肠上皮细胞腔面质膜中的鞘磷脂含量是质膜其他部位含量的一倍，后者显然有助于增加腔面质膜的稳定性。

## (二) 膜脂的运动方式

膜脂分子有4种运动方式：

(1) 沿膜平面的侧向运动，温度为37℃时的扩散系数为 $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ，相当于每秒移动2 μm的距离。由于侧向运动产生分子间的换位，其交换频率约 $10^7$ 次/s。磷脂分子通过侧向运动从细菌的一端到另一端一般仅需要1 s，动物细胞大约20 s。侧向运动是膜脂分子的基本运动方式，具有重要的生物学意义。

(2) 脂分子围绕轴心的自旋运动。

(3) 脂分子尾部的摆动。脂肪酸链靠近极性头部的摆动较小，其尾部摆动较大。X射线衍射分析显示，在距头部第9个碳原子以后的脂肪酸链已变成无序状态。

(4) 双层脂分子之间的翻转运动：一般情况下翻转运动极少发生，其发生频率还不到脂分子侧向交换频率的 $10^{-10}$ 。研究人工膜上脂分子运动所得到的结果与用支原体、细菌和红细胞膜为材料所得到的结果类似，但脂分子的翻转运动在细胞某些膜系统中发生的频率很高，特别是在内质网膜上，新合成的磷脂分子经几分钟后，将有半数从脂双层的一侧通过翻转运动转位到另一侧。但这一过程需要特殊的膜蛋白完成。

脂分子的运动不仅与脂分子的类型有关，也与脂分子同膜蛋白及膜两侧的生物大分子之间的相互作用以及温度等环境因素有关。因此，在某一特定的细胞中所检测到的某类脂分子的运动速率，可能与人工脂膜的数据有较大的差别。

## (三) 脂质体

脂质体 (liposome) 是根据磷脂分子可在水相中形成稳定的脂双层膜的现象而制备的人工膜。单层脂分子铺展在水面上时，其极性端插入水相而非极性尾部面向空气界面，搅动后形成乳浊液，即形成极性端向外而非极性端在内的脂分子团或形成双层脂分子的球形脂质体 (图4-8A, C)。

球形脂质体直径为25~1 000 nm不等，控制形成条件可获得大小均一的脂质体，同样的原理还可以制备平面的脂质体膜 (图4-8B)。

脂质体可用单一或混合的磷脂来制备，同时还可以嵌入不同的膜蛋白，因此脂质体是研究膜脂与膜蛋白及其生物学性质的极好实验材料。脂质体中裹入DNA可有效地将其导入细胞中，因此常用于转基因实验。

在临床治疗中，脂质体显示出诱人的应用前景。脂质体中裹入不同的药物或酶等具有特殊功能的生物大分子，可望用于治疗多种疾病。特别是脂质体技术与单克隆抗体及其他技术结合，可使药物更有效地作用于靶细胞以减少对机体的损伤 (图4-8D)。

## 三、膜蛋白

动物细胞主要有9种膜脂，而膜蛋白的种类繁多。酵母基因组中约1/3的基因编码膜蛋白，多细胞有机体膜蛋白的种类更多一些。虽然多数膜蛋白的分子数量较少，但却赋予生物膜非常重要的生物学功能。50%以上的小分子药物的受体为膜蛋白。不同类型的细胞以及细胞不同部位的生物膜，其膜蛋白的含量与种类都有很大的区别。如线粒体内膜的膜蛋白含量达76%，而在神经细胞髓鞘质膜中，仅占18%。

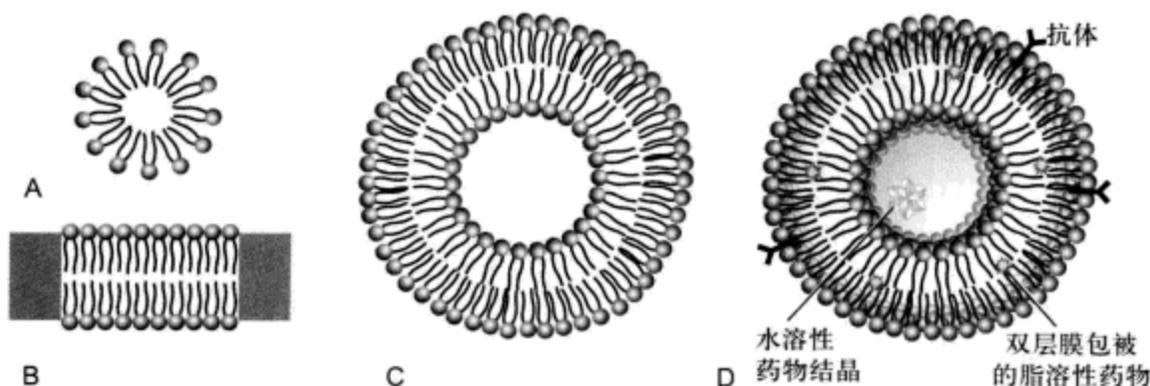


图4-8 几种类型的脂质体  
A. 水溶液中的磷脂分子团。B. 平面脂质体膜。C. 球形脂质体。D. 用于靶向药物治疗的脂质体的示意图。

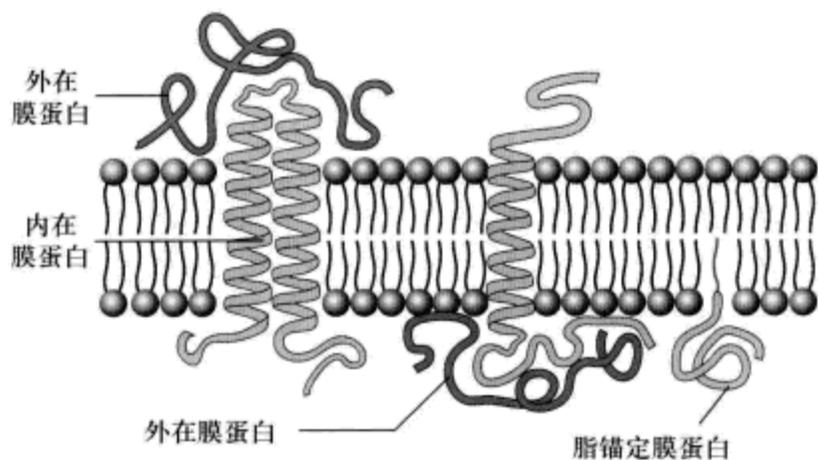


图 4-9 膜蛋白的基本类型

### (一) 膜蛋白的类型

根据膜蛋白分离的难易程度及其与脂分子的结合方式，膜蛋白可分为 3 种基本类型：外在膜蛋白 (extrinsic membrane protein) 或称外周膜蛋白 (peripheral membrane protein)、内在膜蛋白 (intrinsic membrane protein) 或称整合膜蛋白 (integral membrane protein) 和脂锚定膜蛋白 (lipid anchored protein) (图 4-9)。

外在膜蛋白为水溶性蛋白质，靠离子键或其他较弱的键与膜表面的膜蛋白分子或膜脂分子结合，因此只要改变溶液的离子强度甚至提高温度就可以从膜上分离下来，但膜结构并不被破坏。如多种以磷脂为底物的水溶性酶类，就是通过其分子中特殊部位结合到生物膜表面。磷脂酶是其中一例，它以较高的亲和力结合到膜界面的磷脂头部极性基团上，以降解衰老或损伤的生物膜，它也是多种蛇毒的活性成分。

脂锚定膜蛋白是通过与之共价相连的脂分子 (脂肪酸或糖脂) 插入膜的脂双分子中，而锚定在细胞质膜上，其水溶性的蛋白质部分位于脂双层外。脂锚定膜蛋白可分 3 种类型 (图 4-10)：

(1) 脂肪酸 (myristate 或软脂酸) 结合到膜蛋白 N 端的甘氨酸残基上 (图 4-10A)，如与肿瘤发生相关的酪氨酸蛋白激酶的突变体 v-Src。

(2) 由 15 或 20 个碳链长的烃链结合到膜蛋白 C 端的半胱氨酸残基上 (图 4-10B)，有时还有另一条烃链或脂肪酸链结合到近 C 端的其他半胱氨酸残基上，这种双重锚定有助于蛋白质更牢固地与膜脂结合。例如同属于 GTPase 超家族的 Ras 和 Rab 蛋白均为双锚定膜蛋白。前者参与细胞信号转导，后者介导膜泡的融合。上述两类脂锚定膜蛋白均分布在细胞膜胞质一侧。

(3) 通过糖脂锚定在细胞质膜上 (图 4-10C)。如

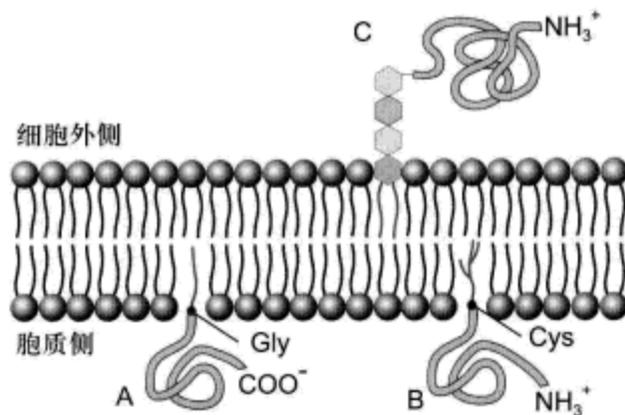


图 4-10 脂锚定膜蛋白的 3 种基本类型

磷脂酶 C 和大分子的蛋白聚糖 (proteoglycan)。在不同的细胞中，这类糖脂的结构有很大的不同，但都含有磷脂酰肌醇 (PI) 基团，因此称为磷脂酰肌醇糖脂 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定方式，简称 GPI 锚定方式。与磷脂分子类似，同磷脂酰肌醇结合的 2 个脂肪酸链插入脂膜中。肌醇同时与长度不等的寡糖链相结合，最后寡糖末端的磷酸己醇胺与蛋白质共价相连。从而有效地将蛋白质结合到质膜上。GPI 脂锚定膜蛋白均分布在质膜外侧。

内在膜蛋白与膜结合比较紧密，只有用去垢剂处理使膜崩解后才可分离出来。内在膜蛋白占整个膜蛋白的 70%~80%，据估计人类基因中，1/4~1/3 基因编码的蛋白质为内在膜蛋白。

### (二) 内在膜蛋白与膜脂结合的方式

目前所了解的内在膜蛋白均为跨膜蛋白 (transmembrane protein)，跨膜蛋白在结构上可分为：胞质外结构域、跨膜结构域和胞质内结构域等 3 个组成部分 (图 4-11)。它与膜结合的主要方式有：

(1) 膜蛋白的跨膜结构域与脂双层分子的疏水核心的相互作用，这是内在膜蛋白与膜脂结合的最主要和最基本的结合方式。

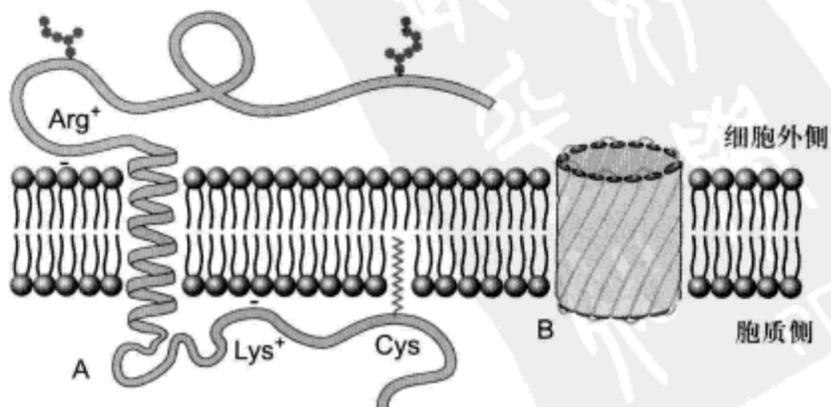


图 4-11 内在膜蛋白与膜脂结合方式示意图

(2) 跨膜结构域两端携带正电荷的氨基酸残基, 如精氨酸、赖氨酸等与磷脂分子带负电的极性头部形成离子键, 或带负电的氨基酸残基通过  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等阳离子与带负电的磷脂极性头部相互作用。

(3) 某些膜蛋白通过自身在胞质一侧的半胱氨酸残基共价结合到脂肪酸分子上, 后者插入脂双层中进一步加强膜蛋白与脂双层的结合力。

内在膜蛋白的跨膜结构域是与膜脂结合的主要部位, 具体作用方式如下:

(1) 跨膜结构域含有 20 个左右的疏水氨基酸残基, 形成  $\alpha$  螺旋 (长度约 3 nm), 其外部疏水侧链通过范德华力与脂双层分子脂肪酸链 (厚度约 3.2 nm) 相互作用 (图 4-11A)。这类膜蛋白称单次跨膜蛋白 (single-pass transmembrane protein), 如红细胞质膜上的血型糖蛋白 A (glycophorin A), 其跨膜的  $\alpha$  螺旋由 23 个氨基酸残基组成。很多膜蛋白具有几个跨膜的  $\alpha$  螺旋区, 称多次跨膜蛋白 (multipass transmembrane protein)。如最普遍存在的细胞信号转导通路, G 蛋白偶联信号通路的细胞表面受体就是一类跨膜 7 次的膜蛋白。跨膜结构域的  $\alpha$  螺旋的方向, 有的与膜面垂直, 有的则与膜面呈一定的角度。因此跨膜结构域的  $\alpha$  螺旋的长度也各有差异。

(2) 跨膜结构域主要由  $\beta$  折叠片 (图 4-11B) 组成。如大肠杆菌外膜上的孔蛋白 (porin) 以及线粒体、叶绿体外膜上的孔蛋白。由于  $\alpha$  螺旋中相邻两个氨基酸残基的轴向距离为 0.15 nm, 而在  $\beta$  折叠片中为 0.35 nm。所以跨膜结构域的  $\beta$  折叠片一般由 10~12 个氨基酸残基组成。16 个反向平行的  $\beta$  折叠片相互作用形成跨膜通道, 通道具有疏水性的外侧和亲水性的内侧。可允许相对分子质量小于  $10^4$  的小分子自由通过。孔蛋白跨膜结构域疏水性的外侧以及某些疏水性的侧链, 使其稳定的结合在脂膜上。所有的孔蛋白均为三聚体的跨膜蛋白。

(3) 某些  $\alpha$  螺旋既具有极性侧链又具有非极性侧链,  $\alpha$  螺旋的外侧是非极性链, 与膜脂相互作用。内侧是极性链, 形成特异极性分子的跨膜通道。如人红细胞膜上的带 3 (band 3) 蛋白, 它介导  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  的跨膜运输。

结构分析的结果显示, 跨膜蛋白与膜脂的相互作用往往是非常复杂的。水孔蛋白 (aquaporin) 是一类具有 6 个  $\alpha$  螺旋区的蛋白质家族, 通常形成四聚体的膜蛋白以行使其转运水或甘油等分子的功能。Glpf 是其中一种转运甘油的水孔蛋白 (图 4-12)。

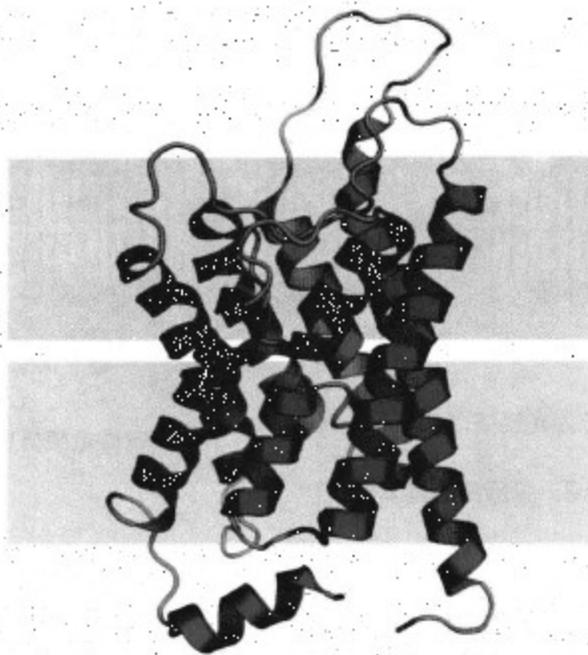


图 4-12 转运甘油的水孔蛋白 GlpF 的三维结构图像 (孔祥鹏博士惠赠)

多数跨膜  $\alpha$  螺旋的方向与脂膜平面成一定角度, 一条最长的  $\alpha$  螺旋在中部出现弯曲, 特别是有两条较短的  $\alpha$  螺旋其 N 端相对, 各插进脂膜的一半 (图 4-12)。可以想象, 膜脂的种类和与膜蛋白的作用方式也直接影响到膜蛋白的空间构象及其功能。已知水孔蛋白 0 (aquaporin-0, AQP0) 在脂膜中, 周围排列紧密的磷脂面对跨膜结构域的疏水部分, 脂肪酸链呈直线排列, 而面对某些亲水的表面, 脂肪酸链呈扭曲状。某些磷脂分子的头部基团与膜面平行, 而某些磷脂分子的头部基团则与膜面近于垂直。又如, 线粒体内膜中心的磷脂与氧化磷酸化相关的膜蛋白复合体的相互作用, 可能对其稳定性是十分重要的。这些都显示了膜脂与膜蛋白的特异的复杂的相互作用。虽然, 人们可以根据膜蛋白分子的氨基酸序列推测其三级结构, 但对膜蛋白及其与膜脂关系的三维结构的分析, 对确切了解其结构和功能依然是至关重要的研究课题 (图 4-13)。

目前已克隆了几千种膜蛋白的基因, 但由其难以形成晶体, 因而只对 150 余种膜蛋白的结构获得了高分辨率的解析结果。其三维结构分析主要是应用低温电镜技术和 X 射线晶体衍射技术。低温电镜技术的基本原理是根据电镜所观察到的膜蛋白的二维晶体图像, 推算出膜蛋白的三维结构。某些能形成结晶的膜蛋白可用 X 射线晶体衍射技术分析。近几年, 我国学者用 X 射线晶体衍射技术成功地解析了叶绿体膜上的捕光复合物 II 的晶体结构和线粒体内膜电子传递链上的复合物 II 的晶体结构, 使得对这类多亚基蛋白复合体的结构与功能的研究



图 4-13 3-磷酸甘油转运蛋白的三维结构图像 (王大能博士惠赠)

图像显示膜蛋白与膜脂复杂的相互作用。

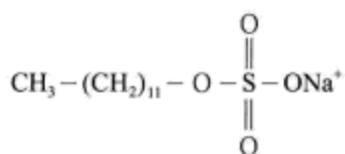
取得了突破性进展。

### (三) 去垢剂

去垢剂 (detergent) 是一端亲水、一端疏水的两性小分子, 是分离与研究膜蛋白的常用试剂。去垢剂可以插入膜脂, 与膜脂或膜蛋白的跨膜结构域等疏水部位结合, 形成可溶性的微粒 (图 4-14A)。

少量的去垢剂能以单分子状态溶解于水中, 当达到一定浓度时, 去垢剂分子可在水中形成微团 (micelle), 此时去垢剂的浓度称为微团临界浓度 (critical micelle concentration, CMC)。CMC 是各种去垢剂的特征和功能的重要参数。当使用的去垢剂的浓度高于或底于其 CMC 时, 去垢剂的作用方式和膜蛋白的分离效果均有所不同。去垢剂分为离子型去垢剂和非离子型去垢剂两种类型。

常用的离子型去垢剂如十二烷基磺酸钠 (SDS) 具有带电荷的基团, 其分子式如下:



SDS 可使细胞膜崩解, 与膜蛋白疏水部分结合并使其与膜分离, 高浓度的 SDS 还可以破坏蛋白质中的离子键和氢键等非共价键, 甚至改变蛋白质亲水部分的构象。这一特性常用于蛋白质成分分析的 SDS 凝胶电泳。

由于 SDS 对蛋白质的作用较为剧烈, 可引起蛋白质变性, 因此在纯化膜蛋白时, 特别是为获得有生物活性的膜蛋白时, 常采用不带电荷的非离子去垢剂。

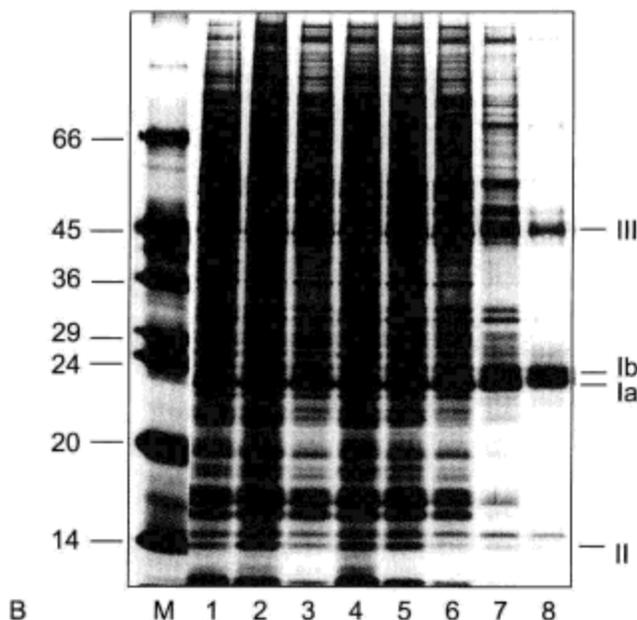
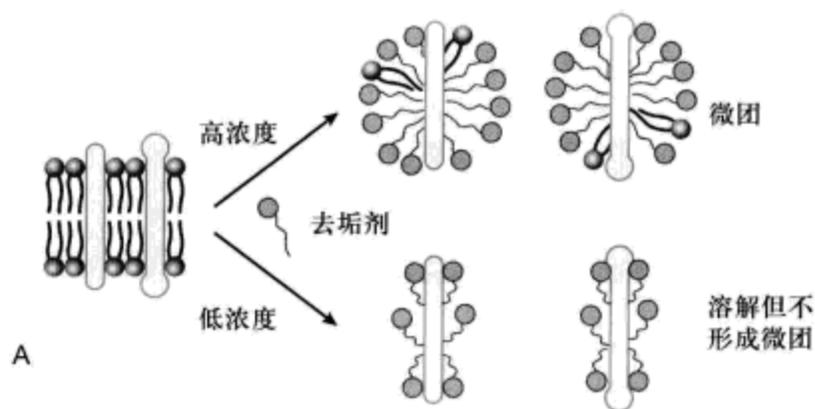
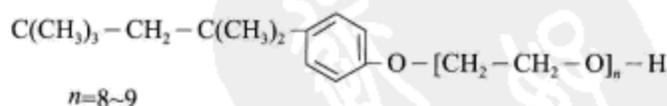


图 4-14 利用去垢剂萃取和研究膜蛋白

A. 去垢剂与膜脂或膜蛋白的跨膜结构域的疏水部位结合, 形成可溶性的微粒的示意图。B. 用不同的去垢剂处理膀胱上皮细胞质膜, 所萃取的膜蛋白的 SDS 凝胶电泳图谱。电泳条带 M 为已知相对分子质量标志蛋白质, 1 为全部膜蛋白的电泳条带, 2~8 为 7 种不同的去垢剂所萃取的膜蛋白的电泳条带 (5、6 分别为 0.5% 和 2% 的 Triton X-100), 7 为去垢剂 Sarkosol, 后者可以特异地萃取出膀胱上皮细胞的 4 种主要质膜蛋白。(B 图由孙同天博士惠赠)

常用的非离子去垢剂 Triton X-100 (商品名) 分子式如下:



非离子去垢剂也可使细胞膜崩解, 但对蛋白质的作用比较温和, 它不仅用于膜蛋白的分离与纯化, 也用于除去细胞的膜系统, 以便对细胞骨架蛋白和其他蛋白质进行研究。

去垢剂有多种类型, 多数为人工合成。由于不同的去垢剂对各种膜蛋白的作用有所区别, 因此, 有针对性地选用合适的、一定浓度的去垢剂在膜蛋白的分离与纯化过程中, 就显得尤为重要 (图 4-14B)。

## 第二节 细胞质膜的基本特征与功能

### 一、膜的流动性

膜的流动性是细胞质膜也是所有的生物膜的基本特征之一，也是细胞生长增殖等生命活动的必要条件。在脂膜二维空间上的热运动是指膜脂和膜蛋白流动性的动力学基础，膜脂与膜蛋白的相互作用以及与膜两侧的生物大分子的相互作用使膜的流动状态更为复杂。它不仅保证了细胞正常的代谢活动而且受控于细胞代谢过程的调节。

#### (一) 膜脂的流动性

膜脂的流动性主要指脂分子的侧向运动，它在很大程度上是由脂分子本身的性质决定的，一般来说，脂肪酸链越短，不饱和程度越高，膜脂的流动性越大。温度对膜脂的运动有明显的影响，各种膜脂都具有其不同的相变温度 (phase transition temperature)，鞘脂的相变温度一般高于磷脂。在生物膜中膜脂的相变温度是由组成生物膜的各种脂分子的相变温度决定的。一般情况下，鞘脂或卵磷脂形成的脂双层膜流动性小一些，磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和磷脂酰丝氨酸等形成的脂膜流动性大一些。

膜脂的流动性是生长细胞完成包括生长、增殖在内的多种生理功能所必需的，在细菌和动物细胞中常常通过增加不饱和脂肪酸的含量来调节膜脂的相变温度以维持膜脂的流动性。

在动物细胞中，胆固醇对膜的流动性也起着重要的双重调节作用。胆固醇分子既有与磷脂疏水的尾部相结合使其更为有序、相互作用增强及限制其运动的作用，也有将磷脂分子隔开使其更易流动的功能。其最终效应取决于胆固醇在脂膜中的相对含量以及上述两种作用的综合效果。通常胆固醇是起到防止膜脂由液相变为固相以保证膜脂处于流动状态的作用。在细胞质膜脂双层的内外两侧的膜脂中，细胞外侧膜脂的胆固醇的含量往往高于内侧，因此内侧膜脂的流动性更弱。

由于膜脂与膜脂以及膜脂与膜蛋白之间的复杂的相互

作用，膜脂分子的运动状态各不相同，其运动的区域也受到一定的限制。当用荧光素标记磷脂分子，研究磷脂在成纤维细胞质膜中的运动情况时，人们发现大多数的磷脂只是在直径约  $0.5\ \mu\text{m}$  的范围内自由运动，其原因是受到了直径约  $1\ \mu\text{m}$  的膜蛋白含量较高的质膜区域所阻隔。

#### (二) 膜蛋白的流动性

一系列的实验证明了膜蛋白的流动性，荧光抗体免疫标记实验就是其中一个典型的例子。用抗鼠细胞质膜蛋白的荧光抗体 (显绿色荧光) 和抗人细胞质膜蛋白的荧光抗体 (显红色荧光) 分别标记小鼠和人的细胞表面，然后用灭活的仙台病毒介导两种细胞融合。10 min 后不同颜色的荧光在融合细胞表面开始扩散，40 min 后已分辨不出融合细胞表面绿色荧光或红色荧光区域。如加上不同的滤光片则显示红色荧光或绿色荧光都均匀地分布在融合细胞表面，这一实验清楚地显示了与抗体结合的膜蛋白在质膜上的运动。

如果用药物抑制细胞能量转换、蛋白质合成等代谢途径，对膜蛋白运动没有影响，但是如果降低温度，则膜蛋白的扩散速率可降低至原来的  $1/20\sim 1/10$ 。实验表明，膜蛋白在脂双层二维溶液中的运动是自发的热运动，不需要细胞代谢产物的参加，也不需要能量输出。

在某些细胞中，当荧光抗体标记时间继续延长，已均匀分布在细胞表面的标记荧光会重新排布，聚集在细胞表面的某些部位，即所谓成斑现象 (patching)，或聚集在细胞的一端，即成帽现象 (capping)。成斑现象和成帽现象进一步证实了膜蛋白的流动性。对这两种现象的解释是二价的抗体分子交联相邻的膜蛋白分子，同时也与膜蛋白和膜下骨架系统的相互作用以及质膜与细胞内膜系统之间膜泡运输相关。

实际上，机体中并不是所有的膜蛋白都像在体外人-鼠融合细胞质膜上那样自由运动。在极性细胞中，质膜蛋白被某些特殊的结构如紧密连接限定在细胞表面的某个区域。即使在单细胞生物草履虫的细胞质膜上，膜蛋白的分布也具有特定的区域性。有些细胞 90% 的膜蛋白是自由运动的，而有些细胞只有 30% 的膜蛋白处于流动状态，原因之一是某些膜蛋白与膜下细胞骨架结构相结合，限制了膜蛋白的运动。用阻断微丝形成的药物细胞松弛素 B 处理细胞后，膜蛋白的流动性大大增加。

用非离子去垢剂处理细胞使细胞膜系统崩解，多数膜蛋白流失，但仍有部分膜蛋白结合在细胞骨架上。细胞骨架不但影响膜蛋白的运动，也影响其周围的膜脂的

流动。膜蛋白与膜脂分子的相互作用也是影响膜流动性的重要因素。

### (三) 膜脂和膜蛋白运动速率的检测

如前所述, 荧光漂白恢复 (FPR) 技术是研究膜蛋白或膜脂流动性的基本实验技术之一。用荧光素标记膜蛋白或膜脂, 然后用激光束照射细胞表面某一区域, 使被照射区的荧光淬灭变暗。由于膜的流动性, 淬灭区域的亮度会逐渐增加, 最后恢复到与周围的荧光强度相等。根据荧光恢复的速度可推算出膜蛋白或膜脂扩散速度。如细胞质膜中磷脂的扩散常数 (diffusion constant) 为  $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ , 较人工制备的纯磷脂双层膜减小近一个数量级。质膜上的膜蛋白扩散常数一般在  $5 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ , 而蛋白质在水溶液中的扩散常数为  $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ , 要比膜蛋白大 100~10 000 倍, 显然脂分子与蛋白质分子及蛋白质分子之间的相互作用束缚了膜蛋白的自由扩散。

## 二、膜的不对称性

膜脂和膜蛋白在生物膜上呈不对称分布, 同一种膜脂在脂双层中的分布不同。同一种膜蛋白在脂双层中的定向或其拓扑学结构完全不同, 糖蛋白和糖脂的糖基部分均位于细胞质膜的外侧。

### (一) 细胞质膜各膜面的名称

为了便于研究和了解细胞质膜以及其他生物膜的不对称性, 人们将细胞质膜的各个膜面命名如下: 与细胞外环境接触的膜面称质膜的细胞外表面

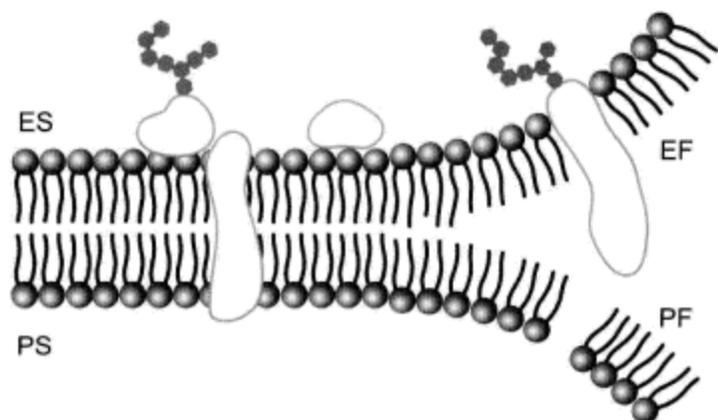


图 4-15 生物膜各膜面的名称

脂双层膜的 ES 与 PS 面以及电镜冷冻蚀刻技术所显示的细胞断裂面: EF 与 PF 面。

(extrocytoplasmic surface, ES), 这一层脂分子和膜蛋白称细胞膜的外小叶 (outer leaflet)。与细胞质基质接触的膜面称质膜的原生质表面 (protoplasmic surface, PS) 这一层脂分子和膜蛋白称细胞膜的内小叶 (inner leaflet)。电镜冷冻蚀刻技术制样过程中, 膜结构常常从双层脂分子疏水端断裂, 这样又产生了质膜的细胞外小叶断裂面 (extrocytoplasmic face, EF) 和原生质小叶断裂面 (protoplasmic face, PF) (图 4-15)。

细胞内的膜系统也根据类似的原理命名, 如细胞内的囊泡, 与细胞质基质接触的膜面为它的 PS 面, 而与囊泡腔内液体接触的面为 ES 面, 在膜泡出芽、融合及转运过程中, 其拓扑学结构保持不变 (图 4-16)。

动植物细胞的细胞质膜、内质网、高尔基体、溶酶体和囊泡等均由一层膜结构组成。线粒体、叶绿体和细胞核等有两层被膜, 革兰氏阴性细菌如大肠杆菌的细胞质膜也由两层膜组成。其膜面的命名原则及其拓扑学性质基本相同。在脂肪细胞 (adipocyte) 和很多细胞中, 都含有储存脂肪 (主要是三酰甘油和胆固醇) 的一种细胞器称脂滴 (lipid droplet)。脂滴外周仅由一层磷脂分子包被, 相当于膜的内小叶。储存脂肪在内质网膜的内外小叶之间合成, 然后以出芽的方式披上内质网膜的内小叶, 形成游离的脂滴。其膜周围有多种膜蛋白, 其中包括与脂代谢相关的酶类。

### (二) 膜脂的不对称性

膜脂的不对称性是指同一种膜脂分子在膜的脂双层中呈不均匀分布。多数磷脂存在于脂双层的内外两侧, 但某一侧往往含量高一些, 并非均匀分布。如在人的红细胞质膜上, 鞘磷脂和卵磷脂多分布在质膜外小叶, 磷

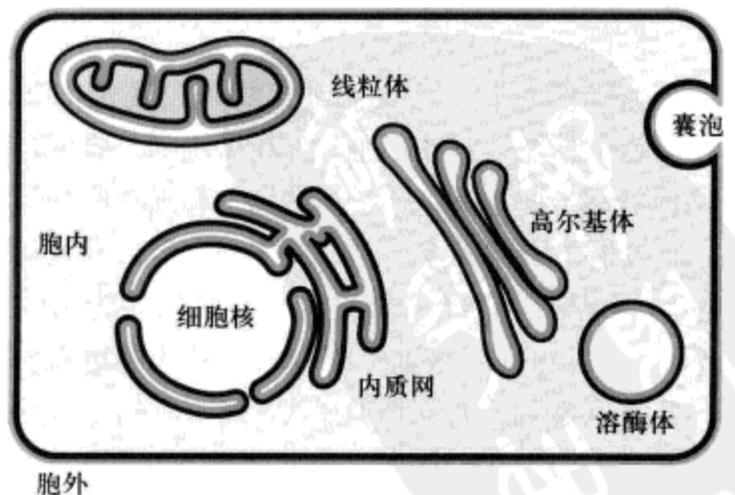


图 4-16 细胞膜系统拓扑学结构的示意图

图中显示细胞的膜系统在膜泡出芽、融合及转运过程中, 其拓扑学结构保持不变。

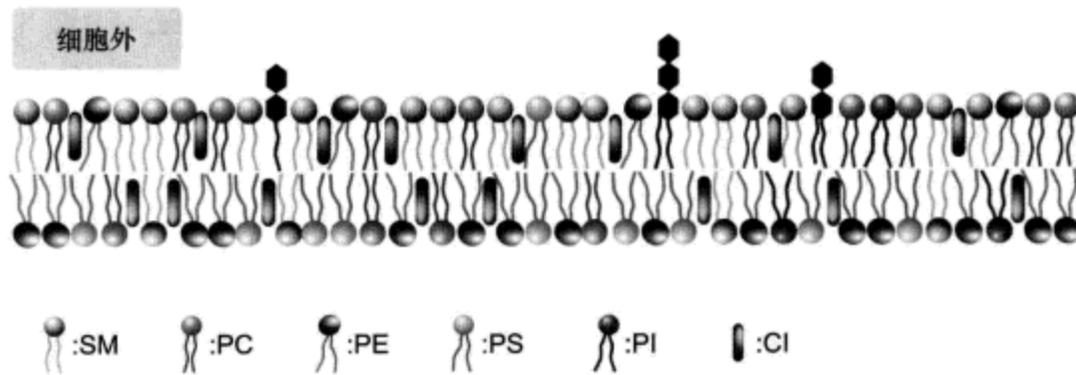


图 4-17 磷脂在人红细胞质膜上分布的示意图

SM: 鞘磷脂; PC: 卵磷脂; PS: 磷脂酰丝氨酸; PE: 磷脂酰乙醇胺; PI: 磷脂酰肌醇; Cl: 胆固醇。

脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和磷脂酰丝氨酸多分布在质膜内小叶（图 4-17）这种分布将会影响质膜的曲度。胆固醇在生物膜内外小叶的分布一般比较均匀。糖脂的分布表现出完全不对称性，其糖侧链都在质膜或其他内膜的 ES 面上，因此糖脂仅存在于质膜的细胞外小叶中以及内膜的 ES 面。糖脂的不对称分布是完成其生理功能的结构基础。磷脂分子不对称分布的原因和生物学意义还不很清楚，有人认为可能与其合成的部位有关，如甘油磷脂和鞘脂分别在内质网的 PS 面和高尔基体的 ES 面合成，这就形成了在脂双层中的不对称分布。显然这还不能完全解释膜脂的不对称性，如卵磷脂在质膜外小叶上含量更高。也有人推测可能与膜蛋白的不对称分布有关。已知某些膜脂的不对称分布有重要的生物学意义。如细胞质膜上，所有的磷酸化的磷脂酰肌醇的头部基团都面向细胞质一侧，这是在 G 蛋白偶联的信号转导的必要条件。又如在血小板的质膜上，磷脂酰丝氨酸通常主要分布在质膜的内小叶中，当受到血浆刺激后，很快翻转到外小叶上，活化参与凝血的酶类。

确定，在随后的一系列转运过程中其拓扑学结构始终保持不变直至蛋白质降解，而不会像膜脂那样发生翻转运动。各种生物膜的特征及其生物学功能主要是由膜蛋白来决定的。膜蛋白的不对称性是生物膜完成复杂的在时间与空间上有序的各种生理功能的保证。

### 三、细胞质膜相关的膜骨架

细胞质膜特别是膜蛋白常常与膜下结构（主要是细胞骨架系统）相互联系、协同作用，并形成细胞表面的某些特化结构以完成特定的功能。这些特化结构包括膜骨架（membrane associated cytoskeleton）、鞭毛和纤毛、

#### （三）膜蛋白的不对称性

所有的膜蛋白，无论是外在膜蛋白还是内在膜蛋白在质膜上都呈不对称分布。与膜脂不同，膜蛋白的不对称性是指每种膜蛋白分子在质膜上都具有明确的方向性。如细胞表面的受体、膜上载体蛋白等，都是按一定的取向传递信号和转运物质。与质膜相关的酶促反应也都发生在膜的某一侧面，特别是质膜上的糖蛋白或糖脂，其糖残基均分布在质膜的 ES 面，它们与细胞外的胞外基质，以及生长因子、凝集素和抗体等相互作用。如人的 ABO 血型抗原（图 4-18）。

各种生物膜的特征及其生物学功能主要是由膜蛋白来决定的。膜蛋白的不对称性是在它们合成时就已经

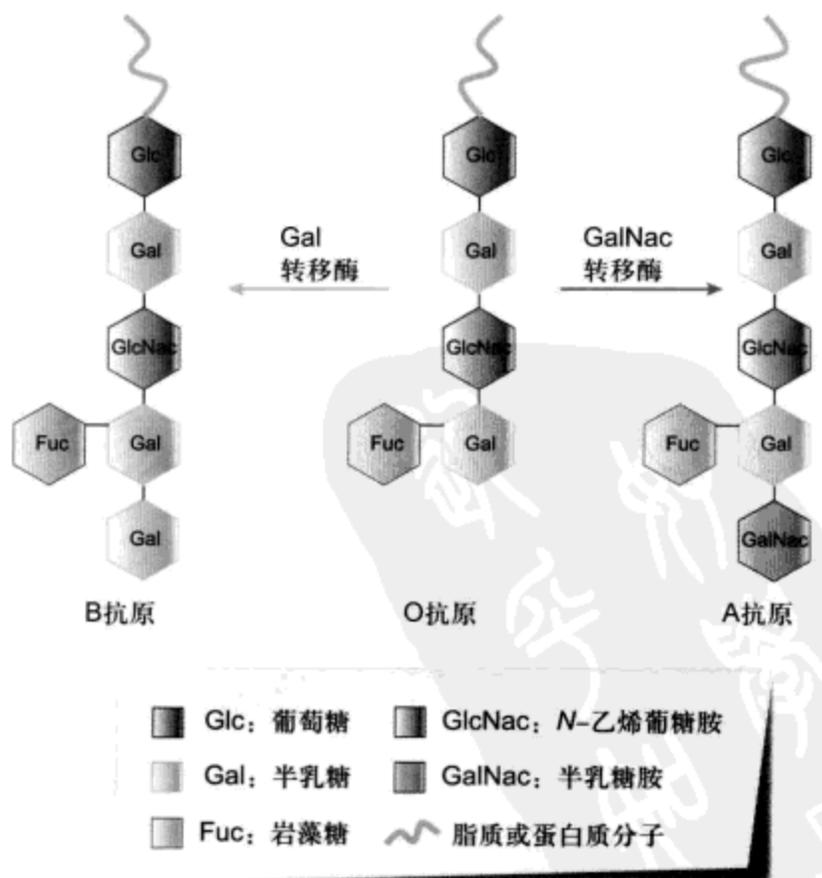


图 4-18 人的 ABO 血型抗原寡糖链结构的比较

微绒毛及细胞的变形足等，分别与细胞形态的维持、细胞运动、细胞的物质交换和信息传递等功能有关。其基本结构与功能将在细胞骨架一章详细阐述。因此本节仅介绍有关膜骨架的一些知识。

### (一) 膜骨架

膜骨架是指细胞质膜下与膜蛋白相连的由纤维蛋白组成的网架结构，它从力学上参与维持细胞质膜的形状并协助质膜完成多种生理功能。早期人们应用光学显微镜曾注意到在细胞质膜下存在约  $0.2\ \mu\text{m}$  厚的、观察不到任何细胞结构的“溶胶层”，又称细胞的皮层(cortex)。电镜技术出现以后，才发现质膜下的溶胶层中含有丰富的细胞骨架纤维(如微丝等)，这些骨架纤维通过膜骨架与质膜相连。多数细胞的细胞质膜下，也都存在精细而复杂的细胞骨架网络，但至今为止，对膜骨架研究最多的还是哺乳动物的红细胞。

### (二) 红细胞的生物学特性

红细胞负责把  $\text{O}_2$  从肺运送到体内各组织，同时把细胞代谢产生的  $\text{CO}_2$  运回肺中。哺乳动物成熟的红细胞没有细胞核和内膜系统，所以红细胞的质膜是最简单最易研究的生物膜。正常情况下，红细胞呈双凹形的椭球结构，直径约  $7\ \mu\text{m}$ ，但它可以通过直径比自己更小的毛细血管。在其平均寿命约 120 天的期间内，人的红细胞往返于动脉和静脉达几百万次，行程约 480 km 而不破损，这就需要红细胞质膜既有很好的弹性又具有较高的强度。红细胞质膜的这些特性在很大程度上是由膜骨架赋予的。红细胞的质膜与膜骨架比较容易纯化、分

析。当细胞经低渗处理后，质膜破裂，同时释放出血红蛋白和胞内其他可溶性蛋白。这时红细胞仍然保持原来的基本形状和大小，这种结构称为血影(ghost)(图 4-19A)。因此红细胞为研究质膜的结构及其与膜骨架的关系提供了理想的材料。

### (三) 红细胞质膜蛋白及膜骨架

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析血影的蛋白质成分显示：红细胞膜蛋白主要包括血影蛋白或称红膜肽(spectrin)、锚蛋白(ankyrin)、带 3 蛋白、带 4.1 蛋白、带 4.2 蛋白和肌动蛋白(actin)，此外还有一些血型糖蛋白(glycoprotein)(图 4-19B)。改变处理血影的离子强度后进行电泳分析，则血影蛋白和肌动蛋白条带消失，说明这两种蛋白质不是内在膜蛋白，比较容易除去。此时血影的形状变得不规则，膜蛋白的流动性增强，说明这两种蛋白质在维持膜的形状及固定其他膜蛋白的位置方面起重要作用。若用去垢剂 Triton X-100 处理血影，这时带 3 蛋白及一些血型糖蛋白的电泳条带消失，但血影仍能维持原来的形状，说明带 3 蛋白及血型糖蛋白是膜整合蛋白，在维持血影乃至细胞形态上并不起决定性作用。

带 3 蛋白是红细胞质膜上  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  阴离子运输的载体蛋白，每个细胞中约有 120 万个分子。与血型糖蛋白不同，它由两个相同的链组成二聚体，每条链含有 929 个氨基酸，在质膜中穿越 12~14 次，形成跨膜  $\alpha$  螺旋。带 3 蛋白的 N 端伸向细胞质基质面折叠成不连续的疏水区域，为膜骨架蛋白提供结合位点。那么红细胞膜骨架是如何构成的呢？它与膜蛋白是什么关系呢？血影

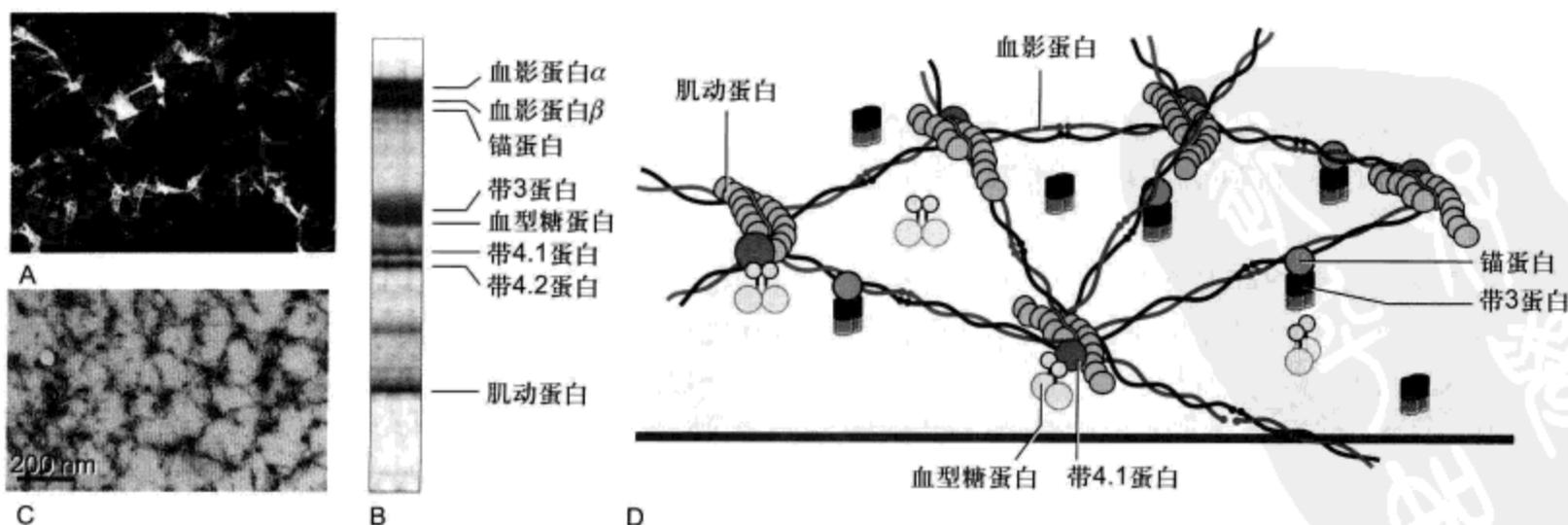


图 4-19 红细胞膜骨架的基本结构与成分

A. 红细胞血影。B. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对血影成分分析。C. 血影的负染色电镜照片，显示出网状的膜骨架结构。D. 膜骨架与膜蛋白结合的示意图。(A、B、C 图由 D. Acehan 和 D. Stokes 博士惠赠)

经非离子去垢剂处理后，所有的脂质和血型糖蛋白及大部分带3蛋白都被溶去，存留部分即是纤维状的膜骨架蛋白网络及部分与之结合的内在膜蛋白。因此，血影的形状仍能保持。膜骨架蛋白主要成分包括血影蛋白、肌动蛋白、锚蛋白和带4.1蛋白等。

血影蛋白由 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链组成一个二聚体，长约100 nm，直径约5 nm，两个二聚体头与头部相连形成一个长度为200 nm的四聚体，血影蛋白在体外溶液中就可以组装。每个红细胞约含有10万个血影蛋白四聚体。与血影蛋白四聚体游离端相连的肌动蛋白纤维链长约35 nm，其中包含13个肌动蛋白单体和一个原肌球蛋白分子（由两个多肽组成，每个多肽相对分子质量为 $3.5 \times 10^4$ ）。纯化的血影蛋白与肌动蛋白纤维结合力非常微弱，带4.1蛋白和一种称为内收蛋白（adducin）的蛋白质与之相互作用大大加强了肌动蛋白与血影蛋白的结合力。由于肌动蛋白纤维上存在多个（一般为5个左右）与血影蛋白结合的位点，所以可以形成一个网络状的膜骨架结构（图4-19C）。

膜骨架网络与细胞膜之间的连接主要通过锚蛋白。每个红细胞中约有10万个锚蛋白分子。每个血影蛋白四聚体上平均有一个锚蛋白分子。锚蛋白含有两个功能性结构域：一个能紧密地而且特异地与血影蛋白 $\beta$ 链上的一个位点相连；另一个结构域与带3蛋白中伸向胞质面的一个位点紧密结合，从而使血影蛋白网架与细胞质膜连接在一起。此外，带4.1蛋白还可以与血型糖蛋白的胞质结构域（C端）或带3蛋白结合，同样也起到使膜骨架与质膜蛋白相连的作用。膜骨架的组织及其与细胞质膜内在膜蛋白的关系如图4-19D所示。

红细胞质膜的刚性与韧性主要由质膜蛋白与膜骨架复合体的相互作用来实现，但其双凹形椭圆结构的形成还需要其他的骨架纤维参与。在红细胞中还存在着少量短纤维状的肌球蛋白纤维，它可能与两个或更多的肌动蛋白纤维相结合并将它们拉到一起，以维持红细胞的形态。

除红细胞外，已发现在其他细胞中也存在与锚蛋白、血影蛋白及带4.1蛋白类似的蛋白质，大多数细胞中也都存在膜骨架结构（图4-20）。与红细胞不同，这些细胞具有较发达的胞质骨架体系，特别是质膜下呈网状分布的肌动蛋白纤维，而且细胞质膜功能更为复杂。呈动态变化的膜骨架不仅在力学结构上为细胞质膜行使其功能提供一个三维的空间，而且直接参与细胞质膜的多种代谢活动。所以有关其他细胞中膜骨架的结构

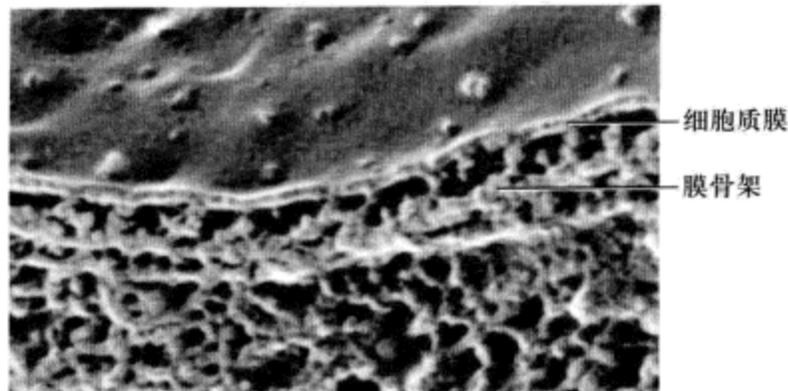


图4-20 深度蚀刻电镜图片显示小鼠耳部外毛细胞的细胞质膜与膜骨架（Bechara Kachar 博士惠赠）

与功能的细节还有待进一步研究。

#### 四、细胞质膜的基本功能

细胞质膜作为细胞内外边界，与内膜系统相比其结构更为复杂，功能更为多样。细胞质膜的主要功能概括如下：

- (1) 为细胞的生命活动提供相对稳定的内环境。
- (2) 选择性的物质运输，包括代谢底物的输入与代谢产物的排除，其中伴随着能量物质的传递。
- (3) 提供细胞识别位点，并完成细胞内外信息跨膜传导；病毒等病原微生物识别和侵染特异的宿主细胞的受体也存在于质膜上。
- (4) 为多种酶提供结合位点，使酶促反应高效而有序地进行。
- (5) 介导细胞与细胞、细胞与胞外基质之间的连接。
- (6) 质膜参与形成具有不同功能的细胞表面特化结构。
- (7) 膜蛋白的异常与某些遗传病、恶性肿瘤、自身免疫病甚至神经退行性疾病相关，很多膜蛋白可作为疾病治疗的药物靶标。

质膜的功能将在后面相关章节详细阐述。

质膜如何高效而精确地完成上述多种功能，其很多结构细节尚不清楚。近年来对脂筏及与之相关的胞膜窖（又称陷窝、质膜微囊，caveola）的研究，加深了对质膜的结构与功能了解（见图4-3）。

脂筏中富含鞘磷脂和胆固醇。鞘磷脂较长且直的非极性尾部之间的相互作用，加上与胆固醇的近乎平面的疏水基团间“疏水键”的作用，形成了脂筏的基本结构。用非离子去垢剂可以将富含鞘磷脂和胆固醇脂筏从细胞质膜上分离出来。

某些蛋白质如阂蛋白（flotillin）、GPI 锚定膜蛋白，

以及与脂筏表面糖基结合（类似凝集素作用）的外在膜蛋白等对脂筏的组装及稳定性均起着一定的作用。由于鞘磷脂的疏水尾部的碳链（通常 20~26 个碳原子）比甘油磷脂（通常 16~22 个碳原子）长，所以脂筏的脂双层厚度也比质膜其他部位厚一些（见图 4-7），而脂筏上内在膜蛋白的跨膜结构域也长一些，借此更有利于脂筏的组装。脂筏是一种相对稳定的、分子排列较紧密的、流动性较低的膜脂微区（membrane lipid microdomain）结构，直径一般为 50 nm。

胞膜窖具有独特的形态结构，形成了在电镜下可见到的直径 50~100 nm 的质膜凹陷区。其中也富含鞘磷脂、胆固醇及 GPI 锚定膜蛋白，同时还发现一类称窖蛋白（又称陷窝蛋白，caveolin）的膜蛋白。胞膜窖是否是脂筏的一种特殊的结构形式，即脂筏与内陷素结合后形成胞膜窖，而胞膜窖失去了内陷素回复成脂筏，或两者是基本成分与结构类似但执行不同功能的两类不同的质膜结构域，尚有待进一步研究。脂筏与胞膜窖的共同特征是具相对有序的、结构上相对稳定的质膜微区，在细

胞的信息传递和物质运输等生命活动中起重要的作用，如：人们发现某些 G 蛋白偶联受体和 G 蛋白均聚集在脂筏上。同时表皮生长因子受体、胰岛素受体等也存在于脂筏上，而且发现越来越多的细胞内信号分子如 Ras、Src 家族酪氨酸激酶及信号转导的接头分子也都定位在脂筏上。显然这为信号的跨膜传递提供了必要的空间和时间的保障。

还有一些的实验结果表明脂筏和/或胞膜窖在细胞的胞饮和细胞蛋白质分选中也起重要的作用。人们还证实 HIV 和流感病毒的感染过程、朊病毒（prion）致病、老年性痴呆（Alzheimer）以及某些肿瘤的发生均可能与脂筏或胞膜窖有密切的关系。

目前脂筏的研究主要停留在体外培养细胞上（脂筏研究多集中在上皮细胞，而胞膜窖主要在成纤维细胞上），在有机体中脂筏存在的普遍性及其确切的结构和功能依然不甚明了，其主要原因是脂筏过于微小且处在动态变化之中。这些问题的解决将依赖于今后新的实验技术和观察手段的建立。

## ● 思考题 ●

1. 从生物膜结构模型的演化，谈谈人们对生物膜的认识过程。
2. 膜脂有哪几种基本类型？它们各自的结构特征与功能是什么？
3. 何谓内在膜蛋白？它以什么方式与脂双层膜相结合？
4. 生物膜的基本特征是什么？这些特征与它的生理功能有什么联系？
5. 细胞表面有哪几种常见的特化结构？红细胞膜骨架的基本结构与功能是什么？

## ● 参考文献 ●

1. 杨福愉. 生物膜. 北京：科学出版社，2005.
2. Engelman D. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 2005, 438: 578-580.
3. Grecco H E, Schmick M, Bastiaens P I H. Signaling from the living plasma membrane. *Cell*, 2011, 144: 897-909.
4. Jacobson K, Dietrich C. Looking at lipid rafts? *Trends in Cell Biology*, 2004, 9: 87-91.
5. Simons K, van Meer G. Lipid sorting in epithelial cell. *Biochemistry*, 1988, 27: 6 197-6 202.
6. Singer S J, Nicolson G L. The fluid mosaic of the structure of cell membranes. *Science*, 1972, 175: 720-731.

# 物质的跨膜运输

细胞质膜是细胞与细胞外环境之间一种选择性通透屏障，它既能保障细胞对基本营养物质的摄取、代谢产物或废物的排除，又能调节细胞内离子浓度，使细胞维持相对稳定的内环境。物质的跨膜运输对细胞的生存和生长至关重要。物质通过细胞质膜的转运主要有3种途径：被动运输、主动运输和胞吞与胞吐作用。

## 第一节 膜转运蛋白与小分子物质的跨膜运输

### 一、脂双层的不透性和膜转运蛋白

活细胞内外的离子浓度是高度不同的， $\text{Na}^+$ 是细胞外最丰富的阳离子（cation），而 $\text{K}^+$ 是细胞内最丰富的阳离子（表5-1）。细胞内外的离子浓度差异对于细胞的存活和功能至关重要。这种离子浓度差异分布主要由两种机制所调控：一是取决于一套特殊的膜转运蛋白（membrane transport protein）的活性；二是取决于质膜本身的脂双层所具有的疏水性特征。除了脂溶性分子和小的不带电荷的分子能以简单扩散的方式直接通过脂双层外，脂双层对绝大多数极性分子、离子以及细胞代谢产物的通透性都极低，形成了细胞的渗透屏障。这些物

表 5-1 典型哺乳类动物细胞内外离子浓度的比较

组分	细胞内浓度 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞外浓度 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
阳离子		
$\text{Na}^+$	5~15	145
$\text{K}^+$	140	5
$\text{Mg}^{2+}$	0.5	1~2
$\text{Ca}^{2+}$	$10^{-4}$	1~2
$\text{H}^+$	$7 \times 10^{-5}$ (pH7.2)	$4 \times 10^{-5}$ (pH7.4)
阴离子*		
$\text{Cl}^-$	5~15	110

\* 细胞必须含有等量的正负电荷，即呈电中性。因此细胞内除含有 $\text{Cl}^-$ 外，还含有许多其他未列在表中的阴离子（如 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、蛋白质、核酸和荷载磷酸及羧基基团的代谢产物等），固定的阴离子是带负电荷的大小不同的有机分子，它们被捕获在细胞内，不能透过质膜。表中给出的 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度是胞质中的游离离子浓度。细胞内总的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为1~2 mmol/L，而 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度约为20 mmol/L，但它们绝大多数与蛋白质或其他物质结合， $\text{Ca}^{2+}$ 还储存在各种细胞器中。

质的跨膜转运需要质膜上的膜转运蛋白参与。

各种细胞膜结合蛋白中，有15%~30%是膜转运蛋白。膜转运蛋白可分为两类：一类是载体蛋白（carrier protein, transporter）；另一类是通道蛋白（channel protein）。载体蛋白与通道蛋白对溶质的转运机制不同，前者与特异的溶质结合后，通过自身构象的改变以实现物质的跨膜

转运,而后者通过形成亲水性通道实现对特异溶质的跨膜转运。

### (一) 载体蛋白及其功能

载体蛋白几乎存在所有类型的生物膜上,属于多次跨膜蛋白。每种载体蛋白能与特定的溶质分子结合,通过一系列构象改变介导溶质分子的跨膜转运(图5-1)。在*E. coli*已经鉴定的基因中,大约20%的基因编码膜转运蛋白。20世纪50年代中期,发现细菌单基因突变可导致半乳糖跨膜运输被阻断,从而发现了细菌质膜上负责 $\beta$ -半乳糖转运的载体蛋白。类似的基因突变在人的胱氨酸尿(cystinuria)遗传病患者中发现,这种病人的肾细胞和肠细胞不能将胱氨酸和半胱氨酸转运到血液,从而导致这些氨基酸在尿中积累并在肾中形成胱氨酸结石。

不同部位的生物膜往往含有各自功能相关的不同载体蛋白(表5-2),如质膜具有输入营养物糖、氨基酸和核苷酸的载体蛋白。线粒体内膜具有输入丙酮酸和ADP以及输出ATP的载体蛋白等。载体蛋白具有与底物(溶质)特异性结合的位点,所以每种载体蛋白对底物具有高度选择性,通常只转运一种类型的分子;转运过程具有类似于酶与底物作用的饱和和动力学特征;既可能被底物类似物竞争性地抑制,又可被某种抑制剂非竞争性抑制以及对pH有依赖性等,因此有人将载体蛋白称为通透酶(permease)。与酶不同的是,载体蛋白对转运的溶质分子不作任何共价修饰。

### (二) 通道蛋白及其功能

通道蛋白有3种类型:离子通道(ion channel)、孔蛋白(porin)以及水孔蛋白(AQP)。目前所发现的大多数通道蛋白都是离子通道。

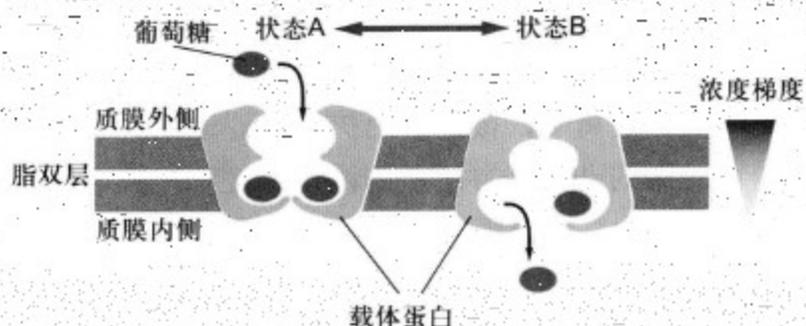


图5-1 载体蛋白通过构象改变介导溶质(葡萄糖)被动运输的模型

载体蛋白以两种构象状态存在:状态A,溶质结合位点在膜外侧暴露;状态B,同样的溶质结合位点在膜内侧暴露。两种构象状态的转变随机发生而不依赖于是否有溶质结合和是否完全可逆。若膜外侧溶质浓度高,则与状态A载体蛋白结合的溶质就比与状态B载体蛋白结合的多,净效果表现为溶质顺浓度梯度进入细胞。

通道蛋白形成选择性和门控性跨膜通道。因为对离子的选择性取决于通道的直径、形状以及通道内带电荷氨基酸的分布,所以离子通道介导被动运输时不需要与溶质分子结合,只有大小和电荷适宜的离子才能通过。它最早发现于神经细胞,目前发现的通道蛋白已有100余种,普遍存在于各类真核细胞的质膜以及细胞内膜上。孔蛋白存在于革兰氏阴性细菌的外膜以及线粒体和叶绿体的外膜上,跨膜区域由 $\beta$ 折叠片层形成柱状亲水性通道。与离子通道蛋白相比,孔蛋白选择性很低,而且能通过较大的分子,如线粒体外膜上的孔蛋白可允许相对分子质量为 $5 \times 10^5$ 的分子通过。水孔蛋白是近年来发现的一类新的通道蛋白,其转运机制随后介绍。

根据对离子通道蛋白转运底物的研究,发现与载体蛋白相比,离子通道具有3个显著特征。第一个特征

表5-2 载体蛋白的举例

载体蛋白	典型定位	能源	功能
葡萄糖载体	大多数动物细胞的质膜	无	被动输入葡萄糖
$\text{Na}^+$ 驱动的葡萄糖泵	肾和肠细胞的顶部质膜	$\text{Na}^+$ 梯度	主动输入葡萄糖
$\text{Na}^+-\text{H}^+$ 交换器	动物细胞的质膜	$\text{Na}^+$ 梯度	主动输出 $\text{H}^+$ ,调节pH
$\text{Na}^+-\text{K}^+$ 泵	大多数动物细胞的质膜	ATP水解	主动输出 $\text{Na}^+$ 和输入 $\text{K}^+$
$\text{Ca}^{2+}$ 泵	真核细胞的质膜	ATP水解	主动输出 $\text{Ca}^{2+}$
$\text{H}^+$ 泵( $\text{H}^+-\text{ATPase}$ )	植物细胞、真菌和一些细菌细胞的质膜	ATP水解	从细胞主动输出 $\text{H}^+$
	动物细胞溶酶体膜、植物和真菌细胞的液泡膜	ATP水解	主动将胞质内 $\text{H}^+$ 转运到溶酶体或液泡
菌紫红质	一些细菌的质膜	光	主动将 $\text{H}^+$ 转运到细胞外

是具有极高的转运速率，比已知任何一种载体蛋白最快转运速率要高 1 000 倍以上，每个通道每秒钟可通过  $10^7 \sim 10^8$  个离子，接近自由扩散的理论值。驱动离子跨膜转运的动力来自溶质的浓度梯度和跨膜电位差两种力的合力，即跨膜的电化学梯度 (electrochemical gradient)，运输的方向顺电化学梯度进行。第二个特征是离子通道没有饱和值，即使在很高的离子浓度下它们通过的离子量依然没有最大值。第三个特征是离子通道并非连续性开放而是门控的，即通道的开启或关闭受膜电位变化、化学信号或压力刺激的调控。因此，根据激活信号的不同，离子通道可分为电压门通道 (voltage-gated channel)、配体门通道 (ligand-gated channel) 和应力激活通道 (stress-activated channel) (图 5-2)。在电压门通道中，带电荷的蛋白质结构域会随跨膜电位梯度的改变而发生相应的移动，从而使离子通道开启或关闭。在配体门通道中，细胞内外的某些小分子配体与通道蛋白结合继而引起通道蛋白构象改变，从而使离子通道开启或关闭。应力激活通道是通道蛋白感应应力而改变构象，从而开启通道形成离子流，产生电信号。内耳听觉毛细胞是依赖于这类通道的典型例子。离子通道决定了细胞膜对于特定离子的通透性，并与离子泵 (如  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  泵) 一起，调节细胞内的离子浓度和跨膜电位。神经细胞离子通道的迅速激活导致动作电位的产生和传递；肌细胞中肌质网膜  $\text{Ca}^{2+}$  通道的迅速开启使得储存的  $\text{Ca}^{2+}$  释放到细胞质基质，从而引发肌肉的收缩。

## 二、小分子物质的跨膜运输类型

离子或小分子物质的跨膜运输与诸多生物学过程密切相关，如神经细胞的可兴奋性传递、细胞对营养物的摄取、细胞信号转导、细胞渗透压的维持以及细胞能量转换中 ATP 的产生等。根据跨膜转运是否需要膜转运蛋白参与以及细胞是否提供能量，跨膜运输分为 3 种类型：简单扩散、被动运输 (又叫协助扩散) 和主动运输 (图 5-3)。

### (一) 简单扩散

小分子物质以热自由运动的方式顺着电化学梯度或浓度梯度直接通过脂双层进出细胞，不需要细胞提供能量，也无需膜转运蛋白的协助，称为简单扩散 (simple diffusion)。不同性质的小分子物质跨膜运动的速率差异极大。疏水性小分子如  $\text{O}_2$ 、 $\text{N}_2$  以及小的不带电荷的极性分子很容易通过简单扩散进出细胞。在简单扩散的跨膜运动中，脂双层对溶质的通透性大小主要取决于分子大小和分子的极性。小分子比大分子更容易穿膜，非极性分子比极性分子更容易穿膜，而带电荷的离子跨膜运动则需要更高的自由能，所以没有膜转运蛋白的人工脂双层对带电荷的离子是高度不透的。图 5-4 显示在通过无膜转运蛋白的人工脂双层时，不同性质的小分子具有不同的跨膜运动速率。

物质对膜的通透性 ( $P$ ) 可以根据它在油和水中的

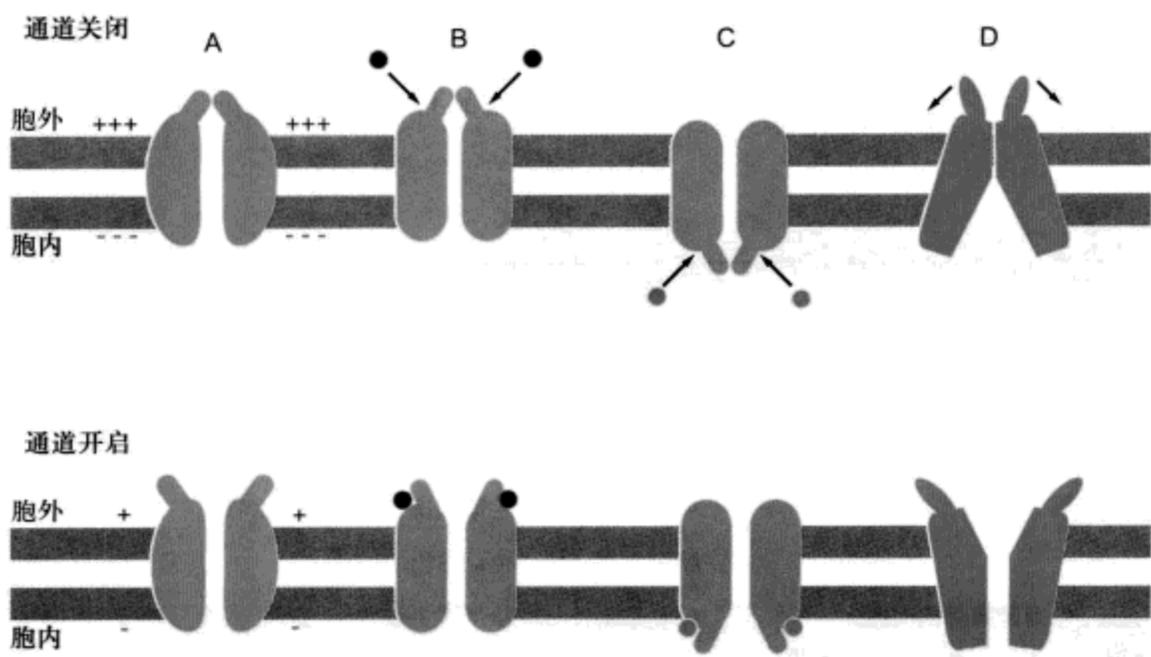


图 5-2 3 种类型的离子通道示意图

A. 电压门通道。B、C. 配体门通道 (B 为胞外配体, C 为胞内配体)。D. 应力激活通道。

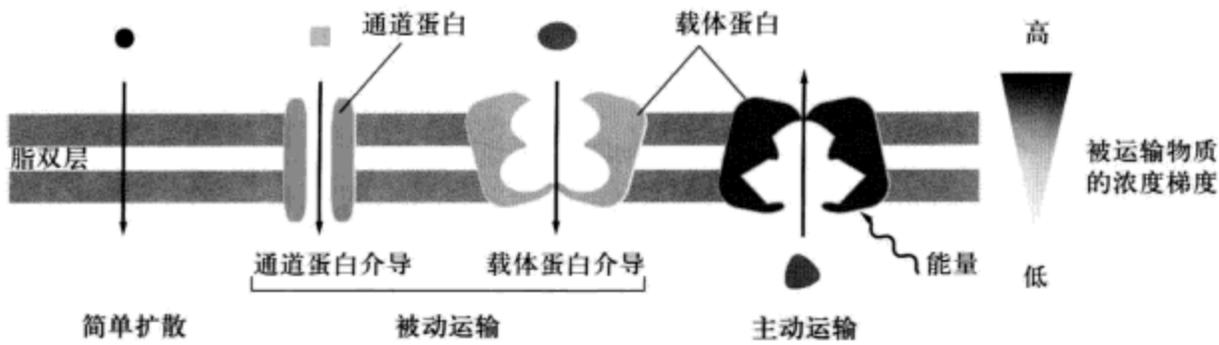


图 5-3 跨膜运输类型

简单扩散和被动运输都是溶质顺着电化学梯度进行跨膜转运，也都不需要细胞提供能量。不同的是，简单扩散不需要膜转运蛋白协助，而被动运输需要膜转运蛋白的协助；主动运输需要细胞提供能量，溶质逆着电化学梯度进行跨膜转运。此外，载体蛋白既能够执行被动运输，又能够执行主动运输，而通道蛋白只能执行被动运输。

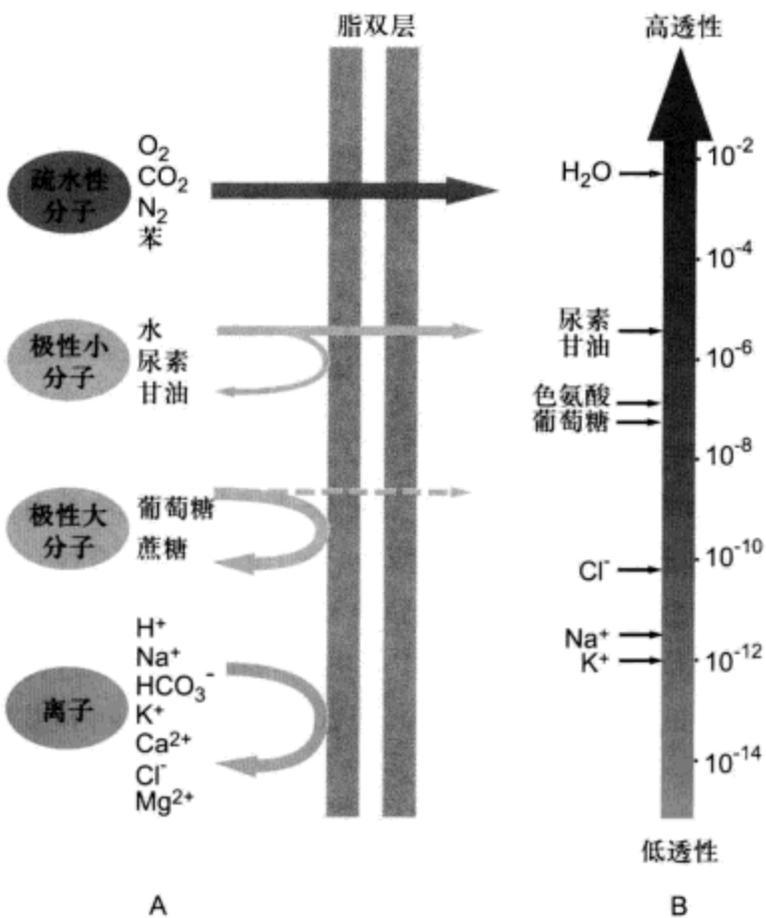


图 5-4 不同性质的分子通过无膜转运蛋白的人工脂双层

A. 人工脂双层膜对不同分子的相对透性。B. 不同分子通过人工脂双层膜的渗透系数。

分配系数 ( $K$ ) 及其扩散系数 ( $D$ ) 来计算:

$$P = KD/t$$

式中,  $t$  为膜的厚度。

## (二) 被动运输

被动运输 (passive transport) 是指溶质顺着电化学梯度或浓度梯度, 在膜转运蛋白协助下的跨膜转运方式, 又叫协助扩散 (facilitated diffusion)。被动运输不需要细胞提供代谢能量, 转运的动力来自物质的电化学梯度或

浓度梯度。借助膜转运蛋白, 多种极性小分子和无机离子, 包括水分子、糖、氨基酸、核苷酸以及细胞代谢物等都可以顺着电化学梯度或浓度梯度完成跨膜转运。

### 1. 葡萄糖转运蛋白

绝大多数哺乳动物细胞都是利用血糖作为细胞的主要能源。所谓血糖就是血液中的糖, 绝大多数情况下都是葡萄糖。人类基因组编码十多种葡萄糖转运蛋白 (glucose transporter, GLUT), 构成 GLUT 蛋白家族, 它们具有高度同源的氨基酸序列, 都含有 12 次跨膜的  $\alpha$  螺旋。对 GLUT1 的深入研究发现, 多肽跨膜部分主要由疏水性氨基酸残基组成, 但有些  $\alpha$  螺旋带有 Ser、Thr、Asp 和 Glu 残基, 它们的侧链可以同葡萄糖羟基形成氢键。这些氨基酸残基被认为可形成载体蛋白内部朝内和朝外的葡萄糖结合位点, 从而通过构象改变完成葡萄糖的协助扩散。转运方向取决于葡萄糖的浓度梯度, 如果胞外葡萄糖浓度高于胞内, 则葡萄糖向胞内转运, 反之则向胞外转运。

### 2. 水孔蛋白: 水分子的跨膜通道

生物体的主要组成成分是水, 约占人体质量的 70%。水分子不带电荷但具有极性, 尽管它可以通过简单扩散的方式缓慢穿过脂双层, 但对于某些组织来说, 如肾小管的近曲小管对水的重吸收、从脑中排出额外的水、唾液和眼泪的形成等, 水分子就必须借助质膜上的大量水孔蛋白 (AQP) 以实现快速跨膜转运 (图 5-5A)。水孔蛋白对于细胞渗透压以及生理与病理的调节作用十分重要, 比如人肾近曲小管对原尿中水重吸收作用, 通常一个正常成年人每天要产生 180 L 的原尿, 这些原尿经近曲小管的水孔蛋白的吸收, 大部分水分被人体循环利用, 最终只有约 1 L 的尿液排出人体。

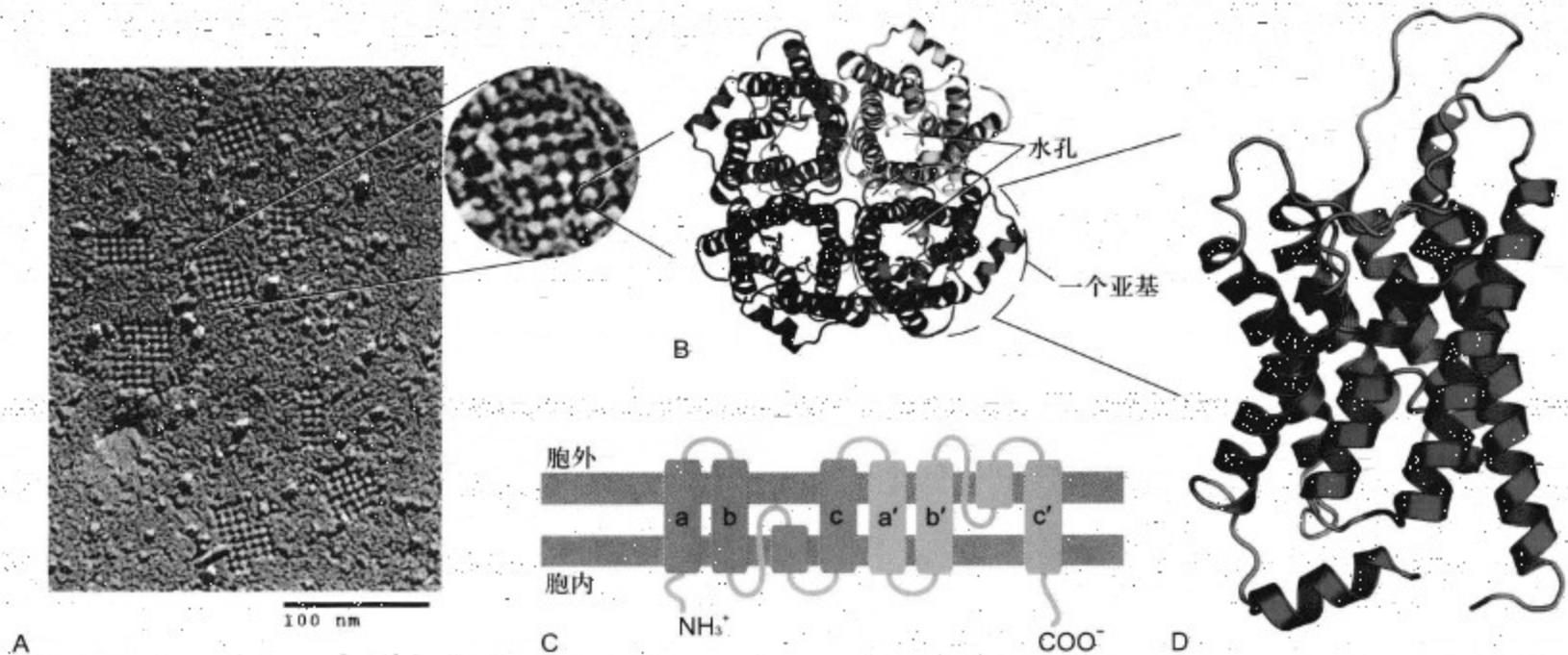


图 5-5 水孔蛋白分布与结构示意图

A. 豚鼠细胞质膜上分布的大量水孔蛋白电镜照片。B. 水孔蛋白 AQP1 由 4 个亚基组成四聚体。C. 每个亚基由 3 对同源的跨膜  $\alpha$  螺旋 (aa'、bb' 和 cc') 组成。D. 亚基三维结构示意图。(A 图由 Bechara Kachar 博士惠赠; B、D 图基于 PDB 数据库 3GD8 结构绘制)

血红细胞是研究水孔蛋白的一个理想模型。20 世纪 80 年代, 在血红细胞膜中发现了第一个水孔蛋白 CHIP28 (channel-forming integral protein, 相对分子质量  $2.8 \times 10^4$ ), 后来统一命名为 AQP1。到现在, 超过 200 种水孔蛋白陆续被发现, 从细菌到植物、从动物到人, 水孔蛋白广泛存在于所有细胞质膜上。水孔蛋白是一个大家族, 仅哺乳类细胞至少就发现了十多种水孔蛋白。表 5-3 列出了部分水孔蛋白的主要分布及其功能。

对 AQP1 晶体学数据分析表明, 水孔蛋白由 4 个

亚基组成四聚体 (图 5-5B), 每个亚基都由 6 个跨膜  $\alpha$  螺旋组成 (图 5-5C, D)。每个水孔蛋白亚基单独形成一个供水分子运动的中央孔, 孔的直径稍大于水分子直径, 约 0.28 nm, 水孔长约 2 nm。尽管现在还没有完全揭示为何 AQP1 在对水分子快速通过的同时能有效阻止质子的通过, 表现出对水分子的特异通透性, 但已有的数据表明, 这种特异性与两个半跨膜区的 Asn-Pro-Ala 模式有关。AQP1 中央孔的孔径无法通过比水分子大的物质, 而两个 Asn-Pro-Ala 中的 Asn 残基所

表 5-3 部分水孔蛋白举例

水孔蛋白	组织分布	功能
AQP0	晶状体纤维细胞	维持晶状体透明度
AQP1	血红细胞 肾近曲小管 眼睛睫状上皮 大脑脉络丛 肺泡上皮细胞	多种功能 近曲肾小管水分重吸收 眼中水状液的分泌 中枢系统脑脊髓液的分泌 肺中水平衡
AQP2	肾集液管	肾集液管中水通透力 (突变产生肾源性糖尿病)
AQP3	肾集液管, 呼吸道支气管上皮细胞	水重吸收进入血液, 气管和支气管液体分泌
AQP4	肾集液管 中枢神经系统 呼吸道支气管上皮细胞	水重吸收 中枢神经系统中脑脊髓液的重吸收, 脑水肿的调节 支气管液体分泌
AQP5	唾液腺、泪腺、汗腺	唾液、眼泪、汗液的分泌
AQP7	脂肪组织、肾、睾丸	转运水以及甘油
$\gamma$ -TIP	植物液泡膜	植物液泡水的摄入, 调节膨压

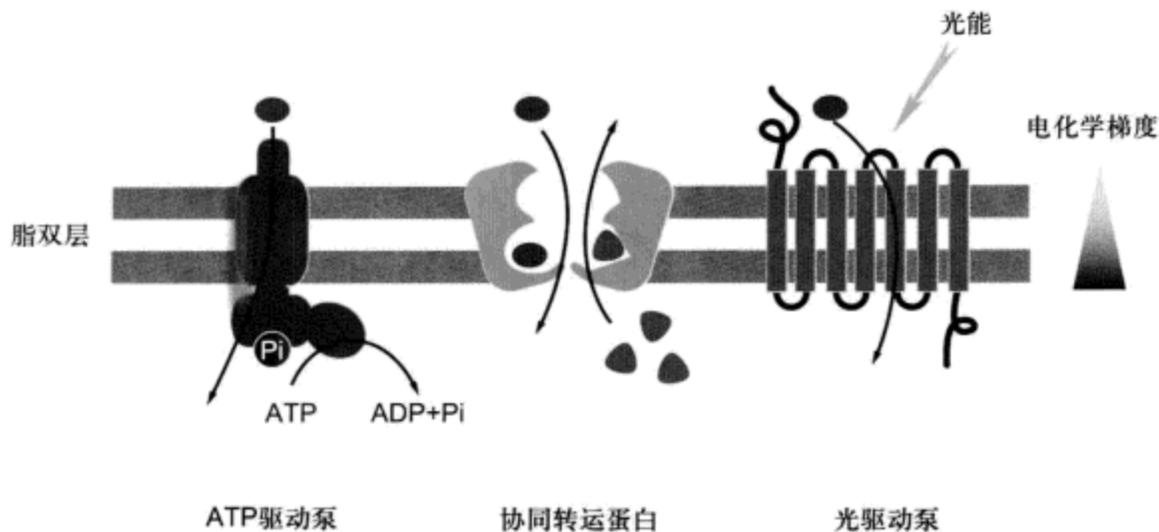


图 5-6 主动运输 3 种类型

带的正电荷也排除了质子的通过，因此，AQP1 是一个高度特异的亲水通道，只允许水而不允许离子或其他小分子溶质通过。值得一提的是，有些水孔蛋白对溶质的通透不仅局限于水分子，如 AQP8 对尿素也有通透性，AQP7 对甘油具有通透性。

植物水孔蛋白在种子萌发、细胞伸长、气孔运动以及受精等过程中调节水分的快速跨膜转运。此外，有些水孔蛋白还在植物逆境应答如抗旱性中起着重要作用。

### (三) 主动运输

与被动运输不同，主动运输 (active transport) 是由载体蛋白所介导的物质逆着电化学梯度或浓度梯度进行跨膜转运的方式。主动运输普遍存在于动、植物细胞和微生物细胞。根据能量来源的不同，可将主动运输分为：由 ATP 直接提供能量 (ATP 驱动泵)、间接提供能量 (协同转运或偶联转运蛋白) 以及光驱动泵 3 种基本类型 (图 5-6)。

#### 1. ATP 驱动泵

ATP 驱动泵 (ATP-driven pump) 是 ATP 酶直接利用水解 ATP 提供的能量，实现离子或小分子逆浓度梯度或电化学梯度的跨膜运输。这种主动运输是一种能量偶联的化学反应过程，即离子或小分子逆电化学梯度的“上山”运动 (需要能量) 与 ATP 水解 (释放能量) 相偶联。主动运输每秒转运的离子数为  $10^0 \sim 10^3$  不等。

#### 2. 协同转运蛋白

协同转运蛋白 (cotransporter) 或偶联转运蛋白 (coupled transporter) 介导各种离子和分子的跨膜运动。这类转运蛋白包括两种基本类型：同向协同转运蛋白 (symporter) 和反向协同转运蛋白 (antiporter)。同向协同转运是偶联物的运输方向相同，如小肠上皮细胞和肾小管上皮细胞吸收葡萄糖或氨基酸等有机物，就是

伴随  $\text{Na}^+$  从细胞外流入细胞内而完成的；而反向协同转运是偶联物的运输方向相反，如质膜上  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换载体在完成  $\text{H}^+$  输出细胞的同时伴随着  $\text{Na}^+$  输入细胞。这两类转运蛋白使一种离子或分子逆浓度梯度的转运与另一种或多种其他溶质顺着电化学梯度或浓度梯度的转运偶联起来。与 ATP 驱动泵直接利用水解 ATP 提供的能量不同，协同转运蛋白所利用的能量储存在其中一种溶质的电化学梯度中。在动物细胞的质膜上， $\text{Na}^+$  是常用的协同转运离子，它的电化学梯度为另一种分子的主动运输提供了驱动力。由于  $\text{Na}^+$  电化学梯度的形成需要  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵水解 ATP，因此，协同转运是一种间接消耗能量的主动转运方式。在细菌、酵母和动物细胞的被膜细胞器，绝大多数协同运输是靠  $\text{H}^+$  而不是靠  $\text{Na}^+$  电化学梯度来驱动的。协同转运蛋白每秒转运的分子数  $10^2 \sim 10^4$  不等。

#### 3. 光驱动泵

光驱动泵 (light-driven pump) 主要发现于细菌细胞，对溶质的主动运输与光能的输入相偶联，如菌紫红质。

## 第二节 ATP 驱动泵与主动运输

在 3 种能量来源形式的主动运输中，最常见的是 ATP 驱动泵。ATP 驱动泵将 ATP 水解生成 ADP 和无机磷 (Pi)，并利用释放的能量将小分子物质或离子进行跨膜转运，因此 ATP 驱动泵通常又被称为转运 ATPase。

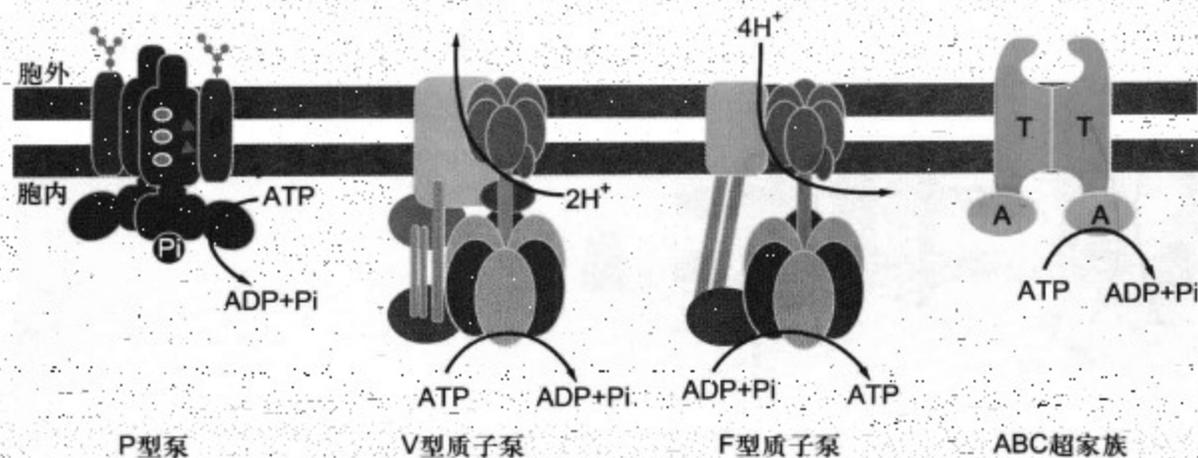


图 5-7 4 种类型的 ATP 驱动泵

P 型泵、V 型质子泵和 ABC 超家族利用 ATP 水解释放的能量进行物质跨膜运输，而 F 型质子泵通常情况下是利用质子动力势合成 ATP。

正常情况下转运 ATPase 并不能单独水解 ATP，而是将 ATP 的水解与物质的跨膜转运紧密偶联在一起。根据泵蛋白的结构和功能特性，ATP 驱动泵可分为 4 类：P 型泵、V 型质子泵、F 型质子泵和 ABC 超家族。前三种转运离子，后一种主要转运小分子（图 5-7）。

## 一、P 型泵

所有 P 型泵 (P-type pump) 都有 2 个独立的  $\alpha$  催化亚基，具有 ATP 结合位点；绝大多数还具有 2 个起调节作用的小的  $\beta$  亚基。在转运离子过程中，至少有一个  $\alpha$  催化亚基发生磷酸化和去磷酸化反应，从而改变转运泵的构象，实现离子的跨膜转运。由于转运泵水解 ATP 使自身形成磷酸化的中间体，因此称作 P 型泵。大多数 P 型泵都是离子泵，负责  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{H}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  跨膜梯度的形成和维持。

### (一) $\text{Na}^+-\text{K}^+$ 泵

#### 1. $\text{Na}^+-\text{K}^+$ 泵结构与转运机制

$\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵 ( $\text{Na}^+-\text{K}^+$  pump)，又称  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPase，

位于动物细胞的质膜上，由 2 个  $\alpha$  和 2 个  $\beta$  亚基组成四聚体 (图 5-8A)， $\beta$  亚基是糖基化的多肽；并不直接参与离子跨膜转运，但帮助在内质网新合成的  $\alpha$  亚基进行折叠。 $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵的转运机制总结在图 5-8B 中：在细胞内侧  $\alpha$  亚基与  $\text{Na}^+$  相结合促进 ATP 水解， $\alpha$  亚基上的一个天冬氨酸残基磷酸化引起  $\alpha$  亚基构象发生变化，将  $\text{Na}^+$  泵出细胞，同时细胞外的  $\text{K}^+$  与  $\alpha$  亚基的另一位点结合，使其去磷酸化， $\alpha$  亚基构象再度发生变化将  $\text{K}^+$  泵入细胞，完成整个循环。从整个转运过程可以看出， $\alpha$  亚基的磷酸化发生在  $\text{Na}^+$  结合后，而去磷酸化则发生在  $\text{K}^+$  结合后。 $\text{Na}^+$  依赖性的磷酸化和  $\text{K}^+$  依赖性的去磷酸化引起  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵构象发生有序变化，每秒钟可发生 1 000 次左右。此外，每个循环消耗一个 ATP 分子，可以逆着电化学梯度泵出 3 个  $\text{Na}^+$  和泵入 2 个  $\text{K}^+$ 。这是由 ATP 直接提供能量的主动转运，而非协同转运，因为  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  都是逆着电化学梯度进行跨膜转运。极少量的乌本苷 (ouabain) 便可抑制  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵的活性 (乌本苷的半数抑制量  $I_{50}$  为  $1 \mu\text{mol/L}$ )，而  $\text{Mg}^{2+}$  和少量的膜脂有助于  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵活性的提高，生物氧化抑制剂如氰化物使 ATP 供应中断， $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵失去能源以致停止工作。

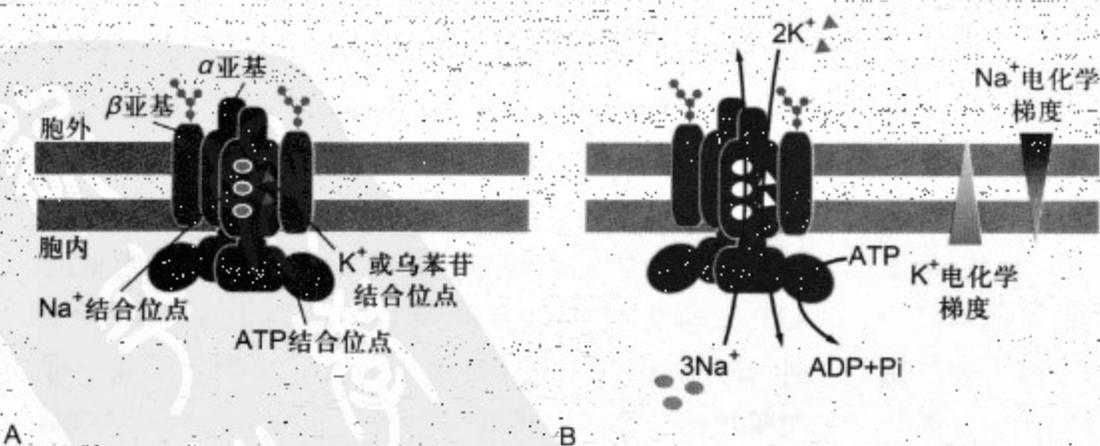


图 5-8  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵的结构 (A) 与工作模式 (B) 示意图

## 2. $\text{Na}^+-\text{K}^+$ 泵主要生理功能

如表 5-1 所示, 动物细胞胞外  $\text{Na}^+$  浓度比胞内高, 而  $\text{K}^+$  离子比胞内低。一般的动物细胞要消耗 1/3 的总 ATP 供  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵工作以维持细胞内高  $\text{K}^+$  低  $\text{Na}^+$  的离子环境 (神经细胞则要消耗 2/3 的总 ATP), 其生理意义主要体现在以下几方面:

(1) 维持细胞膜电位 细胞质膜两侧均具有一定的电位差, 称为膜电位 (membrane potential)。膜电位是膜两侧的离子浓度不同形成的, 细胞在静息状态时膜电位质膜内侧为负, 外侧为正。每一个工作循环下来,  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵将从细胞泵出 3 个  $\text{Na}^+$  并泵入 2 个  $\text{K}^+$ , 结果对膜电位的形成起到了一定作用。

(2) 维持动物细胞渗透平衡 动物细胞内含有多种溶质, 包括多种阴离子以及阳离子。如果没有  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵的工作将  $\text{Na}^+$  泵出细胞, 那么水分子将由于渗透压的缘故顺着自身浓度梯度通过水孔蛋白大量进入细胞引起细胞吸水膨胀。显然,  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵不断地将  $\text{Na}^+$  泵到胞外维持了细胞的渗透平衡。胞外除了高浓度的  $\text{Na}^+$  外, 还有  $\text{Cl}^-$  (靠膜电位停留在胞外) 参与维持动物细胞渗透压平衡。人的红细胞膜上含有丰富的水孔蛋白, 如果利用  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵的抑制剂乌本苷处理, 红细胞将因为胞外  $\text{Na}^+$  浓度降低而不断吸水膨胀, 甚至破裂。

不同类型细胞用不同的机制解决渗透压问题。动物细胞靠  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵工作维持渗透平衡, 而植物细胞依靠其坚韧的细胞壁防止膨胀和破裂, 能耐受较大的跨膜渗透差异, 并具有相应的生理功能, 如保持植物茎坚挺, 调节气孔的气体交换等; 生活在水中的一些原生动物 (如草履虫), 通过收缩泡收集和排除过量的水。

(3) 吸收营养 动物细胞对葡萄糖或氨基酸等有机物吸收的能量由蕴藏在  $\text{Na}^+$  电化学梯度中的势能提供。 $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵工作形成的  $\text{Na}^+$  电化学梯度驱动葡萄糖协同转运载体以同向协同转运的方式将葡萄糖等有机物转运进入小肠上皮细胞, 然后再经 GLUT2 以协助扩散的方式转运进入血液, 完成对葡萄糖的吸收 (图 5-9)。

动物细胞利用膜两侧的  $\text{Na}^+$  电化学梯度以协同转运的方式吸收营养物, 而植物细胞、真菌和细菌细胞通常利用质膜上的  $\text{H}^+-\text{ATPase}$  形成的  $\text{H}^+$  电化学梯度来吸收营养物, 如在某些细菌中, 乳糖的吸收伴随着  $\text{H}^+$  从细胞质膜外进入细胞, 每转移一个  $\text{H}^+$ , 吸收一个乳糖分子。

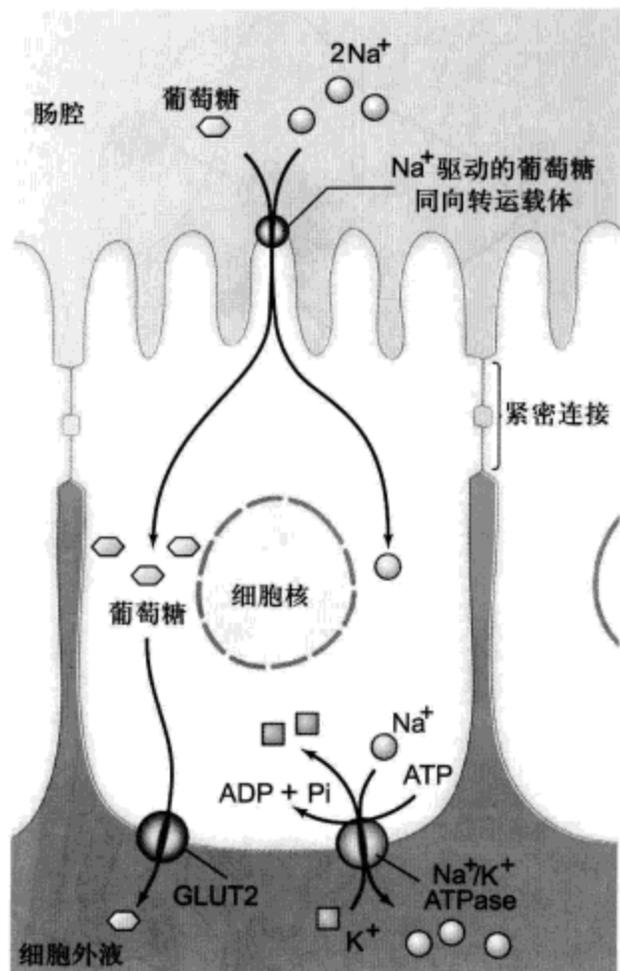


图 5-9 小肠上皮细胞吸收葡萄糖的示意图

葡萄糖分子通过  $\text{Na}^+$  驱动的同向协同运输方式进入上皮细胞, 再经载体介导的协助扩散方式进入血液,  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵消耗 ATP 维持  $\text{Na}^+$  的电化学梯度。

## (二) $\text{Ca}^{2+}$ 泵及其他 P 型泵

### 1. $\text{Ca}^{2+}$ 泵的结构与功能

$\text{Ca}^{2+}$  是细胞内重要的信号分子, 细胞质基质中游离的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度始终维持在一个很低水平。细胞质基质中低  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的维持主要得益于质膜或细胞器膜上的钙泵 ( $\text{Ca}^{2+}$  pump) 将  $\text{Ca}^{2+}$  泵到细胞外或细胞器内。 $\text{Ca}^{2+}$  泵, 又称  $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ , 是另一类 P 型泵, 分布在所有真核细胞的质膜和某些细胞器如内质网、叶绿体和液泡膜上。在肌肉细胞的肌质网膜上,  $\text{Ca}^{2+}$  泵占肌质网膜蛋白 90% 以上, 对细胞引发刺激-反应偶联具有重要作用。对肌质网膜上  $\text{Ca}^{2+}$  泵三维结构已获得高分辨解析 (图 5-10)。 $\text{Ca}^{2+}$  泵是一个由 1 000 个氨基酸残基组成的跨膜蛋白, 与  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  泵的  $\alpha$  亚基同源, 含有 10 个跨膜  $\alpha$  螺旋, 其中 3 个螺旋形成了跨越脂双层的中央通道。在  $\text{Ca}^{2+}$  泵处于非磷酸化状态时, 2 个通道螺旋中断形成胞质侧结合 2 个  $\text{Ca}^{2+}$  的空穴, ATP 在胞质侧与其结合位点结合, 伴随 ATP 水解使相邻结构域天冬氨酸残基磷酸化, 从而导致跨膜螺旋的明显重排。跨膜螺旋的

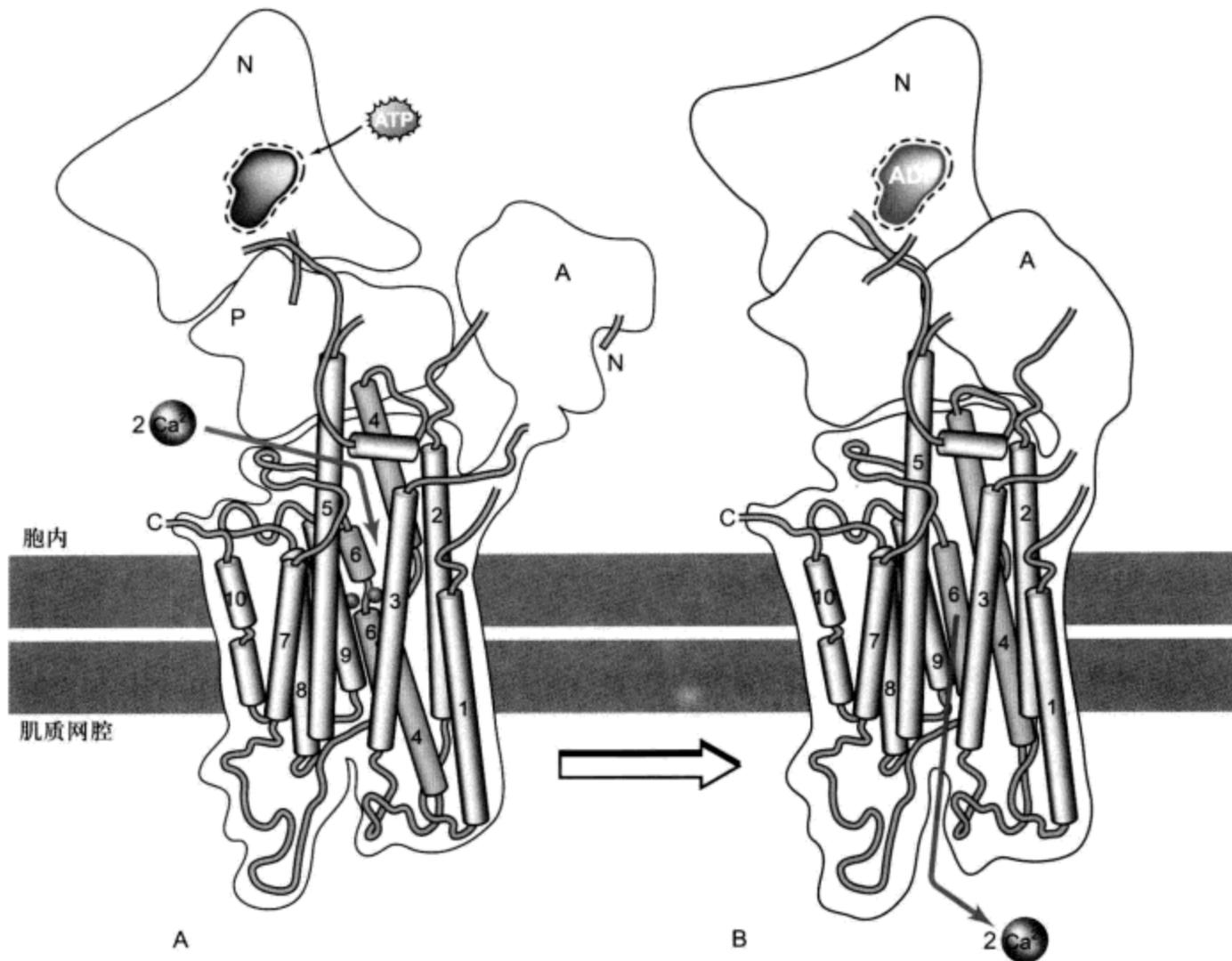


图 5-10 肌质网  $\text{Ca}^{2+}$  泵转运  $\text{Ca}^{2+}$  前 (A) 和后 (B) 的工作模型  
N: 核苷酸结合部位; P: 磷酸化部位; A: 活化部位。

重排破坏了  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点并释放  $\text{Ca}^{2+}$  进入膜的另一侧。

$\text{Ca}^{2+}$  泵工作与 ATP 的水解相偶联, 每消耗 1 分子 ATP 从细胞质基质泵出 2 个  $\text{Ca}^{2+}$ 。 $\text{Ca}^{2+}$  泵主要将  $\text{Ca}^{2+}$  输出细胞或泵入内质网腔中储存起来, 以维持细胞质基质中低浓度的游离  $\text{Ca}^{2+}$ 。 $\text{Ca}^{2+}$  泵将  $\text{Ca}^{2+}$  泵入肌质网, 对调节肌细胞的收缩运动至关重要。在动物细胞质膜上分布的  $\text{Ca}^{2+}$  泵, 其 C 端是细胞内钙调蛋白 (CaM) 的结合位点, 当胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高时,  $\text{Ca}^{2+}$  与钙调蛋白结合形成激活的  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 复合物并与  $\text{Ca}^{2+}$  泵结合, 进而调节  $\text{Ca}^{2+}$  泵的活性。内质网型的  $\text{Ca}^{2+}$  泵没有钙调蛋白的结合域。

## 2. P 型 $\text{H}^+$ 泵

P 型泵中除了  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  泵和  $\text{Ca}^{2+}$  泵外, 还有  $\text{H}^+$  泵 ( $\text{H}^+$  pump)。植物细胞、真菌 (包括酵母) 和细菌细胞质膜上虽然没有  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  泵, 但有 P 型  $\text{H}^+$  泵 ( $\text{H}^+$ -ATPase)。P 型  $\text{H}^+$  泵将  $\text{H}^+$  泵出细胞, 建立和维持跨膜的  $\text{H}^+$  电化学梯度 (作用类似动物细胞  $\text{Na}^+$  的电化学梯度), 并用来驱动转运溶质进入细胞。细菌细胞对糖和氨基酸的摄取主要是由  $\text{H}^+$  驱动的同向协同转运完成的。

P 型  $\text{H}^+$  泵的工作也使得细胞周围环境呈酸性。

## 二、V 型质子泵和 F 型质子泵

V 型质子泵 (V-type proton pump) 广泛存在于动物细胞的胞内体膜、溶酶体膜, 破骨细胞和某些肾小管细胞的质膜, 以及植物、酵母及其他真菌细胞的液泡膜上 (V 为 vesicle 第一个字母)。F 型质子泵 (F-type proton pump) 存在于细菌质膜、线粒体内膜和叶绿体类囊体膜上 (F 为 factor 的第一个字母)。V 型质子泵和 F 型质子泵彼此相似, 但与 P 型泵无关且结构更为复杂。V 型质子泵和 F 型质子泵都含有几种不同的跨膜和胞质侧亚基。两者与 P 型泵不同, 在功能上都是只转运质子, 并且在转运  $\text{H}^+$  过程中不形成磷酸化的中间体。

V 型质子泵利用 ATP 水解供能从细胞质基质中逆  $\text{H}^+$  电化学梯度将  $\text{H}^+$  泵入细胞器, 以维持细胞质基质 pH 中性和细胞器内的 pH 酸性; 而存在于线粒体内膜、植物类囊体膜和细菌质膜上的 F 型质子泵却以相反的方

式发挥其生理作用。它通常利用质子动力势合成 ATP，即当  $H^+$  顺着电化学梯度通过质子泵时，所释放的能量驱动 F-型质子泵合成 ATP，如线粒体的氧化磷酸化和叶绿体的光合磷酸化作用，因此 F-型质子泵称作  $H^+$ -ATP 合成酶 ( $F_1F_0$ -ATPase) 更为贴切。

### 三、ABC 超家族

#### (一) ABC 转运蛋白的结构与工作模式

ABC 超家族 (ABC superfamily) 也是一类 ATP 驱动泵，又叫 ABC (ATP-binding cassette) 转运蛋白。该超家族含有几百种不同的转运蛋白，广泛分布于从细菌到人类各种生物中，是最大的一类转运蛋白。每种 ABC 转运蛋白对于底物或底物的基团有特异性。所有 ABC 转运蛋白都共享一种由 4 个“核心”结构域组成的结构模式 (图 5-11)：2 个跨膜结构域 (T)，每个结构域由 6 个跨膜  $\alpha$  螺旋组成，形成底物运输的通路并决定底物的特异性；2 个胞质侧 ATP 结合域 (A)，具有 ATPase 活性，凸向胞质。有些 ABC 转运蛋白由一条多肽链组成，而有些 ABC 转运蛋白则由 2 条或多条装配成相似结构的多肽链构成。ATP 分子结合前，ABC 转运蛋白的底物结合位点暴露于胞外一侧 (原核细胞) 或胞质一侧 (真核细胞或原生生物)，一旦 ATP 分子与 ABC 转运蛋白结合，将诱导 ABC 转运蛋白 2 个 ATP 结合域二聚化，引起转运蛋白构象改变，使底物结合部位

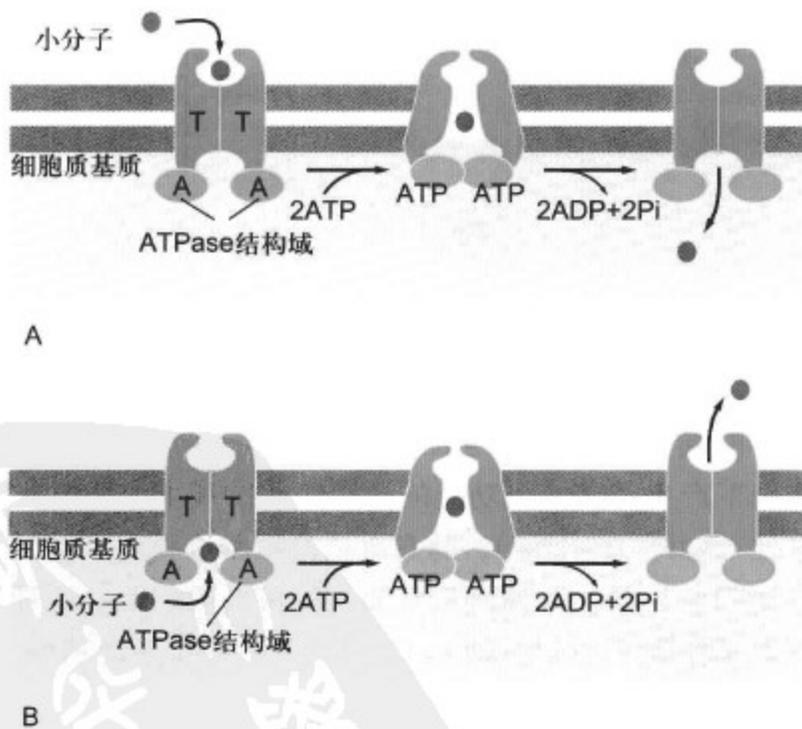


图 5-11 原核细胞 (A) 和真核细胞 (B) ABC 超家族结构与工作示意图

暴露于质膜的另一侧；而 ATP 水解以及 ADP 的解离将导致 ATP 结合域解离，引起转运蛋白构象恢复原有状态。这样，通过 ATP 分子的结合与水解，ABC 转运蛋白就能完成小分子物质的跨膜转运。

细菌除了通过  $H^+$ -ATPase 形成的  $H^+$  电化学梯度来吸收营养物外，其质膜上含有大量依赖水解 ATP 提供能量逆浓度梯度从环境中摄取各种营养物的 ABC 转运蛋白。

#### (二) ABC 转运蛋白与疾病

正常生理条件下，ABC 转运蛋白是细菌质膜上糖、氨基酸、磷脂和肽的转运蛋白，是哺乳类细胞质膜上磷脂、亲脂性药物、胆固醇和其他小分子的转运蛋白。ABC 蛋白在肝、小肠和肾等器官分布丰富，它们能将天然毒物和代谢废物排出体外。

由于有些 ABC 转运蛋白能够将抗生素或其他抗癌药物泵出细胞而赋予细胞抗药性，近些年来，ABC 转运蛋白在医学领域引起了极大关注。事实上，真核细胞最早被鉴定的 ABC 转运蛋白就是从肿瘤细胞和抗药性培养细胞中发现的。这类 ABC 转运蛋白称为多药抗性 (multidrug-resistance, MDR) 转运蛋白，在多种肿瘤细胞中高表达，能利用水解 ATP 的能量将脂溶性的抗癌药物从细胞内转运到细胞外，从而降低细胞内药物浓度，导致肿瘤细胞抗药性增强而降低患者化疗效果。此外，引起疟疾的疟原虫对药物氯喹 (chloroquine) 的抗性也与病原体 ABC 转运蛋白高表达有关。

一些人类遗传病的发生与 ABC 转运蛋白功能改变有关，如囊性纤维化 (cystic fibrosis)。囊性纤维化是白人中最常见的一种常染色体隐性遗传病，又称黏稠物阻塞症，是由于囊性纤维化跨膜转运调节蛋白 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) 发生突变。CFTR 是一种 ABC 转运蛋白，常位于肺、汗腺和胰腺等上皮细胞的顶面 (又称游离面)，调节  $Cl^-$  转运。但由于 CFTR 突变功能异常时， $Cl^-$  转运发生问题，导致细胞外缺水而使得肺部黏稠分泌物堵塞支气管。

综上所述，主动运输都需要消耗能量，所需能量可直接来自 ATP 或来自离子电化学梯度；同样也需要膜上的特异性载体蛋白，这些载体蛋白不仅具有结构上的特异性，还具有结构上的可变性。细胞运用各种不同的方式通过不同的体系在不同的条件下完成小分子物质或离子的跨膜转运。

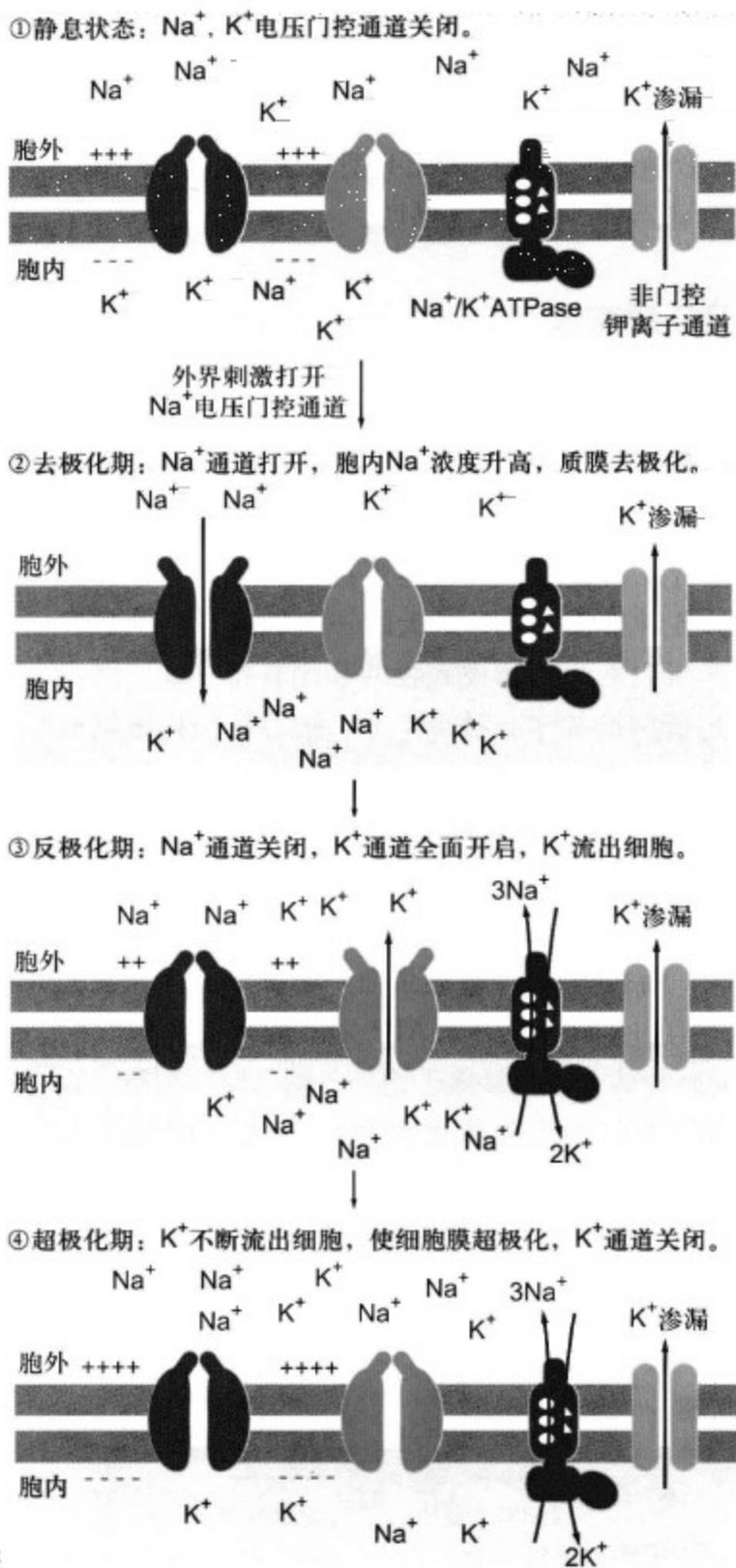
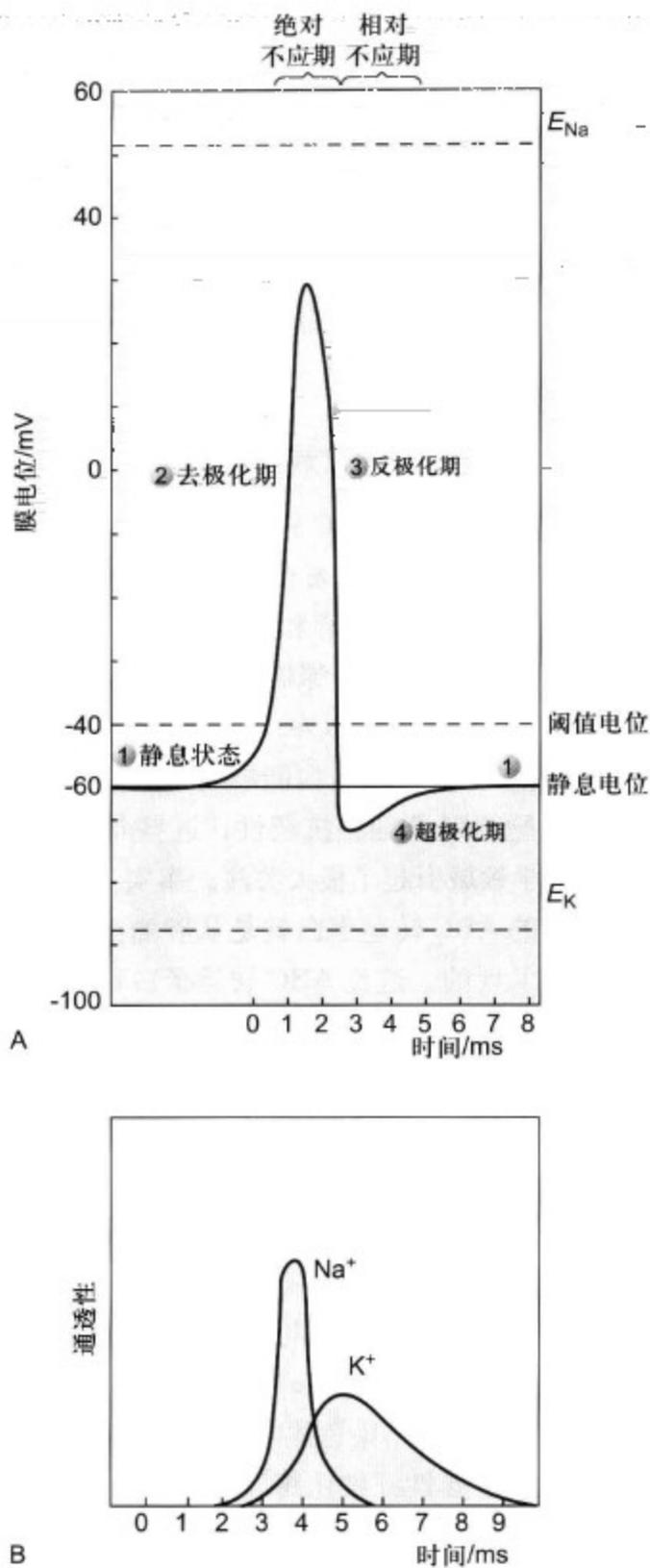


图 5-12 离子流与动作电位的关系示意图

A. 动作电位的产生和膜电位改变。B. 动作电位产生过程中，膜通透性改变。C. 动作电位产生过程中，离子通道开启与关闭示意图。

#### 四、离子跨膜转运与膜电位

不同方式的物质跨膜运动，其结果是产生并维持了膜两侧不同物质特定的浓度分布。对某些带有电荷的物质，特别是对离子来说，就形成了膜两侧的电位差。插入细胞微电极便可测出细胞质膜两侧各种带电物质形成的电位差的总和，即膜电位。细胞在静息状

态下的膜电位称静息电位 (resting potential)，在刺激作用下产生行使通讯功能的快速变化的膜电位称动作电位 (active potential)。静息电位是细胞质膜内外相对稳定的电位差，质膜内为负值，质膜外为正值，这种现象又称极化 (polarization)。在动物不同类型细胞中，静息电位有很大变化，典型的膜电位在  $-30 \sim -70$  mV 之间。

静息电位主要是由质膜上相对稳定的离子跨膜运

输或离子流形成的。 $\text{Na}^+\text{-K}^+$  泵的工作使细胞内外的  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  浓度远离平衡态分布,胞内高浓度的  $\text{K}^+$  是细胞内有机分子所带负电荷的主要平衡者。处于静息状态的动物细胞,质膜上许多非门控的  $\text{K}^+$  渗漏通道通常是开放的,而其他离子(如  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  或  $\text{Ca}^{2+}$ ) 通道却很少开放。所以静息膜允许  $\text{K}^+$  通过开放的渗漏通道顺电化学梯度流向胞外(图 5-12)。随着正电荷转移到胞外而留下胞内的非平衡负电荷,结果是膜外正离子过量和膜内负离子过量,从而产生外正内负的静息电位。动物细胞的静息电位值主要反映了跨膜的  $\text{K}^+$  电化学梯度。对植物和真菌细胞,静息电位的维持主要是通过 ATP 驱动的质子泵将大量  $\text{H}^+$  从细胞内转运到细胞外。

动物细胞质膜对  $\text{K}^+$  的通透性大于  $\text{Na}^+$  是产生静息电位的主要原因,  $\text{Cl}^-$  甚至细胞中的蛋白质分子(一般净电荷为负值)对静息电位的大小也有一定的影响。 $\text{Na}^+\text{-K}^+$  泵对维持静息电位的相对恒定起重要的作用。

$\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  离子通道都是膜上的电压门通道,它们的开关变化应答于膜电位的变化,或者说电压门通道打开的概率由膜电位控制。电压门通道在神经细胞电信号的转导中具有重要作用,它们也存在于其他细胞,包括肌肉细胞、卵细胞、原生动物,甚至植物细胞。电压门通道有特殊的带电荷的蛋白质结构域,称为电压感受器(voltage sensors),对膜电位的变化极其敏感,从而控制通道蛋白转换它的关-开构象。于是,在含有许多通道蛋白分子的膜片内,可能发现当膜处于某一电位时,平均 10% 的通道是打开的,而处于另一电位时,90% 的通道是打开的。

当细胞接受刺激信号(电信号或化学信号)超过一定阈值时,电压门  $\text{Na}^+$  通道将介导细胞产生动作电位。细胞接受阈值刺激,  $\text{Na}^+$  通道打开,引起  $\text{Na}^+$  通透性大大增加,瞬间大量  $\text{Na}^+$  流入细胞内,致使静息电位减小乃至消失,此即质膜的去极化(depolarization)过程。当细胞内  $\text{Na}^+$  进一步增加达到  $\text{Na}^+$  平衡电位,形成瞬间的内正外负的动作电位,称质膜的反极化,动作电位随即达到最大值。只有达到一定的刺激阈,动作电位才会出现,这是一种全或无的正反馈阈值,在  $\text{Na}^+$  大量进入细胞时,  $\text{K}^+$  通透性也逐渐增加,随着动作电位出现,  $\text{Na}^+$  通道从失活到关闭,电压门  $\text{K}^+$  通道完全打开,  $\text{K}^+$  流出细胞从而使质膜再度极化,以至于超过原来的静息电位,此时称超极化(super polarization)。超极化时膜电位使  $\text{K}^+$  通道关闭,膜电位又恢复至静息状态(图 5-12)。

膜电位与质膜对  $\text{K}^+$  和  $\text{Na}^+$  不同的通透性有关,而

质膜上  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  通道蛋白及  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  泵等膜蛋白也随膜电位变化有规律地关闭和开启。细胞质膜膜电位具有重要的生物学意义,在神经、肌肉等可兴奋细胞中,是化学信号或电信号引起的兴奋传递的重要方式。

### 第三节 胞吞作用与胞吐作用

真核细胞通过胞吞作用(endocytosis)和胞吐作用(exocytosis)完成大分子与颗粒性物质的跨膜运输,如蛋白质、多核苷酸、多糖等。在转运过程中,物质包裹在脂双层膜包被的囊泡中,因此又称膜泡运输。这种运输方式常常可同时转运一种或一种以上数量不等的大分子甚至颗粒性物质,因此也有人称之为批量运输(bulk transport)。膜泡运输涉及生物膜的断裂与融合,是一个耗能的过程。所谓胞吞作用,就是细胞通过质膜内陷形成囊泡,将胞外的生物大分子、颗粒性物质或液体等摄取到细胞内,以维持细胞正常的代谢活动;而胞吐作用则是细胞内合成的生物分子(蛋白质和脂质等)和代谢物以分泌泡的形式与质膜融合而将内含物分泌到细胞表面或细胞外的过程。由于胞吐作用将在第八章详细介绍,本节主要介绍胞吞作用。

#### 一、胞吞作用的类型

胞吞时质膜内陷脱落形成的囊泡,称胞吞泡(endocytic vesicle)。根据胞吞泡形成的分子机制不同和胞吞泡的大小差异,胞吞作用可分为两种类型:吞噬作用(phagocytosis)和胞饮作用(pinocytosis)(图 5-13)。吞噬作用形成的吞噬泡直径往往大于 250 nm,而胞饮作用形成的胞饮泡直径一般小于 150 nm。此外,所有真核细胞都能通过胞饮作用连续摄入溶液及可溶性分子,而吞噬作用往往发生于一些特化的吞噬细胞如巨噬细胞(macrophage)。

##### (一) 吞噬作用

吞噬作用是一类特殊的胞吞作用。通过吞噬作用形成的胞吞泡叫做吞噬体(phagosome)。对于原生生物,细胞通过吞噬作用将胞外的营养物摄取到吞噬体,最后在溶酶体中消化降解成小分子物质供细胞利用。吞

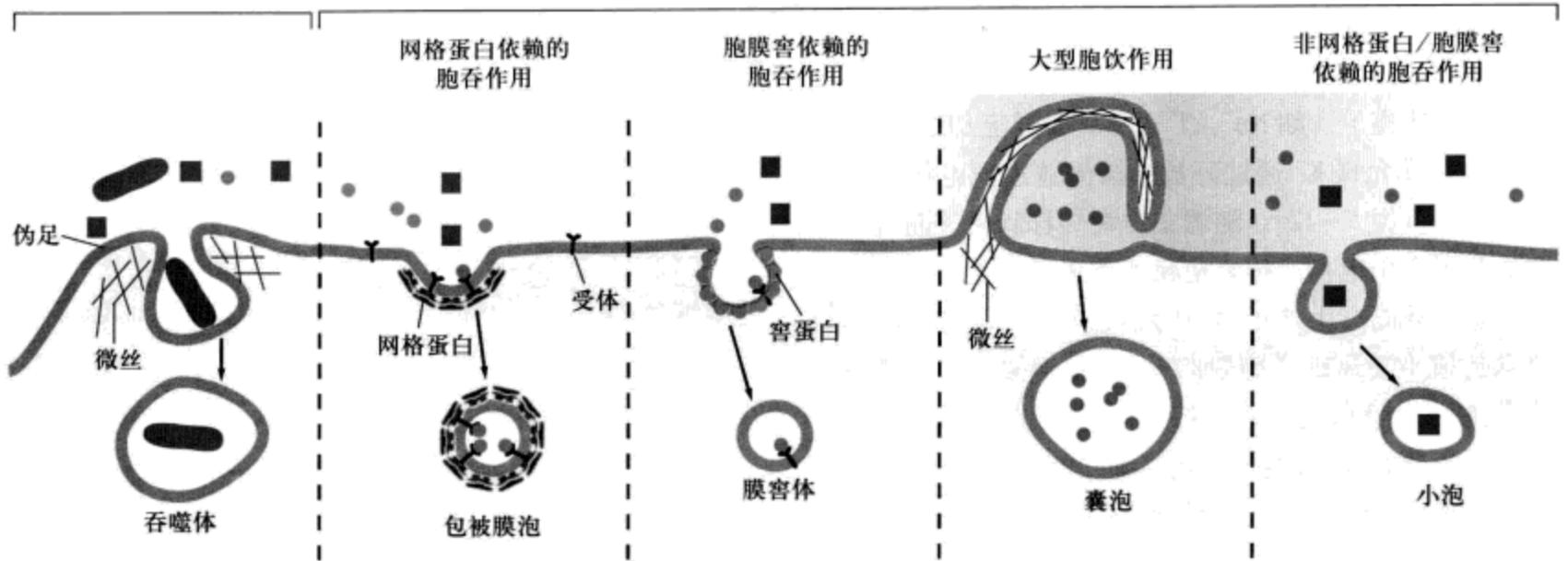


图 5-13 胞吞作用的类型

胞吞作用可分为吞噬作用和胞饮作用两大类，而胞饮作用又可分为网格蛋白依赖的胞吞作用、胞膜窖依赖的胞吞作用、大型胞饮作用以及非网格蛋白/胞膜窖依赖的胞吞作用 4 种类型。

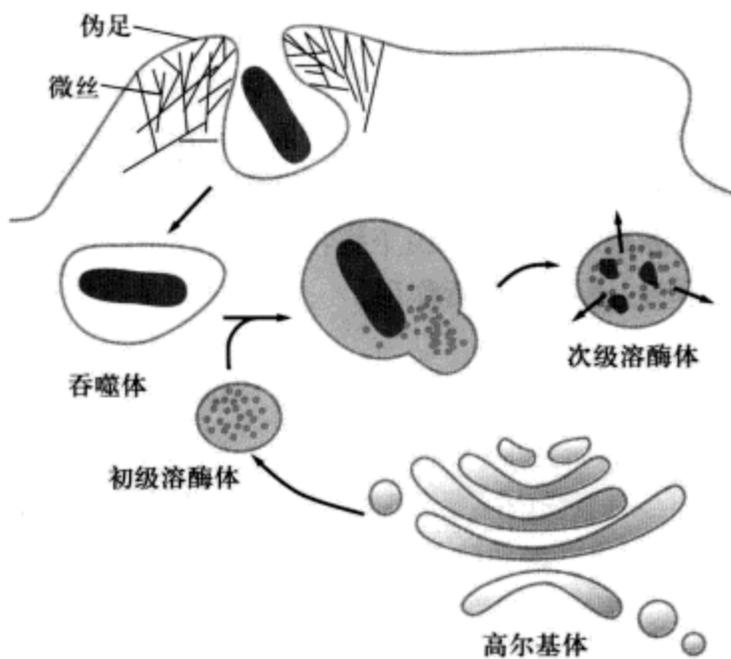


图 5-14 吞噬作用

吞噬细胞伸出伪足，包裹病原微生物形成吞噬体，吞噬体与溶酶体融合，在各种酸性水解酶的作用下，将病原微生物分解。未被分解的底物形成残余小体，可通过胞吐作用的方式将残余底物释放到细胞外。

噬作用是原生生物摄取食物的一种方式。在高等多细胞生物体中，吞噬作用往往发生于巨噬细胞和中性粒细胞 (neutrophil)，其作用不仅仅是摄取营养物，主要是清除侵染机体的病原体以及衰老或凋亡的细胞，如人的巨噬细胞每天通过吞噬作用清除  $10^{11}$  个衰老的血红细胞。

吞噬作用需要被吞噬物与吞噬细胞表面结合并激活细胞表面的受体，将信号传递到细胞内并引起细胞应

答反应，是一个信号触发的过程。在激活吞噬作用过程中，抗体诱发的吞噬作用研究最为清楚。当抗体分子与病原微生物表面结合后，暴露出尾部的 Fc 区域，该区域被巨噬细胞和中性粒细胞表面的 Fc 的受体识别，从而诱发吞噬细胞质膜伸出伪足 (pseudopod)，将病原微生物包裹起来形成吞噬体，最后与溶酶体融合，并在其中被各种水解酶降解 (图 5-14)。伪足的生成与细胞内微丝及其结合蛋白在质膜下局部装配密切相关，这一装配过程需要 Rho 家族蛋白的 GTP 酶活性以及活化的 Rho-GEF。

吞噬细胞表面的受体除了能识别 Fc 启动吞噬作用以外，目前还发现了其他几类启动吞噬作用的受体，如有些受体可以识别补体 (complement)，从而与抗体一道吞噬降解病原微生物；有些受体可以直接识别某些微生物表面的寡糖链；还有些受体可以识别凋亡的细胞，等等。

## (二) 胞饮作用

与吞噬作用不同的是，胞饮作用几乎发生于所有类型的真核细胞中。胞饮作用可以分为网格蛋白依赖的胞吞作用 (clathrin dependent endocytosis)、胞膜窖依赖的胞吞作用 (caveola dependent endocytosis)、大型胞饮作用 (macropinocytosis) 以及非网格蛋白/胞膜窖依赖的胞吞作用 (clathrin and caveola independent endocytosis)

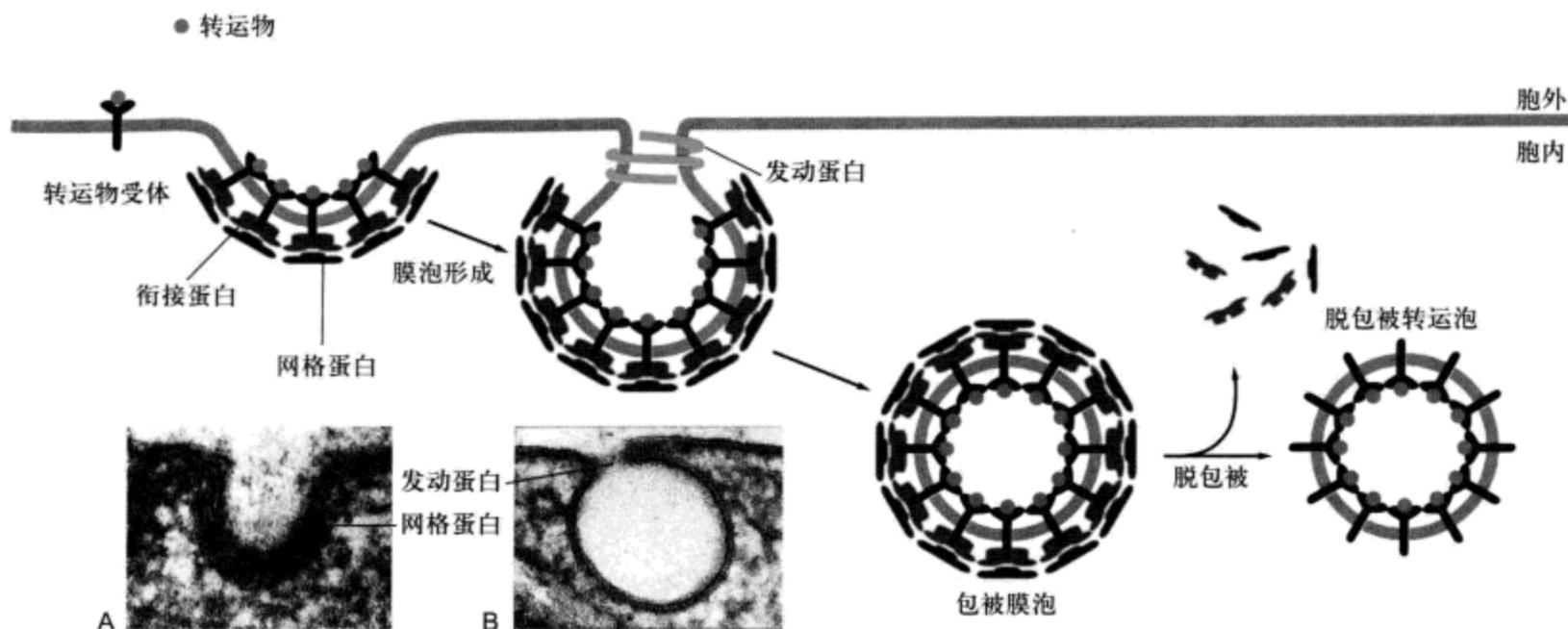


图 5-15 通过网格蛋白包被膜泡介导的选择性运输示意图

A 和 B 是显示网格蛋白包被膜泡形成过程的电镜照片。(图中照片由 Bechara Kachar 博士惠赠)

(图 5-13)。其中，了解最多的胞饮作用就是网格蛋白依赖的胞吞作用。

### 1. 网格蛋白依赖的胞吞作用

网格蛋白 (clathrin) 由 3 个二聚体组成，每个二聚体包括 1 条相对分子质量为  $1.8 \times 10^5$  的重链和 1 条  $3.5 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$  的轻链。3 个二聚体形成三脚蛋白复合体 (triskelion)，是包被的结构单位。当配体与膜上受体结合后，网格蛋白聚集在膜下，逐渐形成直径 50~100 nm 的质膜凹陷，称网格蛋白包被小窝 (clathrin-coated pit)。一种小分子 GTP 结合蛋白——发动蛋白 (dynamin) 在深陷的包被小窝的颈部组装成环，发动蛋白水解与其结合的 GTP 引起颈部缢缩，最终脱离质膜形成网格蛋白包被膜泡 (clathrin-coated vesicle)。几秒钟后，网格蛋白便脱离包被膜泡返回质膜附近区域以便重复使用，脱包被的囊泡与早胞内体 (early endosome) 融合，从而将转运分子及胞外液体摄入细胞。在大分子跨膜转运中，网格蛋白本身并不起捕获特异转运分子的作用，有特异性选择作用的是包被中另一类衔接蛋白 (adaptorin)，它既能结合网格蛋白，又能识别跨膜受体胞质面的尾部肽信号 (peptide signal)，从而通过网格蛋白包被膜泡介导跨膜受体及其结合配体的选择性运输 (图 5-15)。

根据胞吞的物质是否具有专一性，可将胞吞作用分为受体介导的胞吞作用 (receptor mediated endocytosis) 和非特异性的胞吞作用。受体介导的胞吞作用既是大多数动物细胞从胞外摄取特定大分子的有效途径，也是一

种选择性浓缩机制 (selective concentrating mechanism)，避免了摄入细胞外大量的液体。重要的例子包括动物细胞通过受体介导的胞吞作用对胆固醇的摄取、鸟类卵细胞摄取卵黄蛋白以及肝细胞摄入转铁蛋白等。某些激素如胰岛素与靶细胞表面受体结合进入细胞，巨噬细胞通过表面受体对免疫球蛋白及其复合物、病毒、细菌乃至衰老细胞的识别和摄入，以及其他一些基本代谢物如合成血红蛋白所必需的维生素  $B_{12}$  和铁的摄取都是通过受体介导的胞吞作用进行的。受体介导的胞吞作用也可以被某些病毒所利用，流感病毒和 AIDS 病毒 (HIV) 就是通过这种胞吞途径感染细胞的。

胆固醇是动物细胞质膜的基本成分，也是固醇类激素的前体。胆固醇主要在肝细胞中合成，是极端不溶的，它在血液中的运输是通过与磷脂和蛋白质结合形成低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 颗粒的形式进行。LDL 是相对分子质量为  $3 \times 10^6$ ，直径为 22 nm 的多分子复合物，通过与细胞表面的低密度脂蛋白受体特异地结合形成受体-LDL 复合物，几分钟内便通过网格蛋白包被膜泡的内化作用进入细胞，经脱包被作用并与胞内体 (endosome) 融合。胞内体是动物细胞内由膜包裹的细胞器，其作用是传输由胞吞作用新摄入的物质到溶酶体。胞内体膜上有 ATP 驱动的质子泵，将  $H^+$  泵入胞内体腔中，使腔内的 pH 降低 (pH 5~6)。在此过程中，低 pH 环境可引起 LDL 与受体分离，而胞内体以出芽的方式形成含有受体的小囊泡，返回细胞质膜，受体重复使用。然后含有 LDL 的胞内体与溶酶体融合，

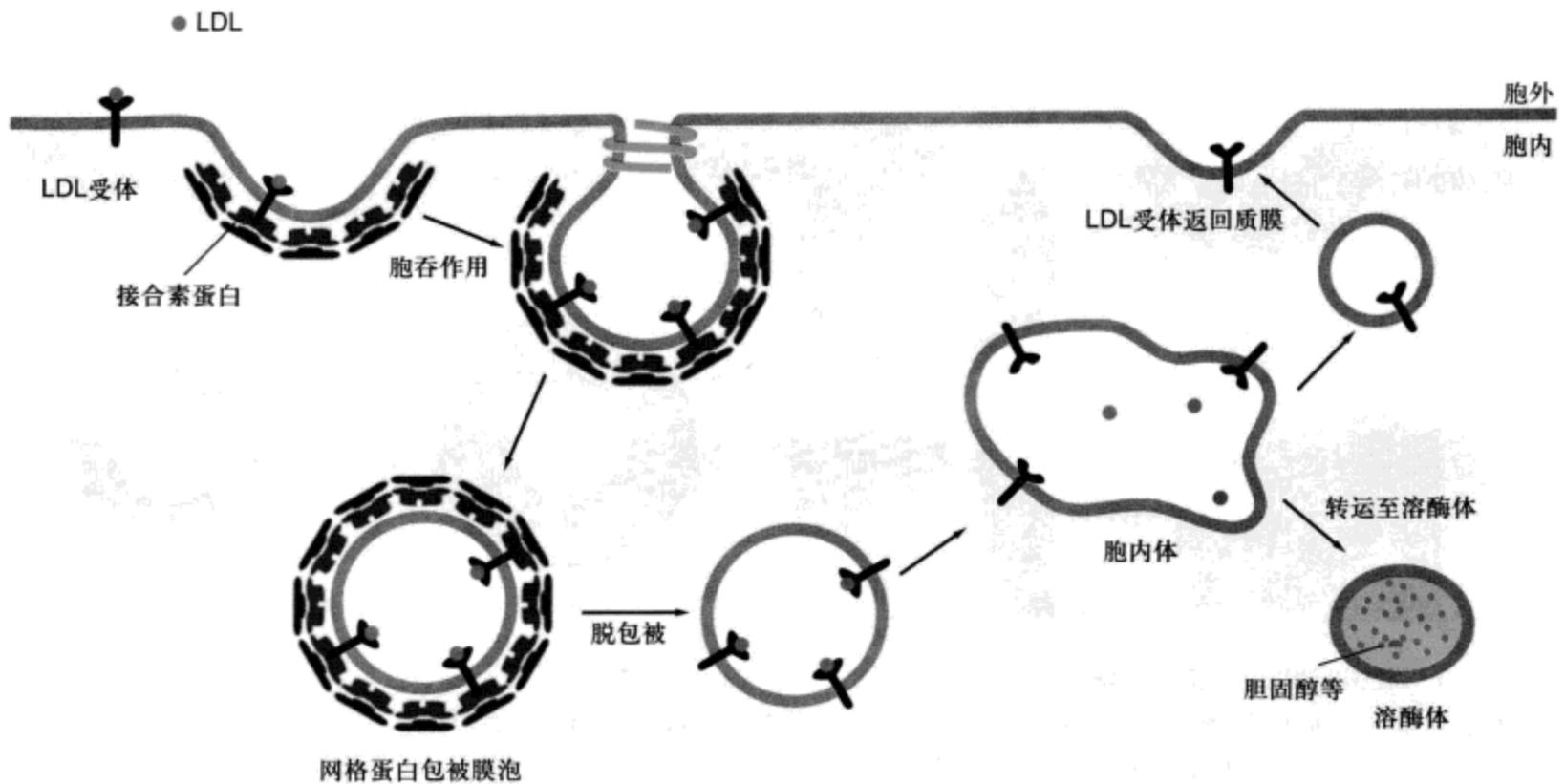


图 5-16 LDL 通过受体介导的胞吞作用进入细胞

低密度脂蛋白被水解，释放出胆固醇和脂肪酸供细胞利用（图 5-16）。

在胞吞过程中，胞内体被认为是膜泡运输的主要分选站之一，其中的酸性环境在分选过程中起关键作用。已知有 25 种以上的不同受体，具有不同的分选信号，参与不同类型受体介导的胞吞作用。在受体介导的胞吞作用过程中，不同类型的受体具有不同的胞内体分选途径：① 大部分受体返回它们原来的质膜区域，如上述 LDL 受体循环到质膜再利用；② 有些受体不能再循环而是最后进入溶酶体被消化，如与表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 结合的细胞表面受体，大部分在溶酶体被降解，从而导致细胞表面 EGF 受体浓度降低，这种现象称为受体下行调节 (receptor down-regulation)；③ 有些受体被运至细胞另一侧的质膜，该过程称为跨细胞转运 (transcytosis)。在具有极性的上皮细胞中，这是一种将胞吞作用与胞吐作用相结合的物质跨细胞转运方式，即转运的物质通过胞吞作用从上皮细胞的一侧被摄入细胞，再通过胞吐作用从细胞的另一侧释放出去。母鼠的抗体从血液通过上皮细胞进入母乳中，乳鼠肠上皮细胞将抗体摄入体内，都是通过跨细胞转运完成的。

## 2. 其他类型的胞饮作用

并非所有的胞吞泡的形成都需要网格蛋白的参与。胞膜窖依赖的胞吞作用是目前关注较多的另一种

胞饮作用。胞膜窖在质膜的脂筏区域形成，电镜观察发现有些细胞的胞膜窖呈内陷的瓶状。胞膜窖的特征性蛋白是窖蛋白，包括 caveolin-1、caveolin-2 和 caveolin-3。与网格蛋白参与的包被膜泡的形成不同，胞膜窖的形成部位位于质膜的脂筏区域。胞吞时，胞膜窖携带着内吞物，利用发动蛋白的收缩作用从质膜上脱落，然后转交给胞内体样的细胞器——膜窖体 (caveosome) 或者跨细胞转运到质膜的另一侧。在整个过程中，因为是整合膜蛋白，窖蛋白始终不会从胞吞泡膜上解离下来。由于胞膜窖所在部位含有大量信号转导的受体和蛋白激酶等，这暗示胞膜窖很可能发挥了一种细胞信号转导的平台作用。

大型胞饮作用是另一种胞饮作用，它是通过质膜皱褶包裹内吞物形成囊泡完成胞吞作用（图 5-13）。与吞噬作用类似，大型胞饮作用形成的胞吞泡也比较大，质膜皱褶的形成过程也依赖微丝及其结合蛋白。但二者有着明显的差别，如启动吞噬作用的受体往往位于特异细胞表面，而启动大型胞饮作用的受体却位于很多类型的细胞表面，而且受体还能启动其他生理功能，如有些受体就是与细胞生长相关的生长因子。

此外，还有非网格蛋白 / 胞膜窖依赖的胞吞作用，如位于淋巴细胞膜上的白介素 2 (interleukin-2, IL-2) 受体就是介导非网格蛋白 / 胞膜窖依赖的胞吞作用。

## 二、胞吞作用与细胞信号转导

作为真核细胞的一种重要生命活动，胞吞作用不仅调控细胞对营养物的摄取和质膜构成等，近年来发现，胞吞作用还参与了细胞信号转导，并与多种信号整合在一起，在更高层次上参与了细胞和机体组织的调控。而信号转导过程也对胞吞作用进行调控，二者相互调节、彼此整合，在细胞生长、发育、代谢以及增殖等过程中发挥着重要作用。

### (一) 胞吞作用对信号转导的下调

下调信号转导活性研究最为清楚的一个例子就是表皮生长因子及其受体的胞吞作用。EGF 是一类相对分子质量较小的胞外信号蛋白分子，能够刺激上皮细胞及其他多种细胞增殖。与 LDL 受体不同，当 EGF 受体与其配体 EGF 结合后，受体二聚化并引起受体胞质结构域酪氨酸残基自磷酸化而被活化，引起细胞下游信号级联反应（详见细胞信号转导一章）；另一方面，细胞通过胞吞作用，将 EGF 受体及 EGF 吞入细胞内降解，从而导致细胞信号转导活性下调。这种调节作用即受体下行调节。而 EGF 受体的胞吞作用也受到细胞信号的调控，尽管调控的分子机制还很不清楚，但这一调控过程与受体的泛素化（ubiquitination）有关。当 EGF 受体与 E3 泛素连接酶 Cbl（Casitas B-lineage lymphoma）结合后，后者催化泛素分子共价连接到受体上，从而引起泛素结合蛋白识别受体上的泛素分子并帮助受体进入网格蛋白包被小窝，启动受体内吞。

### (二) 胞吞作用对信号转导的激活

胞吞作用既可以下调信号转导活性，也可以激活信号转导活性。胞吞作用激活信号转导的最典型例子就是 Notch 信号通路。Notch 信号是细胞与细胞间相互作用的主要信号通路之一，对多细胞生物中细胞分化命运的决定起关键作用。Notch 信号通路的功能最早发现于果蝇神经系统的发育。果蝇正常发育的神经系统通过一种旁侧抑制（lateral inhibition）机制抑制其他上皮细胞发育成神经细胞。即前体神经细胞（信号细胞）通过在自身质膜上表达单次跨膜信号蛋白 Delta，当该信号蛋白与邻近上皮细胞（靶细胞）表面的受体 Notch 结合后，通过 Notch 信号通路调控，邻近靶细胞就无法分化成神经细胞而仍然保持为上皮细

胞。在这一过程中，除了配体（Delta/Serrate/Lag2 家族，DSL）与 Notch 受体结合外，信号通路的激活还依赖于 DSL 和 Notch 的胞吞作用。首先，配体 DSL 与 Notch 受体结合，导致 Notch 暴露出其胞外 S2 切割位点并被裂解，胞外部分与配体被信号细胞内吞，然后，Notch 受体被靶细胞内吞至胞内体并在 S3 位点被  $\gamma$ -分泌酶（ $\gamma$ -secretase）切割产生有活性的 Notch 受体胞内活性片段（Notch intracellular domain, NICD）。该片段进入细胞核，调控靶基因表达，产生相应的细胞响应（图 5-17）。在 Notch 受体活化过程中，无论是配体在信号细胞中的胞吞作用还是受体在 S2 位点切割后的胞吞作用，都对最后在 S3 位点被  $\gamma$ -分泌酶切割产生有活性的 Notch 受体胞内活性片段起到了决定性作用。当然，配体和受体的胞吞作用受泛素化等多种信号的调节。

综上所述，胞吞作用与细胞信号转导相互调节，对生命活动的调控发挥了很重要的作用。除了网格蛋白依赖性胞吞方式以外，细胞还通过非网格蛋白依赖性胞吞作用调节其他很多的细胞表面受体。不同类型的受体有不同的胞吞方式，对细胞信号调节、受体活性关闭与放大、信号持续时间长短等发挥了关键作用。

## 三、胞吐作用

胞吐作用与胞吞作用相反，它是通过分泌泡或其他膜泡与质膜融合而将膜泡内的物质运出细胞的过程。真核细胞有从高尔基体反面管网区（TGN）分泌的囊泡

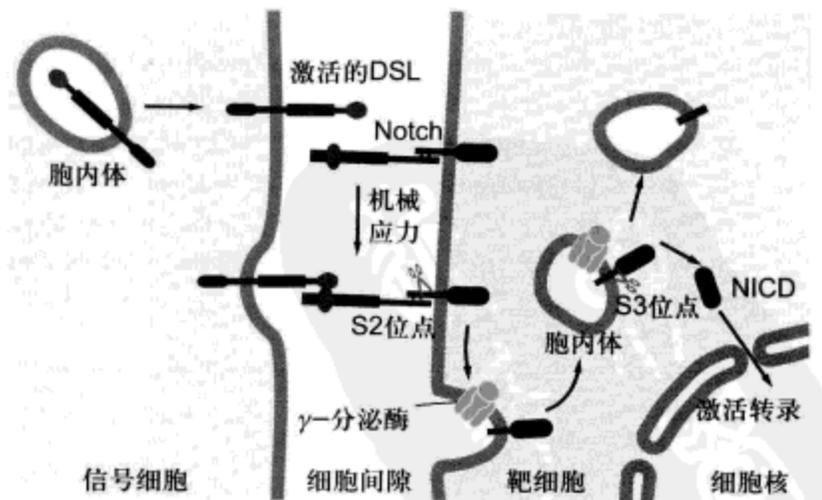


图 5-17 胞吞作用对 Notch 信号转导的激活

Notch 及其配体 DSL 的胞吞作用对 Notch 活化是必需的，其中，DSL 的胞吞依赖泛素。DSL 与 Notch 结合并内吞，Notch 受体第一次被切割后，通过胞吞作用，第二次被切割，产生有活性片段进入细胞核，调节靶基因表达。

向质膜流动并与之融合的稳定过程, 通过这种组成型的胞吐途径 (constitutive exocytosis pathway), 新合成的蛋白质和脂质以囊泡形式连续不断地供应质膜更新, 从而确保细胞分裂前质膜的生长; 囊泡内可溶性蛋白分泌到细胞外, 有的成为质膜外周蛋白, 有的形成胞外基质组分, 有的作为营养成分或信号分子扩散到胞外液。真核细胞除了这种连续的组成型胞吐途径之外, 特化的分泌细胞还有一种调节型胞吐途径 (regulated exocytosis pathway), 这些分泌细胞产生的分泌物 (如激素、黏液或消化酶) 储存在分泌泡内, 当细胞在受到胞外信号刺

激时, 分泌泡与质膜融合并将内含物释放出去。

真核细胞无论是通过胞吞作用摄取大分子还是通过胞吐作用分泌大分子, 都是通过膜泡运输的方式进行的, 并且转运的膜泡只与特定的靶膜融合, 从而保证了物质有序地跨膜转运。此外, 当分泌泡或转运膜泡与质膜融合并通过胞吐作用释放其内含物后, 会使质膜表面积增加, 但发生在质膜其他区域的胞吞作用则减少其表面积, 这种动态平衡过程对质膜成分的更新和维持细胞的生存与生长是必要的。有关胞吐作用的其他内容, 参见本书第八章。

## ● 思考题 ●

1. 比较载体蛋白与通道蛋白的异同。
2. 比较P型离子泵、V型质子泵、F型质子泵和ABC超家族的异同。
3. 说明 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ 泵的工作原理及其生物学意义。
4. 比较动物细胞、植物细胞和原生动物细胞应付低渗膨胀的机制有何不同。
5. 试述胞吞作用的类型与功能。

## ● 参考文献 ●

1. Carafoli E, Brini M. Calcium pumps: Structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, 4:152-161.
2. Higgins C F, Linton K J. Structural biology. The XYZ of ABC transporters. *Science*, 2001, 293:1 782-1 784.
3. Hollenstein K, Dawson R J P, Locher K P. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structure Biology*, 2007, 17: 412-418.
4. Holmgren M, *et al.* Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Nature*, 2000, 403:898-901.
5. Mobius W, *et al.* Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic*, 2003, 4 (4):222-231.
6. Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, *et al.* Structural determinants of water permeation through aquaporin. *Nature*, 2000, 407: 599-605.
7. Nishi T, Forgac M. The vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase-nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3:94-103.
8. Polo S, Fiore P P. Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. *Cell*, 2006, 124: 897-900.
9. Raiborg C, Rusten T E, Stenmark H. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003, 15 (4):446-455.

# 线粒体和叶绿体

细胞的能量转换伴随物质代谢而形影相随。线粒体和叶绿体是真核细胞内两个由双层膜封闭式包被的产能细胞器，在细胞内都呈现显著的整体性和动态特征。它们携带遗传物质 DNA，以原核细胞的编码方式转录合成一些自身需要的 RNA 与蛋白质；两种细胞器都通过分裂方式而增殖，其遗传信息以非孟德尔方式遗传给子代。这些结构、行为和遗传学特征表明线粒体和叶绿体又是一类特殊的半自主性细胞器。在系统发生上，普遍认为它们可能是通过内共生而起源的。

本章讲述线粒体和叶绿体的基本结构与功能，同时对这两种细胞器的细胞行为及调控机制进行初步的讨论。

## 第一节 线粒体与氧化磷酸化

1890年，德国生物学家 Altmann 首先在光学显微镜下观察到动物细胞内存在一种颗粒状结构，取名为生命小体 (bioblast)。1897年，Benda 将之命名为线粒体 (mitochondrion，源于希腊字 mito：线，chondrion：颗粒)。在植物细胞中，Meves 于 1904 年首次发现了线粒体，从而确认线粒体是普遍存在于真核细胞内的重要细胞器。

### 一、线粒体的基本形态及动态特征

在动、植物细胞中，线粒体是一种高度动态的细胞器，包括由于运动导致位置和分布的变化、形态变化以及融合和分裂介导的体积与数目的变化等。

#### (一) 线粒体的形态、分布及数目

借助光学显微镜，早期的科学家观察到的线粒体正如命名时的取意，呈颗粒或短线状，直径为  $0.3\sim 1.0\ \mu\text{m}$ ，长度为  $1.5\sim 3.0\ \mu\text{m}$ 。但在许多动、植物细胞或特定细胞周期时相中，线粒体的大小和形态可能随着细胞生命活动的变化而呈现很大的变化。比如，人成纤维细胞线粒体可长达  $40\ \mu\text{m}$ ，植物分生组织细胞中会出现环核的片层状线粒体等。

线粒体在细胞内的分布与细胞内的能量需求密切相关。能量需求集中的区域线粒体分布密集，反之分布密度较小。已有证据表明，动、植物细胞中的线粒体时刻处于依赖细胞骨架和马达蛋白的运动之中。无论线粒体在细胞中表现为随机还是极性分布，均是各线粒体在运动方向和运动速率上受到调控的一个综合结果，但该调控的深层机制尚不清楚。

细胞中线粒体的数目同样呈现动态变化并接受调控。首先，不同类型真核生物细胞中线粒体的数目相差较大，而同一类真核细胞中线粒体的数目则相对比较稳定。比如，衣藻和红藻等低等的真核细胞每个细胞只含

有一个线粒体，而高等动物细胞内含有数百到数千个线粒体，说明细胞中线粒体的数目受到物种遗传信息的调控。在同一种高等动植物体内，细胞内线粒体数目与细胞类型相关，说明细胞内线粒体的数目随着细胞分化而变化。

## (二) 线粒体的融合与分裂

动、植物细胞中均可观察到频繁的线粒体融合与分裂现象，这被认为是线粒体形态调控的基本方式，也是线粒体数目调控的基础。多个颗粒状的线粒体融合可形成较大体积的线条状或片层状线粒体，同时后者也可通过分裂形成较小体积的颗粒状线粒体。当融合与分裂的比值大致处于平衡状态时，细胞内线粒体的数目和体积基本保持不变。反之，则会出现线粒体数目的增加或减少。

线粒体数目和体积调控的生物学意义尚不完全清楚。通常认为体积较小的颗粒状线粒体易于依赖细胞骨架的动态运输，而体积较大的线粒体则适合在细胞特定的区域呈现相对静态的分布。这样，线粒体的融合与分裂可能是细胞应对生命活动的需求对线粒体进行合理“排兵布阵”的手段之一。

频繁的线粒体融合与分裂实际上把细胞中所有的线粒体联系成一个不连续的动态整体。在植物细胞中，可以观察到线粒体融合与分裂的偶联现象，即颗粒状或短线状的线粒体融合后随即发生分裂（图 6-1）。由于植物细胞中线粒体 DNA 的拷贝数远小于线粒体的数目（如拟南芥的叶肉细胞中有 500~1 000 个线粒体，却只有 50~100 个线粒体 DNA 拷贝），频繁的融合与分裂可能是线粒体间共享遗传信息的重要途径。

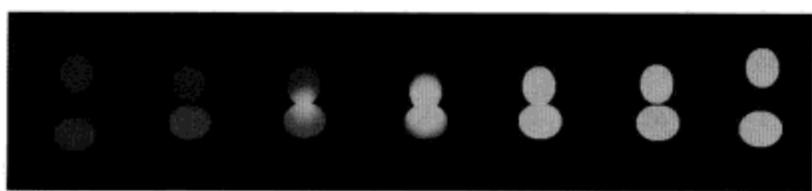


图 6-1 线粒体融合与分裂的偶联

洋葱表皮细胞内线粒体在约 1 min 时间内相继发生融合和分裂的模式图。Arimura 等使用可变色荧光蛋白 (Kaide) 标记线粒体。红色和绿色的颗粒为不同的线粒体，当它们融合后颜色叠加成为黄色。频繁的融合与分裂可能帮助线粒体共享遗传信息。

## (三) 线粒体融合与分裂的分子及细胞生物学基础

### 1. 线粒体融合与分裂的分子生物学基础

线粒体融合与分裂均依赖于特定的基因和蛋白质的调控。

调控线粒体融合所必需的基因最早发现于果蝇，取名为 *Fzo* (fuzzy onion, 模糊的葱头)。在野生型果蝇精细胞发育过程中，细胞内的线粒体发生聚集并融合形成一个大体积的球形线粒体。该线粒体膜系统呈同心圆排布，在切片上酷似葱头平切面的结构特征，故被称作“葱头”。“模糊的葱头”是一个果蝇突变体 (*fzo*)，其精细胞中的线粒体同样会聚集到一个球形的区域内，但不发生融合（图 6-2）。这样，没有融合的线粒体群在显微镜下呈现模糊的边缘，“模糊的葱头”因而得名。分子遗传学研究结果表明，决定果蝇精细胞线粒体融合的关键基因 (*Fzo*) 编码一个跨膜的大分子 GTPase，定位在线粒体外膜上（图 6-2），介导线粒体融合。

进一步的研究发现，与 *Fzo* 具有高度同源性的基因家族广泛存在于酵母和哺乳动物的基因组内。这些基因编码结构类似的大分子 GTPase，其核心功能也是介导线粒体融合。可见，线粒体融合的分子机制在动物进化中高度保守。在哺乳动物中，上述大分子 GTPase 被称作线粒体融合素 (mitofusin)，而编码线粒体融合素的 *Fzo* 同源基因被称作 *Mfn* (如小鼠的 *Mfn1* 和 *Mfn2* 等)。由于线粒体融合与分裂的动态平衡维持线粒体的形态和体积，突变的 *Fzo* 或 *Mfn* 导致线粒体分裂单向发生，细胞

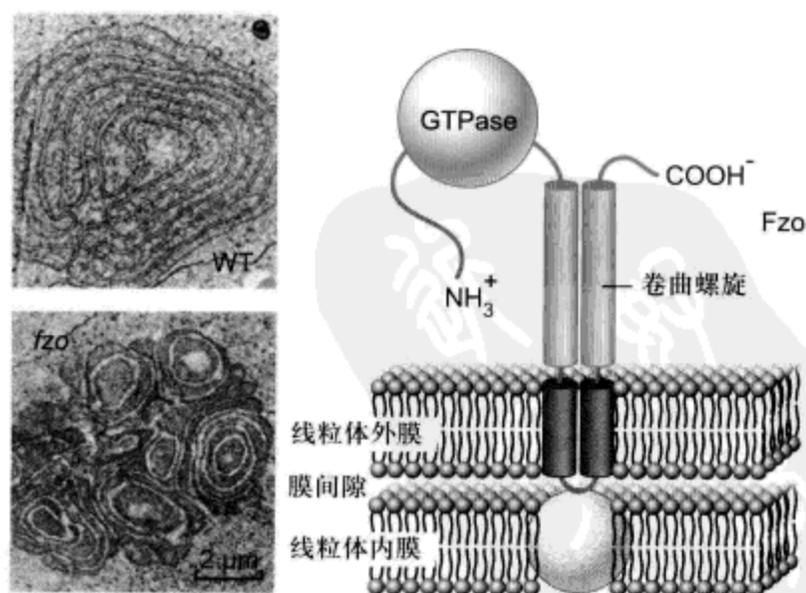


图 6-2 “模糊的葱头”与跨膜大分子 GTPase 的模式结构

野生型 (WT) 果蝇精细胞发育过程中线粒体融合形成大体积球形线粒体，突变体 (*fzo*) 中线粒体聚集但不融合。(图片获授权)

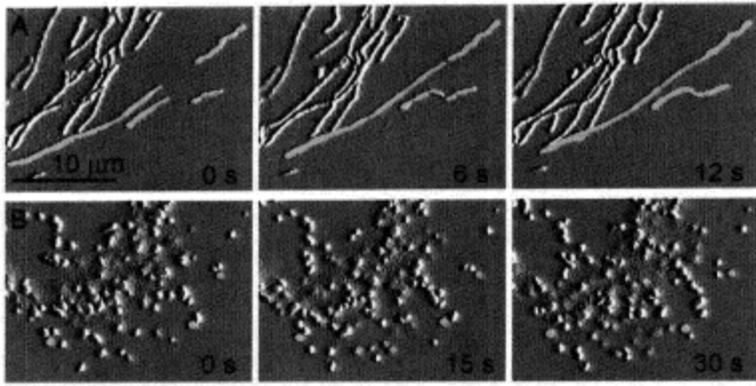


图 6-3 线粒体融合基因突变导致的线粒体片段化

小鼠细胞 *Mfn1* 基因野生型（上排）和突变型（下排）的线粒体。注意野生型细胞中蓝色标出的细长线粒体在相对运动中接触并融合，而突变体细胞中的线粒体高度片段化，无规则运动和融合现象发生。（图片获授权）

内出现线粒体数目增加和体积减小的现象（图 6-3）。该现象被称作线粒体片段化。

*Fzo* 和 *Mfn* 的发现及其功能的确定为人类认识线粒体的融合现象提供了重要的线索。但目前除在酵母中发现了一个与 *Fzo1* 蛋白相结合的膜间隙蛋白 (*Mgm1*) 为线粒体融合所必需外，关于 *Fzo* 和 *Mfn* 的调控机理尚不得而知。此外，虽然植物细胞中同样存在频繁的线粒体融合现象，但其基因组中尚未发现 *Fzo* 或 *Mfn* 的同源基因。

线粒体的分裂同样依赖特定的基因和蛋白质来调控。研究发现，无论在动物或植物细胞中，线粒体的分裂都离不开一类发动蛋白 (dynammin)。编码这类蛋白的基因，如酵母中的 *Dnm1* (*dynammin 1*)、大鼠中的 *Dlp1* (*dynammin like protein 1*)、线虫和哺乳动物中的 *Drp1* (*dynammin related protein 1*) 以及植物细胞中的 *ABL2B* (*Arabidopsis thaliana dynammin-like protein 2B*) 突变均会抑制线粒体的分裂，导致细胞中出现结构异常的大体积线粒体。与介导线粒体融合基因 (*Fzo* 和 *Mfn*) 相比，线粒体分裂必需的 *dynammin* 类基因不仅在酵母和动物之间呈现同源性，同时也发现于植物基因组中，说明线粒体分裂的分子机制在整个真核生物的进化中具有高度的保守性。

有趣的是，线粒体分裂必需的 *dynammin* 类蛋白同样是一类大分子 GTPase。尽管不同类型的大分子 GTPase 具有各自的特征性结构，但它们的共性是具有一个相似的 GTPase 结构域。这些大分子 GTPase 在细胞中有序地介导各种膜相细胞器的融合与分裂，同时在细胞内膜泡转运的过程中扮演重要的角色。目前，人们已将真核生物基因组中编码大分子 GTPase 的所有基因归类为一

个基因超家族。该超家族编码的所有大分子 GTPase 也被统称为发动蛋白相关蛋白 (dynammin related proteins)。依照这种新的归类，介导线粒体融合 (*Fzo* 和 *Mfn*) 及分裂 (*Dnm1*、*Dlp1* 和 *Drp1*) 的基因均被列为发动蛋白相关蛋白基因超家族的成员。

线粒体分裂必需的 *Dnm1*、*Dlp1* 和 *Drp1* 蛋白结构中并没有线粒体膜的定位结构域。这些分子大部分以可溶性蛋白的形式存在于细胞质中。在线粒体分裂时，这类 GTPase 分子在其他蛋白的介导下有序地排布到线粒体分裂面的外膜上 (图 6-4)，组装成环线粒体的纤维状结构。该结构与线粒体膜间隙及内膜下的未知蛋白协同缢缩，致使线粒体膜发生环形内陷并最终一分为二。如果相关基因发生突变，线粒体分裂过程中的膜内陷和膜断裂便会出现障碍。

由于线粒体分裂相关的发动蛋白不具备膜定位能力，所以如何将它们“招募”到线粒体表面适当位置是线粒体分裂调控分子机制的重要环节。两种线粒体分裂必需的蛋白质——*Fis1* 和 *Mdv1*，在这个环节中发挥着中心的作用。其中 *Fis1* 的 C 端具有线粒体外膜的跨膜结构，保证该蛋白 N 端朝向细胞质定位于线粒体外膜；而 *Mdv1* 同时结合 *Fis1* 和 *Drp1* (或 *Dnm1*、*Dlp1*)，以“桥”的方式将 *Drp1* (或 *Dnm1*、*Dlp1*) 定位到线粒体外膜上。除此之外，线粒体分裂还需要 *endophilin B1*、*Mff* (mitochondrial fission factor) 以及 *GDAP1* (ganglioside-induced differentiation associated protein 1) 等一些蛋白质的参与。其中 *GDAP1* 突变还会引起线粒体疾病 (Charcot-Marie-Tooth disease type 4A)。可见，

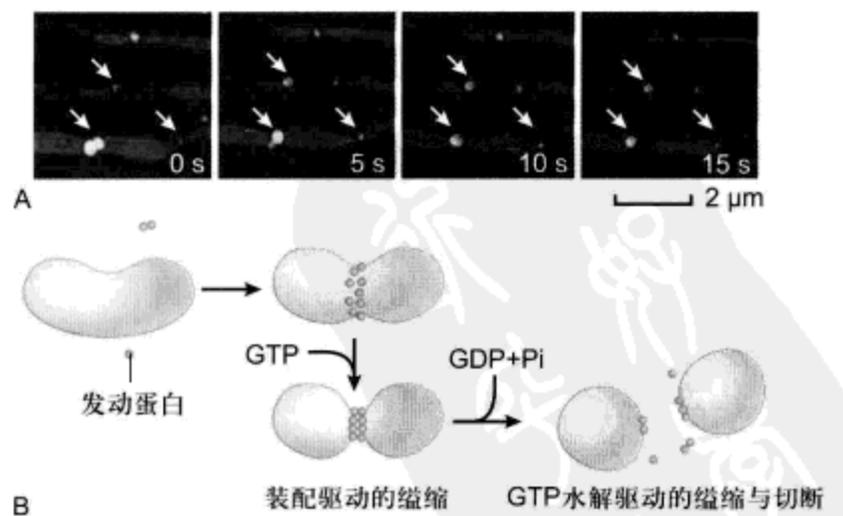


图 6-4 线粒体分裂必需基因 (*Dnm1*、*Drp1*) 的产物定位

A. 线虫细胞中 *Drp1* 的活细胞定位 (线粒体标记为红色, *Drp1* 标记为绿色)。注意线粒体分裂的位点上出现 *Drp1*。B. 发动蛋白纤维组装及分解驱动线粒体分裂的模式图。(图片获授权)

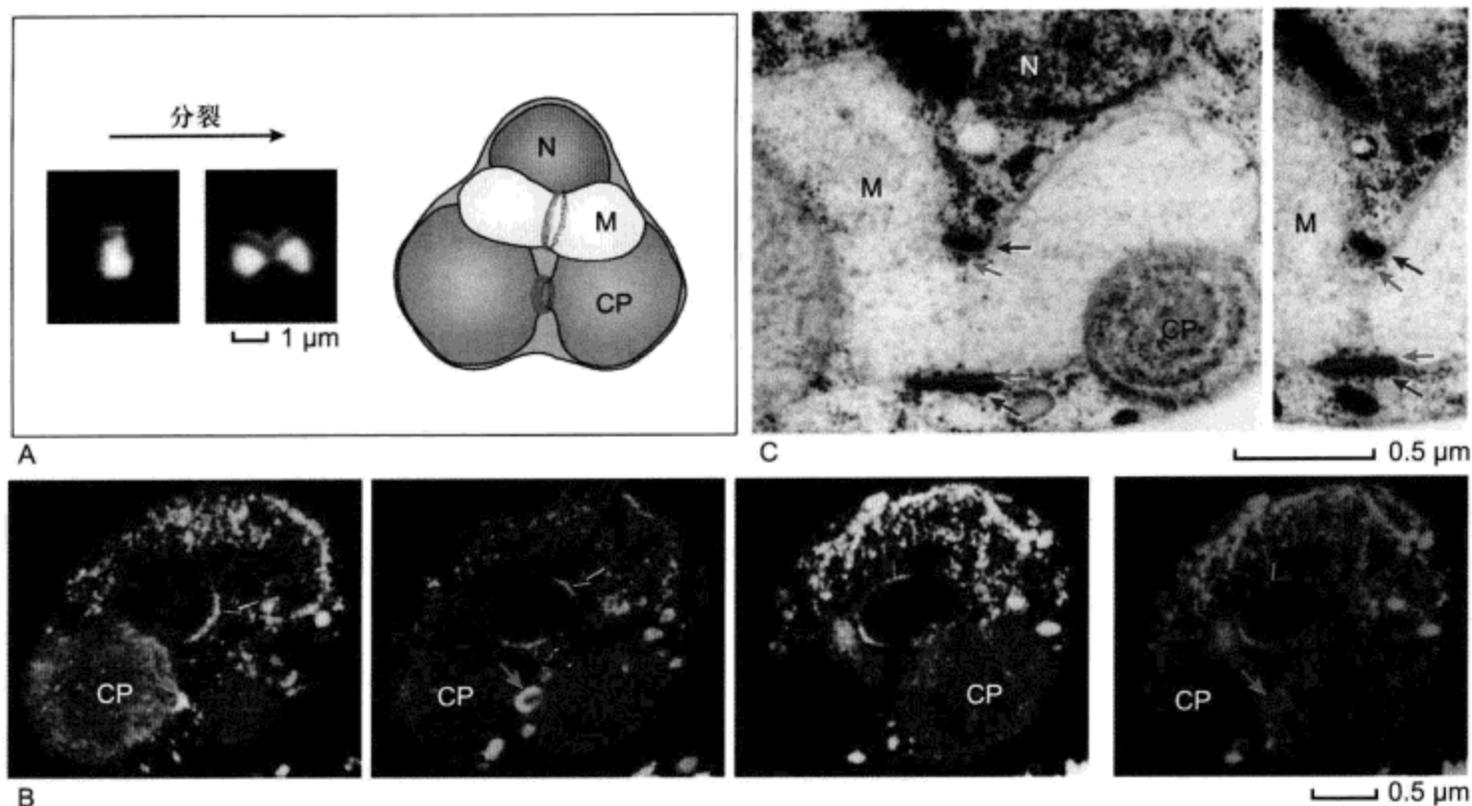


图 6-5 透射电子显微镜下观察到的线粒体分裂装置

A. 研究线粒体和叶绿体分裂装置的经典实验材料——红藻细胞的荧光显微照片 (DNA 特异性探针 DAPI 染色) 及细胞内线粒体与叶绿体分裂模式图。红藻细胞含一个线粒体和一个叶绿体。在细胞增殖过程中, 叶绿体 (红色自发荧光) 率先启动分裂, 随后线粒体启动分裂, 最后细胞核分裂。模式图中红色的环状结构示线粒体和叶绿体的分裂环。B. 透射电子显微镜下观察到的分裂环平环切面。在 3 张连续切面 (黑白) 叠加后生成的图片 (彩色) 上, 可以同时观察到线粒体分裂环 (蓝色箭头) 及叶绿体分裂环 (红色箭头)。C. 线粒体分裂环的垂环切面。在分裂环的断面上, 可以观察到电子密度较高的外环 (蓝色箭头) 及电子密度相对较低的内环 (红色箭头)。CP: 叶绿体; M: 线粒体; N: 细胞核。(图片获授权)

线粒体分裂的分子机制非常复杂且与线粒体的功能密切相关。

## 2. 线粒体融合与分裂的细胞生物学基础

线粒体的融合与分裂都是一个“动”的过程, 和细胞内其他的动态行为 (如染色体的移动等) 一样, 需要特定的力学机制予以保证。介导线粒体融合与分裂的分子力学机制被称为线粒体的融合与分裂装置 (fusion and division apparatus)。这些装置实际上是指参与线粒体融合或分裂的所有蛋白质在细胞内组装而成的功能单位。

借助现有的细胞生物学方法观察线粒体融合时, 除了发现线粒体融合素家族的 GTPase (Fzo 和 Mfn) 均匀分布于线粒体外膜之外, 人们并未观察到结构上的线粒体融合装置, 推测线粒体融合的细胞动力学机制可能比较简单。相比之下, 线粒体分裂装置的细胞结构特征则非常突出。借助透射电子显微镜, 人们在动植物细胞的线粒体上均发现了环绕线粒体的蛋白质缢缩结构, 称为线粒体分裂环 (mitochondrial division ring) (图 6-5)。线粒体分裂环又分为外环和内环。其中外环位于线粒体

外膜的表面, 暴露于细胞质; 而内环则位于线粒体内膜的下面, 暴露在线粒体基质内。在线粒体分裂过程中, 以分裂环为主体的线粒体分裂装置呈现有序的动态变化, 说明线粒体分裂的细胞动力学机制较为复杂。

线粒体的分裂表现为线粒体内外膜同时发生内陷并最终在内陷处被分断的过程。这个连续的过程可被人为地分为 3 个阶段: ① 早期: 线粒体分裂的准备阶段, 膜内陷尚未发生; ② 中期: 线粒体膜呈现环形内陷并逐渐加深; ③ 后期: 线粒体膜被分断, 线粒体一分为二。在线粒体分裂的早期, 内环首先形成于线粒体内膜下, 随后在线粒体的外膜上面出现外环。当内环和外环分别形成时, 线粒体膜上的着环区域开始发生内陷, 线粒体分裂进入中期。随着线粒体膜内陷程度的加深, 外环的横断面不断增大 (环体加粗), 而内环始终保持细薄的状态。当线粒体分裂进入后期时, 内环消失, 外环则一直保留到分裂结束。

目前, 线粒体分裂装置 (分裂环) 的蛋白质基本组成尚不清楚。上面介绍的发动蛋白家族蛋白 (Dnm1、Dlp1 或 Drp1) 只出现于分裂的中期稍后及后期的外环

中, 推测参与深度缢缩及膜分断, 是线粒体分裂外环的重要成分之一。此外, 在红藻细胞的线粒体分裂过程中, 一种称作 FtsZ 的大分子 GTPase (原核细胞分裂的必需蛋白) 先于内环出现在线粒体内膜下的分裂位置并形成环状分布。但随着线粒体分裂进程的加深, FtsZ 蛋白的密度逐渐减小, 推测其可能是招募内环蛋白的重要分子。有趣的是, 动物及高等植物的基因组中并未发现产物定位于线粒体的 FtsZ 同源基因, 说明 FtsZ 蛋白的功能在进化过程中可能被另外的未知蛋白所取代。由于线粒体分裂装置的基本组成以及决定其形成位置的分子机制还不得而知, 线粒体分裂在今后一段时期内仍将是细胞生物学中令人关注的重要领域之一。

## 二、线粒体的超微结构

虽然线粒体的形态和大小表现出多种变化, 但其基本结构均由内外两层单位膜封闭包裹而成。线粒体的外膜 (outer membrane) 平展, 起界膜作用; 而内膜 (inner membrane) 则向内折叠延伸形成嵴 (cristae)。在不同的真核生物中, 线粒体嵴的形态也呈现丰富的变化。比如, 动物细胞中常见的“袋状嵴”是由内膜规则性折叠而成, 而植物细胞线粒体的“管状嵴”则是内膜不规则内陷形成的弯曲小管 (图 6-6) 等。

存在于外膜和内膜之间的空间被称为膜间隙 (intermembrane space)。通常情况下, 膜间隙的宽度比较稳定。线粒体内膜之内空间称之为基质 (matrix) (图 6-6C)。近年来的研究发现, 线粒体外膜与内质网或细胞骨架等

其他细胞组分之间可以通过特定的蛋白质形成结构和功能的联系; 而线粒体内膜与外膜之间也由一些蛋白质形成随机的点状连接。

### (一) 外膜

外膜指线粒体最外面的一层平滑的单位膜结构, 厚约 6 nm。外膜中蛋白质和脂质约各占 50%。外膜上分布有孔蛋白 (porin) 构成的桶状通道, 直径为 2~3 nm, 可根据细胞的状态可逆性地开闭。当孔蛋白通道完全打开时, 可以通过相对分子质量高达  $5 \times 10^3$  的分子。ATP、NAD、辅酶 A 等相对分子质量小于  $1 \times 10^3$  的物质均可自由通过外膜。由于外膜的通透性很高, 膜间隙中的离子环境几乎与胞质相同。

外膜上还分布有一些特殊的酶类, 如参与肾上腺素氧化、色氨酸降解、脂肪酸链延长的酶等, 表明外膜不仅参与膜磷脂的合成, 还可对将在线粒体基质中彻底氧化的物质进行先行初步分解。外膜的标志酶是单胺氧化酶 (monoamine oxidase)。

### (二) 内膜

内膜是位于外膜内侧的一层单位膜结构, 厚 6~8 nm。相对外膜而言, 内膜有很高的蛋白质/脂质比 (质量比  $\geq 3:1$ )。内膜缺乏胆固醇, 富含心磷脂 (cardiolipin, 约占磷脂含量的 20%)。这种组成决定了内膜的不透性 (impermeability), 从而限制了所有分子和离子的自由通过, 是质子电化学梯度的建立及 ATP 合成所必需的。细菌的质膜也具有线粒体内膜的结构特

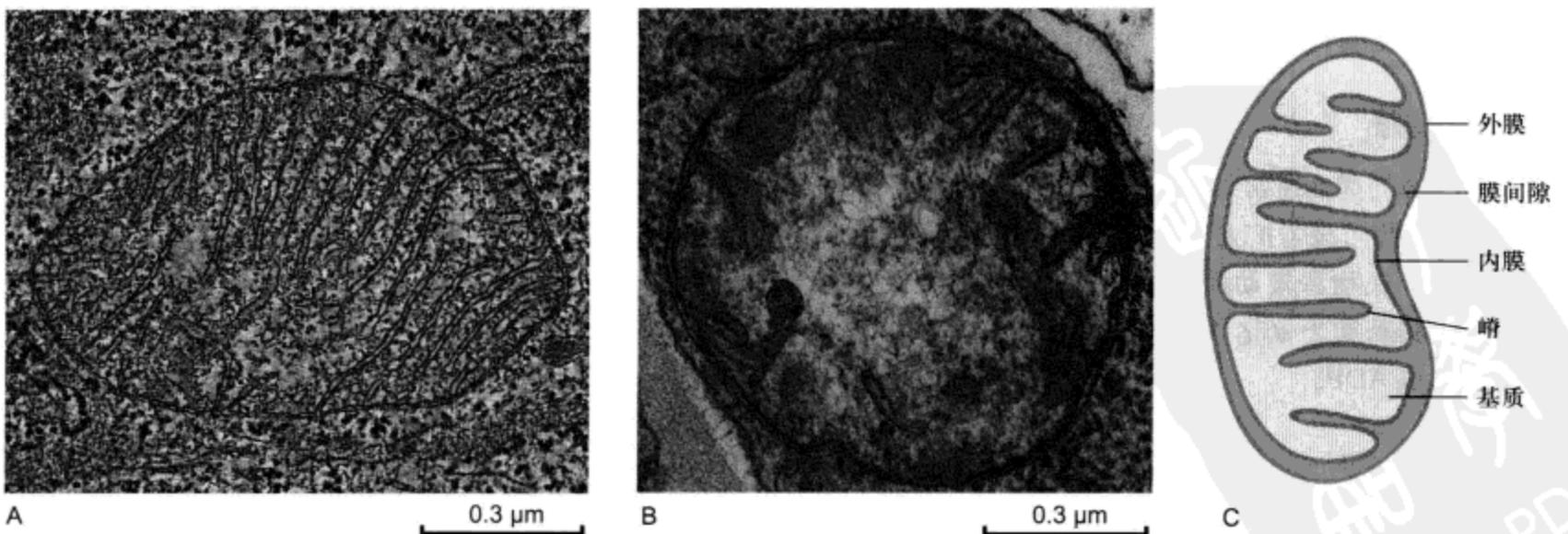


图 6-6 人淋巴细胞线粒体 (A)、拟南芥幼叶线粒体 (B) 的超微结构及线粒体超微结构的模式图 (C)

(A 图由 Devrim Acehan 和 David Stokes 博士惠赠; B 图由张泉博士惠赠)

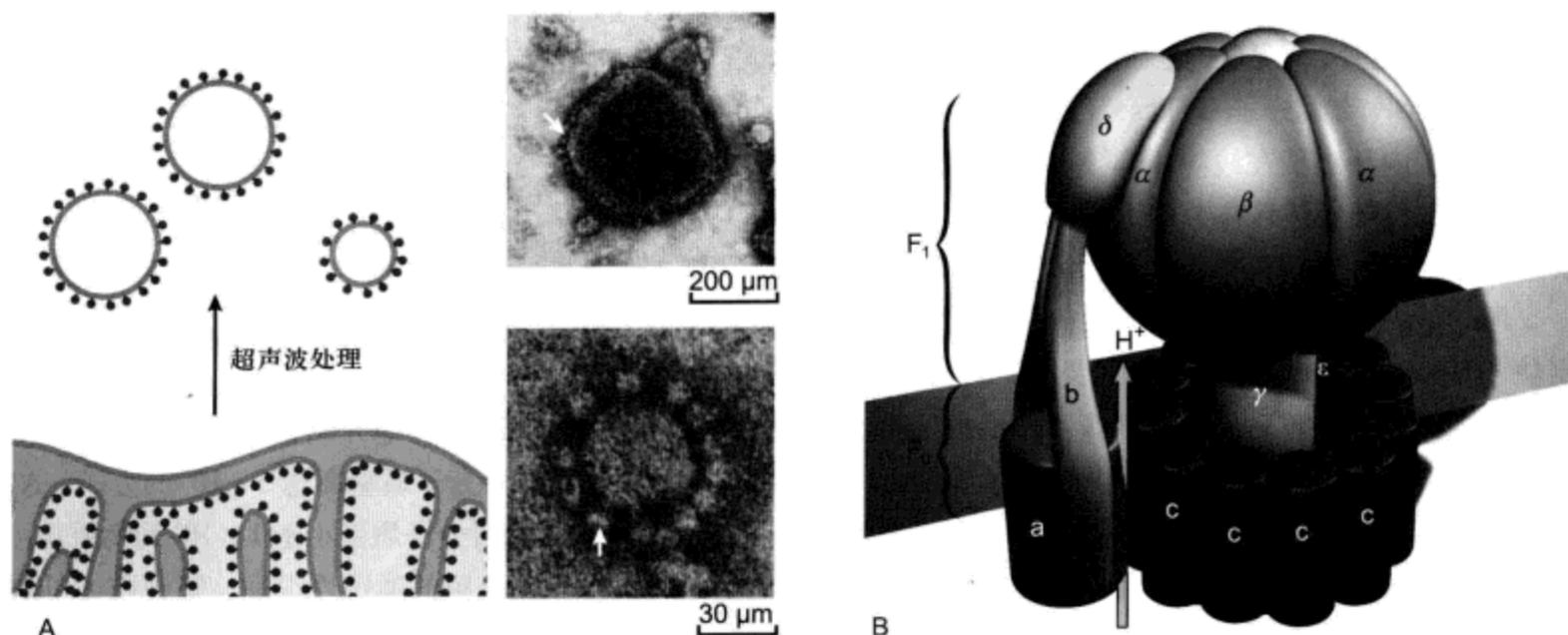


图 6-7 ATP 合酶的负染电子显微构型 (A) 及分子结构模式图 (B)

线粒体内膜在超声波作用下形成亚线粒体小泡，经电子负染后可以观察到其表面排布的线粒体基粒——ATP 合酶（箭头指示）。（图片获授权）

征，推测线粒体内膜与细菌质膜具有进化上的关联性。

线粒体内膜向内延伸形成嵴，大大增加了内膜的表面积。据测算，肝细胞线粒体内膜的表面积相当于外膜的 5 倍，细胞质膜的 17 倍。同时，嵴的形状、数量和排列与细胞种类及生理状况密切相关。如心肌和骨骼肌线粒体嵴的数量相当于肝细胞线粒体嵴的 3 倍等。这种差异可能反映了不同组织细胞对 ATP 的需求。通常情况下，能量需求较多的细胞中线粒体嵴的数量也较多。

线粒体内膜是氧化磷酸化的关键场所。早期的研究发现内膜的嵴上存在许多规则排列的颗粒，称为线粒体基粒 (elementary particle)。实验证明这些颗粒即为 ATP 合酶 (ATP synthase) (图 6-7)。内膜的标志酶是细胞色素氧化酶。

### (三) 膜间隙

膜间隙的宽度通常维持在 6~8 nm。当细胞活跃呼吸时，膜间隙可显著扩大。膜间隙内的液态介质含有可溶性的酶、底物和辅助因子。腺苷酸激酶是膜间隙的标志酶，其功能为催化 ATP 分子末端磷酸基团转移到 AMP，生成 ADP。

### (四) 线粒体基质

线粒体基质为富含可溶性蛋白质的胶状物质，具有特定的 pH 和渗透压。催化线粒体重要生化反应，如三羧酸循环、脂肪酸氧化、氨基酸降解等相关的酶类存在

于基质中。此外，基质中还含有 DNA、RNA、核糖体以及转录、翻译所必需的重要分子。

从上述结构特征可以看出，线粒体的固形成分主要为蛋白质和脂质。其中脂质占线粒体干重的 20%~30%，而蛋白质中包括了催化线粒体生化反应的主要酶类。

## 三、氧化磷酸化

线粒体的主要功能是高效地将有机物中储存的能量转换为细胞生命活动的直接能源 ATP。人体内的细胞每天要合成数千克 ATP，大约 95% 由线粒体产生。因此，线粒体被誉为细胞的“动力工厂”(power plant)。线粒体通过氧化磷酸化作用进行能量转换，其内膜上的 ATP 合酶、电子传递及内膜本身的理化特性为氧化磷酸化提供了必需的保障。

### (一) ATP 合酶

在线粒体中，最终生成 ATP 的装置是 ATP 合酶。在电子显微镜下，ATP 合酶的分子由球形的头部和基部组成，头部朝向线粒体基质，规则性地排布在内膜下并以基部与内膜相连 (图 6-7A)。由于电子密度的差别不明显，尽管 ATP 合酶头部的直径达到了 9 nm，在常规透射电镜的线粒体超薄切片上仍难以分辨，须借助负染色电镜技术。Stasny 和 Crane 于 1964 年分离

了线粒体内膜，用超声破处理成“亚线粒体小泡”后，利用负染技术成功地观察到了ATP合酶的分布及分子构型，为后续的线粒体功能的研究提供了珍贵的初始资料。

由于ATP合酶在ATP生成中处于重要地位，其分子结构与分子动力学机制一直是线粒体研究的重要组成部分。在生化研究中，ATP合酶的头部被称为偶联因子1 (coupling factor 1,  $F_1$ )，由5种类型的9个亚基组成，组分为 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon\delta$ 。在空间上，3个 $\alpha$ 亚基和3个 $\beta$ 亚基交替排列，形成一个“橘瓣”状结构(图6-7B)。其中 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基具有核苷酸结合位点，但只有 $\beta$ 亚基的结合位点具有催化ATP合成或水解的活性。 $F_1$ 的功能是催化ATP合成，在缺乏质子梯度情况下则呈现水解ATP的活性。 $\gamma$ 亚基的一个结构域构成穿过 $F_1$ 的中央轴，另一结构域与3个 $\beta$ 亚基中的一个结合。 $\epsilon$ 亚基协助 $\gamma$ 亚基附着到ATP合酶的基本部结构 $F_0$ 上。 $\gamma$ 与 $\epsilon$ 亚基具有很强的亲和力，结合形成“转子”(rotor)，旋转于 $\alpha_3\beta_3$ 的中央，调节3个 $\beta$ 亚基催化位点的开放和关闭。 $\delta$ 亚基为 $F_1$ 和 $F_0$ 相连接所必需的。

ATP合酶的基本部结构被称作 $F_0$ ，是偶联因子0 (coupling factor 0) 的简称。与亲水性的 $F_1$ 相比， $F_0$ 是一个疏水性的蛋白复合体，嵌合于线粒体内膜，由a、b、c 3种亚基按照 $ab_2c_{10-12}$ 的比例组成跨膜的质子通道。多拷贝的c亚基形成一个环状结构。a亚基和b亚基形成的二聚体排列在c亚基12聚体形成的环的外侧。同时，a亚基、b亚基及 $F_1$ 的 $\delta$ 亚基共同组成“定子”(stator)，也称外周柄。

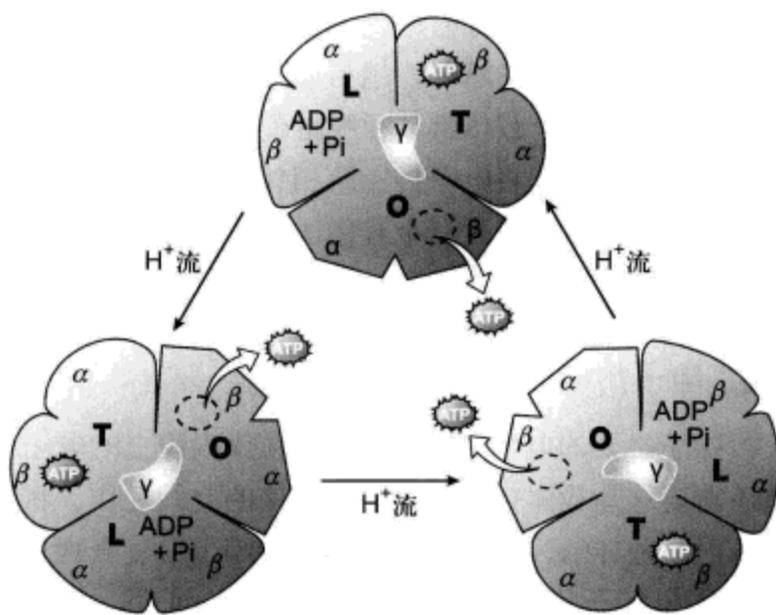


图6-8 ATP合酶的“结合变构”模型

L: 松弛构象 (loose); T: 紧密构象 (tight); O: 开放构象 (open)。

在线粒体ATP合酶的分子中， $F_1$ 和 $F_0$ 通过“定子”和“转子”的双重作用形成连接。合成或水解ATP时，“转子”受到通过 $F_0$ 的 $H^+$ 流驱动，于 $\alpha_3\beta_3$ 的中央旋转，依次与3个 $\beta$ 亚基作用，调节 $\beta$ 亚基催化位点的构象变化；“定子”在一侧将 $\alpha_3\beta_3$ 与 $F_0$ 连接起来并使之保持固定的位置。因此， $F_0$ 在ATP合酶中的作用是将跨膜质子驱动力转换成扭力矩 (torsion)，驱动“转子”旋转。

基于ATP合酶的分子结构，Boyer于1979年提出了结合变构机制 (binding change mechanism)，以解释质子流驱动ATP合成的分子过程。该机制认为：① 质子梯度的作用并不是生成ATP，而是使ATP从酶分子上解脱下来。② ATP合酶上的3个 $\beta$ 亚基的氨基酸序列是相同的，但它们的构象却不同。即在任一时刻，3个 $\beta$ 催化亚基以3种不同的构象存在，从而使它们对核苷酸具有不同的亲和性(图6-8)。③ ATP通过旋转催化 (rotational catalysis) 而生成。在此过程中，通过 $F_0$ “通道”的质子流引起c亚基环和附着于其上的 $\gamma$ 亚基纵轴(中央轴)在 $\alpha_3\beta_3$ 的中央进行旋转。旋转的动力来自于 $F_0$ 质子通道中的质子跨膜运动。由于在外侧有“定子”(外周柄)的固定作用，和酶的外周部分相对于膜表面是静止的。“转子”的旋转在 $360^\circ$ 范围内分3步发生，大约每旋转 $120^\circ$ ， $\gamma$ 亚基就会与一个不同的 $\beta$ 亚基相接触。这种接触迫使 $\beta$ 亚基转变成 $\beta$ -空缺构象。 $\gamma$ 亚基的一次完整旋转( $360^\circ$ )必然使每一个 $\beta$ 亚基都经历3种不同的构象改变，导致3个ATP生成并从酶表面释放。ATP合酶中使化学能转换成机械能的效率几乎达100%，是迄今发现的自然界最小的“分子马达”。

## (二) 质子驱动力

线粒体ATP合酶在质子流的推动下实现分子内“转子”的旋转，驱动ATP的生成。依照这个模型，线粒体膜间隙中的质子浓度必须高于基质中的质子浓度，才有可能产生质子的定向流动。也就是说，膜间隙与基质之间质子浓度梯度的形成与保持是线粒体合成ATP的基本前提。

研究表明，线粒体内膜上的电子传递为膜间隙与基质之间的质子梯度提供了保证。在电子传递的过程中，高能电子的能量逐级释放。而基质中的质子则借助高能电子释放的能量被不断地定向转运到膜间隙。作为电子传递的先决条件，细胞内生物大分子经三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA 循环) 氧化时产生的NADH在NADH脱氢酶作用下脱氢形成 $H^+$ 和高能电子

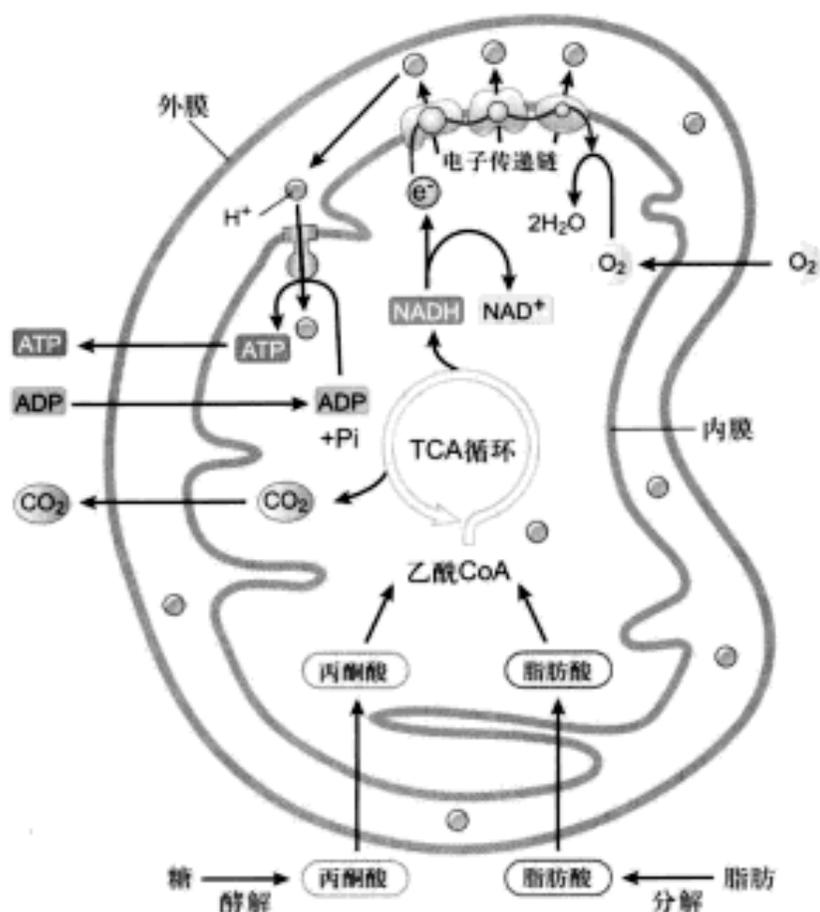


图 6-9 线粒体产能 (ATP) 的原理示意图

细胞内储能的大分子化合物糖和脂肪经酵解或分解形成丙酮酸和脂肪酸。后者进入线粒体后进一步分解成乙酰 CoA。乙酰 CoA 通过 TCA 循环, 产生含有高能电子的 NADH 和  $FADH_2$  (后者未图示)。这两种分子中的高能电子通过电子传递链 (蓝色带箭头曲线表示) 最终传递给氧, 生成水。在电子传递的过程中, 内膜上的电子传递复合物将基质中的质子转运至膜间隙, 形成 ATP 合酶工作所需的质子梯度。除了糖和脂肪以外, 细胞内的储能大分子氨基酸也可被分解为丙酮酸或乙酰 CoA, 加入 TCA 循环 (未图示)。由于 NADH 不能通过线粒体内膜, 细胞质中糖酵解产生的 NADH 不能进入线粒体。但其分子上的电子可以通过“穿梭途径”进入线粒体并加入电子传递链。

( $NADH \rightarrow NAD^+ + H^+ + 2e^-$ ),  $H^+$  跨内膜定向位移, 产生跨膜质子电化学梯度, 高能电子进入内膜电子传递链传递 (图 6-9)。因此, 线粒体承担的能量转换实质上就是把  $H^+$  跨膜电位差和质子浓度梯度 (pH 差) 形成的质子驱动力 (proton motive force) 转换为 ATP 分子中的高能磷酸键。可见, TCA 循环提供的质子驱动力和高能电子是线粒体合成 ATP 的基本能源; 而电子传递则在线粒体的能量转换中承担了重要的介导作用。

在线粒体中, TCA 循环提供的高能电子最终传递给  $O_2$ , 生成  $H_2O$  (图 6-9)。该电子传递的本质是一个氧化过程 ( $H^- \rightarrow 2e^- + H^+$ )。在这个过程中, 是质子驱动力用于驱动 ADP 磷酸化形成 ATP。由于 ATP 合成时的磷酸化过程 ( $ADP + Pi \rightarrow ATP$ ) 以电子传递

中的氧化过程为基础并依托线粒体内膜同时进行, 所以, 线粒体中的 ATP 合成被称为氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation)。线粒体内膜上的 ATP 合酶、电子传递以及内膜本身物理特性的精妙组合是氧化磷酸化的细胞分子生物学基础。

从化学的角度上看,  $O_2$  获得电子 ( $O_2^-$ ) 生成水是电子传递的最终反应。由于该反应中  $O_2$  只接受低能电子, 较高能量的电子在进入  $O_2$  之前必须释放多余的能量。体外的化学反应 ( $H_2 + O_2 \rightarrow H_2O$ ) 中电子的多余能量以热量的形式放出。而在线粒体内, 高能电子的能量则被用于向膜间隙转运质子。可见, 电子传递是一个由高能态向低能态顺序进行的放能过程, 不需要任何能量驱使。

### (三) 电子传递链

从上面的知识中可以看出, 来自 TCA 循环的高能电子在到达  $O_2$  之前需要经历多步的转移, 释放多余的能量。这种转移在线粒体内膜上有序地进行, 故被称为电子传递。在电子传递的过程中, 接受和释放电子的分子和原子被称为电子载体 (electron carrier), 而由电子载体组成的电子传递序列被称为电子传递链 (electron transport chain), 也称作呼吸链 (respiratory chain)。

参与电子传递链的电子载体有 5 种: 黄素蛋白、细胞色素、泛醌、铁硫蛋白和铜原子。它们的共同特征是具有氧化还原作用。

实验证明, 呼吸链中的电子载体有严格的排列顺序和方向, 按氧化还原电位从低向高排序。其中  $NAD^+/NADH$  的氧化还原电位值最低 ( $E'_0 = -0.32 V$ ), 而  $O_2/H_2O$  的最高 ( $E'_0 = +0.82 V$ )。氧化还原电位值越低, 提供电子的能力越强, 越易成为还原剂而处于传递链的前面。每一个载体都从呼吸链前一个载体获得电子而被还原, 随后再将电子传递给相邻的下一个载体而被氧化。这样, 电子就从一个载体传向下一个载体, 沿呼吸链传递并伴随能量的释放。

### (四) 电子传递复合物

除了必要的电子载体以外, 线粒体内膜上的电子传递还需要这些载体分子之间形成有序的空间互作。将线粒体内膜破坏后, 可从中分离出 4 种膜蛋白复合物, 分别命名为复合物 I、II、III 和 IV。实验证明, 每一种复合物都能催化电子穿过呼吸链中的某一段。如: 复合物 I 和 II 分别催化电子从两种不同的供体 NADH 和

FADH<sub>2</sub> 传递到泛醌 (UQ)；复合物Ⅲ使电子从泛醌传递到细胞色素 c (Cyt c)；复合物Ⅳ将电子从 Cyt c 转移到 O<sub>2</sub>。可见，线粒体内膜上的电子传递实际上是由 4 种膜蛋白复合物分段催化完成的 (图 6-10)。这些分布于线粒体内膜、含有电子传递催化中心的膜蛋白复合物被称作电子传递复合物。

近年来膜蛋白复合物的三维结构研究进展表明，哺乳动物中上述 4 种电子传递复合物共含有约 70 种不同的多肽。其中一部分多肽并不参与氧化还原中心和电子传递，可能具有调节或组装复合物的功能。

(1) 复合物 I 即 NADH-CoQ 还原酶，又称 NADH 脱氢酶。哺乳动物的复合物 I 由 42 条不同的多肽链组成，总相对分子质量接近 10<sup>6</sup>。其中 7 个疏水的跨膜多肽由线粒体基因编码。复合物 I 含一个带有 FMN 的黄素蛋白和至少 6 个铁硫中心。高分辨率电镜显示复合物 I 呈 L 形，一个臂位于膜内，另一个臂伸展到基质中。后者催化 1 对电子从 NADH 传递给泛醌。复合物 I 每传递 1 对电子伴随 4 个质子从基质转移到膜间隙，是一种由电子传递释放能量驱动的质子泵。

(2) 复合物 II 即琥珀酸-CoQ 还原酶，又称琥珀酸脱氢酶。它由 4 种不同的蛋白质组成，是三羧酸循环中唯一一个结合在膜上的酶。复合物 II 的总相对分子

质量为 1.4 × 10<sup>5</sup>，功能为催化来自琥珀酸的 1 对电子经 FAD 和 Fe-S 传给泛醌而进入呼吸链。来自琥珀酸的电子能量较低，传递过程中不伴随质子的跨膜转移。因此复合物 II 催化的电子传递不伴随 ATP 的形成。

(3) 复合物 III 即 CoQ-Cyt c 还原酶，又称细胞色素还原酶或 Cyt bc<sub>1</sub> 复合物 (简称 bc<sub>1</sub>)。该复合物由 10 条多肽组成，总相对分子质量为 2.5 × 10<sup>5</sup>，含 1 个 Cyt b (携带 2 个血红素基团 b562 和 b566)、1 个 Cyt c<sub>1</sub> 和 1 个铁硫蛋白。Cyt b 由线粒体基因编码。复合物 III 的功能是催化电子从泛醌传给 Cyt c。每一对电子穿过该复合物到达 Cyt c 时有 4 个 H<sup>+</sup> 从基质跨膜转移到膜间隙。

(4) 复合物 IV 即细胞色素氧化酶，又称 Cyt c 氧化酶。哺乳动物的复合物 IV 总相对分子质量约为 2.04 × 10<sup>5</sup>，由 13 条多肽链组成。其中最大且疏水性最强的 3 个多肽由线粒体基因编码。该酶共有 4 个氧化还原中心：Cyt a 和 Cyt a<sub>3</sub> 及 2 个铜离子 (CuA, CuB) 都集中在亚基 I 和亚基 II 上，催化电子从 Cyt c 传给氧，生成 H<sub>2</sub>O。复合物 IV 每传递 1 对电子从基质中摄取 4 个 H<sup>+</sup>。其中 2 个 H<sup>+</sup> 用于水的形成，另 2 个 H<sup>+</sup> 被跨膜转移到膜间隙。

综上所述，电子传递、质子驱动力的形成以及 ATP 合成是氧化磷酸化的核心，也是线粒体能量转换的特色所在。

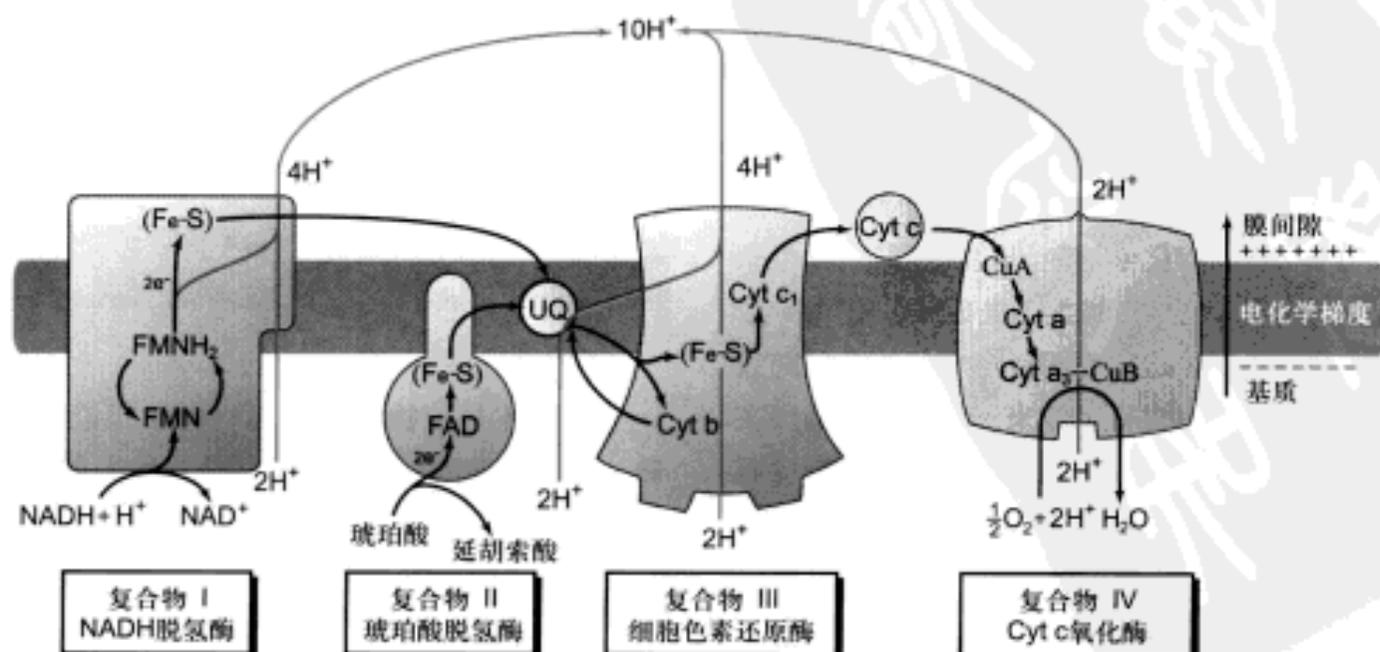


图 6-10 线粒体内膜电子传递复合物的排列及电子和质子传递示意图

呼吸链由 4 种含有电子载体的复合物和 2 种独立存在于膜上的电子载体 (UQ 和 Cyt c) 组成。进入呼吸链的电子来自 NADH 或 FADH<sub>2</sub>。电子从复合物 I 或复合物 II 传递给 UQ，然后进一步传递给复合物 III，经由 Cyt c 传递给复合物 IV，最后传递给 O<sub>2</sub>，生成 H<sub>2</sub>O。图中指出了 H<sup>+</sup> 从基质跨膜转移到膜间隙的位点。尽管在每个位点上被转运的精确 H<sup>+</sup> 数仍有争议，但图中标示的每对电子传递所转运 H<sup>+</sup> 数具有普遍认同。复合物 II 的 H<sup>+</sup> 转移通过 Q 循环分为两步进行，每步向膜间隙释放 2 个 H<sup>+</sup>。

## 四、线粒体与疾病

线粒体是一种半自主性细胞器。除了氧化磷酸化以外，DNA复制、RNA转录、蛋白质翻译等生命活动都需要蛋白质和酶的参与。据推测，线粒体的生命活动需要多达1 000~2 000种蛋白质。目前已经确定在线粒体中发挥某种功能的蛋白质有近900种，其余的有待进一步检测和研究。如果编码这些蛋白质的基因发生了某种突变，蛋白质的功能就有可能受到影响甚至丧失。在这种情况下，线粒体的生命活动可能出现障碍，导致动植物机体发生疾病。在医学上，由线粒体功能障碍引起的疾病被称为线粒体病(mitochondrial disease)。

已知的人类线粒体病有100多种，常见的有脑坏死、心肌病、肿瘤、不育、帕金森综合征等。由于肌肉、心和大脑等组织需要线粒体提供相对大量的能量供给，线粒体病的症状较多地表现为这些组织的异常病变。例如，曾经在我国部分地区高发的克山病就是一种心肌线粒体病。它是以心肌损伤为主要病变的地方性心肌病，因缺硒而引起。由于硒对线粒体膜具有不可替代的稳定作用，缺硒的患者心肌线粒体出现膨胀，嵴稀少且不完整，膜电位下降，膜流动性减低。同时，患者线粒体中的琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶和ATP合酶活性都有明显降低，导致电子传递和氧化磷酸化偶联的效率受到显著影响。

线粒体中许多功能蛋白复合物(如ATP合酶、电子传递复合物I等)是由线粒体基因组和核基因组编码的蛋白质亚基共同组成的。因此，线粒体病既有可能来源于线粒体DNA的突变，也有可能来源于核DNA的突变。此外，线粒体内的化学反应呈链式进行(如电子传递链等)，催化不同环节的酶类缺失或缺陷往往导致类似的线粒体功能障碍。这样，即使症状非常类似的线粒体病，在不同的患者中也有可能来源于不同的基因突变。例如，常见的Leigh综合征(亚急性坏死性脑脊髓病)既有可能由线粒体编码的基因突变引起，也可能由细胞核编码的其他多个基因突变造成。区别线粒体病致病基因核-质性质的简单方法是分析病症的遗传规律。线粒体DNA(基因)突变导致的线粒体病呈单纯的母系遗传。

人类的线粒体基因组只编码13种蛋白质，约相当于线粒体生命活动所需蛋白质总数的1%。但已知的线粒体病的绝大多数来源于线粒体基因组编码的蛋白质

缺失或缺陷，可见线粒体DNA发生突变的频率远高于细胞核DNA。出现这样的现象可能与呼吸链产生的自由基相关。据测算，机体95%以上的氧自由基来自线粒体的呼吸链。正常情况下氧自由基可被线粒体中的Mn<sup>2+</sup>-SOD(超氧化物歧化酶)清除。但机体衰老及退行性疾病时Mn<sup>2+</sup>-SOD活性降低，导致线粒体中氧自由基积累。实验结果表明，氧自由基的过度积累导致线粒体DNA的损伤或突变。

植物的线粒体基因组编码较多的蛋白质(如拟南芥线粒体DNA编码122种蛋白质)。虽然这些蛋白质的变异同样导致个体缺陷，但植物材料中很少使用线粒体病的概念。农业生产中广为利用的细胞质雄性不育，事实上是一种典型的植物线粒体病。由于该性状具有极高的生产利用价值，其分子机制的研究受到了国内外长期和广泛的关注。中国科学家刘耀光的研究组2006年首先破解了水稻细胞质雄性不育及其恢复的机制。实验发现了线粒体DNA特定部位重组产生编码毒性多肽的可读框(orf 79)，其产物在花粉线粒体中的积累导致雄性不育的规律。同时，研究还发现了恢复系中*Rfla*和*Rfla*基因编码核酶，通过降解orf 79 mRNA的方式解除花粉败育的不育系恢复机制。

本节着重介绍了线粒体在真核细胞能量代谢中的重要作用。事实上，除了氧化磷酸化生产ATP以外，线粒体还参与许多其他非常重要的生命活动过程，如细胞氧化还原电位的调节、信号转导、细胞凋亡以及细胞电解质平衡等。相关内容见本教材的其他章节。

## 第二节 叶绿体与光合作用

叶绿体是植物细胞中另一种承担能量转换的细胞器。叶绿体内进行的光合作用是自然界最重要的化学反应。地球上的绿色植物通过光合作用将太阳能转化为生物能源的产量高达2 200亿吨/年，相当于全球每年能耗的10倍。可见，叶绿体及其光合作用为地球上包括人类在内的大多数生物提供了必需的能源。由于光合作用将空气中的CO<sub>2</sub>转换为高能有机碳链，绿色植物中的叶绿体同时还承担着回收大气中CO<sub>2</sub>的重要作用，受到了世界的广泛关注。在21世纪人类面临的主要挑战中，粮食和环境问题均涉及叶绿体及光合作用。因此，叶绿体

与光合作用的研究在理论和生产上具有重要的意义。

## 一、叶绿体的基本形态及动态特征

在植物细胞中，叶绿体 (chloroplast) 也是一种动态的细胞器。这种动态表现为光调控下的分布和位置变化、基质小管介导的相互连接、伴随分化和去分化的形态变化以及叶绿体分裂导致的数目变化等。

### (一) 叶绿体的形态、分布及数目

在植物细胞中，叶绿体是最容易观察到的细胞器。这是因为叶绿体中含有叶绿素，与透明的细胞质之间呈现较大的反差。同时，叶绿体体积较大，借助普通光学显微镜的中低倍物镜即可清晰分辨。在高等植物的叶肉细胞中，叶绿体呈凸透镜或铁饼状，直径为 5~10  $\mu\text{m}$ ，厚 2~4  $\mu\text{m}$  (图 6-11)。由于叶肉细胞内的大部分空间被液泡占据，叶绿体分布在细胞质膜与液泡间薄层的细胞质中，呈平层排列。通常情况下，高等植物的叶肉细胞含 20~200 个叶绿体。

高等植物的叶片生长平展后，叶肉细胞内叶绿体的

体积和数目相对保持稳定。在环境条件不变的情况下，成熟叶肉细胞中罕见有关叶绿体分裂与融合的报道，这种数目和体积的稳定性有别于线粒体。但细胞内的叶绿体仍呈现动态特征。首先，叶绿体在细胞膜下的分布依光照情况而变化。光照较弱时，叶绿体会汇集到细胞顶面，以最大限度地吸收光能，保证高效率的光合作用；而光照强度很高时，叶绿体移动到细胞侧面，以避免强光的伤害 (图 6-12)。叶绿体通过位移避开强光的行称为躲避响应 (avoidance response)。相反，在光照较弱的情况下，叶绿体会汇集到细胞的受光面，这种行为称作积聚响应 (accumulation response)。

叶绿体在细胞内位置和分布受到的动态调控称为叶绿体定位 (chloroplast positioning)。由于光照强度保持稳定状态时叶绿体的分布和位置不呈现明显的变化，叶绿体定位至少包括两个必需的细胞动力学环节：叶绿体的移动及移动后在新的最适位置上的“锚定”。化学处理破坏细胞内的微丝骨架后，叶绿体定位出现异常，说明叶绿体的运动和位置维持需要借助微丝骨架的作用。在拟南芥的叶肉细胞中，一个被命名为 CHUP1 (chloroplast unusual positioning 1) 的微丝结合蛋白为叶

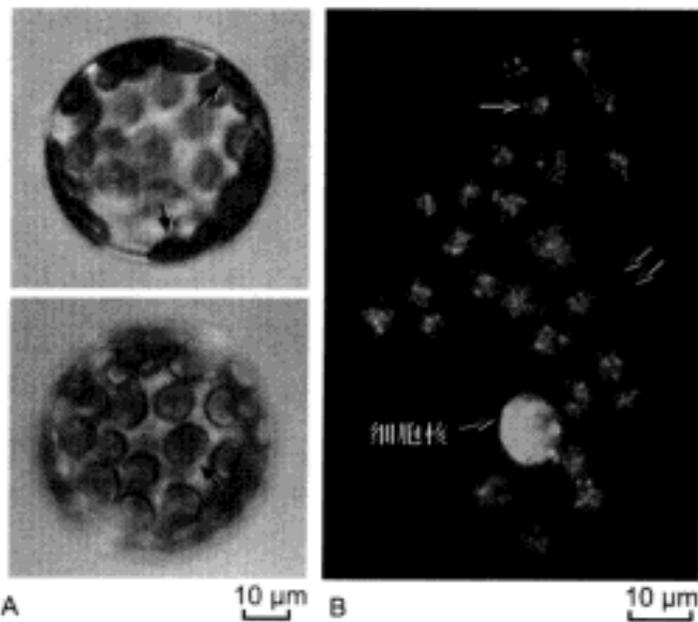


图 6-11 光学显微镜及荧光显微镜下观察到的叶绿体

A. 拟南芥叶肉细胞原生质体光学显微照片。焦面置于细胞中部时，观察到的叶绿体呈两端渐窄的条形 (上图箭头)。而将焦面移动到细胞顶部时，观察到的叶绿体为近圆形 (下图箭头)。可见，叶绿体的立体结构应与凸透镜或铁饼相似。B. 将原生质体细胞质平铺并经 DAPI 染色后的荧光显微照片。红色为叶绿素的自发荧光。当细胞质平铺为一薄层时，叶绿体的顶面观均为近圆形。此外，经 DAPI 染色后的叶绿体中可以观察到叶绿体 DNA 颗粒状荧光 (红色箭头)。同时，细胞质中可以观察到线粒体 DNA 的荧光信号 (蓝色箭头)。(胡迎春博士惠赠)

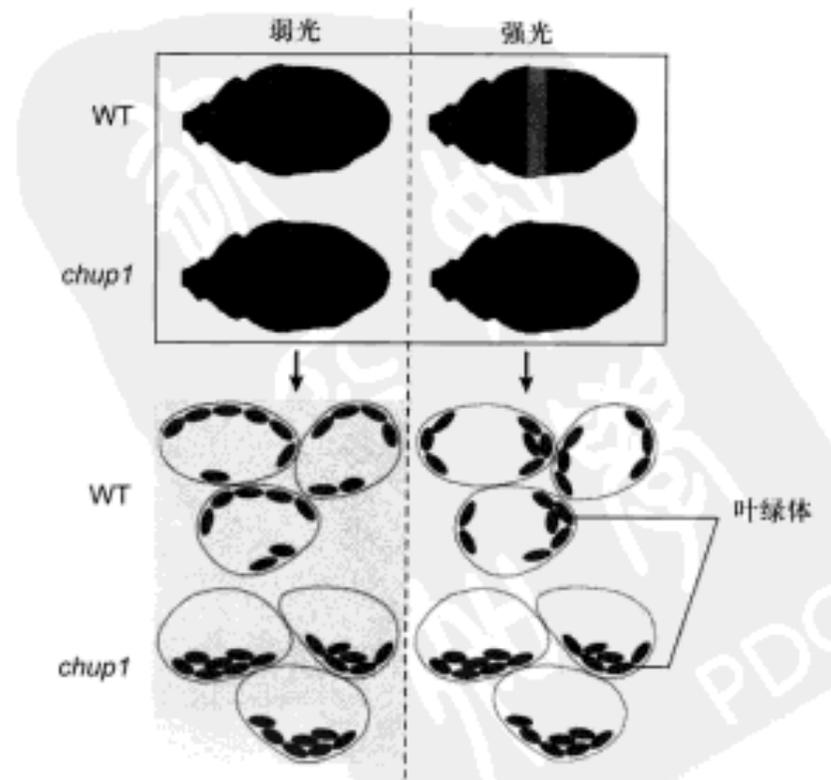


图 6-12 光照强度对叶绿体分布及位置影响的示意图

野生型 (WT) 拟南芥叶片呈深绿色。对叶片的一部分 (整体遮光，中部留出一条窄缝) 强光照射 1 h 后，被照射的窄缝处变成浅绿色。这是由于细胞中的叶绿体发生了位置和分布的变化，以减少强光的伤害。在一种叶绿体定位异常的突变体 (*chup1*) 中，光照对叶绿体的位置和分布失去影响。

绿体正常定位所必需的。编码该蛋白质的基因 (*CHUP1*) 突变后, 叶绿体呈现定位异常 (图 6-12)。研究结果显示, *CHUP1* 定位于叶绿体外膜表面, 相对分子质量约  $1.12 \times 10^5$ 。由于分子上存在肌动蛋白结合域, *CHUP1* 很可能是叶绿体与微丝骨架之间实现连接的重要蛋白, 在以微丝骨架为依托的叶绿体定位过程中发挥重要的作用。

与动物相比, 植物缺乏主动运动能力。其适应和抵御环境胁迫的机制更多地体现在细胞内独特的生命活动, 如叶绿体定位等。目前, 在介导细胞器运动的马达蛋白中未发现叶绿体特异的马达蛋白。据推测, 叶绿体有可能依靠 *CHUP1* 等蛋白质与微丝骨架形成连接, 随着微丝骨架的动态变化而发生位移。

除了位置和分布的变化以外, 细胞中叶绿体的动态行为还表现于叶绿体之间的动态连接。与线粒体不同的是, 叶肉细胞内罕见叶绿体之间的相互融合。但叶绿体可以通过其内外膜延伸形成的管状凸出 (基质小管, stroma-filled tubule, stromule) 实现叶绿体之间的相互联系 (图 6-13)。用 GFP 标记叶绿体膜后, 荧光显微镜下可以观察到基质小管之间频繁的融合与分断。这种动态的融合与分断有助于叶绿体实现实时的物质或信息交换。因此, 与线粒体相似, 细胞内的叶绿体仍然可以被视作一个不连续的动态整体。实验结果显示, 基质小

管还可能具备其他重要的细胞学功能, 比如将叶绿体代谢中产生的废物输送到液泡中等。这些功能的背后尚有许多科学问题值得深入研究。

## (二) 叶绿体的分化与去分化

叶绿体仅存在于植物茎叶等绿色组织的细胞内。未发芽的种子 (胚) 细胞中没有叶绿体。在种子萌发过程中, 子叶、叶鞘和真叶细胞中的原质体 (proplastid) 相继分化为叶绿体。这种分化依赖于光照。植物在黑暗条件下生长时, 细胞中原质体不能形成叶绿体, 幼苗呈黄色。可见, 叶绿体是原质体的一种分化方式。在储藏组织 (如块根、块茎和胚乳) 和一些其他的白化组织中, 质体以造粉质体 (amyloplast) 或白色体 (etioplast) 的形式存在。

叶绿体分化于幼叶的形成和生长阶段。因此, 从生长中的植物顶芽纵切片上, 可以观察到分生细胞中的原质体分化形成叶绿体的连续过程。在形态上, 叶绿体的分化表现为体积的增大、内膜系统的形成和叶绿素的积累。而在生化和分子生物学上, 则体现为叶绿体功能所必需的酶、蛋白质、大分子的合成、运输及定位。据推测, 叶绿体的正常工作需要数千个基因的支持。可见叶绿体分化是一个十分复杂的过程。在该过程中, 某一个基因的突变或异常往往会导致叶绿体分化的障碍。植物中常见的白化苗就是叶绿体分化障碍的表现。除了叶绿素合成相关基因的突变直接导致白化外, 其他基因的缺陷同样可以导致植物白化, 机制多种多样。例如, 叶绿体基因突变导致烟草白化, 园艺中常用的花叶植物 (绿色叶片上出现白斑或白色花纹) 是部分叶肉细胞中叶绿体分化出现障碍的结果; 拟南芥编码叶绿体蛋白酶的基因 (*var1* 及 *var2*) 发生突变后, 早期质体内多余的蛋白质得不到清除, 导致部分叶肉细胞内叶绿体分化异常, 叶片出现白斑, 白化叶或叶片的白化部分中质体形成白色体 (图 6-14)。

在特定情况下, 叶绿体的分化是可逆的。叶肉细胞经组织培养形成愈伤组织细胞时, 叶绿体去分化再次形成原质体。目前, 人们对叶绿体分化与去分化的了解还仅限于发现了一些必需的基因。其复杂的调控网络尚不清楚, 有待于进一步研究。

## (三) 叶绿体的分裂

质体和叶绿体通过分裂而实现增殖。在高等植物中, 叶绿体的分裂集中发生在生长中的幼叶内。在形态上, 幼叶中的叶绿体体积为成熟叶绿体的  $1/10 \sim 1/5$ , 基质内

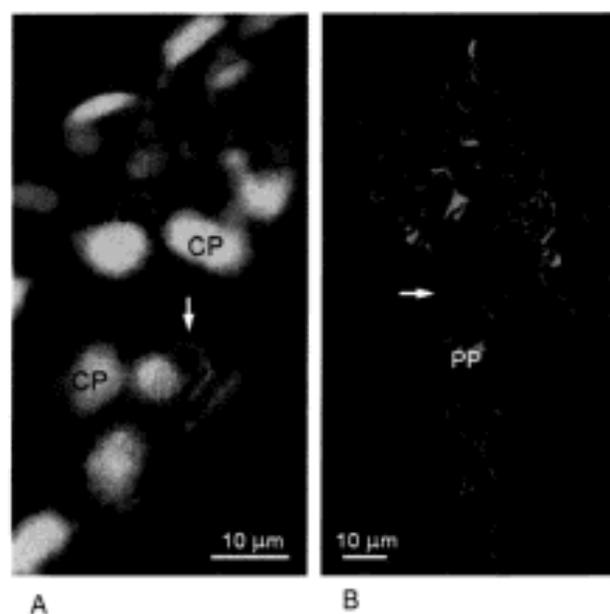


图 6-13 叶绿体及原质体膜向外延伸形成的柔性管状结构——基质小管

该结构具双层膜, 分别为叶绿体内膜和外膜的直接延伸。由于叶绿体 (或质体) 基质随小管延伸, 故名基质小管 (箭头所指)。A. GFP 标记叶绿体膜后荧光显微镜下观察到的基质小管。B. 三维重构显示的拟南芥卵细胞原质体及复杂的基质小管网络。CP: 叶绿体; PP: 原质体。(图片获授权)

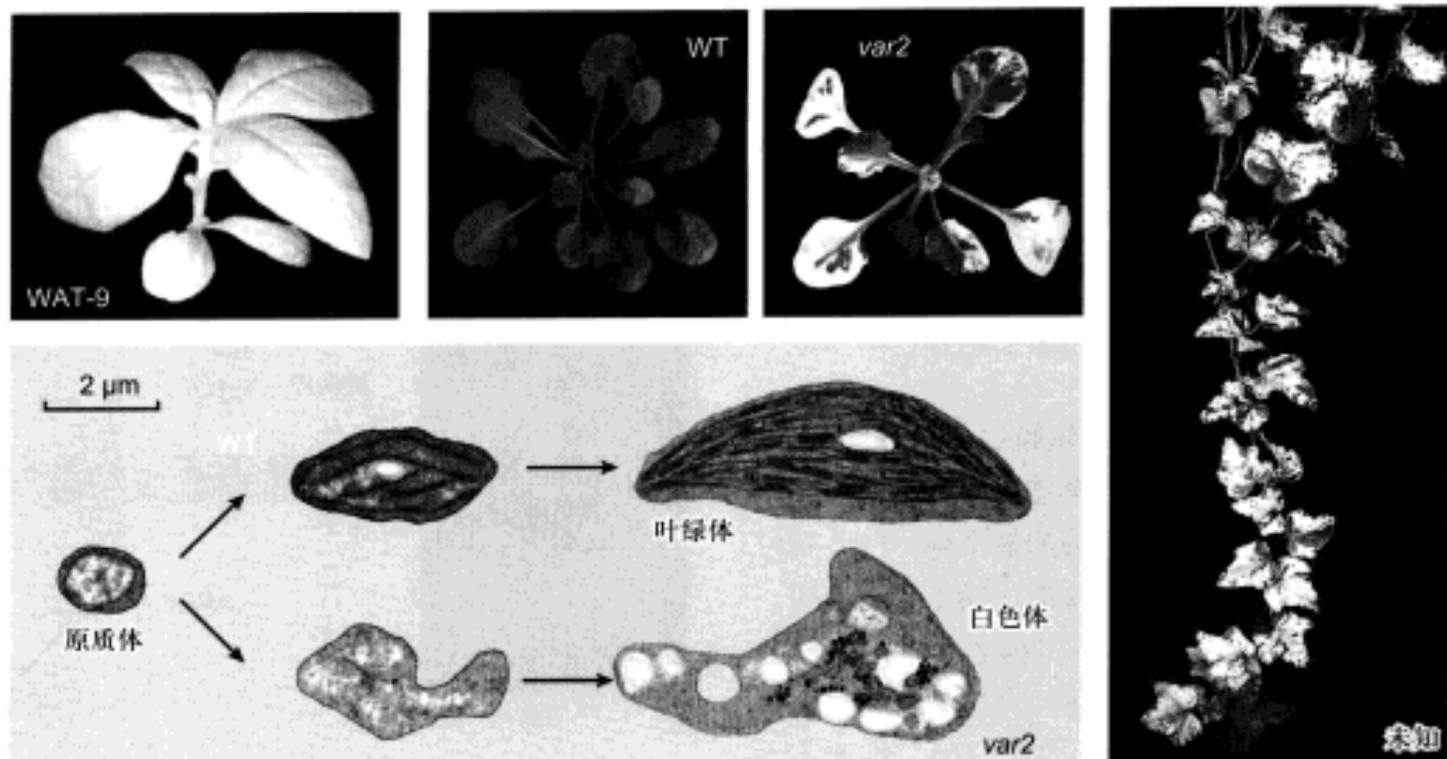


图 6-14 叶绿体分化及分化异常的表现

在烟草中，叶绿体基因 *atpA* 的第 264 个密码子被人为突变后引起植株白化 (WAT-9)。野生型拟南芥 (WT) 叶肉细胞中原质体分化为叶绿体，而花叶突变体 (*var2*) 叶片白斑部分的叶肉细胞内质体形成白色体 (绿色区域内质体形成正常的叶绿体)。植物的花叶突变体在园艺中常被视为珍稀观叶品种，其变异的分子生物学机制多数不详 (“未知” 示一种未知变异机制的常春藤花叶突变体)。(WAT-9 获授权；其他图片由张泉博士、胡迎春博士及 W. Sakamoto 博士惠赠)

只形成少数基质类囊体，尚未或正在开始形成基粒类囊体。这种分化中的叶绿体被称为前叶绿体 (pre-chloroplast) (图 6-14)。观察茎尖分生组织附近的幼叶细胞时，可以发现频繁的前叶绿体分裂现象。但在停止生长的成熟叶片中很少观察到叶绿体分裂，说明细胞内叶绿体数目的调控主要发生于细胞分化和生长的早期阶段。

叶绿体的分裂与线粒体分裂具有相同的细胞动力学机制。在分裂中的叶绿体上，可以观察到环绕叶绿体的分裂环 (chloroplast division ring)，亦由外环和内环组成。外环位于叶绿体外膜表面，暴露于细胞质；而内环位于叶绿体内膜下面，暴露于叶绿体基质 (图 6-15)。

分裂环的缢缩是叶绿体分裂的细胞动力学基础。但需要说明的是，对叶绿体分裂环与线粒体分裂环的认识还仅限于作为电镜下细胞超微结构概念，所涉及的蛋白质分子基础尚不清楚。人们将叶绿体分裂所有相关蛋白组成的分裂功能单位称为叶绿体分裂装置 (chloroplast division apparatus, chloroplast division machinery)。较分裂环而言，分裂装置是一个更为完整的细胞功能概念，包括分裂环和分裂环以外的相关蛋白。

与线粒体的分裂相似，dynamamin 相关蛋白在叶绿体分裂装置中起着同样的作用。在被子植物中，叶绿体分

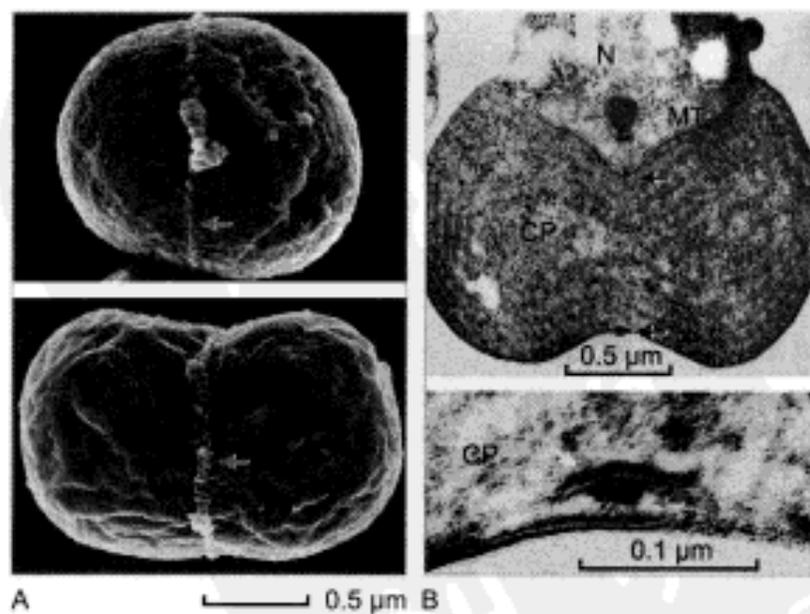


图 6-15 电子显微镜下观察到的红藻的叶绿体分裂环

在扫描电子显微镜下，红藻叶绿体分裂环的外环 (A 中红色箭头指示) 为一环形索状结构，位于叶绿体表面，随着叶绿体分裂的进行而变粗。在叶绿体的垂环切面上，分裂环的一对横切面出现在叶绿体的缢缩处，呈较高电子密度 (B 中蓝色箭头指示)。将分裂环的切面放大 (B 下图) 后，在外环切面 (红色箭头) 的下面可以清楚地分辨出形状宽扁的内环 (黄色箭头) 断面。外环与内环的断面之间由叶绿体膜相隔。高等植物的分裂环在超微结构上与红藻相同。CP: 叶绿体; MT: 线粒体; N: 细胞核。(图片获授权)

裂必需的 dynamin 相关蛋白被称为 ARC5 (accumulation and replication of chloroplasts-5)。该蛋白在叶绿体表面开始缢陷时组装成环状结构, 出现于缢陷处, 推动叶绿体膜深度缢陷及分断。在分子结构和作用时空上, ARC5 与线粒体分裂装置中的 dynamin 类蛋白非常相似, 推测可能是分裂外环的重要组成部分。编码 ARC5 的基因突变导致叶绿体分裂受到抑制, 细胞内出现异常大体积的叶绿体。

由于 ARC5 分子上没有叶绿体膜定位信号, ARC5 在叶绿体膜外的外环处的组装需要借助其他蛋白质的作用。研究结果发现, 在叶绿体分裂的最早期, FtsZ 蛋白先于叶绿体膜的缢陷汇集于叶绿体的内膜下, 组装成一个环状结构, 称为 FtsZ 环或 Z 环 (FtsZ ring, Z ring)。由于 Z 环的荧光强度在叶绿体膜尚未发生缢陷时最强, 而随着叶绿体分裂进程而减弱 (图 6-16), 推测其功能可能是在叶绿体分裂前参与分裂位置的确定, 而不是内环的组成蛋白。

如果叶绿体分裂环和分裂缢陷的位置由最先出现于该位置的 Z 环决定的话, 叶绿体膜内的 Z 环位置信息必须传递到膜外的相应位置, 以招募外环蛋白在该位置汇集和组装。这个推测近期得到了证实。研究结果表明, 一个内膜的跨膜蛋白 ARC6 通过其伸向叶绿体基质的 N 端实现与 FtsZ 的相互作用, 同时其伸向膜间隙的 C 端与外膜上的跨膜蛋白 PDV2 (plastid division-2) 的 C 端相结合。由于 PDV2 的 N 端伸向细胞质并与 ARC5 相结合, 叶绿体膜内的 Z 环位置信息通过 ARC6 传递到膜间隙, 再通过 PDV2 传递给叶绿体膜外的 ARC5 (图 6-16)。实验结果还显示, 编码 FtsZ、ARC6、PDV1 和 PDV2 的基因突变均导致叶绿体分裂障碍, 细胞内出现异常大体积的叶绿体。

## 二、叶绿体的超微结构

叶绿体的超微结构可以被分为 3 个部分: 叶绿体被膜 (chloroplast envelope) 或称叶绿体膜 (chloroplast membrane)、类囊体 (thylakoid) 以及叶绿体基质 (stroma) (图 6-17)。这 3 部分结构组成一个三维的产能“车间”, 为光合作用提供了必需的结构支持。

### (一) 叶绿体膜

与线粒体相同, 叶绿体也是一种由双层单位膜包被的细胞器。其外膜和内膜的厚度为每层 6~8 nm。叶

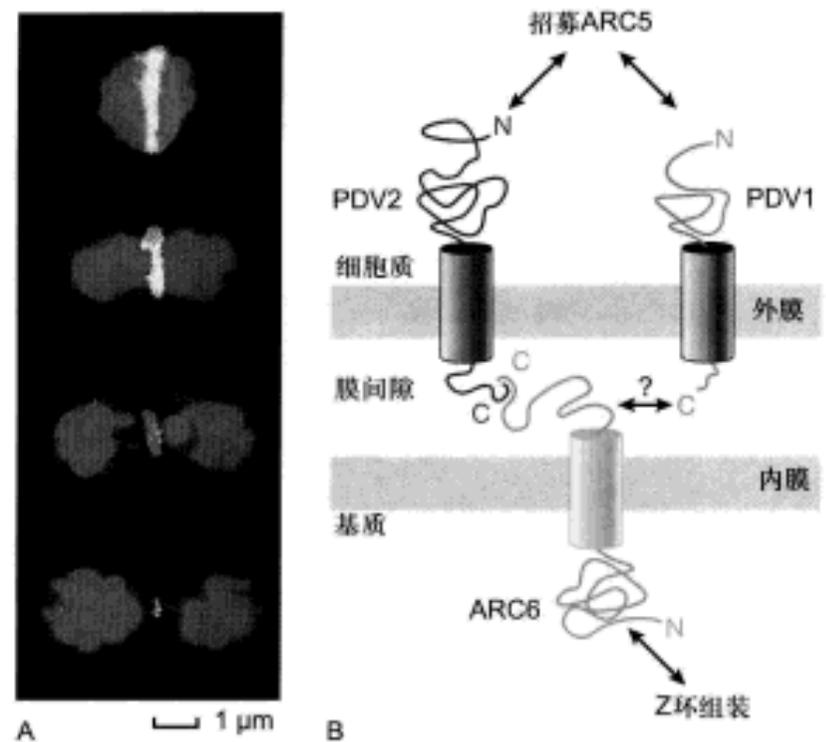


图 6-16 高等植物叶绿体分裂过程中的 Z 环 (A) 及分裂相关蛋白的定位 (B)

注意 Z 环的免疫荧光在叶绿体膜尚未发生缢陷的分裂早期最强, 随着叶绿体分裂的进行而减弱。实验结果表明: 在叶绿体分裂的早期, 内膜下的 Z 环最先完成定位和组装。叶绿体内膜跨膜蛋白 ARC6 的 N 端伸向叶绿体基质, 与 FtsZ 的相互作用, 协助 Z 环组装。同时, ARC6 的 C 端伸向膜间隙, 与外膜跨膜蛋白 PDV2 的 C 端相结合, 将叶绿体膜内的 Z 环位置信息传递到膜间隙。在 PDV2 的相同位置, 还存在另一个 C 端较短跨膜蛋白 PDV1。这两个蛋白质的 N 端均伸向细胞质, 共同招募 ARC5。PDV1 和 PDV2 的编码基因双突变后 ARC5 无法正常定位, 而它们的单突变亦导致叶绿体分裂异常。(图片获授权)

绿体内、外膜之间的腔隙称为膜间隙 (intermembrane space), 为 10~20 nm。与线粒体膜一样, 叶绿体的外膜通透性大, 含有孔蛋白, 允许相对分子质量高达  $10^4$  的分子通过; 而内膜则通透性较低, 成为细胞质与叶绿体基质间的通透屏障, 仅允许  $O_2$ 、 $CO_2$  和  $H_2O$  分子自由通过。叶绿体内膜上有很多转运蛋白, 选择性转运较大分子进出叶绿体。如磷酸交换载体 (phosphate exchange carrier, 将细胞质中的无机磷转运到叶绿体基质并将基质中产生的磷酸甘油醛释放到细胞质) 和二羧酸交换载体 (dicarboxylate exchange carrier, 交换含有 2 个羧基的酸, 如苹果酸和延胡索酸) 等。

### (二) 类囊体

叶绿体内部由内膜衍生而来的封闭的扁平膜囊, 称为类囊体。类囊体囊内的空间称为类囊体腔 (thylakoid lumen)。在叶绿体中, 许多圆饼状的类囊体有序叠置成

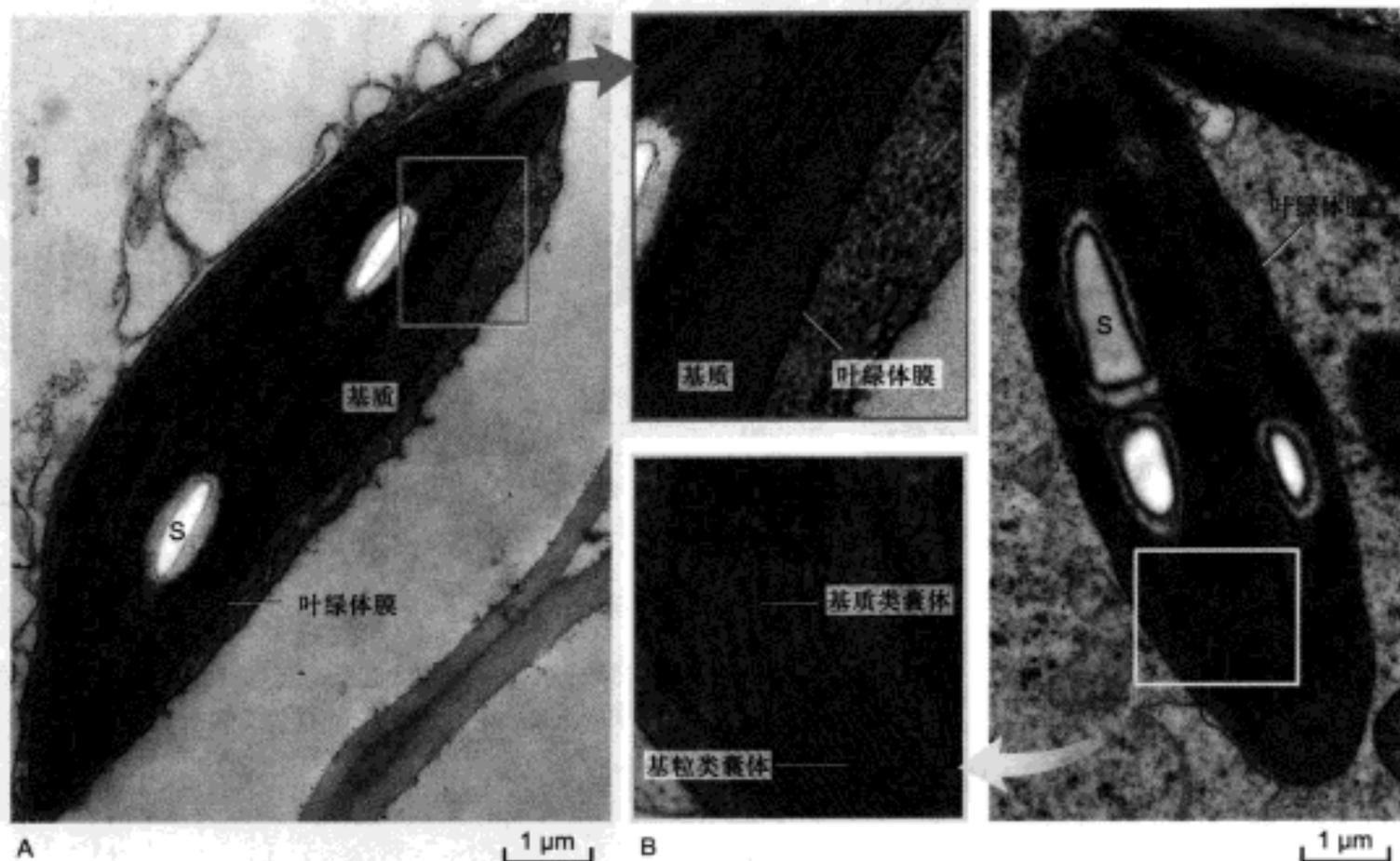


图 6-17 电子显微镜下观察到叶绿体

不同植物或同一植物不同绿色组织中叶绿体的超微结构略有差别。如拟南芥幼叶中的叶绿体 (A) 边缘较为扁平, 基粒类囊体层数较少; 而水稻幼叶中的叶绿体 (B) 边缘相对浑圆, 基粒类囊体层数较多等。此外, 基粒类囊体的层数还与植物的受光情况相关。S: 淀粉粒。(张泉博士惠赠)

垛, 称为基粒 (grana)。组成基粒的类囊体称为基粒类囊体 (granum thylakoid)。而贯穿于两个或两个以上基粒之间, 不形成垛叠的片层结构称为基质片层 (stroma lamella) 或基质类囊体 (stroma thylakoid) (图 6-17)。基粒类囊体的直径为  $0.25 \sim 0.8 \mu\text{m}$ , 厚约  $0.01 \mu\text{m}$ 。一个叶绿体通常含有  $40 \sim 60$  个甚至更多的基粒。每个基粒由  $5 \sim 30$  层基粒类囊体组成。基粒类囊体的层数在不同植物或同一植物的不同绿色组织间可出现较大变化。在光照等因素的调节下, 基粒类囊体与基质类囊体之间可发生动态的相互转换。

类囊体垛叠成基粒是高等植物叶绿体特有的结构特征。这种垛叠大大增加了类囊体片层的总面积, 有益于更多地捕获光能, 提高光反应效率。由于管状或扁平状的基质类囊体将相邻基粒相互连接, 叶绿体内的全部类囊体之间实际上是一个完整连续的封闭膜囊。该膜囊系统独立于基质, 在电化学梯度的建立和 ATP 的合成中起重要作用。

类囊体膜的化学组成与其他的细胞膜有明显差异,

富含具有半乳糖的糖脂和极少的磷脂。糖脂中的脂肪酸主要是不饱和的亚麻酸, 约占 87%。这样, 类囊体膜的脂质双分子层流动性非常大, 有益于光合作用过程中类囊体膜上的光系统 II (PS II)、Cyt  $b_6/f$  复合物、光系统 I (PS I) 及  $CF_0$ - $CF_1$  ATP 合酶复合物在膜上的侧向移动。此外, 类囊体膜上的蛋白质/脂质的比值很高, 同样与叶绿体的光合作用功能相关。

### (三) 叶绿体基质

叶绿体内膜与类囊体之间的液态胶体物质, 称为叶绿体基质。基质的主要成分是可溶性蛋白质和其他代谢活跃物质, 其中丰度最高的蛋白质为核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, 简称 Rubisco)。该酶相对分子质量为  $5.5 \times 10^5$ , 由 8 个大亚基 (每个相对分子质量约为  $5.3 \times 10^4$ ) 和 8 个小亚基 (每个相对分子质量约为  $1.4 \times 10^4$ ) 组成, 约占类囊体可溶性蛋白质的 80% 和叶片可溶性蛋白质的 50%。Rubisco 是光合作用中的一个重要的酶系统, 亦是自然

界含量最丰富的蛋白质。研究证实, Rubisco 的大亚基由叶绿体基因组编码, 而小亚基由核基因组编码。此外, 叶绿体基质中还含有参与  $\text{CO}_2$  固定反应的所有酶类, 是光合作用固定  $\text{CO}_2$  的场所。在蛋白质之外, 基质中还存在着叶绿体 DNA、核糖体、脂滴 (lipid droplet)、植物铁蛋白 (phytoferritin) 和淀粉粒 (starch grain) 等物质。

### 三、光合作用

叶绿体的主要功能是光合作用。绿色植物、藻类和蓝细菌通过光合作用将水和二氧化碳转变为有机化合物并放出氧气。光合作用是自然界将光能转换为化学能的主要途径, 其本质可视为呼吸作用的逆过程。线粒体中的呼吸作用是将氧还原成水, 而叶绿体中的光合作用将水光解放出氧。这两个过程逆向进行, 前者释放能量, 后吸收能量。

高等植物的光合作用由两步反应协同完成, 分别被称为依赖光的反应 (light dependent reaction) 或称“光反应” (light reaction) 和碳同化反应 (carbon assimilation reaction) 或称固碳反应 (carbon fixation reaction)。光反应包括原初反应和电子传递及光合磷酸化两个步骤, 指叶绿素等光合色素分子吸收、传递光能并其转换为电能, 进而转换为活跃的的化学能, 形成 ATP 和 NADPH, 同时产生  $\text{O}_2$  的一系列过程。光反应在类囊体膜上进行。固碳反应指在光反应的产物, 即在 ATP 和 NADPH 的驱动下,  $\text{CO}_2$  被还原成糖的分子反应过程。该过程将活跃的的化学能转换为稳定的化学能, 在叶绿体基质中进行。

#### (一) 原初反应

捕获光能是光合作用的初始步骤。原初反应 (primary reaction) 指光合色素分子被光能激发而引起第一个光化学反应的过程。该过程包括光能的吸收、传递和转换, 即光能被天线色素分子吸收并传递至反应中心, 继而诱发最初的光化学反应, 使光能转换为电能的过程 (图 6-18)。原初反应只需  $10^{-19} \sim 10^{-12}\text{s}$ , 并可在  $-196^\circ\text{C}$  低温下进行。

##### 1. 光合色素

叶绿体化学成分的显著特点是含有色素 (pigment)。色素的特性是分子内含有独特的化学基团, 能吸收可见光谱中特定波长的光。植物叶绿体中所含的色素有数十种之多, 可分为 3 类: 叶绿素、类胡萝卜素和藻胆素。高等植物和多数藻类的叶绿体内含有叶绿素和类胡萝卜

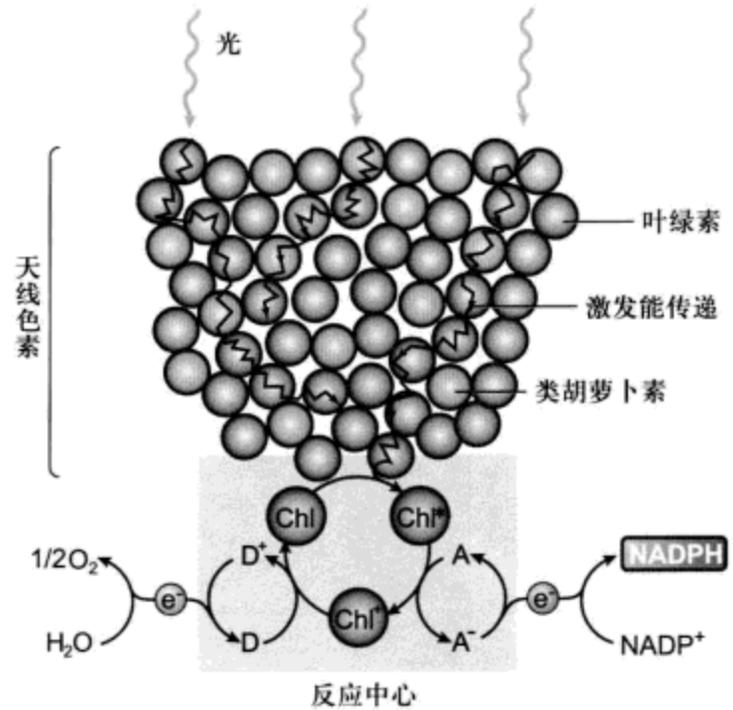


图 6-18 光合作用原初反应的能量吸收、传递与转换图解

Chl 为反应中心色素分子; D 为原初电子供体; A 为原初电子受体。

素, 藻胆素仅存在于一些细菌和藻类中。

叶绿素 (chlorophyll) 是光合作用的主要色素, 在光吸收中起核心作用。高等植物的叶绿体含有叶绿素 a 和叶绿素 b。这两种叶绿素均为绿色, 具有不同的吸收光谱, 可互补吸收不同范围的可见光。叶绿素分子由卟啉环 (porphyrin ring) 和叶绿醇 (phytol) 两部分基团组成。前者具有吸光性和亲水性, 后者则具有疏水性。疏水的叶绿醇插入类囊体膜和脂质结合, 起到分子定位作用。

类胡萝卜素 (carotenoid) 是类囊体膜上的辅助色素 (accessory pigment), 呈黄色、红色或者紫色。最重要的类胡萝卜素是  $\beta$ -胡萝卜素 ( $\beta$ -carotene) 和叶黄素 (phytoanthin)。类胡萝卜素能协助叶绿体吸收叶绿素不能吸收的光, 提高光吸收效率; 同时又能从激发的叶绿素分子上回收多余的能量, 以热能的形式释放。叶绿素分子上多余的能量如果不被类胡萝卜素吸收, 将转移至氧分子产生单氧原子 ( $\text{O}^*$ ), 引起分子或细胞损伤。因此, 类胡萝卜素具有重要的光损伤防护功能。

藻胆素 (phycobilin) 能够吸收叶绿素不能吸收的杂色光。其吸收的光能可以转移给叶绿素, 同叶绿素分子吸收的光能一起进入光反应途径。

实验表明, 叶绿体中并非所有的叶绿素分子都直接参与将光能转换为化学能的光化学反应。在大约 300 个叶绿素分子组成的一个光合单位 (photosynthetic unit) 中, 只有一对特殊的叶绿素 a 分子, 即反应中心色素 (reaction

center pigment), 具有将光能转换为化学能的功能, 其余的光合色素称为捕光色素 (light harvesting pigment) 或天线色素分子 (antenna pigment molecule)。后者的作用是吸收光能并将之有效地传递到反应中心色素。

天线色素分子间的能量传递是有序的, 即从需能较高的天线色素分子传递到需能较低的色素分子。换言之, 能量从吸收短波长光波的天线色素分子传向吸收长波长光波的天线色素分子。反应中心的叶绿素分子是吸收最长波长光的色素。所有天线色素分子吸收的光能必然和不可逆转地传递给反应中心色素。反应中心色素在直接吸收光能或接受从天线色素分子传递来的光能后被激发, 产生电荷分离和能量转换。

## 2. 光化学反应

光化学反应是指反应中心色素分子吸收光能而引发的氧化还原反应。天线色素分子吸收的光能通过共振机制迅速地传递给反应中心色素分子 Chl。Chl 被激发后形成激发态  $\text{Chl}^*$ , 放出电子传给原初电子受体 A。这时 Chl 被氧化为带正电荷的  $\text{Chl}^+$ , 而 A 被还原为带负电荷的  $\text{A}^-$ 。氧化态的  $\text{Chl}^+$  再次从原初电子供体 D 获得电子而恢复为原初状态的 Chl, 原初电子供体 D 则被氧化为

$\text{D}^+$  (见图 6-18)。这样, 氧化还原 (即电荷分离) 不断发生, 电子被不断地传递给原初电子受体 A。通过这样的过程, D 被氧化而 A 被还原, 光能最终被转换为电能。

## (二) 电子传递和光合磷酸化

原初反应将光能转换为电能, 完成了光反应的第一步。电子随后在电子传递体之间的传递, 导致 ATP 和 NADPH 的形成, 即电能转换为活跃的的化学能。这一过程涉及水的裂解、电子传递及  $\text{NADP}^+$  还原。其中  $\text{H}_2\text{O}$  是原初电子供体;  $\text{NADP}^+$  是最终电子受体。水裂解释放的电子在沿着光合电子传递链传递的同时, 在类囊体膜的两侧建立质子电化学梯度, 驱动 ATP 的合成。

### 1. 电子传递

光合电子传递链 (photosynthetic electron transfer chain) 由一系列的电子载体构成。这些电子载体包括细胞色素、黄素蛋白、醌和铁氧还蛋白等。它们分别组装在膜蛋白复合物, 如 PS I、PS II 及  $\text{Cyt } b_6/f$  复合物中 (图 6-19)。

光系统 (photosystem, PS) 指光合作用中光吸收的功能单位, 由叶绿素、类胡萝卜素、脂质和蛋白质组成。每一个光系统复合物含两个组分: 捕光复合

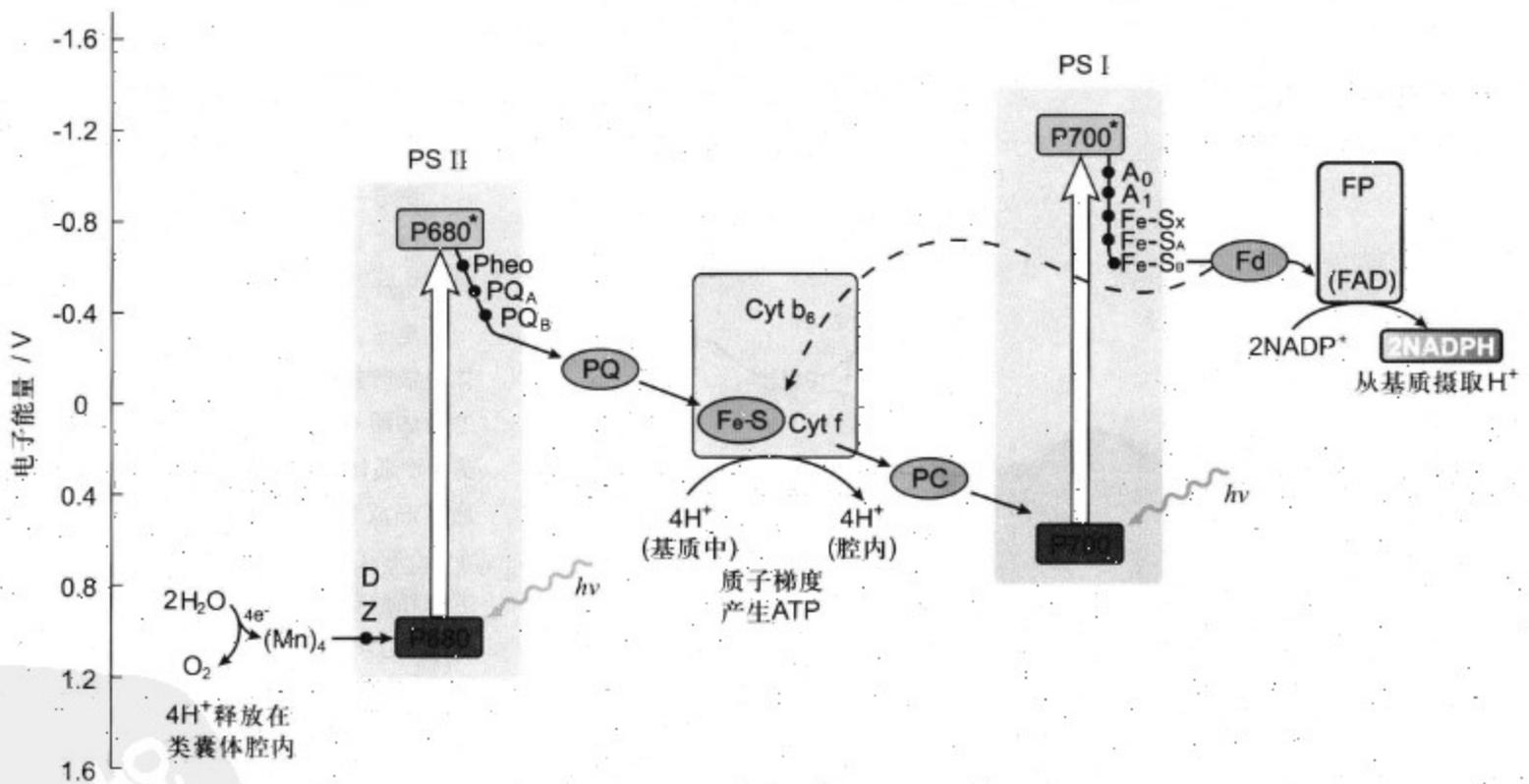


图 6-19 叶绿体中的光系统及电子传递途径

在非循环光合作用过程中, 电子从  $\text{H}_2\text{O}$  传递到  $\text{NADP}^+$  经过一个“Z形”传递路径。电子传递体的纵轴位置反映了其标准还原电势。来自水分子的电子在传递给  $\text{NADP}^+$  之前需经过两次能量提升 (空心箭头)。每次提升消耗一个光子, 分别在不同的光系统中完成。经 PS II 完成第一次能量提升的电子以“下山”的方式流过电子传递链。其间电子经过细胞色素  $b_6/f$  复合物时驱动质子移动穿过类囊体膜, 产生质子梯度。同时, 水分子裂解时产生的质子亦释放于类囊体腔内。虚线箭头表示循环光合作用的电子传递路径。该途径只涉及 PS I。PS II 和 PS I 反应中心的叶绿素分别称为 P680 和 P700。“P”代表色素, “680”和“700”分别为该色素最大吸收波长。

物 (light harvesting complex, LHC) 和反应中心复合物 (reaction center complex)。在叶绿体的类囊体膜上存在两个不同的光系统: PS II 和 PS I。这两个光系统具有独特而互补的功能。它们的反应中心相继催化光驱动的电子从  $H_2O$  到  $NADP^+$  的流动 (图 6-19)。

光系统驱动 1 个电子从  $H_2O$  传递到  $NADP^+$  需要 2 个光子 (每个光系统各吸收 1 个)。这样, 每形成 1 分子的  $O_2$  需要 4 个电子从 2 个  $H_2O$  传递到 2 个  $NADP^+$ , 共需吸收 8 个光子 (每个光系统各吸收 4 个)。

(1) PS II 的结构与功能 PS II 由反应中心复合物和 PS II 捕光复合物 (LHC II) 组成。它们的功能是利用光能在类囊体膜腔面一侧裂解水并在基质侧还原质体醌, 使类囊体膜的两侧形成质子梯度。

反应中心复合物是一个由 20 多个不同的多肽组成的叶绿素-蛋白质复合物 (图 6-20)。这些多肽大多数由叶绿体基因组编码。

LHC II 是一个由蛋白质、叶绿素、类胡萝卜素和脂质分子组成的复杂的高疏水性膜蛋白复合物。2004 年, 中国科学家在 *Nature* 上发表了菠菜 LHC II 的晶体结构, 首次提出了 LHC II 的完整结构模型。该结构模型揭示了每一个复合物单体中的 14 个叶绿素分子 (其中 8 个叶绿素 a, 6 个叶绿素 b) 和 4 个类胡萝卜素的排布规律, 阐述了 LHC II 高效率进行光吸收和能量传递的分子结

构基础。

(2) Cyt  $b_6f$  复合物的结构与功能 在电子传递过程中, Cyt  $b_6f$  复合物在 PS II 和 PS I 之间承担重要的联系。PS II 光反应产生的  $PQ_BH_2$  脱离 D1 蛋白后, 电子从  $PQ_BH_2$  经 Cyt  $b_6f$  复合物传递至质体蓝素 (plastocyanin, PC) 并经之传递给 PS I 中的  $P700^+$ 。Cyt  $b_6f$  复合物含有一个 Cyt  $b_6$ 、一个 Fe-S 和一个 Cyt f (c 型细胞色素), 和线粒体中的 Cyt  $bc_1$  的结构与功能相似, 都是作为电子载体。Cyt  $b_6f$  复合物将电子从双电子载体  $PQ_B$  转运到单电子载体 PC, 形成一个 Q 循环。在这个循环中, 电子从  $PQ_BH_2$  一次一个地传递到 PC, 引起  $H^+$  的跨膜转移。在叶绿体中, 一对电子的传递导致 4 个  $H^+$  从基质转移至类囊体腔。随着电子从 PS II 传递到 PS I, 质子在类囊体膜的两侧形成梯度。

(3) PS I 的结构与功能 PS I 由反应中心复合物和 PS I 捕光复合物 (LHC I) 组成 (图 6-21), 其功能是利用吸收的光能或传递来的激发能在类囊体膜的基质侧将  $NADP^+$  还原为 NADPH。

## 2. 光合磷酸化

由光照所引起的电子传递与磷酸化作用相偶联而生成 ATP 的过程称为光合磷酸化 (photophosphorylation)。光合作用通过光合磷酸化形成 ATP, 再通过  $CO_2$  同化将能量储存在有机物中。

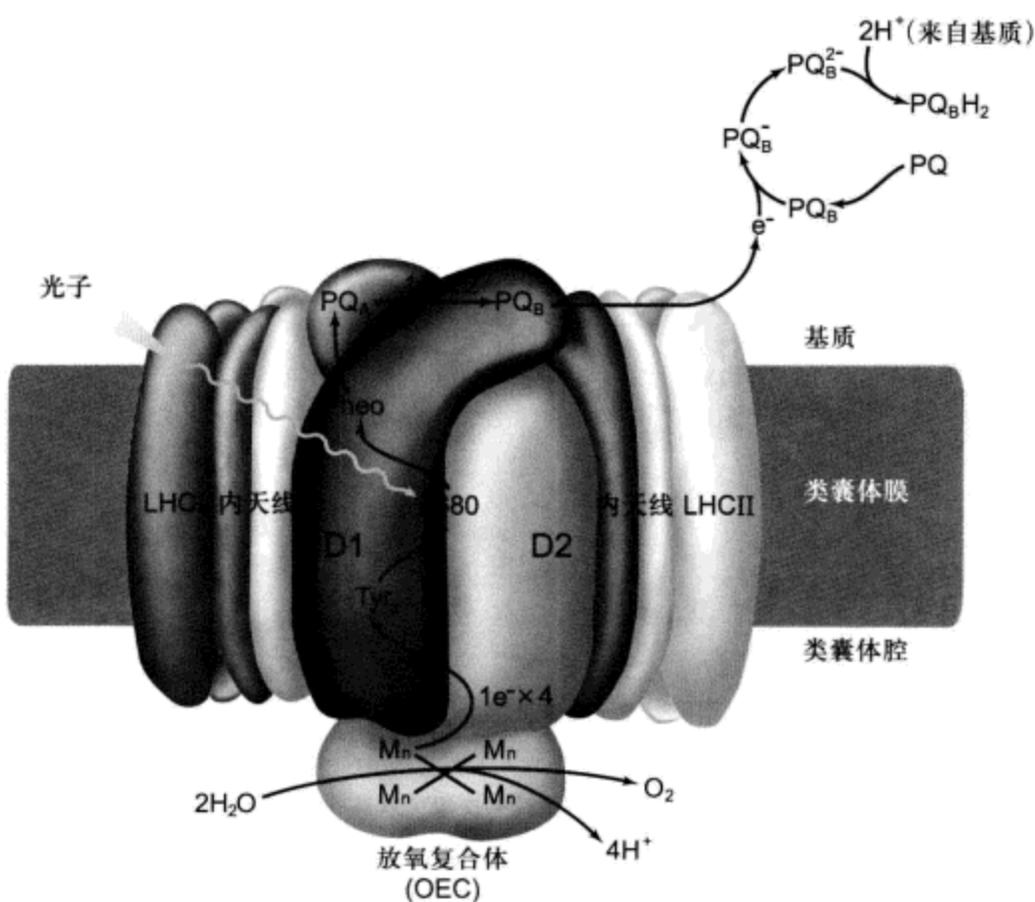


图 6-20 PS II 结构示意图

LHC II 中的天线色素分子吸收光能并将之传递给反应中心 P680 后, P680 受到激发释放一个电子。该电子经 D1 蛋白上的原初电子受体脱镁叶绿素 (Pheo) 传递给与 D2 蛋白结合的质体醌  $PQ_A$ , 继而传递至与 D1 蛋白结合的另一个质体醌  $PQ_B$ 。  $PQ_B$  在连续接受 2 个电子后, 形成  $PQ_B^{2-}$ 。此时  $PQ_B^{2-}$  从基质中摄取 2 个  $H^+$  形成还原型  $PQ_BH_2$ , 并从 D1 蛋白上解离下来释放到类囊体膜的脂双层中。随后新的氧化型 PQ 补充到 D1 蛋白上。在上述电子传递过程中, 反应中心 P680 经酪氨酸残基 (Z 或  $Tyr_2$ ) 接受来自水分子的电子。在整体功能上, PS II 催化电子从水传递给质体醌, 从而建立质子梯度。

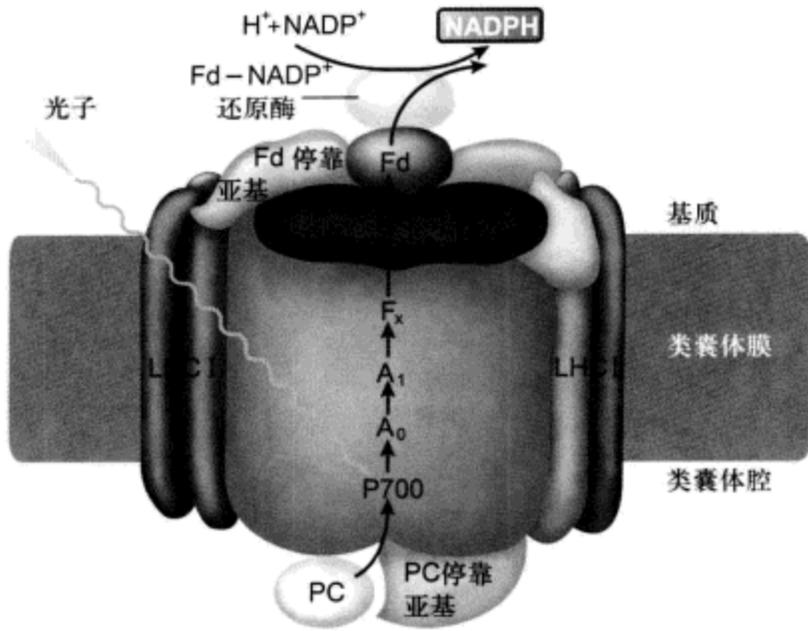


图 6-21 PS I 的结构示意图

LHC I 中的天线色素分子吸收光能并传递给反应中心 P700，使其中的一个叶绿素 a 分子激发而释放 1 个电子。释放的电子传递给原初电子受体（另一个单体叶绿素 a 分子）A<sub>0</sub>，经 A<sub>1</sub>（可能是叶绿醌 phylloquinone，即维生素 K<sub>1</sub>）、F<sub>x</sub>（铁硫中心）和 F<sub>d</sub>/F<sub>b</sub> 传递给铁氧还蛋白（ferredoxin, Fd）。Fd 是一个含 2Fe-2S 的低相对分子质量可溶性铁硫蛋白，疏松地结合于类囊体膜基质侧，通过 Fe<sup>3+</sup> → Fe<sup>2+</sup> 的转变每次接受和传递 1 个电子。在 Fd-NADP<sup>+</sup> 还原酶（ferredoxin-NADP reductase）的作用下，电子随后从 Fd 转移到氧化型辅酶 II（NADP<sup>+</sup>）。获得 2 个电子的 NADP<sup>+</sup> 结合基质中的 1 个 H<sup>+</sup> 形成还原型辅酶 II（NADPH），自 H<sub>2</sub>O 至 NADP<sup>+</sup> 的电子传递最终完成。PS I 至少含有 11 种多肽，由核基因组和叶绿体基因组共同编码（高等植物中）。反应中心复合物是一个多蛋白复合体，其中色素 P700 是两个特殊的叶绿素 a 的二聚体。LHC I 由天线色素分子和几种不同的多肽组成，位于反应中心复合物的周围。

(1) CF<sub>0</sub>-CF<sub>1</sub>ATP 合酶 在叶绿体中催化 ATP 合成的酶称为 CF<sub>0</sub>-CF<sub>1</sub>ATP 合酶（CF<sub>0</sub>-CF<sub>1</sub>ATP synthase），位于类囊体膜外表面朝向基质一侧，由 CF<sub>0</sub> 和 CF<sub>1</sub>（C 代表叶绿体）两部分组成。CF<sub>1</sub> 与线粒体中的 F<sub>1</sub> 在亚基组成、结构和功能上都非常相似，均由 α、β、γ、δ、ε 5 种亚基组成。CF<sub>0</sub> 是一个跨膜的质子通道，至少有 4 种亚基组成，与线粒体中的 F<sub>0</sub> 同源。

叶绿体 ATP 合酶的作用机制也与线粒体 ATP 合酶基本相同。在质子驱动力作用下，ADP 和 Pi 在酶的表面缩合成 ATP。同样，ATP 从酶分子上释放需要质子驱动力。叶绿体 ATP 合酶以旋转催化的方式使其中的 3 个 β 催化亚基按顺序参与 ATP 的合成、ATP 的释放和 ADP+Pi 的结合。

(2) 光合磷酸化的类型 光合磷酸化依电子传递的

方式的不同分为非循环和循环两种类型。

非循环光合磷酸化：由光能驱动的电子从 H<sub>2</sub>O 开始，经 PS II、Cyt b<sub>6</sub>f 复合物和 PS I 最后传递给 NADP<sup>+</sup>（见图 6-19）。非循环光合磷酸化的电子传递经过两个光系统，在电子传递过程中建立质子梯度，驱动 ATP 的形成。在这个过程中，电子被单向传递，故称非循环光合磷酸化（noncyclic photophosphorylation）。这种磷酸化途径的产物有 ATP 和 NADPH（绿色植物）或 NADH（光合细菌）。

循环光合磷酸化：由光能驱动的电子从 PS I 开始，经 A<sub>0</sub>、A<sub>1</sub>、Fe-S 和 Fd 后传给 Cyt b<sub>6</sub>f，再经 PC 回到 PS I（见图 6-19）。电子循环流动过程中释放的能量通过 Cyt b<sub>6</sub>f 复合物转移质子，建立质子梯度并驱动 ATP 的形成。这种电子的传递是一个闭合的回路，故称循环光合磷酸化（cyclic photophosphorylation）。循环光合磷酸化由 PS I 单独完成，同时在其过程中只有 ATP 的产生，不伴随 NADPH 的生成和 O<sub>2</sub> 的释放。当植物缺乏 NADP<sup>+</sup> 时，启动循环光合磷酸化，以调节 ATP 与 NADPH 的比例，适应碳同化反应对 ATP 与 NADPH 的比例需求（3:2）。

(3) 光合磷酸化的作用机制 光合磷酸化的作用机制与线粒体的氧化磷酸化相似，同样可用化学渗透学说来阐明。在类囊体膜中，光合链的各组分按一定的顺序排列，呈不对称分布。当两个光系统发生原初反应时，类囊体腔中的水分子发生裂解，释放出氧分子、质子和电子，引起电子从水传递到 NADP<sup>+</sup> 的电子流（图 6-22）。

叶绿体中 ATP 合成的机制也与线粒体的十分相似。通过电子传递，类囊体腔内的 H<sup>+</sup> 浓度升高，类囊体膜两侧形成质子梯度。当腔内的 H<sup>+</sup> 顺电化学梯度穿越类囊体膜上的 ATP 合酶（CF<sub>0</sub> 和 CF<sub>1</sub>）时，驱动 ADP 磷酸化形成 ATP。由于 CF<sub>1</sub> 位于类囊体膜的基质侧，新合成的 ATP 被释放入基质。同时，通过 PS I 形成的 NADPH 也被释放在基质中。这两种光反应高能产物（ATP 和 NADPH）随即用于叶绿体基质中的碳同化反应。

可见，光合磷酸化和氧化磷酸化的相同之处在于：ATP 的形成都由 H<sup>+</sup> 流所驱动；叶绿体的 CF<sub>1</sub> 因子与线粒体的 F<sub>1</sub> 因子都具有催化 ADP 和 Pi 形成 ATP 的作用；在光合磷酸化和氧化磷酸化中都需要完整的膜；等等。光合磷酸化和氧化磷酸化之间又存在细微的不同。比如，叶绿体中 1 对电子的 2 次穿膜传递，导致基质中的 3 个 H<sup>+</sup> 被摄取进入类囊体腔，同时类囊体腔内产生 4

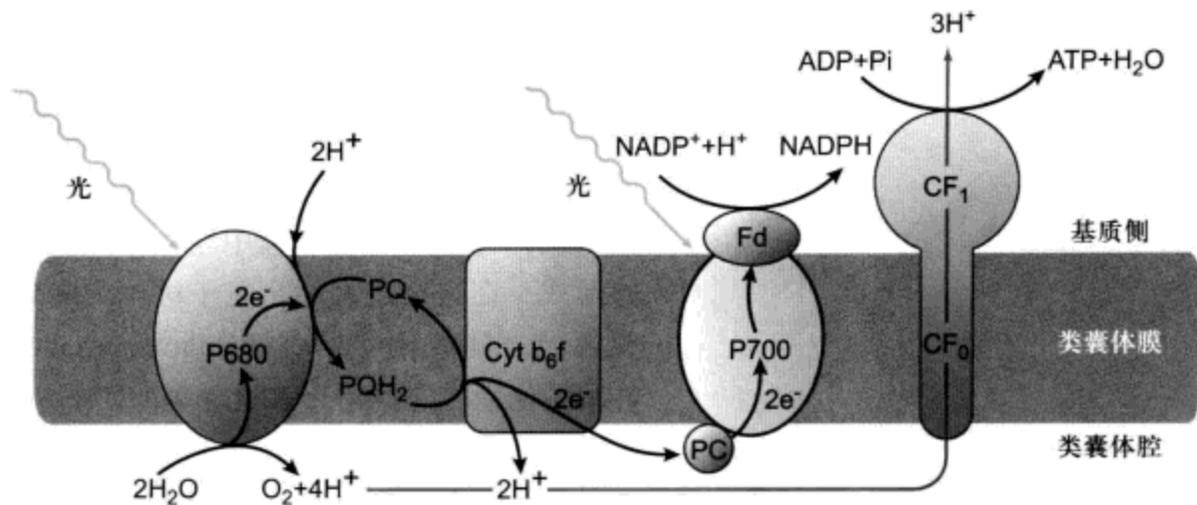


图 6-22 叶绿体类囊体膜中进行的电子传递和  $H^+$  跨膜转移

P680 分子吸收光子后，激发出的电子传至膜外侧的电子受体 PQ；PQ 接受电子，并从基质中摄取 2 个质子，还原为  $PQH_2$ ； $PQH_2$  移到膜的内侧，将 2 个质子释放到类囊体腔中，而把电子交给 Cyt  $b_6/f$ ，随后又经位于膜内侧的质体蓝素（PC），把电子传递给 P700；P700 分子吸收光子后，放出电子，经铁硫蛋白传给位于膜外侧的铁氧还蛋白（Fd），最后将电子交给  $NADP^+$ ，使之还原成 NADPH。在进行电子传递的同时， $H^+$  被泵过类囊体膜，在类囊体膜的两侧建立质子梯度。

个  $H^+$ 。此后平均每 3 个  $H^+$  穿过叶绿体 ATP 合酶驱动合成 1 个 ATP 分子。而线粒体中 1 对在电子 3 次跨膜传递的过程中将 5 对  $H^+$  由基质摄入膜间隙，之后每 2 个  $H^+$  穿过线粒体 ATP 合酶驱动 1 个 ATP 分子的合成。

(4) ATP 合成机制 在光合作用的光反应中，两个光系统的联合作用将水裂解释放出的电子传递到  $NADP^+$ 。在电子从  $H_2O$  转移到  $NADP^+$  的过程中，大约每 4 个电子的转移（即 1 分子  $O_2$  的形成）可使类囊体腔中约增加了 12 个  $H^+$ 。其中 4 个  $H^+$  由放氧复合体直接提供，另外 8 个  $H^+$  由 Cyt  $b_6/f$  复合体从基质中摄入。在 ATP 合成的高峰期，检测结果表明类囊体膜两侧的质子浓度相差约 1 000 倍，相当于 3 个单位的  $\Delta pH$ 。如此明显的梯度保证了 ATP 合成的强大驱动力。在电子传递过程中，当  $H^+$  从基质转移到类囊体腔时，其他阳离子从类囊体腔转移向基质，以保证叶绿体内不会产生明显的膜电位。

### (三) 光合碳同化

二氧化碳同化 ( $CO_2$  assimilation) 是光合作用过程中的固碳反应。从能量转换角度看，碳同化的本质是将光反应产物 ATP 和 NADPH 中的活跃化学能转换为糖分子中高稳定性化学能的过程。高等植物的碳同化有 3 条途径：卡尔文循环、 $C_4$  途径和景天酸代谢 (CAM)。其中卡尔文循环是碳同化的基本途径，具备合成糖类等产品物的能力。其他两条途径只能起到固定、浓缩和转运  $CO_2$  的作用，不能单独形成糖类等产品物。

#### 1. 卡尔文循环

卡尔文循环 (Calvin cycle) 以甘油酸-3-磷酸 (三碳化合物) 为最初产物固定  $CO_2$ ，故也称做  $C_3$  途径。20 世纪 50 年代卡尔文 (Calvin) 等应用  $^{14}CO_2$  示踪的方法揭示了该著名的碳同化过程。由于 Calvin 在光合碳同化途径上做出的重大贡献，1961 年被授予诺贝尔化学奖。 $C_3$  途径是所有植物进行光合碳同化所共有的基本途径，包括 3 个主要的阶段，羧化 ( $CO_2$  固定)、还原和 RuBP 再生 (图 6-23)。

(1) 羧化阶段  $CO_2$  被 NADPH 还原固定的第一步是被羧化生成羧酸。此时，核酮糖-1,5-二磷酸 (ribulose-1,5-biphosphate, RuBP) 作为  $CO_2$  的受体。在 RuBP 羧化酶/加氧酶 (RuBP carboxylase/oxygenase, Rubisco) 的催化下，1 分子 RuBP 与 1 分子  $CO_2$  反应形成 1 分子的不稳定六碳化合物，并立即分解为 2 分子甘油酸-3-磷酸。此过程被称为  $CO_2$  羧化阶段 ( $CO_2$  carboxylation phase)。

(2) 还原阶段 甘油酸-3-磷酸在甘油酸-3-磷酸激酶催化下被 ATP 磷酸化，形成甘油酸-1,3-二磷酸，然后在甘油醛-3-磷酸脱氢酶催化下被 NADPH 还原成储能更多的甘油醛-3-磷酸。这一阶段是耗能的。光反应中生成的 ATP 和 NADPH 主要被利用于这个过程。因此，还原阶段是光反应与固碳反应的连接点。当  $CO_2$  被还原成甘油醛-3-磷酸，光合作用的储能过程便告完成。甘油醛-3-磷酸等三碳糖可进一步转化，在叶绿体内合成淀粉，也可透出叶绿体，在细胞质中合成蔗糖。

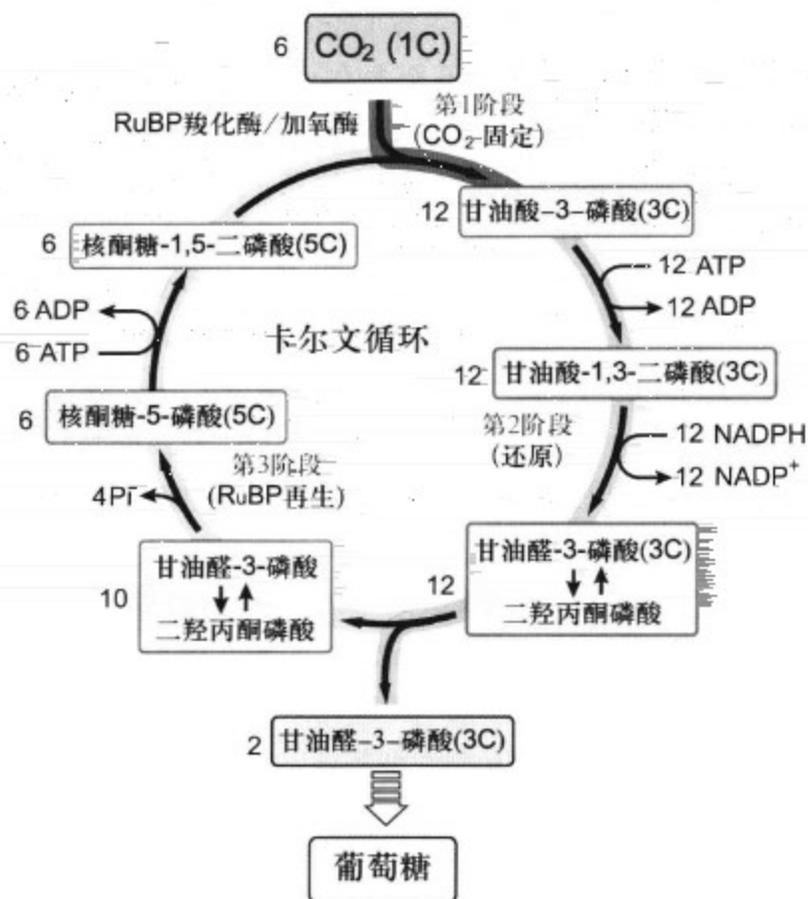
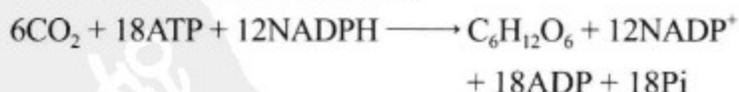


图 6-23 卡尔文循环的 3 个阶段示意图

(3) RuBP 再生阶段 甘油醛-3-磷酸可异构化, 形成二羟丙酮磷酸。这两种磷酸丙糖在醛缩酶催化下合成磷酸己糖, 然后在一系列酶的作用下, 可形成磷酸化的丁糖、戊糖、庚糖。核酮糖-5-磷酸在核酮糖-5-磷酸激酶的催化下发生磷酸化, 消耗一个 ATP, 再形成 RuBP。该反应是第三次耗能反应。RuBP 作为卡尔文循环的起始物和 CO<sub>2</sub> 的受体, 需要得到不断的再生, 以维持循环的连续进行。

综上所述, C<sub>3</sub> 途径以光反应生成的 ATP 及 NADPH 为能源, 推动 CO<sub>2</sub> 的固定和还原。卡尔文循环每次只固定 1 个 CO<sub>2</sub> 分子, 6 次循环才能把 6 个 CO<sub>2</sub> 分子同化成 1 个己糖分子。在能量使用上, 循环每固定 1 个 CO<sub>2</sub> 分子需要 3 分子 ATP 和 2 分子 NADPH。

卡尔文循环净反应可表示为:



在糖类化合物中, 己糖特别是葡萄糖占据中心位置。葡萄糖是合成纤维素和淀粉的构件分子, 被看成是 CO<sub>2</sub> 固定的主要终产物。

## 2. C<sub>4</sub> 途径

20 世纪 60 年代发现, 除了卡尔文循环以外, 一些热带或亚热带起源的植物中还存在着另一个独特的 CO<sub>2</sub> 固定途径。该途径固定 CO<sub>2</sub> 的最初产物为草酰乙酸 (四碳化合物), 因而被称为 C<sub>4</sub> 途径。通过 C<sub>4</sub> 途径固定 CO<sub>2</sub> 的植物被称为四碳植物 (C<sub>4</sub> 植物), 如甘蔗、玉米、高粱等。C<sub>4</sub> 植物具有一个典型的结构特征, 即叶脉周围有一圈含叶绿体的薄壁维管束鞘细胞, 其外面整齐环列叶肉细胞。与 C<sub>3</sub> 植物不同的是, CO<sub>2</sub> 在叶肉细胞中首先与磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 反应生成草酰乙酸。这步反应在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEP 羧化酶) 催化下进行。生成的草酰乙酸具有不稳定性, 迅速被还原为苹果酸。叶肉细胞随后将苹果酸转运至维管束鞘细胞。在维管束鞘细胞中, 苹果酸被分解再次释放出 CO<sub>2</sub>, 进入卡尔文循环。

这样, C<sub>4</sub> 植物的卡尔文循环是在维管束鞘细胞内进行的。叶肉细胞为此提供 CO<sub>2</sub> 的供体 (苹果酸)。人们普遍认为 C<sub>4</sub> 途径是植物适应环境的产物。在热带或亚热带环境中, 高温导致强烈的蒸腾作用。植物叶片缺水时调节部分气孔关闭或半关闭, 致使叶片中 CO<sub>2</sub> 浓度下降, 光合作用的效率降低。与 C<sub>3</sub> 植物细胞的 RuBP 羧化酶/加氧酶相比, C<sub>4</sub> 植物叶肉细胞中的 PEP 羧化酶具有非常高的 CO<sub>2</sub> 亲和力, 可固定低浓度的 CO<sub>2</sub>。这样, 通过高效率固定低浓度 CO<sub>2</sub> 并向叶肉细胞输送苹果酸的方式, C<sub>4</sub> 途径保证了维管束鞘细胞中较高的 CO<sub>2</sub> 水平 (可达大气中浓度的 10 倍), 维持了高热环境下的光合作用。

## 3. 景天酸代谢

景天酸代谢 (crassulacean acid metabolism, CAM) 发现于生长在干旱地区的景天科及其他一些肉质植物。由于环境干旱, 这些植物的气孔白天关闭, 夜间开放, 以最大限度地减少水分蒸发。由于 CO<sub>2</sub> 只能在夜间进入叶片, 需要在此间将其固定下来。景天酸代谢与 C<sub>4</sub> 途径非常相似, CO<sub>2</sub> 在 PEP 羧化酶的催化下与磷酸烯醇式丙酮酸结合, 生成草酰乙酸, 进一步还原为苹果酸。细胞中的苹果酸在白天经氧化脱羧释放 CO<sub>2</sub>, 进入卡尔文循环, 最后形成淀粉。与 C<sub>4</sub> 植物不同的是, 景天酸代谢过程中的初级固碳产物 (苹果酸) 合成和卡尔文循环均在叶肉细胞中进行, 不需要细胞间转移。

### 第三节 线粒体和叶绿体的半自主性及其起源

在真核生物的细胞中，线粒体和叶绿体是一类特殊的细胞器。它们的功能主要受细胞核基因组调控，但同时又受到自身基因组的调控。因此，真核细胞中这两种特殊的细胞器被称为半自主性细胞器 (semiautonomous organelle)。由于这样的特殊性，人们普遍认为线粒体和叶绿体具有独特的内共生起源 (endosymbiotic origin)。

线粒体和叶绿体以非孟德尔方式遗传。这种遗传方式可能在真核生物的起源与进化过程中发挥了重要的作用。

#### 一、线粒体和叶绿体的半自主性

线粒体和叶绿体的功能依赖数以千计的核基因编码的蛋白质。同时，这两种细胞器还拥有自身的遗传物质 DNA，编码一小部分必需的 RNA 和蛋白质。这些蛋白质通过线粒体和叶绿体专用的酶和核糖体系统进行翻译。

##### (一) 线粒体和叶绿体 DNA

1962 年，Ris 和 Plant 在衣藻叶绿体中发现了 DNA 状物质；1963 年，Nass 和 Nass 在鸡胚肝细胞线粒体中也发现同样的物质，推测线粒体和叶绿体中可能存在遗传物质 DNA。人们之后陆续从各种生物的叶绿体和线粒体中纯化出了 DNA。

绝大多数真核细胞的线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 呈双链环状，分子结构与细菌的 DNA 相似。在不同的物种之间，mtDNA 的分子大小有一定的差异。比如，人类的 mtDNA 约为 16 kb，酵母的约为 78 kb，而高等植物拟南芥的 mtDNA 约为 366 kb 等。继 1981 年人类的线粒体基因组被成功测序之后，目前已有一千多种真核生物的 mtDNA 序列信息被解读。这些信息为了解线粒体的起源与进化提供了重要的资料。

在动物细胞中，平均每个线粒体携带 1 个以上拷贝的 mtDNA。除了精细胞以外，每个动物细胞携带的 mtDNA 拷贝数在 1 000~10 000 个范围内。相比之下植

物细胞携带的 mtDNA 拷贝数要低得多。比如拟南芥的每个叶肉细胞平均携带 50 个左右 mtDNA，细胞内平均每个线粒体携带不到 0.1 个拷贝。线粒体需要通过频繁的融合与分裂共享细胞内的遗传信息。此外，被子植物的 mtDNA 呈现出丰富的分子多态性。

叶绿体 DNA (cpDNA) 或称质体 DNA (ptDNA) 亦呈环状，分子大小依物种的不同呈现较大差异，在 200~2 500 kb 之间。在发育中的幼嫩叶片中，叶绿体含较多拷贝的 cpDNA (最多时接近 100 个)。而当叶片成熟后，每个叶绿体中的 cpDNA 数量呈现明显的下调，维持在 10 个左右。

mtDNA 和 cpDNA 均以半保留方式进行复制。<sup>3</sup>H-嘧啶核苷标记实验证明，mtDNA 主要在细胞周期的 S 期及 G<sub>2</sub> 期进行复制；而 cpDNA 则主要在 G<sub>1</sub> 期复制。mtDNA 和 cpDNA 的复制受细胞核的控制。复制所需的 DNA 聚合酶、解旋酶等均由核基因组编码。

##### (二) 线粒体和叶绿体中的蛋白质

线粒体和叶绿体的 DNA 具有与核 DNA 一样的编码功能。在一些学术著作中，mtDNA 和 cpDNA 也被称为线粒体基因组 (mitochondrial genome) 和叶绿体基因组 (chloroplast genome)。借助自身的酶系统 (主要由细胞核编码)，这些基因组携带的遗传信息会被转录和/或翻译成相应的功能分子。比如，哺乳动物的线粒体基因组编码 2 种 rRNA (12 S 和 16 S)、22 种 tRNA 以及 13 种多肽。这些遗传信息均在线粒体中得到表达，其产物在线粒体的生命活动中扮演着不可缺少的重要作用。比如，上述产物中的 13 种多肽分别为线粒体复合物 I (7 个亚基)、复合物 III (1 个亚基)、复合物 IV (3 个亚基) 和 F<sub>0</sub> (2 个亚基) 的组成部分。

叶绿体基因组携带的遗传信息同样为叶绿体的生命活动所必需。它们包括 4 种 rRNA (23 S、16 S、4.5 S 及 5 S)、30 种 (烟草) 或 31 种 (地钱) tRNA 以及 100 多种多肽。叶绿体基因编码的多肽涉及光合作用的各个环节，如 RuBP 羧化酶的 (大亚基)、PS I (2 个亚基)、PS II (8 个亚基)、ATP 合酶 (6 个亚基) 以及 Cyt b<sub>6</sub>f 复合物 (3 个亚基)。此外，叶绿体基因编码的多肽还以 70 S 核糖体的组成蛋白等形式参与叶绿体的生命活动。

可见，线粒体和叶绿体基因组编码的蛋白质在线粒体和叶绿体的生命活动中是重要和不可缺少的，但这些蛋白质还远远不足以支撑线粒体和叶绿体的基本功能。

更多的蛋白质来自于核基因组的编码，于细胞质中合成后被运往线粒体和叶绿体的功能位点。比如，酵母线粒体中的主要酶复合物由 75 个亚基组成。其中线粒体基因组编码并在线粒体中合成的只有 9 个，其余的 64 个亚基均由细胞核编码并在细胞质中合成。

现有的研究资料表明，线粒体和叶绿体的生命活动均需要数以千计的核基因参与。这个数字充分说明了线粒体和叶绿体对细胞核的依赖。细胞核编码的基因产物在细胞质中合成后，需要被准确地定向运输到叶绿体和线粒体。参见本书第八章相关内容。

### (三) 线粒体、叶绿体基因组与细胞核的关系

上述内容不难看出，线粒体和叶绿体的生命活动受到细胞核以及它们自身基因组的双重调控。这就要求不同的基因表达调控机制以及表达产物分子之间建立精确的协作关系。简而喻之，如果线粒体和叶绿体中的某种酶复合物被看作一台机器的话，这台机器的“国产部件”（细胞器自身编码和合成的多肽亚基）和“进口部件”（细胞核编码的亚基）之间必须形成数量和质量上的完好匹配，才能保证线粒体和叶绿体生命活动的有效运行。在真核生物的演化过程中，细胞核与线粒体、叶绿体之间通过“共进化”（coevolution）的方式建立了精确有效的分子协作机制。

在真核细胞中，细胞核与线粒体、叶绿体之间在遗传信息和基因表达调控等层次上建立的分子协作机制被称为核质互作（nuclear-cytoplasmic interaction）。有序的核质互作为线粒体、叶绿体以及真核细胞的生命活动提供了必要的保证。当核质互作相关的细胞核或线粒体、叶绿体基因单方面发生突变，引起细胞中的分子协作机制出现严重障碍时，细胞或真核生物个体通常会表现出一些异常的表型。这类表型背后的分子机制被统称为核质冲突（nuclear-cytoplasmic incompatibility, nuclear-cytoplasmic conflict）。

在自然界中，核质冲突的表型并不罕见。人类线粒体疾病的本质就是一类典型的核质冲突。人类的线粒体病多为母系遗传，说明其中核质冲突的直接原因更多地来源于线粒体基因的突变。这些基因突变可能造成其编码亚基的构型发生变化，无法与细胞核编码的其他亚基组装成具有正常功能的蛋白质复合体，导致线粒体功能丧失。此外，人为地突变细胞质基因组也可以造成核质冲突。比如，烟草叶绿体基因组编码的 ATP 合酶  $\alpha$  亚基被置换一个氨基酸后导致叶绿体分化异常（见图 6-

14, WAT-9) 等。

另一个值得注意的现象是，在线粒体和叶绿体的基因表达过程中，一些基因中的个别碱基需要接受必要的修饰方可翻译出正确的蛋白质。这种修饰在 RNA 水平上进行，称为 RNA 编辑（RNA editing）。RNA 编辑改变 RNA 分子上的碱基，因此会带来表达产物蛋白质上氨基酸的变化。在高等植物中，将碱基 C 转换为 U 的编辑（C-to-U editing）最为普遍，叶绿体基因组中通常有 40~50 个碱基，而线粒体基因组则有 400~500 个碱基受到编辑。当某些基因转录的 RNA 编辑出现障碍时，

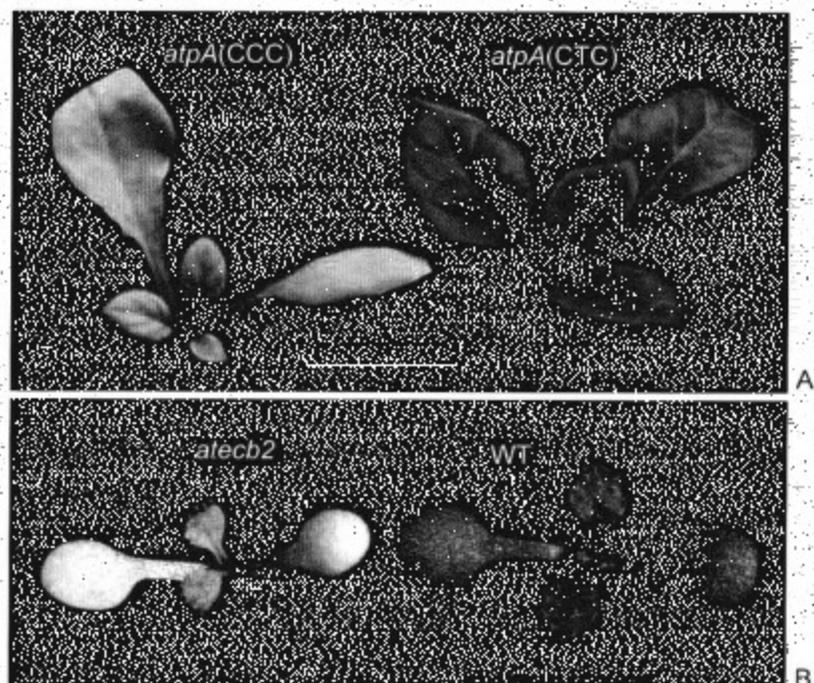


图 6-24 颠茄核质冲突 (A) 及拟南芥 RNA 编辑障碍 (B) 导致的白化苗

烟草叶绿体基因 *atpA* (编码 ATP 酶  $\alpha$  亚基) 的第 264 个密码子为 CTC，翻译后对应一个亮氨酸残基。此时酶功能及叶绿体发育正常 (*atpA* - CTC)。烟草叶绿体 *atpA* 的相应密码子为 CCC，对应脯氨酸残基。但烟草细胞在 RNA 水平将该密码子编辑为 CUC，保证了亮氨酸残基不发生改变。当通过细胞融合的方法把烟草的叶绿体基因组置换给颠茄时，由于颠茄细胞不具备该位点的 RNA 编辑机制，导致 ATP 酶  $\alpha$  亚基的第 264 个氨基酸残基发生突变。该突变影响了 ATP 酶  $\alpha$  亚基的分子构型，使其无法与细胞核编码的其他亚基组装成具有正确功能的酶复合物。这种分子水平上的核质冲突引起颠茄的白化苗表型 (*atpA* - CCC)。在野生型拟南芥 (WT) 中，叶绿体基因 *accD* (编码乙酰 CoA 羧化酶复合物中羧基转移酶的  $\beta$  亚基。该复合物在脂肪酸合成中具关键作用) 的第 265 个密码子得到编辑后产物具有正常的活性。该 RNA 编辑需要细胞核蛋白 AtECB2 的参与。当编码 AtECB2 的基因被突变 (*atecb2*) 后，正常的 RNA 编辑机制受到破坏。该 RNA 编辑障碍导致 *accD* 产物的分子中出现错误的氨基酸残基而失活，幼苗出现白化表型。可见，RNA 编辑具有消除核质冲突的客观作用。(A 图获授权；B 图由杨仲南博士惠赠)

细胞或植物会呈现类似核质冲突的表型 (图 6-24)。这个现象暗示 RNA 编辑有可能是真核细胞为有效消除核质冲突而获得的一种分子机制。

综上所述, 在真核生物的形成和进化过程中, 细胞核基因组与线粒体、叶绿体基因组之间经历了长期的“磨合”, 形成了上述既互相依赖又相互制约的核质互作关系。这种磨合式的共进化在不同类别的真核生物之间既体现出了共性, 也表现出一些差别。比如, 动物、酵母、脉孢菌和植物的 mtDNA 在分子大小上存在较大差异, 但它们在编码复合物 III 中的细胞色素 b、复合物 IV 的亚基 1、2 和 3 以及 ATP 合酶 ( $F_0$ ) 的亚基 6 和 8 上具有完全的一致性 (表 6-1)。此外, 脉孢菌和植物的线粒体基因组编码复合物 I 中的 6 个亚基; 而酵母中的这些亚基则全部由细胞核编码等 (详见表 6-1)。细胞核与线粒体、叶绿体基因组的编码内容反映不同类别真核生物的核质互作形态以及这些生物之间的进化关系, 值得深入思考。

## 二、线粒体和叶绿体的起源

由于线粒体和叶绿体具有独特的半自主性并与细胞核建立了复杂而协调的互作关系, 它们的起源一直以来多被认为有别于其他细胞器。在人们为这两种细胞器设计的起源假说中, 内共生起源学说很好地贴合了线粒体和叶绿体的半自主性和核质关系特征, 因而得到了广泛的认可和支持。

内共生起源学说认为, 线粒体和叶绿体分别起源于原始真核细胞内共生的行有氧呼吸的细菌和行光能自养的蓝细菌。该假说的提出远早于 mtDNA 和 cpDNA 的发现。其中叶绿体的内共生起源假说见于 1905 年, 由 K. Mereschkowsky 提出; 而线粒体的类似起源假说见于 1918 和 1922 年, 分别由 P. Porteir 和 I. E. Wallin 提出。随着人们对真核细胞超微结构、线粒体和叶绿体 DNA 及其编码机制的认识, 内共生起源学说的内涵得到了

表 6-1 不同真核生物线粒体基因组 (DNA) 大小及其表达产物

	动物	酵母	真菌 (脉孢菌属)	植物
线粒体 DNA/kb	14~18	78	119~108	200~2 500
表达产物				
复合物 I (NADH-CoQ 还原酶)				
亚基数	7	0	6	6
复合物 III (CoQ-Cyt c 还原酶)				
Cyt b	+	+	+	+
复合物 IV (细胞色素氧化酶)				
亚基 1、2、3	+	+	+	+
ATP 合酶的 $F_0$ 部分				
亚基 6	+	+	+	+
亚基 8	+	+	+	+
亚基 9		+	-	+
ATP 合酶的 $F_1$ 部分				
$\alpha$ 亚基				+
rRNAs				
大亚基	16S	21S	21S	26S
小亚基	12S	15S	15S	18S
5S RNA				+
tRNAs	22	23~25	23~25	30

进一步充实。

1970年, Margulis 在已有的资料基础上提出了一种更为细致的设想。该设想认为, 真核细胞的祖先是一种体积较大、不需氧具有吞噬能力的细胞, 通过糖酵解获取能量。而线粒体的祖先则是一种革兰氏阴性菌, 具备三羧酸循环所需的酶和电子传递链系统, 可利用氧气把糖酵解的产物丙酮酸进一步分解, 获得比酵解更多的能量。当这种细菌被原始真核细胞吞噬后, 即与宿主细胞间形成互利的共生关系: 原始真核细胞利用这种细菌获得更充分的能量; 而这种细菌则从宿主细胞获得更适宜的生存环境。与此类似, 叶绿体的祖先可能是原核生物蓝细菌 (cyanobacteria)。当这种蓝细菌被原始真核细胞摄入后, 为宿主细胞进行光合作用; 而宿主细胞则为其提供其他的生存条件。

线粒体和叶绿体的内共生学说先后得到了大量的生物学研究证据的支持。特别是近期的分子生物学和生物信息学的研究发现真核细胞的细胞核中存在大量原本可能属于呼吸细菌或蓝细菌的遗传信息, 说明最初的呼吸细菌和蓝细菌的大部分基因组在漫长的共进化过程中发生了向细胞核的转移。这种转移极大地削弱了线粒体和叶绿体的自主性, 建立起稳定、协调的核质互作关系。

除遗传信息转移之外, 线粒体和叶绿体内共生起源学说还得到如下主要论据的支持。

### (一) 基因组与细菌基因组具有明显的相似性

线粒体和叶绿体具有细菌基因组的典型特征。它们均为单条环状双链 DNA 分子, 不含 5-甲基胞嘧啶, 无组蛋白结合并能进行独立的复制和转录。此外, 在碱基比例、核苷酸序列和基因结构特征等方面, 线粒体和叶绿体基因组也与细胞核基因组表现出显著差异, 而与原核生物极为相似。同时, 线粒体和叶绿体具有自身的 DNA 聚合酶及 RNA 聚合酶, 能独立复制和转录自己的 RNA。其 mRNA、rRNA 的沉降系数与细菌的类似。

### (二) 具备独立、完整的蛋白质合成系统

线粒体和叶绿体的蛋白质合成机制类似于细菌, 而有别于真核生物: ① 与细菌一样, 线粒体和叶绿体中的蛋白质合成从 *N*-甲酰甲硫氨酸开始, 而真核细胞中的蛋白质合成从甲硫氨酸开始。② 线粒体和叶绿体在核糖体较小于真核生物的 80 S 核糖体。例如, 动物细

胞线粒体的核糖体为 50~60 S, 真菌线粒体的核糖体为 70~74 S, 而叶绿体的核糖体为 70 S。③ 线粒体、叶绿体和原核生物的核糖体中只有 5 S rRNA, 而不少真核细胞的核糖体中存在 5.8 S rRNA。④ 线粒体中的蛋白质合成因子具有原核生物核糖体的识别特异性, 其功能可部分地被细菌的蛋白质合成因子取代, 但线粒体的蛋白质合成因子不能识别细胞质核糖体。⑤ 线粒体核糖体与线粒体 mRNA 形成多核糖体。⑥ 叶绿体 tRNA 和氨酰-tRNA 合成酶通常可与细菌相应的酶交叉识别, 而不与细胞质中相应的酶形成交叉识别。⑦ 叶绿体的核糖体小亚基可与大肠杆菌的核糖体大亚基组合, 形成有功能的杂合核糖体。⑧ 线粒体和叶绿体核糖体上的蛋白质合成被氯霉素、四环素抑制, 而抑制真核生物核糖体上蛋白质合成的放线酮对它们无抑制作用。⑨ 线粒体 RNA 聚合酶可被原核细胞 RNA 聚合酶的抑制剂 (如利福霉素) 所抑制, 但不被真核细胞 RNA 聚合酶的抑制剂 (如放线菌素 D) 所抑制等。

### (三) 分裂方式与细菌相似

线粒体和叶绿体均以缢裂的方式分裂增殖, 类似于细菌。

### (四) 膜的特性

线粒体、叶绿体的内膜和外膜存在明显的性质和成分差异。外膜与真核细胞的内膜系统具有性质上的相似性, 可与内质网和高尔基体膜融合沟通; 而它们的内膜则与细菌质膜相似, 内陷折叠形成细菌的间体、线粒体的嵴和叶绿体的类囊体。在膜的化学成分上, 线粒体和叶绿体内膜的蛋白质/脂质比远大于外膜, 接近于细菌质膜的成分。这些特性都暗示线粒体和叶绿体的内膜起源于其最初的共生体 (呼吸细菌和蓝细菌) 的质膜, 而外膜则来源于它们的宿主 (共生体进入宿主细胞时被形成)。

### (五) 其他佐证

线粒体的磷脂成分、呼吸类型和 Cyt c 的初级结构均与反硝化副球菌或紫色非硫光合细菌非常接近, 暗示线粒体的祖先可能是这两种菌中的一种。

自然界中存在的胞内共生蓝藻 (蓝小体) 表现出了基因片段转移等内共生形成叶绿体的行为特征, 为真核生物形成的内共生说提供了“活化石”性的佐证。

近年来, 真核细胞线粒体和叶绿体的内共生起源学

说得到了越来越多的研究证据的支持,使得非内共生起源学说(non-endosymbiosis theory)逐渐淡出了人们的视野。作为另一种假说,非内共生起源学说由 T. Uzzell 等于 1974 年提出,认为真核细胞的前身可能是一种体

积较大的好氧细菌。其细胞膜通过内陷、扩张和分化逐渐发展成了线粒体、叶绿体和其他细胞器,继而细胞演化为真核细胞。

## ● 思考题 ●

1. 怎样理解线粒体和叶绿体是细胞能量转换的细胞器?
2. 线粒体和叶绿体在细胞内呈现怎样的动态特征?
3. 试比较线粒体与叶绿体在基本结构方面的异同。
4. 为什么说三羧酸循环是真核细胞能量代谢的中心?
5. 电子传递链与氧化磷酸化之间有何关系?
6. 试比较线粒体的氧化磷酸化与叶绿体的光合磷酸化的异同点。
7. 光系统中捕光复合物和反应中心复合物的结构与功能的关系如何?
8. 氧化磷酸化偶联机制的化学渗透假说的主要论点是什么?
9. 试比较光合碳同化3条途径的主要异同点。
10. 为什么说线粒体和叶绿体是半自主性细胞器?
11. 线粒体与叶绿体的内共生起源学说有哪些证据?

## ● 参考文献 ●

1. Arimura S, Yamamoto J, Aida G P, Nakazono M, Tsutsumi N. Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 7 805-7 808.
2. Berry E A, Guergova-Kuras M, Huang L S, Crofts A R. Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 1 005-1 075.
3. Boyer P D. What makes ATP synthase spin? *Nature*, 1999, 402: 247-249.
4. Elston T, Wang H, Oster G. Energy transduction in ATP synthase. *Nature*, 1998, 391: 510-513.
5. Glynn J M, Froehlich J E, Osteryoung K W. Arabidopsis ARC6 coordinates the division machineries of the inner and outer chloroplast membranes through interaction with PDV2 in the intermembrane space. *Plant Cell*, 2008, 20: 2 460-2 470.
6. Lackner L L, Nunnari J M. The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1 792: 1 138-1 144.
7. Liu Z, Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gui L, An X, Chang W. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 resolution. *Nature*, 2004, 428: 287-292.
8. Oikawa K, Kasahara M, Kiyosue T, Kagawa T, Suetsugu N, Takahashi F, Kanegae T, Niwa Y, Kadota A, Wada M. CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1 is essential for proper chloroplast positioning. *Plant Cell*, 2003, 15: 2 805-2 815.
9. Praefcke G J K, McMahon H T. The dynamin superfamily: universal membrane tabulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5: 133-147.
10. Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, Rao Z. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 2005, 121: 1 043-1 057.
11. Westermann B. Mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1641: 195-202.
12. Yu Q B, Jiang Y, Kang Chong K, Yang Z N. AtECB2, a pentatricopeptide repeat protein, is required for chloroplast transcript *accD* RNA editing and early chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2009, 59: 1 011-1 023.

## ● 图片版权说明 ●

**Figure 6-2** is reprinted from *Cell*, Vol. 90. Karen G. Hales and Margaret T. Fuller. Developmentally Regulated Mitochondrial Fusion Mediated by a Conserved, Novel, Predicted GTPase. 121–129. ©1997, with permission from Elsevier; **Figure 6-3** is reprinted with permission from ©The Rockefeller University Press, 2003, originally published in *The Journal of Cell Biology*, 160: 189-200; **Figure 6-4** is reprinted from *Molecular Cell*, Vol. 4. Arnaud M. Labrousse, Mauro D. Zappaterra, Daniel A. Rube, and Alexander M. van der Blik. *C. elegans* Dynamin-Related Protein DRP-1 Controls Severing of the Mitochondrial Outer Membrane. 815–826. ©1999, with permission from Elsevier; **Figure 6-5** is reprinted with kind permission from Springer Science+Business Media: *Protoplasma*. Mitochondria-dividing ring: ultrastructural basis for the mechanism of mitochondrial division in *Cyanidioschyzon merolae*. Vol. 186, 1995, 12-23. T. Kuroiwa, K. Suzuki, R. Itou, K. Toda t, T. C. O’Keefe, and H. Kuroiwa. Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5C, D. ©Springer-Verlag 1995; **Figure 6-7** is reprinted with permission from © The Rockefeller University Press, 1964, originally published in *The Journal of Cell Biology*. 22: 49-62; **Figure 6-13A** is used with permission of American Society of Plant Biologists. Mobilization of Rubisco and Stroma-Localized Fluorescent Proteins of Chloroplasts to the Vacuole by an ATG Gene-Dependent Autophagic Process. Hiroyuki Ishida, Kohki Yoshimoto, Masanori Izumi, Daniel Reisen, Yuichi Yano, Amane Makino, Yoshinori Ohsumi, Maureen R. Hanson, and Tadahiko Mae. Vol. 148. ©2008, permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.; **Figure 6-14 (WAT-9)** is used with permission of American Society of Plant Biologists. Pigment Deficiency in Nightshade/Tobacco Cybrids is Caused by the Failure to Edit the Plastid ATPase  $\alpha$ -Subunit mRNA. Christian Schmitz-Linneweber, Sergei Kushnir, Elena Babychuk, Peter Poltnigg, Reinhold G. Herrmann, and Rainer M. Maier. Vol. 17. ©2005, permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.; **Figure 6-15** is reprinted with kind permission from Springer Science+Business Media: *Planta*. Orderly formation of the double ring structures for plastid and mitochondrial division in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. Vol. 206, 1998, 551-560. Shin-ya Miyagishima, Ryuichi Itoh, Kyoko Toda, Hidenori Takahashi, Haruko Kuroiwa, Tsuneyoshi Kuroiwa. Fig. 4i,l. ©Springer-Verlag 1998; and with kind permission from Springer Science+Business Media: *Planta*. Isolation of dividing chloroplasts with intact plastid-dividing rings from a synchronous culture of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. Vol. 209, 1999, 371-375. Shin-ya Miyagishima, Ryuichi Itoh, Saburo Aita, Haruko Kuroiwa, and Tsuneyoshi Kuroiwa. Fig. 2f,g. ©Springer-Verlag 1999; **Figure 6-16A** is reprinted with kind permission from Springer Science+Business Media: *Planta*. Chloroplast division machinery as revealed by immunofluorescence and electron microscopy. Vol. 215, 2002, 185–190. Haruko Kuroiwa, Toshiyuki Mori, Manabu Takahara, Shin-ya Miyagishima, and Tsuneyoshi Kuroiwa. Fig. 1B. ©Springer-Verlag 2002; and **Figure 6-24 [atpA(CCC), atpA(CTC)]** is used with permission of American Society of Plant Biologists. Pigment Deficiency in Nightshade/Tobacco Cybrids is Caused by the Failure to Edit the Plastid ATPase  $\alpha$ -Subunit mRNA. Christian Schmitz-Linneweber, Sergei Kushnir, Elena Babychuk, Peter Poltnigg, Reinhold G. Herrmann, and Rainer M. Maier. Vol. 17. ©2005, permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

# 细胞质基质与内膜系统

在光学显微镜下，生活的真核细胞其细胞质内几乎看不到什么结构。直到 20 世纪初，观察染色的组织学切片提示，在细胞质内似乎存在一个膜相网络；电镜技术出现以后，形态学观察和生化证据使人们确认，真核细胞内具有发达的膜相结构，将细胞质区分成不同的隔室。细胞内区室化 (compartmentalization) 是真核细胞结构和功能的基本特征之一。细胞内被膜区分为 3 类结

构：细胞质基质 (cytosol)、内膜系统 (endomembrane system) 和其他由膜所包被的细胞器，诸如线粒体、叶绿体、过氧化物酶体和细胞核 (图 7-1)。细胞内膜系统是指在结构、功能乃至发生上相互关联、由单层膜包被的细胞器或细胞结构。主要包括内质网、高尔基体、溶酶体、胞内体和分泌泡等。

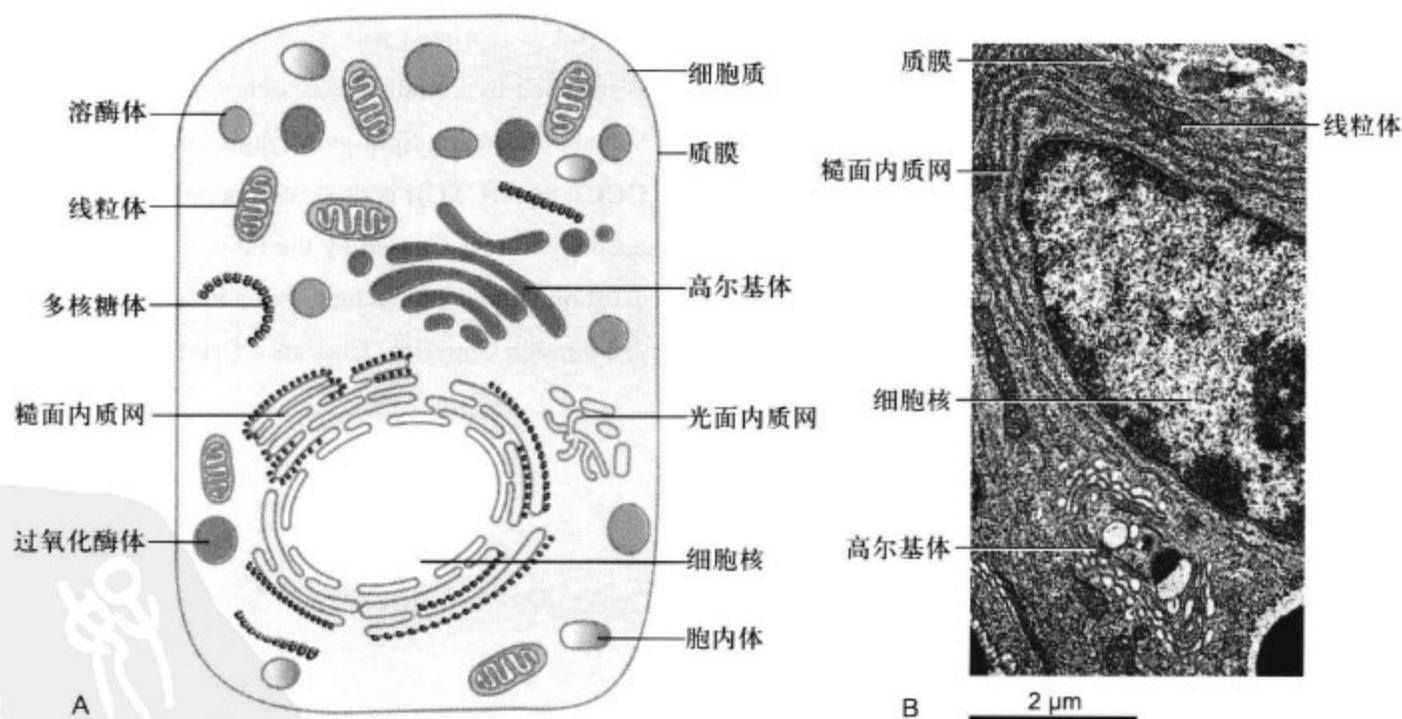


图 7-1 真核细胞内典型区室化特征示意图 (A) 与小鼠回肠 Paneth 细胞超微结构的一部分 (B) (梁凤霞博士惠赠)

## 第一节 细胞质基质及其功能

在真核细胞的细胞质中，除去可分辨的细胞器以外的胶状物质，占据着细胞膜内、细胞核外的细胞内空间，称细胞质基质（cytoplasmic matrix）。细胞质基质的主要成分包括约占总体积 70% 的水和溶于其中的离子以及以可溶性蛋白质为主的大分子，其体积占细胞总体积 50% 以上。

### 一、细胞质基质的含义

细胞与环境，细胞质与细胞核，以及细胞器之间的物质运输、能量交换、信息传递等都要通过细胞质基质来完成，很多重要的中间代谢反应也发生在细胞质基质中。近年来发现细胞质基质还担负着多种其他的重要功能。然而对细胞质基质的认识与细胞核和其他细胞器相比还是相当肤浅，在研究细胞质基质过程中，曾赋予它诸如细胞液（cell sap）、透明质（hyaloplasm）、胞质溶胶（cytosol）等多个名称，其含义也不断地更新与完善，这既反映了从不同的侧面与层次对细胞质基质的了解，也反映了对细胞质基质认识的不断深入。越来越多的证据表明，细胞质基质很可能是一种高度有序的体系。用差速离心的方法分离细胞匀浆物中的各种细胞组分，先后除去细胞核、线粒体、溶酶体、高尔基体和细胞质膜等细胞器或细胞结构后，存留在上清液中的主要是细胞质基质的成分。生物化学家多称之为胞质溶胶。在细胞质基质中蛋白质质量浓度约 200 mg/ml，体积分数为 20%~30%。细胞质基质是种黏稠的胶体，多数的水分子是以水化物的形式紧密地结合在蛋白质和其他大分子表面的极性部位，只有部分水分子以游离态存在，起溶剂作用。细胞质基质中蛋白质分子和颗粒性物质的扩散速率仅为水溶液中的 1/5，更大的结构如分泌泡和细胞器等则固定在细胞质基质的某些部位上，或沿细胞骨架定向运动。细胞质基质是蛋白质与脂肪合成的重要场所。在细胞质基质中合成的蛋白质，半数以上将分门别类地转移到细胞核和细胞器中。在细胞质基质中，各种代谢活动高效有序地进行，各种代谢途径之间协调有序，完成物质、能量与信息的定向转

移和传递，这些复杂的生命过程都不是简单的“酶溶液”所能完成的。

近些年来人们注意到，在细胞质基质中多数蛋白质，其中包括水溶性蛋白，并不是以溶解状态存在的。Paine 把乳胶小球注射到非洲爪蟾的卵母细胞中，经过一段时间之后，取出乳胶小球，用聚丙烯酰胺双向凝胶电泳技术分析了渗入乳胶小球中的蛋白质成分，并与周围细胞质中的蛋白质成分进行比较。结果发现，在所检测的 90 多种多肽中，80% 多肽未曾扩散到乳胶小球中，而是结合在细胞质基质上。人们推测，细胞质基质作为一种高度有序的体系，关键在于细胞质骨架纤维贯穿其中，起重要的组织作用，多数的蛋白质直接或间接地与骨架结合，或与生物膜结合，其周围又吸附了多种分子，从而不同程度地影响和改变微环境的某些物理性质，这样一种有精细区域化的凝胶结构体系，在不同细胞的不同生理状态下，可能有所不同，以完成多种复杂的生物学功能。用原位杂交技术还显示，mRNA 在细胞中也呈区域性分布，在卵母细胞中不同种的 mRNA 定位于细胞质基质的不同部位，卵细胞在母体发生期间，由蛋白质和 RNA 在细胞质基质中的特定分布而形成的位置信息，往往对子代个体胚胎发育早期的细胞分化起着重要的作用。用免疫荧光技术显示与糖酵解过程有关的一些酶结合在微丝上，在骨骼肌细胞中则结合在肌原纤维的某些特殊位点上。这种特异性的结合不仅与细胞的生理状态有关，而且也与组织发育和细胞分化的程度有关。酶与微丝结合后，酶的动力学参数也发生了明显的变化。如与糖酵解有关的酶类，彼此之间可能以弱键结合在一起形成多酶复合体，定位在细胞质基质的特定部位，催化从葡萄糖至丙酮酸的一系列反应。前一个反应的产物即为下一个反应的底物，二者间的空间距离仅为几个纳米，各个反应途径之间也以类似的方式相互关联，从而有效地完成复杂的代谢过程。这种结构体系的维持只能在高浓度的蛋白质及其特定的离子环境的条件之下实现。一旦细胞破裂，甚至在稀释的溶液中，这种靠分子之间脆弱的相互作用而形成的结构体系就会遭到破坏。这也正是研究细胞质基质比研究其他细胞器困难的主要原因。

也有学者主张细胞质骨架作为相对独立的主要结构体系不应纳入细胞质基质范畴。然而离开了细胞质骨架的支持与组织，细胞质基质便无法维系这种复杂的高度有序的结构，也就无法完成各种生物学功能。从细胞骨架的角度来看，骨架的主要成分，特别是微管和微丝的

装配和解聚与周围的液相始终处在一种动态平衡之中，离开这种特定的环境，骨架系统也难以行使其功能。

## 二、细胞质基质的功能

细胞质基质所担负的功能不是孤立而单一的，它的功能体现为多种细胞过程。目前了解最多的是许多中间代谢过程都发生在细胞质基质中，如糖酵解过程、磷酸戊糖途径、糖醛酸途径、糖原的合成与部分分解过程等。尽管人们对这些代谢反应的具体生化步骤早已比较清楚，但对它们在细胞质基质中如何进行的细节，特别是反应的底物和产物如何定向转运的机制还了解得不多。细胞信号转导是调控细胞代谢及细胞增殖、分化、衰老和凋亡的基本途径，但目前对多种信号通路的网络整合及交叉对话 (cross-talking) 却知之甚少。

细胞质基质的首要功能是为某些蛋白质合成和脂肪酸合成提供场所。现已知，细胞内所有蛋白质合成的起始步骤都发生在细胞质基质的游离核糖体上，具有特殊 N 端信号序列的分泌蛋白合成起始后多核糖体很快转移到内质网膜上，边合成边转移到内质网腔，然后再以膜泡运输的方式由内质网转运至高尔基体并进一步完成蛋白质分选。其他蛋白质的合成均在细胞质基质中游离核糖体上完成，并根据蛋白质自身所携带的信号，分别转运到线粒体、叶绿体、微体以及细胞核中，也有些蛋白质驻留在细胞质基质中，构成本身的结构成分。

细胞质基质第二方面的功能是与细胞质骨架相关的。细胞质骨架作为细胞质基质的主要结构成分，不仅与维持细胞的形态、细胞的运动、细胞内的物质运输及能量传递有关 (见第十章细胞骨架)，而且也是细胞质基质结构体系的组织者，为细胞质基质中其他成分和细胞器提供锚定位点。有人估计一个直径为  $16\ \mu\text{m}$  的细胞，其细胞骨架的表面积可达  $50 \times 10^5 \sim 100 \times 10^5\ \mu\text{m}^2$ ，而相同直径的球形细胞的表面积仅有  $0.8 \times 10^3\ \mu\text{m}^2$ ，这样大的表面积不仅限制了水分子的运动，而且使蛋白质、mRNA 等生物大分子通过与骨架蛋白分子间的选择性结合，锚定在特定的位点，从而在细胞质基质中形成更为精细的三维特定区域，使复杂的代谢反应高效而有序地进行。

细胞质基质第三方面的功能是与细胞膜相关的，一是细胞内的各种膜相细胞器使细胞质基质产生区室化，从而通过生物膜结构将蛋白质等生物大分子限定在膜的二维平面上，促进反应高效而有序地进行；二是依

靠细胞膜或细胞器膜上的泵蛋白和离子通道维持细胞内外跨膜的离子梯度，如产生钙波 (calcium waves) 和产生并改变跨膜电位；依靠细胞膜某些协同转运蛋白 (cotransporter) 调节细胞质基质的 pH 稳态，而环境的稳态又是行使正常生理生化功能的前提条件。细胞内葡萄糖无氧代谢产生乳酸，有氧代谢产生  $\text{CO}_2$ ，溶于水形成  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ，这些弱酸解离产生  $\text{H}^+$ ，如果这些“额外”质子不能从细胞内被有效转移，则细胞质基质内 pH 会急剧下降而危及细胞功能。动物细胞有 2 类协同转运蛋白通过反向共转运清除多余的质子。一个是  $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  反向运载体 (antiporter)，负责从胞外输入一个  $\text{Na}^+$  (和一个  $\text{HCO}_3^-$ )，交换一个  $\text{Cl}^-$  从细胞输出。细胞质基质内碳酸酐酶催化  $\text{HCO}_3^-$  解离形成  $\text{CO}_2$  和一个  $\text{OH}^-$  离子，前者扩散出细胞，后者与基质内质子结合形成水，所以该转运体的功能就是消耗细胞质基质内“额外”的  $\text{H}^+$ ，致使 pH 升高。另一个致使细胞质基质 pH 升高的反向运载体是  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  转运体，这是  $\text{Na}^+$  浓度梯度驱动的反向共运转。在某些环境下，细胞质基质的 pH 可能升高超过正常值 (7.2~7.5)，应对这种  $\text{OH}^-$  额外增加导致 pH 升高，许多动物细胞利用一种阴离子反向运载体 (anion antiporter) 实现  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{Cl}^-$  一对一地跨膜反向交换。当 pH 升高时，这种  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  运载体输出  $\text{HCO}_3^-$  (可视为  $\text{OH}^-$  和  $\text{CO}_2$  复合物)，以交换  $\text{Cl}^-$  的输入，从而降低 pH，这种阴离子交换是顺  $\text{Cl}^-$  浓度梯度提供动力的。上述反向转运膜蛋白的活性依赖于基质 pH 变化，从而调控细胞质基质的 pH 稳态，生长的细胞其基质 pH 维持在 7.4 附近。

细胞质基质第四方面功能，是与蛋白质的修饰和选择性降解等方面有关：

### (一) 蛋白质的修饰

已发现有 100 余种蛋白质的侧链修饰方式，绝大多数的修饰都是由专一的酶作用于蛋白质侧链特定位点上。侧链修饰对细胞的生命活动十分重要，但很多修饰的生物学意义至今尚不清楚。在细胞质基质中发生蛋白质修饰的类型主要有：

(1) 辅酶或辅基与酶的共价结合 在无数酶促氧化-还原反应中，细胞内的辅酶将能量以氢原子的形式在酶之间传递。

(2) 磷酸化与去磷酸化 用以调节细胞内多种蛋白质的生物活性，进而快速影响细胞代谢。被磷酸化的蛋白质氨基酸残基包括酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸、组氨酸

和赖氨酸也能被磷酸化。蛋白质磷酸化与去磷酸化还影响细胞信号调控级联反应和基因转录活性。已知人类基因组中有大约 2 000 个基因编码与蛋白质磷酸化有关的蛋白质激酶和 1 000 个基因编码与蛋白质去磷酸化有关的蛋白质磷酸水解酶。

(3) 蛋白质糖基化作用 糖基化主要发生在内质网和高尔基体中,在细胞质基质中发生的糖基化在哺乳动物的细胞中主要是把 *N*-乙酰葡萄糖胺 (*N*-acetylglucosamine) 加到蛋白质的丝氨酸残基的羟基上。

(4) 甲基化修饰 很多细胞骨架蛋白其 *N* 端发生甲基化修饰,以防止被细胞内的蛋白质水解酶降解,从而使蛋白质在细胞中维持较长的寿命。组蛋白甲基化修饰在细胞内由特异性的甲基转移酶催化完成,主要包括精氨酸甲基化和赖氨酸甲基化两种情况,组蛋白甲基化修饰既可抑制也可增强基因表达,是表观遗传学的重要研究领域之一,越来越多的证据表明组蛋白甲基化功能异常与肿瘤的发生发展密切相关。

(5) 酰基化 最常见的一类酰基化的修饰是内质网上合成的跨膜蛋白在通过内质网和高尔基体的转运过程中发生的,由不同的酶催化软脂酸链共价连接到某些跨膜蛋白暴露在细胞质基质侧的结构域上。另一类酰基化修饰发生在诸如 *src* 基因和 *ras* 基因这类癌基因的表达产物上,催化这一反应的酶可识别蛋白质中的信号序列,将脂肪酸链共价地结合到蛋白质特定的位点上。如 *src* 基因编码的酪氨酸蛋白激酶,与豆蔻酸共价结合后,靠豆蔻酸链结合到细胞质膜上,这一修饰是 *src* 基因导致细胞转化所必需的。

## (二) 控制蛋白质的寿命

细胞中的蛋白质处于不断降解与更新的动态过程中。细胞质基质中的蛋白质,大部分寿命较长,其生物活性可维持几天甚至数月。但也有一些寿命很短,合成后几分钟就降解了,其中包括在某些代谢途径中催化限速反应步骤的酶和 *fos* 等癌基因的产物。只要改变它们的合成速度,就可以控制其浓度,从而发挥调节代谢途径或细胞生长与分裂的作用。

在蛋白质分子的氨基酸序列中,既含有决定蛋白质定位和功能的靶向信号和修饰信号,还含有决定蛋白质寿命的信号。这种信号存在于蛋白质 *N* 端的第一个氨基酸残基,若 *N* 端的第一个氨基酸是 Met (甲硫氨酸)、Ser (丝氨酸)、Thr (苏氨酸)、Ala (丙氨酸)、Val (缬氨酸)、Cys (半胱氨酸)、Gly (甘氨酸) 或 Pro (脯

氨酸),则蛋白质往往是稳定的;如是其他氨基酸,则往往是不稳定的。在真核细胞每种蛋白质起始合成时,*N* 端的第一个氨基酸都是甲硫氨酸(细菌中为甲酰甲硫氨酸),但合成后不久便被特异的氨基肽酶水解除去,然后由氨酰-tRNA 蛋白转移酶(aminoacyl-tRNA-protein transferase)把一个信号氨基酸加到某些蛋白质的 *N* 端,最终在蛋白质的 *N* 端留下一个稳定或不稳定的氨基酸残基。

在真核细胞的细胞质基质中,有一种识别并降解错误折叠或不稳定蛋白质的机制,即泛素化和蛋白酶体所介导的蛋白质降解途径(ubiquitin-and proteasome-mediated pathway),有人将这种蛋白质降解机制戏称是“细胞给予需要损毁的蛋白质一个化学的死亡之吻(kiss of death)”,Aaron Ciechanover 等 3 位科学家因此发现而获得 2004 年诺贝尔化学奖。泛素化和蛋白酶体所介导的蛋白质降解途径具有多种生物学功能:包括蛋白质质量监控、影响细胞代谢、信号转导和受体调整(receptor modulation)、免疫反应、细胞周期、转录调节和 DNA 修复等。

蛋白酶体(proteasome)是细胞内降解蛋白质的大分子复合体,由约 50 种蛋白质亚基组成,相对分子质量为  $2 \times 10^6 \sim 2.4 \times 10^6$ ,富含 ATP 依赖的蛋白酶活性,其功能然若细胞内蛋白质破碎机(protein shredder)。一个典型的哺乳类细胞蛋白酶体约占细胞蛋白质含量的 1%。26 S 蛋白酶体为多亚基复合物,呈中空桶状结构(图 7-2A),中间为 28 种蛋白质亚基组成的 20 S 催化核心;两端各结合一个由 16~18 种蛋白质亚基组成 19S 帽,起调节和识别作用,其中 6 种亚基具有 ATPase 活性,负责为蛋白质降解活动提供能量。泛素是由 76 个氨基酸残基组成的  $8.5 \times 10^3$  的小分子球蛋白,具热稳定性,普遍存在于真核细胞中,人和酵母细胞的泛素分子共享序列高达 96%,由于广泛存在且序列高度保守,故名泛素。泛素具有多种生物学功能。在蛋白质降解过程中,多个泛素分子共价结合到含有不稳定氨基酸残基的蛋白质的 *N* 端,然后带有泛素化标签的蛋白质被蛋白酶体识别并降解,通过该途径降解的蛋白质大体包括两类:一是错误折叠或异常的蛋白;二是需要进行存量调控和不稳定的蛋白质。蛋白质的泛素化需要多酶复合体发挥作用,即通过 3 种酶的先后催化来完成,包括泛素活化酶(E1)、泛素结合酶(E2,又称泛素载体蛋白)和泛素连接酶(E3)。泛素化过程涉及如下步骤(图 7-2B):① 泛素活化酶(E1)通过形成酰基-腺

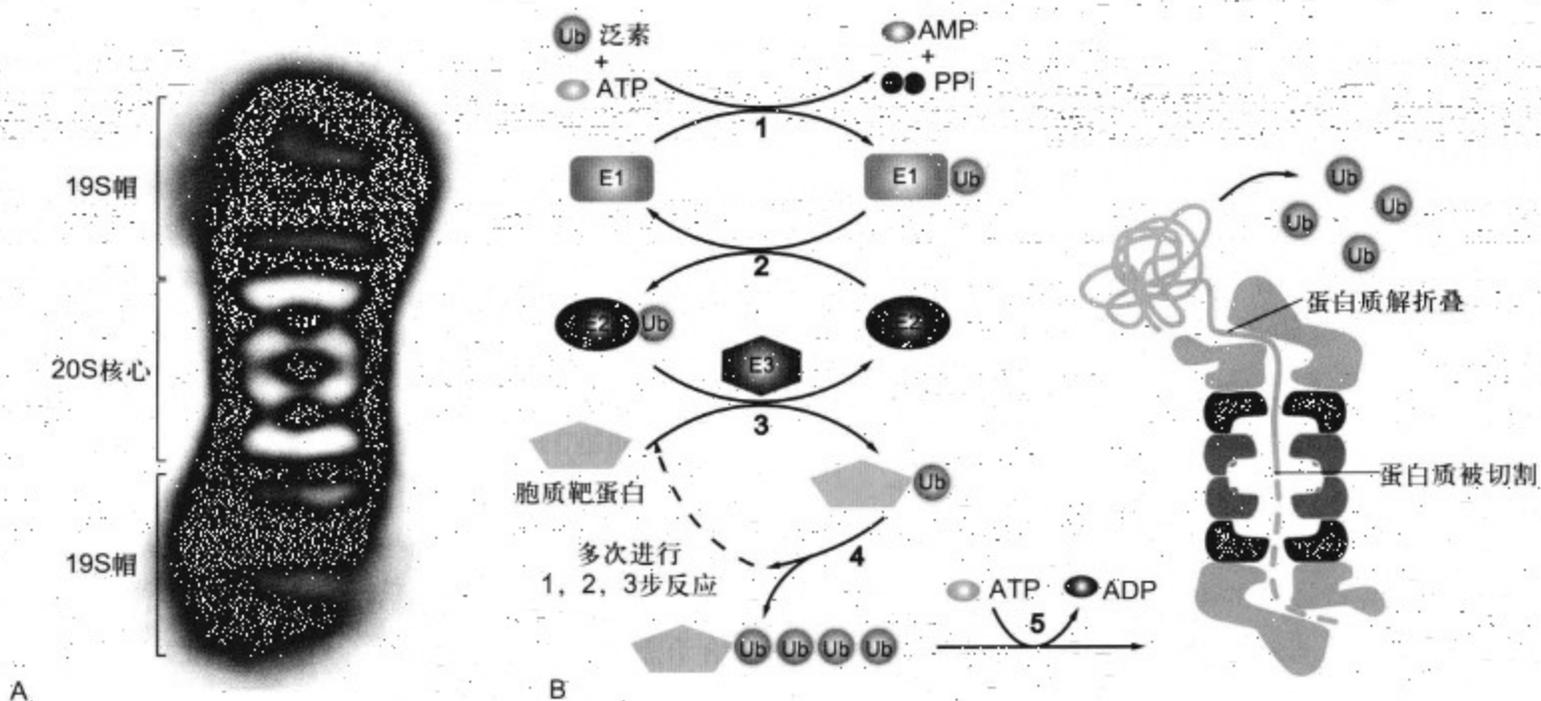


图 7-2 由泛素和蛋白酶体所介导的蛋白质降解途径示意图

A. 经负染色的蛋白酶体结构电镜照片。B. 靶蛋白泛素化及其降解示意图：1. E1 活化泛素分子；2. 泛素分子转移至 E2；3. E3 催化形成异肽键；4. 靶蛋白被泛素化；5. 蛋白酶体识别泛素化靶蛋白、ATP 水解驱动泛素移除、靶蛋白解折叠转入蛋白酶体核心内被降解。（A 图由孔祥鹏博士惠赠）

苷酸中介物使泛素分子 C 端被激活，该反应需要 ATP；② 转移活化的泛素分子与泛素结合酶（E2）的半胱氨酸残基结合；③ 异肽键（isopeptide bond）形成，即与 E2 结合的泛素羧基和靶蛋白赖氨酸侧链的氨基之间形成异肽键，该反应由泛素连接酶（E3）催化完成。重复上述步骤，形成具有寡聚泛素链的泛素化靶蛋白。泛素化标签被蛋白酶体帽识别，并利用 ATP 水解提供的能量驱动泛素分子的切除和靶蛋白解折叠，去折叠的蛋白质转移至蛋白酶体核心腔内被降解。靶蛋白不同位点赖氨酸残基的泛素化修饰产生不同的生理效应，靶蛋白 Lys48 残基修饰的泛素化靶蛋白导致被蛋白酶体降解，靶蛋白 Lys63 位点的泛素化修饰可能导致蛋白质活性的改变（活化或失活）。

### （三）降解变性和错误折叠的蛋白质

细胞质基质中的变性蛋白质、错误折叠的蛋白质、含有被氧化或其他非正常修饰氨基酸的蛋白质，不管其 N 端氨基酸残基是否稳定，也常常很快被降解清除。推测这种蛋白质降解作用，可能涉及对畸形蛋白质所暴露出来的氨基酸疏水基团的识别，并由此启动对蛋白质 N 端第一个氨基酸残基的作用，结果形成了 N 端不稳定信号，同样被依赖于泛素的蛋白酶体降解途径彻底降解。在细胞质基质中，正在合成的蛋白质的构象与错误折叠

的蛋白质有很多类似之处。实验表明，加入蛋白质合成抑制剂后，停留在不同阶段、大小不等的多肽链会很快被降解，说明细胞在正常状态下蛋白质合成的复合物对延伸中的肽链具有暂时的保护作用。

### （四）帮助变性或错误折叠的蛋白质重新折叠，形成正确的分子构象

这一功能主要靠热休克蛋白（heat shock protein, HSP）来完成。热休克蛋白是一类进化上高度保守的蛋白质家族，在人类、果蝇和植物中发现的 HSPs 都有相似的序列和功能，特别值得注意的是它们作为分子伴侣（molecular chaperone）而发挥多种作用，协助细胞内蛋白质合成、分选、折叠与装配等。其中大多数是组成型表达和执行多种基本功能，有些是细胞在胁迫条件下高水平表达，以便在维持细胞稳态中发挥核心作用。根据相对分子质量大小、结构和功能，热休克蛋白被区分为几个家族：HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和新近发现的相对分子质量在  $1.5 \times 10^4 \sim 4.0 \times 10^4$  的小分子 sHSP。每一家族中都有由不同基因编码的数种蛋白质成员。有的基因在正常条件下表达，有些则在温度增高或其他胁迫条件下大量表达，以保护细胞，减少异常环境的损伤。有证据表明，在正常细胞中，热休克蛋白选择性地与畸形蛋白质结合形成聚合物，利用水解 ATP 释

放的能量使聚集的蛋白质溶解,并进一步折叠成正确构象的蛋白质。

## 第二节 细胞内膜系统及其功能

细胞内区室化是真核细胞结构和功能的基本特征之一,由于细胞内大量膜相结构的存在,从而大大提高了细胞生理生化反应的效率。细胞内膜系统包括内质网、高尔基体、溶酶体、胞内体和分泌泡等,这些细胞器在结构、功能乃至发生上是彼此相互关联的动态整体,因此称之为内膜系统。各区室之间通过生物合成、蛋白质修饰与分选、膜泡运输和各种质量监控机制维系其系统的动态平衡。根据对肝细胞和胰腺外分泌细胞的分析,二者在细胞大小和功能上有所不同,肝细胞体积平均约  $5\,000\ \mu\text{m}^3$ ,而胰腺外分泌细胞为  $1\,000\ \mu\text{m}^3$ ,总细胞膜面积(包括细胞器膜)大约分别为  $110\,000\ \mu\text{m}^2$  和  $13\,000\ \mu\text{m}^2$ 。二者质膜和各种细胞器的膜所占百分比也不尽相同。

研究内膜系统的有效技术主要包括:揭示超微结构的电镜技术、用于功能定位研究的放射自显影技术、GFP 标记荧光显微技术、用于组分分离与功能分析的差速离心技术和用于研究膜泡运输和遗传基础的突变体分析技术等。这些技术对于阐明内膜系统的结构与功能,各组分的相互关系和动态特征发挥了重要作用。

### 一、内质网

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是真核细胞中最普遍、最多变、适应性最强的细胞器。内质网由封闭的管状或扁平囊状膜系统及其包被的腔形成互相沟通的三维网络结构。内质网通常占细胞膜系统的一半左右,体积占细胞总体积的10%以上。在不同类型的细胞中,内质网的数量、类型与形态差异很大,同一细胞在不同发育阶段和不同的生理状态下,内质网的结构与功能也随之显著变化。在细胞周期不同阶段,内质网也发生很大变化。细胞分裂时,内质网要经历解体与重建的过程。

内质网是细胞内除核酸以外一系列重要的生物大分子,如蛋白质、脂质和糖类的合成基地。由于内质网的存在,使细胞内膜的表面积大为增加,为多种酶

特别是多酶体系提供了大面积的结合位点。同时内质网作为完整封闭体系,将内质网合成的物质与细胞质基质中合成的物质分隔开来,这更有利于它们的加工和运输。原核细胞内没有内质网,由细胞膜代行其某些类似的职能。

内质网的发现要比线粒体和高尔基体等细胞器晚得多。1945年,K. R. Porter 等人在组织培养细胞中初次观察到细胞质的内质部分有网状结构,建议称为内质网。随着超薄切片和固定技术的改进,Palade 和 Porter 等人于1954年证实内质网是由膜围绕的囊泡所组成。虽然以后发现的内质网不仅仅存在于细胞的内质部位,但仍习惯沿用此名称。

生物化学家曾从细胞质中分离出大量称为微粒体(microsome)的结构,实际上这是在细胞匀浆和超速离心过程中,由破碎的内质网形成的近似球形的囊泡结构,它包含内质网膜与核糖体两种基本组分。虽然这是形态上的人工产物,但在体外实验中,微粒体仍具有蛋白质合成、蛋白质的糖基化和脂质合成等内质网的基本功能。因此在生化与功能研究中,常常把微粒体和内质网等同看待。

### (一) 内质网的两种基本类型

根据结构与功能,内质网可分为两种基本类型:糙面内质网(rough endoplasmic reticulum, rER)和光面内质网(smooth endoplasmic reticulum, sER)。

糙面内质网多呈扁囊状,排列较为整齐,因其膜表面附有大量的核糖体而命名(图7-3A)。它是内质网与核糖体共同形成的复合机能结构,其主要功能是合成分泌性蛋白和多种膜蛋白。因此在分泌细胞(如胰腺腺泡细胞)和分泌抗体的浆细胞中,糙面内质网非常发达,而在一些未分化的细胞与肿瘤细胞中则较为稀少。内质网膜上有一种称为移位子(translocon)的蛋白质复合体,直径约8.5 nm,中心有一个直径为2 nm的“通道”,其功能与新合成的多肽转移有关。

表面没有附着核糖体的内质网称光面内质网,光面内质网常为分支管状,形成较为复杂的立体结构。光面内质网是脂质合成的重要场所,细胞中几乎不含有纯的光面内质网,它们只是作为内质网这一连续结构的一部分。光面内质网所占的区域通常较小,往往作为出芽的位点,将内质网上合成的蛋白质或脂质转移到高尔基体内。在某些细胞中,光面内质网非常发达并具有特殊的功能,如合成固醇类激素的细胞(图7-3B)及肝细胞等。

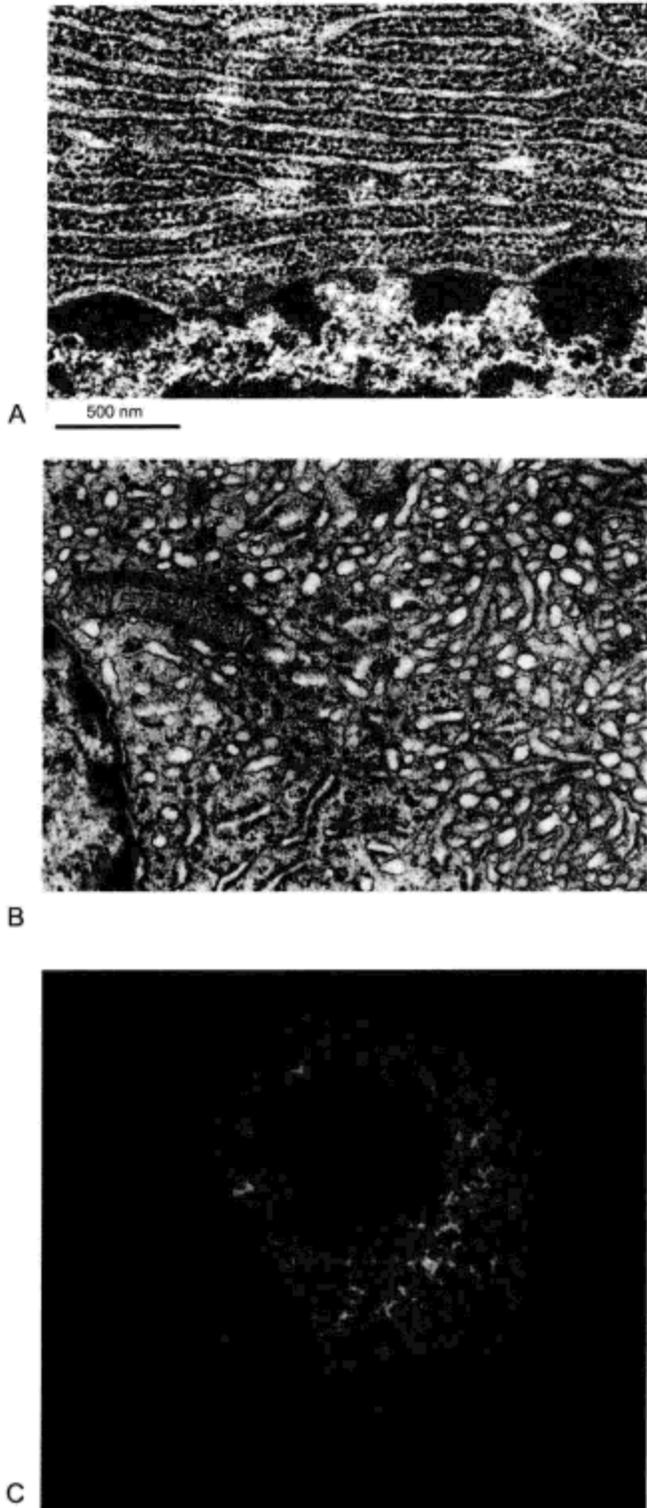


图 7-3 糙面内质网与光面内质网结构

A. 胰腺外分泌细胞中发达的糙面内质网，内质网膜及外核膜上均附有核糖体。B. 黄体细胞有丰富的光面内质网。C. Cos-7 细胞经双重荧光染色显示的内质网的分布：抗 Calreticulin 绿色荧光染色和抗 climp-63 红色荧光染色，绿色显示两种形式的内质网，叠加色（黄）显示糙面内质网区。（A 图由梁凤霞博士惠赠；B 图由黄百梁和曾宪录博士惠赠；C 图由 Yoko Shibata 博士惠赠）

用密度梯度离心技术可将肝细胞中的光面内质网和糙面内质网分离开来，发现糙面内质网上有 20 余种与光面内质网上不同的蛋白质。既然内质网是一个连续的整体结构，因此，在内质网膜上可能存在某些特殊的装置，将光面内质网与糙面内质网隔离开来，并维持其形

态。否则在内质网膜这个二维的流体结构中，不同区域的脂质和蛋白质就会因侧向扩散而趋于平衡。

内质网与其他细胞器关系的研究，不仅有利于阐明细胞的某些生理生化过程，而且对探讨细胞器的发生与进化很有意义。超微结构研究表明，向内折叠的细胞质膜有时与内质网相连接，甚至有管道相通。原核细胞的细胞膜内侧有时附着大量核糖体，因而一些人认为在细胞进化过程中，内质网可能由细胞膜演化而来。内质网膜常与外层核膜连接，内质网的腔与核周隙相沟通，而且外核膜有时也附着大量的核糖体，这种结构上的联系不仅反映了核-质间的物质交换，同时也提示内质网与核膜在发生上有同源关系。

光面内质网与高尔基体在结构、功能与发生上的关系更为密切。此外，在合成代谢旺盛的细胞内，糙面内质网总是与线粒体紧密相依，这固然与线粒体为内质网执行功能提供所需能量直接相关，最近还发现这种分布上的联系与脂质的转移以及  $\text{Ca}^{2+}$  释放的调节也密切相关。在间期细胞中，内质网的分布常常与微管的走向一致，且总是沿微管向细胞周缘延伸。已发现与微管运输相关的马达蛋白——驱动蛋白（kinesin）与内质网结合，有可能内质网一端固定在核膜上，另一端在驱动蛋白的牵引下沿微管向外延伸形成复杂的网状结构。

内质网对外界因素（如射线、化学毒物、病毒等）的作用非常敏感，糙面内质网发生的最普遍的病理变化是内质网腔扩大并形成空泡，继而核糖体从内质网膜上脱落，蛋白质合成受阻。

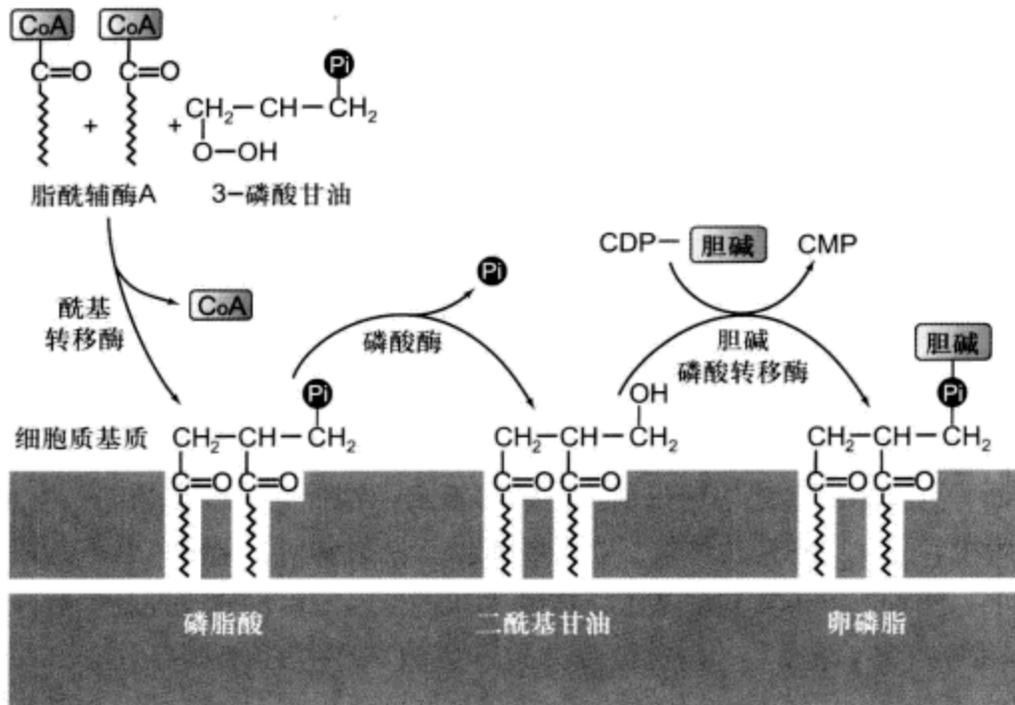
## （二）内质网的功能

内质网是细胞内蛋白质与脂质合成的基地，几乎全部的脂质和多种重要的蛋白质都是在内质网上合成的。目前对内质网的功能尚不完全了解，就已积累的资料可以看出，内质网是行使多种重要功能的复杂的结构体系。

### 1. 蛋白质的合成是糙面内质网的主要功能

细胞中的蛋白质都是在核糖体上合成的，并都是起始于细胞质基质游离核糖体。有些蛋白质刚起始合成不久便转移至内质网膜上，继续肽链延伸并完成蛋白质合成。在糙面内质网上，多肽链边延伸边穿过内质网膜进入内质网腔中，以这类方式合成的蛋白质主要包括：

（1）向细胞外分泌的蛋白质 向细胞外分泌的蛋白质，包括胰腺细胞分泌的酶、浆细胞分泌的抗体、小肠



ER腔面

图 7-4 卵磷脂在内质网膜上合成过程的示意图

杯细胞分泌的黏蛋白 (mucoprotein)、内分泌腺分泌的多肽类激素和胞外基质成分等。这类蛋白质常以分泌泡的形式通过细胞的胞吐作用输送到细胞外。

(2) 膜的整合蛋白 细胞质膜上的膜蛋白及内质网、高尔基体和溶酶体膜上的膜蛋白，其构象都具有方向性，并且在内质网上合成时就已确定，在后续的转运过程中，其拓扑学特性始终保持不变。

(3) 细胞器中的可溶性驻留蛋白 有些驻留蛋白需要与其他细胞组分严格隔离，如溶酶体与植物液泡中的酸性水解酶类；内质网、高尔基体和胞内体 (endosome) 中可溶性驻留蛋白，以及其他有重要生物活性的蛋白质，在合成后进入内质网腔，然后再进一步包装分选。另外，有些蛋白质在合成后需进行修饰和加工，这是在转运过程中由内质网和高尔基体中一系列酶来完成的。细胞质基质中合成的蛋白质与内质网上合成的蛋白质各具特点，内质网为这些蛋白质准确有效地靶向分选提供了必要的条件。

## 2. 光面内质网是脂质合成的重要场所

内质网合成细胞所需包括磷脂和胆固醇在内的几乎全部膜脂，其中最主要的磷脂是磷脂酰胆碱 (卵磷脂)。合成磷脂所需要的 3 种酶都定位在内质网膜上，其活性部位在膜的细胞质基质侧 (图 7-4)。用于磷脂合成的底物来自细胞质基质，反应的第一步是增大膜面积，第二、三两步确定新合成磷脂的种类。除卵磷脂外，其他几种磷脂，如磷脂酰乙醇氨、磷脂酰丝氨酸以及磷脂酰肌醇等都以类似的方式合成。在内质网膜上合成的磷脂

几分钟后就由细胞质基质侧转向内质网腔面，其转位速度比自然转位速度高达十万倍，这是借助一种磷脂转位蛋白 (phospholipid translocator) 或称转位酶 (flippase) 的帮助来完成的。这种转位蛋白对含胆碱的磷脂要比对含丝氨酸、乙醇胺和肌醇的磷脂转位能力强，因此卵磷脂更容易转位到内质网膜的腔面。

在内质网合成的磷脂向其他膜的转运主要有 3 种可能的机制 (图 7-5)。第一种机制是以出芽的方式通过膜泡转运到高尔基体、溶酶体和细胞质膜上。第二种机制是凭借一种水溶性的小分子结合蛋白，称为磷脂交换蛋白 (phospholipid exchange protein, PEP)，在膜之间转移磷脂。其转运模式首先是 PEP 与磷脂分子结合形成

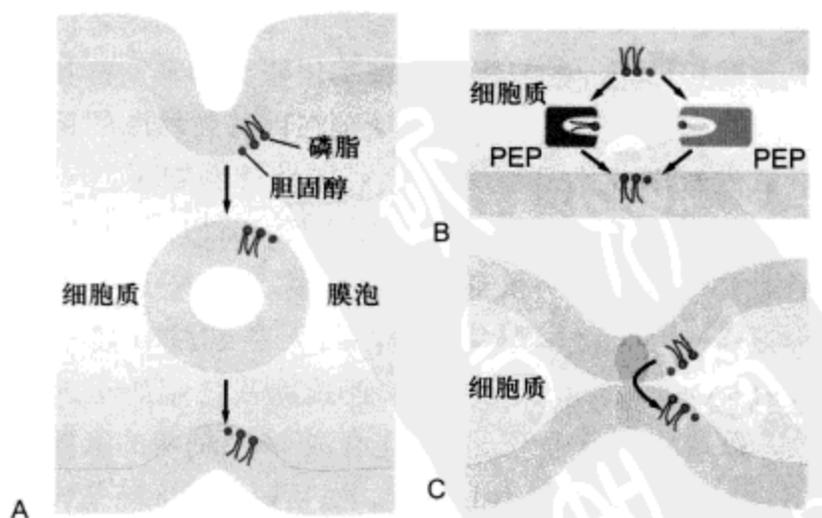


图 7-5 胆固醇与磷脂在供体膜与受体膜之间可能的转运机制  
A. 通过膜泡转运脂质。B. 通过 PEP 介导的脂质转运。C. 膜嵌入蛋白介导的膜间直接接触。

表 7-1 N-连接与 O-连接的寡糖比较

特征	N-连接	O-连接
合成部位	糙面内质网和高尔基体	高尔基体
合成方式	来自同一个寡糖前体	一个个单糖加上去
与之结合的氨基酸残基	天冬酰胺	丝氨酸、苏氨酸、羟赖氨酸、羟脯氨酸
最终长度	至少 5 个糖残基	一般 1~4 个糖残基, 但 ABO 血型抗原较长
第一个糖残基	N-乙酰葡萄糖胺	N-乙酰半乳糖胺等

水溶性的复合物进入细胞质基质, 通过自由扩散, 直至遇到靶膜时, PEP 将磷脂卸载下来, 并安插在膜上, 结果是从磷脂含量高的膜转移到磷脂含量低的膜上, 例如从磷脂合成部位内质网转移到线粒体或过氧化物酶体膜上, 可能线粒体和过氧化物酶体是缺少磷脂的细胞器。每种 PEP 只能识别一种磷脂, 推测磷脂酰丝氨酸就是以这种方式转移到线粒体膜上, 然后脱羧基而形成磷脂酰乙醇胺, 而卵磷脂则不加任何修饰地转移到线粒体膜上。第三种膜脂转运机制可能是供体膜与受体膜之间通过膜嵌入蛋白所介导的直接接触。

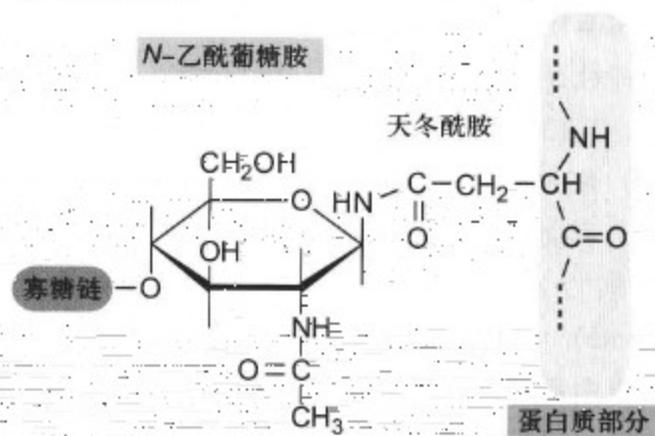
### 3. 蛋白质的修饰与加工

在糙面内质网合成的膜蛋白和可溶性分泌蛋白在它们分选各就各位之前, 通常要发生 4 种基本修饰与加工: ① 发生在内质网和高尔基体的蛋白质糖基化; ② 在内质网发生二硫键的形成; ③ 蛋白质折叠和多亚基蛋白的装配; ④ 在内质网、高尔基体和分泌泡发生特异性的蛋白质水解切割。

蛋白质糖基化是指在蛋白质合成的同时或合成后, 在酶的催化下寡糖链被连接在肽链特定的糖基化位点, 形成糖蛋白。蛋白质糖基化修饰对蛋白质折叠、分选及其定位, 糖链结构不同还将影响糖蛋白的半寿期和降解。参与靶蛋白糖基化修饰的寡糖链具有共同的内核结构。大多数寡糖链在糖基转移酶的催化下从内质网膜上磷酸多萜醇载体转移到靶蛋白三氨基酸残基 (Asn-X-Ser/Thr, -X 为除 Pro 以外任意氨基酸) 序列的天冬酰胺残基上, 称之为 N-连接的糖基化 (N-linked glycosylation), 与天冬酰胺直接结合的糖都是 N-乙酰葡萄糖胺, N-连接糖基化起始于内质网, 以磷酸多萜醇为载体, 先合成 14 个糖基的寡糖链 [(Glc)<sub>3</sub>(Man)<sub>5</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>] 前体, 然后通过膜上糖基转移酶 (glycosyltransferase) 的作用, 将寡糖链由磷酸多萜醇转移至肽链糖基化位点 (Asn-X-Ser/Thr) 的天冬酰胺残基上, 然后经内质网特异性糖苷酶加工, 形成高甘

露糖型糖蛋白, 再转移至高尔基体完成蛋白质 N-连接糖基化修饰。也有少数糖基化是发生在靶蛋白丝氨酸或苏氨酸残基上, 或发生在靶蛋白羟赖氨酸或羟脯氨酸残基上 (如胶原蛋白), 称之为 O-连接的糖基化 (O-linked glycosylation), O-连接糖基化发生在高尔基体, 与靶蛋白直接结合的糖是 N-乙酰半乳糖胺。两种糖基化其寡糖链在成分和结构上有很大的不同, 合成与加工的方式也完全不同 (表 7-1, 图 7-6)。

N-连接糖基化



O-连接糖基化

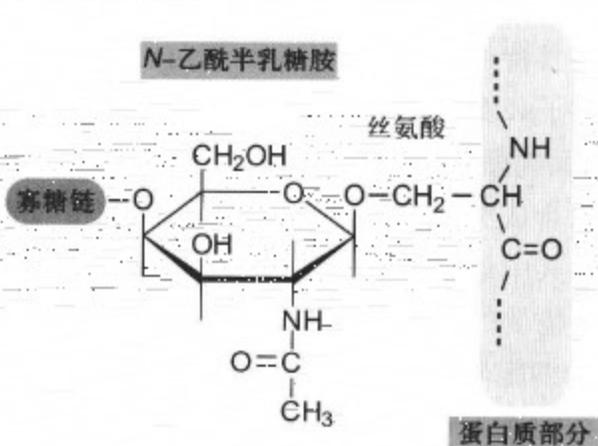


图 7-6 N-连接糖基化与 O-连接糖基化的比较

N-连接糖基化与之直接结合的糖是 N-乙酰葡萄糖胺, O-连接糖基化与之直接结合的糖是 N-乙酰半乳糖胺。

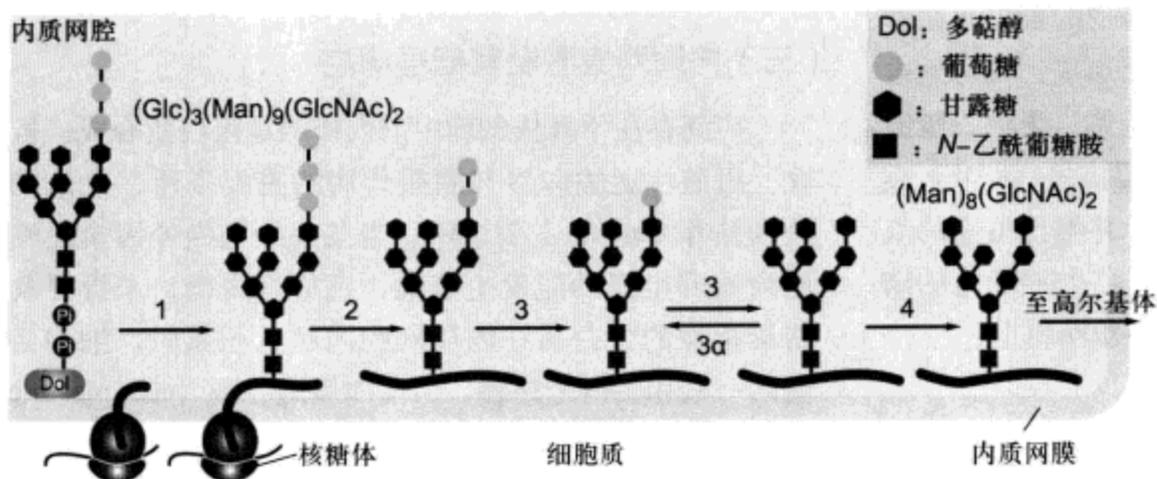


图 7-7 发生在糙面内质网蛋白质 N-连接的糖基化过程

1. 含有  $(\text{Glc})_3(\text{Man})_9(\text{GlcNAc})_2$  的寡聚糖首先在内质网磷酸多萜醇载体上组装，然后在糖基转移酶的催化下，寡聚糖基从磷酸多萜醇载体转移到新生肽链的天冬酰胺残基上。2-3. 在分子伴侣 Bip 和蛋白二硫键异构酶的帮助下，蛋白质折叠时，3 个葡萄糖残基分别被葡萄糖苷酶所切除（3 $\alpha$  在内质网蛋白质正确折叠时起作用）。4. 一个 Man 残基被移除，形成  $(\text{Man})_8(\text{GlcNAc})_2$  高甘露糖型寡聚糖。

在内质网发生的蛋白质 N-连接糖基化的加工过程如图 7-7 所示，转移至高尔基体后还会经过一系列复杂的修饰，其进一步加工过程参见高尔基体功能。

另一种蛋白质修饰酰基化 (acylation) 发生在内质网的胞质侧，通常是软脂酸共价结合在跨膜蛋白的半胱氨酸残基上，类似的酰基化也发生在高尔基体甚至膜蛋白向细胞膜转移的过程中，是形成脂锚定蛋白的重要方式。

此外，新生肽的脯氨酸和赖氨酸要进行羟基化 (hydroxylation)，形成羟脯氨酸和羟赖氨酸，不过这种反应只是在少数蛋白质上发生。在合成胶原的细胞中，脯氨酸和赖氨酸羟基化则是一个主要的反应。

#### 4. 新生多肽的折叠与组装

肽链的合成仅需几十秒钟至几分钟即可完成，而新合成的多肽在内质网停留的时间往往长达几十分钟。不同的蛋白质在内质网停留的时间长短不一，这在很大程度上取决于蛋白质正确折叠所需要的时间。有些多肽还要进一步参与多亚基寡聚体的组装。不能正确折叠的畸形肽链或未组装成寡聚体的蛋白质亚基，不论在内质网膜上还是在内质网腔中，一般都不能进入高尔基体，这类多肽一旦被识别，便通过 Sec61p 复合体从内质网腔转至细胞质基质，进而通过泛素依赖性降解途径被蛋白酶体 (proteasome) 所降解。它们的半寿期为 20~30 min 钟，有些只有 5 min。由此可见内质网是蛋白质分泌转运途径中行使质量监控的重要场所。

在目前发现的 16 000 种与人类疾病相关的蛋白质错义突变中，绝大多数是通过影响这些蛋白质的折叠、

组装及转运直接或间接造成的。蛋白质错误折叠引起疾病，究其机制大体可分为两类彼此重叠的情况，一是正确折叠和转运的蛋白质减少，无法保障功能需求，即功能丢失 (loss of function)；二是错误折叠蛋白质可以异常地获得功能 (gain of function)，例如某些离子通道蛋白质突变致使功能异常 (肺囊性纤维病)；错误折叠蛋白质形成细胞毒性聚合物，导致神经退行性疾病 (阿尔茨海默病 A $\beta$  淀粉样斑，亨廷顿舞蹈症中 Huntington 聚合物)。

在内质网狭小的腔隙中常常同时有多种蛋白质大量合成，特别是许多分泌蛋白常含有连接半胱氨酸残基的二硫键。内质网腔是一种非还原性环境，多肽链疏水基团之间以及侧链基团之间的相互作用，也极易导致二硫键形成，从而对肽链的正确折叠带来了很大困难。内质网中有一种蛋白二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI)，它附着在内质网膜腔面上，可以切断二硫键，形成自由能最低的蛋白质构象，从而帮助新合成的蛋白质重新形成二硫键并产生正确折叠的构象。

折叠好的蛋白质，内部往往有一个疏水的核心，未折叠的蛋白质由于疏水核心的外露，即使在很低的浓度下，也很容易发生聚集，甚至与其他未折叠的蛋白质形成复合物。内质网含有一种结合蛋白 (binding protein, Bip)，是属于 Hsp70 家族分子伴侣，在内质网中有两个作用：一是 Bip 同进入内质网的未折叠蛋白质的疏水氨基酸结合，防止多肽链不正确地折叠和聚合，或者识别错误折叠的蛋白质或未装配好的蛋白质亚单位，并促

进它们重新折叠与装配；二是防止新合成的蛋白质在转运过程中变性或断裂。一旦这些蛋白质形成正确构象或完成装配，便与 Bip 分离，进入高尔基体。蛋白二硫键异构酶和 Bip 等蛋白质都具有 4 肽驻留信号 (KDEL 或 HDEL) 以保证它们滞留在内质网中，并维持很高的浓度。Bip 还可同  $\text{Ca}^{2+}$  结合，可能通过  $\text{Ca}^{2+}$  与带负电的磷脂头部基团相互作用，使 Bip 结合到内质网膜上。

### 5. 内质网的其他功能

一般情况下，光面内质网所占比例很小，但在某些细胞中非常发达。肝细胞中的光面内质网很丰富，它是合成外输性脂蛋白颗粒的基地。肝细胞中的光面内质网中还含有一些酶，介导氧化、还原和水解反应，使有毒物质由脂溶性转变成水溶性而被排出体外，此过程称为肝细胞的解毒作用 (detoxification)。研究较为深入的是细胞色素 P450 家族酶系的解毒反应，聚集在光面内质网膜上的水不溶性毒物或代谢产物在 P450 混合功能氧化酶 (mixed-function oxidase) 作用下羟基化，完全溶于水并转送出细胞进入尿液排除体外。某些药物如苯巴比妥 (phenobarbital) 进入体内，肝细胞中与解毒反应有关的酶便大量合成，几天之中光面内质网的面积成倍增加。一旦毒物消失，多余的光面内质网也随之被溶酶体消化，5 天内又恢复到原来的大小。

心肌细胞和骨骼肌细胞中含有发达的特化的光面内质网，称为肌质网 (sarcoplasmic reticulum)，是储存  $\text{Ca}^{2+}$  的细胞器，对  $\text{Ca}^{2+}$  具调节作用。肌质网膜上的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶将细胞质基质中的  $\text{Ca}^{2+}$  泵入肌质网腔中，储存起来。当肌细胞受到神经冲动刺激后， $\text{Ca}^{2+}$  释放，肌肉收缩。在多数真核细胞中，内质网具有储存  $\text{Ca}^{2+}$  的功能，内质网膜上存在与肌质网膜上相同的三磷酸肌醇 ( $\text{IP}_3$ ) 的受体，细胞外信号通过胞内第二信使 ( $\text{IP}_3$ ) 也可引起  $\text{Ca}^{2+}$  向细胞质基质释放。内质网储存  $\text{Ca}^{2+}$  的功能，在于内质网中存在大量包括 Bip 在内的 4 种以上的  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白，其浓度可达 30~100 mg/ml。每个  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白分子可与 30 个左右的  $\text{Ca}^{2+}$  结合，从而致使内质网中的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度高达 3 mmol/L。内质网作为  $\text{Ca}^{2+}$  的储存库，由于高浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  及与之结合的  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白，从而阻止内质网以出芽的方式形成转运膜泡。因此， $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化对转运膜泡的形成，可能起重要的调节作用。

在某些合成固醇类激素的细胞如睾丸间质细胞中，光面内质网也非常丰富，其中含有制造胆固醇并进一步产生固醇类激素的一系列的酶。

### (三) 内质网应激及其信号调控

广泛存在于真核细胞中的内质网是蛋白质合成、折叠、组装、运输和参与脂质代谢的重要场所，也是细胞内储存  $\text{Ca}^{2+}$  的主要场所。当某些细胞内外因素使细胞内质网生理功能发生紊乱，钙稳态失衡，未折叠及错误折叠的蛋白质在内质网腔内超量积累时，细胞会激活一些相关信号通路，引发内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 反应，来应对条件的变化和恢复内质网良好的蛋白质折叠环境 (图 7-8)。所以 ERS 是体内的一种自我保护的机制，也是一套完整的质量监控机制，帮助内质网中蛋白质的折叠与修饰。内质网应激 (ERS) 是一个存活程序和凋亡程序同时被激活的过程，细胞可以整合应激反应，调动应激反应蛋白减轻应激因素对细胞的损伤，调整细胞稳态；同时细胞也可以启动细胞凋亡来处理不能修复的损伤细胞，因此 ERS 机制事关细胞生死抉择 (cell life and death decision)。ERS 包括：① 未折叠蛋白质应答反应 (unfolded protein response, UPR)，即错误折叠与未折叠蛋白质不能按正

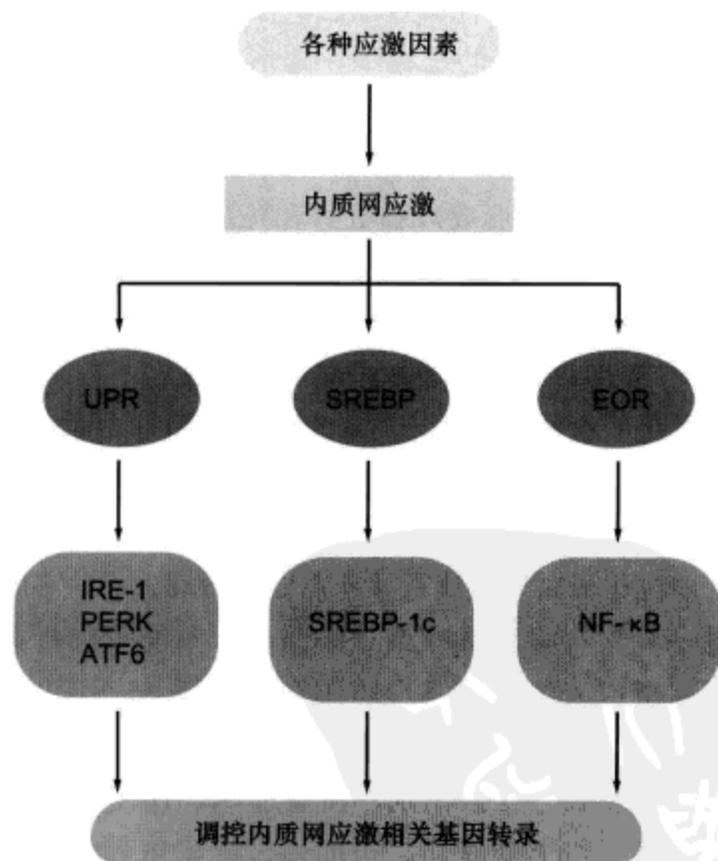


图 7-8 内质网应激反应

在各种应激因素 (错误折叠或未折叠蛋白质在 ER 腔内聚集、 $\text{Ca}^{2+}$  平衡紊乱、缺氧、异常糖基化和病毒感染等) 作用下，主要通过 3 条途径引发内质网应激 (ERS) 反应，影响特定基因表达。如果内质网功能持续紊乱，细胞将最终启动凋亡程序。(图中英文缩写符号见正文)

常途径从内质网中释放，从而在内质网腔内聚集，引起一系列分子伴侣和折叠酶表达上调，促进蛋白质正确折叠，防止其聚集，从而提高细胞在有害因素下的生存能力；② 内质网超负荷反应 (endoplasmic reticulum overload response, EOR)，细胞除启动 UPR 反应之外，正确折叠的蛋白质在内质网过度蓄积，特别是因膜蛋白在内质网异常堆积也会启动其他促生存的机制来反制内质网压力，例如激活细胞核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 引发的内质网超负荷反应，最终产生对前炎性细胞因子 (proinflammatory cytokine)，进而激活细胞存活、凋亡、细胞炎症反应和细胞分化等相关的信号途径；③ 固醇调节级联反应，是由内质网表面合成的胆固醇损耗所致，通过固醇调节元件结合蛋白质 (sterol regulatory element binding protein, SREBP) 介导的信号途径，影响特定基因表达；④ 如果内质网功能持续紊乱，细胞将最终启动凋亡程序。

1. 内质网腔内未折叠或错误折叠蛋白质的超量积累，引发未折叠蛋白质应答反应 (UPR)

哺乳类动物细胞有 3 种 ER 跨膜蛋白：需要肌醇酶 1 (inositol requiring enzyme 1, IRE1)、PKR 类似的内质网激酶 (PKR-like endoplasmic reticulum kinase, PERK；PKR 为双链 RNA 激活的蛋白激酶) 和激活性转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)，它们在 UPR 信号转导途径中起着胞内感受器的作用。在正常生理条件下，它们与内质网腔中的调控蛋白 Bip/GRP78 相结合，形成稳定的复合物，当错误或未折叠蛋白质在 ER 中超量积累时，这些感应蛋白与 Bip/GRP78 解离，感应 ERS 信号，分别引发 3 条不同的平行信号途径，以保护 ERS 下的细胞，引发不同的未折叠蛋白质应答反应 (UPR) (图 7-9A)。

第一条途径最先是在酵母细胞中发现，参与 UPR 的关键蛋白质是跨 ER 膜的双功能蛋白激酶 / 核酸内切

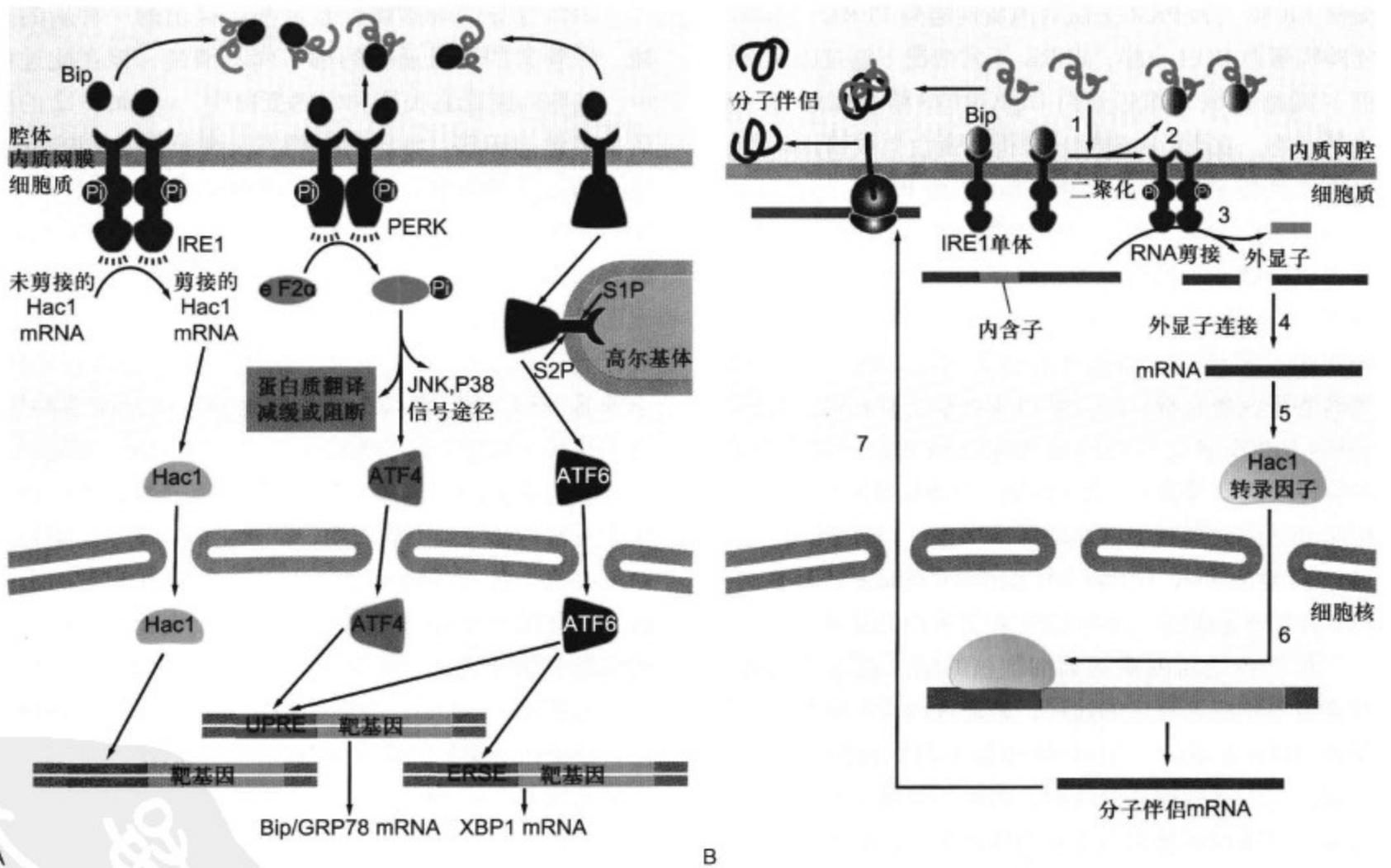


图 7-9 未折叠蛋白质应答反应 (UPR) 图示

A. 3 条不同的平行信号转导途径执行未折叠蛋白质应答反应 (UPR)。B. IRE1 膜蛋白介导的 UPR: 1. 错误折叠蛋白质作为内质网信号，激活内质网跨膜激酶 (感受器)；2. 活化的激酶二聚化、交叉磷酸化，激活核糖核酸内切酶活性；3. 活化的核糖核酸内切酶，切除前体 RNA 的内含子；4. 外显子连接，形成有功能活性的 mRNA；5. mRNA 翻译形成转录因子 Hac1；6. 转录因子进入核内，激活为 ER 分子伴侣编码的基因；7. 新合成的 ER 分子伴侣帮助蛋白质折叠。

酶 IRE1。IRE1 蛋白其 ER 腔面结构域具有 Bip/GRP78 (binding immunoglobulin protein, Bip 或称 glucose-regulated protein78, GRP78) 的结合位点和丝氨酸/苏氨酸激酶活性, 胞质面结构域具有特异性的 RNA 核酸内切酶活性。应答反应的基本步骤如图 7-9B 所示: 超量的错误折叠蛋白质在 ER 腔面与 Bip 竞争性结合, 从而使结合 Bip 的 IRE1 单体释放并二聚化和交叉磷酸化, 结果激活 IRE1 作为核酸内切酶的活性; IRE1 核酸内切酶致使基因调节蛋白前体 mRNA 的加工, 产生有功能的 mRNA, 新近证据表明, 这种 mRNA 加工过程发生在细胞质基质中, 而非常规那样发生在细胞核内。成熟 mRNA 被翻译成基因调节蛋白 (如 Hac1), 再转位进入核内作为转录因子激活那些编码未折叠蛋白质应答反应相关蛋白质的基因的转录, 以缓解内质网应激压力。IRE1 具有核糖核酸酶活性, 能切割 28S rRNA, 影响核糖体装配, 抑制蛋白质翻译。

第二条途径是超量积累的错误折叠蛋白质作为信号激活 ER 膜上的 PKR 类似的内质网激酶 PERK。和双功能跨膜蛋白 IRE1 一样, PERK 正常情况下通过内质网腔面 N 端结构域与伴侣蛋白 Bip/GRP78 结合而保持一种失活状态。在 ER 应激时, 未折叠蛋白质或错误折叠蛋白质竞争性地结合 Bip/GRP78, 因而 PERK 与之解离, 然后 PERK 激酶二聚化和交叉磷酸化。活化的 PERK 在蛋白质折叠受阻的情况下, 致使翻译起始因子 eIF2 $\alpha$  第 51 位丝氨酸磷酸化, 磷酸化的 eIF2 $\alpha$  不能完成 GTP-GDP 的交换作用, 减缓或暂停蛋白质合成, 限制了内质网的蛋白质负荷, 这对蛋白质折叠是有利的。有研究表明: PERK 活化后能特异性地抑制细胞周期蛋白 D1 的翻译表达, 导致 G<sub>1</sub> 期的停顿。PERK 磷酸化 eIF2 $\alpha$  后抑制细胞内大部分蛋白质的翻译生成, 同时 PERK 激活后还会激活 JNK (c-Jun NH-terminal kinases, JNK) 及 P38 信号转导通路, 诱导 UPR 相关基因的转录上调。

第三条是从内质网到细胞核的信号通路并激活未折叠蛋白质应答反应的途径, 是通过内质网应激调节的跨膜 ATF6 完成的。ATF6 最初作为内质网跨膜蛋白被合成, 与内质网膜共价结合, 因此不能激活核内基因的转录。当错误折叠蛋白质在内质网积累, 则内质网整合的跨膜蛋白 ATF6 转位至高尔基体, 在高尔基体被 S1P 和 S2P 蛋白酶裂解而被激活, 激活后的 ATF6 进入细胞核内, 促进含顺式作用元件 ERSE (ER stress response element, ERSE) 的转录因子 (如 XBP-1) 及 UPR 靶分子 (Bip/GRP78) 等基因转录。

2. 固醇调节级联反应是指胆固醇缺乏引发的固醇调控元件结合蛋白质 (SREBP) 信号通路调节基因转录的反应

依赖胆固醇的转录调控有赖于受控靶基因启动子内 10 个碱基对组成的固醇调控元件 (sterol regulatory element, SRE), 依赖类固醇的转录因子称作固醇调控元件结合蛋白 (SRE-binding protein, SREBP), SREBP 通过两个跨膜结构域锚定在内质网膜上。由 SREBP 介导的信号通路始于内质网膜, 除 SREBP 之外, 至少还涉及内质网膜 2 种跨膜蛋白 insig-1(2) 和 SCAP 的联合作用, 从而使细胞胆固醇库的变化受到监视, 以维持磷脂和胆固醇的水平 (图 7-10)。当膜上胆固醇水平升高时, SREBP 和 SCAP 结合形成复合物而抑制胆固醇的合成; 当胆固醇耗竭时, SREBP-SCAP 复合物被释放并转移到高尔基体被 S1P 和 S2P 分别在 2 个位点酶切, 成为活性因子易位到胞核而激活靶基因转录。

### 3. ERS 反应引发的细胞凋亡

ERS 介导的细胞凋亡是近些年提出的一种新的途径。尽管某些信号通路的细节尚不清楚, 但在此过程中, 细胞内钙稳态失衡和需钙蛋白酶、caspase-12 的激活是关键的一环。细胞内钙稳态失衡是诱导 ERS 的重要因素, 当 ERS 时, 钙离子从内质网腔释放到胞质中, 胞质中的钙离子水平增高, 从而激活钙离子依赖的蛋白酶 calpain, 诱发 ERS 介导的细胞凋亡途径。calpain 以无活性的二聚体的形式存在于胞质中, 由大小亚基组成, 大亚基 ( $8 \times 10^4$ ) 有 4 个结构域, 包含活性部位, 小亚基 ( $3 \times 10^4$ ) 由两个结构域组成, 包含调节部位, 大小亚基上均有钙离子的结合位点。ERS 时, 不同的凋亡信号可刺激内质网膜上的 IP3R 通道开放, 使钙离子从内质网腔释放到细胞质中, 高水平的钙离子与需钙蛋白酶结合, 从而导致 calpain 酶原大小亚基水解而被激活。活化的 calpain 可裂解多种蛋白质底物, 例如与几种细胞骨架蛋白结合的黏着斑蛋白 (vinculin), calpain 可通过裂解 vinculin, 破坏细胞骨架稳定性, 使胞膜起泡, 核染色质聚集, 诱导细胞凋亡。同时活化的 calpain 还可剪切 Bcl-xL 使之由抗凋亡分子转变为促凋亡分子, 促进细胞凋亡。caspase-12 位于内质网膜的胞质侧, 并且是唯一存在于内质网上的 caspase 家族成员。在非应激情况下, 它以酶原的形式存在, 当 ERS 时, caspase-12 可以通过不同的途径被激活, 其中包括 caspase-12 酶原作为 calpain 最重要的作用底物, 活化的 calpain 可转位于内质网膜上, 在 T132/A133 和 K158/T159 两个切

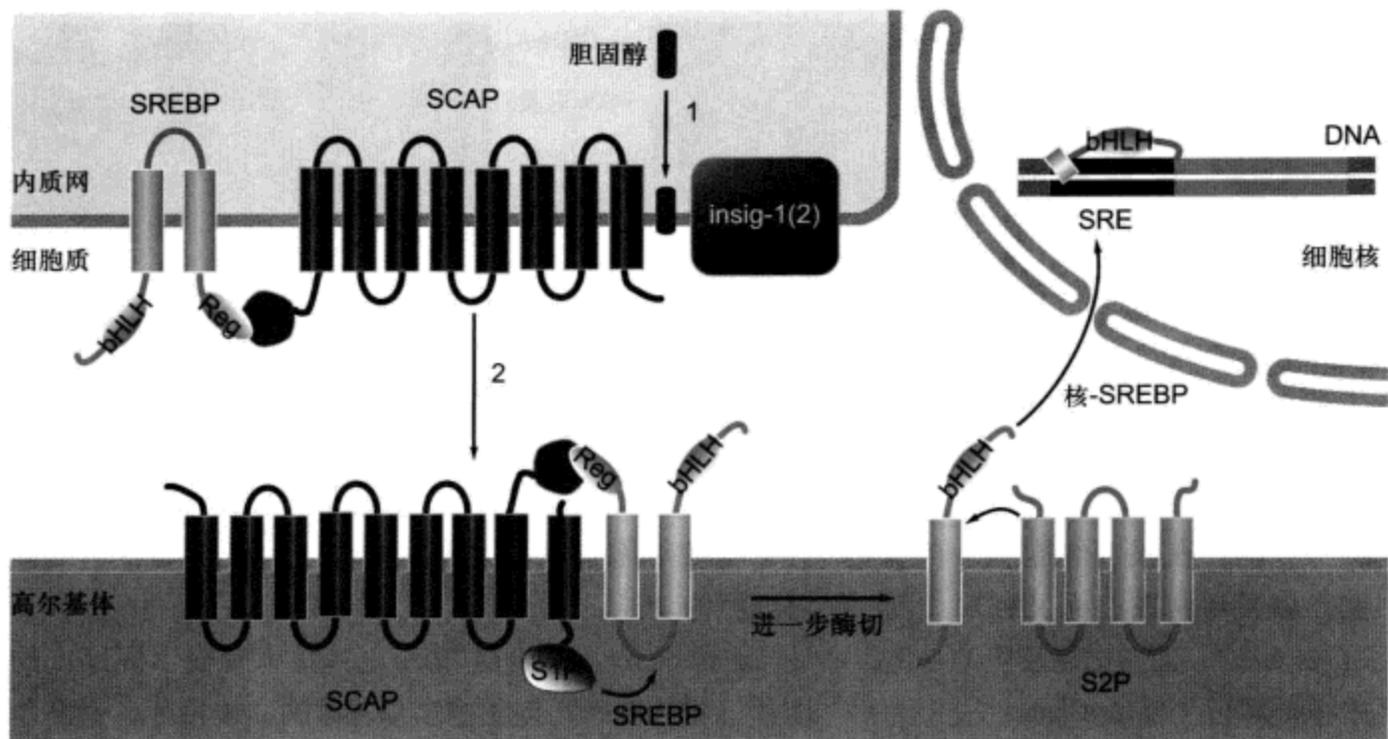


图 7-10 SREBP 的胆固醇敏感调控示意图

1. 当胆固醇水平过高时, insig-1(2) 与 SCAP 蛋白上固醇敏感结构域结合, 将 SCAP-SREBP 复合物锚定在内质网膜上。2. 在胆固醇水平降低时, insig-1(2) 与 SCAP 解离, 容许 SCAP-SREBP 复合物以膜泡转运的形式移动到高尔基体。在高尔基体上, SREBP 随即在 2 个位点分别被蛋白酶 S1P 和 S2P 切割, 从而使 SREBP 蛋白 N 端 bHLH 结构域得以释放。释放后的 bHLH 结构域称作核-SREBP (nSREBP), 并转位到核内, 调控具有 SRE 的靶基因的转录。

割位点切割 caspase-12 酶原, 使其成为活化的 caspase-12, 作为执行细胞凋亡的重要水解酶而发挥作用。

上述源自内质网的信号途径, 虽然了解得还不够深入, 但都是应激条件下细胞中内质网的一种保护性反应。内质网分子伴侣表达的上调可辅助未折叠蛋白质的折叠, 如果仍未形成天然构象, 则可转位到细胞质中经泛素-蛋白酶体途径降解 (内质网相关蛋白的降解)。ERS 可以通过未折叠蛋白质反应和内质网相关蛋白的降解, 维持内质网的稳态, 促进细胞生存; 但如果 ERS 反应过强或持续时间过长, 则会导致细胞启动细胞凋亡程序。

## 二、高尔基体

高尔基体 (Golgi body) 又称高尔基器 (Golgi apparatus) 或高尔基复合体 (Golgi complex), 是真核细胞内普遍存在的一种细胞器。1898 年, 意大利医生 Camillo Golgi 用镀银法首次在神经细胞内观察到一种网状结构, 命名为内网器 (internal reticular apparatus)。后来在很多细胞中相继发现了类似的结构并称之为高尔基体。高尔基体从发现至今已有百余年历史, 其中几乎一半时间是进行关于高尔基体形态乃

至是否真实存在的争论。50 年代以后随着电子显微镜技术的应用和超薄切片技术的发展, 才确证了高尔基体的真实存在。它不仅存在于动植物细胞中, 而且也存在于原生动物和真菌细胞内。

高尔基体是由大小不一、形态多变的囊泡体系组成的。在不同的细胞中, 甚至细胞生长的不同阶段都有很大的变化。高尔基体是高度动态的结构, 而且难以分离与纯化, 再加之动物细胞中高尔基体数目较少, 即使在含量丰富的肝细胞中高尔基体也仅有 50 个左右。因此对高尔基体的结构与功能的研究, 一直是细胞生物学家面临的挑战性难题之一。近些年来虽然对高尔基体的结构与功能进行了较多研究, 但目前积累的资料仍不足以彻底阐明高尔基体的结构与功能。

### (一) 高尔基体的形态结构与极性

电子显微镜所观察到的高尔基体特征性结构是由排列较为整齐的扁平膜囊 (sacculs) 堆叠而成 (常常 4~8 个), 囊堆构成了高尔基体的主体结构 (图 7-11), 扁平膜囊多呈弓形或半球形。膜囊周围又有许多大小不等的囊泡结构。高尔基体是一种有极性的细胞器, 这不仅表现在它在细胞中往往有比较恒定的位置与方向, 而且物质从高尔基体的一侧输入, 从另一侧输

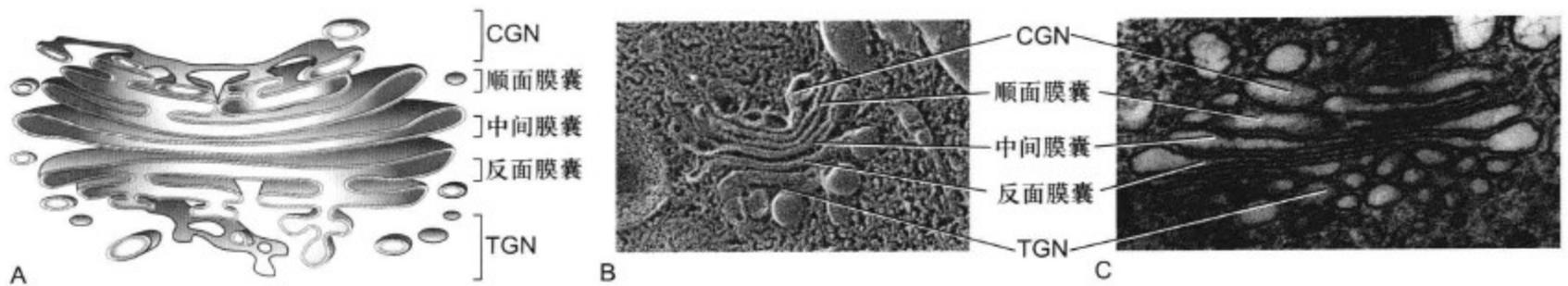


图 7-11 高尔基体的形态结构

A. 动物分泌细胞高尔基体三维结构的分区示意图。B. 动物细胞冷冻蚀刻扫描电镜观察到的高尔基体。C. 小鼠回肠 Paneth 细胞电镜超薄切片观察到的高尔基体。(B 图由 Bechara Kachar 博士惠赠; C 图由梁凤霞博士惠赠)

出, 因此每层膜囊也各不相同。在很多细胞中, 高尔基体靠近细胞核的一侧, 扁囊弯曲成凸面又称形成面 (forming face) 或顺面 (cis face), 面向细胞质膜的一侧常呈凹面 (concave) 又称成熟面 (mature face) 或反面 (trans face)。

根据高尔基体的各部膜囊特有的成分, 可用电镜组织化学染色方法对高尔基体的结构组分作进一步的分析, 常用的 4 种标志细胞化学反应是:

(1) 嗜银反应, 经银酸浸染后, 高尔基体的顺面膜囊被特异地染色。

(2) 焦磷酸硫酸素酶 (TPP 酶) 的细胞化学反应, 可特异地显示高尔基体反面的 1~2 层膜囊。

(3) 胞嘧啶单核苷酸酶 (CMP 酶) 和酸性磷酸酶的细胞化学反应, 常常可显示靠近反面膜囊状和反面管网结构, CMP 酶也是溶酶体的标志酶。20 世纪 60 年代初, Novikoff 发现 CMP 酶和酸性磷酸酶存在于高尔基体反面一侧, 称这种结构为 GERL, 意为这种结构与高尔基体 (G) 密切相关, 但它是内质网 (ER) 的一部分, 参与溶酶体 (L) 的生成。当时认为溶酶体中的酶是内质网合成后, 通过 GERL 而经过高尔基体进入溶酶体中, 这一假说影响达十年之久。

(4) 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸酶 (NADP 酶) 的细胞化学反应, 是高尔基体中间几层扁平囊的标志反应。

组织化学染色技术可以反映高尔基体的生化极性, 高尔基体的各种标志反应不仅有助于对高尔基体结构与功能的深入了解, 而且可以用来更准确地鉴别高尔基体的极性, 如汤雪明等用嗜银反应作为高尔基体顺面的标志反应, 研究了嗜中性粒细胞发育过程中高尔基体的极性变化。结果表明, 高尔基体的顺面并非总是在高尔基体的凸面, 在细胞发育的某个阶段可能位于高尔基体的凹面。在此以前, 由于仅根据形态上的凸凹来确定高尔基体的极性, 因此一度认为嗜中性粒细胞

的中幼粒细胞阶段, 其高尔基体的顺面也具有输出分泌颗粒的功能。

Rambourg 等借助超高压电镜技术观察不同厚度的切片, 并从不同角度拍摄高尔基体的立体照片, 对高尔基体的形态结构进行了比较并做了系统的三维结构分析, 结果显示高尔基体是一个十分复杂的连续的整体结构。酵母细胞高尔基体功能缺陷突变株研究发现, 高尔基体是一个复杂的由许多功能不同的间隔所组成的完整体系。目前多数学者认为, 高尔基体至少由互相联系的 4 个部分组成:

(1) 高尔基体顺面膜囊或顺面网状结构 (cis Golgi network, CGN) 位于高尔基体顺面最外侧的顺面膜囊, 呈中间多孔而连续分支状的网状结构 (CGN)。CGN 膜厚约 6 nm, 比高尔基体其他部位略薄, 但与内质网膜厚度接近。一般认为, CGN 接受来自内质网新合成的物质并将其分类后大部分转入高尔基体中间膜囊, 少部分蛋白质与脂质再返回内质网。返回内质网的蛋白质具有 KDEL (或 HDEL) 信号序列, 它是内质网驻留蛋白的特有序列。CGN 区域还可能具有其他生物活性, 如蛋白质丝氨酸残基发生 O-连接的糖基化, 跨膜蛋白质在细胞质基质一侧结构域的酰基化, 溶酶体酶上寡糖的磷酸化, 日冕病毒的装配也发生在 CGN。

(2) 高尔基体中间膜囊 (medial Golgi) 中间膜囊由扁平膜囊与管道组成, 形成不同间隔, 但功能上是连续的、完整的膜囊体系。多数糖基修饰与加工、糖脂的形成以及与高尔基体有关的多糖的合成都在中间膜囊。扁平膜囊特殊的形态大大增加了糖的合成与修饰的有效表面积。

(3) 高尔基体反面膜囊以及反面高尔基网状结构 (trans Golgi network, TGN) TGN 位于反面的最外层, 与反面膜囊相连, 另一侧伸入反面细胞质中, 形态呈管网状。TGN 内 pH 可能比高尔基体其他部位低。TGN

是高尔基体蛋白质分选的枢纽区，同时也是蛋白质包装形成网格蛋白/AP包被膜泡的重要发源地之一。此外，某些“晚期”的蛋白质修饰也发生在TGN，如半乳糖( $\alpha$ )2,6位的唾液酸化、蛋白质酪氨酸残基的硫酸化及蛋白原的水解加工作用等。有人认为TGN在蛋白质与脂质的转运过程中还起到“瓣膜”的作用，保证这些物质单向转运。

令人疑惑的是高尔基体作为细胞内高度动态的细胞器，却又始终维持一种极性结构并实现大分子在各部组分间有序地转移，对此目前有2种假说进行解释(图7-12)：①膜泡运输模型(vesicular transport model)，该模型认为高尔基体的膜囊群主体是相对稳态的结构，膜囊自身的更新和各部膜囊的生化极性(特征性酶和驻留蛋白的变化)是通过不同类型转运膜泡在相邻膜囊间顺向(顺面→反面)和反向(反面→顺面)有序转移实现的。②膜囊成熟模型(cisternal maturation model)，此模型认为高尔基体的膜囊群主体是动态的结构，源自ER的泡管结构首先形成高尔基体CGN，随后膜囊自身从顺面→反面渐次成熟并迁移，一些不当转移的膜囊特异酶类或驻留蛋白通过反向COP I转运膜泡再没收回来。实际上，关于解释高尔基体结构如何组织与维持，以及膜囊间蛋白质转运的机制问题，现在并没有定论，也许上述2种模型共同发挥作用。

高尔基体与细胞骨架关系十分密切，在没有极性的细胞中，高尔基体分布在微管的负极端即微管组织中心处，在分离的高尔基体膜囊上，既存在依赖微管的马达蛋白，包括胞质动力蛋白(cytoplasmic dynein)和驱动蛋白(kinesin)，又存在依赖微丝的马达蛋白，如不同

类型的肌球蛋白(myosin)。最近还发现特异的血影蛋白(spectrin)网架也存在于高尔基体处。显然，它们在维持高尔基体动态的空间结构以及复杂的膜泡运输中起重要的作用。

## (二) 高尔基体的功能

高尔基体的主要功能是将内质网合成的多种蛋白质进行加工、分类与包装，然后分门别类地运送到细胞特定的部位或分泌到细胞外。内质网合成的脂质一部分也通过高尔基体向细胞质膜和溶酶体膜等部位运输。因此说，高尔基体是细胞内大分子转运的枢纽或“集散地”。此外高尔基体还是细胞内糖类合成的工厂，在细胞生命活动中起多种重要的作用。

### 1. 高尔基体与细胞的分泌活动

早期的形态学观察结果就提示高尔基体可能与细胞分泌活动有关，但对这一功能的了解却经历了一个较长的认识过程。20世纪70年代初，Caro用 $^3\text{H}$ -亮氨酸对胰腺的腺泡细胞进行脉冲标记，发现在脉冲标记3 min后，放射自显影银粒主要位于内质网；20 min后，银粒出现在高尔基体；120 min后则位于分泌泡并开始于顶端释放。实验显示了分泌性蛋白在细胞内的合成与转运过程是通过高尔基体来完成的，后来的研究进一步发现，除分泌性蛋白外，多种细胞质膜上的膜蛋白、溶酶体中的酸性水解酶及胶原等胞外基质成分，其定向转运过程都是通过高尔基体完成的。

作为蛋白质合成主要场所的糙面内质网常常同时合成多种蛋白质，高尔基体TGN区是蛋白质包装分选的关键枢纽，在这里至少有3条分选途径(图7-13)。

(1) 溶酶体酶的包装与分选途径 具有甘露糖-6-磷酸(M6P)标记的溶酶体酶与相应膜受体结合，通过出芽方式形成网格蛋白/AP包被膜泡，再转运至晚期胞内体，在这里溶酶体酶(M6P残基)与膜受体解离，受体返回再利用，溶酶体酶被释放到溶酶体。溶酶体中含有几十种酸性水解酶，它们在内质网上合成后进入高尔基体。溶酶体酶在内质网合成时已起始N-连接的糖基化修饰，即把一个寡糖链共价结合到酶分子的天冬酰胺残基上。进入高尔基体膜囊后，在N-乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶和磷酸葡萄糖苷酶先后催化下，寡糖链中的甘露糖残基磷酸化生成甘露糖-6-磷酸。这种特异的反应，只发生在溶酶体的酶上，而不发生在其他的糖蛋白上，估计溶酶体酶本身的构象含有某种磷酸化的信号，如改变其构象则不能被识别也就不能形成甘露糖-6-磷酸。在

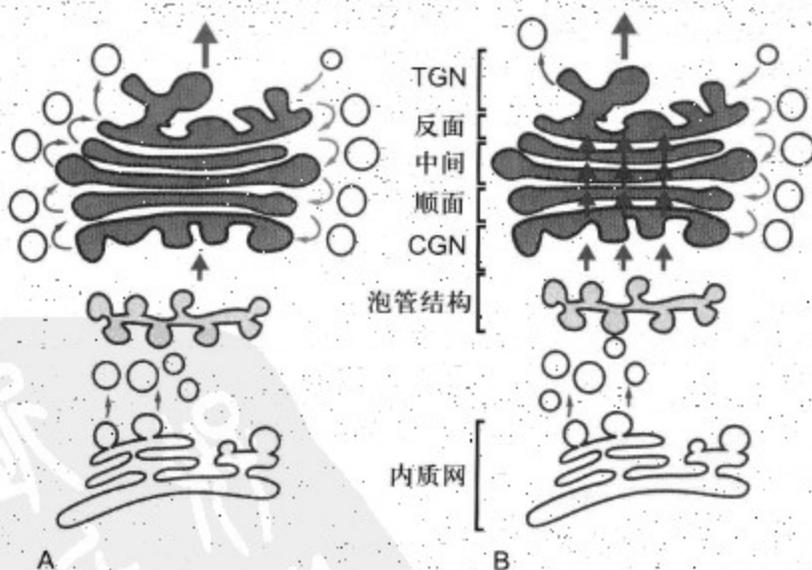


图7-12 解释高尔基体结构组织及膜囊间蛋白质转运的两种可能模型

A. 膜泡运输模型。B. 膜囊成熟模型。

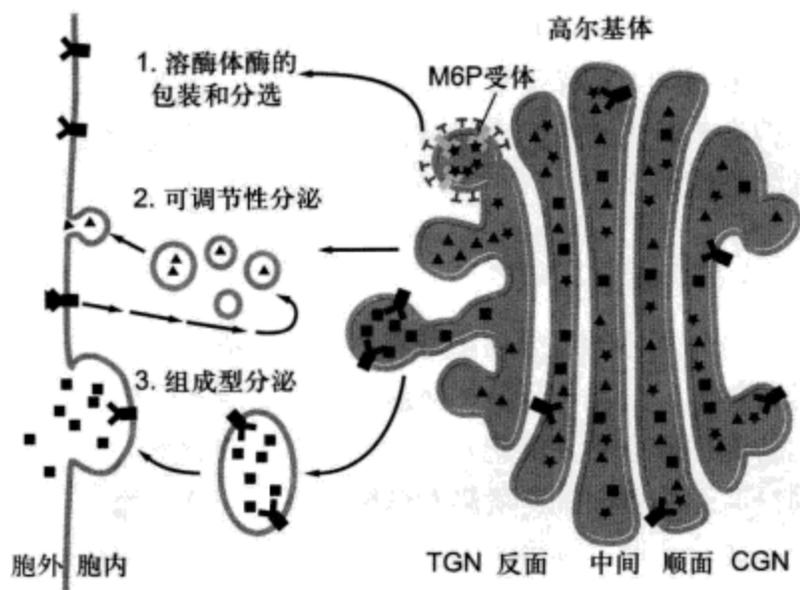


图 7-13 发生在高尔基体 TGN 区的蛋白质分选途径

高尔基体反面的膜囊上有结合甘露糖-6-磷酸的膜受体，由于溶酶体酶的多个位点上都可形成甘露糖-6-磷酸，从而大大增加了与受体的亲和力，这种特异的亲和力使溶酶体酶与其他蛋白质分离并起到局部浓缩的作用。在一种称为 I 细胞病 (inclusion cell disease) 的病人中，由于 N-乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶单基因的突变，因此不能合成甘露糖-6-磷酸，溶酶体的酶也就不能被受体识别，因而无法转运到溶酶体中。在内质网合成的蛋白质很多都是糖蛋白，而且这些蛋白质的糖链在高尔基体中经历十分复杂的修饰，于是人们猜测这种修饰作用可能与蛋白质在高尔基体的分选有关。然而用 DNA 重组技术证明，多种糖蛋白在去掉糖链后仍能正常地输送到细胞的特定部位，说明糖链在多数蛋白质的分选中并不起决定性的作用。上述溶酶体酶的分选途径可能仅是一种特例，况且也不是溶酶体酶唯一的分选途径，已发现在肝细胞中溶酶体酶还存在不依赖于甘露糖-6-磷酸的其他分选途径。

(2) 可调节性分泌 (regulated secretion) 途径 特化类型的分泌细胞，新合成的可溶性分泌蛋白在分泌泡聚集、储存并浓缩，只在特殊刺激条件下才引发分泌活动。例如胰腺  $\beta$  细胞胰岛素储存在特殊分泌泡内，当细胞应答血糖升高时才会分泌。在可调节性分泌过程中，对分泌性蛋白的分选例如促肾上腺皮质激素 (ACTH)、胰岛素和胰蛋白酶原进入可调节性分泌泡似乎利用一种共同的机制。在合成 ACTH 的垂体肿瘤细胞用重组 DNA 技术同时诱导胰岛素和胰蛋白酶原的合成，正常情况下这些细胞并不表达胰岛素和胰蛋白酶原，但诱导合成的这 3 种蛋白质却分别进入同样的可调节性分泌

泡，当一种激素与垂体肿瘤细胞的受体结合并引起胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  升高时，则 3 种蛋白质一起被分泌。虽然并没发现这 3 种蛋白质具有共有氨基酸序列作为分选信号，但明显具有某些共同特征发挥“信号”作用，指导它们选择性进入可调节性分泌泡。电镜观察的形态学证据表明，可调节性分泌途径是通过蛋白质选择性聚集而调控的，而选择性聚集与特殊的离子条件 ( $\text{pH} 6.5$  和  $1 \text{ mmol/L Ca}^{2+}$ ) 有某些关联。

(3) 组成型分泌 (constitutive secretion) 途径 所有真核细胞，均可通过分泌泡连续分泌某些蛋白质至细胞表面，特别是非极性细胞，该途径似乎不受调节，所以称之为组成型分泌。在极性细胞，分泌蛋白和质膜膜蛋白被选择性分选到顶面或基底面质膜，这种分选形式可能涉及特殊信号介导。一个很有趣的实验显示了蛋白质在高尔基体分选及其转运的信息仅存在于编码这个蛋白质的基因本身。流感病毒和水疱性口炎病毒可同时感染上皮细胞，这两种有囊膜病毒的囊膜蛋白均在糙面内质网上合成，然后经高尔基体转运到细胞质膜上。流感病毒的囊膜蛋白特异性地转运到上皮细胞游离端的细胞质膜上，而水疱性口炎病毒的囊膜蛋白则转运到基底面的细胞质膜上。

目前，人们发现水疱性口炎病毒囊膜蛋白在由糙面内质网合成后进入高尔基体时，存在于细胞质基质一侧的双酸分选信号 (Asp-X-Gln 或 DXE) 起重要的作用，其他一些膜蛋白也具有这一信号序列，表明膜蛋白在由内质网向高尔基体转运时，也存在一种选择性的转运机制。但是在有极性的上皮细胞高尔基体 TGN 如何使质膜膜蛋白进入不同的转运膜泡被分选到顶端或基底面质膜，其分子机制仍然不太清楚。

## 2. 蛋白质的糖基化及其修饰

大多数蛋白质或膜脂的糖基化修饰和与高尔基体有关的多糖的合成，主要发生在高尔基体。溶酶体酶类、质膜上大多数膜蛋白和可溶性分泌蛋白都是糖蛋白，修饰蛋白质侧链的寡糖链是在糙面内质网上合成中及其从内质网向高尔基体转运过程中发生一系列有序加工的结果。而细胞质基质和细胞核中绝大多数蛋白质都缺少糖基化修饰，仅有的例外是某些转录因子和核孔复合体上发现一些糖蛋白，但其糖基都比较简单。与细胞内 DNA、RNA 和蛋白质合成不同，糖蛋白中寡糖链的合成与修饰都没有模板，是依靠不同的糖基转移酶、在细胞的不同间隔中经历复杂的加工过程才完成的。这自然会使人联想，真核细胞中普遍存在的蛋白质糖基化

一定具有某些重要的生物学功能：① 糖基化的蛋白质其寡糖链具有促进蛋白质折叠和增强糖蛋白稳定性的作用。用衣霉素 (tunicamycin) 阻断蛋白质糖基化，在糙面内质网合成的多肽，如分泌的抗体 IgG 或分选到质膜上的糖蛋白如血凝素等，由于缺少糖基侧链不能正确折叠而滞留在内质网中。虽然很多糖蛋白的分选与行使其功能并非需要糖基化的修饰，例如成纤维细胞所分泌的纤连蛋白 (fibronectin, FN) 的数量与速率不受蛋白质糖基化与否的影响，但是糖基化的 FN 比未糖基化的 FN 对组织蛋白酶有更强的抗性，提示糖基化增强了糖蛋白的稳定性。② 蛋白质糖基化修饰使不同蛋白质携带不同的标志，以利于在高尔基体进行分选与包装，同时保证糖蛋白从糙面内质网至高尔基体膜囊单向转移。目前所知，M6P 即作为溶酶体酶分选和包装的指导信号。③ 鉴于细胞内一些负责糖链合成与加工的酶类均由严格意义上的管家基因所编码，如多萜醇二磷酸寡糖糖基转移酶、甘露糖蛋白 GlcNAc 转移酶、 $\alpha$ -葡糖糖苷酶 II 的  $\alpha$  亚基等，这些蛋白质的编码基因被敲除后会导致胚胎致死。另外，细胞表面、细胞外基质密集存在的寡糖链，可通过与另一个细胞表面的凝集素 (lectin) 之间发生特异性相互作用，直接介导细胞间的双向通讯，或参与分化、发育等多种过程。④ 多羟基糖侧链还可能影响蛋白质的水溶性及蛋白质所带电荷的性质，如哺乳动物细胞表面常常带有负电荷，显然与膜上糖蛋白末端唾液酸残基的存在有关。考虑到寡糖链具有比核酸和多肽更大的潜在信息编码容量，作为分子标志之一可能还有其他重要作用，如参与机体细胞间识别，以及宿主细胞与病原微生物之间的识别。典型的例证是 ABO 血型抗原的许多决定簇是红细胞表面的不同结构的糖链，被抗糖抗体特异性识别，具有重要的临床价值。目前对蛋白质糖基化生物学意义的了解还不够深入，有些学者从进化的角度上提出，糖链的复杂加工可能是在进化过程中逐步演化产生的。因为寡糖链具有一定的刚性，从而限制了其他大分子接近细胞表面的膜蛋白，这就可能使真核细胞的祖先具有一个保护性的外被，同时又不像细胞壁那样限制细胞的形状与运动。

N-连接的糖基化反应起始发生在糙面内质网，一个由 14 个糖残基的寡糖链从供体磷酸多萜醇上转移至新生肽链的特定三肽序列的天冬酰胺残基上 (Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr，其中 X 是除 Pro 以外的任何氨基酸)。因此，所有的 N-连接的寡糖链都有一个共同的前体，在糙面内质网以及在通过高尔基体各膜囊间隔的转

移过程中，寡糖链经过一系列加工、切除和添加特定的单糖，最后形成成熟的糖蛋白。所有成熟的 N-连接的寡糖链都含有 2 个 N-乙酰葡萄糖胺和 3 个甘露糖残基。根据其结构特征又可分为高甘露糖 N-连接寡糖 (high mannose N-linked oligosacchiride) 和复杂的 N-连接寡糖 (complex N-linked oligosacchiride)，前者只含有 N-乙酰葡萄糖和甘露糖，后者除此之外还含有岩藻糖、半乳糖和唾液酸，二者可能分别存在于不同种类的糖蛋白中，也可能存在于同一条肽链的不同位点上。

O-连接的糖基化是在高尔基体中进行的。由不同的糖基转移酶催化，每次加上一个单糖。同复杂的 N-连接的糖基化一样，最后一步是加上唾液酸残基，这一反应发生在高尔基体反面膜囊和 TGN 中，至此完成全部糖基的加工与修饰。多数的糖蛋白在 10 min 内便可从高尔基体分选到其目的地。

内质网和高尔基体中所有与糖基化及寡糖加工有关的酶都是整合膜蛋白。它们固定在细胞的不同间隔中，其活性部位均位于内质网或高尔基体的腔面。在高尔基体中，其反应底物核苷酸单糖 (nucleotide sugar) 通过载体蛋白介导的反向协同运输方式从细胞质基质转运到高尔基体囊腔内。在不同的膜囊间隔中，膜上的载体蛋白也有所不同，以维持腔内特定反应底物的浓度。

用电镜放射自显影的方法或不同的寡糖链合成的抑制剂，可显示在内质网和高尔基体各间隔中寡糖合成的活性。如用  $^3\text{H}$ -甘露糖进行脉冲标记，标记物集中在糙面内质网上，用  $^3\text{H}$ -岩藻糖或  $^3\text{H}$ -半乳糖标记，则标记物集中在高尔基体的反面囊膜中。进一步分析证明半乳糖苷转移酶位于高尔基体反面膜囊，唾液酸转移酶定位于高尔基体反面膜囊和 TGN。因此寡糖链的合成与加工非常像是一条装配流水线上，糖蛋白从细胞器的一个间隔输送到另一个间隔，固定在间隔内侧上的一套排列有序的酶系，依次进行一道道加工，前一个反应的产物又作为下一个反应的底物，确保只有加工过的底物才能进入下一道工序 (图 7-14)。

细胞中还有一类重要的糖蛋白，即蛋白聚糖 (proteoglycan)，也是在高尔基体完成组装的。它是由一个或多个糖氨聚糖 (glycosaminoglycan) 结合到核心蛋白的丝氨酸残基上，与一般 O-连接寡糖不同，直接与丝氨酸羟基结合的不是 N-乙酰半乳糖胺而是木糖 (xylose)。蛋白聚糖多为胞外基质的成分，有些也整合在细胞质膜上，很多上皮细胞分泌的保护性黏液常常是蛋白聚糖和高度糖基化的糖蛋白的混合物。

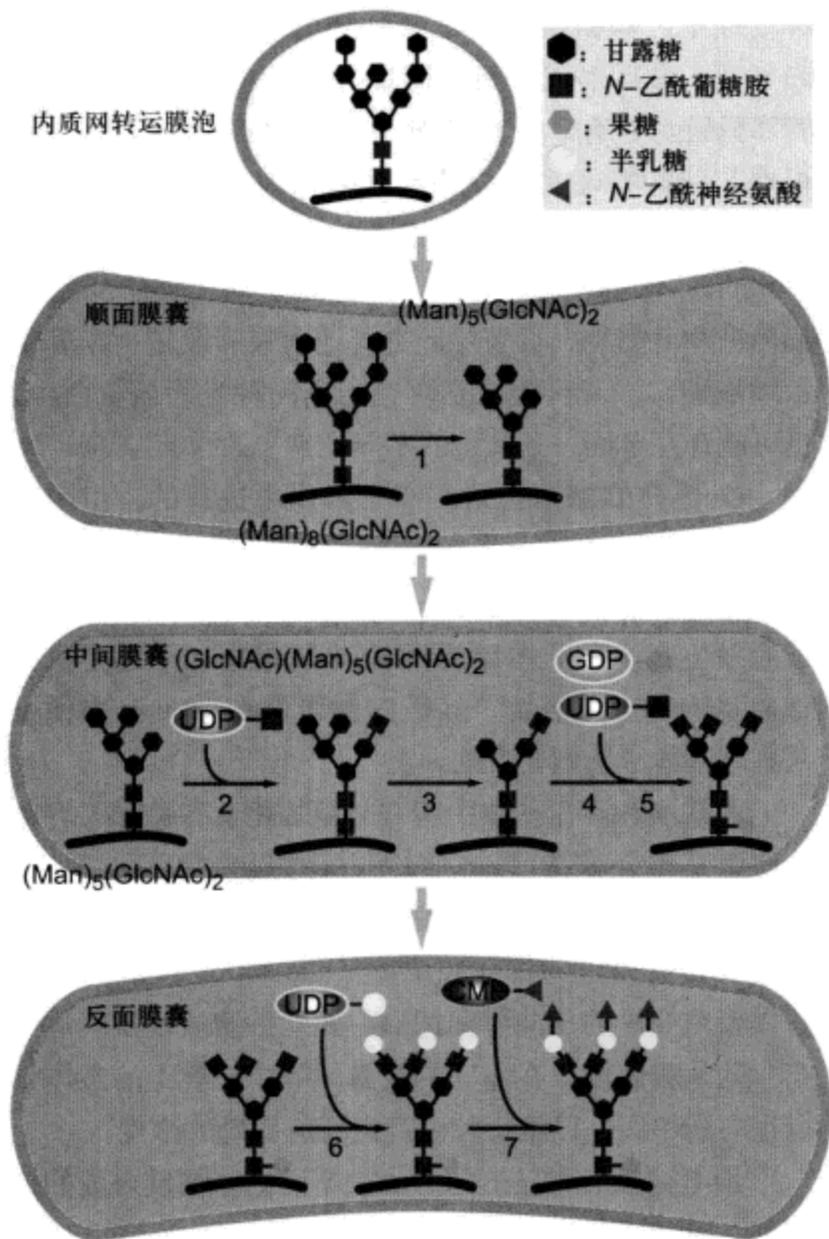


图 7-14 脊椎动物细胞糖蛋白 N-连接寡糖在高尔基体各膜囊区间的加工过程

N-连接寡糖的核心糖基是在内质网装配后转移到的高尔基体的。N-连接寡糖的进一步加工修饰在高尔基体上完成：在高尔基顺面膜囊切除 3 个 Man 残基（步骤 1）；在中间膜囊，再附加 3 个 GlcNAc 残基（步骤 2, 4 和 5），移除 2 个 Man 残基（步骤 3）；在反面膜囊，再加 3 个半乳糖残基（步骤 6），最后每个半乳糖残基连上一个 N-乙酰神经氨酸残基（步骤 7），完成 N-连接寡糖的加工。

在植物细胞中，高尔基体合成和分泌多种多糖，它们至少含 12 种以上的单糖，多数多糖呈分支状且有很多共价修饰，远比动物细胞复杂得多，估计构成植物细胞典型初生壁的过程就涉及数百种酶。除少数酶共价结合在细胞壁上外，多数酶都存在于内质网和高尔基体中。其中一个例外是多数植物细胞的纤维素是由细胞质膜外侧的纤维素合成酶合成的。对糖脂研究的资料不多，但已有的证据表明，糖脂的糖侧链也是以与糖蛋白相同的途径和方式合成与加工的，最后由高尔基体转运到溶酶体膜或细胞质膜上。

### 3. 蛋白酶的水解和其他加工过程

有些多肽，如某些生长因子和某些病毒囊膜蛋白，在糙面内质网中切除信号肽后便成为有活性的成熟多肽。还有很多肽激素和神经多肽（neuropeptides）当转运至高尔基体的 TGN 或 TGN 所形成的分泌泡中时，在与 TGN 膜相结合的蛋白水解酶作用下，经特异性水解（常常发生在与一对碱性氨基酸相邻的肽键上）才成为有生物活性的多肽。

不同的蛋白质在高尔基体中酶解加工的方式各不相同，可归纳为以下几种类型：

(1) 没有生物活性的蛋白原（proprotein）进入高尔基体后，将蛋白原 N 端或两端的序列切除形成成熟的多肽。如胰岛素、胰高血糖素及血清蛋白，等这是一种比较简单的蛋白质加工形式。

(2) 有些蛋白质分子在糙面内质网合成时是含有多个相同氨基酸序列的前体，然后在高尔基体中被水解形成同种有活性的多肽，如神经肽等。

(3) 一个蛋白质分子的前体中含有不同的信号序列，最后加工形成不同的产物；有些情况下，同一种蛋白质前体在不同的细胞中可能以不同的方式加工，产生不同种类的多肽，这样大大增加了细胞信号分子的多样性。不同的多肽采用不同的加工方式，推测其原因是：① 有些多肽分子太小，在核糖体上难以有效地合成，如仅由 5 个氨基酸残基组成的神经肽；② 有些可能缺少包装并转运到分泌泡中的必要信号；③ 更重要的是可以有效地防止这些活性物质在合成它的细胞内提前发挥作用。假如胰岛素在糙面内质网中合成后便具有生物活性，那么它很可能与内质网膜上的受体结合启动错误的反应。胰岛素即使进入分泌泡后也不会与受体结合，因为它仅在 pH 7 左右的条件下与受体结合，而储存胰岛素的分泌泡中 pH 为 5.5。

硫酸化作用也在高尔基体中进行的，硫酸化反应的硫酸根供体是 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸（3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS），它从细胞质基质中转入高尔基体膜囊内，在酶的催化下，将硫酸根转移到肽链中酪氨酸残基的羟基上。硫酸化的蛋白质主要是蛋白聚糖。

### 三、溶酶体

与其他细胞器不同，发现溶酶体的最早证据不是来自形态观察，而是在用差速离心法分离细胞组分时获

得的。1949年, de Duve 将大鼠肝组织匀浆, 并对其中各种细胞器进行分级分离, 以期找出哪些细胞器与糖代谢的酶有关。在测定作为对照的酸性磷酸酶活性时, 发现酶的活性主要存在于线粒体组分中。但实验结果却出现了一些反常的现象, 如蒸馏水提取物中酶的活性比在蔗糖渗透平衡液抽提物中酶的活性高。放置一段时间的抽提物比新鲜制品中的酶活性高, 而且酶活性与沉淀物线粒体无关。随后又发现其他几种水解酶也有类似的现象, 从而推测在线粒体组分中还存在另一种新的细胞器。1955年, de Duve 与 Novikoff 合作首次用电子显微镜证明了溶酶体的存在。

### (一) 溶酶体的形态结构与类型

溶酶体 (lysosome) 是单层膜围绕、内含多种酸性水解酶类的囊泡状细胞器, 其主要功能是行使细胞内的消化作用。溶酶体在维持细胞正常代谢活动及防御等方面起着重要作用, 特别是在病理学研究中具有重要意义, 因此越来越引起人们的高度重视。

溶酶体几乎存在于所有的动物细胞中, 植物细胞内也有与溶酶体功能类似的细胞器, 如圆球体、糊粉粒及植物细胞的中央液泡, 原生动物细胞中也有类似溶酶体的结构。典型的动物细胞约含数百个溶酶体, 但在不同的细胞内溶酶体的数量和形态有很大差异, 即使在同一种细胞中溶酶体的大小、形态也有很大变化, 这主要与溶酶体处于不同生理功能阶段相关。

溶酶体是一种异质性的 (heterogeneous) 细胞器, 这是指不同的溶酶体的形态大小, 甚至其中所含水解酶的种类都可能有很大的不同。根据溶酶体处于完成其生理功能的不同阶段, 大致可分为初级溶酶体 (primary lysosome)、次级溶酶体 (secondary lysosome) 和残质体 (residual body)。

初级溶酶体呈球形, 直径  $0.2 \sim 0.5 \mu\text{m}$ , 内容物均一, 不含有明显的颗粒物质, 外面由一层脂蛋白膜围绕 (图 7-15)。溶酶体含有多种酸性水解酶类, 如蛋白酶、核酸酶、糖苷酶、酯酶、磷脂酶、磷酸酶和硫酸酶等, 酶的最适 pH 为 5.0 左右。若将氢氧化氨或氯奎 (chloroquine) 等可透过细胞膜的碱性物质加入细胞培养液中, 致使溶酶体内 pH 提高至 7.0 左右, 则导致溶酶体酶失活。

溶酶体膜在成分上也与其他生物膜不同: ① 嵌有质子泵, 利用 ATP 水解释放的能量将  $\text{H}^+$  泵入溶酶体内, 使溶酶体中的  $\text{H}^+$  浓度比细胞质中高 100 倍以上,

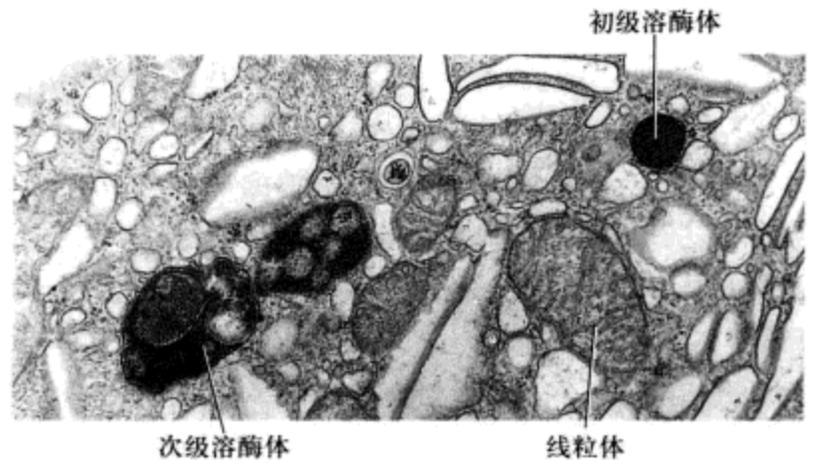


图 7-15 小鼠膀胱上皮细胞中的溶酶体 (梁凤霞博士惠赠)

以形成和维持酸性的内环境; ② 具有多种载体蛋白用于水解产物向外转运; ③ 膜蛋白高度糖基化, 可能有利于防止自身膜蛋白的降解, 以保持其稳定。

目前已发现 60 余种溶酶体酶, 多数为可溶性酶, 有些整合在溶酶体膜上。酶蛋白本身的结构能抵御酸变性的作用。已克隆了近 20 种酶的 cDNA, 并测出基因序列, 发现溶酶体酶具有某些特征性同源序列。此外, 发现催化相关反应的某种溶酶体酶和非溶酶体酶之间蛋白质一级结构非常相似, 与低等真核生物及原核生物的有关酶也具相似性。显然, 溶酶体酶与相关的非溶酶体酶是一类结构与功能上相似的酶家族, 推测它们在分子进化上有共同起源。

次级溶酶体是初级溶酶体与细胞内的自噬泡或异噬泡 (胞饮泡或吞噬泡) 融合形成的进行消化作用的复合体, 分别称之为自噬溶酶体 (autophagolysosome) 和异噬溶酶体 (heterophagic lysosome)。电镜观察显示次级溶酶体内部结构复杂多样, 含有多种生物大分子、颗粒、膜片甚至某些细胞器, 因此次级溶酶体形态不规则, 大者直径可达几个微米。次级溶酶体内经历消化后, 小分子物质可通过膜上载体蛋白转运到细胞质基质中, 供细胞代谢利用, 未被消化的物质残存在溶酶体内形成残质体或称后溶酶体。残质体可通过类似胞吐的方式将内容物排出细胞。

根据溶酶体的标志酶反应, 可辨认出不同形态与大小的溶酶体。酸性磷酸酶 (acid phosphatase) 是常用的标志酶, 用这种方法不仅有助于研究溶酶体的发生与成熟过程, 而且还发现了多泡体等多种类型的溶酶体。溶酶体可看作是以含有大量酸性水解酶为共同特征, 有不同形态大小, 执行不同生理功能的一类异质性的细胞器。少量的溶酶体酶泄露到细胞质基质中, 并不会引起

细胞损伤，其主要原因是细胞质基质中的pH为7.0左右，在这种环境中溶酶体酶的活性大大降低。此外，在酵母细胞质中已发现一些蛋白质可以特异地与溶酶体酶结合而使其丧失活性。植物细胞的液泡中含有多种水解酶类，具有与动物细胞溶酶体类似的功能，一般液泡占细胞总体积的30%以上，但在不同细胞中液泡体积从5%至90%不等。除此之外，液泡还具有储存营养与废物、调节细胞体积增长及细胞膨压等多种作用。

## (二) 溶酶体的功能

溶酶体的基本功能是细胞内的消化作用，这对于维持细胞的正常代谢活动及防御微生物的侵染都有重要的意义。溶酶体的消化作用一般可概括成内吞作用、吞噬作用和自噬作用3种途径，每种途径都将导致不同来源的物质在细胞内被消化(图7-16)。

### 1. 清除无用的生物大分子、衰老的细胞器及衰老损伤和死亡的细胞

细胞处于不同分化阶段及不同生理状态下，都需要一系列特定的酶系统以维系正常的代谢活动，细胞生理状态的变化常常是通过酶系统的改变而实现的。原核细胞的快速增殖可稀释不需要的酶，真核细胞对蛋白质存量的调节，除依赖泛素的蛋白酶体降解途径外，溶酶体是另一个重要的降解途径，用以清除暂时不需要的酶或某些代谢产物。此外，细胞中的生物大分子及细胞器都有一定的半寿期，很多生物大分子的半寿期只有几小时

至几天，肝细胞中线粒体的平均寿命约10天，细胞质膜也处在不断的更新之中。通过溶酶体的消化作用不断地清除衰老的细胞器和生物大分子，是保障细胞正常代谢活动与调控所必需的。占成人细胞总数1/4的红细胞仅能存活120天，因此人体每天清除的红细胞多达 $10^{11}$ 个。此外，还要清除在发育中和成体中凋亡的细胞。这些任务主要由溶酶体和蛋白酶体共同承担，所以溶酶体起着“清道夫”的作用。当基因突变导致溶酶体酶缺失或产生溶酶体酶功能异常时，其底物不能被水解而积留在溶酶体中，结果会导致代谢紊乱，引起疾病。溶酶体酶对水解底物似乎没有选择性，但暂不需要的大分子和衰老的细胞器选择性地进入自噬泡，溶酶体识别并与其融合，这显然是一个精确的调控过程，其机制还不清楚。对衰老细胞的清除主要是由巨噬细胞完成，如衰老的红细胞膜骨架发生改变，导致细胞韧性的改变，而不能进入比其直径更小的毛细血管中。同时细胞表面糖链中的唾液酸残基脱落，暴露出半乳糖残基，从而被巨噬细胞识别并捕获，进而被吞噬和降解。

### 2. 防御功能

防御功能是某些细胞特有的功能，它可以识别并吞噬入侵的病毒或细菌，在溶酶体作用下将其杀死并进一步降解。动物有几种吞噬细胞(phagocyte)，位于肝、脾和其他血管通道中，用以清除抗原抗体复合物及吞噬的细菌、病毒等入侵者，同时也不断清除衰老死亡的细胞和血管中颗粒物。当机体被感染后，单核细

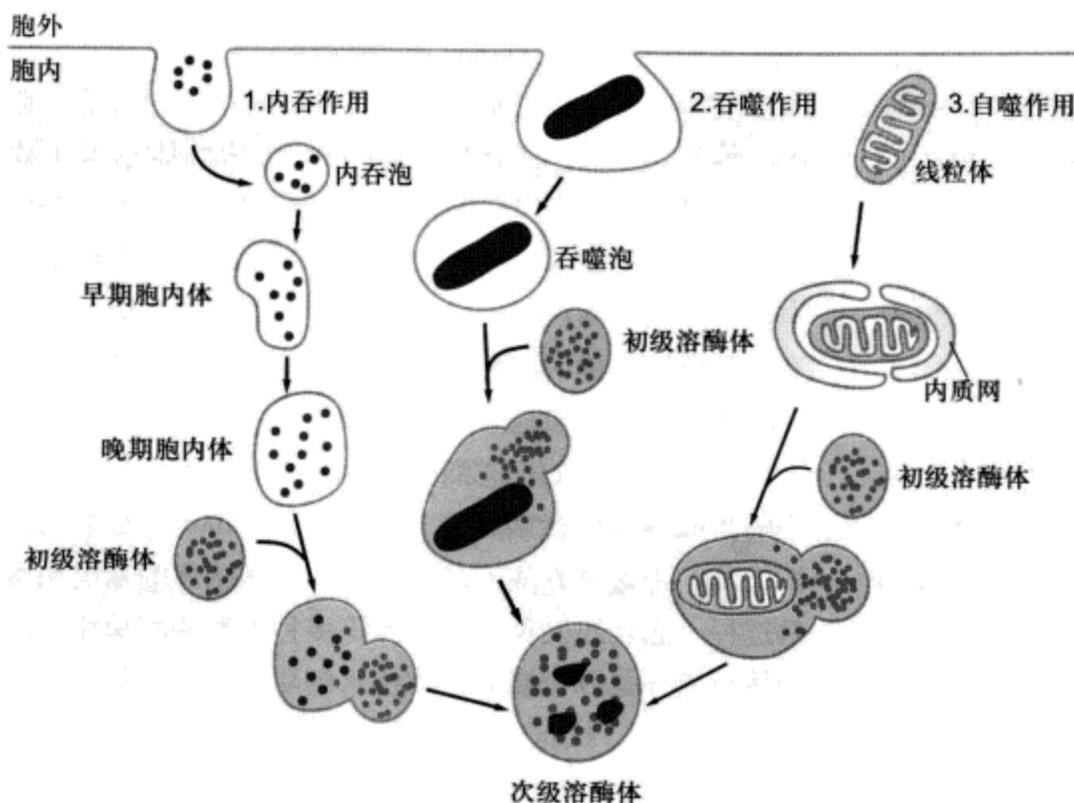


图7-16 溶酶体消化作用的3种途径

1. 内吞作用，可溶性大分子通过质膜被小窝内化和内吞泡摄入细胞与初级溶酶体结合形成异噬溶酶体被消化。2. 吞噬作用，破损细胞或病原体及不溶性颗粒物通过异噬泡形成进入细胞与初级溶酶体结合被消化。3. 自噬作用，细胞内破损细胞器和批量细胞质形成自噬泡与初级溶酶体结合被消化。

胞 (monocyte) 迁移至感染或发炎的部位, 分化成巨噬细胞, 巨噬细胞中溶酶体非常丰富, 溶酶体酶与溶酶体所含过氧化氢、超氧化物 ( $O_2^-$ ) 等共同作用杀死细菌, 电镜下巨噬细胞内常可见较多残质体, 这也可能是为什么巨噬细胞的生命只有 1~2 天的缘故。某些病原体被细胞摄入, 进入吞噬泡但未被杀死, 如麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、利什曼原虫 (*Leishmania*) 等, 它们可在巨噬细胞的吞噬泡中繁殖, 其原因主要是通过抑制吞噬泡的酸化从而抑制了溶酶体酶的活性。某些病毒借助受体介导的细胞内吞作用而侵入宿主细胞, 它们巧妙地利用胞内体中的酸性环境将病毒核衣壳释放到细胞质中, 如在细胞培养液中加入氢氧化铵或氯奎等碱性试剂, 将内吞泡中的 pH 提高至 7 左右, 则病毒虽然能进入细胞, 但不能将其核衣壳从胞内体中释放到细胞质基质中, 因而也就不能在细胞中繁殖。

### 3. 其他重要的生理功能

(1) 作为细胞内的消化“器官”为细胞提供营养, 如降解内吞的血清脂蛋白, 获得胆固醇等营养成分等。很多单细胞真核生物如黏菌、变形虫等靠吞噬细菌和某些真核微生物而生存, 其溶酶体的消化作用就显得更为重要。饥饿状态下, 溶酶体可分解细胞内的生物大分子即自噬作用, 以保证机体所需的能量。在肝细胞中, 每小时降解的蛋白质占肝细胞蛋白总量的 4.5%, 这一过程主要由溶酶体完成。

(2) 在分泌腺细胞中, 溶酶体常常摄入分泌颗粒, 参与分泌过程的调节。在甲状腺中, 甲状腺球蛋白 (thyroglobin) 储存在腺体内腔中, 通过吞噬作用进入分泌细胞内并与溶酶体融合, 甲状腺球蛋白被水解成甲状腺素, 然后分泌到细胞外进入毛细血管。

(3) 无尾两栖类发育过程中蝌蚪尾巴的退化, 哺乳动物断奶后乳腺的退行性变化等都涉及某些特定细胞程序性死亡, 死亡后的细胞被周围吞噬细胞溶酶体消化清除。

(4) 在受精过程中的顶体反应, 精子的顶体 (acrosome) 相当于特化的溶酶体, 其中含多种水解酶类, 如透明质酸酶、酸性磷酸酶、 $\beta$ -N-乙酰葡萄糖胺酶及蛋白水解酶等, 它能溶解卵细胞的外被及滤泡细胞, 产生孔道, 使精子进入卵细胞, 精子冷冻保存中的技术难题之一就是防止顶体的破裂。

### (三) 溶酶体的发生

如前所述, 溶酶体酶是在糙面内质网上合成并经

N-连接的糖基化基础修饰, 然后转至高尔基体, 在高尔基体的 *cis* 面膜囊中寡糖链上的甘露糖残基被磷酸化形成甘露糖-6-磷酸 (mannose-6-phosphate, M6P), 在高尔基体的 *trans* 面膜囊和 TGN 膜上存在 M6P 的受体, 这样溶酶体酶就与其他蛋白质区分开来, 并得以浓缩, 最后以出芽的方式形成网格蛋白 /AP 包被膜泡转运到溶酶体中。

溶酶体酶甘露糖残基的磷酸化先后由两种酶催化: 一种是 N-乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶 (N-acetylglucosamine phosphotransferase, GlcNAc-P-transferase); 另一种是磷酸葡萄糖苷酶 (phosphoglycosidase)。当溶酶体酶进入高尔基体的 *cis* 面膜囊后, N-乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶将单糖二核苷酸 UDP-GlcNAc 上的 GlcNAc-P 转移到高甘露糖寡糖链上的  $\alpha$ -1,6 甘露糖残基上, 再将第二个 GlcNAc-P 加到  $\alpha$ -1,3 的甘露糖残基上, 接着在高尔基体中间膜囊中磷酸葡萄糖苷酶除去末端的 GlcNAc 暴露出磷酸基团, 形成 M6P 标志。上述反应涉及磷酸转移酶如何从自内质网转入高尔基体的多种蛋白质中识别溶酶体酶, 现已确定在溶酶体酶分子中存在识别信号, 这种信号不是肽链的某些一级结构序列而是依赖于溶酶体酶的构象或三级结构形成的信号斑 (signal patch)。

多数溶酶体酶分子上具有多个 N-连接的寡糖链, 一旦 GlcNAc-磷酸转移酶识别了溶酶体酶的信号斑后, 在每条寡糖链上便可形成多个 M6P 残基。溶酶体酶与 GlcNAc-磷酸转移酶的识别位点的结合, 其亲和常数为  $K_d = 10^5$  L/mol, 在高尔基体 TGN 区, 含有多个 M6P 的溶酶体酶与 M6P 受体结合, 其亲和常数高达  $K_d = 10^9$  L/mol, 前后对比放大了 10 000 倍。在高尔基体 TGN 中, M6P 受体常集中地分布在某些 TGN 膜区, 从而使溶酶体酶与其他的蛋白质分离并起到局部浓缩的作用, 保证了它们以出芽的方式向溶酶体转移。M6P 受体有两种, 其中一种是依赖  $Ca^{2+}$  的受体, 它也作为胰岛素类生长因子 II 的受体, 这种受体已被纯化, 它在 pH 7.0 左右时与 M6P 结合, 而 pH 6.0 以下则与 M6P 分离。

在 TGN 形成的转移小泡首先将溶酶体酶转运到前溶酶体 (prelysosome) 中, 有人认为前溶酶体是载有溶酶体酶的脱包被的转运膜泡与晚期胞内体 (late endosome) 融合形成的。前溶酶体的基本特征是脂蛋白膜上具有质子泵, 腔内呈酸性, pH 6.0 左右。用抗 M6P 受体的抗体进行免疫标记, 显示 M6P 受体存在于高尔基体的 TGN 和前溶酶体 (晚期胞内体) 膜上, 但不存在于溶酶体膜上。如用弱碱性试剂处理体外培养细胞,

则 M6P 受体从高尔基体的 TGN 上消失而仅存在于前溶酶体膜上，该结果提示，M6P 受体穿梭于高尔基体和前溶酶体之间。在高尔基体的中性环境中，M6P 受体与 M6P 结合，进入前溶酶体的酸性环境中后，M6P 受体与 M6P 分离，并返回高尔基体。同时在前溶酶体中，溶酶体酶 M6P 去磷酸化，进一步促使 M6P 受体与之彻底分离。在高尔基 TGN 包装溶酶体酶的转运膜泡是网格蛋白/AP 包被膜泡，但出芽后很快便脱包被，转运至晚期胞内体并与其融合。溶酶体的发生及其转运过程的见图 7-17 所示。

溶酶体酶的 M6P 特异标志是目前研究高尔基体分选机制中较为清楚的一条途径。然而这一分选体系的效率似乎不高，一部分含有 M6P 标志的溶酶体酶会通过转运膜泡直接分泌到细胞外。在细胞质膜上，存在依赖于  $Ca^{2+}$  的 M6P 受体，它同样可与胞外的溶酶体酶结合，在网格蛋白/AP 协助下通过受体介导的内吞作用，将酶送至前溶酶体中，M6P 受体也同样可返回细胞质膜，循

环使用。分泌到细胞外的溶酶体酶多数以酶前体的形式存在且具有一定的活性，但蛋白酶是一例外，其前体没有活性。蛋白酶需要进一步切割与加工才能成为有活性的蛋白酶，这一过程是否发生在前溶酶体或溶酶体中，尚不清楚。

已发现在正常淋巴细胞中，如在细胞毒 T 细胞和天然杀伤细胞的溶酶体中，既含有溶酶体酶也含有水溶性蛋白穿孔蛋白 (perforin) 和粒酶 (granzyme)，溶酶体酶是通过依赖于 M6P 的途径进入溶酶体；而后者是通过不依赖 M6P 的途径进入溶酶体。当细胞受到外界信号刺激后，这类溶酶体会像分泌泡一样释放内含物，杀伤靶细胞，因此又称这类溶酶体为分泌溶酶体 (secretory lysosome)。

在溶酶体中，除可溶性水解酶外，还有一些是结合在膜上的酶，如葡糖脑苷脂酶 (glucocerebrosidase)，此外还有溶酶体膜上的特异膜蛋白，这些蛋白也是在内质网上合成，经高尔基体加工与分选的。M6P 标志的作

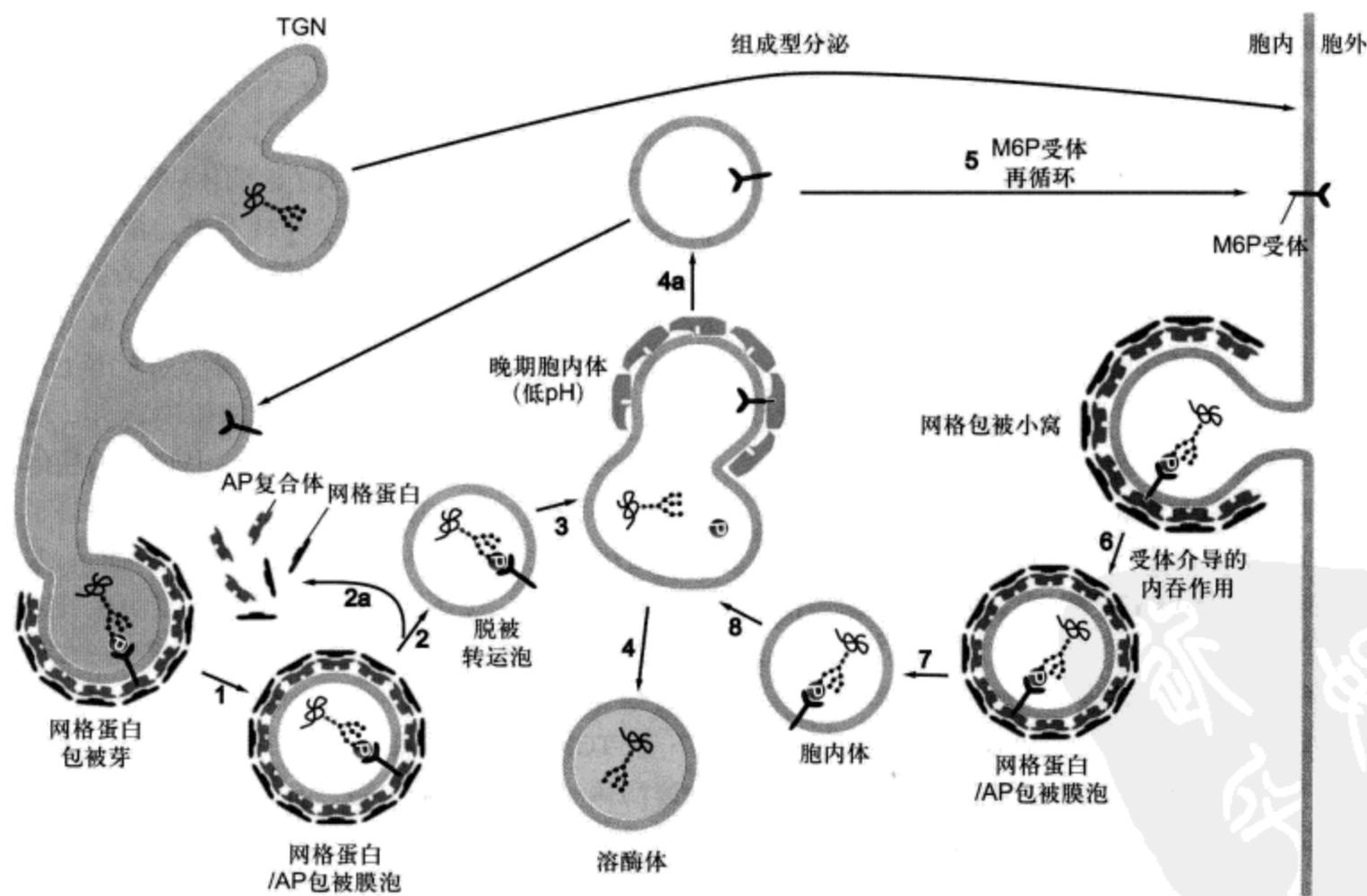


图 7-17 新合成的可溶性溶酶体酶从高尔基 TGN 和细胞表面转运到溶酶体的示意图

1. 具有 M6P 标记的溶酶体酶与膜受体结合，在 TGN 出芽，形成网格蛋白/AP 包被膜泡。2. 包被复合物解聚，形成脱被转运膜泡。3. 转运膜泡与晚期胞内体融合。4. 磷酸化的酶与 M6P 受体解离，形成溶酶体；2a 和 4a 表示包被蛋白和 M6P 受体可再循环利用。5. 某些受体可转运到细胞表面，磷酸化的溶酶体酶偶尔也会通过组成型分泌途径转运到细胞表面或分泌到细胞外。6~8. 分泌的酶通过受体介导的内吞作用被回收。

用是把可溶性的蛋白质结合在特异膜受体上,因此溶酶体的膜蛋白就无需 M6P 化,但这些膜蛋白如何同其他蛋白质区分开来而特异地分选到溶酶体膜上,其机制尚不清楚。实际上,溶酶体的发生可能是多种途径的复杂过程。不同种类的细胞可能采取不同的途径,同一种细胞也可能有不同的方式,甚至某些酶还可能通过不同的渠道进入溶酶体中,如酸性磷酸酶合成时是一种跨膜蛋白,它并不涉及 M6P 途径,而像其他膜蛋白那样经高尔基体转运到细胞表面,随后依赖于胞质侧部分酪氨酸残基信号,从细胞表面再转运到溶酶体,在胞质中巯基蛋白酶和溶酶体中天冬氨酸蛋白酶的作用下成为可溶性的酶。溶酶体酶的加工常常发生在它们进入溶酶体以后,不同种酶的加工方式也各自不同,然而有些加工,如糖侧链的部分水解,可能是溶酶体内特定环境造成的,对酶的活性并非必要。

#### (四) 溶酶体与疾病

溶酶体是细胞内消化的主要场所,由于遗传缺陷致使溶酶体中缺乏某种水解酶,导致相应的底物不能被降解而积蓄在溶酶体内,由于溶酶体过载、代谢紊乱,引起溶酶体储积症 (lysosomal storage diseases),例如泰-萨二氏病 (Tay-Sachs disease) 就是因为己糖胺酶 A 的先天性缺失,从而不能有效降解神经节苷脂 GM<sub>2</sub>,结果导致患儿智力迟钝、失明,一般在 2~6 岁死亡。还有一些其他类型的溶酶体储积症,也是由于相关溶酶体酶的缺失,引起底物储积造成的。另一个案例是 I 细胞病,其主要病因不是由于酶的生成障碍,而是由于 N-乙酰氨基葡萄糖磷酸转移酶缺乏 M6P 信号致使异常转运不能进入溶酶体而分泌进入血液,结果底物在溶酶体内积蓄形成很大的包含体。此外,由于不同因素引起溶酶体膜稳定性下降,导致溶酶体水解酶类外溢,也可导致与溶酶体相关的疾病发生,如矽肺、类风湿性关节炎等。

## 四、过氧化物酶体

过氧化物酶体 (peroxisome) 又称微体 (microbody),是由单层膜围绕的内含一种或几种氧化酶类的细胞器 (图 7-18)。1954 年, Rhodin 首次在鼠肾的肾小管上皮细胞中观察到这种细胞器。

由于微体在形态大小及降解生物大分子等功能上与溶酶体类似,再加上微体也是一种异质性的细胞器,其确切的生理功能尚不清楚,因此人们在很长时间里把它

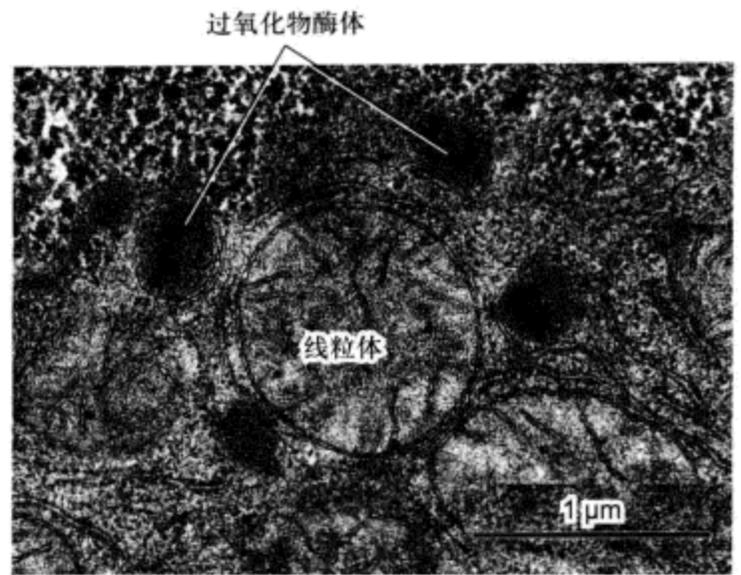


图 7-18 鼠肝细胞超薄切片所显示的过氧化物酶体和其他细胞器如线粒体等 (梁凤霞博士惠赠)

看做是某种特殊溶酶体,直至 20 世纪 70 年代才逐渐确认,微体是一种与溶酶体完全不同的细胞器。它普遍地存在于所有动物细胞和很多植物细胞中。早年以大鼠肝组织及种子植物的种子作为研究过氧化物酶体的实验材料。近些年来,人们从几种酵母菌及成纤维细胞中筛选出一系列过氧化物酶体缺陷突变株,进而克隆了 18 种之多与过氧化物酶体发生相关的基因 (称 *pex* 基因,对应的蛋白称 peroxin),从而对该细胞器结构、功能及其发生过程有了进一步了解。

#### (一) 过氧化物酶体与溶酶体的区别

过氧化物酶体和初级溶酶体的形态与大小类似,但过氧化物酶体中的尿酸氧化酶等常形成晶格状结构,因此可作为电镜下识别的主要特征。此外,这两种细胞器在成分、功能及发生方式等方面都有很大的差异,详见表 7-2 所示。

#### (二) 过氧化物酶体的功能

过氧化物酶体是一种异质性细胞器,不同生物的细胞中,甚至单细胞生物的不同个体中所含酶的种类及其行使的功能都有所不同。如在含糖培养液中生长的酵母细胞内过氧化物酶体的体积很小,但当它生长在含甲醇的培养液中时,过氧化物酶体体积增大、数量增多,可占细胞质体积的 80% 以上,并能氧化甲醇,当酵母生长在含脂肪酸培养基中,则过氧化物酶体非常发达,并可把脂肪酸分解成乙酰辅酶 A 供细胞利用。

对动物细胞过氧化物酶体的功能了解很少,已知在肝细胞或肾细胞中,它可氧化分解血液中的有毒成分,

表 7-2 微体与初级溶酶体的特征比较

特 征	溶酶体	微 体
形态大小	多呈球形，直径 0.2~0.5 μm，无酶晶体	球形，哺乳动物细胞中直径多在 0.15~0.25 μm，内常有酶的晶体
酶种类	酸性水解酶	含有氧化酶类
pH	5.0 左右	7.0 左右
是否需 O <sub>2</sub>	不需要	需要
功能	细胞内的消化作用	多种功能
发生	酶在糙面内质网合成，经高尔基体出芽形成	酶在细胞质基质中合成，经组装与分裂形成
识别的标志酶	酸性水解酶等	过氧化氢酶

起到解毒作用，例如饮酒后几乎半数的酒精是在过氧化物酶体中被氧化成乙醛的。

过氧化物酶体是真核细胞直接利用分子氧的细胞器，其中常含有两种酶：一是依赖于黄素（FAD）的氧化酶，其作用是将底物氧化形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>；二是过氧化氢酶，其含量常占过氧化物酶体蛋白质总量的 40%，它的作用是将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解，形成水和氧气。由这两种酶催化的反应，相互偶联，从而使细胞免受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的毒害。

过氧化物酶体可降解生物大分子，最终产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，其中多数反应也可在其他细胞器中进行，但并不产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。因此有的学者提出，过氧化物酶体另一种功能是分解脂肪酸等高能分子向细胞直接提供热能，而不必通过水解 ATP 的途径获得能量。在植物细胞中过氧化物酶体起着重要的作用。一是在绿色植物叶肉细胞中，它催化 CO<sub>2</sub> 固定反应的副产物的氧化，即所谓光呼吸作用；二是在种子萌发过程中，过氧化物酶体降解储存在种子中的脂肪酸产生乙酰辅酶 A，并进一步形

成琥珀酸，后者离开过氧化物酶体进一步转变成葡萄糖。因上述转化过程伴随着一系列称为乙醛酸循环的反应，因此又将这种过氧化物酶体称为乙醛酸循环体（glyoxysome）。在动物细胞中没有乙醛酸循环反应，因此动物细胞不能将脂肪中的脂肪酸转化成糖。

### （三）过氧化物酶体的发生

人们早期认为过氧化物酶体的发生与溶酶体类似，但现有的证据表明，过氧化物酶体的发生过程与线粒体或叶绿体类似，但在过氧化物酶体中不含 DNA，组成过氧化物酶体的膜蛋白和可溶性的基质蛋白均由细胞核基因编码，主要在细胞质基质中合成，然后分选转运到过氧化物酶体中。现在已知，过氧化物酶体的发生有 2 种途径：一是细胞内已有的成熟过氧化物酶体经分裂增殖而产生子代细胞器；二是在细胞内重新发生（*de novo*），过氧化物酶体重新发生包括 3 个阶段的装配过程（图 7-19）：① 过氧化物酶体的装配起始于内质

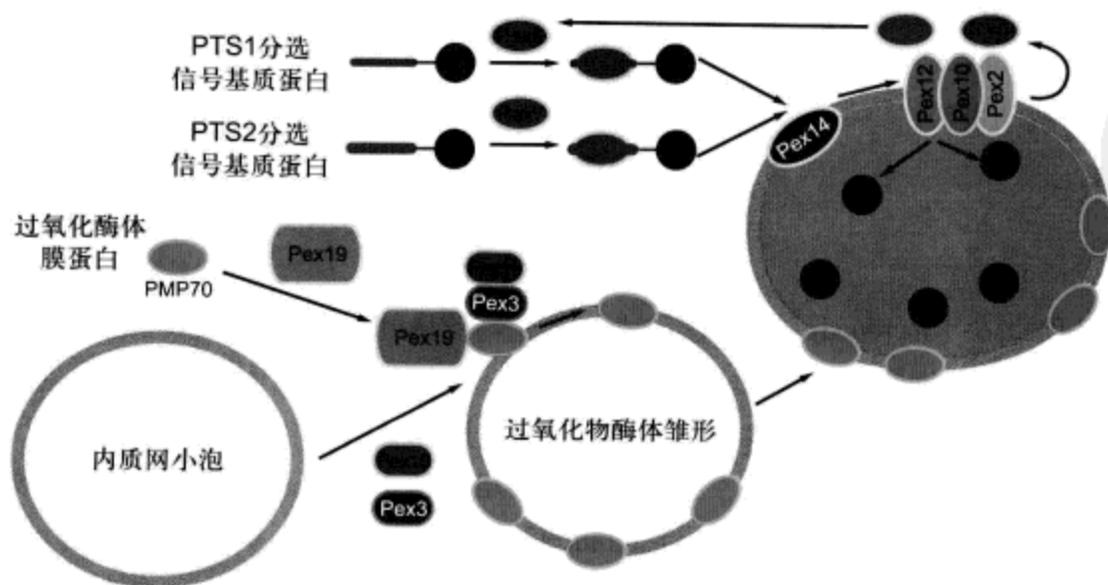


图 7-19 过氧化物酶体的生物发生与分裂过程的模型

网, 即由内质网出芽衍生出前体膜泡, 然后过氧化物酶体的膜蛋白掺入, 形成过氧化物酶体雏形 (peroxisomal ghost), 其中 Pex19 蛋白作为过氧化物酶体膜蛋白靶向序列的胞质受体而发挥作用, 另两种蛋白质 Pex3 和 Pex16 辅助过氧化物酶体膜蛋白正确插入新形成的前体膜泡, 待所有过氧化物酶体膜蛋白都插入后, 形成过氧化物酶体雏形, 为基质蛋白输入提供基础; ② 具有 PTS1 和 PTS2 分选信号的基质蛋白, 它们分别以 Pex5 和 Pex7 为胞质受体, 各自靶向序列与相应受体结合再与膜受体 (Pex14) 结合, 在膜蛋白复合物 (Pex10、Pex12 和 Pex2) 的介导下完成基质蛋白输入产生成熟的过氧化物酶体; ③ 成熟的过氧化物酶体经分裂产生子代过氧化物酶体, 分裂过程依赖于 Pex11 蛋白。

现已发现至少有 2 种以上的过氧化物酶体蛋白的分

选信号 (peroxisomal-targeting signal, PTS), 其中 PTS1 为 Ser-Lys-Leu, 存在于多数过氧化物酶体基质蛋白的 C 端。PTS2 为 Arg/Lys-Leu/Ile-5X-His/Gln-Leu, 存在于某些基质蛋白 N 端的前 20 至 30 个氨基酸序列中。PTS1 介导的过氧化物酶体基质蛋白的输入参见第八章蛋白质分选 (见图 8-8), PTS2 介导的过氧化物酶体基质蛋白的输入利用不同的胞质受体, 但机制与 PTS1 相同。构成过氧化物酶体的膜脂可能在内质网上合成后通过磷脂交换蛋白或膜泡运输方式完成其转运。

根据酵母突变体分析, 现已发现有 20 多种基因对过氧化物酶体的生物发生是必要的, 用研究两种特异蛋白相互作用的双杂交技术证明, 过氧化物酶体膜上存在几种可与信号序列相识别的受体蛋白, 但实际上还有许多细节是不清楚的。

## ● 思考题 ●

1. 你对细胞质基质的结构组成及其在细胞生命活动中作用作何理解?
2. 为什么说细胞内膜系统是一个结构与功能密切联系的动态性整体?
3. 试述内质网的主要功能及其质量监控作用。
4. 试述高尔基体的结构特征及其生理功能。
5. 蛋白质糖基化的基本类型、功能定位及生物学意义是什么?
6. 溶酶体是怎样发生的? 它有哪些基本功能?
7. 过氧化物酶体与溶酶体有哪些区别? 怎样理解过氧化物酶体是异质性的细胞器?

## ● 参考文献 ●

1. Arquhar M G, Palade G E. Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol*, 1998, 8: 2-10.
2. Bernales S, Papa F R, Walter P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22:487-508.
3. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4:181-191.
4. Hiderou Yoshida. ER stress and diseases. *FEBS J*, 2007, 274:630-658.
5. Hoepfner D, et al. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell*, 2005, 122: 85-95.
6. Kubota H. Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival. *J Biochem*, 2009, 146:609-616.
7. Raychaudhuri S, Prinz W A. Nonvesicular phospholipid transfer between peroxisomes and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:15 785-15 790.
8. Trombetta E S, Parod A J. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 649-676.
9. Yan A, Lennarz W J. Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. *J Biol Chem*, 2005, 280:3 121- 3 124.

# 蛋白质分选与膜泡运输

## 第一节 细胞内蛋白质的分选

哺乳动物细胞中通常可检测出上万吨蛋白质，酵母细胞中也含 5 000 种以上蛋白质。真核细胞中除线粒体和植物细胞叶绿体中能合成少量蛋白质外，绝大多数蛋白质都是由核基因编码，或在游离核糖体上合成，或在糙面内质网膜结合核糖体上合成。然而，蛋白质发挥结构或功能作用的部位几乎遍布细胞的各种区间或组分。因此必然存在不同的机制以确保蛋白质分选，转运至细胞的特定部位，也只有蛋白质各就各位并组装成结构与功能的复合体，才能参与实现细胞的各种生命活动。这一过程称蛋白质寻靶 (protein targeting) 或蛋白质分选 (protein sorting)。蛋白质分选与组装是涉及多种信号调控的复杂而重要的细胞生物学热点问题。

### 一、信号假说与蛋白质分选信号

George Palade 发现细胞质的游离核糖体产生非分泌蛋白，内质网附着核糖体能产生分泌蛋白。细胞学家们没有发现能解释游离和附着核糖体功能差异的不同结构。Palade 的学生 Günter Blobel 假设该差异应存在于蛋白本身。他和其同事 David Sabatini 推测分泌蛋白可能

携带 N 端短信号序列，一旦该序列从核糖体翻译合成，结合因子和蛋白结合，指导其转移到内质网膜，后续翻译过程将在内质网膜上进行。这就是 1975 年 Blobel 和 Sabatini 提出的信号假说 (signal hypothesis)。虽然这是假说，但存在信号序列的证据相继被发现。Philip Leder 及其同事构建的无细胞翻译系统产生比正常分泌抗体长 6~8 个氨基酸的轻链，其他人也获得相似的结果。在对 Blobel 和 Sabatini 的假说不知情的情况下，剑桥大学的 Cesar Milstein 基于他的无细胞系统提出相似假设，并且当研究人员检查微粒体的蛋白质时，发现只存在正常长度的蛋白质，他们假设这多余氨基酸序列在指导蛋白质转运至内质网有重要作用。尽管一些人质疑多出的蛋白量是体外翻译和分离的错误，但 Blobel 等人设计了一种蛋白质体外翻译-转运系统，获得了一系列信号假说的证据，包括利用鼠的 mRNA、兔的核糖体和狗的内质网 (胰腺微粒体) 组建的翻译-转运系统可能是一个通用系统。探究细胞内蛋白质转运机制的诸多细节花费了 20 多年时间，其中洛克菲勒大学的 Blobel 在 1999 年由此获诺贝尔生理学或医学奖。

现已知，指导分泌性蛋白质在糙面内质网上合成的决定因素是由蛋白质 N 端的信号肽 (signal peptide)、信号识别颗粒 (signal recognition particle, SRP) 和内质网膜上信号识别颗粒的受体 (又称停泊蛋白, docking protein, DP) 等因子共同协助完成的。

信号肽位于蛋白质的 N 端，一般由 16~26 个氨基酸残基组成，其中包括疏水核心区、信号肽的 C 端和 N



图 8-1 信号肽的一级结构序列

以血清白蛋白和 HIV-1 型病毒的糖蛋白 gp160 信号肽为例，显示出两者信号肽一级序列由疏水核心、C 端和 N 端 3 个区域构成。

端等 3 部分 (图 8-1)；原核细胞某些分泌性蛋白的 N 端也具有信号序列。信号肽似乎没有严格的专一性，如大鼠的胰岛素原蛋白接上真核或原核细胞的信号肽，均可通过大肠杆菌的细胞质膜分泌到细胞外。

信号识别颗粒是一种核糖核蛋白复合体 (图 8-2)，由 6 种不同的蛋白质和一个由 300 个核苷酸组成的 7S RNA 结合组成，SRP 通常存在于细胞质基质中，等待信号肽从多核糖体上延伸暴露出来，SRP 既可与新生肽信号序列和核糖体大亚基结合，又可与内质网膜上 SRP 受体结合。SRP 受体是内质网膜的整合蛋白，相对分子质量为  $7.2 \times 10^4$ ，由  $\alpha$  和  $\beta$  亚基组成，可特异地与信号识别颗粒结合。当 SRP 的 p54 亚基和 SRP 受体的  $\alpha$  亚基与 GTP 结合时，会增进 SRP/新生肽/核糖体复合物与 SRP 受体结合的结合强度。

应用体外非细胞系统 (cell free system) 进行蛋白质合成实验，证实分泌性蛋白向 rER (微粒体) 腔内的转运是同蛋白质翻译过程偶联进行的，这种分泌蛋白在信号肽引导下边翻译边跨膜转运的过程称为共翻译转运 (cotranslational translocation)。

体外非细胞系统蛋白质合成的实验证实，在分泌性蛋白合成过程中信号肽、信号识别颗粒和停泊蛋白之间的相互关系如表 8-1 所示。

根据已有研究资料和证据，对表 8-1 中的结果及分泌性蛋白在内质网上合成的共翻译转运过程可概括为

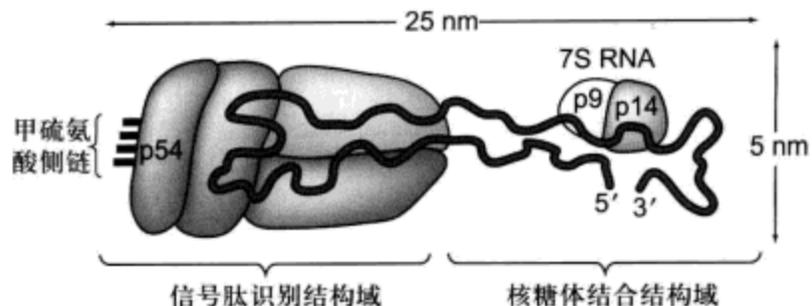


图 8-2 信号识别颗粒 (SRP) 的结构示意图

SRP 含有两个结构域，p54 蛋白是一种包含成簇甲硫氨酸残基的 GTP 酶，甲硫氨酸侧链与信号肽的疏水核心结合；当 SRP 与信号肽结合后，SRP 的 p9 和 p14 蛋白复合体阻断新生肽链的翻译。

如图 8-3 所示。

蛋白质首先在细胞质基质游离核糖体上起始合成，当多肽链延伸至 80 个左右氨基酸残基时，N 端的内质网信号序列暴露出核糖体并与信号识别颗粒结合，导致肽链延伸暂时停止，防止新生肽 N 端损伤和成熟前折叠 (图 8-3 步骤 1 和 2)，直至信号识别颗粒与内质网膜上的 SRP 受体结合 (图 8-3 步骤 3)，这种结合的相互作用被 GTP 与 SRP 和 SRP 受体 (DP) 的结合所强化。核糖体/新生肽与内质网膜的移位子 (translocon) 结合，信号识别颗粒脱离了信号序列和核糖体，返回细胞质基质中重复使用，肽链又开始延伸。以环化构象存在的信号肽与移位子组分结合并使孔道打开，信号肽穿入内质网膜并引导肽链以袢环的形式进入内质网腔中，这是一个耗能过程 (图 8-3 步骤 4)。与此同时，腔面上的信号肽酶切除信号肽并快速使之降解 (图 8-3 步骤 5)。肽链继续延伸 (图 8-3 步骤 6)，直至完成整个多肽链的合成，蛋白质进入腔内并折叠，核糖体释放，移位子关闭 (图 8-3 步骤 7 和 8)。

引导新生肽链穿过内质网膜移位子的信号肽可视为开始转移序列 (start transfer sequence)。肽链中还可能存在某些内在序列与内质网膜有很强的亲和力从而使之结合在脂双层之中，这段序列不再转入内质网腔中，称

表 8-1 在非细胞系统中蛋白质的翻译过程与 SRP、DP 和微粒体的关系

实验组别	含有编码信号序列的 mRNA	SRP	DP	微粒体	结果
1	+	-	-	-	产生含信号肽的完整多肽
2	+	+	-	-	合成 70~100 氨基酸残基后，肽链停止延伸
3	+	+	+	-	产生含信号肽的完整多肽
4	+	+	+	+	信号肽切除，多肽链进入微粒体中

“+”和“-”分别代表反应混合物中存在 (+) 或不存在 (-) 该物质。

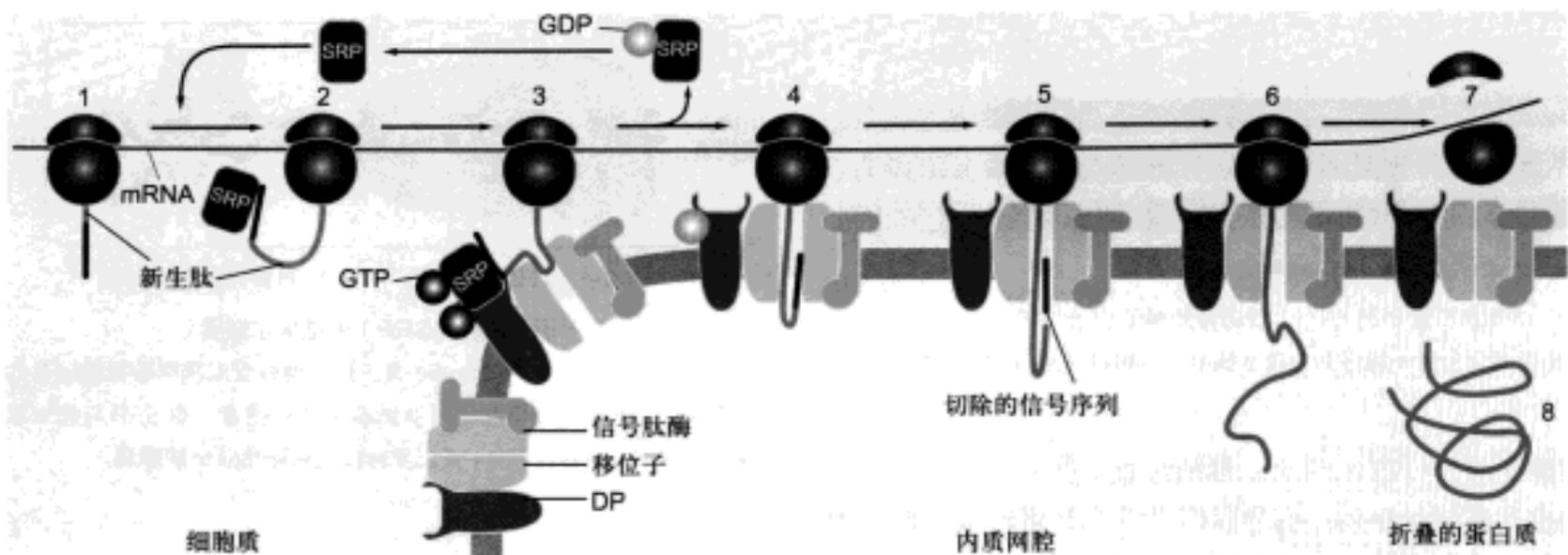


图 8-3 分泌性蛋白的合成与其跨越内质网膜的共翻译转运图解  
图示信号肽、SRP、DP 及移位子之间的相互作用。

之为内在停止转移锚定序列 (internal stop-transfer anchor sequence, STA) 和内在信号锚定序列 (internal signal-anchor sequence, SA)。如果一种多肽只有 N 端信号序列而没有停止转移锚定序列, 那么这种多肽合成后一般进入内质网腔中, 如果一种多肽的停止转移锚定序列位于多肽的内部, 那么这种多肽最终会成为内质网膜的跨膜整合蛋白。含有多个起始转移序列和多个停止转移锚定序列的多肽将成为多次跨膜的膜蛋白。膜蛋白跨膜的拓扑学结构可能就是由这些蛋白质一级结构中的开始和停止转移锚定序列共同决定的。在 rER 合成的整合膜蛋白根据拓扑学特征大体上可分为 4 类 (图 8-4), 它们的共同点是多肽链的 20~25 个疏水氨基酸残基形成跨膜  $\alpha$  螺旋, 不同点在于是否有 N 端可切割的 ER 信号序列, 定位方向或跨膜次数也会有所不同, 其中单次跨膜蛋白多肽内在停止转移锚定序列和信号锚定序列决定其

拓扑学特征, 多次跨膜蛋白具有多个内在停止转移锚定序列和信号锚定序列 (图 8-4)。新生肽链的跨膜取向主要受到跨膜片段侧翼氨基酸残基的电荷分布的影响, 一般而言, 带正电荷氨基酸残基一侧朝向细胞质基质一侧。

线粒体、叶绿体中绝大多数蛋白以及过氧化物酶体中的蛋白也是在某种信号序列的指导下进入这些细胞器中的。为了研究方便, 有人将这种信号序列称之为导肽 (leader peptide), 其基本的特征是蛋白质在细胞质基质中合成以后再转移到这些细胞器中, 因此称这种翻译-转运方式为后翻译转运 (post-translational translocation)。这种转运方式在蛋白质跨膜过程中不仅需要消耗 ATP 使多肽去折叠, 而且还需要一些分子伴侣蛋白的帮助 (如热休克蛋白 Hsp70), 以帮助蛋白正确折叠形成有功能的蛋白。

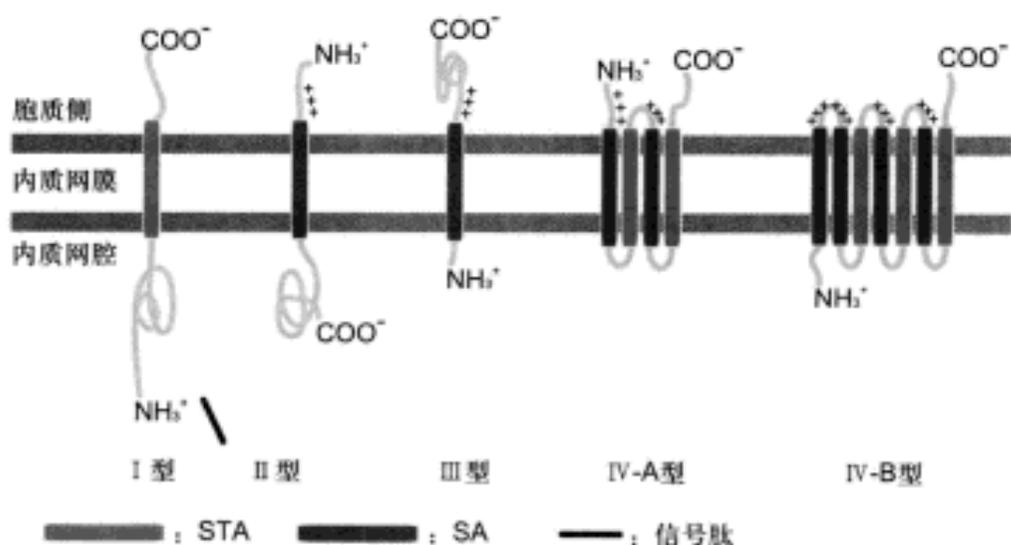


图 8-4 内质网膜整合蛋白的拓扑学类型

I 型: 如 LDL 受体、流感 HA、胰岛素受体、生长素受体; II 型: 无唾液酸糖蛋白受体、转铁蛋白受体、高尔基半乳糖苷转移酶、高尔基唾液酸转移酶; III 型: 细胞色素 P450; IV 型: G 蛋白偶联受体、葡萄糖转运蛋白、电压门  $\text{Ca}^{2+}$  通道、ABC 小分子泵、CFTR ( $\text{Cl}^-$ ) 通道、Sec61 蛋白。

表 8-2 指导蛋白质从细胞质基质转运到细胞器的靶向序列的主要特征\*

靶细胞器	蛋白质中信号序列的定位	信号序列是否切除	信号序列性质
内质网	N 端	切除	6~12 个疏水氨基酸核心, 前面常有一个或多个碱性氨基酸 (Arg、Lys)
线粒体 (基质)	N 端	切除	两性螺旋, 长度 20~50 个氨基酸残基, 一侧具有 Arg 和 Lys 残基, 另一侧是疏水残基
叶绿体 (基质)	N 端	切除	没有共同基序, 常富含 Ser、Thr 和少数疏水残基, 罕见 Glu 和 Asp
过氧化物酶体	大多在 C 端 少数在 N 端	不被切除	PTS1 信号 (Ser-Lys-Leu) 在 C 端, PTS2 信号在 N 端
细胞核	变化的	不被切除	多种类型, 共同基序含有短的富含 Lys 和 Arg 残基序列

\* 靶向细胞器的膜或其他亚区间的蛋白有不同或附加的信号序列。

继发现信号肽序列之后, 人们又相继发现一系列蛋白质分选信号序列 (表 8-2), 统称信号序列 (signal sequence)。有些信号序列还可形成三维结构的信号斑 (signal patch), 指导蛋白质转运至细胞的特定部位。

## 二、蛋白质分选转运的基本途径与类型

核基因编码的蛋白质的分选大体可分 2 条途径:

(1) 后翻译转运途径 即在细胞质基质游离核糖体上完成多肽链的合成, 然后转运至膜围绕的细胞器, 如线粒体、叶绿体、过氧化物酶体及细胞核, 或者成为细胞质基质的可溶性驻留蛋白和骨架蛋白 (图 8-5 右侧)。人们最近在酵母细胞中也发现有些分泌蛋白不是像大多数真核细胞那样, 边合成边跨膜转运, 而是由结合 ATP 的分子伴侣 Bip 蛋白 (Bip-ATP) 与膜整合蛋白 Sec63 复合物相互作用, 水解 ATP 提供动力驱动后翻译转运途径, 即分泌蛋白在细胞质基质游离核糖体上合成, 然后再转运至内质网中。

(2) 共翻译转运途径 即蛋白质合成在游离核糖体上起始之后, 由信号肽及其与之结合的 SRP 引导转移至糙面内质网, 然后新生肽边合成边转入糙面内质网腔或定位在 ER 膜上, 经转运膜泡运至高尔基体加工包装再分选至溶酶体、细胞质膜或分泌到细胞外, 内质网与高尔基体本身的蛋白质分选也是通过这一途径完成的 (图 8-5 左侧)。

根据蛋白质分选的转运方式或机制不同, 又可将蛋白质转运分为 4 类:

(1) 蛋白质的跨膜转运 (transmembrane transport) 主要是指共翻译转运途径中, 在细胞质基质中起始合成的蛋白质, 在信号肽-SRP 介导下转移到内质网, 然后边

合成边转运或进入内质网腔或插入内质网膜; 此外是指后翻译转运途径中, 在细胞质基质核糖体上完成合成的多肽链在不同靶向信号序列指导下, 依不同的机制转运到线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等细胞器。

(2) 膜泡运输 (vesicular transport) 蛋白质被不同类型的转运膜泡从糙面内质网合成部位转运至高尔基体进而分选转运至细胞的不同部位, 其中涉及供体膜出芽形成不同的转运膜泡、膜泡运输以及膜泡与靶膜的融合等过程。

(3) 选择性的门控转运 (gated transport) 在细胞质基质中合成的蛋白质通过核孔复合体在核-质间双向选择性地完成核输入或核输出, 参见核孔复合体的选择性运输。

(4) 细胞质基质中蛋白质的转运 上述几种分选类型也涉及蛋白质在细胞质基质中的转运, 这一过程显然与细胞骨架系统密切相关, 但由于细胞质基质的结构尚不清楚, 因此对其中的蛋白质转运特别是信号转导途径中蛋白质分子的转运方式了解甚少。

## 三、蛋白质向线粒体、叶绿体和过氧化物酶体的分选

和共翻译转运途径中分泌性蛋白或内质网膜蛋白 N 端信号肽引导序列定位于内质网不同, 后翻译转运途径中转运到线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等细胞器的蛋白质分选是一个多步过程, 需要多个不同的靶向序列 (targeting sequence), 定位到叶绿体的前体蛋白 N 端具有 40~50 个氨基酸组成的转运肽 (transit peptide), 用以指引多肽定位到叶绿体并进一步穿过叶绿体被膜进入基质或类囊体中。转运到线粒体和过氧化物酶体的蛋白质

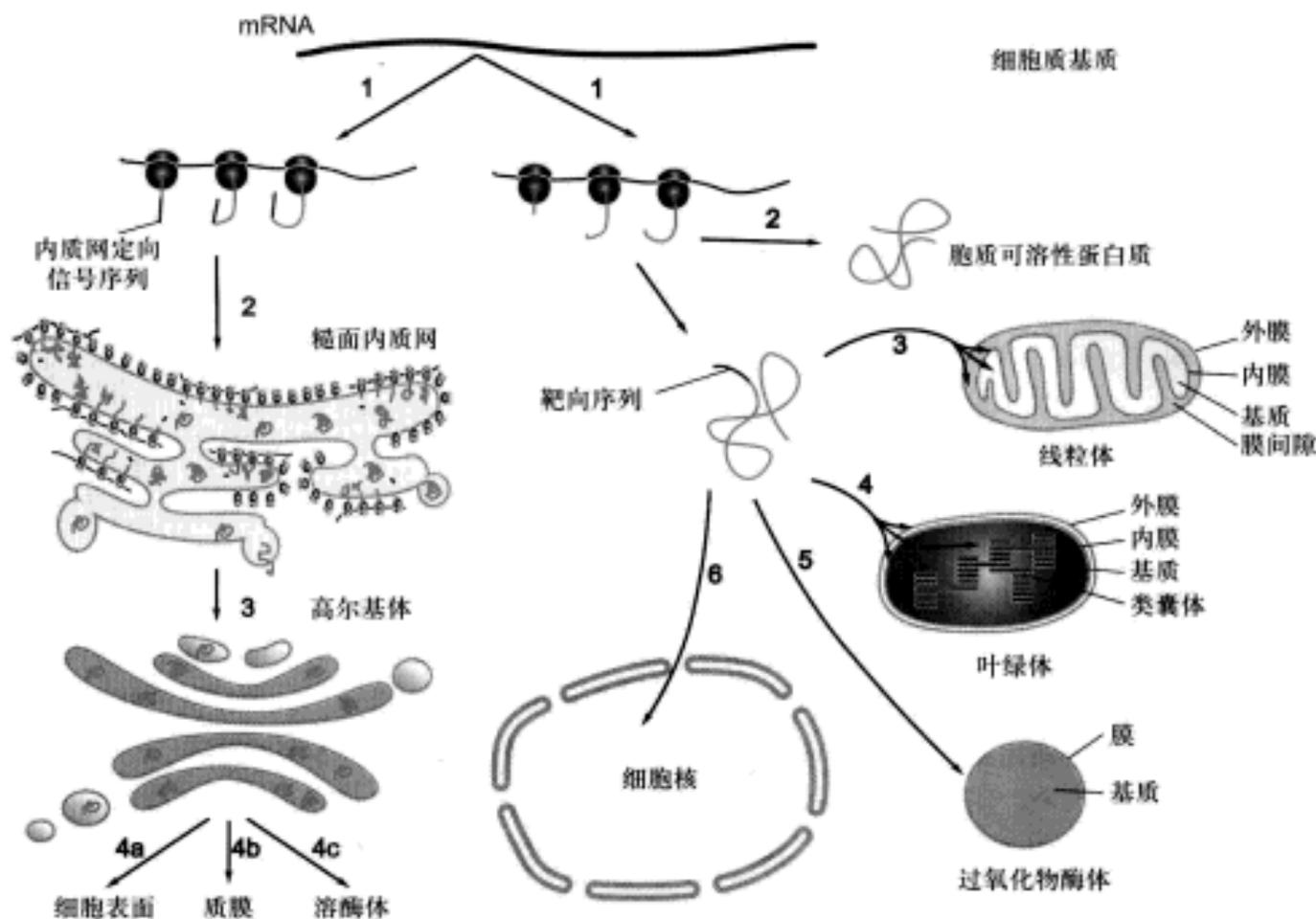


图 8-5 真核细胞蛋白质分选的主要途径与类型

图右侧（黑色序号）代表后翻译转运的非分泌途径：核基因编码的 mRNA 在细胞质基质游离核糖体上完成多肽链的合成。途径 2 表示合成的蛋白不含信号序列，并驻留在细胞质基质中。途径 3、4、5 分别表示依据不同的细胞器特异性的靶向序列，首先释放到细胞质基质，然后通过跨膜运输方式转运至线粒体、叶绿体和过氧化物酶体。途径 6 表示通过门控运输方式转运至细胞核。图左侧（红色序号）代表共翻译转运的蛋白质分泌途径：核基因编码的 mRNA 在细胞质基质游离核糖体上起始合成，然后在信号肽及其结合的 SRP 引导下与内质网膜结合并完成蛋白质合成。途径 2 表示在 rER 完成蛋白质合成，途径 3 表示以膜泡运输方式转运至高尔基体，途径 4a、4b、4c 表示以膜泡运输方式分选至细胞表面、质膜和溶酶体。

与此类似，但靠的是不同的引导序列，即线粒体蛋白 N 端的导肽或过氧化物酶体蛋白 C 端的内在靶向序列（见表 8-2）。至于这些细胞器蛋白最终是定位在不同的膜上还是不同的基质空间，除 N 端不同转运肽外，还需要其他空间定位信号序列。此外，通过后翻译转运途径进入线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等细胞器的蛋白质，也必须在分子伴侣的帮助下解折叠或维持非折叠状态，这有利于通过膜上的输入装置，蛋白质输入这些细胞器通常是需能量的过程。

### （一）蛋白质从细胞质基质输入到线粒体

线粒体作为细胞产能和半自主性细胞器，核基因编码的蛋白质在细胞质基质游离核糖体上合成后向线粒体分选并各就各位，这对线粒体的功能活动具有重要意义。

（1）蛋白质从细胞质基质输入到线粒体基质 所有线粒体基质蛋白 N 端靶向信号序列虽然不尽相同，但共享相同的基序（motif），由 20~50 个氨基酸残基组成，富含疏水氨基酸，带正电荷的碱性氨基酸（Arg、Lys）和羟基氨基酸（Ser、Thr），缺少带负电荷的氨基酸（Asp、Glu）。这样的氨基酸残基组成有利于基质蛋白的靶向信号序列形成两性的  $\alpha$  螺旋构象，并且实验表明，两性的 N 端靶向信号序列对于指导蛋白质输入线粒体基质是至关重要的。蛋白质从细胞质基质输入到线粒体基质的基本步骤如图 8-6A 所示：在游离核糖体上合成的前体蛋白，与胞质蛋白分子伴侣 Hsc70 结合，并使其保持未折叠或部分折叠状态，其 N 端具有基质靶向序列（步骤 1），前体蛋白与内外膜接触点附近的输入受体（Tom20/22）结合（步骤 2），被转运进入输入孔（步骤 3），输入的蛋白进而通过内外膜接触点的输入通

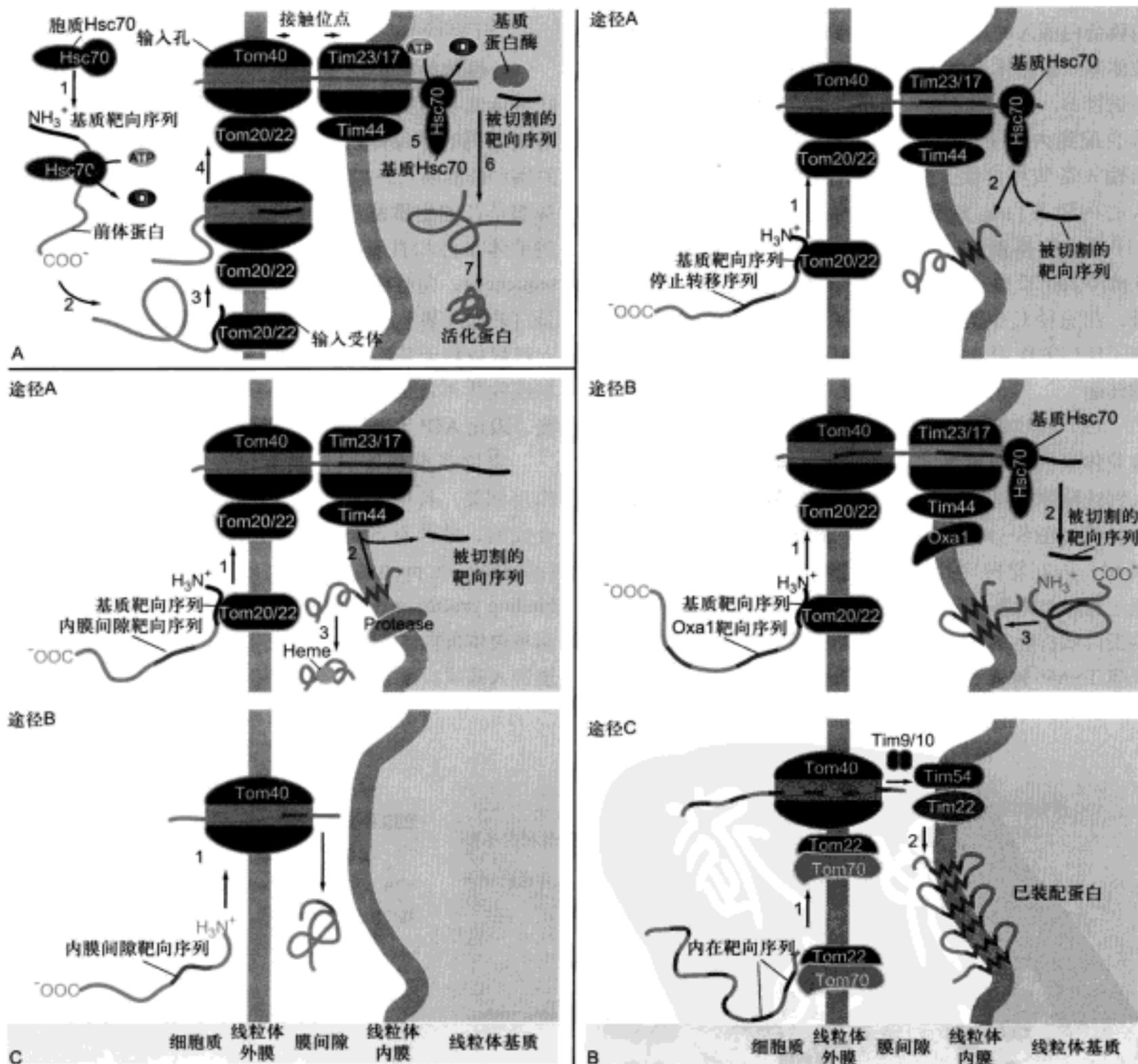


图 8-6 通过后翻译转运途径，核基因编码的线粒体蛋白的转运

A. 蛋白质从细胞质基质输入到线粒体基质。B. 线粒体蛋白通过 3 种途径从细胞质基质输入到线粒体内膜。C. 线粒体蛋白通过两种途径从细胞质基质输入到线粒体膜间隙。Tom: translocon of the outer membrane; Tim: translocon of the inner membrane。

道（外膜为 Tom40，内膜为 Tim23/17，步骤 4、5），线粒体基质分子伴侣 Hsc70 与输入蛋白结合并水解 ATP 以驱动基质蛋白的输入。输入的基质蛋白其基质靶向序列，在基质蛋白酶作用下被切除，同时 Hsc70 也从新输入的基质蛋白上释放出来（步骤 6），进而折叠，产生活性构象（步骤 7）。

(2) 蛋白质以 3 种途径从细胞质基质输入到线粒

体内膜 如图 8-6B 所示，途径 A 和途径 B 输入的线粒体蛋白其 N 端都有基质靶向序列，在线粒体外膜上都利用 Tom40 为输入孔道，外膜上 Tom22/20 作为识别 N 端基质靶向序列的输入受体，内膜转运蛋白都是 Tim23/17，但通过途径 B 输入的内膜蛋白（如 ATP 合酶亚基 9）不但具有 N 端基质靶向序列，还具有内在的疏水结构域，前者引导前体蛋白进入线粒体基质，后者

可被内膜蛋白 Oxal1 所识别, Oxal1 是一种与细菌中涉及内膜蛋白插入的相关蛋白, 由线粒体基因组编码, 在线粒体基质核糖体上合成。因此, 这类线粒体内膜蛋白通过途径 B, 其前体先进入基质, 基质靶向序列被切割后再装配到内膜上。在 A 和 B 两种途径中, 基质 Hsc70 与输入基质可溶性蛋白起相同作用。在途径 3 中, 输入的内膜蛋白是多次跨膜蛋白 (如 6 次跨膜的 ADP/ATP 反向交换蛋白), 缺少 N 端基质靶向序列, 含有被 Tom70/Tom22 输入受体识别的多个内在靶向序列。此外, 在途径 C 中两种膜间隙蛋白 (Tim9/10) 被认为起分子伴侣的作用, 协助输入蛋白在外膜与内膜通道之间的转运。

(3) 线粒体蛋白通过两条途径从细胞质基质输入到线粒体膜间隙 (图 8-6C) 途径 A 是从细胞质基质输入到线粒体膜间隙的主要途径, 其过程与内膜蛋白途径 A 类似 (图 8-6B), 但主要不同是蛋白质 (如细胞色素 b2) 内在靶向序列预定其定位在膜间隙, 并且在转运过程中被内膜上蛋白酶于膜间隙一侧切割, 然后释放的蛋白质折叠并与血红素结合。途径 B 转运的蛋白通过外膜 Tom40 输入孔, 直接进入膜间隙。

## (二) 叶绿体基质蛋白与类囊体蛋白的靶向输入

叶绿体的结构比线粒体还要复杂, 除外膜、内膜、叶绿体基质以外, 还有相对独立的类囊体空间, 由核基因编码的叶绿体基质蛋白包括所有 Calvin 循环有关的酶和核酮糖 1,5-二磷酸羧基歧化酶 (rubisco) 的小亚基都是在细胞质基质合成后输入到叶绿体基质的。这些前体蛋白均具有 N 端基质输入序列 (stromal-import sequence), 向叶绿体基质靶向运输过程和线粒体基质蛋白的输入基本相似, 前体蛋白以非折叠形式输入, 输入过程依赖于基质 Hsc70 蛋白催化 ATP 水解提供能量; 与线粒体不同的是, 叶绿体不产生跨内膜的电化学梯度, 因此 ATP 水解供能几乎是唯一动力来源。

定位在类囊体膜和类囊体腔的许多蛋白与光合作用相关, 其中大多数是在细胞质基质中以前体形式合成的, 并含有多个靶向序列。以质体蓝素前体蛋白 (plastocyanin precursor) 和金属结合前体蛋白 (metal-binding precursor) 为例, 如图 8-7 所示, 尚未折叠的两种前体蛋白首先通过外膜上相同的转运基质蛋白的通道进入基质, N 端基质靶向序列被基质蛋白酶切除, 从

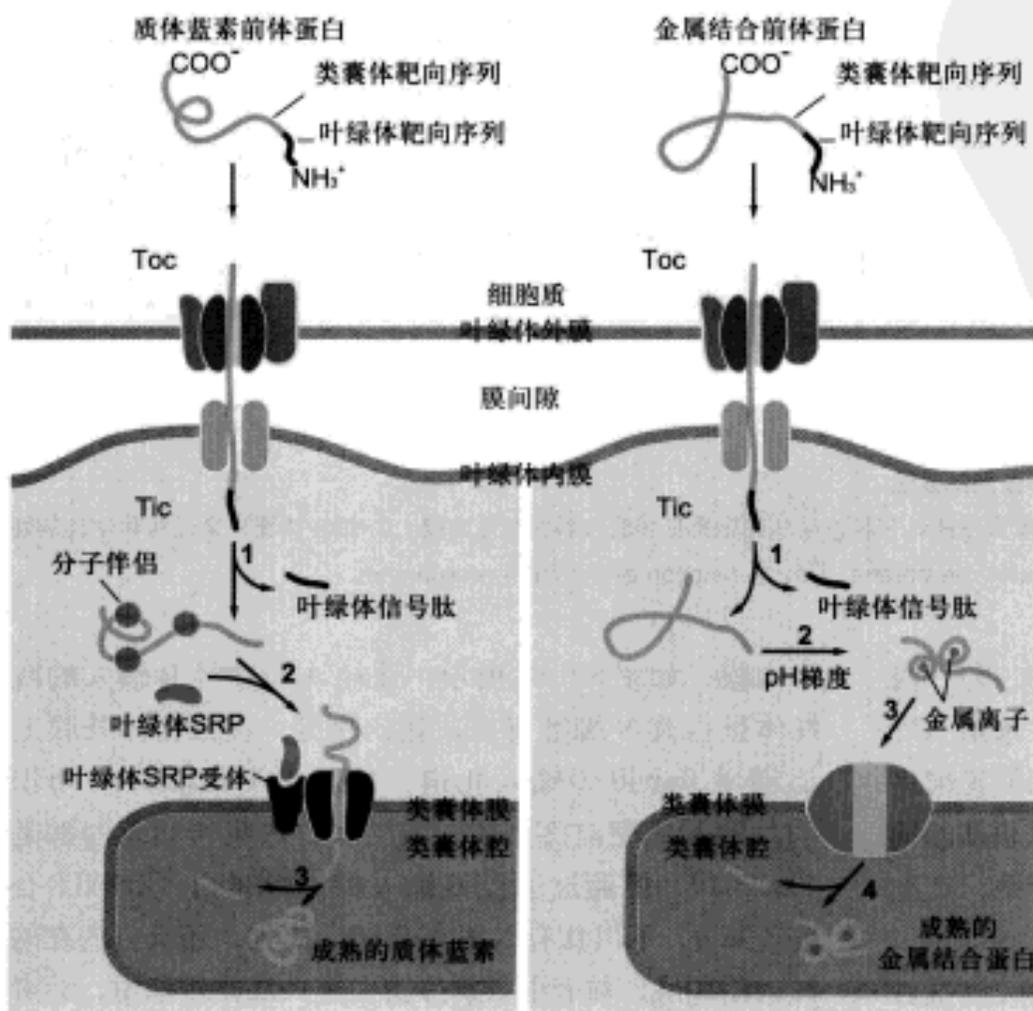


图 8-7 通过后翻译转运途径, 叶绿体蛋白从细胞质基质输入到类囊体腔

Tic: 内膜转运体复合物 (translocon of the inner membrane complex); Toc: 外膜转运体复合物 (translocon of the outer membrane complex)。

而使类囊体靶向序列暴露 (图 8-7 步骤 1); 进入基质后两种蛋白的转运途径产生分歧, 一个是 SRP 依赖途径: 质体蓝素蛋白和类似的蛋白在基质空间保持非折叠状态, 这需要一组分子伴侣参与 (图中未示), 在类囊体靶向序列指导下与叶绿体 SRP (和细菌 SRP 密切相关) 结合, 然后在类囊体膜上叶绿体 SRP 受体和转运蛋白 SecY 的介导下, 转运到类囊体腔 (图 8-7 步骤 2); 进入腔内后, 质体蓝素蛋白的类囊体靶向序列被内切蛋白酶 (endoprotease) 切除, 蛋白质折叠产生成熟构象 (图 8-7 步骤 3)。另一种是 pH 依赖的途径: 非折叠的金属结合蛋白的 N 端基质靶向序列首先被切除, 然后金属结合蛋白在基质中折叠并与其辅助因子结合 (图 8-7 步骤 2), 在类囊体靶向序列 N 端的两个精氨酸残基和跨叶绿体内膜的 pH 梯度是折叠蛋白输入到类囊体腔所必需的 (图 8-7 步骤 3); 类囊体膜上的转运蛋白至少由 4 种与细菌质膜相关的蛋白组成, 输入到类囊体腔的金属结合蛋白其 N 端的类囊体靶向序列被切除, 产生成熟的构象 (图 8-7 步骤 4)。

### (三) 过氧化物酶体蛋白的分选

与线粒体和叶绿体不同, 过氧化物酶体是真核细胞中唯一利用分子氧氧化底物形成小分子用于合成途径的细胞器, 它不含自身的 DNA 及核糖体, 因此所有蛋白质都是由核基因编码, 在细胞质基质中合成的, 然后输入到预存或新增殖产生的过氧化物酶体中。可溶性细胞质受体识别并结合具有 C 端 SKL (Ser-Lys-Leu) 序列的基质蛋白将其靶向运输到过氧化物酶体的基质中。如图 8-8 所示, 含有过氧化物酶体靶向序列 (peroxisomal-targeting sequence 1, PTS1) 的基质蛋白, 其 C 端信号序列为 3 肽 SKL, 它首先与胞质中可溶性 Pex5 受体蛋白结合 (步骤 1), 结合基质蛋白的 Pex5 受体再与过氧化物酶体膜上的 Pex14 受体相互作用 (步骤 2), 可溶性 Pex5 受体和膜结合的 Pex14 受体似乎与 SRP 和 SRP 受体的功能有相似性。基质蛋白-Pex5 受体复合物通过定位在过氧化物酶体膜上的一组蛋白质复合物 (Pex10/Pex12/Pex2) 以尚不清楚的机制转运到基质中 (步骤 3), 在转运过程或在基质中, Pex5 与 Pex10/12/2 复合物解离返回细胞质基质中再利用 (步骤 4), 值得注意的是折叠好的基质蛋白在 C 端 PTS1 指导下可以输入到过氧化物酶体基质中, 但其信号序列不被切除。此外, 蛋白质输入过氧化物酶体需要 ATP 水解, 但尚不清楚 ATP 释放的能量如何作为蛋白质单向跨膜转运的动力。

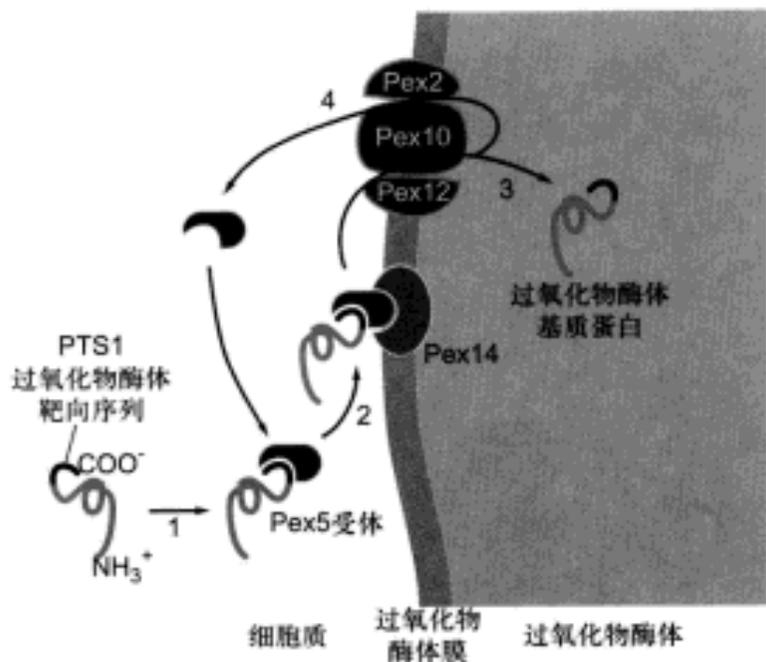


图 8-8 PTS1 指导的过氧化物酶体基质蛋白的输入

## 第二节 细胞内膜泡运输

### 一、膜泡运输概观

细胞必须依赖有效而精密的机制, 确保在糙面内质网合成的各种蛋白, 加工后在高尔基体 TGN 区通过形成不同的转运膜泡以不同的途径被分选、运输, 各就各位, 在特定时间和位点发挥其特定功能。膜泡运输是蛋白质分选的一种特有的方式, 普遍存在于真核细胞中。在转运过程中不仅涉及蛋白质本身的修饰、加工和组装, 还涉及多种不同膜泡靶向运输及其复杂的调控过程。在细胞分泌与胞吞过程中, 以膜泡运输方式介导蛋白质分选途径形成细胞内复杂的膜流 (membrane flow) (图 8-9), 这种膜流具有高度组织性、方向性并维持动态平衡。

在细胞的膜泡运输中, 糙面内质网相当于重要的物质供应站, 而高尔基体是重要的枢纽和集散中心。由于内质网的驻留蛋白具有回收信号, 即使有的蛋白发生逃逸, 也会被回收回来, 所以有人将内质网比喻成“开放的监狱”。既然高尔基体在细胞的膜泡运输及其随之而形成的膜流中起枢纽作用, 那么高尔基体在细胞中的位置如何确定, 高尔基体本身的特定成分又是如何保持的呢? 对高尔基体特征性蛋白进行免疫标记, 可观察到高

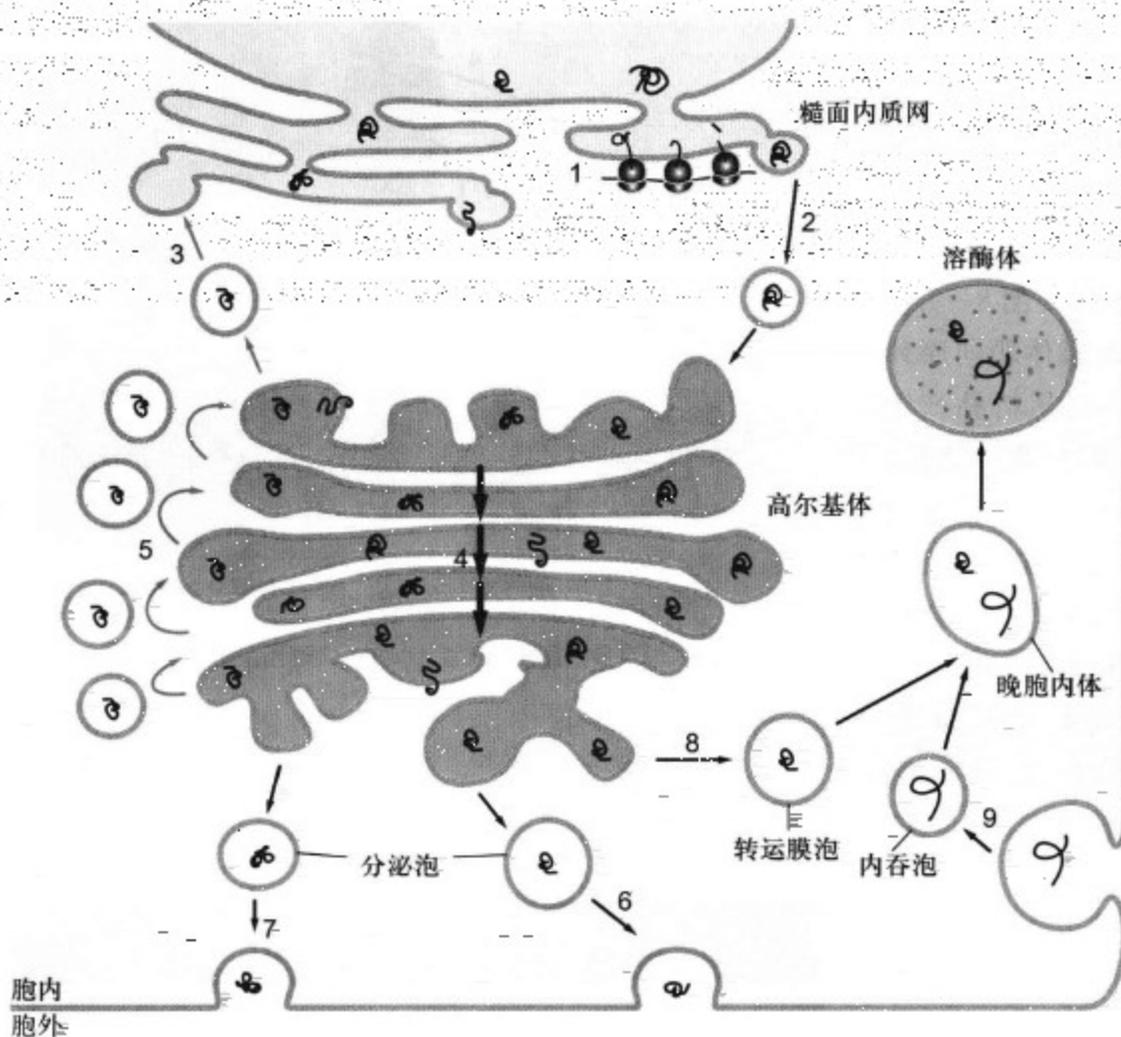


图 8-9 蛋白质的分泌与胞吞途径概观

1. 蛋白质在 rER 合成, 通过共翻译转运途径跨膜运输。2. 内质网出芽, 形成转运膜泡并与高尔基体融合, 形成高尔基体顺面膜囊和高尔基体顺面网状结构。3. 从高尔基体顺面膜囊和高尔基体顺面网状结构到 rER 的逆向运输。4. 高尔基体膜囊从顺面→反面成熟递进 (非膜泡过程)。5. 从高尔基体后期膜囊→早期膜囊的逆向运输。6. 组成型分泌。7. 调节型分泌。8. 分选到溶酶体。9. 胞吞途径。

高尔基体聚集在微管组织中心 (MTOC) 附近。在有丝分裂过程中用秋水仙素 (colchicine) 解聚微管后, 高尔基体也裂解成若干小囊泡分散在细胞质中。当微管再装配时, 囊泡又沿微管移向 MTOC, 重新形成高尔基体, 这种运动方式与内质网相反, 推测在高尔基体膜囊上结合有类似动力蛋白的马达蛋白, 从而使高尔基体靠近中心体, 并维持其极性。高尔基体不同的膜囊具有各自不同的成分。同样, 内质网、溶酶体、分泌泡和细胞质膜及胞内体也都具有各自相对稳定的特异性成分, 这是行使复杂膜泡运输功能的物质基础。例如, SRP 受体仅存在于内质网膜上, 而特定的糖苷转移酶和寡糖加工酶仅存在于某些高尔基体膜囊上。然而由内质网合成的蛋白质, 其中包括膜蛋白在通过高尔基体的转运与分选过程中经历了多次囊泡形成和与特定靶膜的融合过程, 因而推测每一步都可能都是通过特异信号介导并与相应受体相互作用实现的。蛋白质分子上某些信号可使其长期驻留在内质网或高尔基体中。另一些信号可使蛋白质不断从一个间隔转移到另一个间隔。因此, 很多蛋白质分子的表面可能含有多种介导转移与分选信号。转运膜泡形

成或出芽主要发生在膜的特异部位, 即蛋白信号与受体结合的部位。某些有囊膜病毒的出芽释放可看成膜泡转移的一种特例, 成分分析表明, 在病毒的囊膜中几乎不含有宿主细胞的膜蛋白而仅含病毒的囊膜蛋白。如果把病毒囊膜蛋白看成膜上受体, 似乎正是病毒核衣壳上的信号与受体的相互作用, 排除了细胞质膜上的其他多种膜蛋白。在细胞内的出芽、胞吞和膜融合过程中, 除受体外究竟有多少膜蛋白会从一个细胞间隔进入另一个细胞间隔, 目前还不清楚。但实验表明, 受体蛋白可以返回原来的膜结构中, 如从高尔基体的顺面膜囊返回内质网, 从溶酶体返回至高尔基体的 TGN 以及从受体介导的胞吞泡返回到细胞质膜上。显然这有利于维持特定膜成分的相对稳定。

细胞内膜泡运输需要多种转运膜泡参与, 根据转运膜泡表面包被蛋白的不同, 目前发现有 3 种不同类型: COP II (coat protein II) 包被膜泡、COP I (coat protein I) 包被膜泡和网格蛋白/接头蛋白 (clathrin/adaptor protein) 包被膜泡, 它们分别介导不同的膜泡转运途径 (表 8-3, 图 8-10)。

表 8-3 蛋白质转运中涉及的 3 种包被膜泡的特征比较

膜泡类型	介导的转运途径	包被蛋白	结合的 GTP 酶
COP II 包被膜泡	ER → 高尔基体顺面膜囊	Sec23/Sec24 和 Sec13/Sec31 复合物, Sec16	Sar1
COP I 包被膜泡	高尔基体顺面膜囊 → ER, 晚期高尔基扁平囊 → 早期扁平囊	包含 7 种不同 COP 亚基的包被蛋白	ARF
网格蛋白 / 接头蛋白包被膜泡	高尔基体反面膜囊 → 胞内体 高尔基体反面膜囊 → 胞内体 细胞膜 → 胞内体 高尔基体 → 溶酶体, 黑 ( 色 ) 素体或血小板囊泡	clathrin / AP1 clathrin / GGA clathrin / AP2 AP3 复合物**	ARF ARF 证据表明不需 ARF ARF

\* 新近证据表明, 在胞吞作用过程中, 不需要 ARF 参与。 \*\* 每种类型 AP 复合物由 4 种不同亚基组成。 AP3 复合物包被蛋白是否含有网格蛋白未知。

## 二、COP II 包被膜泡的装配与运输

COP II 包被膜泡介导细胞内顺向运输 (anterograde transport), 即负责从内质网到高尔基体的物质运输。 COP II 包被由下列蛋白组分形成: 小分子 GTP 结合蛋白 Sar1、 Sec23/Sec24 复合物、 Sec13/Sec31 复合物以及大的纤维蛋白 Sec16。 COP II 包被膜泡是通过胞质可溶性 COP II 包被蛋白在供体膜 (ER 膜) 出芽时聚合形成的, 包被装配的聚合过程受小分子 GTP 结合蛋白 Sar1 调控, Sar1 隶属 GTPase 超家族成员; 通过 GDP-Sar1/GTP-Sar1 的转换, 起分子开关调控作用。 COP II 包被膜泡的装配过程如图 8-11 所示: 细胞质中可溶性 Sar1-GDP 与 ER 膜蛋白 Sec12 (鸟苷酸交换因子) 相互作用, 催化 GTP 置换 GDP 形成 Sar1-GTP, GTP 的结合引发 Sar1 构象改变暴露出疏水 N 端并插入 ER 膜, 膜结合的 Sar1 对包被蛋白的进一步装配起募集者作用 (图 8-11 步骤 1), Sar1 与膜的结合提供了随后 Sec23/ Sec24 复合物的结合位点, 从而在 ER 膜出芽区形成三重复合

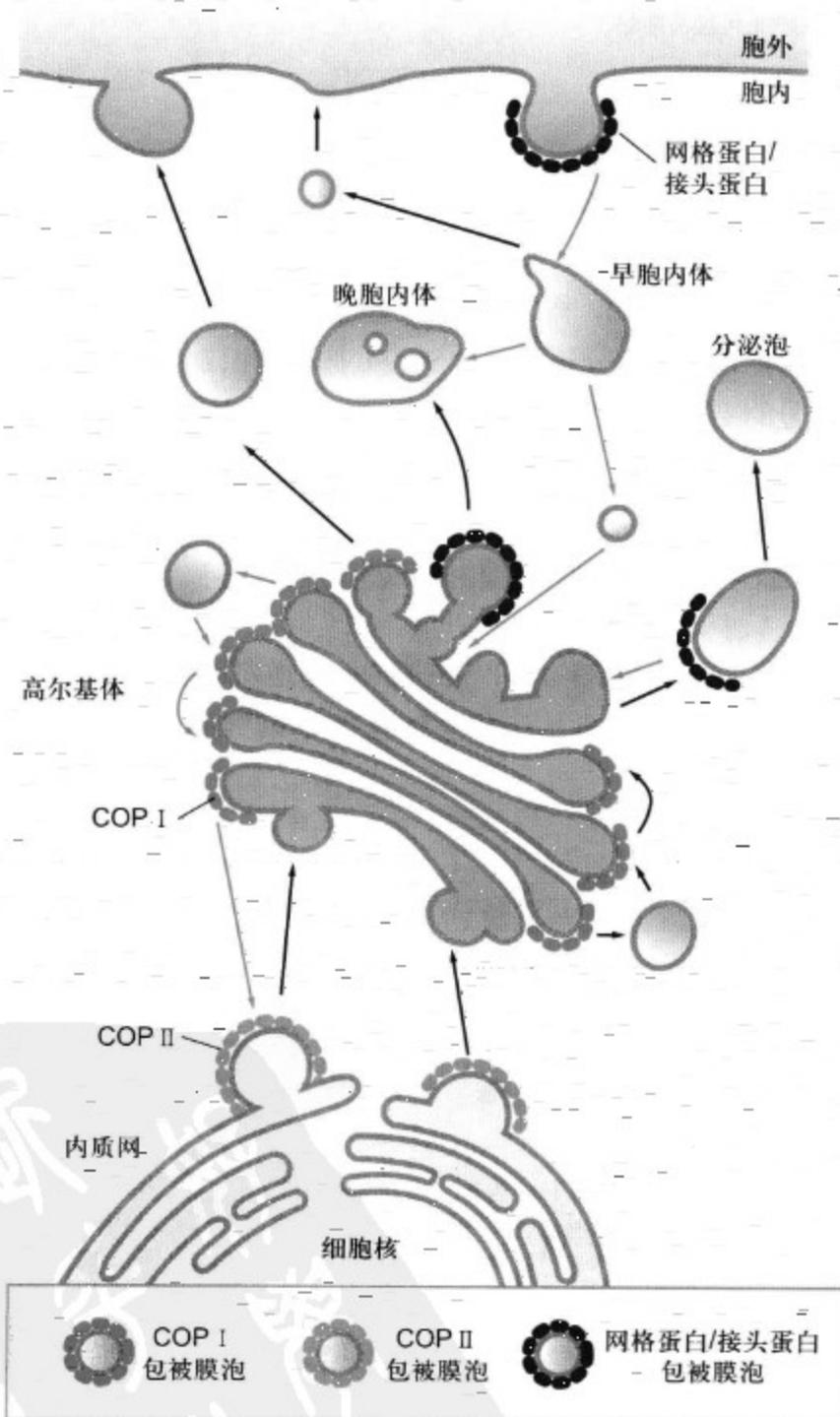


图 8-10 在细胞合成-分泌与内吞途径中 3 种不同的主要膜泡运输方式

1. COP II 包被膜泡介导顺向运输, 即从 rER 到高尔基体顺面网状结构。 2. COP I 包被膜泡介导逆向运输, 即在高尔基体内膜囊间和从高尔基体顺面膜囊和高尔基体顺面网状结构到 rER。 3. 网格蛋白 / 接头蛋白包被膜泡从高尔基体反面管网区出芽和从质膜内化形成, 脱去包被后的膜泡与晚期胞内体融合, 这类膜泡的包被除网格蛋白外还含有其他蛋白 (此处未表示)。分泌泡的包被蛋白尚未鉴定, 这些转运膜泡携带分泌蛋白和质膜蛋白从高尔基体反面管网结构转运到细胞表面。请注意, 分泌蛋白通过高尔基体顺面膜囊到高尔基体反面膜囊的递进方式的运输并不是通过膜泡所介导的运输。

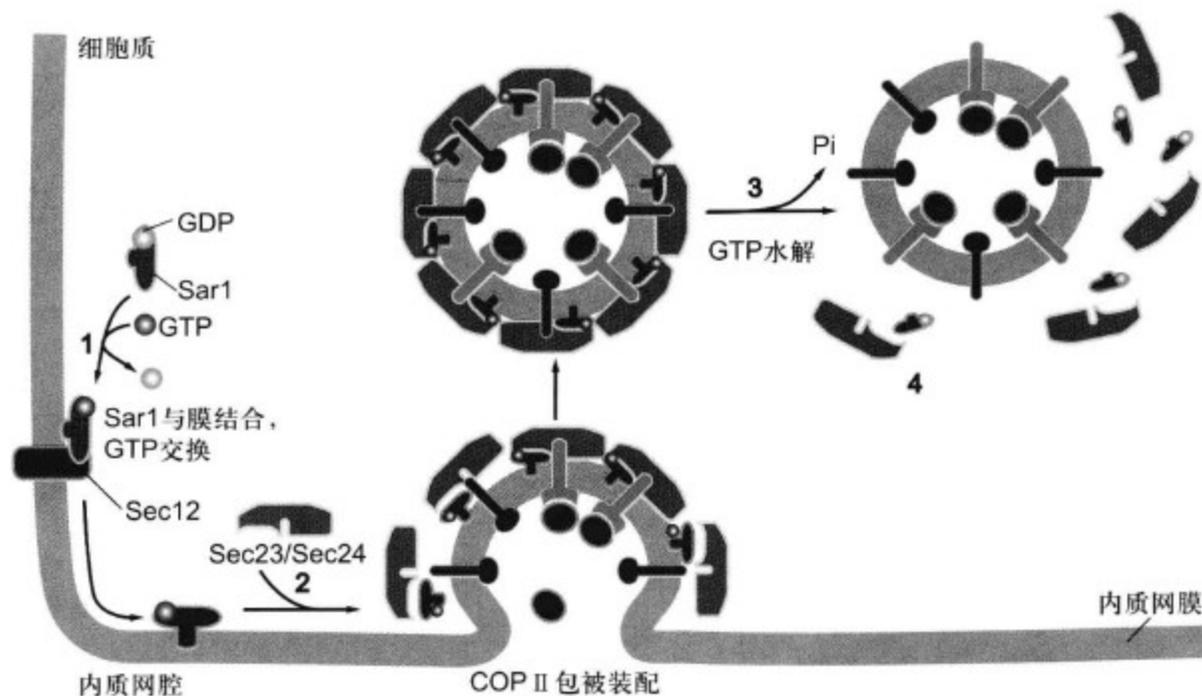


图 8-11 Sar1 蛋白在 Cop II 包被膜泡装配与去装配中作用模型

1. Sar1 与膜结合, GTP 交换。2. COP II 包被装配。3. GTP 水解。4. COP II 包被去装配。

物 Sar1-GTP/ Sec23/ Sec24 (图 8-11 步骤 2), 随后, Sec13/ Sec31 复合物与三重复合物结合 (图中未显示)。因为纯化的 Sec13 和 Sec31 蛋白具有自组装形成网格结构的特点, 因而发挥 COPII 包被骨架的作用。最后, 大的纤维蛋白 Sec16 结合在 ER 膜的胞质表面, 一方面与已装配的复合物相互作用, 另一方面组织其他包被蛋白的结合, 从而增加包被蛋白的聚合效率。当包被组装完成以后, Sec23 亚基促进 GTP 被 Sar1 水解 (图 8-11 步骤 3), Sar1-GDP 从膜泡上释放, 引发包被去装配而解聚 (图 8-11 步骤 4)。

膜泡运输既能转运膜结合的蛋白, 又能通过膜受体识别并转运可溶性蛋白, 其包装特异性取决于被转运

蛋白的靶向分选序列 (表 8-4), 借以区分哪些膜蛋白或可溶性蛋白将被进一步包装转运, 哪些将作为驻留蛋白而被排除在外, 从而膜泡包被直接选择靶向序列或分选信号。例如, 内质网被转运的膜蛋白具有二酸 (如: Asp-X-Glu) 分选信号, Sec24 亚基是识别并结合该信号的受体, 最终通过 COP II 包被膜泡从内质网转运到高尔基体 (图 8-12)。

### 三、COP I 包被膜泡的装配与运输

COP I 包被膜泡介导细胞内膜泡逆向运输 (retrograde transport), 负责从高尔基体反面膜囊到高尔基体顺面

表 8-4 已知的指导蛋白质包装到特异性转运膜泡的分选信号

信号序列	具有信号的蛋白	信号受体	转运膜泡类型
<b>腔内分选信号</b>			
Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)	ER-驻留可溶性蛋白	高尔基体顺面膜囊 KDEL 受体	COP I
甘露糖-6-磷酸 (M6P)	在高尔基体顺面膜囊加工后的可溶性溶酶体酶	高尔基体反面膜囊 M6P 受体	clathrin/AP1
	分泌的溶酶体	质膜上 M6P 受体	clathrin/AP2
<b>膜蛋白分选信号</b>			
Lys-Lys-X-X (KKXX)	ER-驻留膜蛋白	COP I $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基	COP I
两个酸性氨基酸 (如 Asp-X-Glu)	ER-转运膜蛋白	COP II Sec24 亚基	COP II
Asn-Pro-X-Tyr (NPXY)	质膜上 LDL 受体	AP2 复合物	clathrin/AP2
Tyr-X-X- $\Phi$ (YXX $\Phi$ )	高尔基体反面膜囊蛋白	AP1 ( $\mu$ 1 亚基)	clathrin/AP1
	质膜膜蛋白	AP2 ( $\mu$ 2 亚基)	clathrin/AP2
Leu-Leu (LL)	质膜膜蛋白	AP2 复合物	clathrin/AP2

X= 任意氨基酸;  $\Phi$ = 疏水氨基酸。括号内为单字母氨基酸缩写。

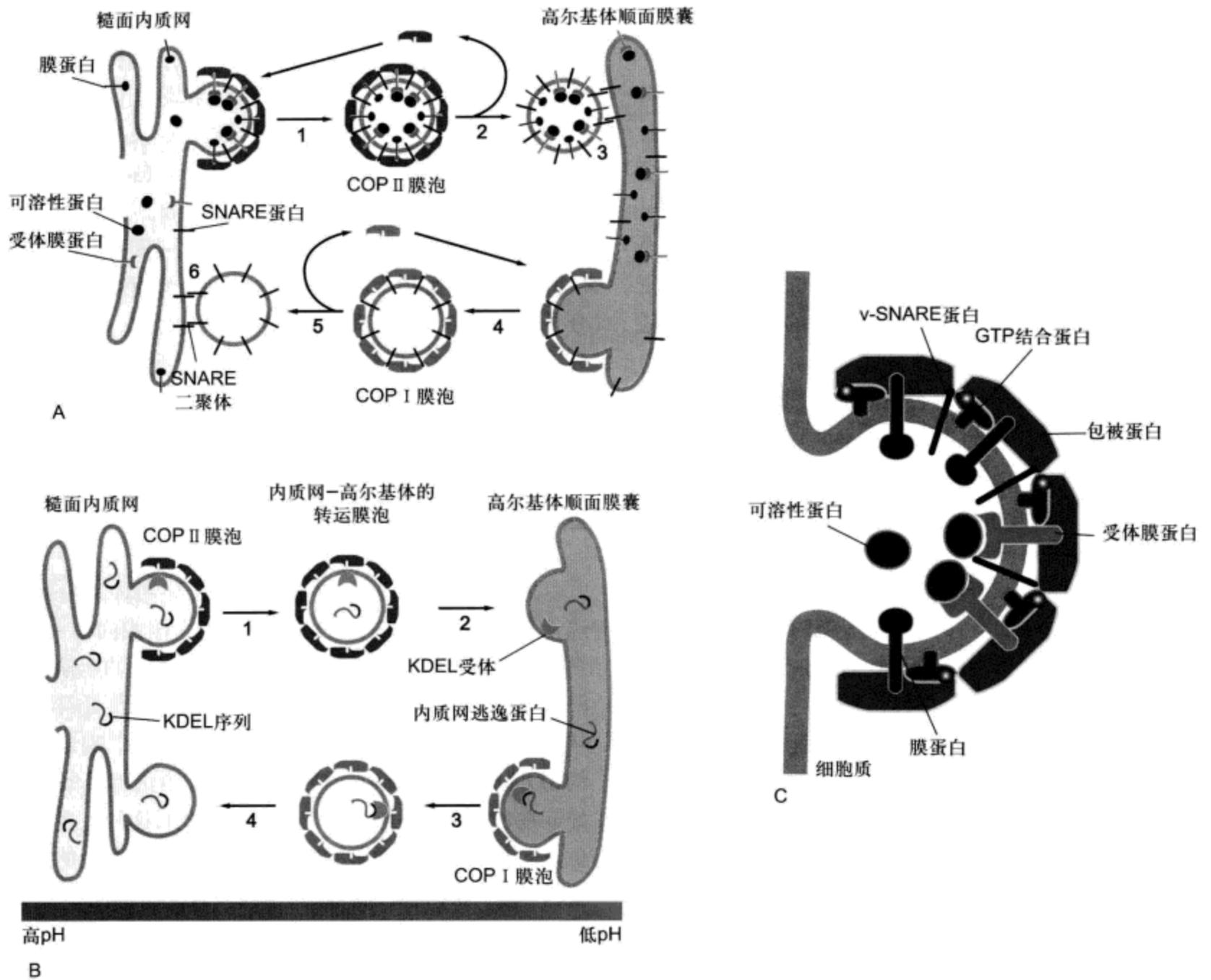


图 8-12 不同类型的膜泡运输

A. 在内质网与高尔基体之间，分别由 COP II 和 COP I 膜泡介导蛋白质顺向和逆向转运：步骤 1~3 表示由 COP II 包被膜泡介导的顺向运输，内质网膜出芽，可溶性包被蛋白复合物聚合形成膜泡包被；v-SNARE 和其他被转运的膜蛋白和可溶性蛋白（与芽泡膜上受体结合），通过与包被蛋白的相互作用被包装在膜泡内，包被复合物解聚再循环利用，v-SNARE 蛋白在脱包被膜泡表面得以暴露，以利于同靶膜的融合。步骤 4~6 表示由 COP I 包被膜泡介导的反向运输，膜脂双分子层、某些蛋白如 v-SNARE 和错误分选的内质网驻留蛋白，从高尔基体顺面网状区转运到内质网。B. KDEL 受体在从高尔基体回收内质网腔驻留蛋白中的作用：步骤 1~2 表示内质网腔中高水平存在的蛋白 C 端具有 KDEL 信号，被包装到 COP II 包被膜泡，并转运到高尔基体；步骤 3~4 表示内质网逃逸蛋白通过 COP I 膜泡介导的反向运输得以回收，注意，COP II、COP I 和高尔基体顺面网状区膜上均有识别与结合 KDEL 信号的受体，信号与受体的亲和力受到 pH 高低的影响，低 pH 促进结合，高 pH 有利于释放。C. 在供体膜内质网出芽及其转运蛋白的包装示意图：通过募集小分子 GTP 结合蛋白，引发供体膜出芽，然后，胞质中的包被蛋白复合物与被转运的膜蛋白胞质结构域结合，其中有些膜蛋白也作为腔内可溶性蛋白的受体。

膜囊以及从高尔基体顺面网状区到内质网的膜泡转运，包括再循环的膜脂双层、内质网驻留的可溶性蛋白和膜蛋白，是内质网回收错误分选的逃逸蛋白 (escaped protein) 的重要途径。

COP I 包被膜泡首先被分离鉴定，用不能被水解的 GTP 拟似物 (GTP analogues) 处理细胞，将引起

COP I 包被膜泡在细胞内聚集，并通过密度梯度离心法可将其从细胞匀浆中分离出来，分析发现 COP I 包被含有 7 种不同的蛋白质亚基和一种调节膜泡转运的 GTP 结合蛋白 ARF。和 Sar1 一样，ARF 也是一种结合 GDP/GTP 转换的分子开关调控蛋白，包被蛋白复合物 (coatamer) 的装配与去装配依赖于 ARF 所结合的核苷酸

交换与水解过程；此外，ARF 也参与网格蛋白包被膜泡的装配调节。

是什么因素决定一种特异蛋白是否被保留在内质网或进入高尔基体？已有研究证据显示，细胞器中的蛋白质是通过两种机制保留及回收来维持的：一是转运膜泡将驻留蛋白有效排斥在外，例如，有些驻留蛋白参与形成大的复合物，因而不能被包装在出芽形成的转运膜泡中，结果被保留下来；二是对逃逸蛋白的回收机制，使之返回它们正常驻留的部位。回收逃逸的内质网蛋白是通过回收信号介导的特异性受体完成的。现已发现，内质网的正常驻留蛋白，不管在腔内还是在膜上，它们在 C 端含有一段回收信号序列 (retrieval signal)，如果它们意外地被包装进入转运膜泡从内质网逃逸到高尔基体 CGN，则 CGN 区的膜结合受体蛋白将识别并结合这些逃逸蛋白的回收信号，形成 COP I 包被膜泡将它们回收到内质网 (图 8-12B)。如表 8-4 所示，内质网腔中的可溶性蛋白，如蛋白二硫键异构酶和协助折叠的分子伴侣，均具有典型的 KDEL 回收信号。如果一个内质网的蛋白缺乏 KDEL 序列，那么这种蛋白将不能返回内质网，而是被转运膜泡带到质膜。相反，如果通过基因重组方法使表达的溶酶体蛋白或分泌蛋白在 C 端含有一段附加的 KDEL 序列，那么这种蛋白将返回内质网，而不是被转运至溶酶体或分泌泡。内质网的膜蛋白如 SRP 受体，在 C 端有一个不同的回收信号，通常是 KKXX (K-lysine, X-任意氨基酸)，识别并结合该信号的受体是包被蛋白的 COP I  $\alpha$  和  $\beta$  亚基，从而促进它们返回到 ER。

在 ER 膜上整合蛋白 v-SNARE (供体膜受体蛋白，见下文膜融合) 和其他被转运蛋白是通过与包被蛋白的相互作用被包装到转运膜泡的，可溶性转运蛋白通过与出芽膜泡上相应受体的结合而被募集，包被膜泡脱去包被复合物，包被蛋白可再循环利用，而 v-SNARE 暴露在小泡膜表面。膜泡脱被后，在小分子 GTP 结合蛋白 Sar1 蛋白参与下，脱包被的膜泡留在高尔基体顺面膜囊，暴露的内质网膜蛋白 v-SNARE 与高尔基体顺面膜囊上同类蛋白 t-SNARE (靶膜受体蛋白，见下文膜融合) 相互配对，介导膜泡与靶膜融合，内含物释放进入高尔基体顺面膜囊。内质网腔中的蛋白 (特别是高浓度存在的腔内蛋白) 在出芽过程中可以被动掺入到 COP II 包被膜泡并转运到高尔基体。许多这类蛋白带有 C 端 KDEL 序列，KDEL 的受体主要定位在高尔基体 TGN 区、COP II 和 COP I 包被膜泡的膜上，它们能识别并

结合 KDEL 分选信号，二者的亲和性对 pH 变化非常敏感，内质网和高尔基体之间微小的 pH 差异都有利于携带 KDEL 序列的蛋白与高尔基体衍生膜泡上的受体结合，并有助于这些蛋白从内质网释放。如果在内质网发生错误包装和转运，由于 COP I 膜泡上也有 KDEL 受体，所以也能保证逃逸蛋白被内质网回收。

这种通过回收信号所介导的回收机制有利于防止内质网腔蛋白 (如用于新合成分泌蛋白正确折叠所需要的分子伴侣蛋白) 的损失。在生物合成途径中，每种膜组分也许都具有它自身独特的回收信号，所以任凭转运膜泡在特定空间不断运动，但每种细胞器仍可保持它独特的蛋白质组分。

#### 四、网格蛋白 / 接头蛋白包被膜泡的装配与运输

网格蛋白 / 接头蛋白包被膜泡介导几种蛋白质分选途径，包括从高尔基体 TGN 向胞内体或向溶酶体、黑 (色) 素体、血小板囊泡和植物细胞液泡的运输 (表 8-3)。另外，在受体介导的胞吞途径中还负责将物质从细胞表面运往胞内体转而在溶酶体的运输。高尔基体的 TGN 区是网格蛋白 / 接头蛋白包被膜泡形成的发源地，在功能上既是细胞分泌途径中物质转运的主要分选位点，又是网格蛋白包被膜泡的组装位点。典型的网格蛋白 / 接头蛋白包被膜泡是一类双层包被的膜泡，外层由网格蛋白组成，内层由接头蛋白复合物组成。纯化的网格蛋白分子呈三腿结构 (triskelion)，每个分支含一条重链和一条轻链。与 COP II 包被蛋白 Sec13/Sec31 复合物一样，网格蛋白也有自组装形成多角型网格的特性 (图 8-13A)，当网格蛋白在供体膜上聚合，便募集接头蛋白复合物到供体膜的胞质面并与网格蛋白结合，接头蛋白复合物一方面将网格蛋白网格包被连接到质膜上，另一方面又能特异性地促使一些膜结合蛋白富集到形成包被的膜区。现已发现有 3 种接头蛋白 (AP) 复合物 (AP1、AP2 和 AP3)，每种 AP 复合物含有 4 种 AP 蛋白亚基的一个拷贝，形成异四聚体。AP 复合物的一个亚基与网格蛋白重链远端的球形结构域特异性结合，一方面促进三腿网格蛋白与 AP 复合物的联合装配，同时也增加已装配包被的稳定性。正如小分子 GTP-结合蛋白 ARF 参与启动 COP I 包被装配一样，ARF 也参与网格蛋白 / 接头蛋白包被的起始装配。除三种 AP 复合物之外，还发现另一类接头蛋白 GGA，由单一多肽链组成。AP 或 GGA 复合物在膜泡的胞质

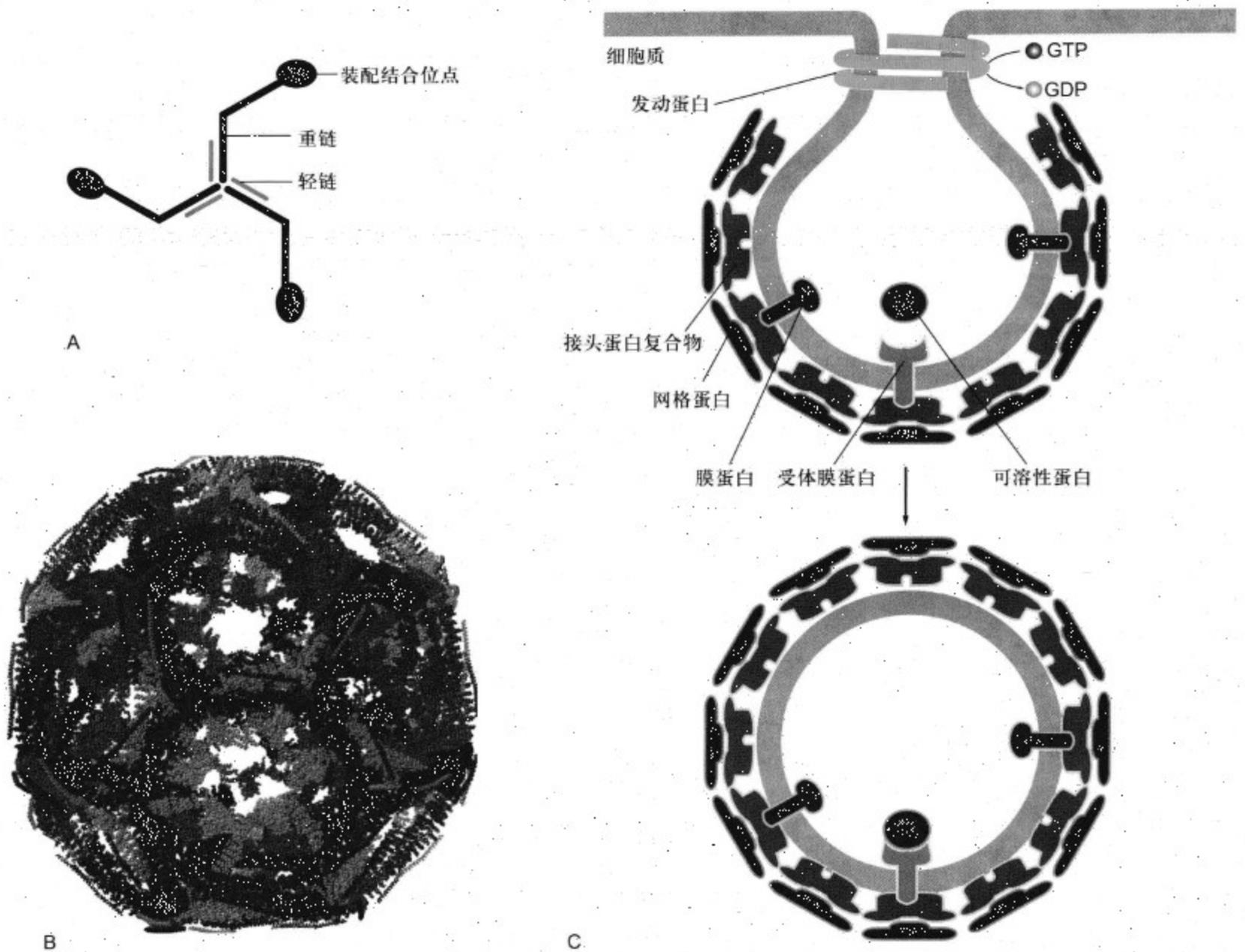


图 8-13 网格蛋白、多角形网格包被结构及发动蛋白介导的网格蛋白/接头蛋白包被膜泡的形成示意图

A. 三腿网格蛋白分子: 3 条重链, 3 条轻链。B. 在体外缺乏膜泡的情况下自组装的网格蛋白网格包被。C. 发动蛋白介导的网格蛋白/接头蛋白包被膜泡的形成示意图。(B 图基于 PDB 数据库 1XI4 结构绘制)

面与转运的膜蛋白或膜受体(结合腔内可溶性蛋白)特异性结合, 决定哪些蛋白将被包装转运或哪些蛋白将被排除在外, 这种特异性是由转运蛋白的分选信号决定的(表 8-4)。

网格蛋白/接头蛋白包被膜泡形成的首要步骤是供体膜出芽和包被的装配, 芽体如何缢缩并与供体膜断裂是网格蛋白/接头蛋白包被膜泡形成的关键, 发动蛋白(dynamin)具有 GTPase 活性, 它所介导的网格蛋白包被膜泡的组装模式见图 8-13C。在供体膜上网格蛋白/接头蛋白包被膜泡出芽形成后, 发动蛋白围绕颈部聚合, 然后催化 GTP 水解, 所释放的能量驱动发动蛋白构象改变, 导致网格蛋白/接头蛋白包被膜泡从供

体膜断裂并释放。如果人为使细胞表达突变型的发动蛋白, 则该蛋白将不能结合 GTP 并使之水解, 也不形成独立的网格蛋白/接头蛋白包被膜泡, 而是产生发动蛋白聚合包绕具有较长颈部的膜泡芽体。现在尚未发现 GTPase 也参与 COP I 和 COP II 膜泡芽体从供体膜的断裂, 更不清楚不同类型的包被膜泡断裂会有如此差异。但与 COP I 和 COP II 膜泡一样, 通常情况下网格蛋白/接头蛋白包被膜泡形成后不久便脱去包被, 网格蛋白/接头蛋白包被的解聚一方面涉及 ARF 开关蛋白从结合 GTP 状态转变为结合 GDP 状态, 另外也可能涉及 ATP 水解提供的能量。鉴于胞质内 Hsc70 蛋白是所有真核细胞中普遍存在的组成型分子伴侣, 因而被认为 Hsc70 致

使 ATP 水解释放的能量用于驱动网格蛋白 / 接头蛋白包被的去组装过程。脱包被的结果不仅释放三腿网格蛋白被循环再利用，而且由于包被去组装也会使 v-SNARE 得以暴露，利于膜泡与靶膜的融合。

## 五、转运膜泡与靶膜的锚定和融合

膜泡运输是十分复杂的过程，在酵母基因组中至少发现 25 种以上与膜泡转运有关的基因。膜泡运输的关键步骤至少涉及如下过程：① 供体膜的出芽、装配和断裂，形成不同的包被转运膜泡，该过程已在前面述及（图 8-12C 和图 8-13B）；② 在细胞内由马达蛋白驱动、以微管为轨道的膜泡运输（参见细胞骨架微管功能与相关马达蛋白）；③ 转运膜泡与特定靶膜的锚定和融合。现已知，在膜泡靶向转运过程中，有另一类小分子

GTP 结合蛋白，即 Rab 蛋白的参与。和 Sar1 与 ARF 蛋白一样，Rab 蛋白也属于开关调控蛋白 GTPase 超家族成员，在特异性鸟苷酸交换因子（GEF）催化下，胞质中 Rab-GDP 转换为 Rab-GTP，引发 Rab 构象改变致使其与特定转运膜泡的表面蛋白相互作用，并通过类异戊二烯（isoprenoid）基团插入转运膜泡内。一旦 Rab-GTP 被结合在膜泡表面，便与靶膜上称作 Rab 效应器（Rab effector）的结合蛋白相互作用，从而使转运膜泡被锚定在适当的靶膜上（图 8-14 步骤 1）。在膜泡融合发生以后，与 Rab-蛋白结合的 GTP 被水解成 GDP，随即引发 Rab-GDP 释放，然后再被用于进行 GDP-GTP 交换、结合与水解的下一个周期。有些证据表明，在膜泡融合事件中，涉及特异性 Rab 蛋白的参与，如酵母中 *sec4* 基因编码一种 Rab 蛋白，如果酵母细胞表达突变的 SEC4 蛋白，则细胞内将导致分泌泡的

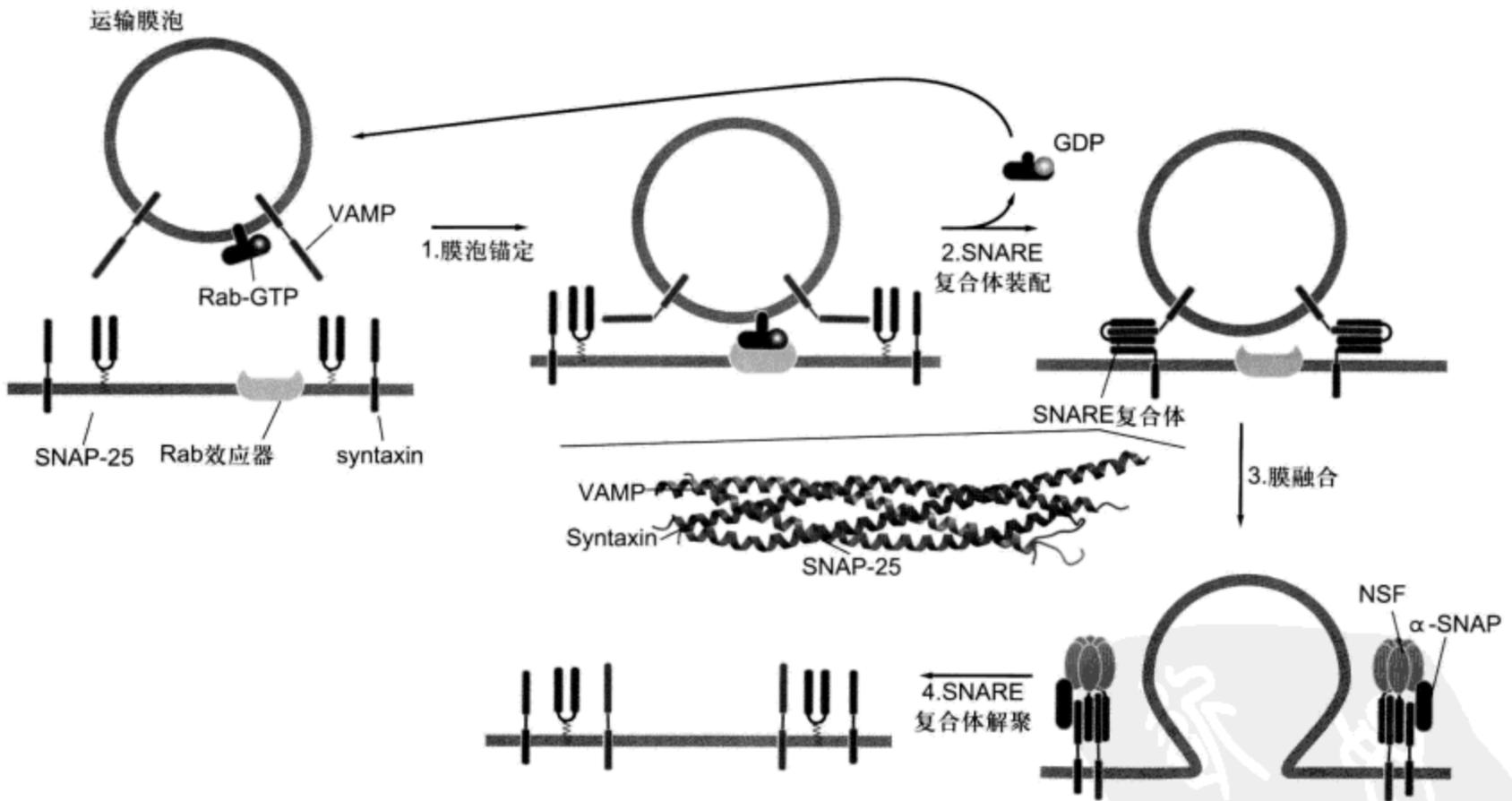


图 8-14 在供体膜和靶膜之间膜泡的锚定与融合模式图解

在供体膜上的鸟苷酸交换因子（GEF）识别并结合特异性 Rab 蛋白，诱发 GTP 置换 GDP，鸟苷酸交换引发 Rab 蛋白构象改变并暴露其共价结合的脂质基团，从而帮助 Rab-GTP 蛋白锚定在供体膜上，并随膜泡转移，在靶膜上 Rab-GTP 与 Rab 效应器结合，这种结合有助于膜泡锚定和 v-SNARE 与 t-SNARE 的配对（步骤 1）；v-SNARE 蛋白（图中 VAMP）与同类 t-SNARE（图中 syntaxin 和 SNAP25）胞质结构域相互作用，形成稳定的卷曲 SNARE 复合体，将膜泡与靶膜紧密束缚在一起（步骤 2）；伴随 SNARE 复合物形成后，供体膜泡与靶膜随即融合（步骤 3）；两膜融合后，NSF 联合  $\alpha$ -SNAP 蛋白随即与 SNARE 复合体结合，然后 NSF 催化 ATP 水解，驱动 SNARE 复合体解离，游离的 SNARE 蛋白再用于其他膜泡的融合（步骤 4）。具有 GTPase 活性的 Rab 蛋白水解与之结合的 GTP，释放可溶性的 Rab-GDP 进入细胞质。在细胞质中 Rab-GDP 与 GDP 解离抑制物（GDI）结合，从而防止 Rab 蛋白从 Rab-GDP 复合物中释放出来，直至与 GEF 发生相互作用。（图中 SNARE 复合体模式图由孔祥鹏博士惠赠）

积累,而不能与质膜融合。在哺乳类细胞中,Rab5 蛋白被定位在作为早期胞内体的脱被内吞泡上,在无细胞系统实验体系中,早期胞内体彼此融合需要 Rab5 的存在。此外,在无细胞提取物中加入 GTP,则会促进胞内体彼此融合的速率。在早期胞内体膜上发现还存在一种长的卷曲蛋白,称之早期胞内体抗原 1 (early endosome antigen 1, EEA1),其功能是作为 Rab5 效应器而存在,这样,一种内吞泡膜上的 Rab5-GTP 与另一种内吞泡膜上的 EEA1 特异性结合,为膜泡间彼此融合提供了保障机制。

转运膜泡的形成、运输及其与靶膜的融合是一个耗能的特异性过程,涉及多种蛋白间识别、组装、去组装的复杂调控,膜泡与靶膜的选择性融合是保证细胞内定向膜流的重要因素之一。如果说小分子 GTP 结合蛋白 Rab 主要是控制转运膜泡与适当靶膜的锚定,那么,介导转运膜泡与靶膜融合的主要机制是 v-SNARE/t-SNARE 蛋白的配对。有些与融合相关的蛋白已被分离,特别是从神经细胞中分离出了参与特异性的膜泡锚定和融合的蛋白组分,如神经元突触前膜含有一种突触融合蛋白 (syntaxin),能与突触小泡膜上的膜蛋白 VAMP (vesicle-associated membrane protein) 特异性地结合,这两种蛋白的相互作用介导膜的融合和神经递质的释放。尽管酵母与哺乳类在进化上已有 10 亿年的分歧,而且酵母细胞也没有任何突触传递的功能活性,但却具有编码与突触融合蛋白和 VAMP 相似蛋白的基因家族,现已知酵母细胞表达 20 种以上不同的相关 v-SNARE 和 t-SNARE 蛋白,对每一种编码 SNARE 基因进行的突变缺陷分析证实,每种 SNARE 蛋白参与特异性的膜融合事件。考察所有融合事件表明,SNAREs 形成四螺旋束复合体,与 1 个 VAMP/1 个 syntaxin/2 个 SNAP25 组成的复合体一样 (图 8-14),其功能都是介导分泌泡与质膜融合,在其他类型的膜泡融合事件中,如 COP II 膜泡与高尔基体顺面网状区的融合,SNARE 复合体四螺旋束的组成 (1 个 v-SNARE/3 个 t-SNARE) 有所不同。应用体外脂质体融合试验,研究者可以检验各种 v-SNARE 和 t-SNARE 蛋白组合对介导供体膜与靶膜之间融合的能力,发现只有少数组合可以有效介导膜的融合,说明膜的融合是有选择性的。动物细胞融合需要一种可溶性的胞质融合蛋白 *N*-乙基马来酰亚胺敏感因子 (*N*-ethylmaleimide-sensitive factor, NSF) 和几种可溶性 NSF 结合蛋白 (soluble NSF attachment protein, SNAP),NSF 和 SNAP 负责介导不同类型膜泡

的融合,没有明显特异性。提供特异性保障的是 SNAP 受体 (SNAP receptor, 又称 SNARE),每种转运膜泡都有特异的 v-SNARE (vesicle-SNAP receptor),能识别并与靶膜上 t-SNARE (target-SNAP receptor) 彼此配对,形成稳定的卷曲 SNARE 复合体,因此正是通过 v-SNARE 与 t-SNARE 两类蛋白间的互补性和相互作用,决定了供体膜泡与靶膜的融合 (图 8-14)。SNARE 复合体的稳定性是靠蛋白分子间大量非共价键来维系的,因此融合完成后,SNARE 复合体必须消耗 ATP 水解能量而解离,释放的单一 SNARE 蛋白亚基再用于另外的融合事件。

## 六、细胞结构体系的组装

蛋白质等生物大分子如何逐级组装并最终形成赖以进行生命活动的细胞结构体系,这是当前生物学中所面临的基本问题之一。虽然分子生物学,结构生物学以及科学技术的快速发展为回答上述问题提供了可能性,但这一问题还远没有得到解决。

生物大分子的组装方式大体可分自我装配 (self-assembly)、协助装配 (aided-assembly) 和直接装配 (direct-assembly) 以及更为复杂的细胞结构及结构体系之间的组装。有些装配过程需 ATP 或 GTP 提供能量。自我装配的信息存在于装配大分子复合物亚基本身,当然也不排除细胞提供的装配环境,如 pH、离子种类及浓度等,这类装配可视为重新发生 (*de novo*)。协助装配方式在其大分子复合物装配过程中,除需要形成最终结构的亚基外,还需要其他组分的介入;或者对装配亚基进行修饰,以保障装配过程或正确行使功能。如 T4 噬菌体装配时需要一种支架蛋白 (scaffolding protein) 参与,装配完成后,这种支架蛋白离开 T4 噬菌体头部。直接装配是指某些亚基直接装配到预先形成的基础结构上,如细胞膜组分的更新与装配。

各种类型的装配具有以下重要的生物学意义:

(1) 减少和校正蛋白质合成中出现的错误 同 DNA 与 RNA 合成一样,如果蛋白质合成的错误率为  $10^{-3}$ ,那么合成一个由  $10^4$  个氨基酸残基组成的多肽链与  $10^2$  个氨基酸残基的多肽链相比,前者只有不到 0.01% 的多肽链是准确无误的,而后者可高达 90%。在装配过程中组装校正机制可进一步排除畸形的亚单位。

(2) 可大大减少所需的遗传物质信息量 如前所述,编码  $10^2$  个氨基酸残基多肽链 DNA 长度比编码  $10^4$

个氨基酸残基多肽链 DNA 长度相差 2 个数量级。

(3) 通过装配与去装配更容易调节与控制多种生物学过程 正如后文所提及的, 大分子间相互作用及其细胞结构或细胞器的装配是严格受控的有序过程, 这种定势与动态平衡是细胞结构完整性与功能多样性的保障。

当人们试图从分子水平来研究并解释生命现象及其本质时, 越来越多的实验证据表明, 某一种酶或某一代谢反应环节仅仅表现出一定的生物活性, 它固然是生命活动的基础, 然而对生命现象的了解尚须在更高的细胞结构层次上进行。事实上细胞内许多代谢活动往往涉及蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸、蛋白质与磷脂等组装成特定的复合体, 这些复合体构成了细胞结构体系的结构基础与功能单位。如在遗传信息结构体系中, 人们已熟知的 DNA 与组蛋白组装成的核小体是染色质结构的基本单位, rRNA 与核糖体蛋白组装成的核糖体是蛋白质合成的结构单位, 在进行蛋白质合成时又进一步与 mRNA 结合形成多核糖体 (polysome)。多核糖体还要与膜系统 (如内质网) 或骨架系统 (如微丝或中间丝) 相结合形成更为复杂的结构。只有这样合成的蛋白质才能正确地折叠、组装和分选, 并受控于整个细胞信号网络和参与细胞的生命活动。相比之下, 在试管的非细胞体系中合成的蛋白质, 即使其一级结构完全相同, 但在蛋白的折叠、修饰加工、转运以及合成的时相和调控等方面均无法与有序的活细胞相比, 因此可以说在试管内仅仅是某些生物活性的表现。

随着分子生物学研究的深入, 人们已更多地注意到这类反应复合体的组装及其功能。有些已赋予新的名称用于强调它在代谢中的重要性, 如 DNA 复制起始复合体 (primosome)、mRNA 拼接复合体 (spliceosome)、胞质中对错误折叠或变性损伤的蛋白质起降解作用的蛋白酶复合体 (proteasome) 等。至于糖酵解和三羧酸循环的酶系、电子传递链和光系统等都是在不同程度上组装成的反应复合体, 而它们又以不同的方式与不同的骨架系统或膜系统相结合发挥其在生命活动中的作用。

膜系统的组装特别是膜围绕的细胞器的组装是更高一个层次上的组装。膜围绕的细胞器大体分为两类: 一类是与细胞内膜系统相关的, 如内质网、高尔基体、溶酶体、胞内体等, 目前已有较多的了解; 另一类是含有遗传物质 DNA 的细胞器, 即线粒体和叶绿体, 细胞核可看作是真核细胞内最大、最复杂的细胞器。细胞器的组装同样涉及蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸、蛋白质

与膜脂的组装, 其运输和组装过程与方式也更为复杂。线粒体与叶绿体的组装还涉及自身的基因产物与核基因产物之间的协调等复杂调控过程, 其组装的突出特点是不能重新组装形成线粒体与叶绿体, 而只能在已有线粒体与叶绿体 (或前体) 基础上进行。

在细胞有丝分裂过程中, 绝大多数的细胞器经历去组装和重组的过程, 其中以细胞核的变化最为明显, 包括核膜与核纤层、核孔复合体、核仁的解体与重建。染色体去凝集与在核内重新排布, 也可看作是一种与核基质 (nuclear matrix) 等成份重新组装, 形成新的功能结构的过程, 行使基因复制与转录功能。细胞核体外重建技术, 为研究细胞核的组装过程与机制提供了一个较为理想的模型。相形之下, 线粒体、叶绿体和过氧化物酶体的组装, 特别是与细胞核调控关系的研究, 还处在寻找各种突变体或理想研究模型的阶段。某些病毒的组装与成熟过程可望成为研究细胞结构体系组装某些环节的模式。

在间期细胞中, 随着细胞周期进程中的物质更新, 细胞结构与细胞器也处于动态变化之中, 包括细胞骨架的组装与去组装, 质膜的更新以及某些细胞器的装配与去装配, 细胞结构体系的组装都伴随整个细胞周期的进程而进行, 细胞代谢状态也有所不同。因此研究细胞结构体系的组装与去组装对了解细胞的生长分化, 衰老和凋亡, 以及细胞的信息传递与应答是十分重要的。

细胞结构体系之间的相互关系是细胞结构体系组装的更高的一个层次, 正是各结构体系之间的相互协同与配合, 才表现出整体细胞的生命活动。细胞骨架体系在整个细胞结构体系中起了重要的组织作用。一方面它起到支持和联系的作用, 使整个细胞结构体系成为结构与功能上的统一整体; 另一方面它也像膜系统一样提供了很大的表面积, 并通过细胞质基质与核基质 (nuclear matrix) 进一步使细胞结构发生区域化分布。

分子生物学的成就与手段使我们有可能着手解决上述的难题。然而如将细胞结构体系的组装与动态变化放在整体细胞层次一起考虑时, 就会发现在这一复杂系统中确定的因果关系和叠加原则, 将会遇到难以克服的困难。即细胞结构体系组装与去组装的动态过程不能简单归于分子水平的活动。因此在分子水平研究的基础上借助于新的整体思维的理论与方法, 可能会使这一难题在高层次结构体系的组装的研究中取得突破性的进展。

## ● 思考题 ●

1. 何谓分泌性蛋白合成的信号肽学说, 涉及的主要组分如何协同作用?
2. 试述分泌蛋白的合成、加工及转运途径。
3. 试述细胞内膜泡运输的概况、类型及其各自主要功能。
4. 怎样理解细胞结构组装的生物学意义?

## ● 参考文献 ●

1. Dolezal P, *et al.* Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science*, 2006, 313:314-318.
2. Edeling M A, *et al.* Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7:32-44.
3. Gevorgyan-Airapetov L, *et al.* Interaction of Tim23 with Tim50 is essential for protein translocation by the mitochondrial TIM23 complex. *J Biol Chem*, 2009, 284:4 865-4 872.
4. Grosshans B L, *et al.* Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:11 821-11 827.
5. Gurkan C, *et al.* The COP II cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7:727-738.
6. Jahn R, Scheller R H. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 631- 643.
7. Martens S, McMahon H T. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9:543-556.
8. Mokranjac D, Neupert W. Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33:1 019-1 023.
9. Neupert W, Herrmann J M. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76:723-749.
10. Soll J, Schleiff E. Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5:198-208.
11. Wicknelr W, Schekman R. Protein translocation across biological membranes. *Science*, 2005, 310:1 452-1 456.

# 细胞信号转导

多细胞生物是一个有序而可控的细胞社会，这种社会性的维持不仅依赖于细胞的物质代谢与能量代谢，更依赖于细胞间通讯与信号调控，从而协调细胞的行为，诸如细胞生长、分裂、分化、调亡及其他各种生理功能。

## 第一节 细胞信号转导概述

细胞通讯 (cell communication) 是指一个信号产生细胞发出的信息通过介质 (又称配体) 传递到另一个靶细胞并与其相应的受体相互作用，然后通过细胞信号转导产生靶细胞内一系列生理生化变化，最终表现为靶细胞整体的生物学效应的过程。由此可见，细胞信号转导是实现细胞间通讯的关键过程，它是协调多细胞生物细胞间功能，控制细胞的生长和分裂，组织发生与形态建成所必需的。

### 一、细胞通讯

细胞通讯可概括为 3 种方式：① 细胞通过分泌化学信号进行细胞间通讯，这是多细胞生物普遍采用的通讯方式；② 细胞间接触依赖性通讯 (contact-dependent signaling)，细胞间直接接触，通过信号细胞跨膜信号分

子 (配体) 与相邻靶细胞表面受体相互作用；③ 动物相邻细胞间形成间隙连接 (gap junction)、植物细胞间通过胞间连丝 (plasmodesma) 使细胞间相互沟通，通过交换小分子来实现代谢偶联或电偶联，从而实现功能调控。

细胞分泌化学信号可长距离或短距离发挥作用，其作用方式分为：① 内分泌 (endocrine)，由内分泌细胞分泌信号分子 (如激素) 到血液中，通过血液循环运送到体内各个部位，作用于靶细胞 (图 9-1A)。② 旁分泌 (paracrine)，细胞通过分泌局部化学介质到细胞外液中，经过局部扩散作用于邻近靶细胞 (图 9-1B)，在多细胞生物中调节发育的许多生长因子往往是通过短距离而起作用的。此外，旁分泌方式对创伤或感染组织刺激细胞增殖以恢复功能也具有重要意义。③ 通过化学突触传递神经信号 (图 9-1C)，从作用范围来讲，也当属短距离局部作用，当神经元接受刺激后，神经信号以动作电位的形式沿轴突快速 (100 m/s) 传递至神经末梢，电压门控的  $\text{Ca}^{2+}$  通道将电信号转换为化学信号，即刺激突触前化学信号 (神经递质或神经肽) 小泡的分泌，在不到 1 ms 的时间内化学信号通过扩散经过相距不足 100 nm 的突触间隙到达突触后膜，再通过膜上配体门控通道将化学信号转换回电信号，实现电信号-化学信号-电信号的快速转导。④ 自分泌 (autocrine)，细胞对自身分泌的信号分子产生反应 (图 9-1D)。自分泌信号常存在于病理条件下，如肿瘤细胞合成并释放生长因子刺激细胞自身，导致肿瘤细胞的增殖；此外，通过

分泌信息素 (pheromone) 传递信息也属于通过化学信号进行细胞间通讯, 作用于同类的其他个体。

细胞间另一种通讯方式是接触依赖性通讯, 细胞间直接接触而无需信号分子的释放, 通过信号细胞质膜上的信号分子与靶细胞质膜上的受体分子相互作用来介导细胞间的通讯 (图 9-1E)。这种通讯方式包括细胞-细胞黏着、细胞-基质黏着, 这种接触依赖性通讯在胚胎发育过程中对组织内相邻细胞的分化命运具有

决定性影响。在胚胎发育过程中, 胚胎上皮细胞层将发育成神经组织。最初相邻的上皮细胞是彼此相同的, 但在发育过程中, 某些单个上皮细胞通过独立分化成为神经元, 而与其相邻的周边细胞则受到抑制保持非神经细胞状态。这是因为预分化形成神经元的细胞通过膜结合的抑制性信号分子 (Delta) 与其相接触的周边细胞的膜受体 (Notch, 见 Notch 信号通路) 相互作用, 阻止它们也分化为神经元。控制这一过程的信号是通过细胞

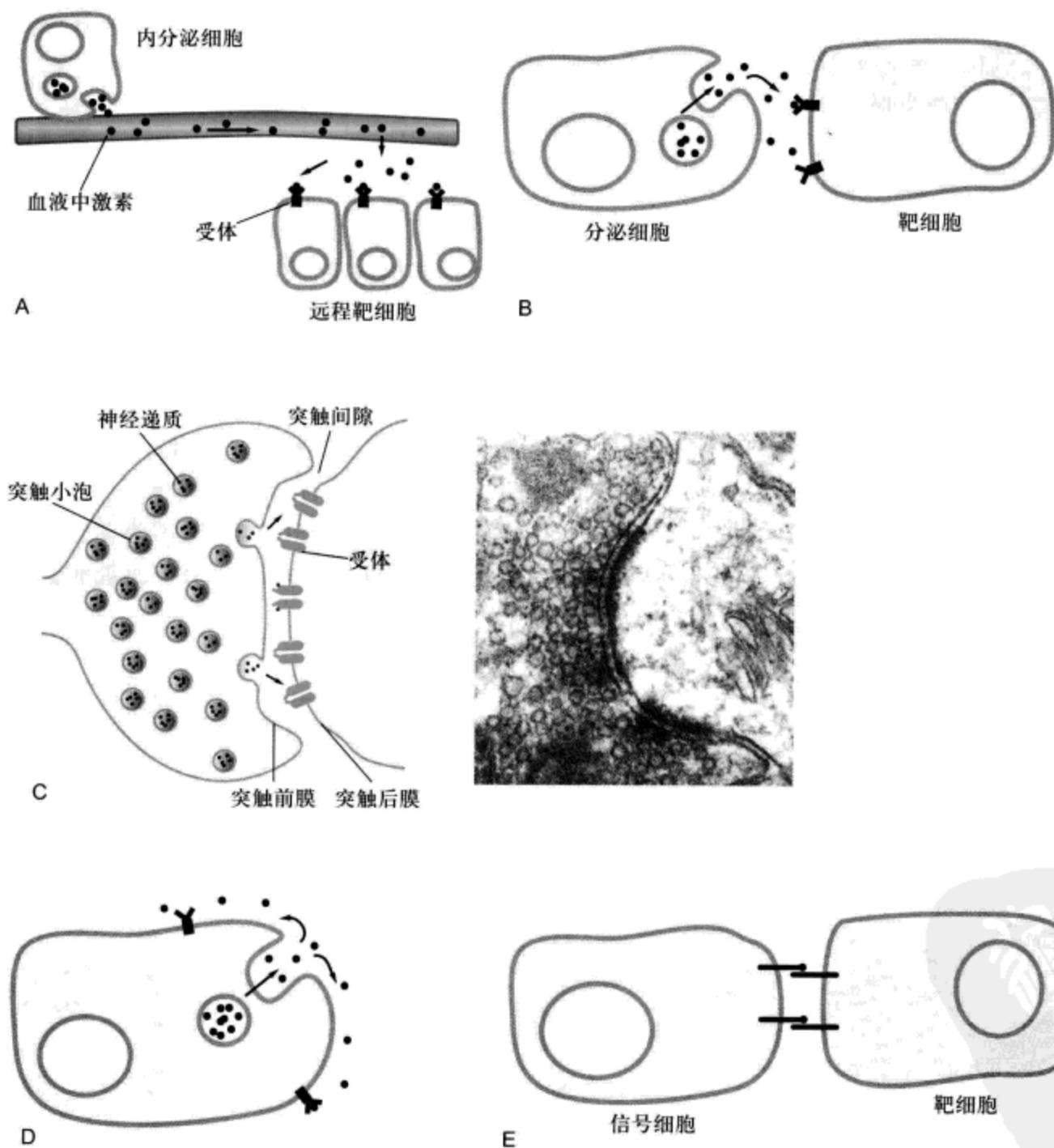


图 9-1 不同的细胞通讯方式

A. 内分泌: 由内分泌腺产生的激素, 分泌进入血液循环, 作用于相应的靶器官。B. 旁分泌: 信号细胞分泌局部化学介质释放到细胞外液中, 作用于邻近的靶细胞, 其作用距离只有几微米。C. 神经元与靶细胞之间的化学突触通讯: 突触结构电镜照片来自人脑杏仁体 (照片由李伯勤教授惠赠)。D. 自分泌: 细胞对其自身分泌的信号分子起反应。E. 细胞间接触依赖性通讯: 信号细胞质膜上结合蛋白 (信号分子) 直接与相邻靶细胞的表面受体相互作用。细胞间接触性依赖的信号传递需要细胞膜与细胞膜之间彼此直接接触。

间接触而传递的。这类膜表面的信号分子与受体基本类似，它们所介导的信号转导机制也基本相同。在接触依赖性通讯缺陷的突变体中，有些细胞类型（如神经元）会过量发生。

动物细胞间的间隙连接或植物细胞间的胞间连丝同属通讯连接，详见第十七章。

通过胞外信号所介导的细胞通讯通常涉及如下步骤：① 信号细胞合成并释放信号分子；② 转运信号分子至靶细胞；③ 信号分子与靶细胞表面受体特异性结合并导致受体激活；④ 活化受体启动靶细胞内一种或多种信号转导途径；⑤ 引发细胞代谢、功能或基因表达的改变；⑥ 信号的解除并导致细胞反应终止。本章所要讨论的重点是后四步，也是细胞信号转导的关键步骤。

## 二、信号分子与受体

### （一）信号分子

信号分子 (signal molecule) 是细胞的信息载体，种类繁多，包括化学信号诸如各类激素、局部介质 (local mediator) 和神经递质 (neurotransmitter) 等，以及物理信号诸如声、光、电和温度变化等。各种化学信号根据其化学性质通常可分为 3 类：① 气体性信号分子 (gaseous signal molecule)，包括 NO、CO，可以自由扩散，进入细胞直接激活效应酶（鸟苷酸环化

酶）产生第二信使 cGMP，参与体内众多的生理过程，影响细胞行为。② 疏水性信号分子，主要是甾类激素和甲状腺素，是血液中长效信号 (long lasting signal)，这类亲脂性分子小、疏水性强，可穿过细胞质膜进入细胞，与细胞内核受体 (nuclear receptor) 结合形成激素-受体复合物，调节基因表达。③ 亲水性信号分子，包括神经递质、局部介质和大多数蛋白类激素，它们不能透过靶细胞质膜，只能通过与靶细胞表面受体结合，经信号转换机制，在细胞内产生第二信使或激活蛋白激酶或蛋白磷酸酶的活性，引起细胞的应答反应。表 9-1 列出了一些激素、局部介质、神经递质和接触依赖性信号分子。

### （二）受体

受体 (receptor) 是一类能够识别和选择性结合某种配体 (信号分子) 的大分子，已经鉴定的绝大多数受体都是蛋白质且多为糖蛋白，少数受体是糖脂 (如霍乱毒素受体和百日咳毒素受体)，有的受体是糖蛋白和糖脂组成的复合物 (如促甲状腺素受体)。根据靶细胞上受体存在的部位，可将受体区分为细胞内受体 (intracellular receptor) 和细胞表面受体 (cell-surface receptor)。细胞内受体位于细胞质基质或核基质中，主要识别和结合小的脂溶性信号分子，如甾类激素、甲状腺素、维生素 D 和视黄酸 (retinoic acid)；细胞表面受

表 9-1 信号分子举例

信号分子	合成 / 分泌位点	化学性质	生理功能
<b>激素</b>			
肾上腺素	肾上腺	酪氨酸的衍生物	升高血压，加快心律和增加代谢
皮质醇	肾上腺	类固醇 (胆固醇衍生物)	影响多数组织中蛋白质、糖类和脂质代谢
雌二醇	卵巢	类固醇 (胆固醇衍生物)	诱导和维持雌性第二性征
胰高血糖素	胰腺 $\alpha$ 细胞	肽	刺激葡萄糖合成、糖原降解和脂肪分解 (如肝细胞和脂肪细胞)
胰岛素	胰腺 $\beta$ 细胞	蛋白质	刺激肝细胞葡萄糖摄取、蛋白质合成和脂质合成
睾丸酮	睾丸	类固醇 (胆固醇衍生物)	诱导和维持雄性第二性征
甲状腺素	甲状腺	酪氨酸的衍生物	刺激多种细胞的代谢
<b>局部介质</b>			
表皮生长因子 (EGF)	多种细胞	蛋白质	刺激上皮细胞等多种细胞的增殖
血小板衍生生长因子 (PDGF)	多种细胞 (包括血小板)	蛋白质	刺激多种细胞的增殖
神经生长因子 (NGF)	各种神经支配的组织	蛋白质	促进某类神经元的存活，促进神经元轴突的生长
组胺	肥大细胞	组氨酸衍生物	扩张血管，增加渗透，有助发炎
一氧化氮 (NO)	神经元、血管内皮细胞	可溶性气体	引起平滑肌细胞松弛，调节神经元活性
<b>神经递质</b>			
乙酰胆碱	神经末梢	胆碱衍生物	在许多神经-肌肉突触和中枢神经系统中存在的兴奋性神经递质
$\gamma$ -氨基丁酸 (GABA)	神经末梢	谷氨酸衍生物	中枢神经系统中存在的抑制性神经递质
<b>接触依赖性信号</b>			
Delta	预定神经元、其他胚胎细胞	跨膜蛋白	抑制相邻细胞以相同的方式分化

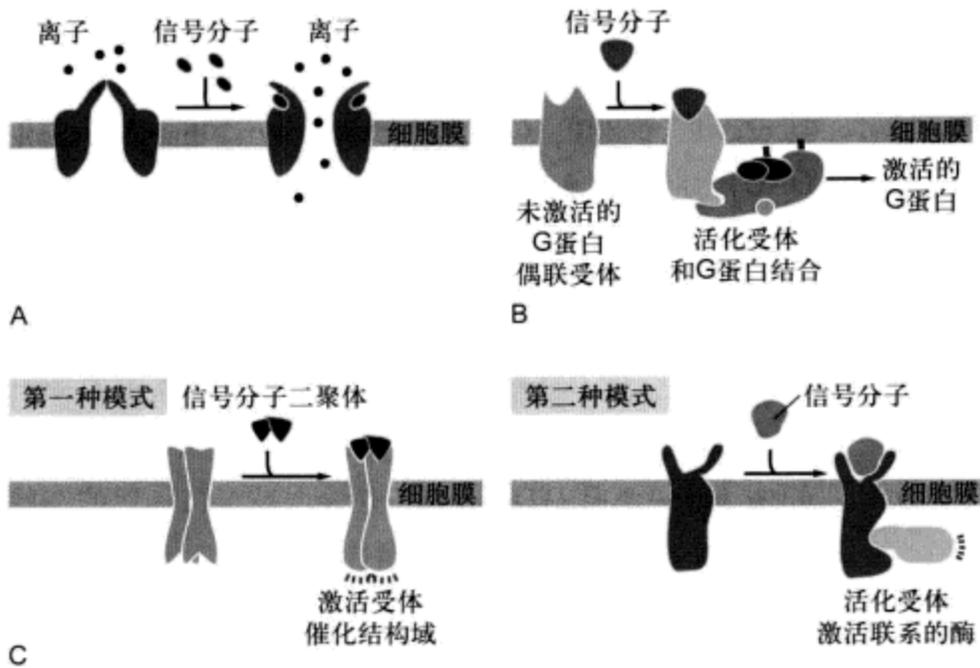


图 9-2 三种类型的细胞表面受体  
 A. 离子通道偶联受体。B. G 蛋白偶联受体。  
 C. 酶联受体。

体主要识别和结合亲水性信号分子，包括分泌型信号分子（如神经递质、多肽类激素、生长因子等）或膜结合型信号分子（细胞表面抗原、细胞表面黏着分子等）。根据信号转导机制和受体蛋白类型的不同，细胞表面受体又分属三大家族（图 9-2）：

(1) 离子通道偶联受体 (ion channel-coupled receptor) 细胞表面离子通道偶联受体是指受体本身既有信号（配体）结合位点，又是离子通道，其跨膜信号转导无需中间步骤，又称配体门离子通道 (ligand-gated channel) 或递质门离子通道 (transmitter-gated channel)。

(2) G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptor, GPCR) 是细胞表面受体中最大家族，普遍存在于各类真核细胞表面，根据其偶联效应蛋白的不同，介导不同的信号通路。

(3) 酶联受体 (enzyme-linked receptors) 一类是受体胞内结构域具有潜在酶活性，另一类是受体本身不具酶活性，而是受体胞内段与酶相联系。

不管哪种类型的受体，一般至少有两个功能域，结合配体的功能域及产生效应的功能域，分别具有结合特异性和效应特异性。受体结合特异性配体后而被激活，通过信号转导 (signal transduction) 途径将胞外信号转换为胞内信号，引发两种主要的细胞反应：一是细胞内预存蛋白活性或功能的改变，进而影响细胞代谢功能的短期反应（快反应）；二是影响细胞内特殊蛋白的表达量，最常见的方式是通过转录因子的修饰激活或抑制基因表达的长期反应（慢反应），最后的综合效应是改变细胞的行为（图 9-3）。

对多细胞生物而言，一个细胞经常暴露于以不同

状态存在的上百种不同信号分子的环境中，靶细胞对外界特殊信号分子的特异反应取决于细胞具有的相应受体。受体与信号分子空间结构的互补性是二者特异性结合的主要因素，但并不意味受体与配体之间是简单的一对一的关系。不同细胞对同一种化学信号分子可能具有不同的受体，因此，不同的靶细胞以不同的方式应答于相同的化学信号，如同为乙酰胆碱，作用于骨骼肌细胞引起收缩，作用于心肌细胞却降低收缩频率，作用于唾液腺细胞则引起分泌；另外也有不同的细胞具有相同的受

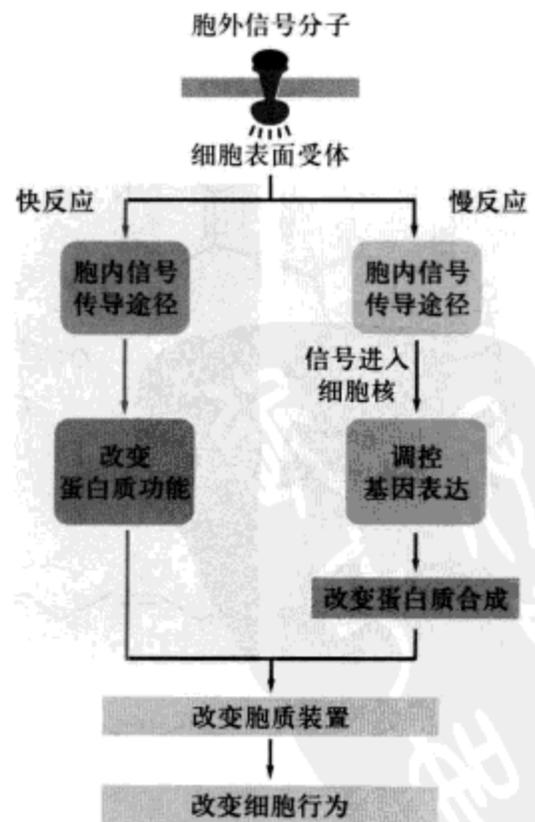


图 9-3 细胞表面受体转导胞外信号引发两类主要反应——快反应和慢反应

体, 当与同一种信号分子结合时, 不同细胞对同一信号产生不同的反应, 或同一细胞不同的受体应答于不同的胞外信号产生相同的效应, 如肝细胞肾上腺素或胰高血糖素受体在结合各自配体被激活后, 都能促进糖元降解而升高血糖; 再有就是一种细胞具有一套多种类型的受体, 应答多种不同的胞外信号从而启动细胞不同生物学效应, 如存活、分裂、分化或死亡。由此可见, 靶细胞一是通过受体对信号结合的特异性, 二是通过细胞本身固有的特征对外界信号产生反应。

### (三) 第二信使与分子开关

20 世纪 50 年代, E. W. Sutherland 通过体外实验证明, 向肝组织切片加入肾上腺素时, 可明显导致糖原磷酸化酶活性增加, 并促进糖原分解为葡萄糖, 从而导致 cAMP 的发现。70 年代初提出激素作用的第二信使学说 (second messenger theory), 即胞外化学信号 (第一信使) 不能进入细胞, 它作用于细胞表面受体, 导致产生胞内信号 (第二信使), 从而引发靶细胞内一系列生化反应, 最后产生一定的生理效应, 第二信使的降解使其信号作用终止。Sutherland 正是通过阐明 cAMP 的功能并提出第二信使学说, 获得了 1971 年诺贝尔生理学或医学奖。他的研究结果一直作为基本模式指导着细胞信号系统的研究, 并不断发展完善。第二信使是指在胞内产生的非蛋白类小分子, 通过其浓度变化 (增加或减少) 应答胞外信号与细胞表面受体的结合, 调节细胞

内酶和非酶蛋白的活性, 从而在细胞信号转导途径中行使携带和放大信号的功能。目前公认的第二信使包括 cAMP、cGMP、 $\text{Ca}^{2+}$ 、二酰甘油 (1,2-diacylglycerol, DAG)、肌醇-1,4,5-三磷酸 (1,4,5-inositol trisphosphate,  $\text{IP}_3$ ) 和 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 ( $\text{PIP}_3$ ) 等 (图 9-4)。

在细胞信号转导过程中, 除细胞表面受体和第二信使分子以外, 还有两类在进化上保守的胞内蛋白, 其功能作用依赖于细胞外信号的刺激, 这两类蛋白在引发信号转导级联反应中起分子开关 (molecular switch) 的作用。一类是 GTPase 分子开关调控蛋白构成的细胞内 GTPase 超家族, 包括三聚体 GTP 结合蛋白和单体 GTP 结合蛋白如 Ras 和类 Ras 蛋白。这类鸟苷酸结合蛋白当结合 GTP 时呈活化的“开启”状态, 当结合 GDP 时呈失活的“关闭”状态。开关调控蛋白通过两种状态的转换控制下游靶蛋白的活性, Alfred G. Gilman 和 Martin Rodbell 因为发现 G 蛋白及其在细胞信号转导中的调控作用而获得 1994 年诺贝尔生理学或医学奖。信号诱导的开关调控蛋白从失活态向活化态的转换, 由鸟苷酸交换因子 (guanine nucleotide-exchange factor, GEF) 所介导, GEF 引起 GDP 从开关调控蛋白释放, 继而结合 GTP 并引发开关调控蛋白 (G 蛋白) 构象改变使其活化。随着结合 GTP 的水解形成 GDP 和  $\text{P}_i$ , 开关调控蛋白又恢复成失活的关闭状态。GTP 的水解速率被 GTPase 促进蛋白 (GTPase-accelerating protein, GAP) 和 G 蛋白信号调节子 (regulator of G protein-

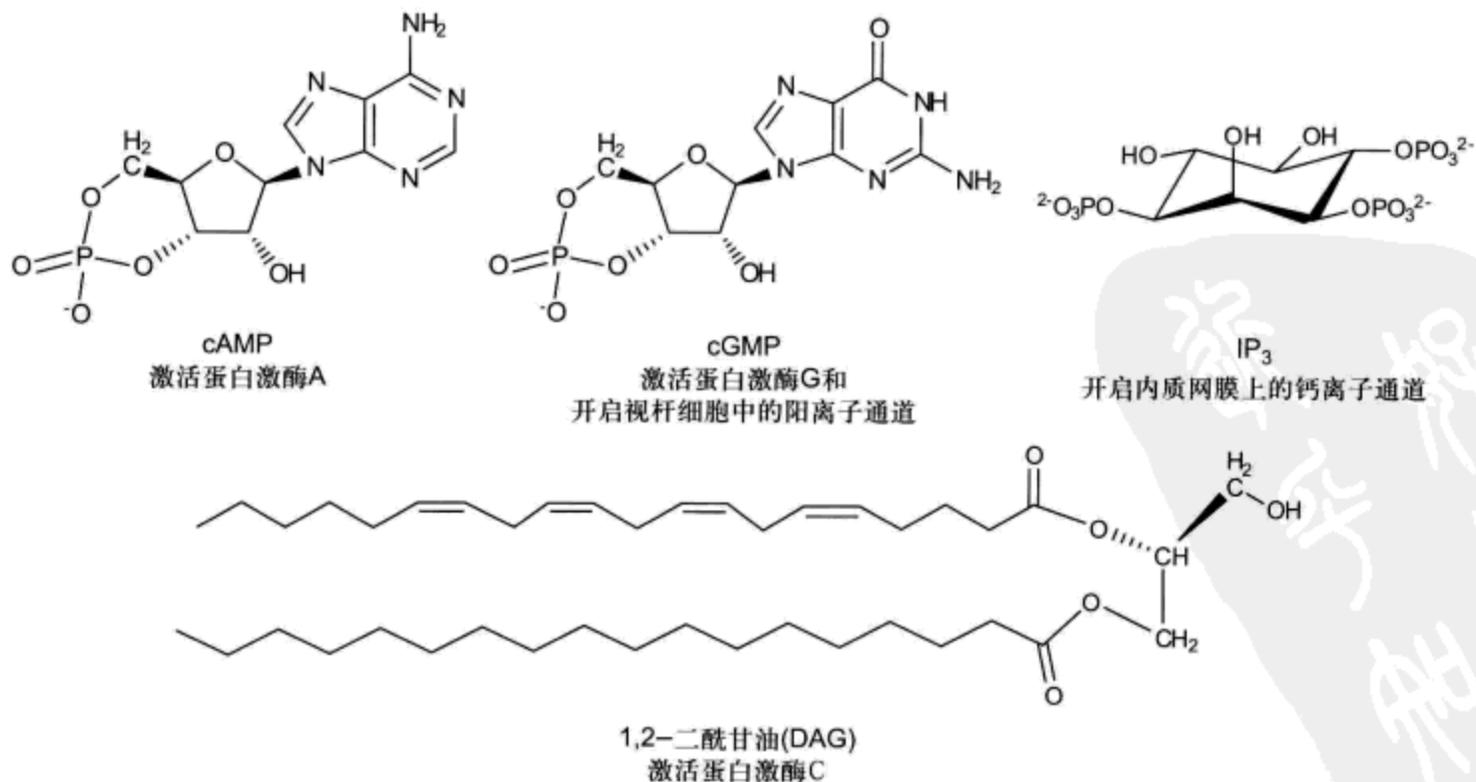


图 9-4 4 种常见的细胞内第二信使及其主要效应

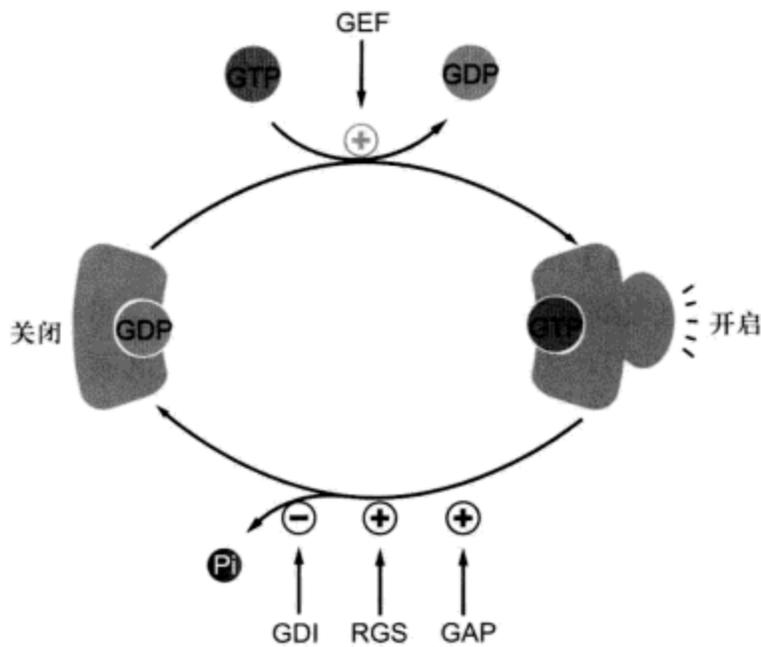


图 9-5 GTPase 开关调控蛋白活化(开)与失活(关)的转换  
通过结合 GTP 的水解, GTPase 开关调控蛋白由活化态转换为失活态, 该过程受 GAP 和 RGS 的促进, 受 GDI 的抑制; GTPase 开关调控蛋白的再活化被 GEF 所促进。

signaling, RGS) 所促进, 被鸟苷酸解离抑制蛋白 (guanine nucleotide dissociation inhibitor, GDI) 所抑制 (图 9-5)。另一类更为普遍存在的分子开关机制, 是通过蛋白激酶 (protein kinase) 使靶蛋白磷酸化, 通过蛋白磷酸水解酶 (protein phosphatase) 使靶蛋白去磷酸化, 从而调节靶蛋白的活性, Edwin G. Krebs 和 Edmond H. Fischer 因为发现蛋白质磷酸化与去磷酸化作为一种生物学调节机制而获得 1992 年诺贝尔生理学或医学奖。虽然这两种反应基本上是不可逆的, 但综合蛋白激酶和蛋白磷酸水解酶的活性, 蛋白质磷酸化和去磷酸化可为细胞提供一种“开关”机制, 使各种靶蛋白处于“开启”或“关闭”的状态 (图 9-6)。蛋白质磷酸化和去磷酸化可以改变蛋白质的电荷并改变蛋白质构象, 从而导致该蛋白质活性的增强或降低, 是细胞内普遍存在的一种调节机制, 在代谢调节、基因表达、细胞周期调控中具有重要作用。据估计, 酵母细胞有 3% 的蛋白质是蛋白激酶或蛋白磷酸水解酶, 人类基因组编码蛋白激酶的基因多达 2 000 个, 编码蛋白磷酸水解酶的基因有 1 000 个左右。细胞内许多蛋白, 诸如信号蛋白、结构蛋白、酶和膜通道蛋白其活性变化都是通过蛋白激酶/蛋白磷酸水解酶开关调节的, 并且具有靶蛋白特异性。此外, 对于  $\text{Ca}^{2+}$  作为胞内第二信使, 钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 可通过与  $\text{Ca}^{2+}$  的结合或解离而分别处于活化或失活的“开启”或“关闭”状态。

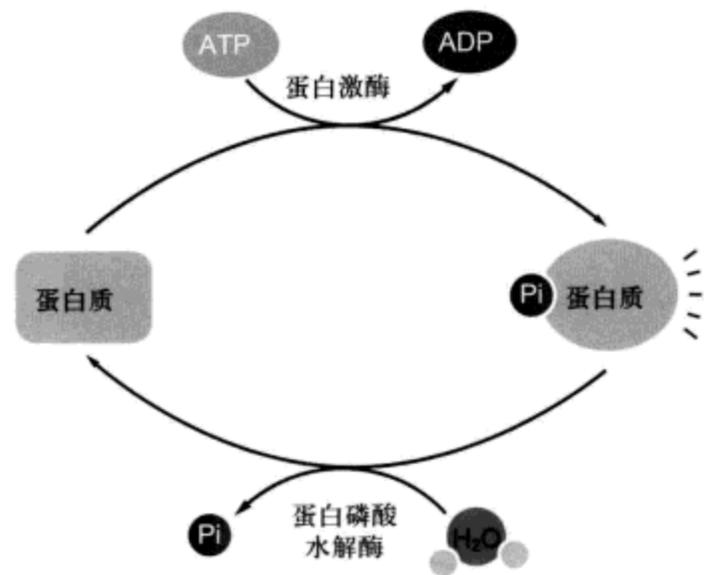


图 9-6 靶蛋白磷酸化和去磷酸化是细胞调节靶蛋白活性的一个普遍机制

在该图中, 当靶蛋白被磷酸化时活化; 去磷酸化时失活。有些靶蛋白具有相反的变化模式。

### 三、信号转导系统及其特性

#### (一) 信号转导系统的基本组成及信号蛋白的相互作用

通过细胞表面受体介导的信号通路 (signaling pathway) 通常由下列 5 个步骤组成 (图 9-7): ① 细胞表面受体特异性识别并结合胞外信号分子 (配体), 形成受体-配体复合物, 导致受体激活; ② 由于激活受体构象改变, 导致信号初级跨膜转导, 靶细胞内产生第二信使或活化的信号蛋白; ③ 通过胞内第二信使或细胞内信号蛋白复合物的装配, 起始胞内信号放大的级联反应 (signaling cascade); ④ 细胞应答反应, 如果这种级联反应主要是通过酶的逐级激活, 结果将改变细胞代谢活性, 或者通过基因表达调控蛋白影响细胞基因表达和影响发育, 或者通过细胞骨架蛋白的修饰改变细胞形状或运动; ⑤ 由于受体脱敏 (desensitization) 或受体下调 (down-regulation), 终止或降低细胞反应。

细胞信号转导系统是由细胞内多种行使不同功能的信号蛋白所组成的信号传递链。受体通过细胞内信号蛋白的相互作用组成不同的信号通路而传播信号, 这必然涉及信号蛋白之间靠何种机制保障彼此的精确联系。细胞内信号蛋白的相互作用是靠蛋白质模式结合域 (modular binding domain) 所特异性介导的, 多种模

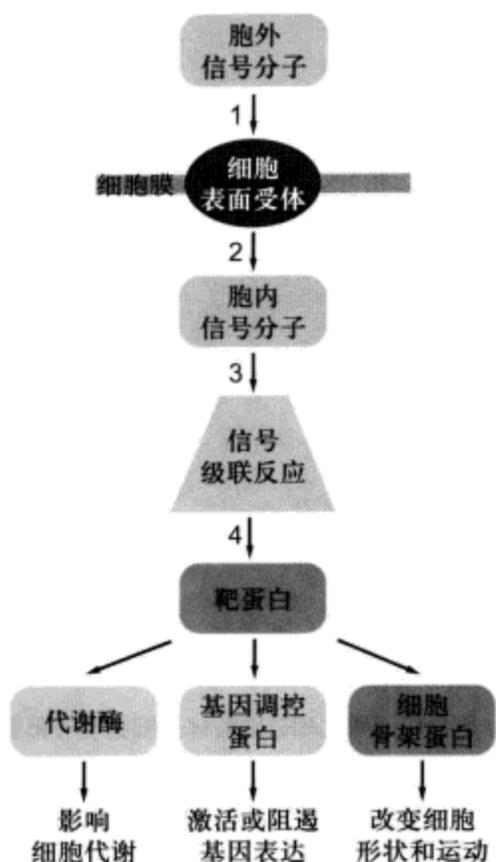


图 9-7 细胞表面受体介导的细胞信号转导系统的组成

1. 受体特异性识别并结合胞外信号分子并被激活。2. 信号初级跨膜转导。3. 通过胞内信号级联反应实现信号传播与放大。4. 产生细胞应答反应。5. 细胞反应终止或下调 (未表示)。

式结合域经多重相互作用极大地拓展了细胞内信号网络的多样性。这些模式结合域通常由 40~120 个氨基酸残基组成，一侧有较浅凹陷的球形结构域，不具酶活性，但能识别特定基序或蛋白质上特定修饰位点，它们与识别对象的亲和性较弱，因而有利于快速和反复进行精细的组合式网络调控。SH2 结构域 (Src homology 2 domain) 是研究蛋白质互作的原型模式结构域，由约 100 个氨基酸残基组成，其定义源于反转录病毒癌蛋白 (oncoprotein) v-Eps。具有 SH2 结构域的蛋白家族，具有相似的三维结构，但每一成员可特异性结合围绕磷酸酪氨酸残基的氨基酸序列 (图 9-8)。

1991 年，进一步阐明了 SH2 结构域的基本功能，人类基因组大约编码 115 种 SH2 结构域，该蛋白家族包括多种功能性成员：① 酶，含有一或两个与催化序列相联系的 SH2 结构域，如蛋白激酶或蛋白磷酸水解酶结构域、磷脂酶 C、RasGAP 结构域、Rho 家族 GEF 结构域。② 癌蛋白 (oncogenic protein)，如人慢性粒细胞白血病 Bcr-Abl 癌蛋白。③ 锚定蛋白 (docking protein)，如哺乳类 ShcA (C 端具 SH2 结构域，N 端具 PTB 结构域)、胰岛素受体底物 (IRS) 等。④ 接头蛋白

(adaptor)，含单个 SH2 和多个 SH3 结构域，如哺乳类的生长素受体结合蛋白 2 (Grb2) 等。⑤ 调节蛋白 (regulator)，许多 SH2 蛋白家族成员具有调节功能，如 STAT 介导的细胞因子信号通路。⑥ 转录因子。此外，人类基因组还大约编码 253 个 SH3 结构域，结合富含脯氨酸序列 (PXXP)。由于技术的进步和方法的完善，现在已有多种手段研究细胞内蛋白-蛋白之间的互作 (参见第三章方法学介绍)，为研究细胞内大分子互作及其复合物的组成提供了有力的工具，特别是包括人类在内的动物基因组序列的发现为研究细胞内分子间相互作用提供了条件。现在需要解决的问题是，要利用计算数学和统计学的原理来归纳已知的分子间相互作用信息，并且利用它们来推测未知分子间的相互作用，从而更深入地研究细胞的生命活动。此外还陆续发现许多其他蛋白质模式结构域及其结合基序的特异性 (表 9-2，图 9-8)。

## (二) 细胞内信号蛋白复合物的装配

细胞内信号蛋白复合物的形成是信号蛋白间相互作用的结果，是实现细胞表面受体所介导的各种细胞内信号通路的重要结构基础。从细胞接受信号刺激到产生应答反应的过程中，信号蛋白复合物的形成有其重要生物学意义，即在时空上增强细胞应答反应的速度、效率和反应的特异性。概括起来，细胞内信号蛋白复合物的装配可能有 3 种不同策略：

(1) 细胞表面受体和某些细胞内信号蛋白通过与大的支架蛋白结合预先形成细胞内信号复合物，当受体结

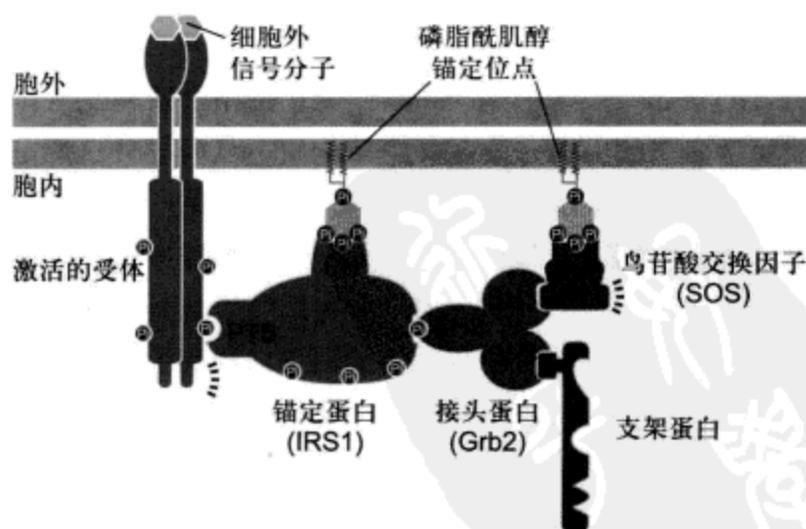


图 9-8 细胞内信号蛋白之间的相互作用是靠蛋白质模式结合域所特异性介导的示意图

图中具有 SH2 结构域的蛋白质具有相似的三维结构，每一成员可特异性结合围绕磷酸酪氨酸残基的氨基酸序列。IRS1 为胰岛素受体底物。

表 9-2 蛋白质模式结合域及其结合基序特异性

结合域	结合基序特征	举例
SH2 结构域	特异性结合磷酸酪氨酸残基 (p-Tyr)	Src、Grb2、Shc、STAT
SH3 结构域	结合富含脯氨酸序列 (PXXP) 和 RXXK	Src、Nck
PTB 结构域	结合 NPXY 基序	Shc、IRS-1
PDZ 结构域	识别膜蛋白 C 端 4-5 个氨基酸残基组成的短肽基序 (通常末端为 Val-COOH)	dishevelled、FAP
WW 结构域	结合富含脯氨酸基序 (XPPXY)	Nedd4 (E3 泛素连接酶)、Smurf、Dystrophin
PH 结构域	与肌醇磷脂结合, 将蛋白质靶向质膜 (PI-3,4-P <sub>2</sub> ; PI-4,5-P <sub>2</sub> ; PI-3,4,5-P <sub>3</sub> )	Akt、SOS
FYVE 结构域	与肌醇磷脂结合, 将蛋白质靶向胞内体 (PI3P)	EEA1、SARA
LIM 结构域	识别基于转角的蛋白质基序	
死亡结构域		Fas

合胞外信号被激活后, 再依次激活细胞内信号蛋白并向下游传递 (图 9-9A)。

(2) 依赖激活的细胞表面受体装配细胞内信号蛋白复合物, 即表面受体结合胞外信号被激活后, 受体胞内段多个氨基酸残基位点发生自磷酸化作用 (autophosphorylation), 从而为细胞内不同的信号蛋白提供锚定位点, 形成短暂的信号转导复合物分别介导可能不同的下游事件 (图 9-9B)。

(3) 受体结合胞外信号被激活后, 在邻近质膜上形

成修饰的肌醇磷脂分子, 从而募集具有 PH 结构域的信号蛋白, 装配形成信号复合物 (图 9-9C)。

### (三) 信号转导系统的主要特性

(1) 特异性 (specificity) 细胞受体与胞外配体通过结构互补机制以非共价键结合, 形成受体-配体复合物, 简称具有“结合”特异性 (binding specificity), 受体因结合配体而改变构象被激活, 介导特定的细胞反应, 从而又表现出“效应器”特异性 (effector

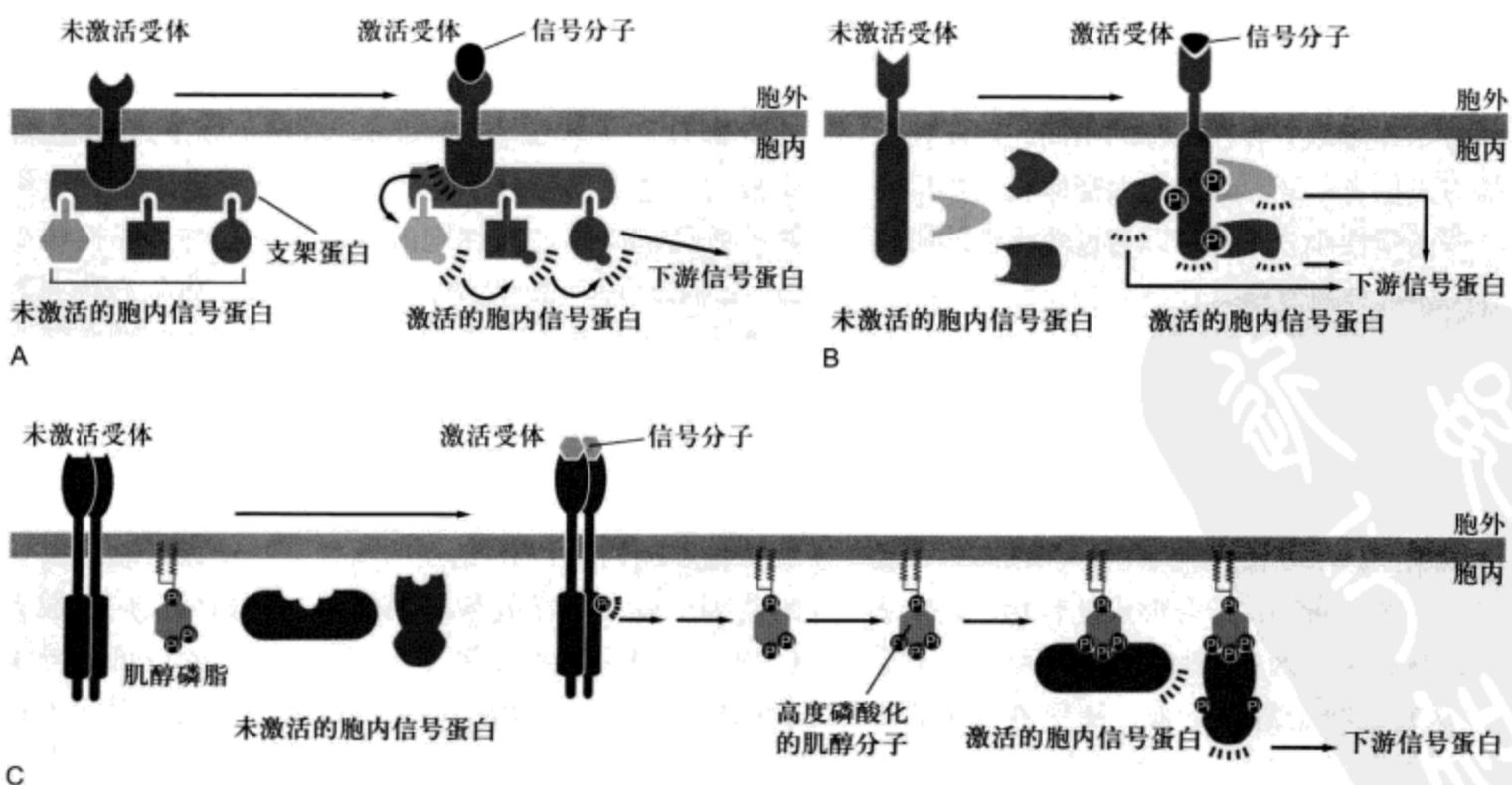


图 9-9 细胞内信号蛋白复合物装配的 3 种类型

A. 基于支架蛋白的信号合作物的装配。B. 在活化受体上信号复合物的装配。C. 肌醇磷脂锚定位点结合的信号复合物。

specificity)。此外，受体与配体的结合具有饱和性和可逆性的特征。

(2) 放大效应 (amplification) 信号传递至胞内效应器蛋白 (通常由酶或离子通道蛋白组成)，引发细胞内信号放大的级联反应 (signaling cascade)，如果级联反应主要是通过酶的逐级激活，结果将改变细胞代谢活性。最常见的级联放大作用是通过蛋白质磷酸化实现的。

(3) 网络化与反馈 (feedback) 调节机制 细胞信号系统网络化的相互作用是细胞生命活动的重要特征，在细胞内由一系列蛋白质组成的信号转导系统中，细胞对刺激作出适时适度的反应是细胞完成各种生命活动的基础，信号网络化效应有利于克服分子间相互作用的随机性对细胞生命活动的负面干扰。这样的网络特性是由一系列正反馈 (positive feedback) 和负反馈 (negative feedback) 环路组成的，对于及时校正反应的速率和强度是最基本的调控机制。

(4) 整合作用 (integration) 多细胞生物的每个细胞都处于细胞“社会”环境之中，大量的信息以不同组合的方式调节细胞的行为。因此，细胞必须整合不同的信息，对细胞外信号分子的特异性组合作出程序性反应，甚至作出生死抉择，这样才能维持生命活动的有序性。

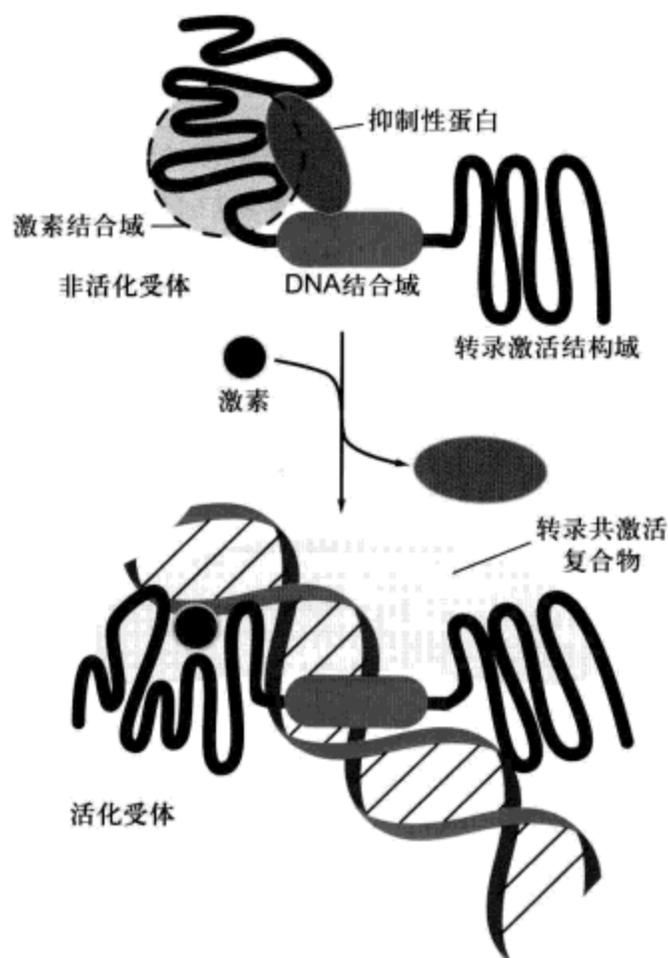


图 9-10 细胞内受体蛋白及其作用模型

域 (图 9-10)。

目前根据这类受体的 cDNA 分析发现，它所含氨基酸残基数 400~900 不等，中部结构域是高度保守富含 Cys 的区域，由 70~80 个氨基酸残基组成两个锌指结构的重复单位。

类固醇 (steroid) 激素、视黄酸 (retinoic acid)、维生素 D 和甲状腺素 (thyroid hormone) 的受体在细胞核内。这类信号分子与血清蛋白结合运输至靶组织并扩散跨越质膜进入细胞内，通过核孔与特异性核受体 (nuclear receptor) 结合形成激素-受体复合物并改变受体构象；激素-受体复合物与基因特殊调节区又称激素反应元件 (hormone response element, HRE) 结合，影响基因转录。类固醇激素诱导的基因活化通常分为两个阶段：① 快速的初级反应阶段，直接激活少数特殊基因转录；② 延迟的次级反应阶段，初级反应的基因产物再激活其他基因转录，对初级反应起放大作用。果蝇注射蜕皮激素后仅 5~10 min 便可诱导唾腺染色体上 6 个基因位点转录，然后会显现至少上百个转录活性位点，大量合成次级反应所特有的蛋白质产物，进而产生影响细胞分化等较长期的生物学效应。甲状腺素也是亲脂性小分子，作用机理与类固醇激素

## 第二节 细胞内受体介导的信号传递

由于受体分子在细胞上存在部位的不同，因此其信号跨膜转导的方式也有不同。与细胞内受体相互作用的信号分子是一些亲脂性小分子，可以透过疏水性的质膜进入细胞内与受体结合而传播信号。

### 一、细胞内核受体及其对基因表达的调节

细胞内受体超家族 (intracellular receptor superfamily) 的本质是依赖激素激活的基因调控蛋白。在细胞内，受体与抑制性蛋白 (如 Hsp90) 结合形成复合物，处于非活化状态。当信号分子 (如皮质醇) 与受体结合，将导致抑制性蛋白从复合物上解离下来，使受体暴露它的 DNA 结合位点而被激活。因此，这类受体一般都含有 3 个功能域：C 端的结构域是激素的结合位点，中部结构域是 DNA 或 Hsp90 的结合位点，N 端是转录激活结构

相同,但也有个别亲脂性小分子(如前列腺素),其受体在细胞质膜上。

## 二、NO 作为气体信号分子进入靶细胞直接与酶结合

早在认识 NO 作为气体信号分子之前,科学家有两个重要发现:20 世纪 80 年代发现在培养条件下巨噬细胞的杀菌活性依赖于培养基中精氨酸的存在,而精氨酸是 NO 合酶(nitric oxide synthase, NOS)的底物,提示 NO 是一种重要的生物功能分子;此外,多年前人们就知道乙酰胆碱(acetylcholine)通过引起平滑肌松弛而舒张血管。1980 年 R. Furchgott 提出血管舒张是因为血管内皮细胞产生一种信号分子引起血管平滑肌松弛所致。随后在 1986 年 R. Furchgott 和 Louis Ignarro 的研究证实,NO 作为气体信号分子引起血管平滑肌舒张。正是他们的研究贡献,R. Furchgott 等 3 位美国科学家获得 1998 年诺贝尔生理学或医学奖。NO 是一种具有自由基性质的脂溶性气体分子,可透过细胞膜快速扩散,作用邻近靶细胞发挥作用。由于体内存在  $O_2$  及其他与 NO 发生反应的化合物(如超氧离子、血红蛋白等),因而 NO 在细胞外极不稳定,其半衰期只有 2~30 s,只能在组织中局部扩散,被氧化后以硝酸根( $NO_3^-$ )或亚硝酸根( $NO_2^-$ )的形式存在于细胞内外液中。血管内皮细胞和神经细胞是 NO 的生成细胞,NO 的生成需要 NO 合酶的催化,以 L-精氨酸为底物,以还原型辅酶 II(NADPH)作为电子供体,等物质的量地生成 NO 和 L-瓜氨酸。NO 没有专门的储存及释放调节机制,作用于靶细胞 NO 的多少直接与 NO 的合成有关。NO 这种可溶性气体作为局部介质在许多组织中发挥作用,它发挥作用的主要机制是激活靶细胞内具有鸟苷酸环化酶(G-cyclase, GC)活性的 NO 受体。内源性 NO 由 NOS 催化合成后,扩散到邻近细胞,与鸟苷酸环化酶活性中心的  $Fe^{2+}$  结合,改变酶的构象,导致酶活性增强和 cGMP 水平增高。cGMP 的作用是通过 cGMP 依赖的蛋白激酶 G(PKG)活化,抑制肌动-肌球蛋白复合物信号通路,导致血管平滑肌舒张(图 9-11)。此外,心房排钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)和某些多肽类激素与血管平滑肌细胞表面受体的结合,也会引发血管平滑肌舒张,这些细胞表面受体的胞质结构域也具有内源性鸟苷酸环化酶活性,通过类似的机制调节心肌的活动。NO 对血管的影响可以解释为什么硝酸甘油

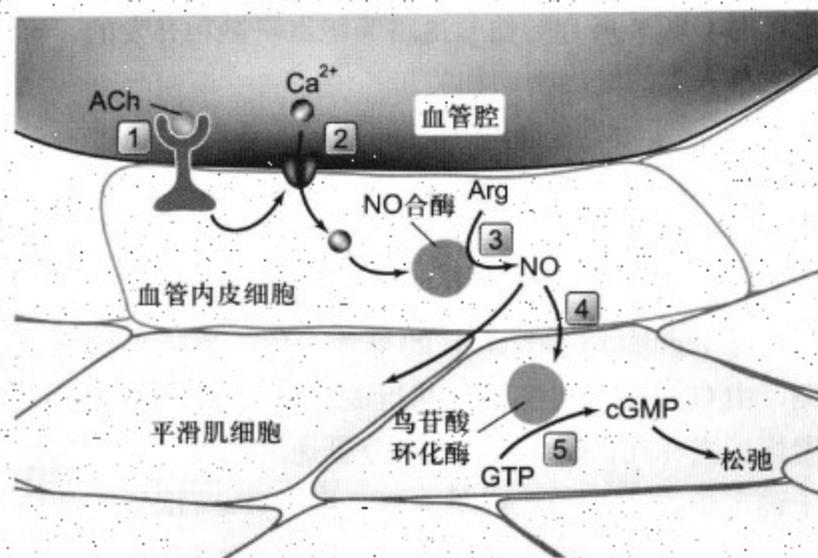


图 9-11 NO 在导致血管平滑肌舒张中的作用

血管神经末梢释放乙酰胆碱作用于血管内皮细胞 G 蛋白偶联受体并激活磷脂酶 C,通过第二信使  $IP_3$  导致细胞质  $Ca^{2+}$  水平升高。当  $Ca^{2+}$  结合钙调蛋白后,刺激 NO 合酶催化精氨酸氧化形成瓜氨酸并释放 NO,NO 通过扩散进入邻近平滑肌细胞,激活具有鸟苷酸环化酶活性的 NO 受体,刺激生成第二信使 cGMP。而 cGMP 通过 cGMP 依赖的蛋白激酶 G 的活化,抑制肌动-肌球蛋白复合物信号通路,导致血管平滑肌舒张。

(nitroglycerin)能用于治疗心绞痛,硝酸甘油在体内转化为 NO,可舒张血管,从而减轻心脏负荷和心肌的需氧量。

NO 也由许多神经细胞产生并传递信号,在参与大脑的学习记忆生理过程中具有重要作用。大脑海马某些区域在受到重复刺激后可产生一种持续增强的突触效应,称为长时程增强作用(long-term potentiation, LTP),是学习和记忆的分子基础。LTP 的产生涉及神经元间突触连接重构,这一过程既需要突触前神经元释放神经递质作用于突触后膜,也需要突触后神经元将信息反馈到突触前膜,NO 就充当了这一逆行信使的角色。NO 作为 LTP 的逆行信使弥散至突触前末梢,刺激谷氨酸递质不断释放,从而对 LTP 效应的维持起促进作用。

## 第三节 G 蛋白偶联受体介导的信号转导

G 蛋白偶联受体(GPCR)是细胞表面受体中最大的多样性家族,统计表明,现有 25% 的临床处方药物

是针对 GPCR 所介导信号通路为靶点研制和开发的，可见它与人类的健康密切相关。

## 一、G 蛋白偶联受体的结构与激活

G 蛋白是三聚体 GTP 结合调节蛋白 (trimeric GTP-binding regulatory protein) 的简称，位于质膜内胞浆一侧，由  $G_\alpha$ 、 $G_\beta$ 、 $G_\gamma$  三个亚基组成， $G_\beta$  和  $G_\gamma$  亚基以异二聚体形式存在， $G_\alpha$  和  $G_\beta$  亚基分别通过共价结合的脂分子锚定在质膜上。 $G_\alpha$  亚基本身具有 GTPase 活性，是分子开关蛋白。当配体与受体结合，三聚体 G 蛋白解离，并发生 GDP 与 GTP 交换，游离的  $G_\alpha$ -GTP 处于活化的开启状态，导致结合并激活效应器蛋白，从而传递信号；当  $G_\alpha$ -GTP 水解形成  $G_\alpha$ -GDP 时，则处于失活的关闭状态，终止信号传递并导致三聚体 G 蛋白的重新装配，恢复系统进入静息状态 (图 9-12)。现已知人类基因组至少编码 27 种不同的  $G_\alpha$  亚基，5 种不同的  $G_\beta$  亚基和 13 种不同的  $G_\gamma$  亚基。有些信号途径，效应器蛋白是离子通道，其活性受游离的  $G_\beta\gamma$  亚基调节并激活。由

于阐明了胞外信号如何转换为胞内信号的机制，对 G 蛋白发现作出重要贡献的 A. G. Gilman 和 M. Rodbell，因此荣获 1994 年诺贝尔生理学或医学奖。

所有 G 蛋白偶联受体都含有 7 个疏水肽段形成的跨膜  $\alpha$  螺旋区和相似的三维结构，N 端在细胞外侧，C 端在细胞胞质侧。每个跨膜  $\alpha$  螺旋由 22~24 个氨基酸残基组成，其中螺旋 5 和 6 之间的胞内环状结构域 (C3) 对于受体与 G 蛋白之间的相互作用具有重要作用 (图 9-13)。推测配体与受体的结合会引起 H5 和 H6 螺旋的彼此相对移动，结果导致 C3 环构象改变使之容许结合并激活  $G_\alpha$  亚基。G 蛋白偶联受体介导无数胞外信号的细胞应答，G 蛋白偶联受体家族包括多种对蛋白或肽类激素、局部介质、神经递质和氨基酸或脂肪酸衍生物等配体识别与结合的受体，以及哺乳类嗅觉、味觉受体和视觉的光激活受体 (视紫红质)。在线虫基因组 19 000 个基因中大约编码 1 000 种不同的 G 蛋白偶联受体。尽管与这类受体相互作用的信号分子多种多样，受体的氨基酸序列也千差万别，但对 G 蛋白偶联受体的研究分析结果表明，所有真核生物从单细胞酵母到人类都

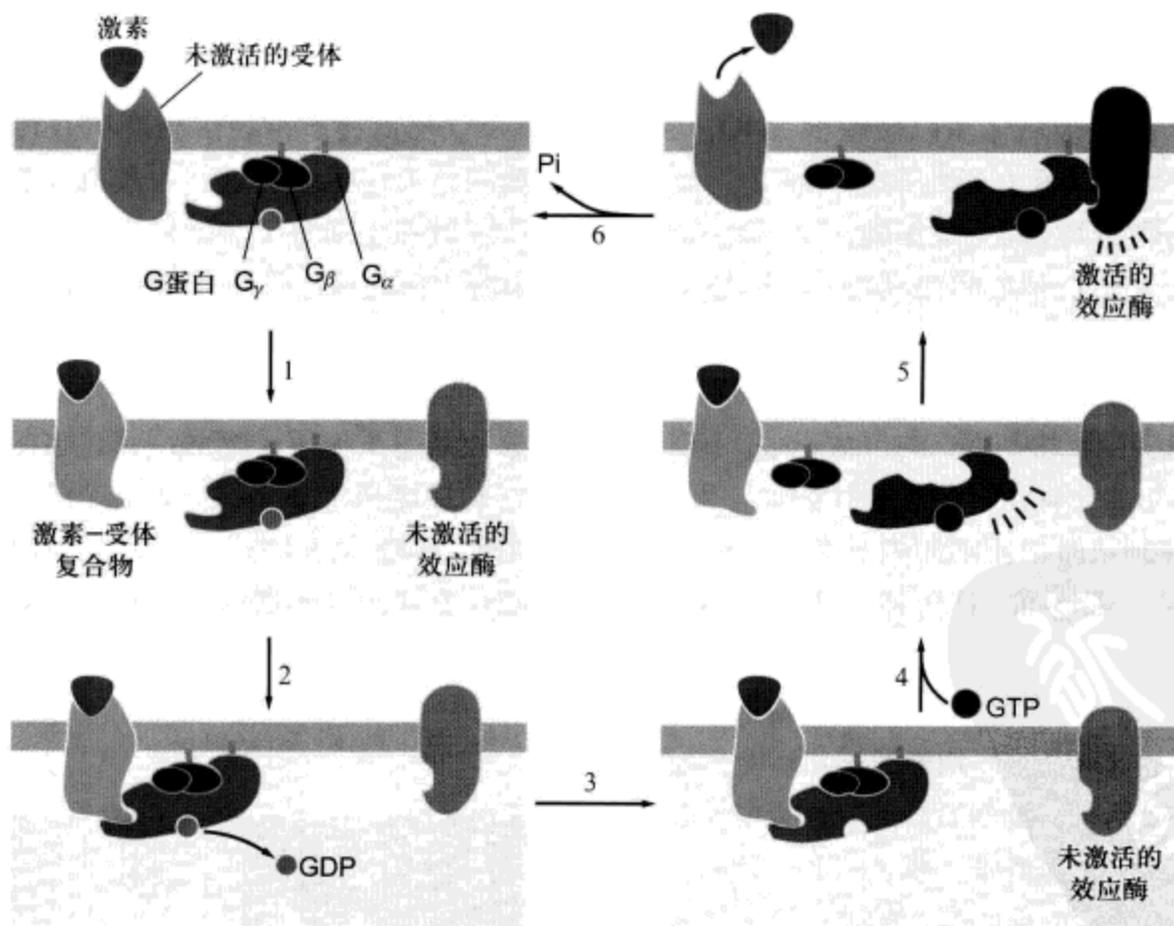


图 9-12 与 G 蛋白偶联受体相联系的效应蛋白的激活普遍机制

三聚体 G 蛋白解离活化的步骤如下：1. 配体 (激素) 结合诱发受体构象改变；2. 活化受体与  $G_\alpha$  亚基结合；3. 活化的受体引发  $G_\alpha$  亚基构象改变，致使 GDP 与 G 蛋白解离；4. GTP 与  $G_\alpha$  亚基结合，引发  $G_\alpha$  亚基与受体和  $G_\beta\gamma$  亚基解离；5. 配体-受体复合物解离， $G_\alpha$  亚基结合并激活效应蛋白；6. GTP 水解成 GDP，引发  $G_\alpha$  亚基与效应蛋白解离并重新与  $G_\beta\gamma$  亚基结合，恢复到三聚体 G 蛋白的静息状态。

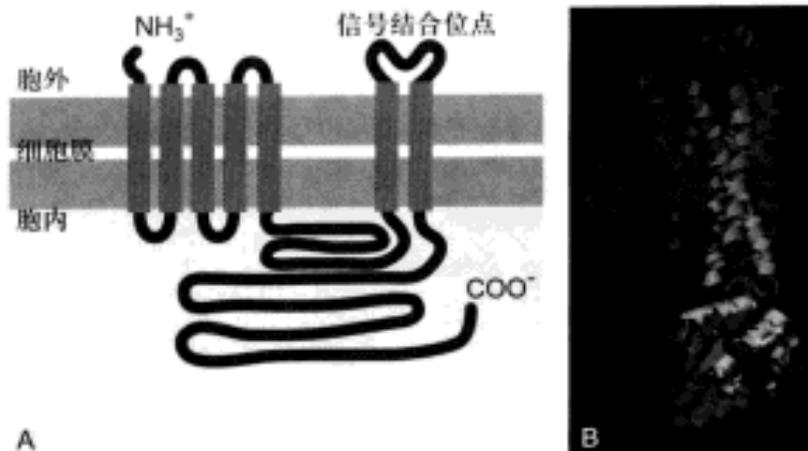


图 9-13

A. G 蛋白偶联受体的结构模式图。所有这类受体在膜上都具有相同的取向，并含有 7 次跨膜  $\alpha$  螺旋区（左至右依次为 H1~H7），4 个细胞外肽段（左至右依次为 E1~E4）；4 个细胞内肽段（左至右依次为 C1~C4），E4 环结合胞外信号（配体），C3 环结构域和有些受体的 C2 环是与 G 蛋白相互作用的位点，配体的结合引起受体胞内域活化 G 蛋白。B. 人  $\beta$  肾上腺素 GPCR 晶体结构。（B 图基于 PDB 数据库 2RH1 结构绘制）

具有相似的 7 次跨膜结构。表 9-3 列出了哺乳类三聚体 G 蛋白的主要种类及其效应器。

## 二、G 蛋白偶联受体所介导的细胞信号通路

由 G 蛋白偶联受体所介导的细胞信号通路（signaling pathway）按其效应器蛋白的不同，可区分为 3 类：① 激活离子通道的 G 蛋白偶联受体；② 激活或抑制腺苷酸环化酶（adenylyl cyclase），以 cAMP 为第二信使的 G 蛋白偶联受体；③ 激活磷脂酶 C（phospholipase C, PLC），以  $IP_3$  和 DAG 作为双信使的 G 蛋白偶联受体。

表 9-3 哺乳类三聚体 G 蛋白的主要种类及其效应器

G <sub>o</sub> 类型	结合的效应器	第二信使	受体举例
G <sub>s</sub>	腺苷酸环化酶	cAMP（升高）	$\beta$ 肾上腺素受体，胰高血糖素受体，血中复合胺受体，后叶加压素受体
G <sub>i</sub>	腺苷酸环化酶 K <sup>+</sup> 通道（G <sub>o</sub> 激活效应器）	cAMP（降低） 膜电位改变	$\alpha_1$ 肾上腺素受体 M 乙酰胆碱受体
G <sub>olf</sub>	腺苷酸环化酶	cAMP（升高）	嗅觉受体（鼻腔）
G <sub>q</sub>	磷脂酶 C	$IP_3$ , DAG（升高）	$\alpha_2$ 肾上腺素受体
G <sub>o</sub>	磷脂酶 C	$IP_3$ , DAG（升高）	乙酰胆碱受体（内皮细胞）
G <sub>t</sub>	cGMP 磷酸二酯酶	cGMP（降低）	视杆细胞中视紫红质（光受体）

### （一）激活离子通道的 G 蛋白偶联受体所介导的信号通路

当受体与配体结合被激活后，通过偶联 G 蛋白的分子开关作用，调控跨膜离子通道的开启与关闭，进而调节靶细胞的活性，如心肌细胞的 M 乙酰胆碱受体和视杆细胞的光感受器，都属于这类调节离子通道的 G 蛋白偶联受体。

#### 1. 心肌细胞上 M 乙酰胆碱受体激活 G 蛋白开启 K<sup>+</sup> 通道

M 乙酰胆碱受体（muscarinic acetylcholine receptor）在心肌细胞膜上与 G<sub>i</sub> 蛋白偶联，乙酰胆碱配体与受体结合使受体活化，导致 G<sub>i</sub> 亚基结合的 GDP 被 GTP 取代，引发三聚体 G<sub>i</sub> 蛋白解离，使 G<sub>o</sub> 亚基得以释放，进而致使心肌细胞膜上相关的效应器 K<sup>+</sup> 通道开启，随即引发细胞内 K<sup>+</sup> 外流，从而导致细胞膜超极化（hyperpolarization），减缓心肌细胞的收缩频率（图 9-14）。该结果已被体外实验所证实。许多神经递质受体是 G 蛋白偶联受体，有些效应器蛋白是 Na<sup>+</sup> 或 K<sup>+</sup> 通道。神经递质与受体结合引发 G 蛋白偶联的离子通道的开放或关闭，进而导致膜电位的改变。

#### 2. Gt 蛋白偶联的光感受器的活化诱发 cGMP 门控阳离子通道的关闭

人类视网膜含有两类光受体（photoreceptor），负责视觉刺激的初级感受。视锥细胞光受体与色彩感受相关；视杆细胞光受体接受弱光刺激。视紫红质（rhodopsin）是视杆细胞 Gt 蛋白偶联的光受体，定位在视杆细胞外段上千个扁平膜盘上，三聚体 G 蛋白与视紫红质偶联，通常称之为传导素（transducin, Gt）。人类视杆细胞含有大约  $4 \times 10^7$  个视紫红质分子，组成 7 次跨膜的视蛋白（opsin）与光吸收色素共价连接。

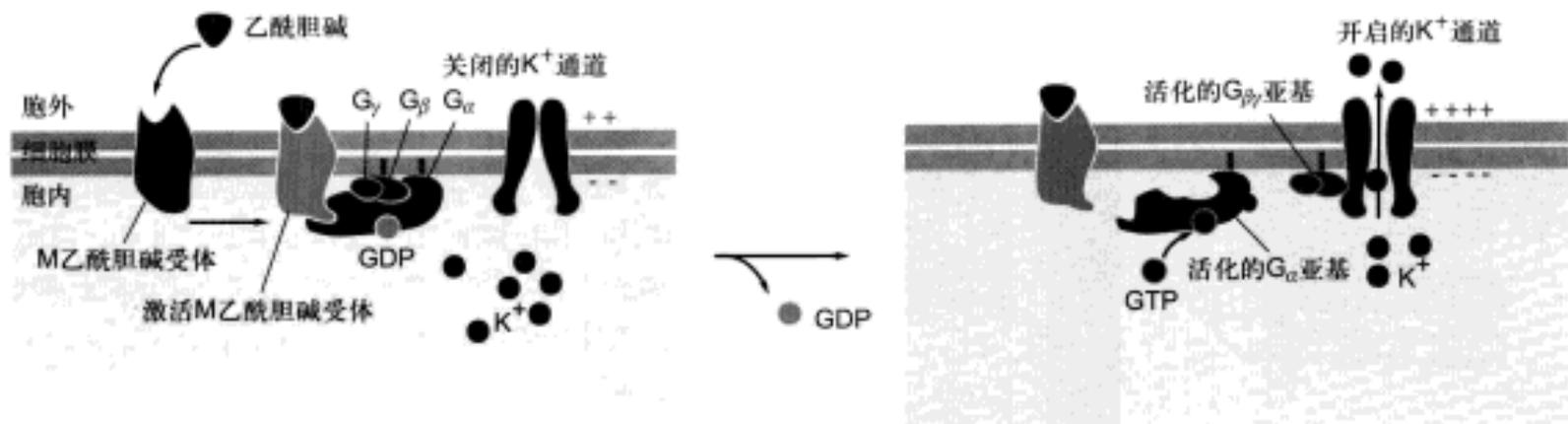


图 9-14 心肌细胞上 M 型乙酰胆碱受体的活化与效应器 K<sup>+</sup> 通道开启的工作模型

这类受体通过三聚体 G<sub>i</sub> 蛋白与 K<sup>+</sup> 通道相联系，乙酰胆碱的结合以常见的方式引发 G<sub>iα</sub> 亚基活化并与 G<sub>βγ</sub> 解离。在本例中，释放的 G<sub>βγ</sub> 亚基（而不是 G<sub>iα</sub>-GTP）结合并打开 K<sup>+</sup> 通道，K<sup>+</sup> 通透性增加，使膜超极化，降低心肌收缩频率。当与 G<sub>iα</sub> 结合的 GTP 水解形成 GDP 时，G<sub>iα</sub>-GDP 重新与 G<sub>βγ</sub> 结合（图中未表示）。

如图 9-15 所示，在暗适应状态下的视杆细胞，高水平的第二信使 cGMP 保持 cGMP 门控非选择性阳离子通道的开放，光的吸收产生激活的视蛋白 O\*（图 9-15 步骤 1），活化的视蛋白与无活性的 GDP-Gt 三聚体

蛋白结合并引发 GDP 被 GTP 置换（图 9-15 步骤 2），Gt 三聚体蛋白解离形成游离的 Gt<sub>α</sub>，通过与 cGMP 磷酸二酯酶（PDE）抑制性 γ 亚基结合导致 PDE 活化（图 9-15 步骤 3），同时引起 γ 亚基与催化性 α 和 β 解离，

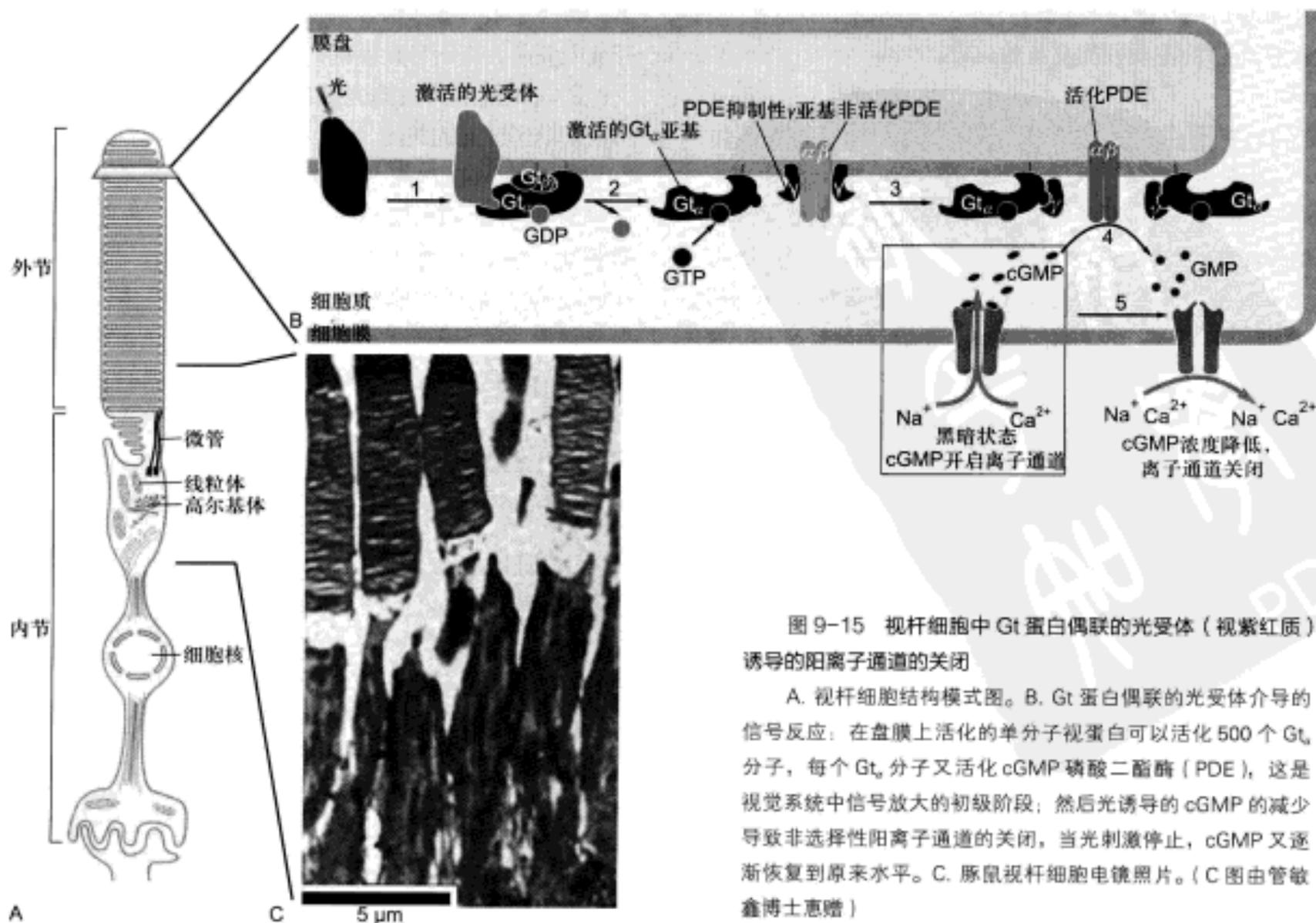


图 9-15 视杆细胞中 Gt 蛋白偶联的光受体（视紫红质）诱导的阳离子通道的关闭

A. 视杆细胞结构模式图。B. Gt 蛋白偶联的光受体介导的信号反应：在盘膜上活化的单分子视蛋白可以活化 500 个 Gt<sub>α</sub> 分子，每个 Gt<sub>α</sub> 分子又活化 cGMP 磷酸二酯酶（PDE），这是视觉系统中信号放大的初级阶段；然后光诱导的 cGMP 的减少导致非选择性阳离子通道的关闭，当光刺激停止，cGMP 又逐渐恢复到原来水平。C. 豚鼠视杆细胞电镜照片。（C 图由管敏鑫博士惠赠）

由于抑制的解除，催化性  $\alpha$  和  $\beta$  亚基使 cGMP 转换成 GMP (图 9-15 步骤 4)，由于胞质中 cGMP 水平降低导致 cGMP 从质膜 cGMP 门控阳离子通道上解离下来并致使阳离子通道关闭 (图 9-15 步骤 5)，然后，膜瞬间超极化。

## (二) 激活或抑制腺苷酸环化酶的 G 蛋白偶联受体

在绝大多数哺乳动物细胞中，G 蛋白偶联受体介导的信号通路遵循如图 9-12 所示的普遍机制。在该信号通路中， $G_s$  亚基的首要效应酶是腺苷酸环化酶，通过腺苷酸环化酶活性的变化调节靶细胞内第二信使 cAMP 的水平，进而影响信号通路的下游事件。这是真核细胞应答激素反应的主要机制之一。

不同的受体-配体复合物或者刺激或者抑制腺苷酸环化酶活性，这类调控系统主要涉及 5 种蛋白组分 (图 9-16)：① 刺激性激素的受体 (receptor for stimulatory hormone,  $R_s$ )，② 抑制性激素的受体 (receptor for inhibitory hormone,  $R_i$ )，③ 刺激性 G 蛋白 (stimulatory G-proteins complex,  $G_s$ )，④ 抑制性 G 蛋白 (inhibitory G-proteins complex,  $G_i$ )，⑤ 腺苷酸环化酶 (adenylyl cyclase, AC)。

刺激性激素的受体 ( $R_s$ ) 和抑制性激素的受体 ( $R_i$ ) 均为 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体，但与之结合的胞外配体不同。已知  $R_s$  有几十种，包括肾上腺素  $\beta$  受体、胰高血糖素受体、后叶加压素受体、促黄体生成素受体、促卵泡激素受体、促甲状腺素受体、促肾上腺皮质激素受体和肠促胰酶激素受体等； $R_i$  有肾上腺素  $\alpha_2$  受体、阿片肽受体、乙酰胆碱 M 受体和生长素释放抑制因子受体等。

刺激性激素与相应刺激性激素受体 ( $R_s$ ) 结合，偶

联刺激性三聚体 G 蛋白 (具刺激性  $G_s$  亚基，即  $G_{s\alpha}$ )，刺激腺苷酸环化酶活性，提高靶细胞 cAMP 水平；抑制性激素与相应抑制性激素受体 ( $R_i$ ) 结合，偶联抑制性三聚体 G 蛋白 (与刺激性三聚体 G 蛋白含相同的  $G_{\beta\gamma}$  亚基，不同的  $G_s$  亚基即抑制性  $G_i$  亚基)，结果抑制腺苷酸环化酶活性，降低靶细胞 cAMP 水平。

腺苷酸环化酶是相对分子质量为  $1.5 \times 10^5$  的多次跨膜蛋白 (12 次)，胞质侧具有 2 个大而相似的催化结构域，跨膜区有 2 个整合结构域，每个含 6 个跨膜  $\alpha$  螺旋；人工制备包含  $G_{s\alpha}$ 、腺苷酸环化酶催化结构域的两个蛋白质片段的 X 射线晶体学分析，已获得三维结构证明 (图 9-17)。腺苷酸环化酶在  $Mg^{2+}$  或  $Mn^{2+}$  存在条件下，催化 ATP 生成 cAMP。在正常情况下细胞内 cAMP 的浓度  $\leq 10^{-6}$  mol/L，当腺苷酸环化酶被激活后，cAMP 水平急剧增加，使靶细胞产生快速应答；在细胞内还有另一种酶即环腺苷酸磷酸二酯酶 (PDE)，可降解 cAMP 生成 5'-AMP，导致细胞内 cAMP 水平下降，从而终止信号反应。cAMP 浓度在细胞内的迅速调节是细胞快速应答胞外信号的重要基础。

在多细胞动物各种以 cAMP 为第二信使的信号通路中，主要是通过 cAMP 激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 所介导的。无活性的 PKA 是含有 2 个调节亚基 (regulatory subunit, R) 和 2 个催化亚基 (catalytic subunit, C) 组成的四聚体，在每个 R 亚基上有 2 个 cAMP 的结合位点，cAMP 与 R 亚基是以协同方式 (cooperative fashion) 结合的，即第一个 cAMP 的结合会降低第二个 cAMP 结合的解离常数 (dissociation constant,  $K_d$ )，因此胞内 cAMP 水平的很小变化就能导致 PKA 释放 C 亚基并快速使激酶活化 (图 9-18)。通过激素引发的某些抑制物的解

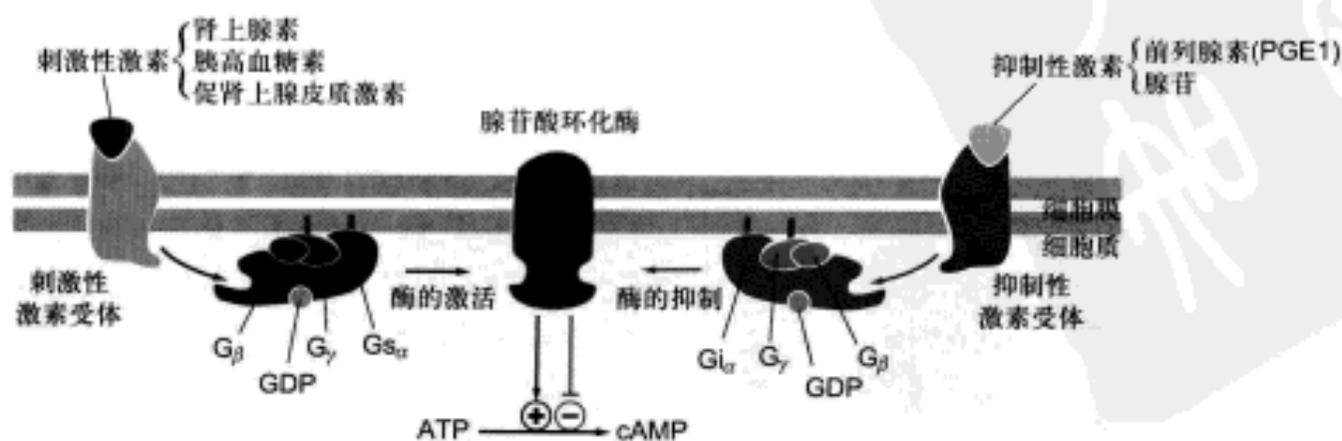
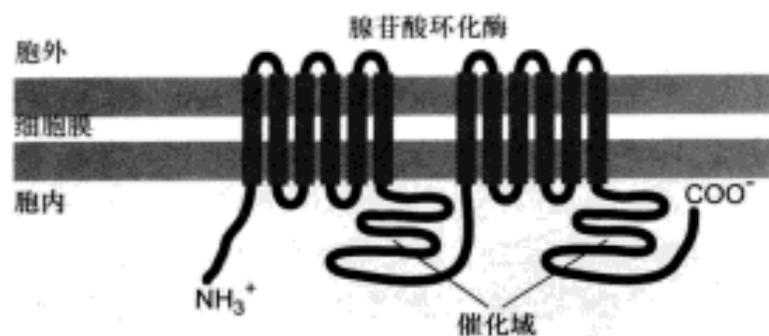
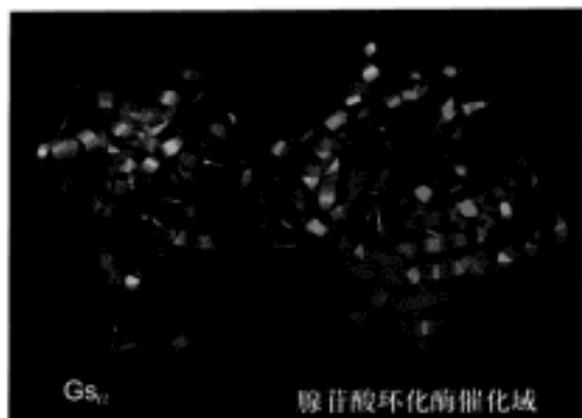


图 9-16 脂肪细胞受激素诱导的腺苷酸环化酶的激活与抑制

不同的激素-受体复合物，偶联不同的 G 蛋白 ( $G_s$  和  $G_i$ )，相同的  $G_{\beta\gamma}$  亚基，不同的  $G_s$  亚基 ( $G_{s\alpha}$  和  $G_{i\alpha}$ )，导致  $G_{s\alpha}$ -GTP 激活腺苷酸环化酶，而  $G_{i\alpha}$ -GTP 抑制腺苷酸环化酶的活性。



A



B

图 9-17 哺乳动物腺苷酸环化酶的结构与该酶同  $G_s\alpha$ -GTP 的相互作用

A. 哺乳动物腺苷酸环化酶的结构示意图: 12 次跨膜蛋白, 含 2 个胞质侧催化结构域, 2 个膜整合结构域 (每个含 6 个跨膜  $\alpha$  螺旋)。

B. 包含牛  $G_s\alpha$  亚基、狗 V 型腺苷酸环化酶和鼠 II 型腺苷酸环化酶催化结构域的重组三维结构。(B 图基于 PDB 数据库 1CJT 结构绘制)

离导致酶的迅速活化是各种信号通路的普遍特征。绝大多数哺乳动物细胞表达 G 蛋白偶联受体。虽然许多激素刺激这些受体导致 PKA 的激活, 但是细胞应答反应可能只依赖于细胞表达的特殊 PKA 异构体和 PKA 底物。例如, 肾上腺素对糖原代谢的效应是通过 cAMP 和 PKA 所介导的, 但主要限于肝和肌细胞, 它们表达与糖原合成和降解有关的酶。在脂肪细胞, 肾上腺素诱导的 PKA 的激活促进磷脂酶的磷酸化和活性, 磷脂酶的作用是催化三酰甘油水解生成脂肪酸和甘油。释放的脂肪酸进入血液并被其他组织 (如肾、心和肌肉) 细胞用作能源。然而, 卵巢细胞 G 蛋白偶联受体在某些垂体激素刺激下导致 PKA 活化, 转而促进 2 种类固醇激素 (雌激素和孕酮) 的合成, 这对雌性性征发育至关重要。虽然 PKA 在不同类型的细胞作用于不同底物, 但 PKA 总是磷酸化相同序列的基序 X-Arg-(Arg/Lys)-X-(Ser/Thr)- $\phi$  (X 代表任意氨基酸,  $\phi$  代表疏水氨基酸) 中的丝氨酸 (Ser) 和苏氨酸 (Thr) 残基, 其他的 Ser/Thr 激酶磷酸化不同序列基序中的靶残基。

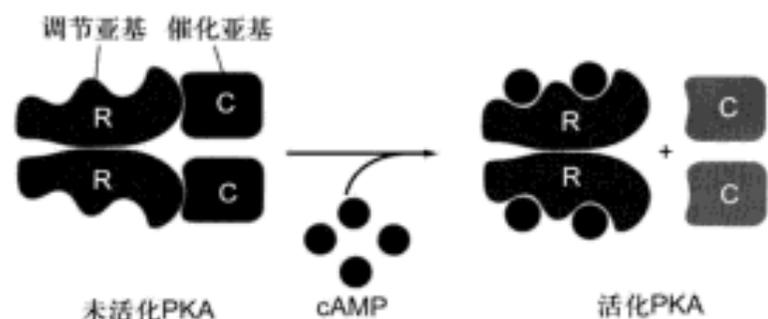


图 9-18 PKA 的结构与活化示意图

cAMP 特异性地活化 cAMP 依赖的 PKA, 释放其催化亚基。

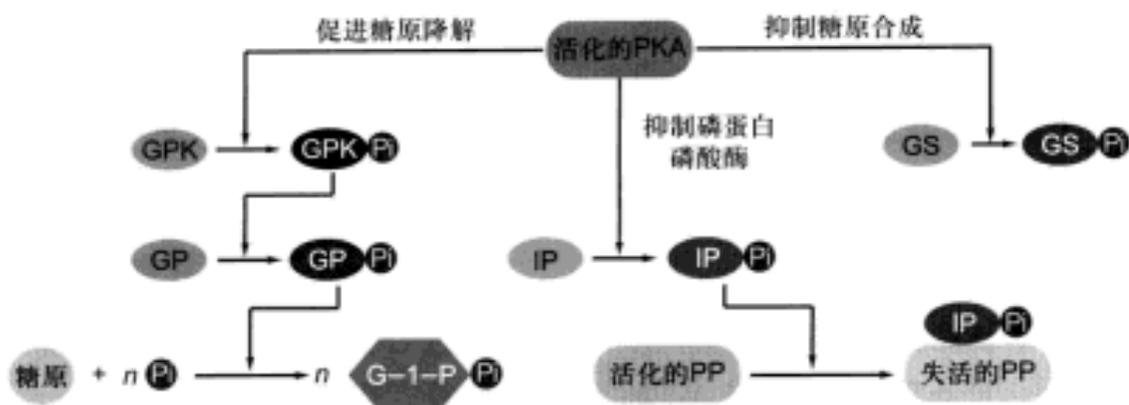
### 1. cAMP-PKA 信号通路对肝细胞和肌细胞糖原代谢的调节

正常人体维持血糖水平的稳态, 需要神经系统、激素及组织器官的协同调节。肝和肌肉是调节血糖浓度的主要组织。脑组织活动对葡萄糖是高度依赖的, 因而在应答胞外信号的反应中, cAMP 水平会发生快速变化, 几乎在 20 s 内 cAMP 水平会从  $5 \times 10^{-8}$  mol/L 上升到  $10^{-6}$  mol/L 水平。细胞表面 G 蛋白偶联受体应答多种激素信号对血糖浓度进行调节。以肝细胞和骨骼肌细胞为例, cAMP-PKA 信号对细胞内糖原代谢起关键调控作用, 这是一种短期的快速应答反应。当细胞内 cAMP 水平增加时, cAMP 依赖的 PKA 被活化, 活化的 PKA 首先磷酸化糖原磷酸化酶激酶 (GPK), 使其激活, 继而使糖原磷酸化酶 (GP) 被磷酸化而激活, 活化的 GP 刺激糖原的降解, 生成葡糖-1-磷酸; 另一方面, 活化的 PKA 使糖原合酶 (GS) 磷酸化, 抑制其糖原的合成。此外, 活化的 PKA 还可以使磷蛋白磷酸酶抑制蛋白 (IP) 磷酸化而被激活, 活化的 IP 与磷蛋白磷酸酶 (PP) 结合并使其磷酸化而失活 (图 9-19A); 当细胞内 cAMP 水平降低时, cAMP 依赖的 PKA 活性下降, 致使磷蛋白磷酸酶抑制蛋白 (IP) 磷酸化过程逆转, 导致磷蛋白磷酸酶 (PP) 被活化。活化 PP 使糖原代谢中 GPK 和 GP 去磷酸化, 从而降低其活性, 导致糖原降解的抑制, 活化 PP 还促使 GS 去磷酸化, 结果 GS 活性增高, 从而促进糖原的合成 (图 9-19B)。

### 2. cAMP-PKA 信号通路对真核细胞基因表达的调控

cAMP-PKA 信号通路对细胞基因表达的调节是一类细胞应答胞外信号缓慢的反应过程, 因为这一过程涉

A. cAMP增加



B. cAMP减少

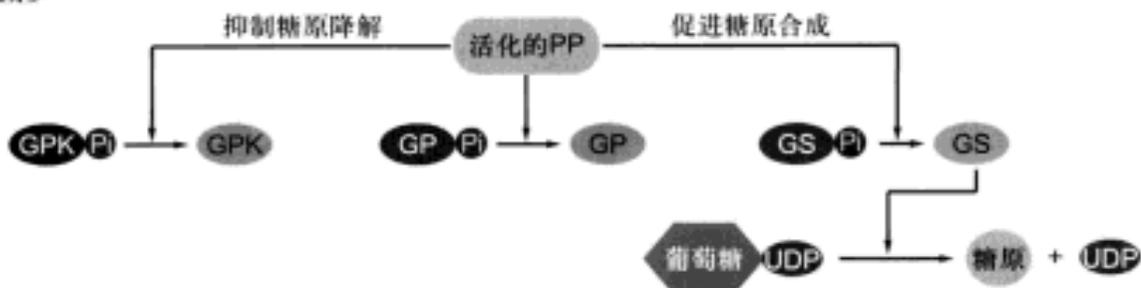


图 9-19 cAMP-PKA 信号对肝和肌细胞糖原代谢的调节

PKA: 蛋白激酶 A; PP: 磷蛋白磷酸酶; GPK: 糖原磷酸化酶激酶; GP: 糖原磷酸化酶; GS: 糖原合酶; IP: 磷蛋白磷酸酶抑制蛋白; G-1-P: 葡萄糖-1-磷酸。

及细胞核机制，所以需要几分钟乃至几小时。这一信号通路控制多种细胞内的许多过程，从内分泌细胞的激素合成到脑细胞有关长期记忆所需蛋白质的产生。该信号通路涉及的反应链可表示为：激素→G 蛋白偶联受体→G 蛋白→腺苷酸环化酶→cAMP→cAMP 依赖的蛋白激酶 A→基因调控蛋白→基因转录。

信号分子与受体结合通过  $G_s$  激活腺苷酸环化酶，导致细胞内 cAMP 浓度增高，cAMP 与 PKA 调节亚基结合，导致催化亚基释放，被活化的 PKA 其催化亚基转位进入细胞核，使基因调控蛋白（cAMP 应答元件结合蛋白，CREB）磷酸化，磷酸化的基因调控蛋白 CREB 与核内 CREB 结合蛋白（CBP）特异结合形成复合物，复合物与靶基因调控序列结合，激活靶基因的表达（图 9-20）。

在讨论 G 蛋白偶联受体介导的信号通路时，我们不禁要问：为什么不同的信号（配体）通过类似的机制会引发多种不同的细胞反应？这主要取决于 G 蛋白偶联受体的特异性。首先，对某一特定的配体其受体可以几种不同的异构体形式存在，并对该配体和特定 G 蛋白有不同的亲和性。现已知肾上腺素受体有 9 种不同的异构体，5-羟色胺的受体有 15 种不同的异构体；其次，人类基因组编码 27 种不同的  $G_s$ ，5 种不同的  $G_p$  和 13 种

不同的  $G_i$  亚基，还有 9 种不同的腺苷酸环化酶。不同亚基组合的多样性决定了通过类似机制可产生众多不同的细胞反应。

有些细菌毒素（bacteriotoxin）含有一个跨细胞质膜的亚基，能催化  $G_s-GTP$  的化学修饰，从而防止结合的 GTP 水解成 GDP，结果  $G_s$  持续维持在活化状

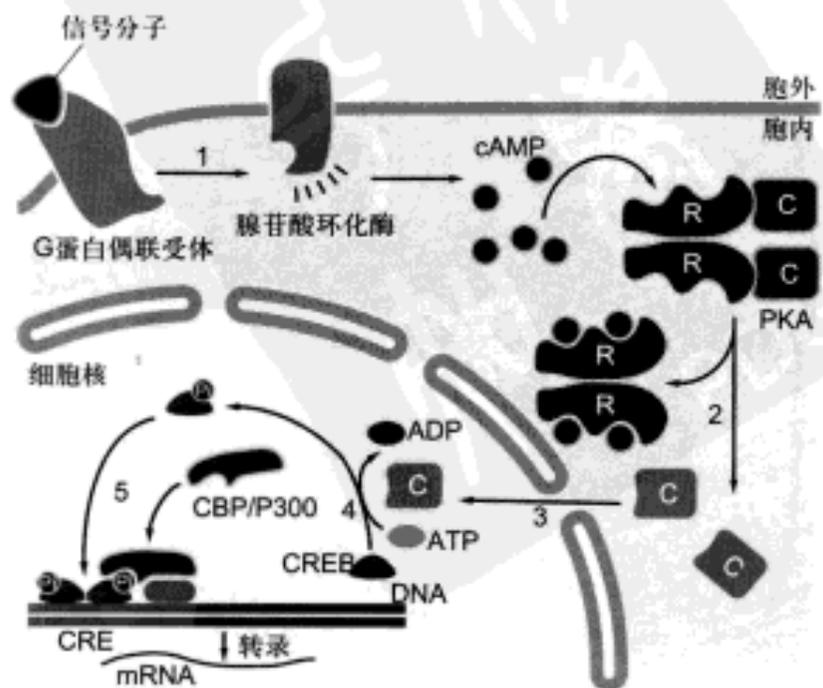


图 9-20 cAMP-PKA 信号通路对基因转录的激活  
活化的 PKA 磷酸化基因调控蛋白，进而激活靶基因转录。

态，在缺乏激素刺激的情况下也会不断地激活腺苷酸环化酶，产生第二信使，向下游传递信号。霍乱毒素 (cholera toxin) 具有 ADP-核糖转移酶活性，进入细胞催化胞内的 NAD<sup>+</sup> 的 ADP 核糖基共价结合在 G<sub>s</sub> 亚基上，致使 G<sub>s</sub> 亚基丧失 GTP 酶活性，与 G<sub>s</sub> 亚基结合的 GTP 不能水解成 GDP，结果 GTP 永久结合在 G<sub>s</sub> 亚基上，处于持续活化状态并不断地激活腺苷酸环化酶，使腺苷酸环化酶被“锁定”在活化状态。霍乱病患者的症状是严重腹泻，其主要原因就是霍乱毒素催化 G<sub>s</sub> 亚基 ADP-核糖基化，致使小肠上皮细胞中 cAMP 水平增加 100 倍以上，导致细胞大量 Na<sup>+</sup> 和水分子持续外流，产生严重腹泻而脱水。百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 产生百日咳毒素 (pertussis toxin) 催化 G<sub>i</sub> 亚

基 ADP-核糖基化，结果防止与 G<sub>i</sub> 亚基结合的 GDP 的释放，使 G<sub>i</sub> 亚基被“锁定”在非活化状态，G<sub>i</sub> 亚基的失活导致气管上皮细胞内 cAMP 水平增高，促使液体、电解质和黏液分泌减少。

### (三) 激活磷脂酶 C、以 IP<sub>3</sub> 和 DAG 作为双信使 G 蛋白偶联受体介导的信号通路

通过 G 蛋白偶联受体介导的另一条信号通路是磷脂酰肌醇信号通路，其信号转导是通过效应酶磷脂酶 C 完成的。

细胞磷脂酰肌醇代谢途径如图 9-21 所示，双信使 IP<sub>3</sub> 和 DAG 的合成来自膜结合的磷脂酰肌醇 (PI)。细胞膜结合的 PI 激酶将肌醇环上特定的羟基磷酸化，形

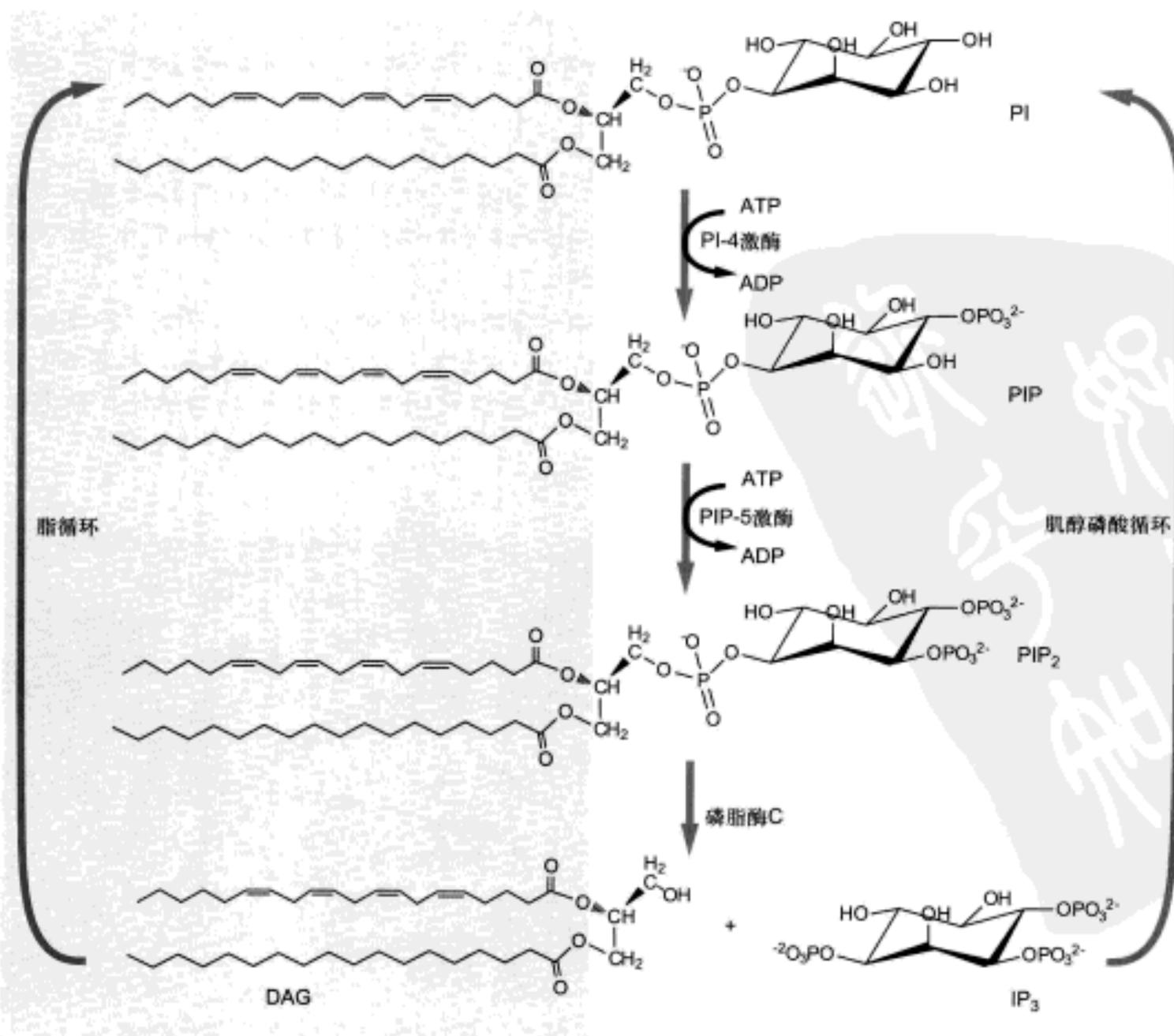


图 9-21 磷脂酰肌醇代谢途径：肌醇三磷酸 (IP<sub>3</sub>) 和二酰甘油 (DAG) 的合成来自膜结合的磷脂酰肌醇 (PI)

成磷脂酰肌醇-4-磷酸 (PIP) 和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP<sub>2</sub>)，胞外信号分子与 G<sub>o</sub> 或 G<sub>q</sub> 蛋白偶联的受体结合，通过如前所述的 G 蛋白开关机制引起质膜上磷脂酶 C 的 β 异构体 (PLC<sub>β</sub>) 的活化，致使质膜上磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP<sub>2</sub>) 被水解生成 IP<sub>3</sub> 和 DAG 两个第二信使。IP<sub>3</sub> 在细胞质中扩散，DAG 是亲脂性分子，锚定在膜上。

IP<sub>3</sub> 刺激细胞内质网释放 Ca<sup>2+</sup> 进入细胞质基质，使胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高，DAG 激活蛋白激酶 C (PKC)，活化的 PKC 进一步使底物蛋白磷酸化，并可激活 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交换，引起细胞内 pH 升高。以磷脂酰肌醇代谢为基础的信号通路的最大特点是胞外信号被膜受体接受后，同时产生两个胞内信使，分别激活两种不同的信号通路，即 IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup> 和 DAG-PKC 途径 (图 9-22)，实现细胞对外界信号的应答，因此把这种信号系统又称之为“双信使系统” (double messenger system)。

### 1. IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup> 信号通路与钙火花

胞外信号分子与 GPCR 结合，活化 G 蛋白 (G<sub>o</sub> 或 G<sub>q</sub>)，进而激活磷脂酶 C (PLC)，催化 PIP<sub>2</sub> 水解生成 IP<sub>3</sub> 和 DAG 两个第二信使。IP<sub>3</sub> 通过细胞内扩散，结合并开启内质网膜上 IP<sub>3</sub> 敏感的 Ca<sup>2+</sup> 通道，引起 Ca<sup>2+</sup> 顺电化学梯度从内质网钙库释放进入细胞质基质，通过结合钙调蛋白引起细胞反应。

IP<sub>3</sub> 的主要功能是引发贮存在内质网中的 Ca<sup>2+</sup> 转移到细胞质基质中，使胞质中游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度提高。依靠内质网膜上的 IP<sub>3</sub> 门控 Ca<sup>2+</sup> 通道 (IP<sub>3</sub>-gated Ca<sup>2+</sup> channel)，将储存的 Ca<sup>2+</sup> 释放到细胞质基质中是几乎所有真核细胞内 Ca<sup>2+</sup> 动员的主要途径。IP<sub>3</sub> 门控 Ca<sup>2+</sup> 通道由 4 个亚

基组成，每个亚基在 N 端胞质结构域有一个 IP<sub>3</sub> 结合位点，IP<sub>3</sub> 的结合导致通道开放，Ca<sup>2+</sup> 从内质网腔释放到细胞质基质中 (图 9-23A)。在细胞中发现的各种磷酸肌醇加到内质网膜泡的制备物中，只有 IP<sub>3</sub> 能引起 Ca<sup>2+</sup> 的释放，表明 IP<sub>3</sub> 具有效应特异性。IP<sub>3</sub> 介导的 Ca<sup>2+</sup> 水平升高只是瞬时的，因为质膜和内质网膜上 Ca<sup>2+</sup> 泵的启动会分别将 Ca<sup>2+</sup> 泵出细胞和泵进内质网腔。一方面，细胞质基质中的 Ca<sup>2+</sup> 会促进 IP<sub>3</sub> 门控 Ca<sup>2+</sup> 通道的开启，因为 Ca<sup>2+</sup> 会增加通道受体对 IP<sub>3</sub> 的亲合性，促使储存 Ca<sup>2+</sup> 的更多释放。另一方面，细胞质基质中 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高，又会通过降低通道受体对 IP<sub>3</sub> 的亲合性，抑制 IP<sub>3</sub> 诱导的胞内储存 Ca<sup>2+</sup> 的释放。当细胞中 IP<sub>3</sub> 通路受到刺激时，这种由细胞质基质中 Ca<sup>2+</sup> 对内质网膜上 IP<sub>3</sub> 门控 Ca<sup>2+</sup> 通道的复杂调控会导致细胞质基质中 Ca<sup>2+</sup> 水平的快速振荡。例如，垂体中激素分泌细胞受到黄体生成素释放激素 (LHRH) 的刺激，引发细胞质基质中 Ca<sup>2+</sup> 水平产生快速而重复的脉冲，每个脉冲又都与 LH 分泌的高潮相吻合。

在细胞信号转导过程的研究中，人们对信号分子与受体的相互作用及其最终的生物学效应已经有了比较多的了解。但是信息是如何在细胞中传递的细节却知之甚少。借助于能与 Ca<sup>2+</sup> 特异结合的荧光试剂如 Fura-2 和 Fluo-3 的发明和激光共聚焦显微镜的使用，人们得以在活细胞中实时观察和记录细胞中 Ca<sup>2+</sup> 浓度的微弱变化 (图 9-23B)，从而揭示了作为第二信使的钙信号在细胞中传递的机制。

1993 年以来，钙火花 (Ca<sup>2+</sup> spark) 等一系列微区钙信号传导单元的发现，显示出钙信号转导过程中，在

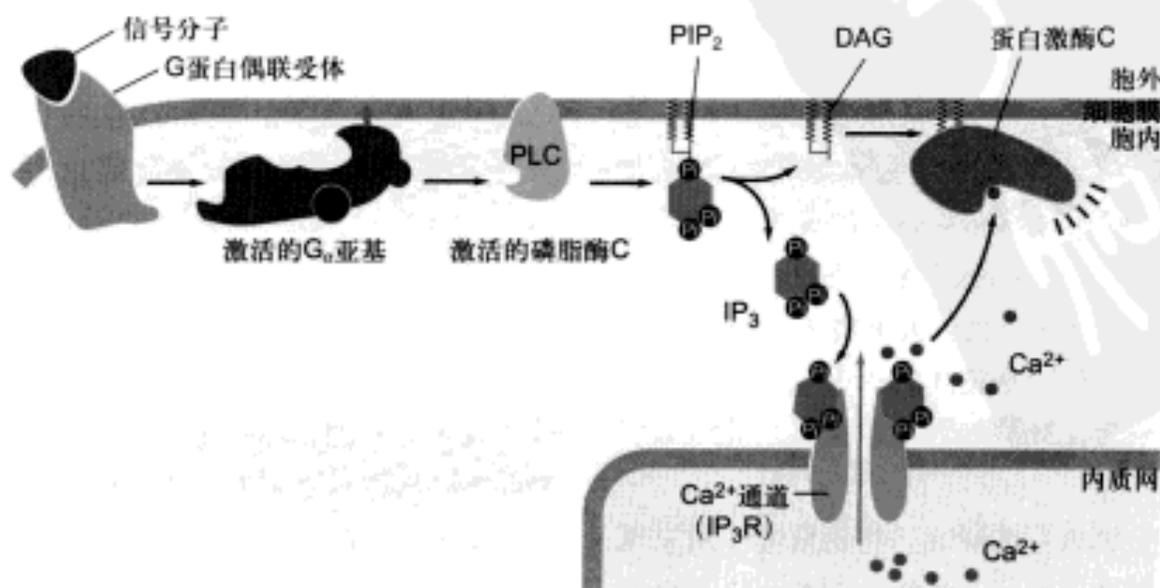


图 9-22 IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup> 和 DAG-PKC 双信使信号通路

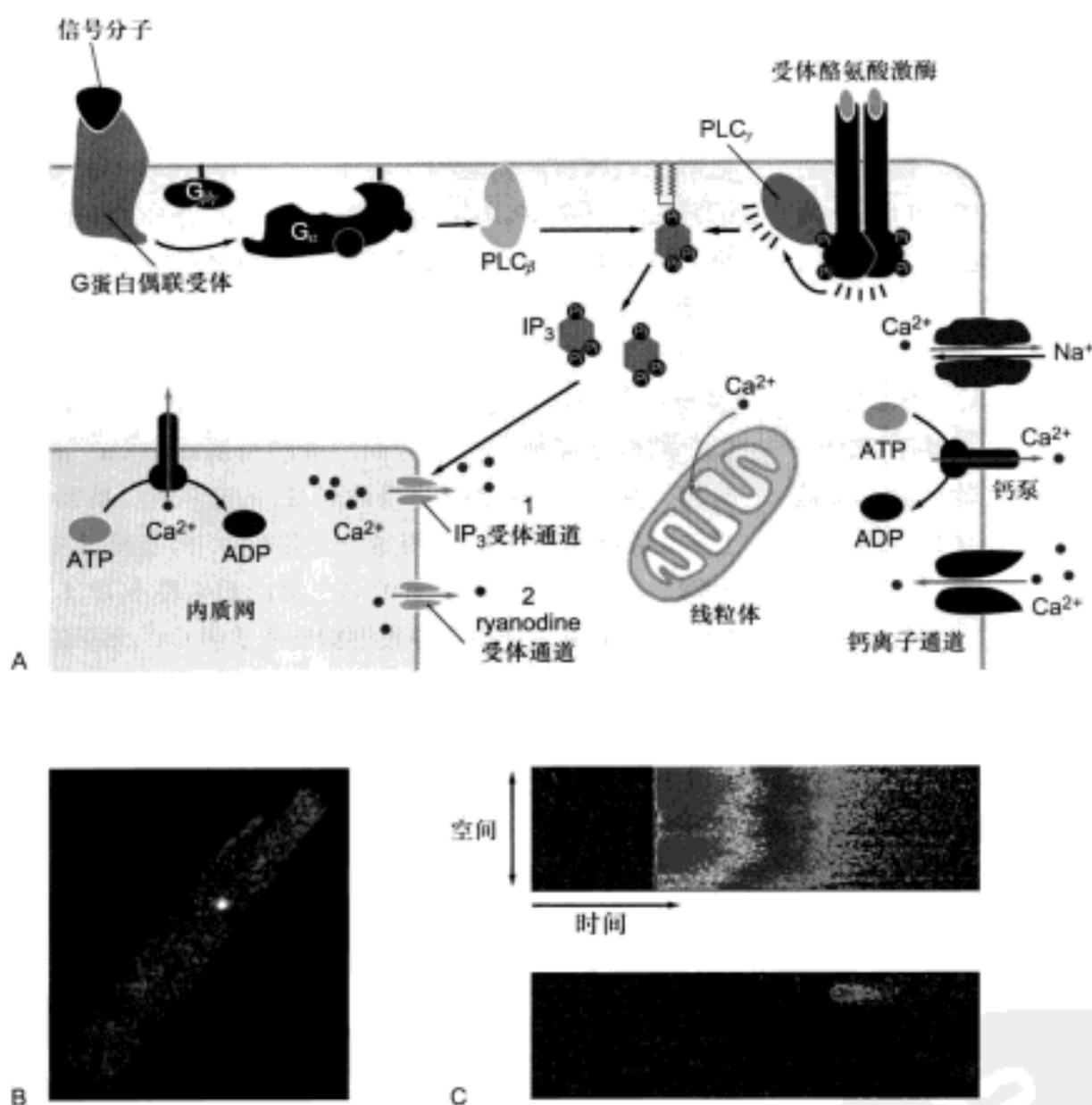


图 9-23 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平调控示意图与心肌细胞钙火花

A. 在内质网膜上有两类  $\text{Ca}^{2+}$  通道: 1.  $\text{IP}_3$  受体, 即  $\text{IP}_3$  门控  $\text{Ca}^{2+}$  通道; 2. ryanodine 受体 (RyR), 主要存在于可兴奋细胞 (如心肌细胞) 中, 咖啡因的作用之一就是降低 ryanodine 受体对  $\text{Ca}^{2+}$  的敏感性, 因而增加这些离子通道被 CICR 开通的可能性, 使细胞更容易兴奋。PLC $_{\beta}$ : 磷脂酶  $\beta$  亚基; PLC $_{\gamma}$ : 磷脂酶  $\gamma$  亚基。B. Fluo-3 染色心肌细胞的共聚焦显微图像, 示钙火花的空间特征。C. 钙火花 (下图) 与钙振荡 (上图) 的时间-空间特征。(B、C 图由程和平博士惠赠)

时间、空间和幅度上形成多尺度、多层次上的精细结构。钙火花的直径约  $2 \mu\text{m}$ , 体积  $8 \text{ fL}$ 。在短短的  $10 \text{ ms}$  内, 细胞中某一微区  $\text{Ca}^{2+}$  探针 Fluo-3 的荧光强度骤升一倍, 随后又在  $20 \text{ ms}$  内消失, 故称钙火花。钙火花的发生是一个“扩散-反应”的过程, 即  $\text{Ca}^{2+}$  从一簇 ryanodine 受体构成的发放源放出, 向周围扩散, 并通过不同的分子机制回收或清除, 以恢复细胞质中正常的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度。在单个心肌细胞中, 每次收缩可形成大约  $10^4$  个钙火花, 它们在时间和空间上的叠加形成了细胞水平的钙振荡, 驱动心肌细胞收缩 (图 9-23C)。此外, 细胞微区钙信号的存在, 也大大丰富了  $\text{Ca}^{2+}$  编码生物信息的能力。在平滑肌细胞膜周的钙火花, 却可选择性地影响膜上离子通道, 导致细胞膜超极化, 最终引发平滑肌舒张。

钙信号基本单元钙火花的研究, 将钙信号作用原理的单一性与其调控和功能的复杂性统一起来。快速变化的钙信号与肌肉收缩、神经递质传递、激素分泌等生理

过程直接相关, 而不同的钙信号的组合在长时程的生物学过程, 如基因表达、细胞凋亡以及受精作用中都发挥重要的作用。因此, 对钙火花激活机制、协同机制和终止机制等方面的研究具有非常重要的生理与病理意义。

一般情况  $\text{Ca}^{2+}$  不直接作用于靶蛋白, 而是通过  $\text{Ca}^{2+}$  应答蛋白间接发挥作用。钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 是真核细胞中普遍存在的  $\text{Ca}^{2+}$  应答蛋白, 相对分子质量为  $16.7 \times 10^3$ , 多肽链由 148 个氨基酸残基组成, 含 4 个结构域, 每个结构域可结合一个  $\text{Ca}^{2+}$ 。钙调蛋白本身无活性, 结合  $\text{Ca}^{2+}$  后激活靶酶的过程分两步: 首先  $\text{Ca}^{2+}$  与 CaM 结合形成活化态的  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 复合物, 然后再与靶酶结合将其活化 (表 9-4), 这是一个受  $\text{Ca}^{2+}$  浓度控制的可逆反应。钙调蛋白激酶 (CaM kinase) 是特别重要的一类靶酶, 动物细胞许多功能活动都是由钙调蛋白激酶所介导的。如细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 复合物水平的升高有利于启动受精后胚胎发育, 兴奋肌细胞的收缩, 刺激内分泌细胞和神经元的分泌。在

表 9-4 受钙调蛋白调节的酶

酶	细胞功能	酶	细胞功能
腺苷酸环化酶	合成 cAMP	磷酸化酶	糖原降解
鸟苷酸环化酶	合成 cGMP	肌球蛋白轻链激酶	平滑肌收缩运动
钙依赖性磷酸二酯酶	水解 cAMP 和 cGMP	钙调蛋白激酶	神经递质分泌和再合成, 分子记忆
Ca <sup>2+</sup> -ATP 酶	Ca <sup>2+</sup> 泵	钙依赖性蛋白磷酸酶	各种蛋白质的去磷酸化
NAD 激酶	合成 NADP	转谷氨酰胺酶	蛋白质交联

哺乳动物脑神经元突触处一种特殊的钙调蛋白激酶十分丰富, 是构成记忆通路的组分, 失去这种钙调蛋白激酶的突变小鼠表现出明显的记忆无能。依细胞类型不同, Ca<sup>2+</sup> 可激活或抑制各种靶酶和运输系统, 改变膜的离子通透性, 诱导膜的融合或者改变细胞骨架的结构与功能。

## 2. DAG-PKC 信号通路

作为双信使之一的 DAG 结合在质膜上, 可活化与质膜结合的蛋白激酶 C(PKC)。PKC 有两个功能区, 一个是亲水的催化活性中心, 另一个是疏水的膜结合区。在静息细胞中, PKC 以非活性形式分布于细胞质中, 当细胞接受外界信号刺激时, PIP<sub>2</sub> 水解, 质膜上 DAG 瞬间积累, 由于细胞质中 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高, 导致细胞质基质中 PKC 与 Ca<sup>2+</sup> 结合并转位到质膜内表面, 被 DAG 活化, 进而使不同类型细胞中不同底物蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化。PKC 是 Ca<sup>2+</sup> 和磷脂酰丝氨酸依赖性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 具有广泛的作用底物, 参与众多生理过程, 既涉及许多细胞“短期生理效应”如细胞分泌、肌肉收缩等, 又涉及细胞增殖、分化等“长期生理效应”。DAG 只是 PIP<sub>2</sub> 水解形成的暂时性产物, DAG 通过两种途径终止其信使作用: 一是被 DAG 激酶磷酸化形成磷脂酸, 进入磷脂酰肌醇代谢途径 (见图 9-21); 二是被 DAG 脂酶水解成单酰甘油。由于 DAG 代谢周期很短, 不可能长期维持 PKC 活性, 而细胞增殖或分化行为的变化又要求 PKC 长期产生效应。现发现另一种 DAG 生成途径, 即由磷脂酶催化质膜上的磷脂酰胆碱断裂产生 DAG, 用来维持 PKC 的长期效应。在许多细胞中, PKC 的活化可增强特殊基因的转录。已知至少有两条途径: 一是 PKC 激活一条蛋白激酶的级联反应, 导致与 DNA 特异序列结合的基因调控蛋白的磷酸化和激活, 进而

增强特殊基因的转录; 二是 PKC 的活化, 导致一种抑制蛋白的磷酸化, 从而使细胞质中基因调控蛋白摆脱抑制状态释放出来, 进入细胞核刺激特殊基因的转录 (图 9-24)。

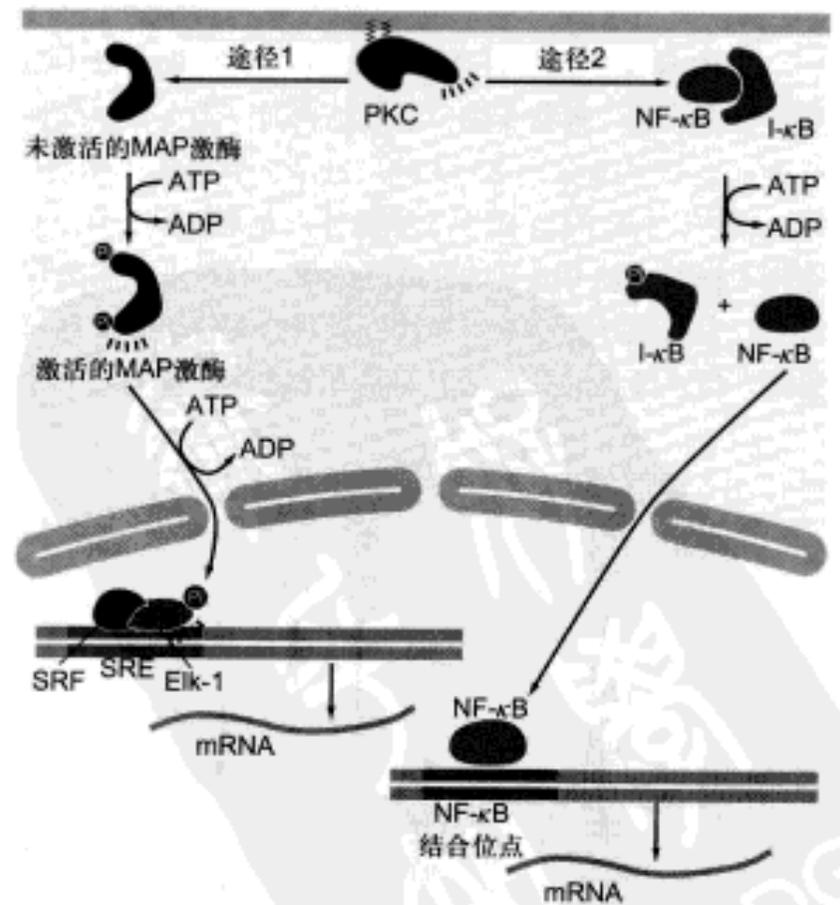


图 9-24 活化的 PKC 激活基因转录的两条细胞内途径

一条途径是 PKC 激活一系列磷酸化级联反应, 导致 MAP 激酶的磷酸化并使之活化, MAP 激酶磷酸化并活化基因调控蛋白 Elk-1。Elk-1 与另一种 DNA 结合蛋白——血清应答因子 (SRF) 共同结合在短的 DNA 调控序列 (血清应答元件, SRE) 上。Elk-1 的磷酸化和活化即可调节基因转录。另一条途径是 PKC 的活化导致 I-κB 磷酸化, 使基因调控蛋白 NF-κB 与 I-κB 解离并进入细胞核, 与相应的基因调控序列结合激活基因转录。MAP 激酶: 促分裂原活化的蛋白激酶 (MAPK)。

## 第四节 酶联受体介导的信号转导

通常与酶连接的细胞表面受体又称催化性受体 (catalytic receptor)，目前已知的这类受体都是跨膜蛋白，当胞外信号 (配体) 与受体结合即激活受体胞内段的酶活性，这类受体至少包括 5 类：① 受体酪氨酸激酶；② 受体丝氨酸 / 苏氨酸激酶；③ 受体酪氨酸磷酸酯酶；④ 受体鸟苷酸环化酶；⑤ 酪氨酸蛋白激酶联受体。

### 一、受体酪氨酸激酶及 RTK-Ras 蛋白信号通路

受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 又称酪氨酸蛋白激酶受体，是细胞表面一大类重要受体家族，迄今已鉴定有 50 余种，包括 7 个亚族 (图 9-25)。所有 RTK 的 N 端位于细胞外，是配体结合域，C 端位于胞内，具有酪氨酸激酶结构域，并具有自磷酸化位点。它的胞外配体是可溶性或膜结合的多肽或蛋白类激素，包括多种生长因子、胰岛素和胰岛素样生长因子

等。RTK 主要功能是控制细胞生长、分化而不是调控细胞中间代谢；Ephrin (Eph) 受体亚族是一大类与膜结合配体相互作用的受体，人类中已鉴定出 8 个成员，主要功能是刺激血管发生、指导细胞和轴突迁移。

绝大多数 RTK 是单体跨膜蛋白，由 500~850 个氨基酸残基组成，人类中已发现约 60 个基因编码 RTK。配体 (如 EGF) 在胞外与受体结合并引起构象变化，但单个跨膜  $\alpha$  螺旋无法传递这种构象变化，因此配体的结合导致受体二聚化 (dimerization) 形成同源或异源二聚体，有些单体性配体 (如 FGF) 与细胞外基质带负电荷的多糖组分肝素 (heparin) 紧密结合，这有利于增强配体与单体性受体的结合并形成二聚化的配体-受体复合物；有些配体是二聚体，它们的结合使 2 个单体性受体直接聚在一起；其他的 RTK (如胰岛素受体) 在没有激素刺激的情况下形成二硫键连接的二聚体，激素与这类受体结合改变其构象使之活化。在静息状态下 RTK 活性很低，当受体二聚化后，激活受体的蛋白酪氨酸激酶活性，进而在二聚体内彼此交叉磷酸化 (cross-phosphorylation) 受体胞内肽段的一个或多个酪氨酸残基，即所谓受体的自磷酸化 (autophosphorylation)。二聚化是一次跨膜的酶联受体被激活的普遍机制。磷酸化的受体酪氨酸残基进一步引发构象改变，或者有利于 ATP 的结合 (如胰岛素受体)，或者有利于结合其他蛋白质底物 (如 FGF)。在激活的 RTK 内，许多磷酸酪

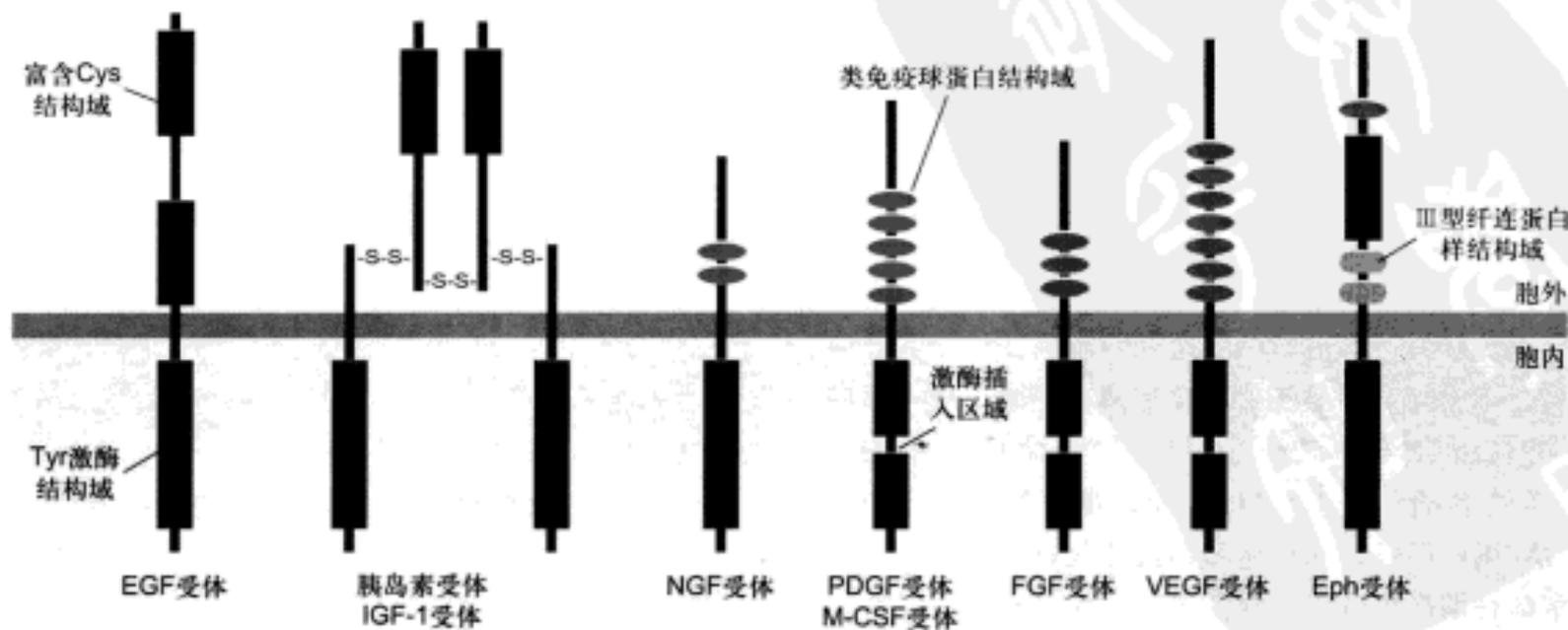


图 9-25 受体酪氨酸激酶 (RTK) 的 7 个亚族

每个亚族只标示了 1~2 个成员：表皮生长因子 (EGF) 受体、胰岛素受体胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 受体、神经生长因子 (NGF) 受体、血小板衍生生长因子 (PDGF) 受体和巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 受体、成纤维细胞生长因子 (FGF) 受体、血管内皮生长因子 (VEGF) 受体和 Eph 受体亚族。在一些亚族中酪氨酸蛋白激酶的结构域被激酶插入区所中断。关于富含半胱氨酸 (Cys) 和类免疫球蛋白结构域的功能意义尚不清楚。

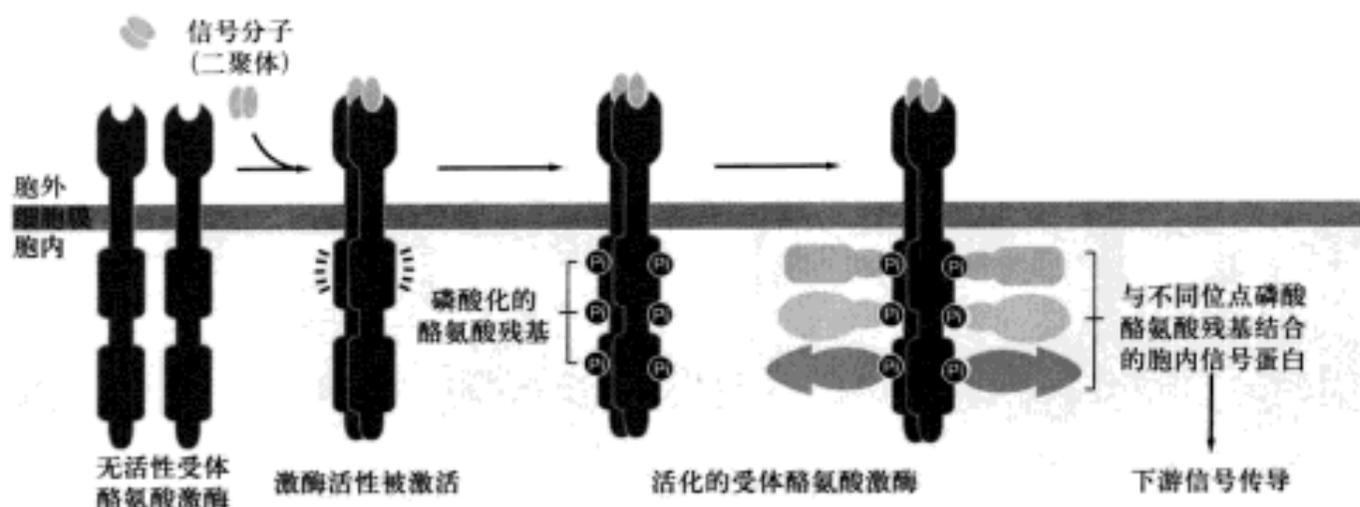


图 9-26 配体结合所诱导的受体酪氨酸激酶 (RTK) 的二聚化与自磷酸化图解

氨酸残基可被含有 SH2 结构域的胞内信号蛋白所识别, 作为多种下游信号蛋白的锚定位点, 启动信号传导 (图 9-26)。

活化的 RTK 通过磷酸酪氨酸残基可以结合多种细胞质中带有 SH2 结构域的蛋白 (参见图 9-8), 其中一类是接头蛋白, 如生长因子受体结合蛋白 2 (GRB2), 其作用是偶联活化受体与其他信号蛋白, 参与构成细胞内信号转导复合物, 但它本身不具酶活性, 也没有传递信号的性质; 另一类是在信号通路中有关的酶, 如 GTP 酶活化蛋白 (GTPase activating protein, GAP)、与肌醇磷脂代谢有关的酶 (磷脂酶 C- $\gamma$ , 3-磷脂酰肌醇激酶)、蛋白磷酸酯酶 (SyP) 以及 Src 类的非受体酪氨酸蛋白激酶等。这两类 RTK 结合蛋白的结构和功能不同, 但它们都具有两个高度保守而无催化活性的结构域即 SH2 和 SH3。因为这两种结构域首先在 Src 蛋白中被发现, 所以称为 Src 同源区 (Src homolog region 2 and 3, SH2 和 SH3)。SH2 选择性结合不同位点的磷酸酪氨酸残基, SH3 选择性结合不同的富含脯氨酸的基序。

在许多真核细胞中, Ras 蛋白在 RTK 介导的信号通路中也是一种关键组分。Ras 蛋白 ( $2.1 \times 10^4$ ) 是 *ras* 基因表达产物, 是由 190 个氨基酸残基组成的小的单体 GTP 结合蛋白, 具有 GTPase 活性, 分布于质膜胞质一侧, 结合 GTP 时为活化态, 而结合 GDP 时为失活态, 所以 Ras 蛋白也是 GTPase 开关蛋白。在细胞中, Ras 蛋白的活性受 GAP 的调节, 它能刺激 Ras 蛋白 GTPase 活性增高 10 万倍。Ras 蛋白从失活态到活化态的转变, 先要 GDP 释放才有 GTP 的结合, GDP 的释放需要鸟苷酸交换因子 (GEF) 参与; Ras 蛋白从活化态到失活态的转变, 则要 GTP 酶活化蛋白 (GAP) 的促进; 所以 GEF 和 GAP 都与 Ras 蛋白 GTP-GDP 转换相关 (图 9-27)。

在酶联受体介导的信号通路中, Ras 蛋白是活化受体 RTK 下游的重要功能蛋白。二者之间通过接头蛋白和 Ras 蛋白-鸟苷酸交换因子 (Ras-GEF) 联系起来。实验证明, 用 PDGF 和 EGF 混合物处理培养的成纤维细胞, 则诱导细胞增殖, 如果向这些细胞显微注射抗 Ras 抗体, 则阻断细胞增殖; 反之, 如果注射 Ras<sup>D</sup> (一种组成型活化的突变 Ras 蛋白), 它不能有效地水解 GTP 并维持细胞持续的活化状态, 结果诱发细胞在缺少生长因子的情况下进行增殖。如图 9-28 所示, 两种胞质蛋白提供了关键性联系: 一个是生长因子受体结合蛋白 GRB2, 具有 SH2 结构域, 可直接与活化受体特异性磷酸酪氨酸残基结合, GRB2 还具有两个 SH3 结构域, 能结合并激活另一种胞质蛋白 Ras-GEF (son of sevenless, Sos), 即 GRB2 作为一种接头蛋白既与活化受体上特异磷酸酪氨酸残基结合又与胞质蛋白鸟苷酸交换因子 Sos 结合, 具有鸟苷酸交换因子活性的 Sos 蛋白与 Ras 结合导致活化 Ras 的构象改变, 使非活性的 Ras-GDP 转换成有活性的 Ras-GTP。对线虫和果蝇发

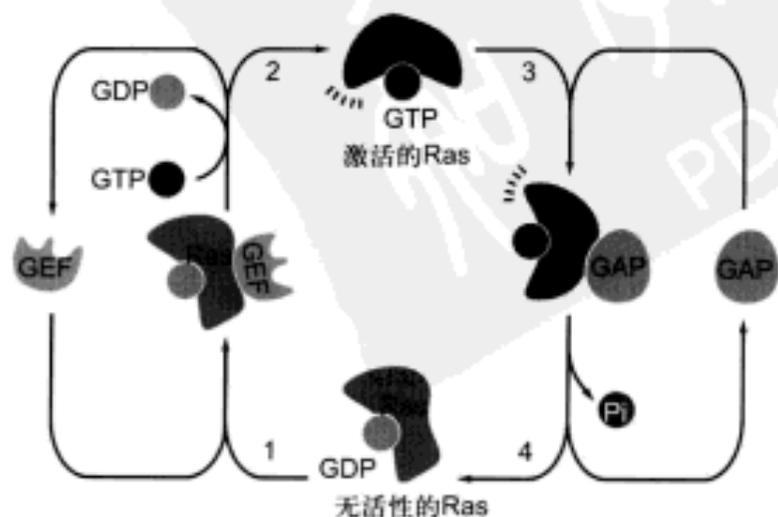


图 9-27 Ras 蛋白 GTP-GDP 转换机制

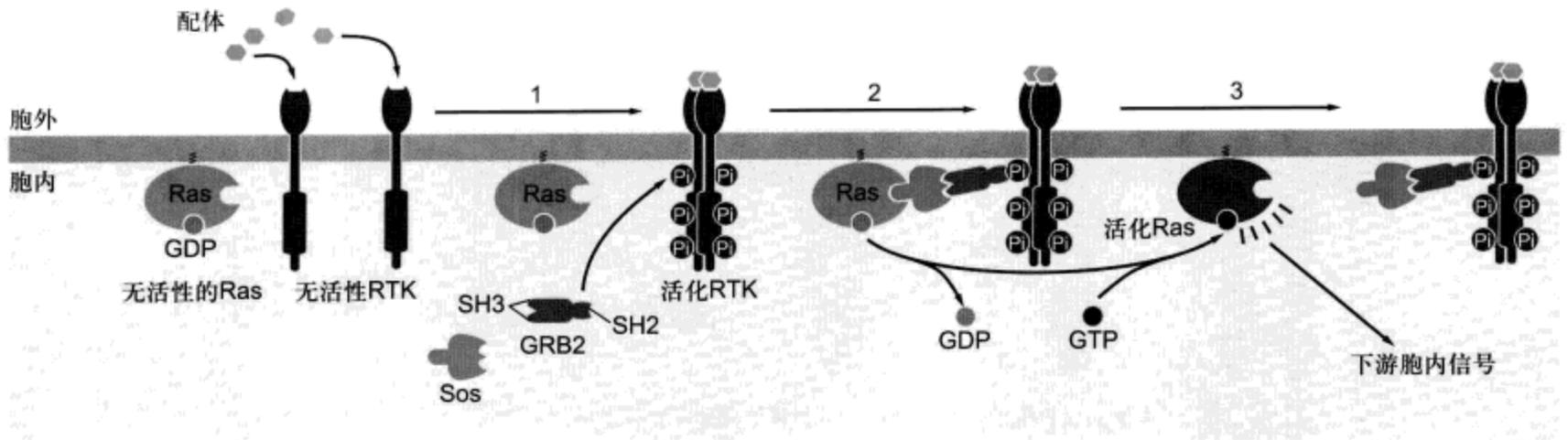


图 9-28 活化的 RTK 激活 Ras 蛋白

育的特定分化阶段的突变遗传分析，也证实上述两种胞质蛋白在联系 RTK 与 Ras 蛋白的活化之间具有关键作用。

Ras 蛋白的活化是通过配体与 RTK 的结合而诱导的，而 Ras 蛋白的活化对诱导不同类型细胞的分化或增殖又是必要的，然而在有些突变细胞中组成型地活化 Ras 蛋白，即使在缺少信号刺激情况下，细胞也会发生应答反应。已有大量研究表明，约 30% 的人类恶性肿瘤与 *ras* 基因突变有关，因为突变的 Ras 蛋白能够与 GTP 结合，但不能将其水解成 GDP，所以这种突变的 Ras 蛋白被“锁定”在开启状态，结果引起赘生性细胞增生。由 RTK 介导的信号通路具有广泛的功能，包括调节细胞的增殖与分化，促进细胞存活，以及细胞代谢的调节与校正作用。各种不同的生长因子与 RTK 结合，往往引起细胞内产生多向性的效应 (pleiotropic effect)，包括早期和晚期基因表达。这种多向性效应是在配体作用下，产生多种信号调节的结果。现在对 RTK-Ras 信号通路已有较多的了解，特别是细胞如何克服 Ras 活化所能维持的时间较短，不足以保障细胞增殖与分化所需持续性信号刺激的问题已获得较深入的认识。配体结合所诱发的 RTK 的激活刺激受体的酪氨酸激酶活性，随后再刺激 Ras-MAPK 磷酸化级联反应 (phosphorylation cascade) 途径和其他几种信号转导通路 (图 9-29)。

多种信号蛋白如 Ras、酪氨酸激酶 Src、蛋白激酶 C、蛋白激酶 B 等都可激活不同的 Raf，其中 Ras 蛋白激活 Raf 是最具代表性的。Ras-MAPK 磷酸化级联反应的基本步骤如下：

(1) 活化的 Ras 蛋白与 Raf 的 N 端结构域结合并使其激活，Raf 是丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶

(又称 MAPKKK)，它使靶蛋白上的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化；丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化的蛋白的代谢周转比酪氨酸残基磷酸化的蛋白慢，这有利于使短寿命的 Ras-GTP 信号事件转变为长寿命的信号事件。

(2) 活化的 Raf 结合并磷酸化另一种蛋白激酶

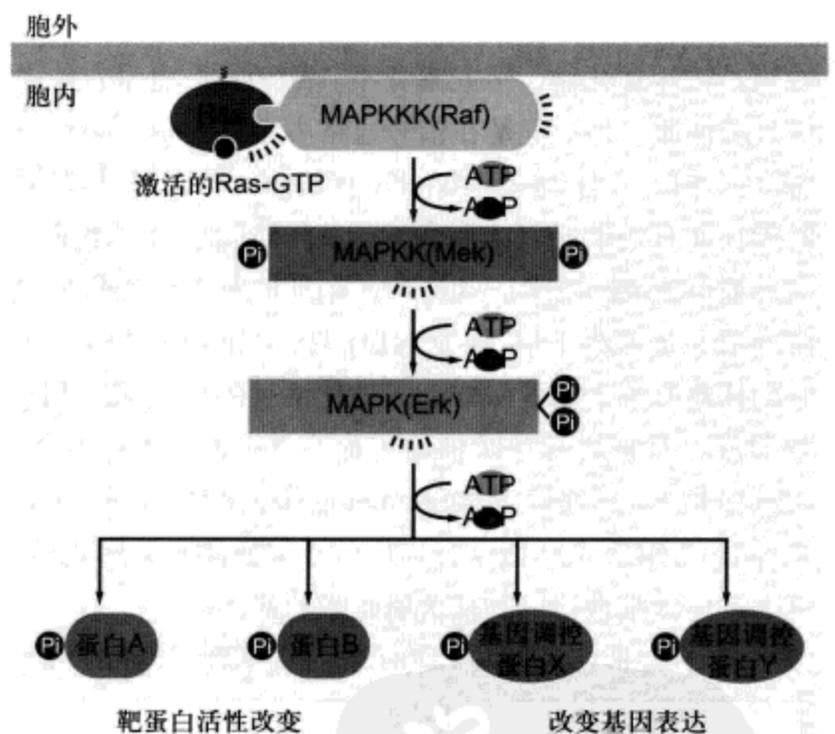


图 9-29 活化的 Ras 蛋白激活的 MAPK 磷酸化级联反应

有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号途径是高度保守的，普遍存在于包括酵母和哺乳动物在内的多种生物细胞中，参与调控细胞生长、发育、分化、凋亡等多种生理过程。活化的 Ras 蛋白引发 3 种蛋白激酶的磷酸化级联反应，增强和放大信号，级联反应的最后才能磷酸化一些基因调控蛋白，改变基因表达模式。这是最终导致细胞行为改变的关键。通过 PKC 激活的靶酶可能是 Raf，也可能是不同的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。MAP：促分裂原活化蛋白质；Raf=MAPKKK：MAP 激酶激酶的激酶；Mek = MAPKK：MAP 激酶的激酶；Erk=MAPK：促分裂原活化的蛋白激酶。

MAPKK, 使其丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化导致 MAPKK 的活化。

(3) MAPKK 是一种双重特异的蛋白激酶, 它能磷酸化其唯一底物 MAPK 的苏氨酸和酪氨酸残基使之激活。

(4) 促分裂原活化的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 在该信号通路的蛋白激酶磷酸化级联反应中是一种特别重要的组分。活化的 MAPK 进入细胞核, 可使许多底物蛋白的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化, 包括调节细胞周期和细胞分化的特异性蛋白表达的转录因子, 从而修饰它们的活性。

综上所述, RTK-Ras-MAPK 信号通路可概括为如下模式: 配体  $\rightarrow$  RTK  $\rightarrow$  Ras  $\rightarrow$  Raf (MAPKKK)  $\rightarrow$  MAPKK  $\rightarrow$  MAPK  $\rightarrow$  进入细胞核  $\rightarrow$  其他激酶或基因调控蛋白 (转录因子) 的磷酸化修饰, 对基因表达产生多种效应。

## 二、PI3K-PKB (Akt) 信号通路

### (一) PI3K-PKB (Akt) 信号通路及其组成

PI3K-PKB (Akt) 信号通路始于 RTK 和细胞因子受体的活化, 产生磷酸化的酪氨酸残基, 从而为募集 PI3K 向膜上转位提供锚定位点。

磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 最初是在多瘤病毒 (polyoma, 一种 DNA 病毒) 研究中被鉴定的。迄今发现在人类基因组中 PI3K 家族有 9 种同源基因编码, PI3K 既具有 Ser/Thr 激酶活性, 又具有磷脂酰肌醇激酶的活性。PI3K 由 2 个亚基组成: 一个 p110 催化亚基; 一个 p85 调节亚基, 具有 SH2 结构域, 可结合活化的 RTK 和多种细胞因子受体胞内段磷酸酪氨酸残基, 被募集到质膜, 使其催化亚基靠近质膜内小叶的磷脂酰肌醇。在膜脂代谢中, 具有磷脂酰肌醇激酶活性的 PI3K 催化 PI-4-P (PIP) 生成 PI-3,4-P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>), 催化 PI-4,5-P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>) 生成 PI-3,4,5-P<sub>3</sub> (PIP<sub>3</sub>)。这些与膜结合的 PI-3-P 为多种信号转导蛋白提供了锚定位点, 进而介导多种下游信号通路。因此, PI3K-蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 信号途径可视为细胞内另一条与磷脂酰肌醇有关的信号通路, 也是 RTK 介导衍生信号通路。

许多蛋白激酶都是通过与质膜上 PI-3-P 锚定位点的结合而被激活的, 然后这些激酶再影响细胞内许多靶蛋白的活性。PKB 是一种相对分子质量约为  $6.0 \times 10^4$  的 Ser/Thr 蛋白激酶, 与 PKA 和 PKC 均有很高的同源

性, 故又称为 PKA 与 PKC 的相关激酶 (related to the A and C kinase, RAC-PK), 该激酶被证明是反转录病毒癌基因 *v-akt* 的编码产物, 故又称 Akt。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (PKB/Akt) 由 480 个氨基酸残基组成, 是重要的信号转导分子, 除中间激酶结构域外, 其 N 端还含有一个 PH 结构域, 能紧密结合 PI-3,4-P<sub>2</sub> 和 PI-3,4,5-P<sub>3</sub> 分子的 3 位磷酸基团。在静息状态下, 2 种磷脂酰肌醇组分均处于低水平, PKB 以非活性状态存在于细胞质基质中, 在生长因子等激素刺激下, PI-3-P 水平升高, PKB 凭借 PH 结构域与 3 位 P 结合而转位到质膜上, 同时 PKB 被 PH 结构域掩盖而抑制的催化位点活性得以释放。实际上, PKB 转位到细胞膜上对其部分活化是必须的也第一步; 它的完全活化还需要另外 2 种 Ser/Thr 蛋白激酶, 一个是 PDK1 借助其 PH 结构域转位到膜上并使 PKB 活性位点上的关键苏氨酸残基磷酸化, 另一个是 PDK2 (通常是 mTOR) 磷酸化 PKB 上丝氨酸残基, 上述 2 个位点被磷酸化后, PKB 才完全活化 (图 9-30)。完全活化的 PKB 从质膜上解离下来, 进入细胞质基质和细胞核, 进而磷酸化多种相应的靶蛋白, 产生影响细胞行为的广泛效应, 诸如促进细胞存活、改变细胞代谢、致使细胞骨架重组等。

### (二) PI3K-PKB 信号通路的生物学作用

PI3K 是脂质磷酸激酶, 催化肌醇第 3 位的磷酸化。PI3K-PKB 信号通路参与多种生长因子、细胞因子和细胞外基质等的信号转导, 具有广泛的生物学效应, 特别是在防止细胞凋亡、促进细胞存活以及影响细胞糖代谢等方面具有重要作用。

(1) PI3K-PKB 信号通路对细胞生存的促进作用是活化的 PKB 所诱发的诸多细胞反应中最值得关注的事件。虽然活化 PKB 仅需花费 5~10 min, 但它的效应却可持续至少几小时。在很多细胞中, 活化的 PKB 可以直接使前体凋亡蛋白 (如 Bad) 磷酸化并产生短期效应以防止激活导致细胞死亡的凋亡途径。对许多培养细胞, 活化的 PKB 也可以产生长期效应, 即通过磷酸化 FOXO 转录因子家族成员 FOXO3A 多个 Ser/Thr 残基, 使其与细胞质中磷酸丝氨酸结合蛋白 14-3-3 结合而滞留在细胞质中, 因而不能进入核内使凋亡基因转录, 结果降低细胞凋亡效应而促进细胞存活。在哺乳动物和人体中, FOXO 家族有 4 种不同的转录因子, 其作用既可激活基因表达, 也可抑制基因表达, 受不同成员调控的这些基因参与诸如细胞凋亡、肝糖异生、细胞周期和细

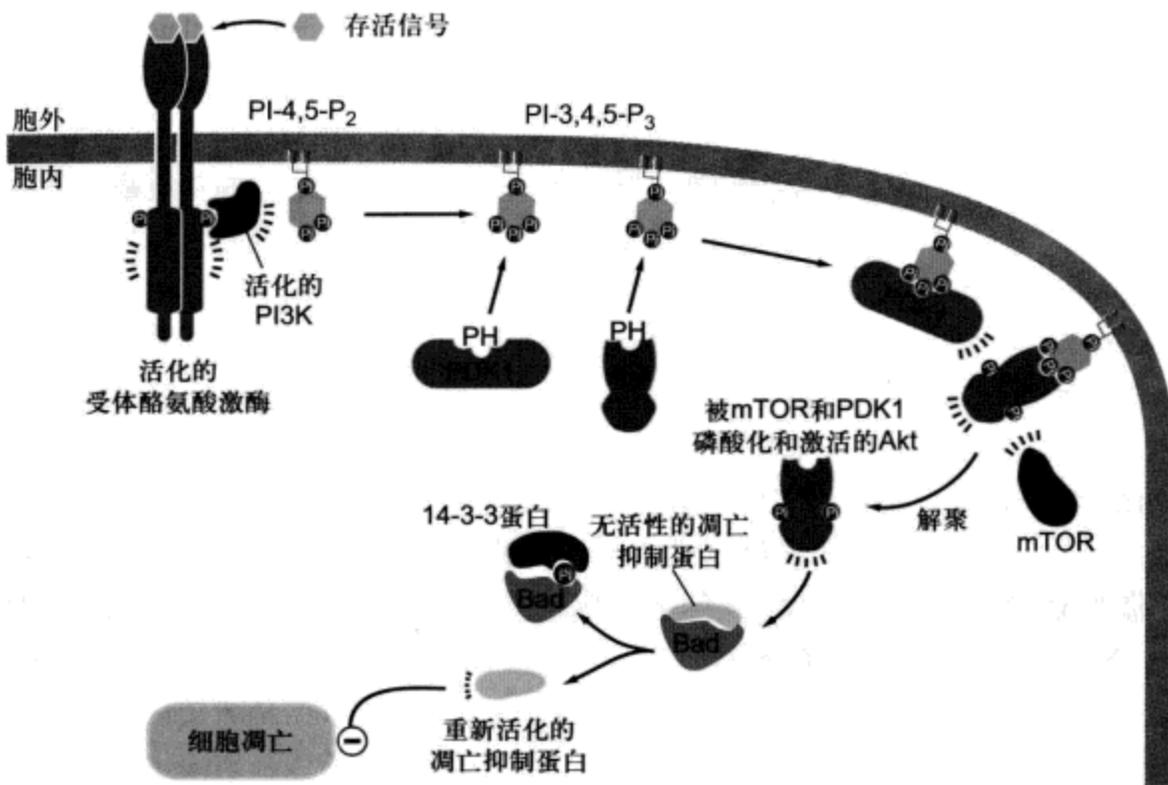


图 9-30 PI3K-PKB 信号通路

胞应激反应等多种生理过程。

(2) PI3K-PKB 信号通路的另一个重要生物学作用是促进胰岛素刺激的葡萄糖摄取与储存。在没有胰岛素存在的情况下，细胞内糖原合酶激酶 3 (GSK3) 是活化的，可将糖原合酶 (GS) 磷酸化使其失去活性；在有胰岛素刺激的情况下，也可启动 PI3K-PKB 信号途径，活化的 PKB 使 GSK3 N 端一个 Ser 残基磷酸化而变成无活性形式，从而解除对 GS 的抑制，促进糖原的合成。此外，在肌细胞和脂肪细胞中，活化的 PKB 还能诱发胰岛素依赖性葡萄糖转运子 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 从细胞内膜转移到细胞表面，促进细胞对葡萄糖的摄取，通过增强糖原合成和促进葡萄糖摄取而使血糖降低。

此外，越来越多的证据表明，在细胞内蛋白质分选或内吞/内化过程中，PI3K 是重要的调节因子。活化的 PI3K 可导致高尔基体 TGN 或质膜局部区域产生高水平的 PI-3,4,5-P<sub>3</sub>，从而连接蛋白 (AP1 或 AP2) 能在这里与膜蛋白中的内吞信号 (YXXΦ 基序) 发生相互作用，进而结合网格蛋白形成包被膜泡，然后发生特定的蛋白质分选或内吞作用。

### 三、TGF-β 受体及其 TGF-β-Smad 信号通路

转化生长因子 β (transforming growth factor-β, TGF-β) 是由多种动物细胞合成与分泌、以非活性形式

储存在细胞胞外基质中结构相关的信号分子超家族，其编码基因于 1985 年克隆成功。无活性的分泌前体需经蛋白酶水解作用形成以二硫键连接的同源或异源二聚体，即成熟的活化形式。人类 TGF-β 超家族由 TGF-β<sub>1</sub>、TGF-β<sub>2</sub>、TGF-β<sub>3</sub> 三种异构体组成，已发现近 40 种。TGF-β 超家族是一类作用广泛、具有多种功能的生长因子，对不同的细胞类型或同一细胞处于不同状态会引起不同的细胞反应。TGF-β 不仅会影响细胞的增殖、分化，而且在创伤愈合、细胞外基质的形成、胚胎发育、组织分化、骨重建、免疫调节以及神经系统的发育中都有重要作用。

TGF-β 超家族成员都是通过细胞表面酶联受体而发挥作用的。根据 <sup>125</sup>I 标记的 TGF-β 与细胞表面受体结合复合物的电泳检测分析，发现 3 种相对分子质量分别为  $5.5 \times 10^4$ 、 $8.5 \times 10^4$  和  $2.8 \times 10^5$  的多肽，分别称之为 R<sub>I</sub>、R<sub>II</sub> 和 R<sub>III</sub> 受体。其中最为丰富的 R<sub>III</sub> 受体是质膜上的蛋白聚糖 (proteoglycan, 也称 β-glycan)，负责结合并富集成熟的 TGF-β，对信号传递起促进作用；R<sub>I</sub> 和 R<sub>II</sub> 受体是二聚体跨膜蛋白，直接参与信号传递，其胞质侧结构域具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性，所以 TGF-β 受体在本质上是受体 Ser/Thr 激酶。R<sub>II</sub> 是组成型活化激酶，在没有 TGF-β 结合情况下也可催化自身磷酸化 Ser/Thr 残基。当细胞外 TGF-β 与 R<sub>III</sub> 受体结合后 (图 9-31, 1a)，R<sub>III</sub> 将 TGF-β 递交给 R<sub>II</sub> 受体；在某些细胞，TGF-β 可以与 R<sub>II</sub> 受体直接结合 (图

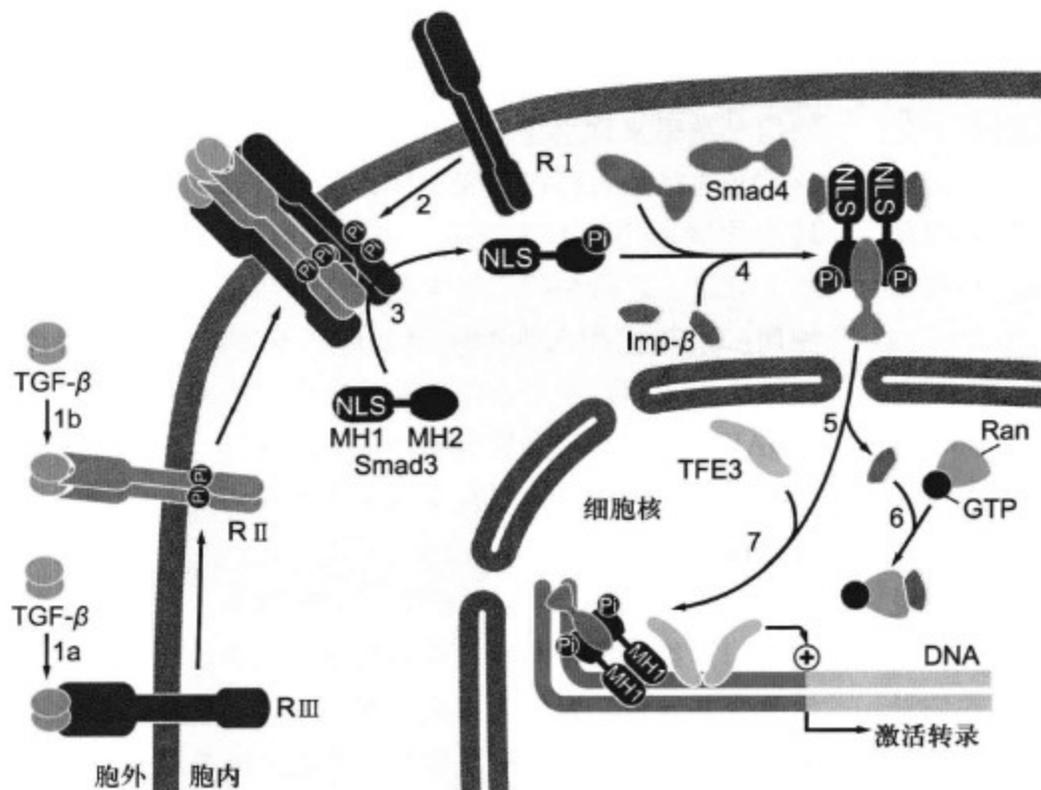


图 9-31 TGF- $\beta$ -Smad 信号通路

1a. 某些细胞中, TGF- $\beta$  与 RII 受体结合, 并由 RII 将信号分子传递给 RI 受体 (具有组成型激酶活性); 1b. 有些细胞中, 信号分子直接与 RII 受体结合。2. 结合配体的 RII 受体募集并磷酸化 RI 受体 (RI 受体不直接结合配体), RI 受体激酶活性的抑制被释放。3. 活化的 RI 受体磷酸化 Smad3 或另外 R-Smad, 引起构象改变, 解除 NLS 的掩盖。4. 两分子磷酸化的 R-Smad (Smad3) 与未磷酸化的 co-Smad (Smad4) 以及 *imp- $\beta$*  相结合, 形成大的细胞质复合物。5, 6. 复合物转位到核内, Ran-GTP 使 *imp- $\beta$*  与 NLS 解离。7. 核内转录因子 (TFE3) 与 Smad3/Smad4 复合物结合, 形成活化型复合物, 调节特定靶基因的转录。

9-31, 1b)。与 TGF- $\beta$  结合的 RII 受体募集并磷酸化 RI 受体胞内段 Ser/Thr 残基, 从而解除其激酶活性的抑制状态, 使 RI 受体被激活。

尽管 TGF- $\beta$  可以诱发复杂而多样的细胞反应, 但 TGF- $\beta$  受体所介导的信号转导通路却又相对简单而且基本相同, 即一旦受体与配体结合形成复合物后便被激活, 那么受体的激酶活性就能在细胞质内直接磷酸化并激活特殊类型的转录因子 Smad, 进入核内调节基因表达, 故称“TGF- $\beta$ -Smad 信号通路”(图 9-31)。

在 TGF- $\beta$ -Smad 信号通路中, Smad 蛋白最初在线虫和果蝇发现, 分别是 Sma 和 Mad, 而后在爪蟾、小鼠和人类中又发现其相关蛋白, 故以 Sma 和 Mad 的缩写 Smad 家族命名这类基因转录调控蛋白。现已知有三种 Smad 转录因子起调控作用, 包括受体调节的 R-Smad (Smad2、Smad3)、辅助性 co-Smad (Smad4) 和抑制性或拮抗性 I-Smad (*imp- $\beta$* ), 三种 Smad 在信号通路中分别发挥不同作用。R-Smad 是 RI 受体激酶的直接作用底物, 含有 MH1 和 MH2 两个结构域, 中间为可弯曲的连接区。位于 N 端的 MH1 结构域含有特异性 DNA 结合区, 同时也包含核定位信号 (NLS) 序列; MH2 结构域与活化受体结合、R-Smad 蛋白磷酸化以及 R-Smad 蛋白分子的寡聚化有关, 并具有潜在转录激活功能。当 R-Smad 未被磷酸化而处于非活化状态时, NLS 被掩盖, 此时 MH1 和 MH2 结构域不能与 DNA 或 co-Smad 相结合。当 RI 受体被激活后, 将 R-Smad 近

C 端的丝氨酸残基磷酸化并导致构象改变使 NLS 暴露, 两个磷酸化的 R-Smad 与 co-Smad 和 *imp- $\beta$*  结合形成大的细胞质复合物 (其中 *imp- $\beta$*  与 NLS 结合), 并引导进入细胞核。在核内 Ran-GTP 作用下 *imp- $\beta$*  与 NLS 解离, Smad2/Smad4 或 Smad3/Smad4 复合物再与其他核内转录因子 (TFE3) 结合, 激活特定靶基因的转录。例如, 经 TGF- $\beta$ -Smad 信号通路激活的 p15 蛋白的表达, 可在 G<sub>1</sub> 期阻断细胞周期, 从而抑制细胞增殖。又如, Smad2/Smad4 或 Smad3/Smad4 复合物也可阻遏 *c-myc* 基因的转录, 从而减少许多受 Myc 转录因子调控的促进细胞增殖基因的表达, 对细胞增殖起负调控作用。因而 TGF- $\beta$  信号的缺失会导致细胞的异常增殖和癌变。现已发现, 许多人类肿瘤或者含有 TGF- $\beta$  受体的失活突变, 或者 Smad 蛋白的突变, 从而颉颃 TGF- $\beta$  引起的生长抑制。

在核内 R-Smad 发生去磷酸化, 结果 R-Smad/co-Smad 复合物解离, 然后从核内输出进入细胞质。由于 Smad 持续的核-质穿梭, 所以细胞核中活化的 Smad 浓度可以很好地反映细胞表面活化的 TGF- $\beta$  受体的水平。

#### 四、细胞质因子受体与 JAK-STAT 信号通路

细胞因子 (cytokine) 是影响和调控多种类型细胞增殖、分化与成熟的活性因子, 包括白介素 (IL)、干扰

素 (interferon, IFN)、集落刺激因子 (colony-stimulating factor, CSF)、促红细胞生成素 (erythropoietin, Epo) 和某些激素 (如生长激素和催乳素) 等, 它们组成一个信号分子家族, 其成员相对分子质量相对较小, 通常由约 160 个氨基酸组成。细胞因子对多种细胞类型的发育, 特别是在造血细胞和免疫细胞的生长、分化与成熟中起重要调控作用。

细胞因子受体 (cytokine receptor) 是细胞表面一类与酪氨酸蛋白激酶偶联的受体 (tyrosine kinase-linked receptor)。这类受体蛋白单次跨膜, 由两条或多条肽链组成, 受体本身不具有酶活性, 但它的胞内段具有与胞质酪氨酸蛋白激酶 (Jak kinase) 的结合位点, 也就是说受体活性依赖于非受体酪氨酸蛋白激酶 (nonreceptor Tyr kinase)。这类受体具有相似的结构, 并激活相似的信号通路。受体的活化机制与 RTK 非常相似, 受体所介导的胞内信号通路也多与 RTK 介导的胞内信号通路重叠。

与细胞因子受体相连的胞质酪氨酸蛋白激酶是一类新近发现的 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) 家族, 其成员包括 Jak1、Jak2、Jak3 和 Tyk2。JAK 的 N 端结构域与受体结合, C 端为激酶结构域。每种激酶成员与特异的细胞因子受体结合。在研究 Epo 受体所介导的信号转导通路中发现, 在激酶的直接底物中发现一类新的衔接子蛋白是基因转录调节因子, 称为信号转导子和转录激活子 (signal transducer and activator of transcription, STAT), STAT 蛋白 N 端具有 SH2 结构域和核定位信号 (NLS), 中间为 DNA 结合域, C 端有一个保守的、对其活化至关重要的酪氨酸残基。目前已发现的 STAT 家

族成员有 7 个, 分别命名为 STAT1 至 STAT7, 具有信号转导和转录激活的双重功能, 因此细胞因子受体介导的信号通路又称之为 JAK-STAT 信号通路 (图 9-32)。该信号通路是人们在研究干扰素诱导培养细胞特定基因转录的调控作用时发现的, 继后发现该通路对细胞增殖、分化、迁移和凋亡等生物学过程都具有重要的调节作用。目前已在人类肿瘤中发现了 STAT3 信号的异常持续活化, 同时在对基因敲除小鼠表型的研究中, 也显示 JAK-STAT 信号通路与某些疾病的发生, 如心血管疾病、肥胖症、糖尿病以及支气管哮喘等可能起关键的调控作用。

JAK-STAT 信号通路的基本步骤如下:

(1) 细胞因子与质膜受体特异性结合, 引发受体构象改变并导致二聚化, 形成同源二聚体。受体二聚化有助于各自结合的 Jak 相互靠近, 使彼此酪氨酸残基发生交叉磷酸化, 从而激活 Jak 的活性。

(2) 活化的 Jak 继而磷酸化受体胞内段酪氨酸残基, 使活化受体上磷酸酪氨酸残基成为具有 SH2 结构域的 STAT 或具有 PTB 结构域的其他胞质蛋白的锚定位点。

(3) STAT 通过 SH2 结构域与受体磷酸化的酪氨酸残基结合, 继而 STAT 的 C 端酪氨酸残基被 JAK 磷酸化。磷酸化的 STAT 分子即从受体上解离下来。

(4) 两个磷酸化的 STAT 分子依靠各自的 SH2 结构域结合形成同源二聚体, 从而暴露其核定位信号 NLS。二聚化的 STAT 转位到细胞核内与特异基因的调控序列结合, 调节相关基因的表达。

细胞因子受体与 STAT 的结合具有特异选择性, 这

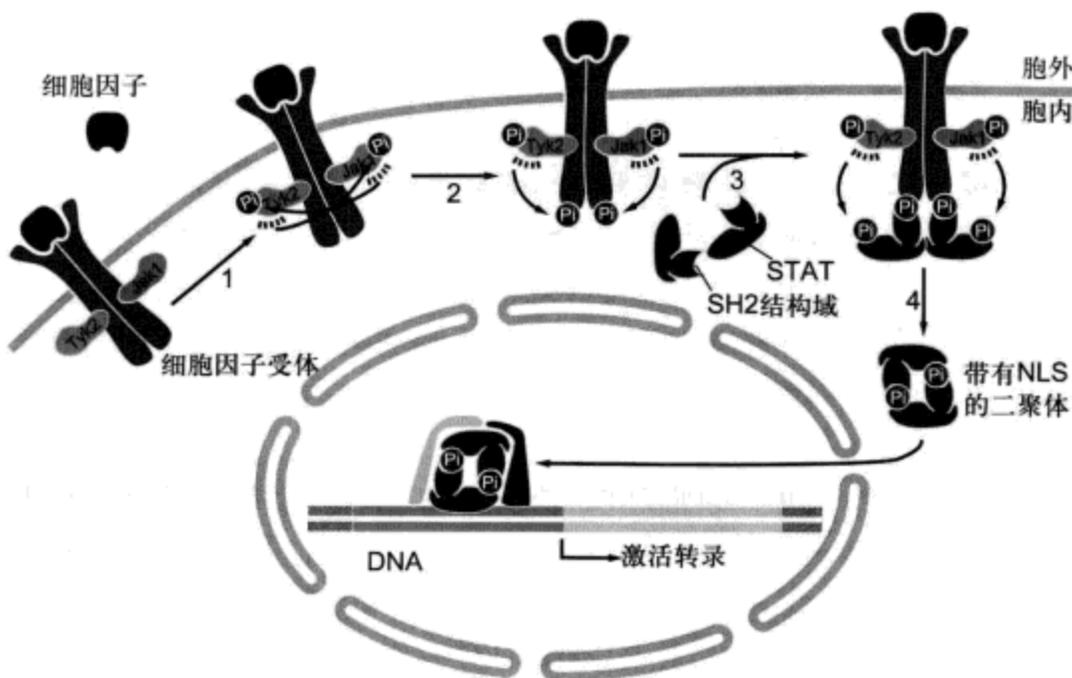


图 9-32 JAK-STAT 信号通路

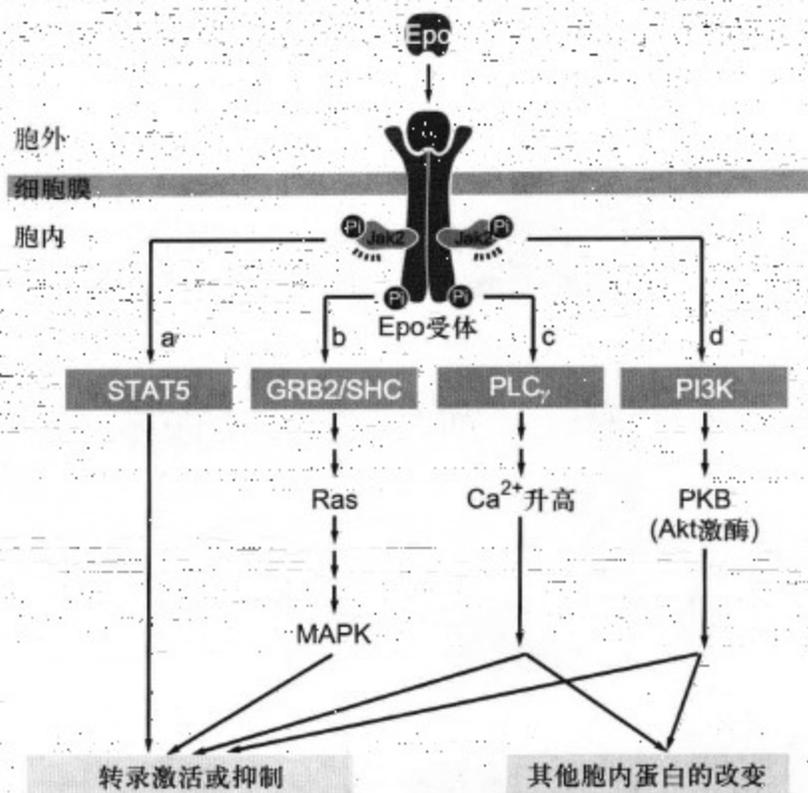


图 9-33 促红细胞生成素 (Epo) 及其受体所介导的信号转导途径概观

基于受体胞内段不同位点的磷酸酪氨酸残基结合不同的 STAT 分子, 例如, 干扰素  $\alpha$  受体识别 STAT1 和 STAT2, 而干扰素  $\beta$  受体只识别 STAT1, Epo 受体识别 STAT5。不同的 STAT 在不同的细胞内调节不同的基因转录。在红细胞分化与成熟过程中, Epo 激活 STAT5 继而诱导 Bcl-XL 活化, 从而防止前体细胞的凋亡, 这对红细胞分化与成熟至关重要。EpoR 基因敲除实验表明, 在小鼠胚胎发育 13 d 时会因为缺少编码 Epo 受体的功能基因导致小鼠因为不能产生正常红细胞而死亡。

细胞因子 Epo 除通过 JAK-STAT 通路调控基因转录外, 还通过其他信号转导途径调控基因转录或改变胞内蛋白质活性 (图 9-33)。

## 第五节 其他细胞表面受体介导的信号通路

由细胞表面受体所介导的调控细胞基因表达的信号通路, 根据其反应机制和特征可区分为 4 类:

(1) GPCR-cAMP-PKA 和 RTK-Ras-MAPK 信号通

路, 它们通过活化受体导致胞质蛋白激酶的活化, 然后活化的胞质激酶转位到核内并磷酸化特异的核内转录因子, 进而调控基因转录 (图 9-34, 1, 2)。

(2) TGF- $\beta$ -Smad 和 JAK-STAT 信号通路, 它们是通过配体与受体结合激活受体本身或偶联激酶的活性, 然后直接或间接导致胞质内特殊转录因子的活化, 进而影响核内基因的表达 (图 9-34, 3, 4)。

(3) Wnt 受体和 Hedgehog 受体介导的信号通路是通过配体与受体结合引发胞质内多蛋白复合物去装配, 从而释放转录因子, 再转位到核内调控基因表达 (图 9-34, 5, 6)。

(4) NF- $\kappa$ B 和 Notch 两种信号通路涉及到抑制物或受体本身的蛋白切割作用, 从而释放活化的转录因子, 再转位到核内调控基因表达 (图 9-34, 7, 8)。

上述 4 类信号通路的共同特点是: ① 所介导的细胞反应是长期反应, 结果是改变核内基因的转录; ② 细胞外信号所诱导的长期反应影响多方面的细胞功能, 包括细胞增殖、细胞分化、细胞通讯, 在影响发育方面起关键作用, 并与许多人类疾病有关; ③ 信号转导过程是高度受控的, 前三类信号调节通路往往是可逆的, 而第四类通路却是不可逆的过程。前两类信号通路上面已经介绍, 后两类信号通路介绍如下。

### 一、Wnt- $\beta$ -catenin 信号通路

Wnt 是一组富含半胱氨酸的分泌性糖蛋白, 作为局域性信号分子, 广泛存在于各种动物多种组织中。小鼠 *Wnt-1* 基因是最先发现的脊椎动物 *Wnt* 基因, 由于某些乳腺癌的发生与它的过表达有关, 所以 *Wnt* 基因倍受关注, 仅在人类中所发现的 *Wnt* 蛋白家族成员已多达 19 个。Wnt 来源于 *wingless* 和 *int* 的融合词, *wingless* 是果蝇中与蝇翅发育缺陷相关的基因, *int* 是小鼠中反转录病毒的整合位点。 $\beta$ -catenin 是哺乳类中与果蝇 Arm 蛋白同源的转录调控蛋白, 它在胞质中的稳定及其在核内的累积是 Wnt 信号通路中关键事件, 起中心作用。由于 Wnt 信号可以引发转录因子  $\beta$ -catenin 从胞质蛋白复合物中释放出来, 调控基因表达, 所以 Wnt 信号通路又称 Wnt- $\beta$ -catenin 信号通路。该信号转导通路十分保守, 从低等动物线虫到高等动物哺乳类, 其组成具有高度同源性。

该信号通路的膜受体 Frzled (Fz) 是与 GPCR 相似的 7 次跨膜细胞表面受体, 直接与 Wnt 结合; 另一个辅助性受体 LRP5/6 (LDL-receptor-related protein, LRP)

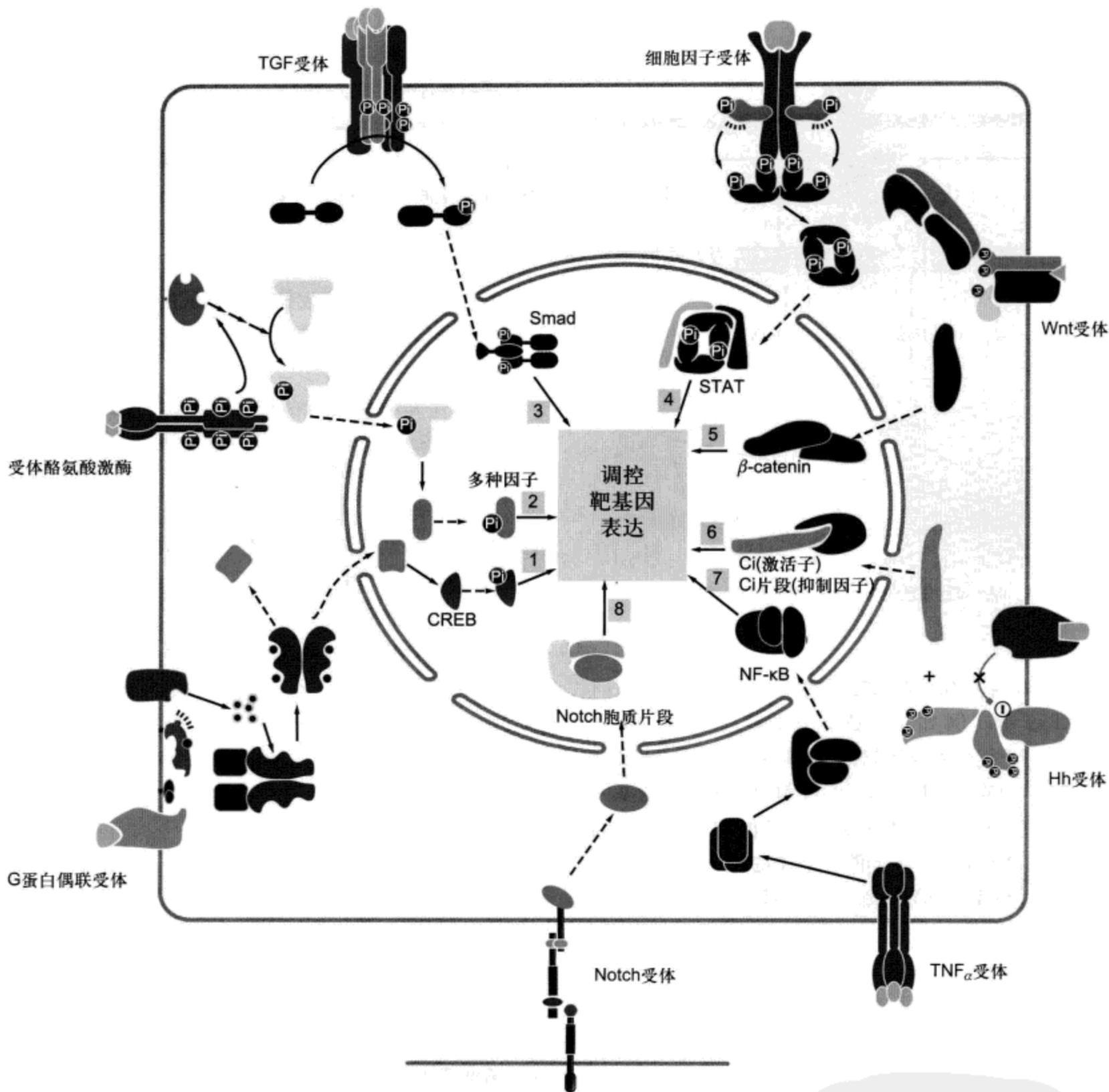


图 9-34 4 类 8 种细胞表面受体所介导的调控细胞基因表达的信号通路

1. GPCR-cAMP-PKA 信号通路：蛋白激酶 A 解离，转位至细胞核中发挥磷酸作用。2. RTK-Ras-MAPK 信号通路：胞质激酶在细胞质或细胞核中磷酸化转录因子。3. TGF-β-Smad 信号通路：活化受体磷酸化胞质蛋白（转录因子）。4. JAK-STAT 信号通路：JAK 激酶磷酸化胞质蛋白 STAT。5. Wnt 受体介导的信号通路：胞质蛋白复合物解聚，翻译转录因子并在核内与 TCF 作用。6. Hedgehog 受体介导的信号通路：胞质内蛋白复合物解聚，释放转录因子，转位至核内。7. NF-κB 信号通路：NF-κB 的抑制因子在胞质中磷酸化并降解，释放活化的转录因子。8. Notch 信号通路：受体被蛋白酶切割，释放 Notch 胞质结构域，后者与核转录因子作用。

1次跨膜，以 Wnt 信号依赖的方式与 Frizzled 结合。实验表明，编码 Wnt、Fz 或 LRP 的基因的突变都会影响胚胎的发育。

按照 Wnt 信号途径的现代模型，在细胞内 Wnt 信号转导中，多功能的  $\beta$ -catenin 起核心作用，它既是转录激活蛋白，又是膜骨架连接蛋白。此外，还有其他胞质调节蛋白参与其中，包括：糖原合酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3)、Dishevelled (DSH)、APC (adenomatous polyposis coli, 人类重要的抑癌基因产物)、支架蛋白 Axin、T 细胞因子 (T cell factor, TCF) 等。

Wnt- $\beta$ -catenin 信号通路如图 9-35 所示。在细胞缺乏 Wnt 信号时， $\beta$ -catenin 结合在由 Axin 介导形成的胞质复合物上，并被复合物中 GSK3 磷酸化，磷酸化的  $\beta$ -catenin 泛素化后被蛋白酶体识别和降解，因而细胞质中  $\beta$ -catenin 的水平很低，核内受 Wnt 信号调控的靶基因处于转录的抑制状态。在细胞外存在较高水平的 Wnt 信号时，支架蛋白 Axin 与辅助受体 LRP 的胞质域结合，导致含有 GSK3 和  $\beta$ -catenin 的胞质蛋白复合物解离，从而避免  $\beta$ -catenin 被 GSK3 磷酸化，使  $\beta$ -catenin 在细胞质中维持稳定。在细胞质中维持由 Wnt 诱导的  $\beta$ -catenin 的稳定还需要与受体 Fz 胞质域结合的 DSH 蛋白。游离的  $\beta$ -catenin 转位到核内，与核内转录因子

TCF 结合，调控特殊靶基因的表达。

Wnt- $\beta$ -catenin 信号通路是胚胎发育中最重要的调控途径之一，对多细胞生物体轴的形成和分化、组织器官建成、组织干细胞的更新与分化等至关重要 (参见本书第十五章)。Wnt 信号通路的异常活化导致或参与多种人类疾病的发生发展，如肿瘤发生、神经系统退行性疾病 (Alzheimer 病) 等。

## 二、Hedgehog 受体介导的信号通路

Hedgehog (Hh) 信号分子是一种由信号细胞所分泌的局域性蛋白质配体，作用范围很小，一般不超过 20 个细胞。在脊椎和无脊椎动物的诸多发育过程中，Hedgehog 信号通路控制细胞命运、增殖与分化，该信号通路被异常激活时，会引起肿瘤的发生与发展。该信号蛋白诱导不同的细胞命运依赖于 Hh 信号分子的浓度。和其他形态生成素 (morphogen) 一样，它的产生在时间与空间上受到严格控制。Hedgehog 在细胞内是以前体 (precursor) 形式合成与分泌的，之后在细胞外发生自我催化性降解，然后在 N 端不同氨基酸残基位点发生胆固醇化和软脂酰化修饰 (palmitoylation)，从而制约其扩散并增加其与质膜的亲和性。

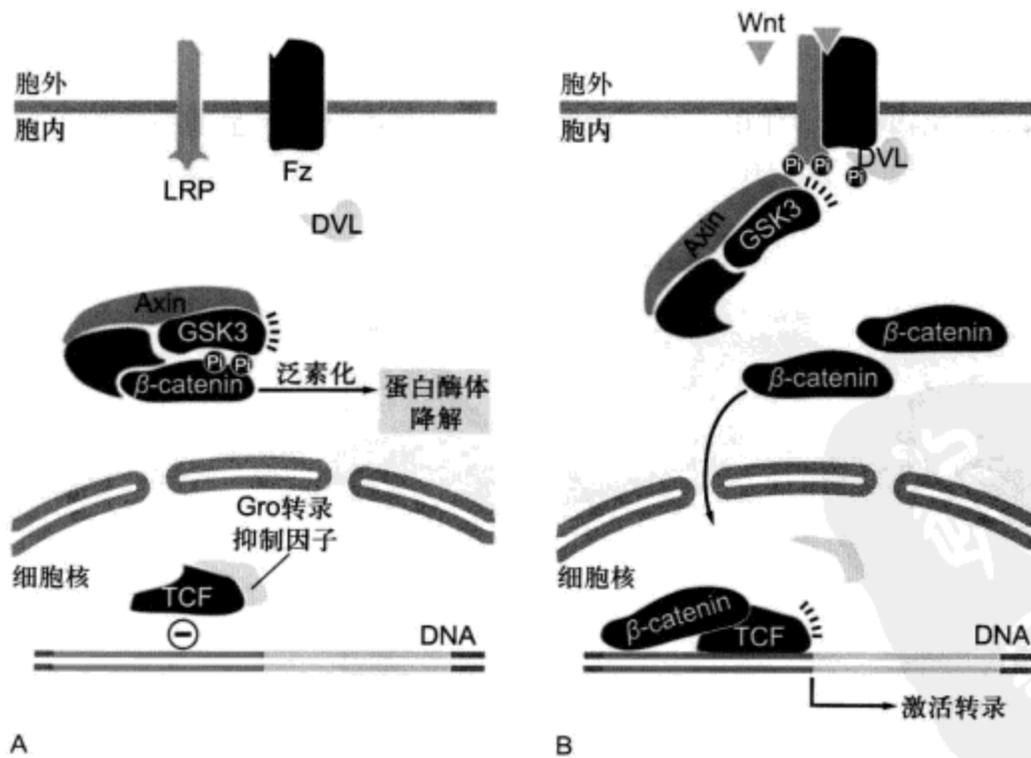


图 9-35 Wnt- $\beta$ -catenin 信号通路

A. 缺乏 Wnt 信号时， $\beta$ -catenin 与 Axin 介导的胞质蛋白复合物结合，利于  $\beta$ -catenin 被 GSK3 磷酸化，磷酸化的  $\beta$ -catenin 泛素化后被蛋白酶体识别和降解，转录因子 TCF 与抑制因子结合在核内作为阻遏物抑制靶基因转录。B. 有 Wnt 信号时，Wnt 信号与受体 Fz 结合，引发 LRP 被 GSK3 和其他激酶磷酸化，从而使 Axin 与 LRP 结合，致使 Axin/APC/GSK3/ $\beta$ -catenin 复合物解离，避免  $\beta$ -catenin 被 GSK3 磷酸化而免于降解并在细胞中富集，转位到核内与 TCF 结合，激活靶基因转录。

Hedgehog 的受体蛋白有 3 种: Patched (Ptc)、Smoothened (Smo) 和 iHog 蛋白, 三者均为跨膜蛋白, 介导细胞对 Hh 信号应答反应。Ptc 跨膜 12 次, Smo 跨膜 7 次, iHog 蛋白单次跨膜但胞外段具有类免疫球蛋白 (Ig) 和类 III 型纤黏连蛋白 (FN) 结构域。Ptc 和 Smo 具有接受和转导 Hh 信号的功能, iHog 可能作为辅助性受体参与 Ptc 与 Hh 信号的结合。在缺乏 Hh 信号情况下, Ptc 主要存在于质膜上, 以尚未明确的机制使 Smo 处于失活状态并隔离在细胞内膜泡上。在 Hh 信号存在和 iHog 辅助下, Hh 信号与 Ptc 结合, 抑制 Ptc 的活性并诱发其内吞被溶酶体消化, 同时 Smo 受体蛋白被磷酸化并转位到细胞表面, 向下游传递信号。和 Wnt 信号一样, Hedgehog 信号通路也涉及在胞质中多种调节蛋白复合物的装配及复合物的解离, 从而释放转录因子。这些调节蛋白包括: 丝氨酸/苏氨酸激酶 Fused (Fu)、驱动蛋白相关的马达蛋白 Costal-2 (Cos-2)、转录因子锌指蛋白 (cubitus interruptus, Ci) 以及相关激酶——蛋白激酶 A (PKA)、糖原合酶激酶 3 (GSK3)、酪蛋白激酶 -1 (casein kinase 1, CK1)。

基于在果蝇中大量的研究, Hedgehog 信号通路的基本模型如图 9-36 所示。在缺乏 Hh 信号情况下 (图 9-36A), 受体 Ptc 蛋白抑制胞内膜泡上的 Smo 蛋白, 而胞质调节蛋白形成复合物并与微管结合, 在复合物中转录因子 Ci 被各种激酶磷酸化, 磷酸化的 Ci 在泛素/蛋白酶体相关的 F-box 蛋白 Slimb 的作用下水解形成 Ci75 片段, 作为应答 Hh 信号基因的阻遏物发挥作用, 进入核内

抑制靶基因表达。在有 Hh 存在情况下 (图 9-36B), Hh 与 Ptc 结合, 抑制 Ptc 活性, 引发 Ptc 内化并被消化, 从而解除对 Smo 的抑制。然后 Smo 通过膜泡融合移位到质膜, 并被 CK1 和 PKA 两种激酶磷酸化, 与 Smo 结合的 Cos2 和 Fu 蛋白超磷酸化, 致使 Fu/Cos2/Ci 复合物从微管上解离下来, 从而形成稳定形式的 Ci。Ci 进入核内并与 CREB 结合蛋白 (CBP) 结合, 作为靶基因的转录激活子而发挥作用。

### 三、NF- $\kappa$ B 信号通路

NF- $\kappa$ B 最初是 R. Sen 和 D. Baltimore 于 1986 年在 B 细胞中发现的一种核转录因子, 能特异性结合免疫球蛋白  $\kappa$  轻链基因的上游增强子序列并激活基因转录, 此后发现它广泛存在于几乎所有真核细胞中。NF- $\kappa$ B 信号通路可调控多种参与炎症反应的细胞因子 (如 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ )、黏附因子和蛋白酶类基因的转录过程, 以应答多种胞外信号刺激, 包括病毒侵染、细菌和真菌感染、肿瘤坏死因子、白细胞介素等细胞因子, 甚至离子辐射, 产生免疫、炎症和应激反应, 并影响细胞增殖、分化及发育。

NF- $\kappa$ B 通常以异二聚体形式存在于细胞质中, 两个亚基 p65 和 p50 在 N 端共享一个同源区, 以确保其二聚化并与 DNA 结合, 核定位信号 (NLS) 也位于此同源区。

在细胞处于静息状态时, NF- $\kappa$ B 在细胞质中与一

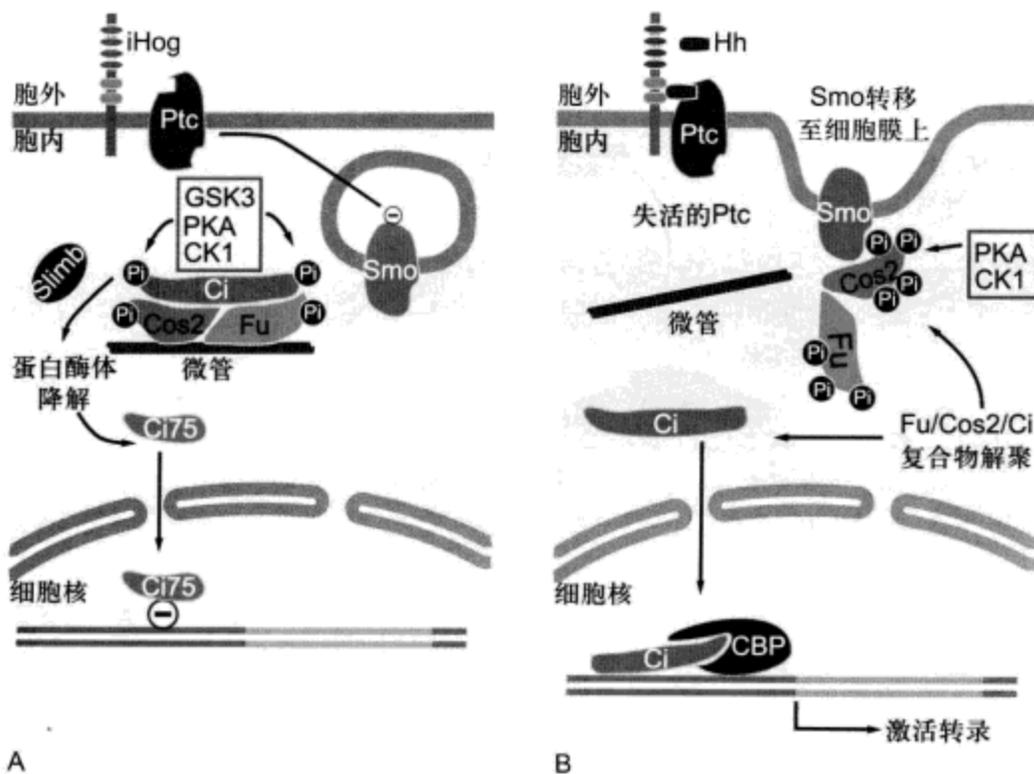


图 9-36 Hedgehog 信号通路示意图

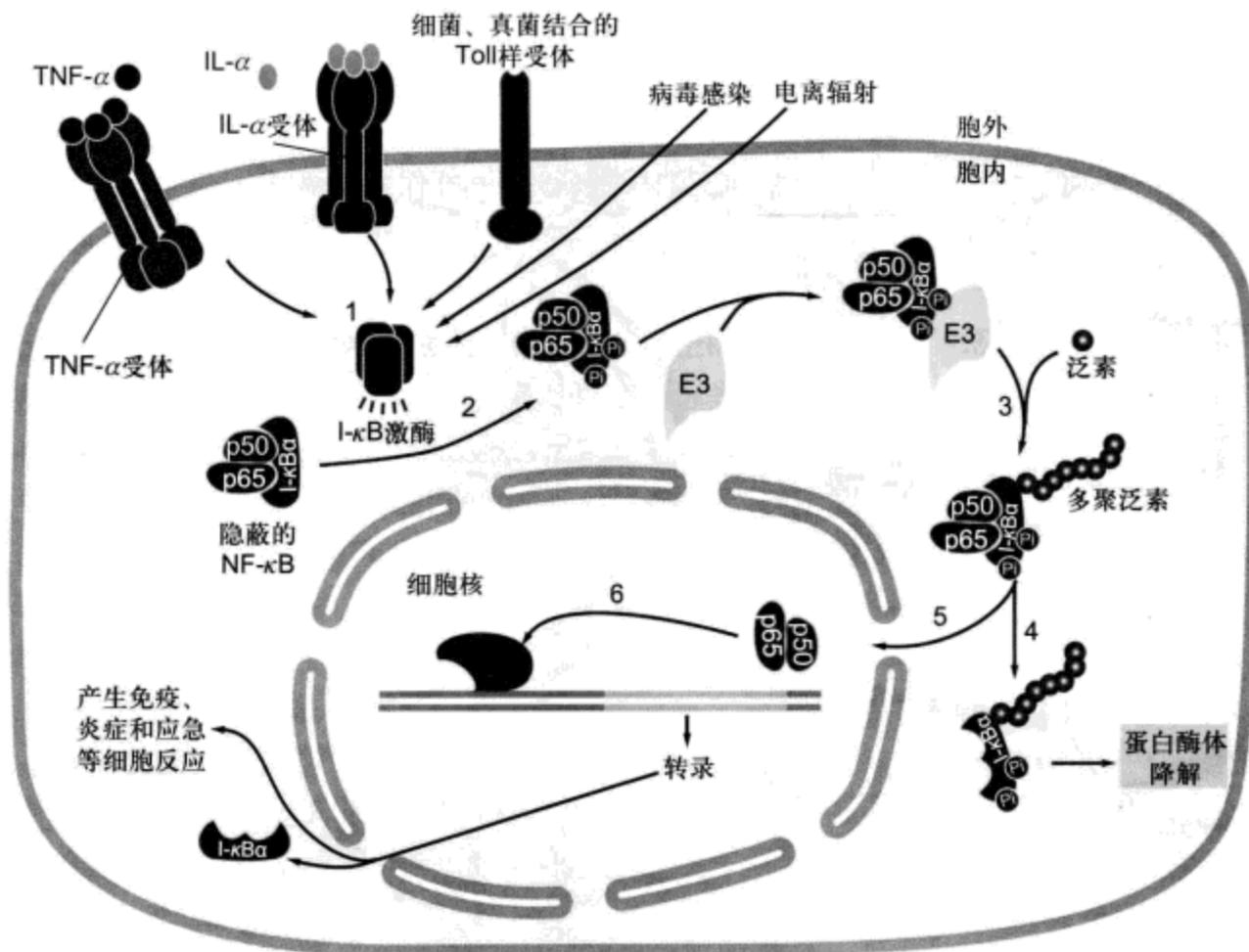


图 9-37 NF- $\kappa$ B 信号通路图解

种抑制物 I- $\kappa$ B $\alpha$  结合，处于非活化状态，同源区的 NLS 也因抑制物的结合被掩盖。当细胞受到外界信号刺激时，胞质中异三聚体 I- $\kappa$ B 激酶 (I- $\kappa$ B kinase) 被激活并磷酸化 I- $\kappa$ B 抑制物 N 端 2 个丝氨酸残基 (图 9-37 步骤 1 和 2)。E3 泛素连接酶快速识别 I- $\kappa$ B 的磷酸化丝氨酸残基并使 I- $\kappa$ B 发生多聚泛素化，进而导致 I- $\kappa$ B 被泛素依赖性蛋白酶体降解 (图 9-37 步骤 3 和 4)。I- $\kappa$ B 的降解使 NF- $\kappa$ B 解除束缚并暴露 NLS，然后 NF- $\kappa$ B 转位进入核内激活靶基因的转录 (图 9-37 步骤 5 和 6)。

在多种免疫系统细胞中，受 NF- $\kappa$ B 激活转录的基因有 150 多种，包括编码细胞因子和趋化因子 (chemokine) 的基因，在炎症反应中 NF- $\kappa$ B 能促进嗜中性粒细胞受体蛋白的表达以利细胞迁移，以及在应对细菌感染时刺激可诱导的一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达。NF- $\kappa$ B 信号通路除了在免疫和炎症反应中的作用之外，在哺乳动物的发育中也起关键作用，NF- $\kappa$ B 对发育中的肝细胞的存活是必需的。实验表明，如果小鼠胚胎不能表达 I- $\kappa$ B 激酶的一种亚基，那么在妊娠中期即发生夭折，原因是发育中的肝细胞过度凋亡。

NF- $\kappa$ B 信号的终止是负向调节的关键，其中活化的 NF- $\kappa$ B 除激活靶基因转录外，还能激活 I- $\kappa$ B 基因的

表达，新合成的 I- $\kappa$ B 与核中 NF- $\kappa$ B 结合，然后 NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B 复合物返回细胞质，抑制 NF- $\kappa$ B 的活性。

#### 四、Notch 信号通路

Notch 信号通路是一种细胞间接触依赖性的通讯方式。信号分子及其受体均是膜整合蛋白。信号转导的启动依赖于信号细胞的信号蛋白与相邻应答细胞的受体蛋白的相互作用，信号激活的受体发生两次切割，释放转录因子，调节应答细胞的分化方向，决定细胞的发育命运。

Notch 受体蛋白是由 *Notch* 基因编码的膜蛋白受体家族，从无脊椎动物到人类都广泛表达，在结构上具有高度保守性。Notch 受体蛋白的胞外区包含多个 EGF 样的重复序列及其与配体的结合位点；胞内区含多种功能序列，是 Notch 受体蛋白完成信号转导的关键区域。Notch 的配体又称 DSL (其名源于果蝇 Notch 配体 Delta, Serrate 和线虫 Lag-2 的首字母缩写)。

Notch 蛋白首先以单体膜蛋白形式在内质网合成，然后转运至高尔基体，在高尔基体反面管网区被蛋白酶切割，产生一个胞外亚单位和一个跨膜-胞质亚单位；在没有与其他细胞的配体相互作用时，两个亚单位彼此

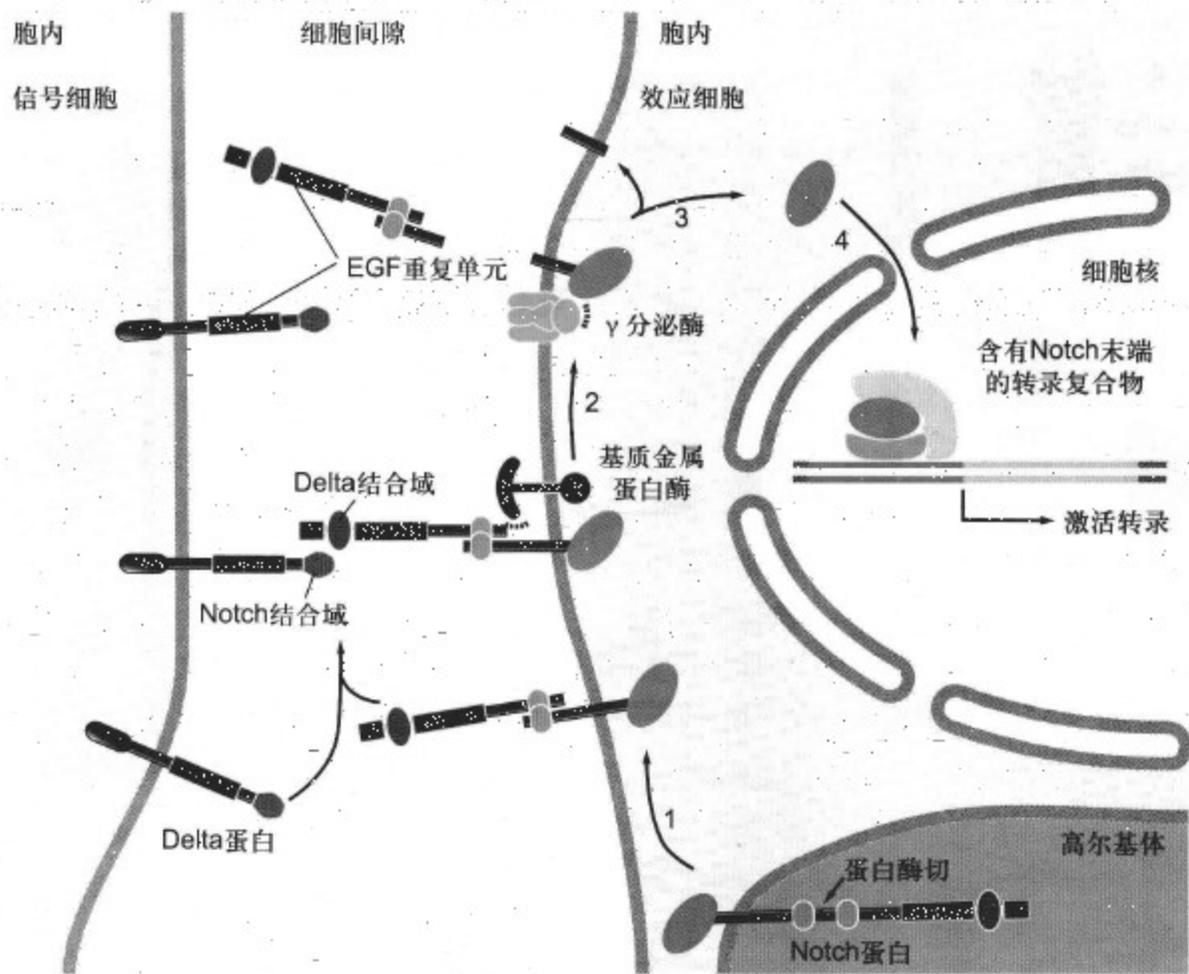


图 9-38 Notch-Delta 信号通路图解 (步骤见正文)

以非共价键结合 (图 9-38 步骤 1)。随着与相邻信号细胞的配体 (Delta) 的结合, 效应细胞的 Notch 蛋白便发生两次蛋白切割过程: Notch 蛋白首先被结合在膜上的基质金属蛋白酶 (matrix metalloprotease) ADAM (源于 A Disintegrin and Metalloprotease 首字母缩写) 切割, 然后释放出 Notch 的胞外片段 (图 9-38 步骤 2); 第二次切割发生在 Notch 蛋白疏水的跨膜区, 由 4 个蛋白亚基组成的跨膜复合物  $\gamma$  分泌酶 ( $\gamma$ -secretase) 负责催化完成, 切割后释放 Notch 蛋白的胞质片段 (图 9-38 步骤 3), 该胞质片段是 Notch 的活性形式, 它立即转位到核内与其他转录因子协同作用, 调节靶基因的表达, 从而影响发育过程中细胞命运的决定 (图 9-38 步骤 4)。

合蛋白不仅介导细胞与胞外基质黏附, 起结构整合作用, 更重要的是提供了一种信号途径, 通过胞外环境调控细胞内活性。整合蛋白的胞外结构域与胞外配体 (如纤黏连蛋白) 相互作用, 可产生多种信号, 如增加胞质钙离子水平, 刺激磷脂酰肌醇第二信使的合成, 胞内蛋白酪氨酸残基磷酸化等, 从而影响诸如细胞生长、运动、分化和存活等基本细胞过程。

细胞与胞外基质之间形成的黏着斑 (focal adhesion) 是复杂的大分子复合物, 黏着斑含有成簇的整联蛋白、细胞质蛋白和成束的肌动蛋白纤维 (应力丝), 黏着斑的装配既受信号控制又具有信号转导功能, 其中酪氨酸激酶 Src 和黏着斑激酶 FAK (focal adhesion kinase) 发挥重要作用。

## 五、细胞表面整联蛋白介导的信号转导

体外培养的正常细胞与癌变细胞有一个显著的区别, 前者不能在悬浮培养条件下生长、分裂, 必须依赖于细胞表面和细胞外基质之间建立接触。整联蛋白 (integrin) 是细胞表面的跨膜蛋白, 由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基组成异二聚体, 其胞外段具有多种细胞外基质组分的结合位点, 包括纤黏连蛋白、胶原和蛋白聚糖。因此, 整

通过黏着斑由整联蛋白介导的信号通路有两条:

(1) 由细胞表面到细胞核的信号通路 细胞表面整联蛋白与胞外配体相互作用, 导致整联蛋白簇集和定位在黏着斑结构中的酪氨酸激酶 Src 的活化。活化的 Src 使黏着斑激酶 FAK 的酪氨酸残基磷酸化, 磷酸酪氨酸残基可结合具有 SH2 结构域的接头蛋白 Grb2 和胞内鸟苷酸交换蛋白 Sos。活化的 Grb2-Sos 复合物引起 Ras 蛋白 GTP-GDP 交换而活化, 活化的 Ras-GTP 通

## 第六节 细胞信号转导的整合与控制

过 MAPK 级联反应途径传递细胞生长促进信号到细胞核，激活涉及细胞生长与增殖相关的基因转录（图 9-39）。这可能是通过细胞表面接触导致细胞增殖的主要途径。如果没有这些接触的存在，Ras-Raf-MAPK 途径似乎将受到抑制，从而使非黏着细胞通过细胞周期的进程受阻。

上皮细胞体外培养实验表明，细胞在基质上的黏着对细胞生存是必需的。在体内，上皮细胞也是彼此紧密接触，任何一个脱离接触的上皮细胞可能是一个潜在的癌细胞。无论在机体内或体外细胞培养条件下，上皮细胞只要能黏着于一种合适的基质，它们就可以避免自我毁灭。所以毫不奇怪，生物体会演化出某种机制以消灭那些本该接触而丧失接触的细胞。

(2) 由细胞表面到胞质核糖体的信号通路 细胞核并非是由整联蛋白介导胞外基质信号的唯一靶细胞器，另一条信号通路是将源于胞外基质的信号传递给细胞质核糖体。当黏着斑激酶 FAK 的酪氨酸残基被 Src 磷酸化后，便为磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 的 SH2 结构域提供结合位点。活化的 PI3K 催化磷脂酰肌醇产生两种衍生物：PI-3,4-二磷酸和 PI-3,4,5-三磷酸，二者作为膜结合信使活化激酶  $p70^{S6k}$ ，活化的  $p70^{S6k}$  进而磷酸化核糖体小亚基的  $S_6$  蛋白。在蛋白质合成过程中，含有磷酸化  $S_6$  蛋白的核糖体被优先利用，翻译某些特定 mRNA，合成细胞从  $G_1$  期运行到 S 期所需要的某些蛋白。

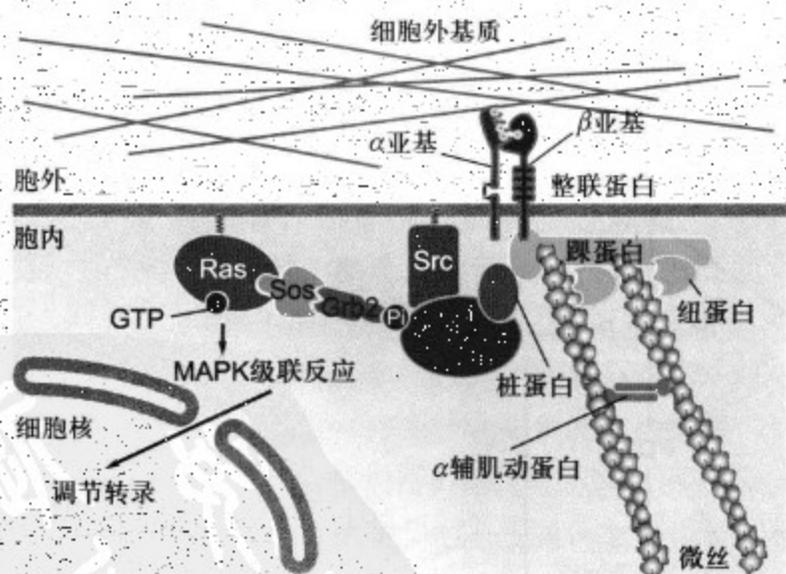


图 9-39 由整联蛋白介导的黏着斑复合体的信号转导示意图  
信号转导功能由酪氨酸激酶（如 Src 和 FAK）完成。在该模型中，Src 磷酸化 FAK，FAK 进而与 Grb2-Sos 结合，从而激活 Ras。由活化的 Ras 发出信号沿 MAPK 途径下传。

细胞的信号转导是多通路、多环节、多层次和高度复杂的可控过程。在许多情况下，细胞的适当反应依赖于接收信号的靶细胞对多种信号的整合以及对信号有效性的控制。

### 一、细胞的应答反应特征

细胞对信号的应答反应具有发散性或收敛性特征，对特定胞外信号产生多样性细胞反应的机制通常有 3 种情况：

(1) 细胞外信号的强度或持续时间的不同控制反应的性质。在体外培养条件下，研究 PC12 细胞是分化成脂肪细胞还是神经元，结果发现神经生长因子 (NGF) 促进神经元的形成，而上皮生长因子 (EGF) 则促进脂肪细胞的形成。通过延长生长因子刺激时间来强化 EGF 信号强度，则又转而引起神经元分化。虽然 NGF 和 EGF 都是 RTK 的配体，但与 EGF 相比，NGF 是 Ras-MAPK 信号转导通路更强的激活子，而 EGF 受体只有延长刺激时间才可能激活这条信号通路。

(2) 在不同细胞中，相同受体因不同的胞内信号蛋白可引发不同的下游通路。在秀丽隐杆线虫研究中已经证明，RTK 受体介导的下游通路具有细胞类型特异性。EGF 信号在不同的细胞类型中至少可诱发 5 种不同的反应，其中 4 种反应是由共同的 Ras-MAPK 信号通路介导的，而第 5 种反应涉及雌雄同体的排卵作用，则是利用一种不同的下游途径，该途径产生第二信使  $IP_3$ ，与内质网膜上  $IP_3$  受体 ( $IP_3R$ ) 结合，动员  $Ca^{2+}$  释放，细胞质中  $Ca^{2+}$  水平升高，引发排卵。

(3) 细胞通过整合不同通路的输入信号调节细胞对信号的反应。不同类型的受体特异性识别并结合各自配体，来自各种非相关受体的信号，通过 2 条或多条信号途径，在向下游传递时经整联蛋白在细胞内会聚，收敛成激活一个共同的效应器（如 Ras 或 Raf 蛋白），从而引起细胞生理、生化反应和细胞行为的改变（图 9-40）。来自细胞表面同一类受体（如 Epo 受体）激活 Jak 激酶也可引发多种信号途径，导致信号传播的发散，调

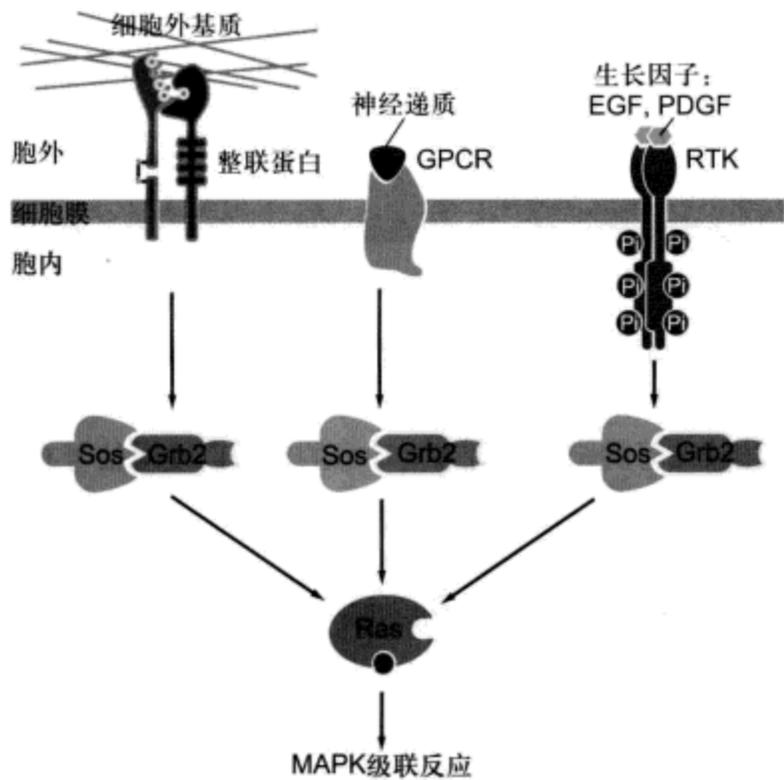


图 9-40 细胞表面受体介导的信号通路在细胞内的收敛性  
来自细胞表面 G 蛋白偶联受体、整联蛋白和受体酪氨酸激酶所转导的信号都收敛到 Ras 蛋白，然后沿 MAPK 级联反应途径向下传递。

节不同的基因表达，产生不同生理效应（见图 9-33）。

## 二、蛋白激酶的网络整合信息

细胞各种不同的信号通路提供了信号途径本身的线性特征，然而细胞需要对多种信号进行整合和精确控制，最后作出适宜的应答。细胞信号转导最重要的

特征之一是构成复杂的信号网络系统 (signal network system)，它具有高度的非线性特点。人们将信号网络系统中各种信号通路之间的交互关系形象地称为“交叉对话” (cross talk)。或许可以把细胞信号转导比喻为电脑的工作，细胞接受的外界信号如同键盘输入的不同的字母或符号，细胞内各种信号通路及其组分如同电脑线路中的各种集成块，信号在这些集成块中流动，经分析、整合，最后将结果显示在荧光屏上。在细胞中，这些经信号网络系统分析、整合后的信号最终表现为特定的生理功能。但是最复杂的电脑恐怕也无法和最简单的细胞相比，电脑作为无生命的机械装置，简单的操作失误或线路故障，都可导致整个系统的瘫痪，而细胞则有一定的自我修复和补偿能力。

自 20 世纪 80 年代中期以来，虽然对细胞信号系统的研究有了长足进展，但对其复杂关系的了解仍然是初步的。细胞信号系统的网络化相互作用是细胞生命活动的重大特征，也是细胞生命活动的基本保障之一。今后以调节基因表达为主线的信号网络研究将会愈来愈受到重视。根据已有事实发现，通过蛋白激酶的网络整合信息调控复杂的细胞行为是不同信号通路之间实现“交叉对话”的一种重要方式。

图 9-41 概括了从细胞表面到细胞内的主要信号通路，从 5 条平行信号途径的比较不难发现：磷脂酶 C 既是 G 蛋白偶联受体信号途径的效应酶，又是 RTK 信号途径的效应酶，在两条信号通路中都起中介作用；尽管 5 条信号通路彼此不同，但在信号转导机制上又具有

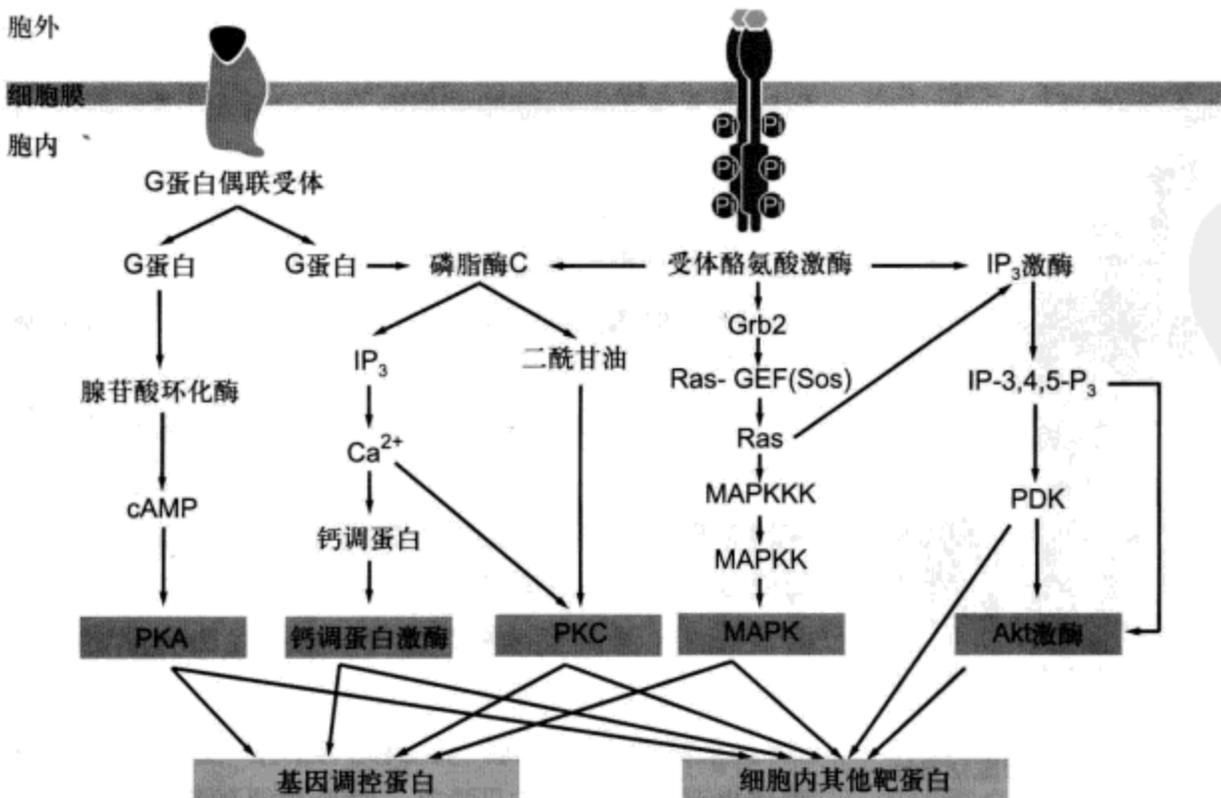


图 9-41 由两类受体介导的细胞内平行的信号通路与它们之间的网络关系

相似性，最终都是激活蛋白激酶，由蛋白激酶形成的整合信息网络原则上可调节细胞任何特定的过程。有人估计，在一个哺乳动物细胞中可能含有 1 000 种以上不同的蛋白激酶，约有 2% 的基因为其编码，因此不难理解蛋白激酶的网络整合信息是不同信号通路之间实现“交叉对话”的一种重要方式。

事实上，细胞信号网络的复杂性远比我们所了解的情况多得多。首先，还有许多信号途径被忽略；其次，对主要途径的相互作用，我们只涉及了蛋白激酶，其他的“交叉对话”却没有提及。相信，对细胞信号转导过程中“交叉对话”的研究和对信号传递过程非线性内涵的认识，将对深入了解多基因表达调控机制、发育机理、病理过程及疾病控制等方面产生重要的影响。

### 三、信号的控制：受体的脱敏与下调

典型哺乳动物细胞针对某种特殊配体的细胞表面受体，只占质膜总蛋白的 0.1%~5.0%，但是靶细胞对信号分子的最大细胞反应通常并不需要所有受体都被激活。受体与配体的亲和性 (affinity) 常用受体-配体复合物的解离常数 ( $K_d$ ) 来估量， $K_d$  值代表细胞表面受体达到 50% 被占据时所需的配体分子浓度。 $K_d$  值越大，表明亲和性越小，相反， $K_d$  值越小，则表明亲和性越大。

细胞对外界信号作出适度的反应既涉及信号的有效刺激和启动，也依赖于信号的解除与细胞的反应终止。特别值得注意的是，信号的解除与终止和信号的刺激与启动对于确保靶细胞对信号的适度反应来说同等重要。解除与终止信号的重要方式，是在信号浓度过高或细胞长时间暴露于某一种信号刺激的情况下，细胞会以不同的机制使受体脱敏，这种现象又称之为适应 (adaptation)，这是一种负反馈调控机制。以视杆细胞对周围光强度变化的适应为例，由光激活的视蛋白 (opsin,  $O^*$ ) 是视紫红质激酶 (rhodopsin kinase) 的底物，活化的视蛋白其胞质面 3 个丝氨酸残基恰是视紫红质激酶的磷酸化位点。视蛋白的磷酸化一方面显著降低  $O^*$  分子激活  $G_t$  亚基的能力，另一方面视蛋白胞质面磷酸-丝氨酸位点为胞质抑制蛋白  $\beta$ -arrestin 的结合提供了锚定位点， $\beta$ -arrestin 的结合完全阻断  $G_t$  亚基与磷酸化  $O^*$  的相互作用，由于阻断  $G_t$ -GTP 复合物的形成，从而关闭所有视杆细胞的活性。这种引发靶细胞对信号刺激的脱敏机制也是其他 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 在高配体水平条件下引发脱敏反应的普遍机制，导致受体

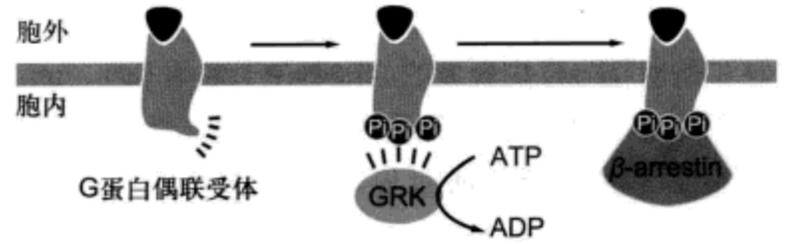


图 9-42 G 蛋白偶联受体在 G 蛋白偶联受体激酶 (GRK) 作用下发生磷酸化而脱敏示意图

磷酸化的激酶包括 PKA、PKC 和 G 蛋白偶联受体激酶 (GRK) 家族 (包括视紫红质激酶)。GRK 只是结合已被激活的受体，使其 C 端胞质域特定氨基酸 (丝氨酸/苏氨酸) 残基磷酸化，从而结合  $\beta$ -arrestin，这是 G 蛋白偶联受体脱敏的重要方式之一 (图 9-42)。随后的研究发现， $\beta$ -arrestin 不仅与磷酸化的受体结合，而且作为接头蛋白与 2 种包被蛋白组分网格蛋白和 AP2 蛋白结合，介导细胞内吞作用；另外还通过结合并激活几种胞质蛋白激酶参与信号转导功能。

细胞何以适应刺激强度或刺激时间的变化，正是因为细胞可以校正对信号的敏感性。概括起来，靶细胞对信号分子的脱敏机制有如下 5 种方式：

(1) 受体没收 (receptor sequestration) 细胞通过配体依赖性的受体介导的内吞作用 (receptor-mediated endocytosis) 减少细胞表面可利用受体的数目，以网格蛋白/AP 包被膜泡形式摄入细胞，内吞泡脱包被形成无包被的早期胞内体，受体被暂时扣留，受 pH 降低的影响 (pH 5.0)，受体-配体复合物在晚期胞内体解离，扣留的受体可返回质膜再利用 (如 LDL 受体)，配体进入溶酶体被消化。这是细胞对多种肽类或其他激素受体发生脱敏反应的一种基本途径。有时即使缺乏配体结合的情况下，细胞通过批量膜流 (bulk membrane flow) 也会使细胞表面受体以相对较低的速率被内化 (internalization)，然后再循环利用，从而减少细胞表面可利用受体的数目。

(2) 受体下调 (receptor down-regulation) 通过受体介导的内吞作用，受体-配体复合物转移至胞内溶酶体消化降解而不能重新利用，因此细胞通过表面自由受体数目减少和配体的清除导致细胞对信号敏感性下调。

(3) 受体失活 (receptor inactivation) 如前所述，G 蛋白偶联受体激酶 (GRK) 使结合配体的受体磷酸化，再通过与胞质抑制蛋白  $\beta$ -arrestin 结合而阻断与 G 蛋白的偶联作用，这是一种快速使受体脱敏的机制。

(4) 信号蛋白失活 (inactivation of signaling protein) 致使细胞对信号反应脱敏的原因不在于受体本身, 而在于细胞内信号蛋白发生改变, 从而使信号级联反应受阻, 不能诱导正常的细胞反应。

(5) 抑制性蛋白产生 (production of inhibitory protein) 受体结合配体而被激活后, 在下游反应中 (如对基因表达的调控) 产生抑制性蛋白并形成负反馈环从而降低或阻断信号转导途径。

### ● 思考题 ●

1. 何谓信号转导中的分子开关机制? 举例说明。
2. 如何理解细胞信号系统及其功能。
3. 试比较G蛋白偶联受体介导的信号通路 (效应蛋白、第二信使、生物学功能)。
4. 概述受体酪氨酸激酶介导的信号通路的组成、特点及其主要功能。
5. 概述细胞表面受体的分类 (配体、受体、信号转导机制)。
6. 图解细胞表面受体调节基因表达的信号通路。
7. 概述细胞信号的整合方式与控制机制。

### ● 参考文献 ●

1. Alexandre Souillard, *et al.* TOR signaling in invertebrates. *Current Opinion in Cell Biology*, 2009, 21:825-836.
2. Berridge, M J. Calcium microdomains: Organization and function. *Cell Calcium*, 2006, 40: 405-412.
3. Cantley L. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002, 296:1 655-1 657.
4. Cheng H, Lederer W J, Cannell M B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 1993, 262:740-744.
5. Gordon M D, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*, 2006, 281:22 429-22 433.
6. Hamm H E. How activated receptors couple to G-proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 4 819-4 821.
7. Heldin C-H, *et al.* Mechanism of TGF- $\beta$  signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Current Opinion in Cell Biology*, 2009, 21:166-176.
8. Heping Cheng, Lederer W J. Calcium sparks. *Physiol Rev*, 2008, 88:1 491-1 545.
9. Hubbard S R, *et al.* Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007, 19:117-123.
10. Leonard, W. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol*, 2001, 73: 271-277.
11. Pierce K L, Premont R T, Lefkowitz R J. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 639-652.
12. Susumu Itoh, *et al.* Negative regulation of TGF- $\beta$  receptor/Smad signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007, 19:176-184.
13. Taylor S S, *et al.* Dynamics of signaling by PKA. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1 754:25-37.
14. Yamamoto Y, Gaynor R B. I $\kappa$ B kinase: key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29:72-79.



# 细胞骨架

一个生活着的细胞，无论是其外部形态还是内部结构，都处于不断的变化之中。用光学显微镜可以见到细胞质内存在一些纤维样的结构，其长度和分布状态由于纤维的组装和解聚而发生改变，某些膜性细胞器或颗粒状物质沿着这些纤维作定向移动。用电子显微镜观察经非离子去垢剂处理后的细胞，可以在细胞质内观察到一个复杂的纤维状网架结构，这种结构通常被称为细胞骨架 (cytoskeleton)。细胞骨架主要包括微丝 (microfilament, MF)、微管 (microtubule, MT) 和中间丝 (intermediate filament, IF) 3 种结构组分。它们分别由相应的蛋白质亚基组装而成，并赋予细胞不同的形态和功能 (图 10-1)。细胞骨架是一种高度动态的结构体系，在细胞周期的不同时相，细胞骨架具有完全不同的分布状态；各种不同分化状态的细胞，细胞骨架的分布模式有很大的差异，甚至构成骨架纤维的蛋白质也不尽相同。细胞骨架与数目众多的结合蛋白的相互作用是细胞结构与功能相统一的分子基础。细胞骨架结合蛋白不仅对骨架网络本身进行调节，还在骨架与其他细胞结构之间建立了广泛的联系，对细胞的结构和功能发挥组织作用，并进一步影响着细胞的形态、运动以及周围的细胞和环境。

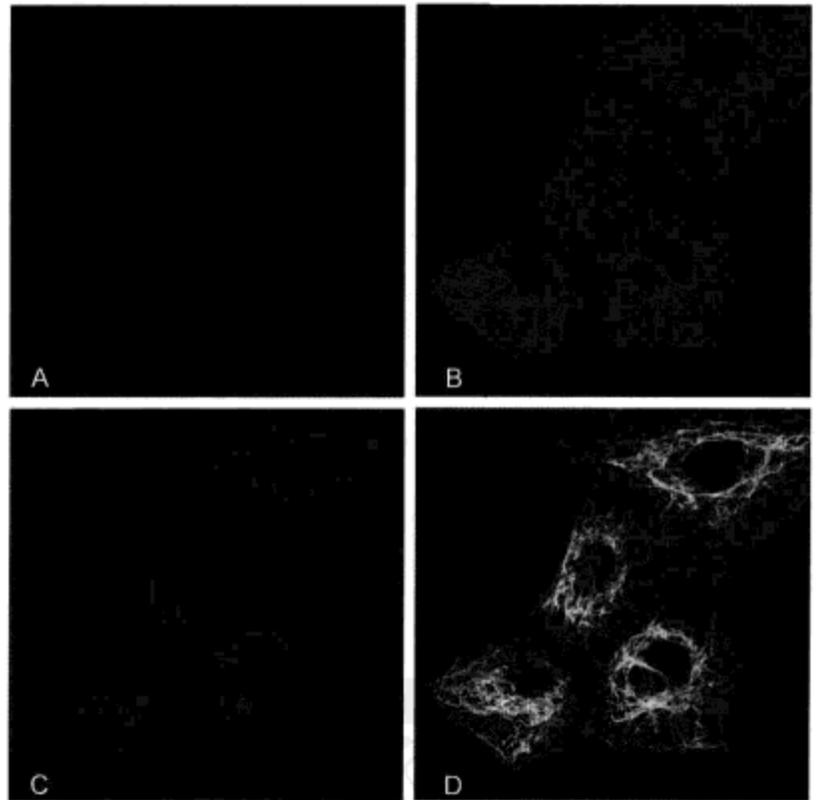


图 10-1 细胞骨架的基本类型及其分布

免疫荧光染色显示细胞内微丝 (A)、微管 (B) 和中间丝 (C) 在体外培养的小鼠上皮细胞内的分布，以及三种细胞骨架结构的叠加图 (D)。微丝网络更接近细胞的边缘。( Ueli Aebi 博士惠赠 )

## 第一节 微丝与细胞运动

微丝又称肌动蛋白丝 (actin filament), 或纤维状肌动蛋白 (fibrous actin, F-actin), 这种直径为 7 nm 的纤维存在于所有真核细胞中。微丝网络的空间结构与功能取决于与之相结合的微丝结合蛋白 (microfilament binding protein)。在不同类型的细胞内, 甚至是在同一细胞的不同部位, 不同的微丝结合蛋白赋予了微丝网络不同的结构特征和功能。如小肠上皮细胞微绒毛内部的微丝束及细胞皮层的微丝网络, 细胞质中与黏着斑相连的张力纤维, 迁移中的成纤维细胞前缘的片状伪足和丝状伪足中临时性的微丝束, 胞质分裂环, 还有如存在于肌细胞中的细丝等。微丝的组装/去组装与多种细胞生命活动过程相关, 如细胞突起 (微绒毛、伪足) 的形成与细胞微环境的调节、细胞质分裂、吞噬作用、细胞迁

移等。作为肌球蛋白运动的轨道, 微丝还在细胞收缩 (如肌细胞) 和物质运输等过程中发挥重要作用。

### 一、微丝的组成及其组装

#### (一) 结构与成分

微丝的主要结构成分是肌动蛋白 (actin)。在大多数真核细胞中, 肌动蛋白是含量最丰富的蛋白质之一。在肌细胞中, 肌动蛋白占细胞总蛋白质量的 10% 左右。即使非肌细胞, 也占细胞总蛋白质量的 1%~5%。肌动蛋白在细胞内有两种存在形式, 即肌动蛋白单体 (又称球状肌动蛋白, G-actin) 和由单体组装而成的纤维状肌动蛋白。肌动蛋白单体由单个肽链折叠而成, 相对分子质量为  $4.3 \times 10^4$ 。电镜下观察到的肌动蛋白图像呈球状, 但经 X 射线衍射得到的结果显示有一个裂缝将肌动蛋白分成两瓣, 其底部有两条肽链相连。在裂缝内部有一个核苷酸 (ATP 或 ADP) 和一个二价阳离子 ( $Mg^{2+}$  或  $Ca^{2+}$ ) 的结合位点 (图 10-2A)。与肌动蛋白结合的核苷酸可以自由地与周围介质中游离的核苷酸交换, 但

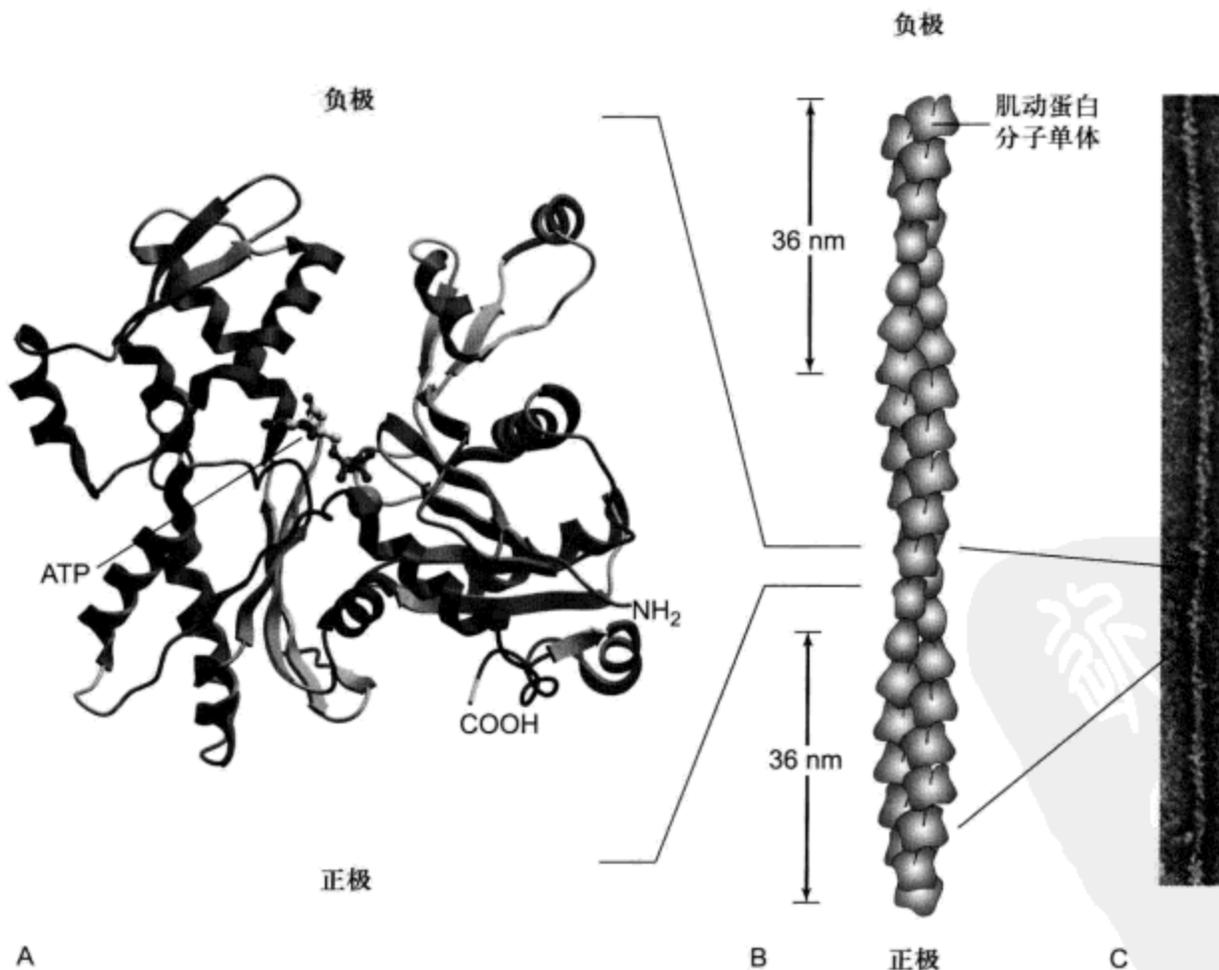


图 10-2 肌动蛋白和微丝的结构

A. 肌动蛋白单体的三维结构 ( $5.5 \text{ nm} \times 5.5 \text{ nm} \times 3.5 \text{ nm}$ ), 1 分子 ATP 和 1 分子  $Mg^{2+}$  结合于肌动蛋白分子中间的裂缝中。B. 微丝的结构模型, 微丝中一个肌动蛋白亚基与 4 个相邻的亚基相互作用 (上下各 1 个, 侧面 2 个)。C. 微丝负染后的电镜图像。(C 图由 Ueli Aebi 博士惠赠)

由于 ATP 与肌动蛋白的结合力更强, 所以游离的肌动蛋白通常是带有 ATP 的。另外, 由于细胞质中游离的  $Mg^{2+}$  远高于  $Ca^{2+}$ , 所以肌动蛋白的二价阳离子结合位点也被  $Mg^{2+}$  占据。

肌动蛋白在生物进化过程中是高度保守的。在哺乳动物和鸟类细胞中至少已分离到 6 种肌动蛋白, 4 种为  $\alpha$ -肌动蛋白, 分别为横纹肌、心肌、血管平滑肌和肠道平滑肌所特有, 它们均组成细胞的收缩性结构; 另 2 种为  $\beta$ -肌动蛋白和  $\gamma$ -肌动蛋白, 存在于所有肌细胞和非肌细胞中。其中  $\beta$ -肌动蛋白通常位于细胞的边缘, 而  $\gamma$ -肌动蛋白与张力纤维有关。对于一个正在迁移的细胞,  $\beta$ -肌动蛋白在细胞的前缘组装成微丝。在不同类型的肌细胞中,  $\alpha$ -肌动蛋白分子的一级结构 (约 400 个氨基酸残基) 仅有 4~6 个氨基酸残基不同,  $\beta$ -肌动蛋白或  $\gamma$ -肌动蛋白与  $\alpha$ -肌动蛋白 (来自横纹肌) 相差约 25 个氨基酸残基。显然这些肌动蛋白基因是从同一个祖先基因演化而来。多数简单的真核生物, 如酵母和黏菌, 仅含单个肌动蛋白基因。然而大多数多细胞真核生物含有多个肌动蛋白基因, 如海胆有 11 个, 网柄菌属 (*Dictyostelium*) 有 17 个, 在某些种类的植物基因组中编码肌动蛋白基因的数目多达 60 个。

尽管来源于不同生物的肌动蛋白具有很高的同源性, 但微小的差异可能会导致功能上的变化。如在果蝇细胞中表达酵母的肌动蛋白基因, 将导致果蝇的飞翔障碍。另外, 在一些原核生物如杆状和螺旋状的细菌中也存在一些肌动蛋白类似物, 如 MreB 和 Mbl。这些蛋白也能组装成丝状结构, 并调控细胞的形态和染色体的分离。

电镜下所观察到的微丝是一条直径约为 7 nm 的扭链 (图 10-2C), 由肌动蛋白单体组装而成。整根微丝在外观上类似于由二股纤维呈右手螺旋盘绕而成, 螺距为 36 nm (图 10-2B)。在纤维内部, 每个肌动蛋白单体周围都有 4 个单体, 上、下各一个, 另外两个位于一侧。肌动蛋白分子上的裂缝使得该蛋白本身在结构上具有不对称性, 在整根微丝上每一个单体上的裂缝都朝向微丝的同一段, 从而使微丝在结构上具有极性。具有裂缝的一端为负极, 而相反一端为正极。在细胞内, 多种微丝结合蛋白与微丝的表面相互作用, 调节微丝的结构和功能。

## (二) 微丝的组装及其动力学特性

有关肌动蛋白组装的信息大多来源于体外实验结果。在试管中, 微丝的组装/去组装与溶液中所含肌动

蛋白的状态 (结合 ATP 或 ADP)、离子的种类及浓度等参数相关联。通常, 只有结合 ATP 的肌动蛋白才能参与微丝的组装。当溶液中含有适当浓度的  $Ca^{2+}$ , 而  $Na^+$ 、 $K^+$  的浓度很低时, 微丝趋向于解聚; 而当溶液中含有 ATP、 $Mg^{2+}$  以及较高浓度的  $Na^+$ 、 $K^+$  时, 溶液中的 G-actin 则趋向于组装成 F-actin, 即新的 G-actin 加到微丝末端, 使微丝延伸。由于纤维两端在结构上存在差异, 通常是微丝正极 (+) 的组装速度较负极 (-) 快。

肌动蛋白单体组装成微丝的过程大体上可以分为几个阶段: 首先是成核反应, 即形成至少有 2~3 个肌动蛋白单体组成的寡聚体, 然后开始多聚体的组装。当聚合作用在只含有肌动蛋白单体, 而没有纤维状肌动蛋白的试管中进行时, 组装的起始过程相当缓慢。G-actin 必须先形成一个具有数个亚基的低聚物, 即所谓的成核过程。该过程是 G-actin 组装的限速步骤, 无论是微丝还是微管, 如果组装体系是从单体开始, 则都会有一个起始的延迟期。跟随着延迟期就是一个纤维快速延长的过程。随着系统中肌动蛋白单体浓度的减少, 组装过程到达一个稳定状态, 即纤维正极组装的速度与负极解聚的速度相同, 纤维的长度保持不变。此时, 体系中肌动蛋白单体的浓度称为临界浓度 ( $C_c$ ), 在数值上等于解聚速度常数和组装速度常数的比值, 即  $C_c = K_{off}/K_{on}$ 。微丝末端的延长或解聚取决于增加亚单位时体系中自由能 ( $\Delta G$ ) 的变化, 当体系中游离的肌动蛋白的浓度高于  $C_c$  时,  $\Delta G$  小于零, 微丝的末端会自发组装。相反, 当游离的肌动蛋白浓度低于  $C_c$  时,  $\Delta G$  大于零, 微丝将自发解聚。

在细胞内, 微丝的成核过程需要肌动蛋白相关蛋白 Arp2/3 (actin related protein, Arp) 复合物的参与, 在该复合物内 Arp2、Arp3 与其他 5 种蛋白质相互作用, 形成微丝组装的起始复合物。肌动蛋白单体与起始复合物结合, 形成一段可供肌动蛋白继续组装的寡聚体。微丝组装的第二个阶段是纤维的延长。肌动蛋白具有 ATP 酶活性, 能催化 ATP 的水解。肌动蛋白单体在参与微丝的组装前必须先与 ATP 结合, 组装到微丝末端的肌动蛋白发挥 ATP 酶的活性, 将 ATP 水解成 ADP, 并释放磷酸基。当微丝的组装速度快于肌动蛋白水解 ATP 的速度时, 处于微丝末端的一些肌动蛋白亚基所携带的 ATP 还没有来得及水解, 即有一个由肌动蛋白-ATP 亚基所构成的帽, 带有这种结构的微丝比较稳定, 可以持续组装。相反, 当末端的肌动蛋白亚基所结合的是 ADP 时, 则构成这段微丝的肌动蛋白亚基比较容易解聚。由于微丝两端在结构上存在差异, 新的肌动蛋白亚

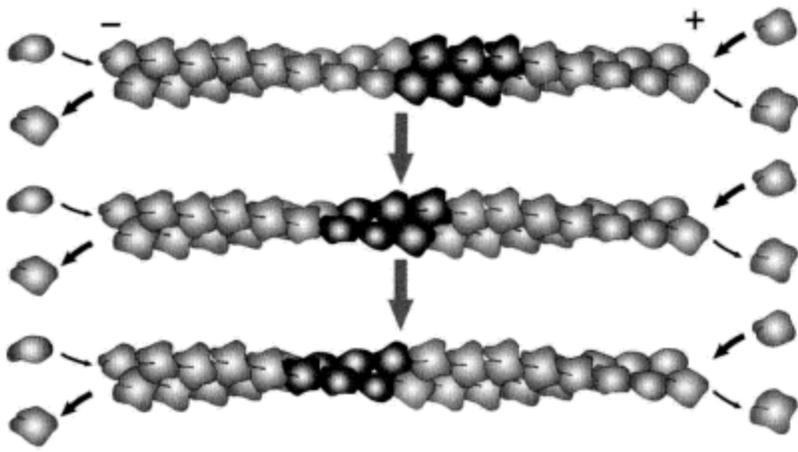


图 10-3 肌动蛋白组装过程中发生的踏车行为

当体系中肌动蛋白的浓度处于临界浓度时，由于微丝两端结构上的差异，在微丝的正极端肌动蛋白亚基组装到纤维上，而在负极端则是去组装占优势。在统计学意义上，正极端延长，负极端缩短。

基通常在正极端加入，而很少在负极端加入。待微丝组装到一定长度时，肌动蛋白亚基的组装/去组装达到平衡状态，即组装和去组装的肌动蛋白亚基数目相当，微丝的长度几乎保持不变，即进入所谓的“稳定期”。在体外组装过程中有时可以见到微丝的正极由于肌动蛋白亚基的不断添加而延长，而负极则由于肌动蛋白亚基去组装而缩短，这一现象称为踏车行为 (treadmilling) (图 10-3)，在试管中可以观察到单根微丝的踏车行为。

### (三) 影响微丝组装的特异性药物

一些药物可以影响肌动蛋白的组装或去组装，从而影响细胞内微丝网络的结构。细胞松弛素 (cytochalasin) 是一组真菌的代谢产物，与微丝结合后可以将微丝切断，并结合在微丝末端阻抑肌动蛋白在该部位的聚合，但对微丝的解聚没有明显影响，因而用细胞松弛素处理细胞可以破坏微丝的网络结构，并阻止细胞的运动。鬼笔环肽 (phalloidin) 是一种由毒蕈 (*Amanita phalloides*) 产生的双环杆肽，与微丝表面有强亲和力，但不与肌动蛋白单体结合，能阻止微丝的解聚，使其保持稳定状态。用荧光标记的鬼笔环肽染色可清晰地显示细胞中微丝的分布。将鬼笔环肽注射到细胞内同样能阻止细胞运动，可见微丝的功能依赖于肌动蛋白的组装和去组装的动态平衡。

## 二、微丝网络结构的调节与细胞运动

### (一) 非肌肉细胞内微丝的结合蛋白

尽管纯化的肌动蛋白单体可以在合适的体外环境下组装成纤维状肌动蛋白，但其复杂性和有序性都远不能

与细胞内的微丝网络相比。细胞内的微丝具有复杂的三维网络结构，有些微丝结构相当稳定，如肌细胞中的细丝及小肠上皮细胞微绒毛中的轴心微丝束等，而另一些微丝结构是暂时性的，如胞质分裂环是由微丝和肌球蛋白形成的收缩环。在血小板激活及无脊椎动物精子顶体反应过程中出现的微丝束也是暂时性结构，只有在功能上需要时才进行组装。实际上，在大多数非肌细胞中，微丝是一种动态结构，它们持续地进行组装和去组装。微丝的这种动态不稳定性与细胞形态的持续变化及细胞运动有密切的关系。体内肌动蛋白的组装在两个水平上受到微丝结合蛋白的调节：① 可溶性肌动蛋白的存在状态；② 微丝结合蛋白的种类及其存在状态。在不同的细胞，甚至是同一细胞的不同部位，由于微丝结合蛋白的种类及存在状态上的差异，微丝网络的结构有可能完全不同。

细胞内微丝网络的组织形式和功能通常取决于与之结合的微丝结合蛋白，而不是微丝本身。细胞微环境内的各种微丝结合蛋白通过影响微丝的组装与去组装，介导微丝与其他细胞结构之间的相互作用来决定微丝的组织行为。此外，微丝还可以通过和肌球蛋白之间的相互作用来实现物质运输功能，从而对细胞内生物大分子及细胞器的分布起组织作用，进而调节细胞的行为。人们已经从各种组织细胞中分离到了 100 多种不同的微丝结合蛋白，根据微丝结合蛋白作用方式的不同，可以将其分成如下几种类型。

#### 1. 肌动蛋白单体结合蛋白

在细胞内，可溶性的肌动蛋白单体和纤维状肌动蛋白的比例大体是 1:1。也就是说，细胞内游离态肌动蛋白的浓度远远高于肌动蛋白在体外组装所需的临界浓度，但由于细胞内游离态肌动蛋白常与另外一些相对分子质量较小的肌动蛋白单体结合蛋白 (如胸腺素  $\beta_4$  和前纤维蛋白或称抑制蛋白等) 结合在一起，从而使肌动蛋白单体组装成纤维状肌动蛋白的过程受到必要的调控，储存在细胞内的肌动蛋白单体只有在存在需求信号时才能加以利用。

胸腺素  $\beta_4$  是一由 43 个氨基酸残基组成的小肽，能与肌动蛋白单体结合，并封闭肌动蛋白聚合的位点，从而阻止肌动蛋白单体的聚合或组装到已有的微丝末端。在细胞内，胸腺素  $\beta_4$  的浓度通常与游离态肌动蛋白库的容量相关，它与肌动蛋白按 1:1 的比例结合，使细胞内肌动蛋白单体的浓度远远高于体外自发组装的临界浓度。由于胸腺素  $\beta_4$  与带 ATP 的肌动蛋白亲和力高于带

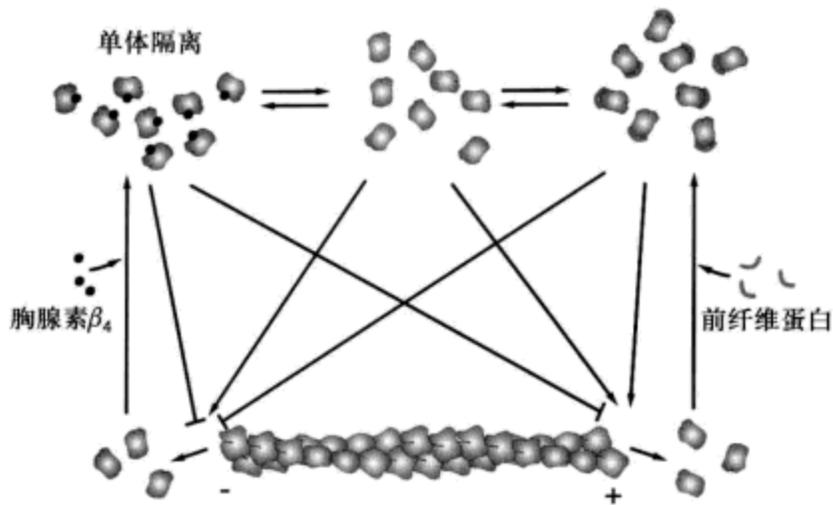


图 10-4 肌动蛋白结合蛋白与微丝的组装

在合适的条件下，结合 ATP 的肌动蛋白既可以参与微丝正极端的组装，也可以在负极端进行组装。胸腺素  $\beta_4$  与肌动蛋白单体结合以后抑制肌动蛋白参与微丝的组装。前纤维蛋白与肌动蛋白单体的底部结合，促进了微丝正极端的组装，但阻断了负极端的组装。

ADP 的肌动蛋白，所以细胞内游离的肌动蛋白主要是结合 ATP 的肌动蛋白 (图 10-4)。

前纤维蛋白 (profilin) 又名抑制蛋白，是一种小分子肌动蛋白单体结合蛋白，相对分子质量约为  $1.5 \times 10^4$ 。由于该蛋白与肌动蛋白单体的底部 (正极端) 结合，从而影响了前纤维蛋白-肌动蛋白复合体在微丝负极端的聚合，但并不影响该复合体在微丝正极端的组装。当前纤维蛋白-肌动蛋白复合体与微丝的正极端结合后，前纤维蛋白便解离下来，与另一个肌动蛋白单体结合 (图 10-4)。

## 2. 成核蛋白

成核是肌动蛋白在体外组装的限速步骤。在细胞内肌动蛋白的组装受外部信号的调控，其成核过程受成核蛋白 Arp2/3 复合物、形成蛋白 (formin) 等的催化，以实现细胞形态和运动状态的快速变化。

Arp2/3 复合物由 Arp2、Arp3 和其他 5 种蛋白质组成，其中 Arp2、Arp3 与肌动蛋白的相似性达 45%，但其本身不能组装成纤维。在该复合物中，Arp2 和 Arp3 形成类似于微丝正极端肌动蛋白两个亚基的结构，从而可以启动肌动蛋白的成核过程。在外来信号的作用下，活化的 Arp2/3 复合物与细胞膜或其他适当的细胞结构结合，提供一个肌动蛋白的结合位点，大大加速了成核过程。新的肌动蛋白亚基在正极端加入，而 Arp2/3 复合物则位于纤维的负极端 (图 10-5A)。Arp2/3 复合物也可以结合在已有的微丝上，启动微丝的组装，新形成的微丝与原有的纤维呈  $70^\circ$  夹角。多

个侧支的组装可使微丝连接成一个树状网络。由于 Arp2/3 复合物与携带 ATP 的肌动蛋白亚基的结合力远大于带有 ADP 的肌动蛋白亚基，因此微丝的分支往往在新组装的一端产生。随着结合在肌动蛋白亚基内部的 ATP 的水解和 Pi 的释放，Arp2/3 复合物有可能从微丝上解离，并造成分支的脱落。

formin 蛋白家族的成员在结构上很保守，包含一个与活化的 Rho-GTP 结合的受体结合域 (receptor binding domain, RBD)、两个特殊的同源结构域 FH1 和 FH2。FH1 与前纤维蛋白结合，FH2 启动肌动蛋白的成核和组装过程。在微丝的延长过程中 formin 始终与其正极端结合，通过 RBD 与前纤维蛋白结合而提高微丝的组装速度，另一方面保护正极端免受加帽蛋白的干扰。

## 3. 加帽蛋白

细胞内微丝的组装一旦停止，其末端的肌动蛋白亚基所带的 ATP 很可能因为水解而使得整个纤维处于不稳定状态；而微丝的过度组装不仅浪费了原材料，也会影响细胞的结构和功能。与微丝的末端结合阻止微丝解聚或过度组装的蛋白称为加帽蛋白 (capping protein)。在微丝的负极端，由于 Arp2/3 复合物或原肌球蛋白 (tropomodulin) 等的存在使该末端结构处于稳定状态。在微丝的正极端，多数是通过 CapZ 或凝溶胶蛋白

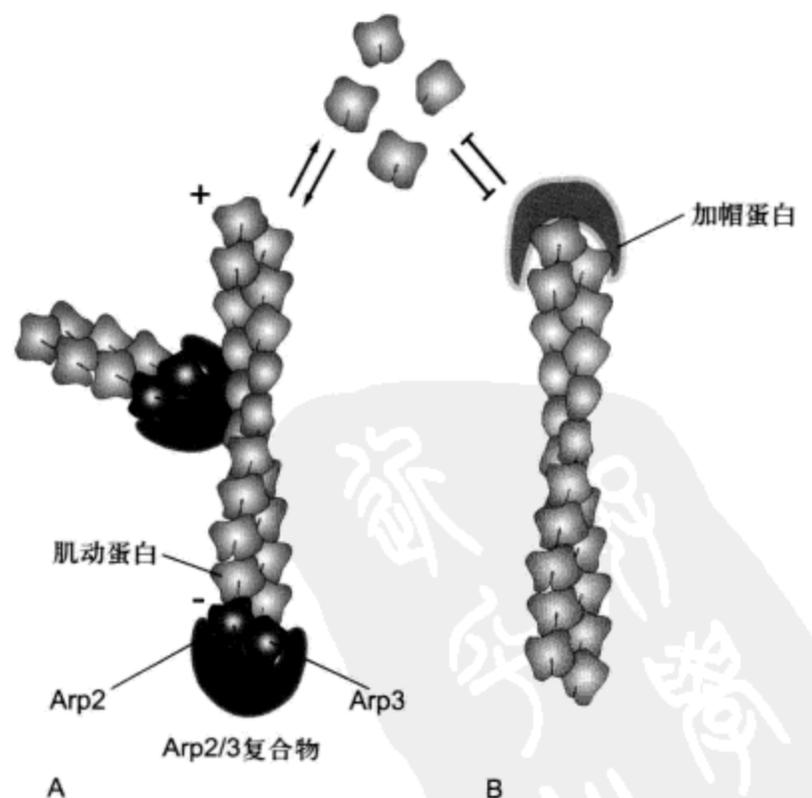


图 10-5 微丝的成核与加帽

A. Arp2/3 复合物参与肌动蛋白的成核，并可以结合在微丝的中部启动分支的组装。B. 微丝加帽蛋白可以结合在微丝的正极端或负极端，使末端处于稳定状态。

(gelsolin) 超家族的成员而被加帽 (图 10-5B)。显然, 与微丝末端相互作用的蛋白质能够调节微丝的动力学性质。在细胞运动过程中, 对加帽和脱帽的调控显得非常重要。凝溶胶蛋白和加帽蛋白的脱帽作用都受细胞膜上 4,5-二磷酸肌醇磷脂 (PIP<sub>2</sub>) 的调节, 而 PIP<sub>2</sub> 的水平受细胞膜上 G 蛋白偶联受体的调节。

#### 4. 交联蛋白

细胞内微丝的排列方式主要有两种: 束状排列和网状排列。微丝的排列方式主要由微丝交联蛋白的种类决定。成束蛋白 (bundling protein) 将相邻的微丝交联成平行排列, 而凝胶形成蛋白 (gel-forming protein) 将微丝连接成网状。微丝交联蛋白都有两个相似的肌动蛋白结合位点。这些蛋白分子能够单独或者以二聚体的形式将相邻的微丝交联起来。多肽链上两个肌动蛋白结合位点之间的距离决定了它们所交联形成的微丝束或网的松紧程度。

丝束 (毛缘) 蛋白 (fimbrin) 是分布很广的微丝成束蛋白, 由于分子较小, 肽链上两个肌动蛋白结合域靠得很近。丝束蛋白横向连接相邻微丝, 形成排列紧密的微丝束 (图 10-6A), 这种情况发生在细胞前缘的丝状伪足中。由于微丝束中相邻的微丝排列紧密, 使得依赖于微丝运动的肌球蛋白分子难以进入, 因此丝状伪足中的微丝束没有收缩能力。绒毛蛋白 (villin) 是另一种与丝束蛋白相似的成束蛋白。该蛋白主要存在于微绒毛和细胞表面的指状突起中, 将微丝交联成紧密排列的束状结构。微绒毛中的核心微丝束通过肌球蛋白 I 与微绒毛膜相连。 $\alpha$ -辅肌动蛋白 ( $\alpha$ -actinin) 与上述成束蛋白不同, 该蛋白形成反向平行的二聚体, 两个肌动蛋白结合位点相距较远, 因此, 由  $\alpha$ -辅肌动蛋白交联形成的微丝束

中相邻的微丝之间的距离较大 (图 10-6B)。 $\alpha$ -辅肌动蛋白负责收缩性微丝束 (如应力纤维) 中肌动蛋白纤维之间的交联, 相对宽松的微丝排列方式使得肌球蛋白 II 容易进入, 使得应力纤维具有收缩能力。

成束蛋白的两个肌动蛋白结合域之间的区域都是僵直的, 而另外一些微丝交联蛋白, 如细丝蛋白 (filamin) 和血影蛋白 (见第四章), 它们的两个肌动蛋白结合域之间的区域是柔软的, 或者本身就是弯曲的。当微丝与这些交联蛋白相互作用时就会形成网状或凝胶样的结构。细胞内一个典型的例子是细丝蛋白。两个细丝蛋白的一端相互作用形成二聚体, 另两个末端将两根微丝以 90° 的夹角交联, 使微丝形成松散的网络结构 (图 10-6C)。这种凝胶样的结构存在于片状伪足中, 能帮助细胞在基质表面爬行。血影蛋白是 4 条多肽链 (两条  $\alpha$  链和两条  $\beta$  链) 组成的细长而容易弯曲的蛋白质分子, 在细胞膜的内侧将短的微丝交联成二维网络, 并将这个网络与细胞质膜相连, 形成一个结实的细胞皮层, 对细胞质膜起机械支撑作用。

#### 5. 割断及解聚蛋白

在细胞迁移或其他运动过程中, 细胞需要将某些区域的微丝快速解聚, 或者是形成大量的末端以加速组装。凝溶胶蛋白在高 Ca<sup>2+</sup> 浓度 (>1  $\mu$ mol/L) 情况下能将较长微丝切成片段, 使肌动蛋白由凝胶态向溶胶态转化。较长的微丝被切断以后产生许多游离的正极端和负极端, 在某些条件下可以加速微丝的解聚, 而在另外一些条件下可以形成大量的组装位点, 促进微丝在短时间内快速组装。丝切蛋白 / 肌动蛋白解聚因子 (cofilin/actin depolymerizing factor, cofilin/ADF) 能与肌动蛋白单体或微丝结合, 提高微丝的解聚速度。

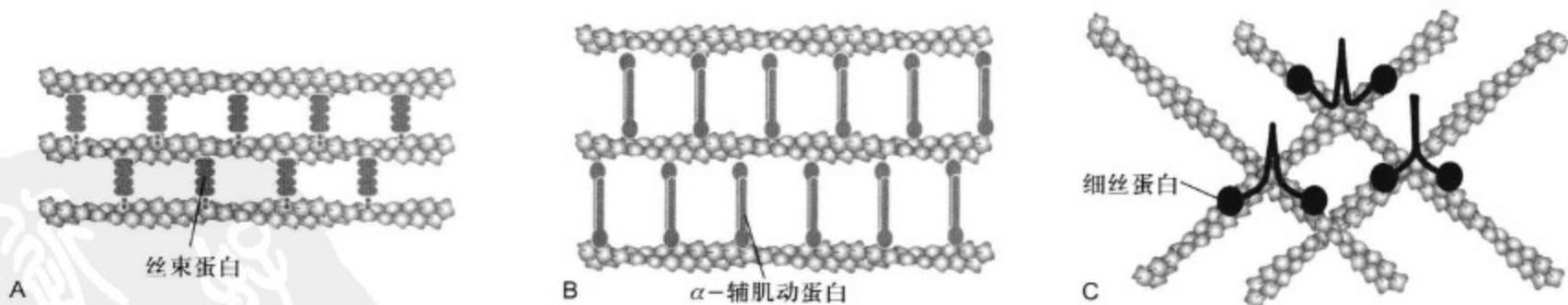


图 10-6 交联蛋白与微丝的相互作用

A. 成束蛋白将相邻的微丝交联成束状结构。丝束蛋白和绒毛蛋白等交联而成的微丝束为紧密包装型, 肌球蛋白不能进入, 因而没有收缩能力。B. 由  $\alpha$ -辅肌动蛋白交联形成的微丝束相邻的纤维之间比较宽松, 肌球蛋白可以进入并与微丝相互作用, 这种类型的微丝束是可收缩的。C. 细丝蛋白将微丝交联成网状结构。

## （二）细胞皮层

免疫荧光染色的结果显示，细胞内大部分微丝都集中在紧贴细胞质膜的细胞质区域，并由微丝交联蛋白交联成凝胶态三维网络结构，该区域通常称为细胞皮层（cell cortex）。皮层内一些微丝还与细胞质膜上的蛋白质有连接，使膜蛋白的流动性受到某种程度的限制。皮层内密布的微丝网络可以为细胞质膜提供强度和韧性，有助于维持细胞形状。细胞的多种运动，如胞质环流（cyclosis）、阿米巴运动（amoiboid）、变皱膜运动（ruffled membrane locomotion）、吞噬（phagocytosis）以及膜蛋白的定位等都与皮层内肌动蛋白的溶胶态-凝胶态转化相关。

## （三）应力纤维

体外培养的细胞在基质表面铺展时，常在细胞质膜的特定区域与基质之间形成紧密黏附的黏着斑。在紧贴黏着斑的细胞质膜内侧有大量成束状排列的微丝，这种微丝束称为应力纤维（stress fiber）（图 10-7）。应力纤维的结构与骨骼肌细胞中的肌原纤维非常相似，其结构成分除微丝外，还含有肌球蛋白 II、原肌球蛋白、细丝蛋白和  $\alpha$ -辅肌动蛋白等结构成分。

应力纤维是真核细胞内广泛存在的微丝束结构。用肌球蛋白重链的 S1 片段与应力纤维结合，显示应力纤维中相邻的微丝呈反向平行排列，而非肌动蛋白组分则表现不连续的周期性分布，故应力纤维呈现出带纹外观。应力纤维通过黏着斑与细胞外基质相连，可能在细



图 10-7 应力纤维

体外培养的星形胶质细胞用罗丹明标记的鬼笔环肽染色，显示在细胞内应力纤维和黏着斑的分布。（李慧惠和陈建国博士提供）

胞形态发生、细胞分化和组织建成等方面发挥作用。从应力纤维的蛋白质组分来看，它应当可以产生张力。当细胞受到外界刺激开始运动时，细胞内的应力纤维将发生变化或消失。

## （四）细胞伪足的形成与细胞迁移

在体外培养条件下，可以观察到细胞沿基质表面迁移的现象。这种现象也常常发生在动物体内，如在神经系统发育过程中，神经嵴细胞从神经管向外迁移；在发生炎症反应时，中性粒细胞从血液向炎症组织迁移；神经元的轴突顺基质上的化学信号向靶目标伸展；等等。这些细胞运动主要是通过肌动蛋白的聚合及与其他细胞结构组分的相互作用来实现的。

以成纤维细胞为例，细胞在基质或相邻细胞表面的迁移过程通常包含以下几个相继发生的事件：首先，细胞表面在它运动方向的前端伸出突起；然后，细胞伸出的突起与基质之间形成新的锚定位点（如黏着斑），使突起附着在基质表面；第三，细胞以附着点为支点向前移动；最后，位于细胞后部的附着点与基质脱离，细胞的尾部前移。在上述过程中，均涉及肌动蛋白以多种方式发挥作用。在迁移过程中，位于细胞前缘的肌动蛋白聚合使细胞伸出宽而扁平的片状伪足（lamellipodium），在伪足内部微丝的正极端通常位于靠近细胞质膜的部位，存在于该部位的 WASP（Wiskott-Aldrich syndrome protein）蛋白家族的成员能够激活 Arp2/3 复合物，导致肌动蛋白的聚合。片状伪足常呈波形运动，在其前端还有一些比较纤细的突起，称为丝状伪足（filopodium）（图 10-8）。

片状伪足和丝状伪足的形成依赖于肌动蛋白的聚合，并由此产生推动细胞运动的力（图 10-9）。当细胞受到外来信号的刺激时（步骤 1），位于细胞质膜附近的 WASP 蛋白将 Arp2/3 复合物激活（步骤 2），并使之成为微丝组装的成核位点，启动微丝的组装（步骤 3）。前纤维蛋白（与游离的肌动蛋白单体结合）可以促进结合 ATP 的肌动蛋白单体在微丝正极端聚合，使其向细胞质膜一侧延伸。待微丝延伸到一定的程度后，Arp2/3 复合物结合到微丝的侧面（步骤 4），在此启动新的微丝的组装，形成分支。游离的肌动蛋白不断在正极端加入而使侧支向细胞质膜处延伸（步骤 5 和 6），在侧支上面再形成新的分支，并继续延伸。持续延伸的肌动蛋白网络推动细胞质膜向信号源方向伸出，形成伪足。

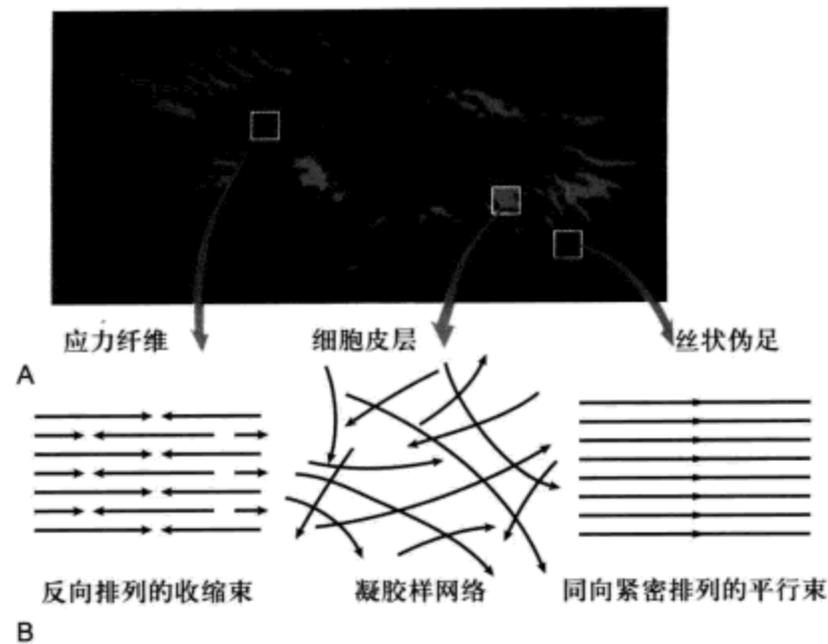


图 10-8 动物细胞边缘的伪足及其微丝的排列方式

A. 用荧光标记的鬼笔环肽染色显示体外培养细胞内微丝的分布以及细胞周缘伸出的伪足。B. 应力纤维、细胞皮层和丝状伪足内部微丝的排列方式示意图。

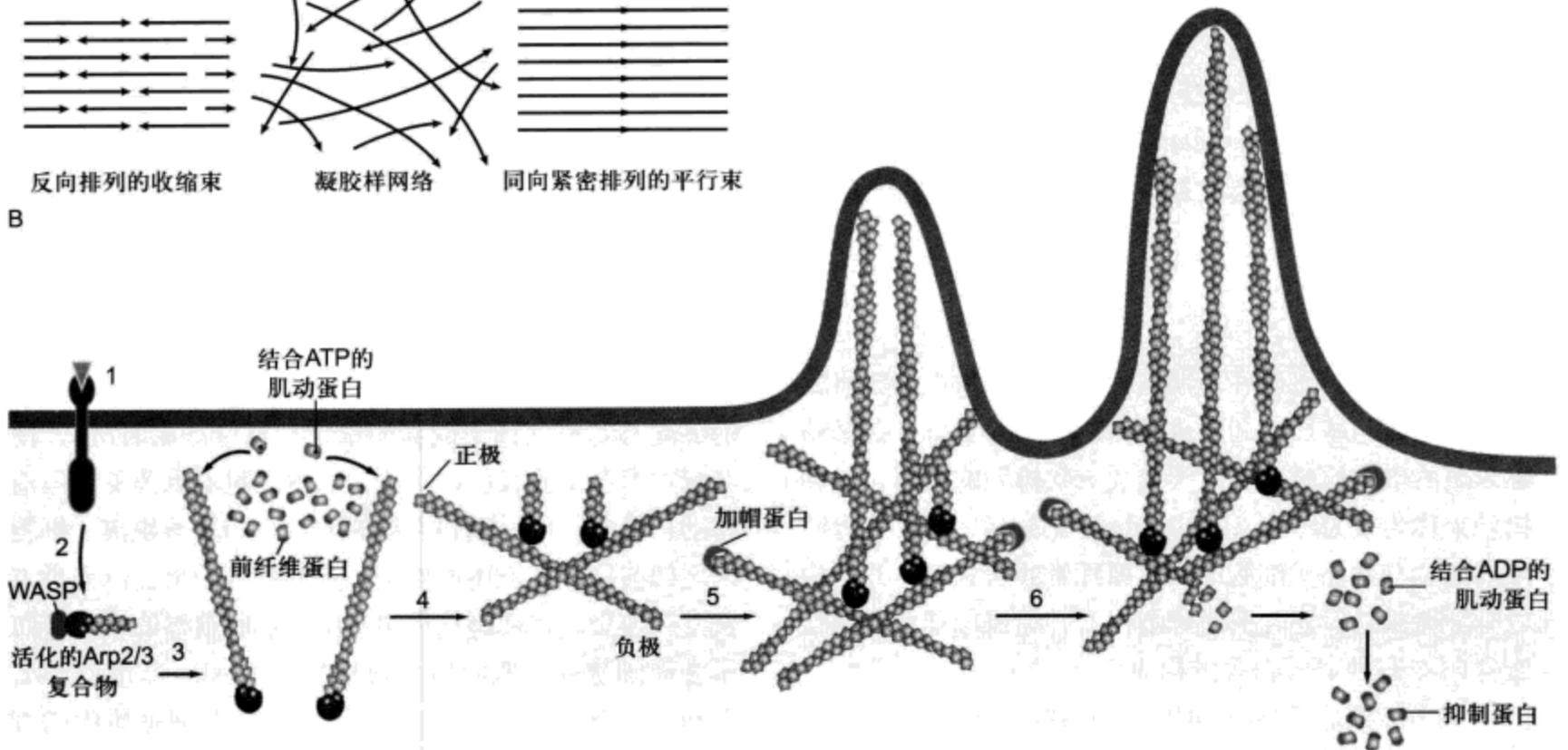


图 10-9 非肌细胞前缘肌动蛋白的聚合和伪足的形成

1. 细胞外信号与位于细胞膜上的受体结合并启动细胞内信号。2. 细胞内信号作用于 WASP，并激活 Arp2/3 复合物，启动微丝的组装。3. 肌动蛋白单体在微丝正极端聚合，使微丝向细胞膜延伸。4. Arp2/3 复合物结合到微丝的侧面，启动微丝侧支的组装。5. 微丝的正极不断延伸推动细胞质膜形成伪足。6. 微丝的负极端解聚。

## (五) 微绒毛

在小肠上皮细胞的游离面存在大量的微绒毛 (microvilli)，其轴心是一束平行排列的微丝，微丝束正极端指向微绒毛的顶端，其下端终止于端网结构 (terminal web)。微丝束对微绒毛的形态起支撑作用。由于微丝束内不含肌球蛋白、原肌球蛋白和  $\alpha$ -辅肌动蛋白，因而该微丝束无收缩功能。微丝交联蛋白如绒毛蛋白、丝束蛋白、胞衬蛋白 (fodrin) 等在微丝束的形成、维持及其与细胞质膜的连接中起重要作用。将肌球蛋白的 S1 片段与微绒毛内的微丝结合，然后用快速冷冻深度蚀刻电镜技术可显示微绒毛内部微丝束的极性，微丝的正极端在微绒毛的顶部，在微绒毛的基部微丝束与细胞质中

间丝相连 (图 10-10)。

## (六) 胞质分裂环

胞质分裂环是有丝分裂末期在两个即将分裂的子细胞之间的质膜内侧形成的一个起收缩作用的环形结构 (图 10-11)。收缩环是由大量平行排列，但极性相反的微丝组成。胞质分裂的动力来源于收缩环上肌球蛋白所介导的极性相反的微丝之间的滑动。随着收缩环的收缩，两个子细胞被缢缩分开。胞质分裂完成后，收缩环即消失。收缩环是非肌细胞中具有收缩功能的微丝束的典型代表，微丝能在很短的时间内迅速组装与去组装以完成胞质分裂功能。

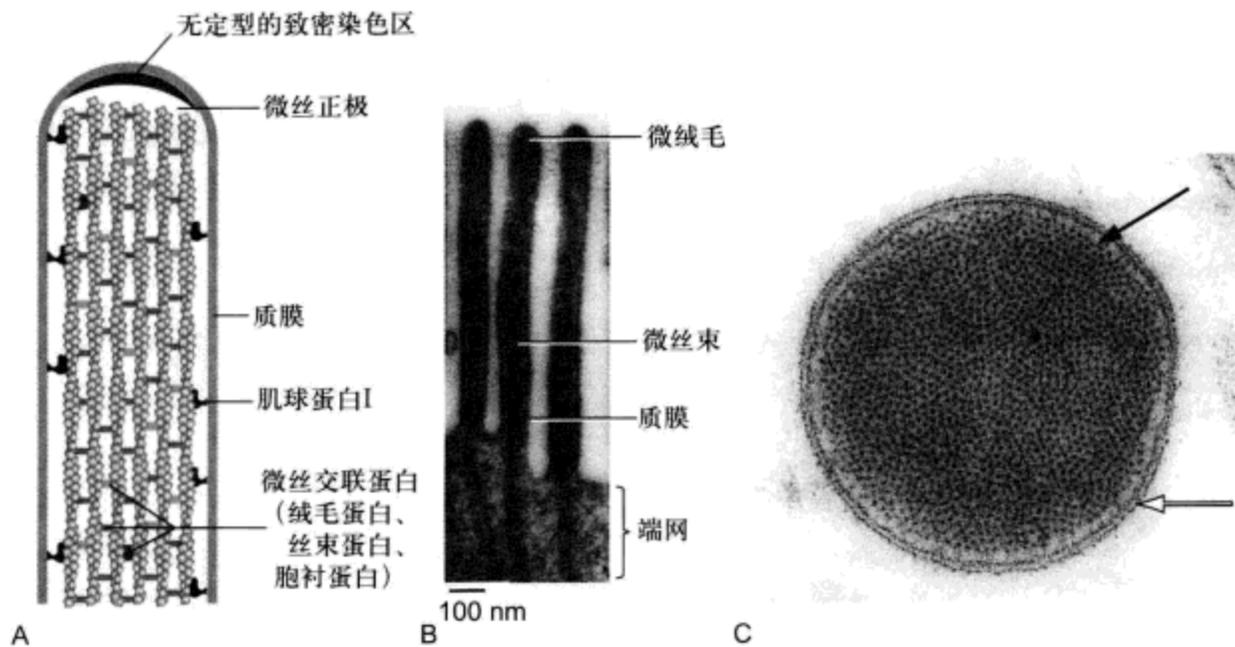


图 10-10 微绒毛中的微丝和微丝交联蛋白

A. 微绒毛内部微丝及其微丝交联蛋白排列结构模式图。B. 小肠上皮细胞表面微绒毛（纵切面）电镜图像。C. 内耳耳蜗的毛细胞顶端的静纤毛（微绒毛）横切面的电镜图像，实心箭头示微丝断面，空心箭头示微绒毛膜。（B、C 图由 Ueli Aebi 博士惠赠）

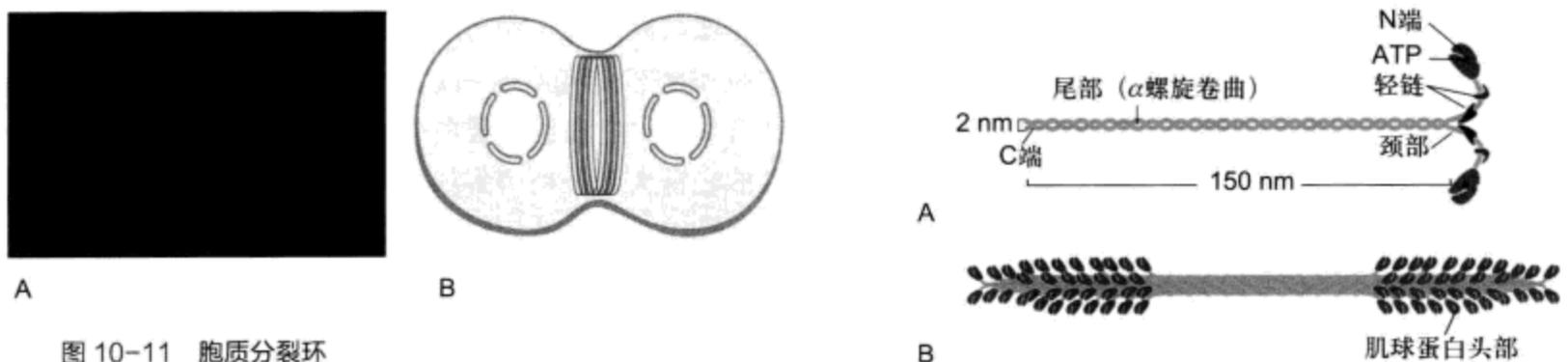


图 10-11 胞质分裂环

A. 鬼笔环肽染色显示星形胶质细胞在两个即将形成的子细胞之间形成一个由肌动蛋白/肌球蛋白 II 组装而成具有收缩作用的环，另外的一些微丝结构存在于细胞皮层。染色质由 DAPI 染色显示。B. 胞质分裂环模式图。（A 图由李慧惠博士惠赠）

图 10-12 II 型肌球蛋白分子和粗肌丝的结构示意图

A. II 型肌球蛋白分子由两条具有马达结构域的重链（黄色）和 4 条起调节作用的轻链构成。B. 由 II 型肌球蛋白的尾部结构域相互作用而组装成的粗肌丝。

### 三、肌球蛋白：依赖于微丝的分子马达

在细胞内参与物质运输的马达蛋白 (motor protein) 可以分为 3 类：沿微丝运动的肌球蛋白 (myosin)、沿微管运动的驱动蛋白 (kinesin) 和动力蛋白 (dynein)。这些蛋白质既有与微丝或微管结合的马达结构域，又有与膜性细胞器或大分子复合物特异结合的“货物”结构域，利用水解 ATP 所提供的能量有规则地沿微管或微丝等细胞骨架纤维运动。

#### (一) 肌球蛋白的种类

有关肌球蛋白的最初信息来自对骨骼肌细胞的研究。在骨骼肌细胞内，多个 II 型肌球蛋白分子（图

10-12) 组装成肌原纤维的粗丝，并被相关的细胞结构约束在一定的区域，肌球蛋白的头部和组成微丝的肌动蛋白亚基之间的相互作用导致粗丝与细丝之间的滑动。随后，人们又在多种其他类型的细胞内发现了不同类型的肌球蛋白分子。所有的肌球蛋白都具有相似的马达结构域，这是肌球蛋白超家族成员间最保守的部位，可以作为肌球蛋白分类的依据，而多肽链的 C 端和 N 端扩展部分则存在很大的差异（图 10-13）。基于马达结构域多肽链一级结构的同源性进行分类，至少可以将肌球蛋白超家族的成员分成 18 种家族，一些类群还可以进一步分成多个亚家族。不同的生物细胞所表达的肌球蛋白的种类具有较大的区别，如芽殖酵母表达的 5 种的肌球蛋白分属 3 个不同的家族，而人类细胞表达 40 多种肌球蛋白，它们分别属于 12 个不同的肌球蛋白家族。

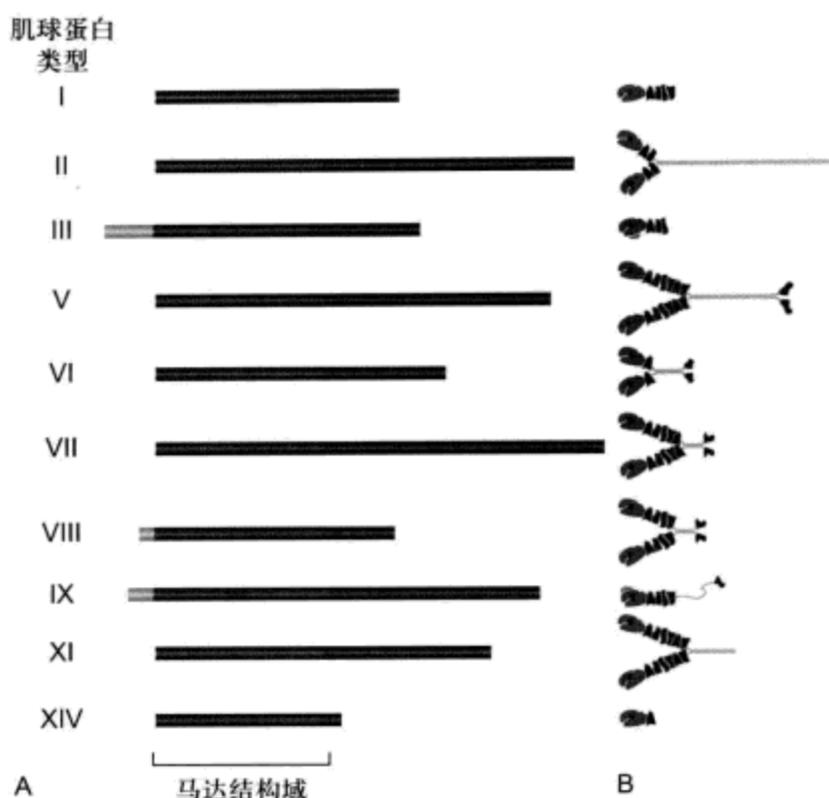


图 10-13 部分肌球蛋白超家族成员的结构示意图

A. 各类肌球蛋白分子的一级结构，棕色部分示马达结构域在多肽链中的位置。B. 一些肌球蛋白超家族成员重链的结构域比较。所有的肌球蛋白分子都具有相似的马达结构域，但它们 C 端和某些成员的 N 端扩展部分却是多种多样的。

在进化过程中，不同类型肌球蛋白成员逐步适应于特殊的细胞功能。如 II 型肌球蛋白的成员在心肌、骨骼肌和平滑肌中能产生强大的收缩力，也在收缩环、张力纤维等具有收缩能力的细胞结构中发挥作用；V 型肌球蛋白的成员在细胞内膜泡和其他细胞器的运输方面发挥作用；I、VI、IX 和 X 型肌球蛋白的成员参与了内吞作用以及吞噬泡的运输；有些肌球蛋白家族的成员在细胞形态和极化细胞结构的建立及维持过程中发挥功能，如 I 型肌球蛋白家族的成员将膜脂和微丝结构相连接，在一些细胞膜突起的形成过程中发挥作用，II 型肌球蛋白的某些成员为与细胞形态维持相关的张力纤维及细胞皮层的微丝提高收缩力，VII 型肌球蛋白参与黏着斑的动态变化。还有一些肌球蛋白家族的成员参与了细胞感知系统及信号转导过程，如某些 I 型肌球蛋白分子对钙通道的活性具有调控作用，III 型肌球蛋白的成员与光感受器的信号分子相互作用，VI、VII 和 XV 型肌球蛋白家族的一些成员与耳朵感觉细胞中的微丝结构相关，这些基因的突变有可能造成听力障碍。

## (二) 肌球蛋白的结构

肌球蛋白是沿微丝运动的分子马达，该蛋白通常含有 3 个功能结构域。它们是与运动相关的马达结构域，调控结构域，及与肌球蛋白复合体的组装相关，或者是选择性地与所运输的“货物”结合的尾部结构域。相对分子质量为  $8 \times 10^4$  左右的马达结构域位于肌球蛋白的头部，包含一个肌动蛋白亚基结合位点和一个具有 ATP 酶活性的 ATP 结合位点。该结构域在肌球蛋白超家族的各成员之间高度保守，是肌球蛋白定性和分类的依据，负责将 ATP 水解所释放的化学能转变成机械能。位于马达结构域头部的肌动蛋白亚基结合位点有一个裂隙，距 ATP 结合位点大约 4 nm。ATP 结合位点所结合的核苷酸分子的变化（ATP 水解成 ADP+Pi 或 Pi 的释放等）将改变肌动蛋白亚基结合位点和调控结构域的构象。当 ATP 与肌球蛋白结合时，裂隙稍稍开启，马达结构域与微丝的亲和力降低。调控结构域是连接马达结构域和尾部杆状区的一段  $\alpha$  螺旋，也是肌球蛋白轻链的结合部位，它在肌球蛋白分子上发挥杠杆作用。肌球蛋白的轻链大多是钙调蛋白家族的成员，每个肌球蛋白分子上所结合的轻链的种类取决于肌球蛋白的类型和生物体的发育状态。

根据各种肌球蛋白分子结构上的差异，习惯上将 II 型肌球蛋白称为传统的肌球蛋白 (conventional myosin)，其他的各种类型称为非传统的肌球蛋白 (unconventional myosin) 类型。图 10-13 显示了几种类型的肌球蛋白的分子结构，其中研究较多的是 I 型、II 型和 V 型。除 VI 型肌动蛋白的运动方向是从微丝的正极端向负极端移动以外，其他所有类型的肌动蛋白都是向微丝的正极端移动。

### 1. II 型肌球蛋白

在肌细胞中，II 型肌球蛋白组装成肌原纤维的粗丝，其含量约占肌细胞总蛋白质质量的一半。在非肌细胞中，II 型肌球蛋白与胞质分裂过程中收缩环的动态结构以及应力纤维的活动相关。典型的 II 型肌球蛋白分子包含 2 条相对分子质量为  $2.2 \times 10^5$  的重链和 4 条轻链，形成一个高度不对称的结构 (图 10-12A)。2 条重链的尾部卷曲盘绕形成直径 2 nm，长约 150 nm 的双股  $\alpha$  螺旋。用胰蛋白酶处理肌球蛋白分子，可产生轻酶解肌球蛋白 (light meromyosin, LMM) 和重酶解肌球蛋白 (heavy meromyosin, HMM)。重酶解肌球蛋白经木瓜蛋白酶处理，形成肌球蛋白头部 (HMM-S1) 和杆部

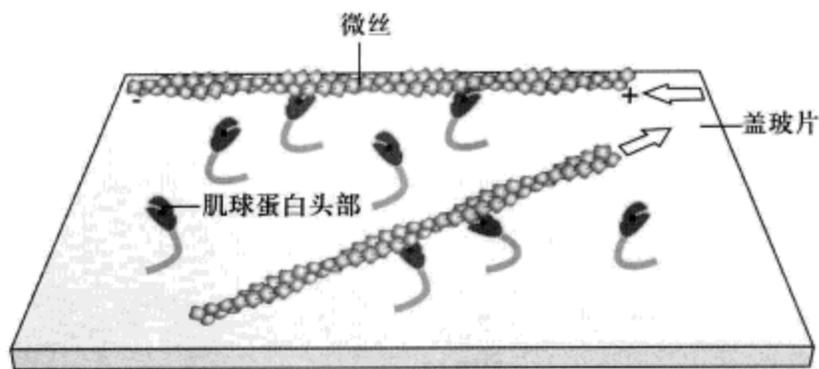


图 10-14 肌球蛋白的体外运动实验模式图

纯化的肌球蛋白 S1 片段被固定在盖玻片上，然后在体系中加入用荧光标记的微丝。当在体系中加入 ATP 时，在荧光显微镜下可以观察到微丝沿盖玻片表面滑动。

(HMM-S2)。当反应体系中有 ATP 存在时，固定在盖玻片上的 S1 片段可以驱动肌动蛋白丝位移 (图 10-14)。

II 型肌球蛋白分子的尾部主要起结构支撑作用。双极肌球蛋白纤维组装时其尾部位于纤维的中央，而头部朝向两侧 (图 10-12B)。在骨骼肌细胞中，由肌球蛋白尾部构成的肌原纤维的粗丝是高度稳定的，而在胞质分裂收缩环中则是一个临时性的结构。

## 2. 非传统类型的肌球蛋白

I 型肌球蛋白分子于 1973 年由 Thomas Pollard 和 Edward Korn 从原生动物 *Acanthamoeba* 中分离得到。与传统的 II 型肌球蛋白分子不同，该蛋白分子只有一个头部 (马达结构域) 和一个尾部，长度为 70 nm (图 10-13)，并且在体外不能组装成纤维。其头部结构域能在 ATP 存在时沿微丝运动，尾部结构域在不同种类的 I 型肌球蛋白中各不相同，尾部结构域的多样性与它们所运输“货物”的种类不同有关。有些 I 型肌球蛋白的尾部可以和特殊类型的膜泡结合，沿微丝移动；也有一些是和细胞质膜结合，牵引质膜和皮层微丝作相对运动，从而改变细胞的形状。

V 型肌球蛋白分子是由两条肽链组成的二聚体，具有两个头部。其颈部的长度大约是 II 型肌球蛋白颈部的 3 倍，达 23 nm。在运动过程中，V 型肌球蛋白的步幅正好是微丝上由 13 个肌动蛋白亚基所组成的重复结构的长度。该蛋白的两个头部交替与微丝结合可以确保整个分子以及所运载的“货物”始终与微丝相连。

从细胞中分离到的一些膜泡表面既有依赖于微管的马达分子，也有依赖于微丝的非传统类型的肌球蛋白。在细胞质内，一些膜性细胞器作长距离转运时通常依赖于微管，而在细胞皮层以及神经细胞生长锥前端等富含微丝的部位，“货物”的运输则转到以微丝为轨道进行。

然而，在植物花粉管中的物质运输似乎主要依赖于微丝。

## 四、肌细胞的收缩运动

高等动物的个体运动有赖于骨骼肌的收缩。肌细胞是高度有序的收缩装置，使人们能从分子水平直至器官功能水平上对其进行详细了解。

### (一) 肌纤维的结构

骨骼肌细胞又称肌纤维，是在胚胎期由大量的单核成肌细胞融合而成，但细胞核仍保留在肌纤维内。用电镜观察肌纤维的纵切面，可见肌纤维是由数百条更细的肌原纤维 (myofibril) 组成的集束 (图 10-15)。

每根肌原纤维由称为肌节 (sarcomere) 的收缩单元呈线性重复排列而成。每个肌节都表现出特征性的带型。肌原纤维的带状条纹由粗肌丝和细肌丝的纤维有序组装而成。粗肌丝由肌球蛋白组装而成，细肌丝的主要成分是肌动蛋白，辅以原肌球蛋白和肌钙蛋白。肌球蛋白的头部突出于粗肌丝的表面，并可与细肌丝上肌动蛋白亚基结合，构成粗肌丝与细肌丝之间的横桥 (图 10-16)。

原肌球蛋白 (tropomyosin, Tm) 在肌细胞中占总蛋白质量的 5%~10%，分子长度为 40 nm，由两条平行的多肽链形成  $\alpha$  螺旋构型。Tm 位于肌动蛋白丝的螺旋状沟槽内，一个 Tm 的长度相当于 7 个肌动蛋白单体 (图 10-15C)，对肌动蛋白与肌球蛋白头部的结合行使调节功能。

肌钙蛋白 (troponin, Tn) 含 3 个亚基，其中肌钙蛋白-C (Tn-C) 能与  $\text{Ca}^{2+}$  结合，肌钙蛋白-T (Tn-T) 与原肌球蛋白有高度亲和力，肌钙蛋白-I (Tn-I) 能抑制肌球蛋白马达结构域的 ATP 酶活性。细肌丝中每隔 40 nm 有一个肌钙蛋白复合体结合到原肌球蛋白上 (图 10-17)。

除上述主要分子外，肌肉收缩系统中还存在一些其他蛋白。将细肌丝锚定于 Z 盘或质膜上的蛋白质有：① CapZ，由相对分子质量为  $3.2 \times 10^4$  和  $3.6 \times 10^4$  的两个亚基构成，定位于 Z 盘，与肌动蛋白丝正极端结合，使肌动蛋白丝保持稳定。②  $\alpha$ -辅肌动蛋白是骨骼肌 Z 盘、平滑肌细胞质板及心肌闰盘的主要成分之一，可将微丝横向连接成束。③ 组蛋白，位于平滑肌细胞质板、心肌闰盘，介导微丝与细胞质膜结合。

在肌节中起结构作用的蛋白质还有：① 肌联蛋白 (connectin)：相对分子质量大约为  $1 \times 10^6$ ，长度达

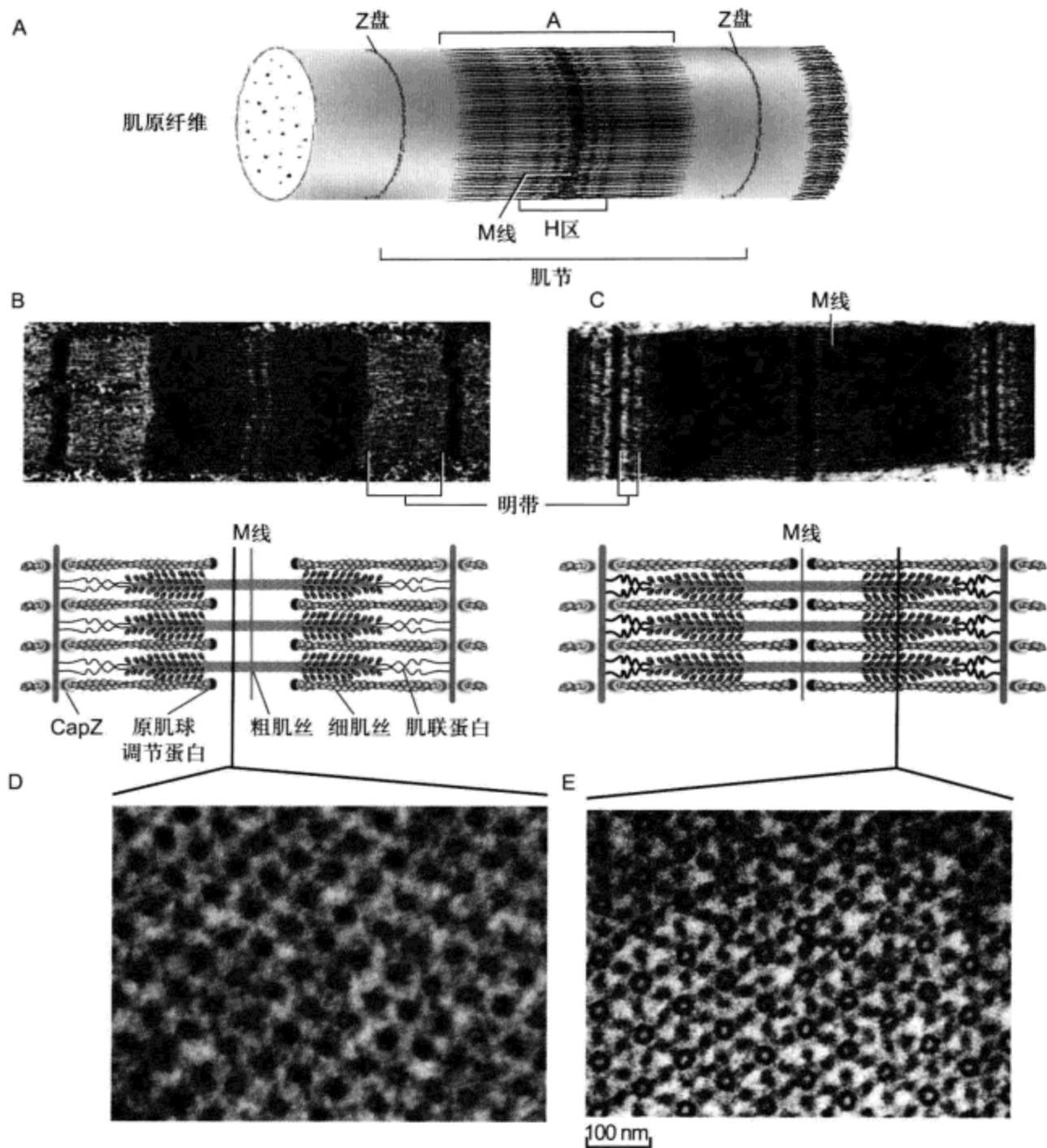


图 10-15 肌原纤维的结构

A. 肌纤维的三维结构示意图。B 和 C. 肌细胞纵切面，低倍电镜图片显示处于松弛（B 上）和收缩（C 上）状态下肌节中明带和暗带有规律的排列状态，B（下）和 C（下）分别为松弛和收缩状态下粗肌丝和细肌丝的结构示意图。D. 肌肉中粗肌丝横切面的电镜照片。E. 肌肉中粗肌丝和细肌丝交汇处的电镜照片，显示细肌丝围绕粗丝的六角形排列。（图中照片由洪健博士惠赠）

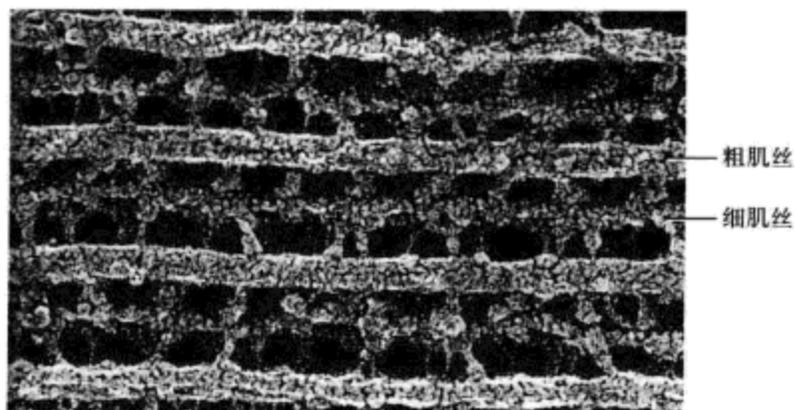


图 10-16 快速冷冻深度蚀刻电镜技术显示骨骼肌细胞中肌球蛋白（粗肌丝）与肌动蛋白（细肌丝）间的横桥（Heuser 博士惠赠）

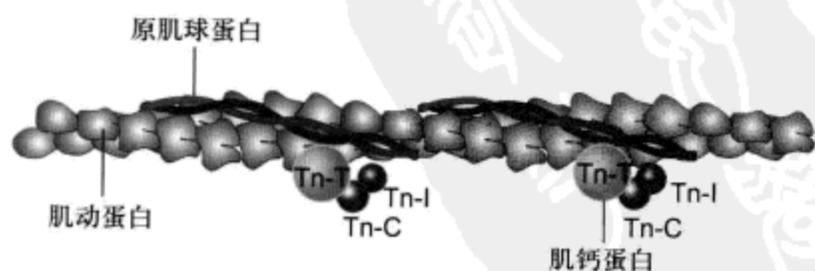


图 10-17 细肌丝的分子结构示意图

显示原肌球蛋白和肌钙蛋白沿肌动蛋白丝的分布状况，每个原肌球蛋白分子镶嵌在肌动蛋白丝的沟槽内，前后连接 7 个肌动蛋白亚基。

1  $\mu\text{m}$ ，具有弹性，连接Z盘与肌球蛋白纤维，在肌肉收缩或舒张时将肌球蛋白纤维（粗肌丝）定位于肌节中央。② 伴肌动蛋白（nebulin）：该蛋白从Z盘伸出，与肌动蛋白丝伴行，可能参与调节肌动蛋白丝的组装。③ 肌营养不良蛋白（dystrophin）：该蛋白可能参与微丝与质膜的锚定作用，对防止肌纤维退化也很重要。

## （二）肌肉收缩的滑动模型

Huxley 和 Hanxon (1954) 在观察肌肉收缩时发现肌节缩短，但在肌节内并无粗/细肌丝的长度变化，而只是由神经冲动引发的细肌丝与粗肌丝之间的相对滑动所致，这就是肌肉收缩的滑行学说 (sliding theory)。在之后对肌肉收缩的分子机制又有了更为明晰的认识，其基本过程如下。

### 1. 动作电位的产生

来自脊髓运动神经元的神经冲动经轴突传到神经—肌肉接点—运动终板，使肌细胞质膜去极化，并经T小管传至肌质网。

### 2. $\text{Ca}^{2+}$ 的释放

肌质网去极化后释放  $\text{Ca}^{2+}$  至肌浆中，触发  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高，达到收缩期的  $\text{Ca}^{2+}$  阈浓度 (约为  $10^{-6} \text{ mol/L}$ )。

### 3. 原肌球蛋白位移

$\text{Ca}^{2+}$  与 Tn-C 结合，引起肌钙蛋白构象变化，Tn-C 与 Tn-I、Tn-T 结合力增强，导致 Tn-I 与肌动蛋白结合力削弱，使肌动蛋白与 Tn-I 脱离；同时，Tn-T 使原肌球蛋白移位到肌动蛋白双螺旋沟槽的深处，暴露出细肌丝肌动蛋白与横桥结合活化位点，解除了肌动蛋白与肌球蛋白结合的障碍。

### 4. 细肌丝与粗肌丝之间的相对滑动

在肌丝的滑动过程中，肌球蛋白将 ATP 中储存的化学能转化成肌丝滑动的机械能。肌球蛋白的头部结构域与细肌丝之间的每一个机械运动周期消耗 1 分子 ATP (图 10-18)。根据滑动模型，当肌球蛋白头部 (马达) 结构域上没有与 ATP 结合，突出于粗肌丝表面的头部结构域与细肌丝上的肌动蛋白亚基处于紧密结合状态。当 ATP 结合到肌球蛋白的头部，引起头部结构域与细肌丝分离 (步骤 1~2)；同时头部结构域的 ATP 酶被激活，将 ATP 水解成 ADP 和  $\text{P}_i$ ，ATP 水解释放出的能量被肌球蛋白吸收，导致进一步的构象变化，头部结构域向前抬升，并结合到靠近细肌丝正极端的一个肌动蛋白亚基上 (步骤 3~4)；随着  $\text{P}_i$  和能量的释放，肌球蛋白颈部结构域发生构象变化，由此产生的力改变了肌

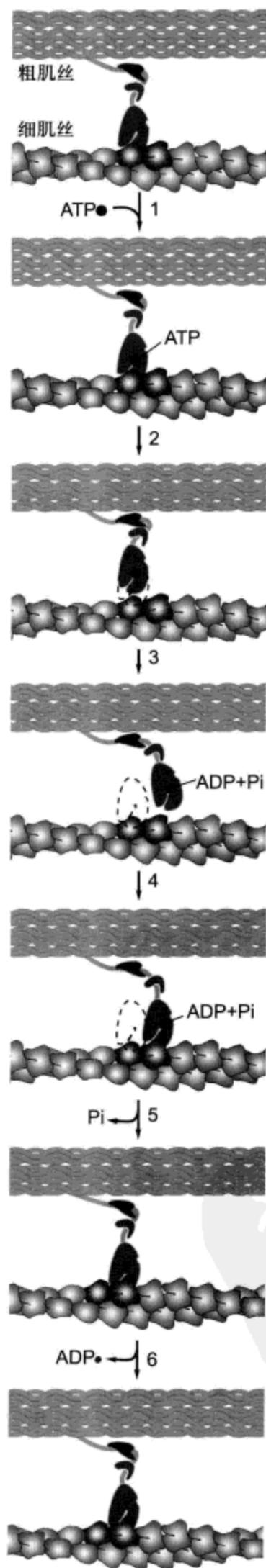


图 10-18 肌肉收缩过程图解

在初始状态，组成粗肌丝的肌球蛋白的头部 (马达结构域) 没有结合 ATP 时，该肌球蛋白的头部与细肌丝结合，并成僵直状态。1~2. ATP 结合到肌球蛋白的头部导致与肌动蛋白纤维的结合力下降，肌球蛋白与肌动蛋白分开。3. ATP 水解为  $\text{ADP} + \text{P}_i$ ，但水解产物仍与肌球蛋白结合，获能的肌球蛋白头部发生旋转，向细肌丝的正极端抬升。4. 在  $\text{Ca}^{2+}$  存在的条件下，肌球蛋白头部与靠近细肌丝正极端的一个肌动蛋白亚基结合。5.  $\text{P}_i$  释放，肌球蛋白颈部结构域发生构象变化，导致肌球蛋白的头部与细丝的角度发生变化，拉动细肌丝导致细肌丝相对于粗肌丝的滑动。6. ADP 释放，肌球蛋白的头部结构域与细肌丝之间又回到僵直状态。

球蛋白的头部结构域与细肌丝的角度，拉动细肌丝导致相对于细肌丝的滑动（步骤5）；接着是ADP的释放，肌球蛋白的头部结构域与细肌丝之间又回到僵直状态（步骤6）。如果体系中仍有高浓度的 $\text{Ca}^{2+}$ 存在，肌球蛋白将继续下一个周期，沿细肌丝滑动。到达肌细胞的冲动一旦停止，肌质网就通过钙泵将 $\text{Ca}^{2+}$ 回收，使胞质中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度降低，于是收缩周期停止。

的组织作用。另外一些微管形成相对稳定的“永久性”结构，如存在于纤毛或鞭毛内的轴丝微管、神经元突起内部的微管束结构等。

## 第二节 微管及其功能

电镜下观察到的微管呈中空的管状结构，其外径为24 nm，内径为15 nm。微管几乎存在于所有真核细胞中，但大部分微管在细胞质内形成暂时性的结构，如间期细胞内的微管、分裂期细胞的纺锤体微管，这些微管对细胞内各种细胞器和生物大分子的分布和功能起重要

### 一、微管的结构组成与极性

微管由微管蛋白亚基组装而成。每个微管蛋白都是由2个非常相似的球蛋白亚基（ $\alpha$ -微管蛋白和 $\beta$ -微管蛋白）结合而成的异二聚体，这种 $\alpha\beta$ -微管蛋白二聚体是细胞质内游离态微管蛋白的主要存在形式，也是微管组装的基本结构单位（图10-19）。其中 $\alpha$ -微管蛋白含450个氨基酸残基， $\beta$ -微管蛋白含455个氨基酸残基。两者的C端均含有酸性氨基酸序列，使微管表面带有较强的负电荷。有些微管蛋白亚基上特定的氨基酸残基在乙酰化酶的作用下被乙酰化修饰。这种修饰可能与微管结合蛋白（microtubule-associated protein, MAP）的选择性结合有关。

从低等的单细胞真核生物到高等哺乳动物，微管蛋

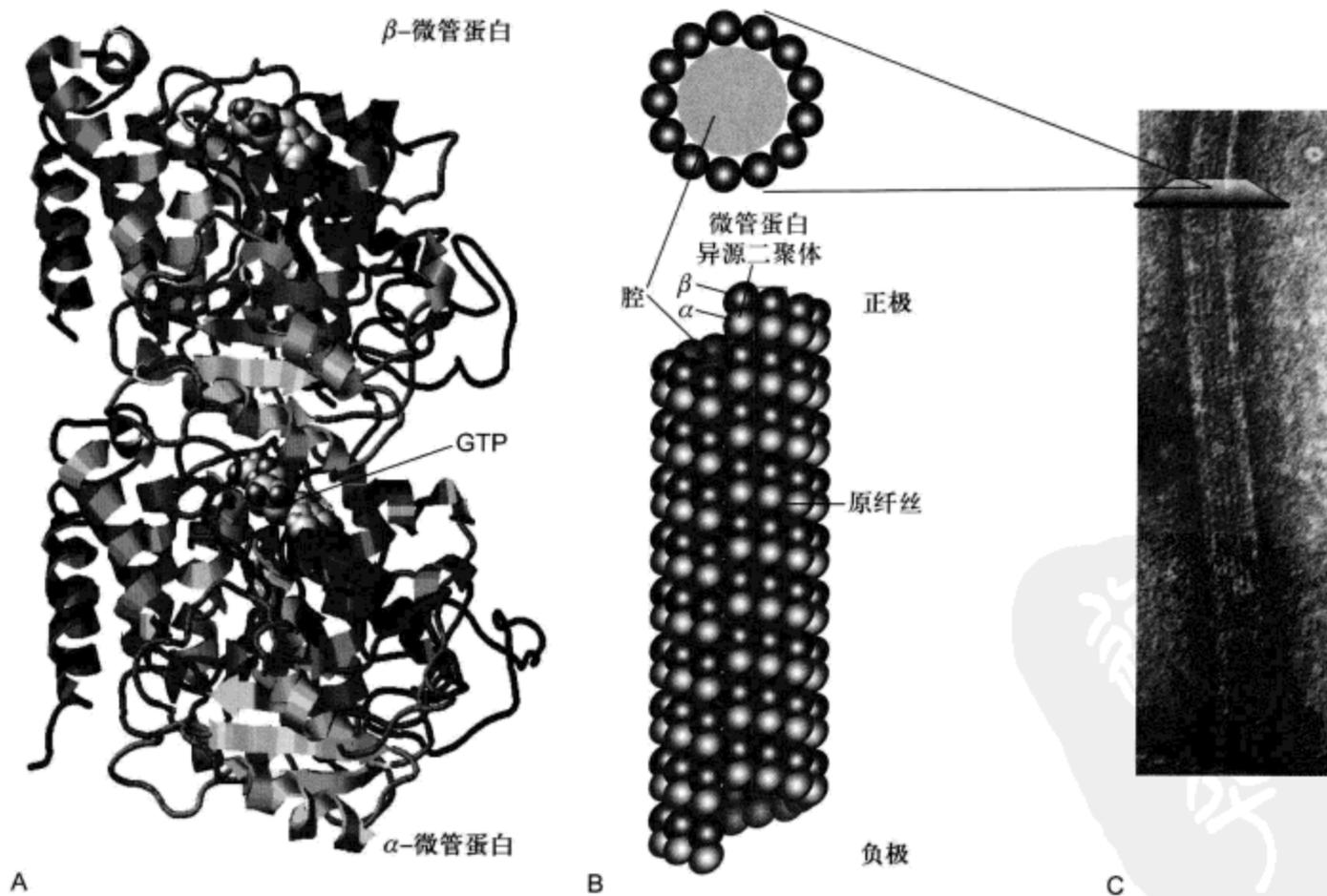


图 10-19 微管和微管蛋白

A. 微管蛋白二聚体的三维结构模型， $\alpha$ -微管蛋白和 $\beta$ -微管蛋白各结合1分子的GTP，它们在相互作用的界面上呈互补关系。B. 微管的结构模式图，上面为微管的横切面，显示由13个微管蛋白亚基组成的环状结构，下面为一段微管的侧面观，显示13根原纤丝合成微管。C. 微管负染电镜图像，显示微管蛋白亚基和原纤丝的排列方式。（C图由Ueli Aebi博士惠赠）

白可能是进化上最稳定的蛋白质分子之一。在 $\alpha$ -微管蛋白上有一个GTP结合位点,可能是由于构象上的原因,结合在该位点的GTP通常不会被水解,因而被称为不可交换位点(nonexchangeable site, N位点)。在 $\beta$ -微管蛋白也有一个GTP结合位点,该GTP在微管蛋白二聚体参与组装成微管后即被水解成GDP。当微管去组装后, $\beta$ -微管蛋白上的GDP可以被GTP所替换,然后再参与微管的组装。所以 $\beta$ -微管蛋白上的GTP结合位点是可交换位点(exchangeable site, E位点)。此外,微管蛋白上还有二价阳离子结合位点,一个秋水仙素结合位点,一个长春花碱结合位点。

在大多数生物中,微管蛋白是多基因编码的。在哺乳动物基因组中至少有6种编码 $\alpha$ -微管蛋白和 $\beta$ -微管蛋白的基因。这些基因编码的微管蛋白在序列和结构上都非常相似,并且在试管中能混合组装成微管,但在细胞内却有不同定位和功能。在细菌和古细菌中有一种被称为FtsZ的蛋白与真核细胞中的微管蛋白同源,FtsZ在细菌细胞分裂时形成环状结构,类似于动物细胞分裂时由肌动蛋白/肌球蛋白形成的收缩环,促进细菌细胞的分裂。

用电镜所观察到的微管横截面上有13个球形蛋白亚基,用负染或原子力显微镜观察到的微管管壁是由 $\alpha/\beta$ -微管蛋白二聚体纵向排列而成的原纤丝(protofilament)构成,13根原纤丝合拢后构成微管的管壁。由于相邻的原纤丝之间在排列上存在1nm左右的交错,以至微管蛋白沿微管的圆周呈螺旋状排列,在微管合拢的位置微管蛋白构成的螺旋被终止,出现 $\alpha$ -微管蛋白和 $\beta$ -微管蛋白之间的横向结合,并产生纵贯微管长轴的“接缝”。由于微管组装的基本结构单位是由 $\alpha/\beta$ -微管蛋白组成的二聚体,每一根原纤丝都是由这些二聚体有规律地排列而成。这样每一根原纤丝的两端都是不对称的,它们在微管的某一端都是 $\alpha$ -微管蛋白,而在另一端都是 $\beta$ -微管蛋白,从而使整根微管在结构上呈极性状态。结构上的不对称也导致了微管组装时微管蛋白二聚体在两端聚合速度上的差异,人们通常将组装较快的一端称为正极(plus end),而另一端称为负极(minus end)(图10-20)。微管的极性与微管的动态性质及功能密切相关。

从结构上看,细胞内的微管有3种类型,它们分别是单管(如细胞质微管或纺锤体微管)、二联管(纤毛或鞭毛中的轴丝微管)和三联管(中心体或基体的微管)。带正电荷的微管结合蛋白一端通过微管结合域与

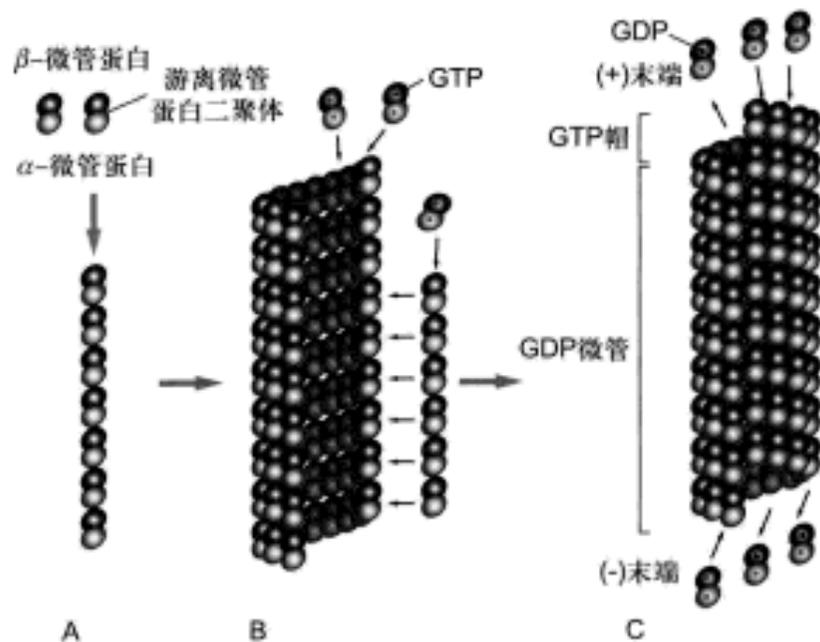


图 10-20 微管组装的过程与踏车行为

A. 原纤丝装配, $\alpha/\beta$ -微管蛋白二聚体首先组装成原纤丝。B. 侧面层装配,原纤丝侧向相互作用形成片层。C. 微管延伸,由13根原纤丝合拢形成微管, $\alpha/\beta$ -微管蛋白二聚体从两端加入(或解聚)使微管延长(或缩短)。当体系中 $\alpha/\beta$ -微管蛋白二聚体的浓度处于临界浓度时,微管蛋白在微管的正极端组装的速度与在负极端去组装的速度相等,微管的长度可保持不变。

带负电荷的微管表面结合,而另一端突出于微管表面与相邻的微管或其他细胞结构相连。马达蛋白利用水解ATP产生的能量携带所运输的“货物”沿微管运动。这些蛋白与微管网络的空间分布及功能密切相关。

## 二、微管的组装和去组装

### (一) 微管的体外组装与踏车行为

由于细胞内部结构及蛋白质组分相当复杂,因而有关微管组装方面的资料主要来源于体外试验。首次在试管内成功进行微管组装试验的是 Temple 大学 Richard Weisenberg 的研究室。他们以脑组织的匀浆物为材料,匀浆物中含有微管组装所需的全部结构组分和其他所需因子,利用大部分微管具有在低温下解聚,而在37℃时可以重新组装的特点,并在脑组织的匀浆液中加入镁离子、GTP和EDTA,结果成功地在试管中实现了微管的组装。通过调节实验系统的温度和缓冲液的组成成分,经过组装/去组装的多轮循环,再结合层析技术可以得到较纯的微管蛋白或组装好的微管。然而,在用电子显微镜观察体外组装的微管时,发现它们的粗细并不均一。一些微管的横断面上并不是人们在细胞内所见到的有13个微管蛋白亚基,有的才11个或更少,也有些

具有 15 个亚基。这些结果提示，微管在体外组装时，似乎缺乏某种机制来控制微管横断面上微管蛋白亚基的数目。

微管在体外的组装过程可以分为成核 (nucleation) 和延伸 (elongation) 两个阶段。由于缺乏中心体，微管在体外的成核过程有点特别。一些微管蛋白二聚体首先纵向聚合形成短的丝状结构，即所谓的成核反应，然后通过两端以及侧面增加二聚体而扩展成片状，当片状聚合物加宽到大致 13 根原纤丝时，即合拢成为一段微管。新的微管蛋白二聚体不断地组装到这段微管的两端，使之延长 (图 10-20)。由于微管的一端是  $\alpha$ -微管蛋白，而另一端是  $\beta$ -微管蛋白，这种差异导致微管蛋白二聚体在两端进行装配时的平衡常数不同，从而使得微管两端的组装速度大不相同。通常持有  $\alpha$ -微管蛋白的一端 (负极) 组装较慢，而持有  $\beta$ -微管蛋白的一端 (正极) 组装较快。

与其他所有生化反应过程一样，微管的组装同样与其底物 (携带 GTP 的  $\alpha/\beta$ -微管蛋白二聚体) 的浓度有关。底物浓度较高时在微管的末端组装的速度快，使微管延长。微管蛋白二聚体组装到微管的末端后，结合在  $\beta$ -微管蛋白上的 GTP 被水解为 GDP，由于高能磷酸键断裂所释放的能量储存于微管结构中，这使得末端带有 GDP 帽 (GDP-cap, D 型) 微管解聚所产生的自由能的变化 ( $\Delta G$ ) 高于末端带有 GTP 帽 (GTP-cap, T 型) 的微管。同样，前者解聚的平衡常数  $K_D (K_D = K_{off}/K_{on})$  大于后者，即微管末端带 GDP 帽的组装所需的临界浓度  $[C_c(D)]$  要大于带 GTP 帽的临界浓度  $[C_c(T)]$ 。当体系中微管蛋白二聚体的浓度介于这两个临界浓度之间时，末端为 GDP 帽的微管解聚，而带 GTP 帽的微管因组装而延长。末端  $\beta$ -微管蛋白上 GTP 的水解导致自由能和微管蛋白构象发生变化，使微管原纤丝的末端发生弯曲，这种状态使微管蛋白二聚体之间的结合力下降，更容易发生解聚 (图 10-21)。用电镜观察正在解聚的微管，可以在末端观察到这种弯曲的原纤丝，而正在组装过程中的末端亚基带的核苷酸是 GTP，这种末端的原纤丝是伸直的。当组装体系中结合 GTP 的微管蛋白二聚体的浓度较高，微管末端的组装速度大于 GTP 的水解速度时，可以在微管的末端形成一个结合 GTP 的帽子，从而使微管稳定地延伸。反之，随着微管的组装而使底物的浓度下降时，发生在微管末端的聚合速度下降，当微管组装的速度小于  $\beta$ -微管蛋白上 GTP 水解的速度时，末端暴露出结合 GDP 的微管蛋白，导致微管结构上的

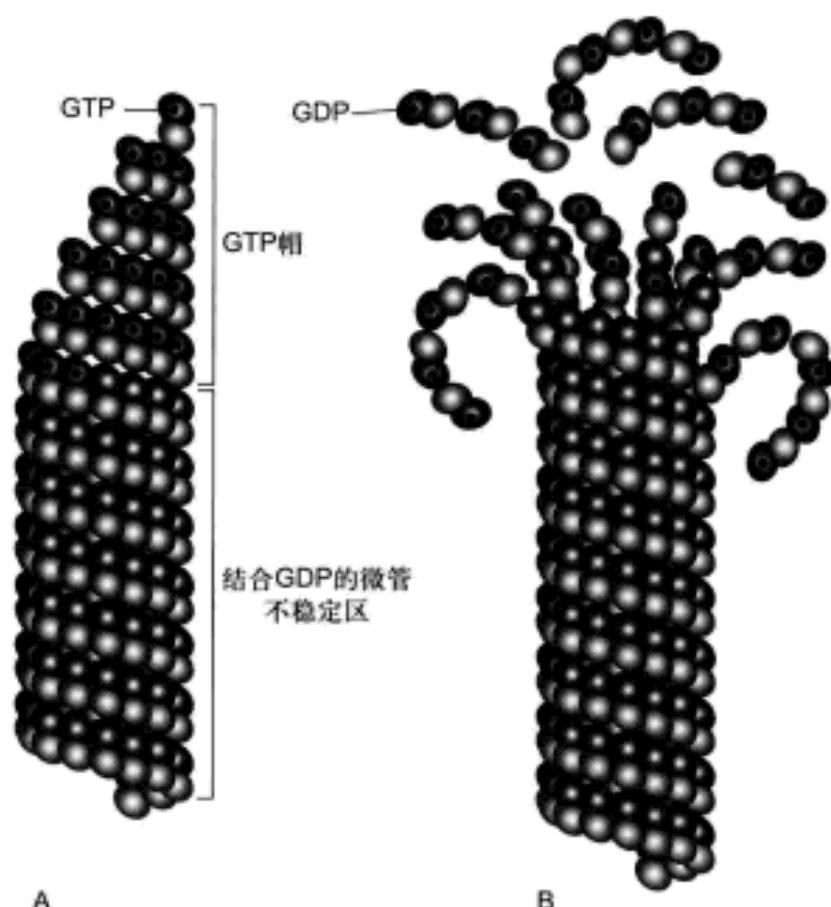


图 10-21 微管的动态不稳定性依赖于微管末端  $\beta$ -微管蛋白上 GTP 的有无

A. 当体系中  $\alpha/\beta$ -微管蛋白二聚体的浓度高于临界浓度时，微管末端新的微管蛋白加入的速度大于 GTP 水解的速度，在微管的末端部位的  $\beta$ -微管蛋白上带有 GTP，在这种末端微管的组装快于解聚。B. 当体系中游离的微管蛋白二聚体的浓度等于或低于临界浓度时，微管末端的  $\beta$ -微管蛋白上 GTP 水解的速度可能会高于末端组装的速度，GTP 的水解导致微管蛋白聚合物构象的变化，原纤丝发生弯曲，微管的末端倾向于解聚。

不稳定，从而表现出动力学不稳定性。由于微管两端极性的不同，导致微管两端组装的临界浓度的差异，当组装体系内底物的浓度接近微管正极端组装所需的临界浓度时，负极端已在临界浓度之下。可以检测到在同一根微管上其正极端因组装而延长，而其负极端则因去组装而缩短。当一端组装的速度和另一端解聚的速度相同时，微管的长度保持稳定，即所谓的“踏车行为”。

细胞内微管的组装和去组装在时间和空间上是高度有序的。与肌动蛋白类似，细胞内游离的微管蛋白亚基的浓度远高于微管组装所需的临界浓度，但由于 stathmin (微管去稳定蛋白，一种微管蛋白结合蛋白) 将游离的微管蛋白亚基成对地结合在一起 (一个 stathmin 结合两个  $\alpha/\beta$ -微管蛋白二聚体)，从而阻碍了它们参与微管的组装。stathmin 与微管蛋白亚基的结合受其本身磷酸化状态的调控。磷酸化的 stathmin 失去了与微管蛋白结合的活性，细胞内微管蛋白亚基的有

效浓度因此而提高,从而加快了微管末端的组装速度,降低了微管的动态不稳定性;相反, stathmin 去磷酸化将降低微管蛋白亚基的有效浓度,使微管末端的组装速度降低,而组装后的 $\beta$ -微管蛋白水解 GTP 的速率不变,因而 stathmin 的活性提高将增加微管的动态不稳定性,细胞可以通过调节局部 stathmin 的磷酸化状态来调控微管的组装及其分布。

在有丝分裂期过程中,微管组装和去组装受细胞内一些因子的调控,使微管的分布状态发生显著变化。在有丝分裂前期,细胞质微管解聚,游离的微管蛋白亚基被用于组装纺锤体微管;在分裂末期,这一过程发生逆转。正如用荧光显微镜观察体外培养活细胞时所见到的那样,细胞内的微管组装通常都起源于某一特殊位点,如间期、G<sub>0</sub>期细胞内的微管,以及有丝分裂时的纺锤体微管大都起源于中心体(centrosome);纤毛和鞭毛内部的微管起源于基体(basal body)。在间期细胞或终末分化细胞内,微管的组装通常从中心体部位开始,并随着微管蛋白亚基的不断加入而得以延伸,但并非所有的微管都能持续不断地进行组装。在同一细胞内总能见到一些微管在延伸,而另一些微管在缩短甚至全部解聚。刚刚从一根微管解聚下来的微管蛋白亚基在细胞质基质内将 $\beta$ -微管蛋白上的 GDP 换成 GTP 后有可能很快就被组装到另一根微管的游离端。这种快速组装和去组装的行为对于微管行使其功能极为重要。有时延伸中的微管的游离端与某些蛋白质或细胞结构结合而不再进行组装或去组装,使该微管处于相对稳定状态。

## (二) 作用于微管的特异性药物

一些药物如秋水仙素(colchicine)、诺考达唑(nocodazole)和紫杉醇(taxol)等可以影响细胞内微管的组装和去组装。用低浓度的秋水仙素处理细胞,可立即破坏细胞内的微管或纺锤体的结构。秋水仙素可以与微管蛋白亚基结合,而当结合秋水仙素的微管蛋白亚基组装到微管末端后,其他的微管蛋白亚基就很难再在该处进行组装,但秋水仙素在微管末端的结合并不影响该微管的去组装,从而导致细胞内微管网络的解体。紫杉醇的作用与秋水仙素相反,当紫杉醇与微管结合后可以阻止微管的去组装,但不影响微管末端的组装。结果是微管不停地组装,而不会解聚,其结果同样使细胞周期的运行被终止。临床上将一些影响微管组装和去组装的药物用于肿瘤的治疗就是基于这种机制。

微管组装和去组装的动态行为还与温度有关。在

通常情况下,当其他条件合适,环境温度高于 20℃时微管蛋白亚基可以组装成微管,而当温度较低时微管会发生去组装。但也有些微管在低温状态下仍然保持稳定,这些微管被称为冷稳定性微管。

## 三、微管组织中心

微管的体外组装可以分为成核和延伸两个阶段。在活细胞内,能够起始微管的成核作用,并使之延伸的细胞结构称为微管组织中心(microtubule organizing center, MTOC)。除中心体以外,细胞内起微管组织中心作用的类似结构还有位于纤毛和鞭毛基部的基体等细胞器。

### (一) 中心体

当用低温或者能使微管去组装的药物如秋水仙素、诺考达唑等处理体外培养的动物细胞时,常可以导致微管结构的解体。当温度恢复到 20℃以上,并从培养液中除去影响微管组装的药物后,再用抗微管蛋白的抗体染色,可以清楚地观察到大部分微管从细胞核附近的中心体周围重新长出,并渐渐伸展到细胞的边缘(图 10-22)。

动物细胞的间期微管通常都是从中心体开始装配的。中心体含有一对桶状的中心粒,它们彼此垂直分布,外面被无定形的中心粒外周物质所包围。中心粒是一个直径 0.2  $\mu\text{m}$ ,长 0.4  $\mu\text{m}$ 的桶状结构。每个中心粒含有 9 组等间距的三联体微管。在每组三联体微管中,只有一根微管在结构上是完整的,含有 13 根原纤丝,称为 A 管,另外的两根微管为不完整微管,依次称为 B 管和 C 管。用电子显微镜观察中心粒外围的致密物质,发现微管并不是直接起源于中心粒,而是在中心粒外周物质区域成核(图 10-23)。

在细胞内并不是所有的微管都与中心体相连。在神经细胞轴突内,大部分微管起源于轴突内的某一位置,尽管它们的正极都指向轴突的顶端,但轴突微管并不连接到细胞体内的中心体上。在树突内部,约有 50% 的微管的正极指向细胞体,它们显然不可能与中心体相连。另外一个特殊的例子是小鼠的卵母细胞,该细胞似乎并不含有中心体,但仍然能组装像减数分裂纺锤体那样复杂的微管结构。高等植物细胞缺少中心粒结构。在某些植物的间期细胞内,与微管组织中心相关的物质似乎存在于细胞核的周围,如在植物的胚乳细胞中,微管好像是起源于核膜的外表面。植物细胞有丝分裂纺锤体

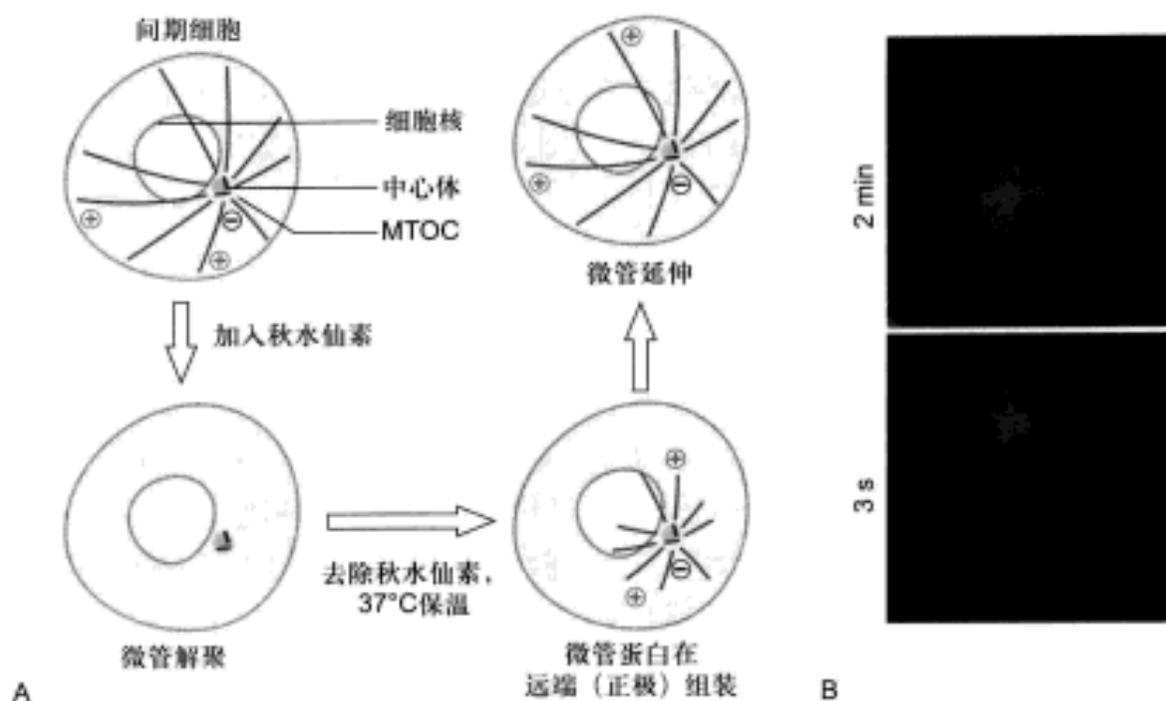


图 10-22 中心体的微管成核作用

A. 中心体微管的解聚与重新组装模式图。向细胞培养体系中加入和除去秋水仙素或者用 0 °C 处理后再放回到 37 °C 培养的方法可以诱导微管的去组装和重新组装。在这个实验中，微管蛋白的组装和去组装均发生在微管的正极。B. 体外培养的成纤维细胞用 0.5 μg/mL 乙酰甲基秋水仙素处理 1 h，使细胞内的微管解聚，然后在正常培养液内生长 30 s 或更长时间，用抗微管蛋白的抗体染色后的荧光图片显示，从中心体新组装的微管已经开始向各个方向生长。（B 图由伍启熹和何润生博士惠赠）

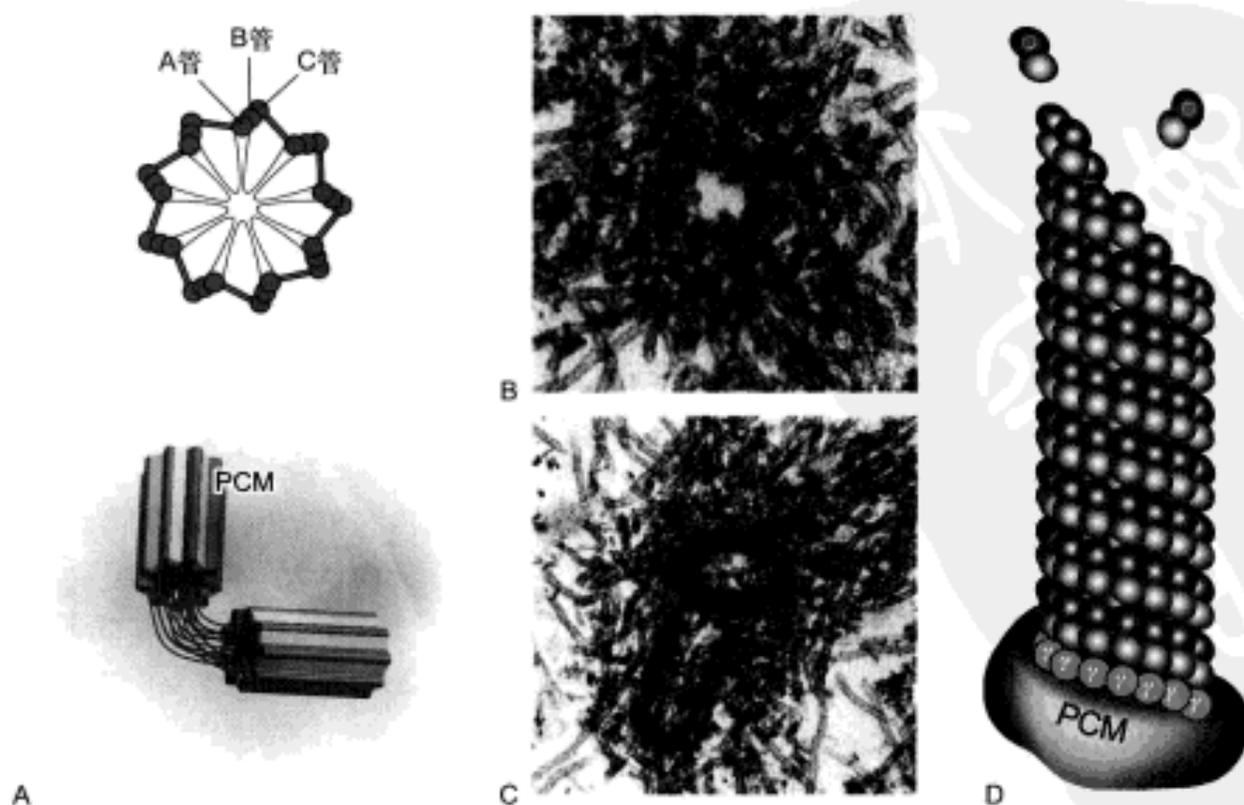


图 10-23 中心体的结构及微管的成核

A. 中心体结构示意图，显示成对的中心粒以及中心体周围物质 [PCM]。B. 中心粒横切面的电镜照片，显示 9 组微管三联体结构呈风车状排列。C. 显示一对垂直分布的中心粒及其起源于外周物质的微管。D. 微管在中心体上的组装过程。微管的组装起始于 PCM 上的  $\gamma$ -微管蛋白环状复合物。该环状复合物决定了微管横切面上原纤丝的数目以及微管的极性。（B、C 图由伍启熹和滕俊琳博士惠赠）

的微管从细胞的两极开始组装，然而，那里并不存在中心体。

20世纪80年代，在酵母的温度敏感突变体内发现了另外一种类型的微管蛋白，称为 $\gamma$ -微管蛋白。 $\gamma$ -微管蛋白在细胞内的含量极微，定位于细胞中心体的无定形致密周质中。免疫电镜观察结果显示， $\gamma$ -微管蛋白在中心体的周质中形成直径为24 nm的环状结构。该环状结构在体外可以诱导微管的成核与组装。根据这些结果，人们提出了微管在中心体部位的成核模型（图10-23D）。该模型认为13个 $\gamma$ -微管蛋白在中心体的无定形致密周质中呈螺旋状排列形成一个开放的环状复合物。微管组装时，游离的 $\alpha/\beta$ -微管蛋白二聚体有序地加到 $\gamma$ -微管蛋白构成的环上，而且 $\gamma$ -微管蛋白只与二聚体中的 $\alpha$ -微管蛋白结合。这样组装起来的微管在靠近中心体的一端为负极端，而另一端为正极端，并且一定是 $\beta$ -微管蛋白。

## （二）基体和其他微管组织中心

鞭毛和纤毛内部的微管起源于其基部称为基体的结构。基体在结构上与中心粒（图10-23）基本一致，其外围由9组三联体微管构成，A管为完全微管，B管和C管为不完全微管。A管和B管跨过纤毛板与纤毛轴丝中相应的亚纤维相连，C管终止于纤毛板或基板附近。中心粒和基体是同源结构，在某些时候可以相互转变。例如，精子鞭毛内部的微管起源于从中心粒衍生而来的基体，该基体在进入卵细胞后在受精卵第一次有丝分裂过程中又形成中心粒。中心粒和基体都具有自我复制的性质，一般情况下，新的中心粒是由原来的中心粒在S期复制而来。在某些细胞中，中心粒能自我发生。

最近的一些文献显示，高尔基体的反面膜囊区域也有组织微管组装的能力。在一些细胞中似乎存在一种机制，可以从微管的末端切下一小段微管来，这种被切下来的小段微管的命运并不清楚，有可能作为新的微管的生长点。

## 四、微管的动力学性质

微管的稳定性与其所结合的细胞结构组分以及细胞的生理状态相关。对微管动力学特征的研究通常采用体外培养细胞体系。当细胞处于正常的生长状态时，微管的组装和去组装并不是同步进行的。在同一个细胞中往往可以观察到一部分微管正在组装延伸，而另一部分

微管却处在解聚过程中。有时整根微管解聚后又从中心体的同一个 $\gamma$ -微管蛋白环状复合体开始重新组装，甚至在同一根微管的末端，其组装和去组装也可以反复进行。微管所表现的这种动力学不稳定性通常都发生在正极或中心体的远端。当微管的游离端与某些细胞结构结合后整根微管就会变得相对稳定。

不同状态的微管其稳定性差异很大。间期细胞源于中心体的微管和有丝分裂期的纺锤体微管时刻处于组装和去组装的动态平衡中，对各种理化因素如温度、流体压力、钙离子浓度等的变化，以及一些化学药物如秋水仙素、长春花碱等都相当敏感。在纤毛或鞭毛内部源于基体的微管则由于微管蛋白亚基中的一些特定的氨基酸残基被乙酰化修饰而相对稳定。微管结合蛋白（MAP）与微管表面结合也能使微管的稳定性增强，如存在于神经元突起中的微管，由于MAP的作用而使多根微管被交联成束，从而也显得相当稳定。

在神经元分化过程中，神经元突起从细胞体向外生长。在生长中的轴突和树突内部的微管呈束状排列。微管束在生长锥部位稍显分散并伸展至片状伪足的中央区，而在片状伪足的外围区的细胞骨架组分主要是微丝。微丝在丝状伪足的基部呈网状结构，而在丝状伪足的内部则排列成束状。当生长锥接收引导信号向某一方生长时，该方向的丝状伪足向前延伸，而其他方向上的丝状伪足因内部微丝束的解体而缩回。片状伪足因与突起生长方向相同的微管继续组装而向前延伸，其他方向上的微管则解聚缩回至生长锥的基部，再向突起的生长方向重新组装延伸。

## 五、微管结合蛋白对微管网络结构的调节

如前所述，利用微管结构对温度变化的敏感性，再结合差速离心技术可以将微管蛋白纯化。但即使是进行多次组装和去组装的循环，仍然有一些其他的蛋白质被保留在实验体系中，并始终伴随着微管的组装和去组装而存在，人们将这类蛋白质称之为微管结合蛋白（microtubule associated protein, MAP）。根据MAP在电泳时所显示相对分子质量的不同，依次命名为MAP1、MAP2、MAP3、MAP4、tau蛋白等。由于类似的研究大多以神经组织为对象，因此在已经鉴定的MAP中，有相当部分仅在神经细胞系统中表达。微管结合蛋白通常都是单基因编码的，具有一个或数个带正电荷的微管结合域（microtubule binding domain），该结构域与带负

电荷的（微管蛋白的C端所形成的）微管表面相互作用，具有稳定微管的作用。微管结合蛋白其余的结构域突出于微管表面与相邻的微管或细胞结构相作用，对微管网络的结构和功能进行调节。

在微管结合蛋白中，MAP2和tau是研究得较为清楚的组分。MAP2存在于神经元的胞体和树突，而tau则存在于轴突。在MAP2和tau的C端均有3-4个由18个氨基酸残基构成的微管结合域。与微管结合后，其N端突出于微管表面，并在相邻的微管之间形成横桥（图10-24）。

为了探讨微管结合蛋白（MAP2和tau）在细胞内的定位及其与微管网络结构的关系，J. Chen等（1992）用编码MAP2和tau的cDNA转染体外培养的Sf9细胞，这些基因在Sf9细胞内表达后，原本呈圆形的昆

虫卵巢细胞长出了类似神经元树突（MAP2）和轴突（tau）样的细胞突起。电镜观察结果显示，由于MAP2的表达，在突起内形成了规则排列的微管束。由MAP2诱导产生的微管束内相邻微管间的距离与树突内部微管束的结构相似，而由tau诱导产生的微管束内相邻微管间的距离与轴突内部微管束的结构相似。MAP2和tau蛋白的分子结构基本相似，所不同的是N端突出区域，MAP2有1820个氨基酸残基，而tau蛋白只含有380个氨基酸残基。正是由于MAP2和tau蛋白的N端，而不是以往认为的C端分别决定了树突和轴突内微管束相邻微管间的距离（图10-24）。MAP2或tau蛋白基因剔除小鼠的神经元树突或轴突内部相邻微管间的横桥明显减少，虽然对神经元突起生长的影响并不是很大，但MAP1B/MAP2或MAP1B/tau的双基因剔除小鼠的神经突起的生长明显受阻，表明MAP1B和MAP2/tau蛋白之间在功能上存在互补作用。

MAP与微管的结合有助于提高微管的稳定性，如果用微管解聚药物如秋水仙素或诺考达唑处理间期细胞，可以阻止微管的组装，但并不影响微管的解聚。在神经元的树突或轴突内部，这些药物同样能与微管蛋白二聚体结合而影响微管的组装，但神经元突起内部的微管似乎并不那么容易解聚，原因是大量的MAP与微管结合，从而发挥了稳定微管的作用。

## 六、微管对细胞结构的组织作用

真核细胞内部是高度区室化的结构。包括蛋白质和mRNA在内的各种生物大分子、内质网、高尔基体等细胞器在细胞内通常都有特定的空间分布，而线粒体总是被运往细胞内能量需求较大的部位发挥作用。当用秋水仙素等药物处理体外培养的细胞时，微管很快就解聚，细胞变圆。与此相应的变化是内质网缩回到细胞核周围，高尔基体解体成小的膜泡样结构分散在细胞质内，

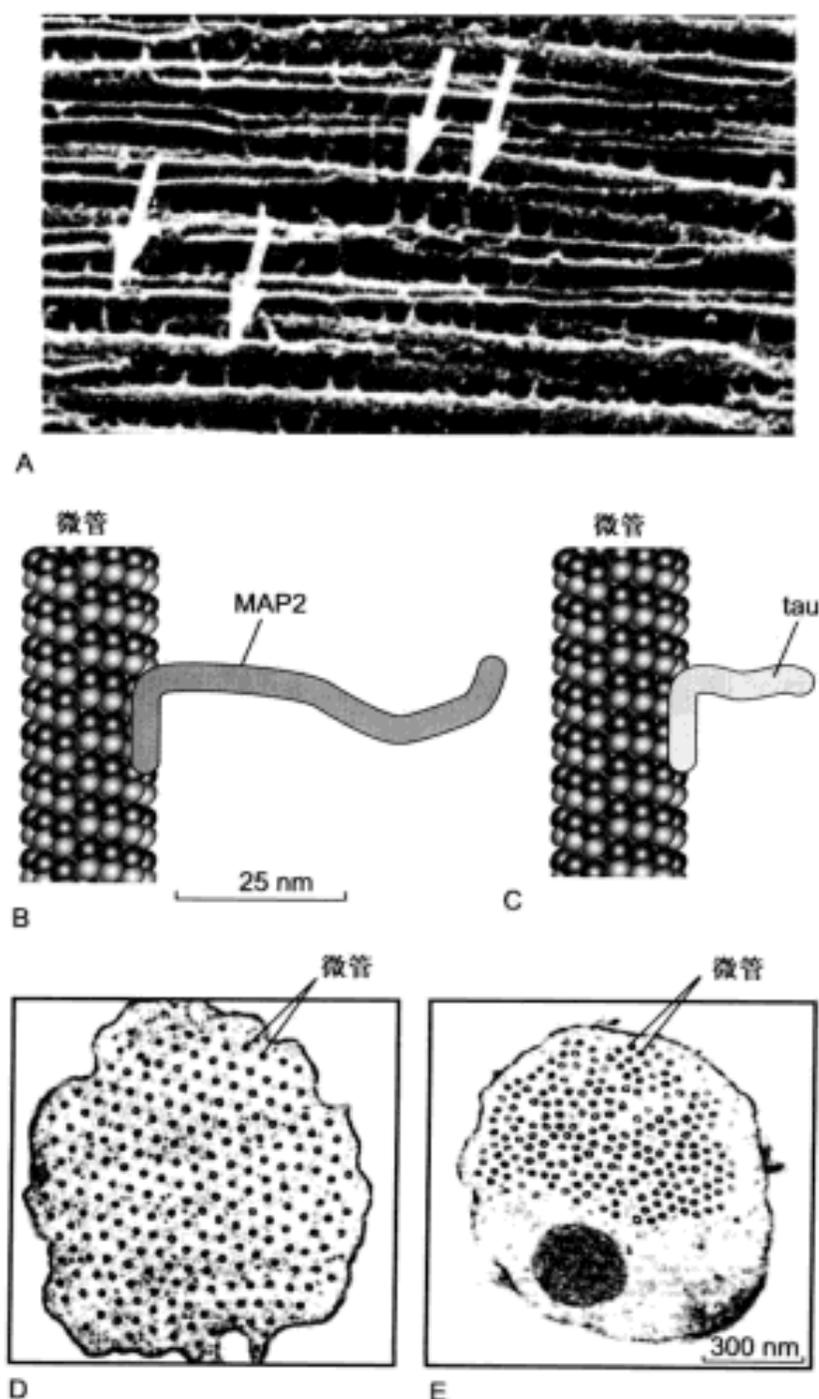


图10-24 MAP2和tau蛋白诱导产生的微管束的结构

A. 微管蛋白和tau在体外共组装，tau蛋白在相邻的微管之间形成20-30 nm的横桥（箭头所指）。B和C. MAP2和tau蛋白的C端微管结合域与微管表面结合，其N端突出于微管表面。D. 由MAP2诱导产生的细胞突起内的微管束结构，相邻微管之间的距离为60-70 nm，与树突内微管束的结构相似。E. 由tau蛋白诱导产生的细胞突起内的微管束结构，相邻微管之间的距离为20-30 nm，与轴突内微管束的结构相似。（A、D、E图由陈建国博士等提供）

细胞内依赖于微管的物质运输系统全面瘫痪，那些处于M期的细胞停止分裂。一旦阻止微管组装的药物被除去，微管又从中心体部位重新组装。随着微管向细胞周缘的伸展，内质网也随之向外侧铺展，高尔基体重新组装。对于体外培养的神经元，微管的解体将导致正在延伸中的神经元突起停止生长，甚至缩回细胞体。显然微管与细胞器的分布以及细胞的形态发生与维持有很大的关系。

对于神经元这样的终末分化细胞，在细胞分化过程中随着轴突和树突的生长，形成一个高度极性的结构，大量的MAP与微管表面结合，将微管交联成束状排列。相对于处于分裂周期中的细胞来说，神经元突起内的微管要稳定得多。在早老性痴呆患者的脑神经元内，tau蛋白的过度磷酸化使其很容易从微管上解离下来形成神经元纤维缠结。失去tau蛋白的微管其稳定性降低，导致细胞内部微管结构紊乱，依赖于微管的物质运输系统受损，最终导致神经元的死亡。

在神经细胞的轴突内部，微管的正极在远离细胞体的一端。微管的这种极性排列方式与轴突内部的物质运输密切相关。由于轴突缺乏合成蛋白质的能力，轴突内所需要的蛋白质需要从细胞体合成后运入。一些细胞器，如线粒体等也是沿着微管在轴突内运输的。对于另外一些极性的细胞，如上皮细胞，在细胞的基底部和顶端，细胞器和细胞的蛋白质组分有着完全不同的分布方式。物质沿着微管定向转移为细胞内各种细胞器和生物大分子的不对称分布提供了可能。

## 七、细胞内依赖于微管的物质运输

真核细胞内一些生物大分子的合成部位与行使功能部位往往是不同的，因此必然存在精细的物质转运系统和分选机制。应用快速冷冻深度蚀刻技术观察轴突内部的结构时，在微管和一些膜性细胞器之间常常会看到一些横桥样结构（图10-25）。在光学显微镜下观察活细胞，可以看到许多细胞器或膜状小泡在细胞质或轴突内部沿微管作定向运动。甚至在同一根微管上可以观察到一些膜性细胞器向微管的一端运动，而另一些则向相反的方向移动。如果用破坏微管或抑制ATP酶活性的药物处理细胞，可以使这种依赖于微管的膜泡运输过程停止。可见，这种依赖于微管的膜泡运输是个需能的靶向过程。依赖于微管的马达蛋白主要有驱动蛋白(kinesin)和胞质动力蛋白(cytoplasmic dynein, CyDn)，

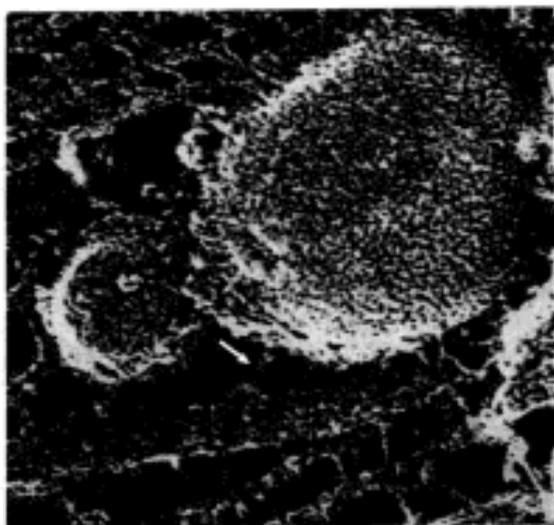


图10-25 快速冷冻深度蚀刻电镜图像显示在轴突内部的微管和膜性细胞器之间有马达蛋白构成的横桥相连  
箭头所指为横桥。(Hirokawa 博士惠赠)

它们能将储存于ATP中的化学能转化成机械能，沿微管运输货物。

### (一) 驱动蛋白

#### 1. 驱动蛋白的分子结构及其功能

通常所说驱动蛋白是指R. D. Vale (1985)等在鱿鱼神经元巨大的轴突内分离到的、能沿微管移动，但不同于肌球蛋白和动力蛋白的马达分子，被命名为kinesin (即kinesin-1)。该蛋白能运载膜性细胞器沿着微管向轴突的末梢移动。驱动蛋白在结构上与II型肌球蛋白相似，由2条具有马达结构域的重链(kinesin heavy chain, KHC)和2条与重链的尾部结合、具有货物结合功能的轻链(kinesin light chain, KLC)组成。用低角度旋转投影(low angle rotary shadowing)电子显微技术观察的结果显示，驱动蛋白分子是一条长80 nm的杆状结构，头部一端有两个呈球状的马达结构域，直径约10 nm，另一端是重链和轻链组成的扇形尾端，中间是重链组成的杆状区(图10-26)。球状的头部具有ATP结合位点和微管结合位点。继后，在其他多种生物如酵母、曲霉、昆虫以及小鼠和人的细胞中也陆续发现了编码类似驱动蛋白的基因及其表达产物。人类基因组中共有45个驱动蛋白基因，马达结构域是该家族成员的一个共有元件，在进化上非常保守。

根据驱动蛋白分子马达结构域系统演化方面的信息和功能特征，驱动蛋白超家族(kinesin superfamily proteins, KIFs)的成员被分成14个驱动蛋白家族和一个暂时未成组的“orphan kinesin”，用阿拉伯数字1-14标记各个驱动蛋白家族，各个蛋白家族中的亚族则用附加

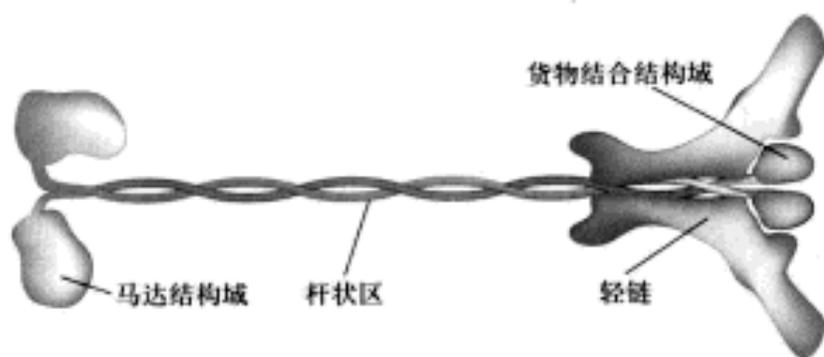


图 10-26 驱动蛋白分子重链和轻链结构模式图

驱动蛋白的重链二聚体和 2 条轻链构成同源四聚体。球状的马达结构域位于左侧（重链的 N 端），从左向右分别是连接马达结构域的颈部、杆状区和由重链的 C 端及轻链构成的扇形尾部。

的大写英文字母表示如 kinesin-14A（驱动蛋白 14A）和 kinesin-14B（驱动蛋白 14B）（表 10-1）。

驱动蛋白的行为与其马达结构域在多肽链中的位置有关，大部分驱动蛋白家族成员的马达结构域在肽链的 N 端（N-驱动蛋白），如驱动蛋白 -1~12，它们从微管的负极向正极移动。另外一些的马达结构域位于多肽链的中部（M-驱动蛋白），如驱动蛋白 -13 的 3 个成员，它们结合在微管的正极端或负极端，使微管处于不稳定状态，如有丝分裂时动粒微管两端的解聚。还有一些的马达结构域位于肽链的 C 端（C-驱动蛋白），如驱动蛋白 14 的 3 个成员，这类驱动蛋白的运动方向与 N-驱动蛋白相反，它们从微管的正极端向负极

端移动（图 10-27）。驱动蛋白 8 和驱动蛋白 14 家族的成员既能沿微管向正极端移动，还具有调节微管解聚的能力。驱动蛋白 5 家族的成员可以通过其杆状区形成反向四聚体，在极性相反的两根相邻的微管（如纺锤体极微管）之间滑动（见图 10-35D）。

大部分驱动蛋白可通过多肽链上一段卷曲螺旋相互作用而形成同源二聚体（如驱动蛋白 4、6、7、8、10、12、13 和 14 家族）。驱动蛋白 1 除了有两条重链（KHC）以外，在 C 端还有 2 条轻链（KLC）共同构成货物结合域。驱动蛋白 2 家族可分成 2 个亚族（KIF3 和 KIF17），由这 2 个亚族的成员以及 1 个驱动蛋白结合蛋白一起构成异三聚体（KIF3A-KIF3B-KAP3）或同源二聚体（KIF17）。驱动蛋白 3 家族的成员以单体或同源二聚体的形成存在，而驱动蛋白 5 家族的成员为同源四聚体。驱动蛋白 1~3 家族的成员主要与膜性细胞器和大分子复合物的运输相关，而其他家族的成员主要作用在于调节微管的动态不稳定性以及微管网络的结构。

## 2. 驱动蛋白沿微管运动的分子机制

驱动蛋白的马达结构域具有两个重要的功能位点：ATP 结合位点和微管结合位点。与肌球蛋白的马达结构域（850 个氨基酸残基）相比，驱动蛋白的马达结构域（350 个氨基酸残基）显得很小巧。虽然两者在氨基酸序列上没有同源性，但它们的 ATP 结合位点非常相似，

表 10-1 驱动蛋白家族成员的结构与功能

驱动蛋白家族	分子结构模式图	功能	亚基组成及主要成员
kinesin-1		膜泡、细胞器和 mRNA 运输	2 条重链和 2 条轻链，如 KIF5, KHC 和 UNC-116, Bmkinesin-1 等
kinesin-2		膜泡、黑色素体和鞭毛内运输	异源三聚体，如 KIF3, KLP64D, KLP68D, KRP85, KRP95 和 FLA10 同源二聚体：KIF17, OSM-3 和 Kin5
kinesin-3		膜泡运输	单体，如 KIF1A, KIF1B, KIF13, KIF14, KIF16 和 KIF28
kinesin-4		染色体定位	同源二聚体，如 KIF4, Chromokinesin 和 KLP3A 等
kinesin-5		纺锤体极的分离和双极性确立	KIF11, Eg5, KLP61F, BimC, BMK-1(Ce), Cin8, Kip1 和 Cut7 等
kinesin-13		纠正动粒微管错误，染色体分离	双链二聚体，如 KIF2A, KIF2B, KIF2C, KLP10A, KLP59C, KLP59D, KLP7, KIF24 和 Bmkinesin-13
kinesin-14		纺锤体极的组织，货物运输	KIFC1, KIFC2, KIFC3, KLP3, Bmkinesin-14A 和许多植物细胞中特有的种类

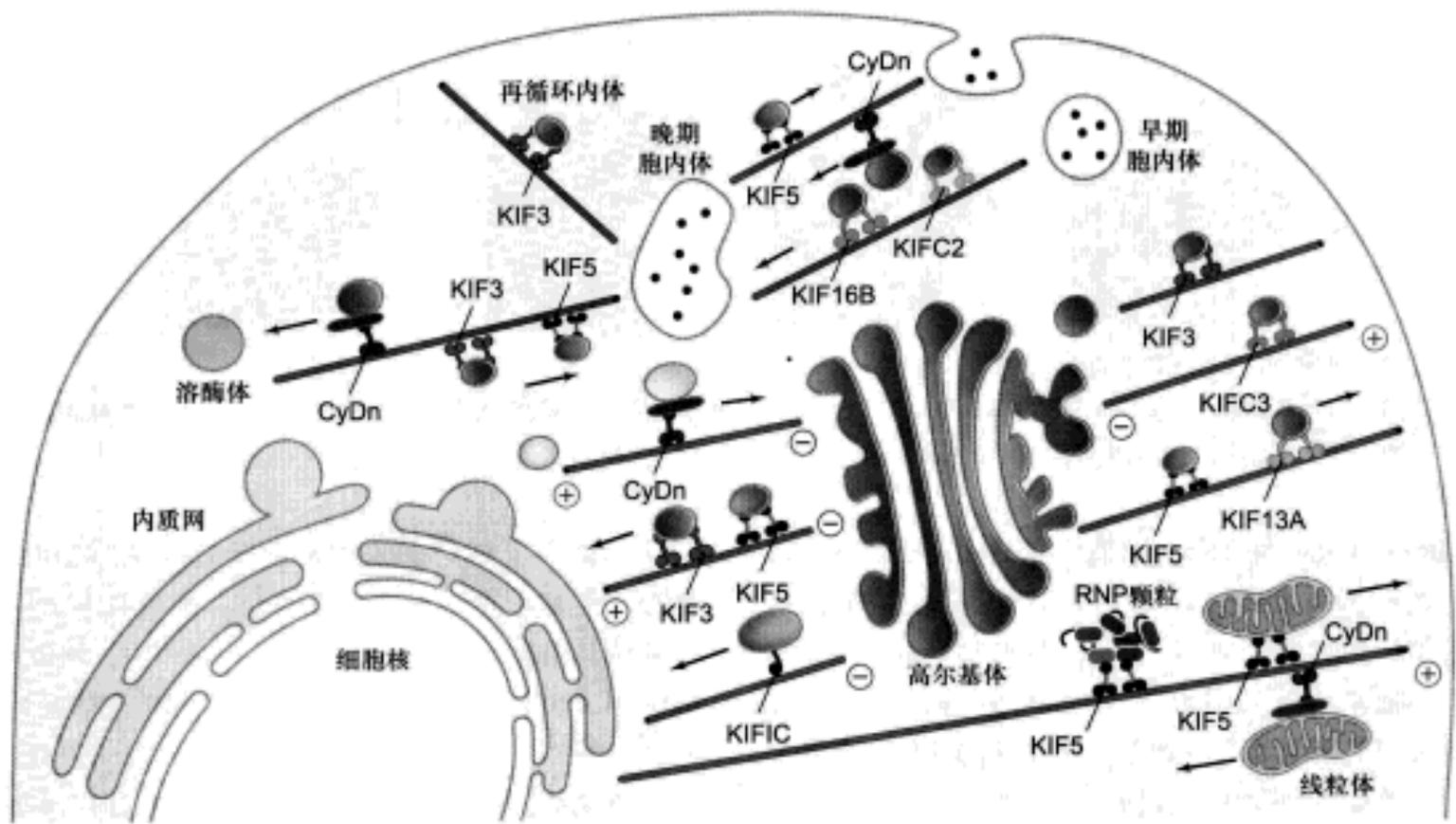


图 10-27 细胞内依赖于微管的物质运输系统

胞质动力蛋白介导内质网至高尔基体之间、细胞吞泡至细胞内部的膜泡运输，而驱动蛋白家族的成员介导从高尔基体反面膜囊出芽小泡的运输。

两种马达结构域在大小和功能上的差异主要表现在细胞骨架结合部位和动力转换装置上。

驱动蛋白沿微管运动的分子模型有两种：一种是“步行” (hand over hand) 模型，另一种是“尺蠖” (inchworm) 爬行模型。步行模型认为：驱动蛋白的两个球状头部交替向前，每水解一个 ATP 分子，落在后面的那个马达结构域将向前移动两倍的步距，即 16 nm。而原来领先的那个头部则在下一个循环时再向前移动。尺蠖爬行模型认为：驱动蛋白两个头部中的一个始终向前，另一个永远在后，每步移动 8 nm。虽然，过去近 20 年的研究积累了大量生物化学和结构生物学的证据，特别是近年来发展起来的单分子行为分析，为研究驱动蛋白两个马达结构域是怎样协调向前运动的问题提供了有效的方法，但实验结果很不一致，有些结果支持步行模型，但也不乏与尺蠖爬行模型相吻合的结果。这里以传统的驱动蛋白为例，着重介绍被大多数学者承认的步行模型。

驱动蛋白的运动主要涉及发生在两个马达结构域上的 ATP 的结合、水解和 ADP 的释放以及与自身构象变化相偶联等机械化学循环过程。在这一过程中，驱动蛋白的两个头部交替与微管相结合，以确保在移动过程中不会从微管上掉下来。马达结构域每水解一个 ATP 分

子，整个分子就向前移动一步（2 个微管蛋白亚基的长度，约 8 nm）。当驱动蛋白沿微管行走时，两个马达结构域中位于前面的那个（L）与 ATP 结合时导致驱动蛋白发生构象变化，该马达结构域与微管紧密结合，并使后面的马达结构域（T）向前移动，越过原来位于前面的马达结构域（L）至微管正极一侧的另一个新的结合位点（共移动了 16 nm）。此时，处于前面的一个马达结构域（原来处于后面）释放 ADP，处于后面的那个（原来处于前面）马达结构域水解 ATP，使得驱动蛋白二聚体处于开始时的状态，但两个头部互换了位置，整个分子则向微管的正极端移动了一步，即 2 个微管蛋白亚基的长度。在这一循环的运行过程中，两个马达结构域与微管之间交替结合，驱动蛋白的每个头部有一半以上的时间与微管处于结合状态，另外的时间与微管处于分离状态（图 10-28）。相比之下，II 型肌球蛋白沿微丝移动时，同样是 ATP 的水解与马达结构域的构象变化相偶联，但在每个循环开始时，不带 ATP 的肌球蛋白的头部以僵直的构象与微丝紧密结合，当 ATP 与肌球蛋白头部结合时，马上引起肌球蛋白与肌动蛋白结合处构象的变化，使头部与微丝的亲和力降低。但头部脱离微丝时，ATP 水解，引发较大的构象变化，使肌球蛋

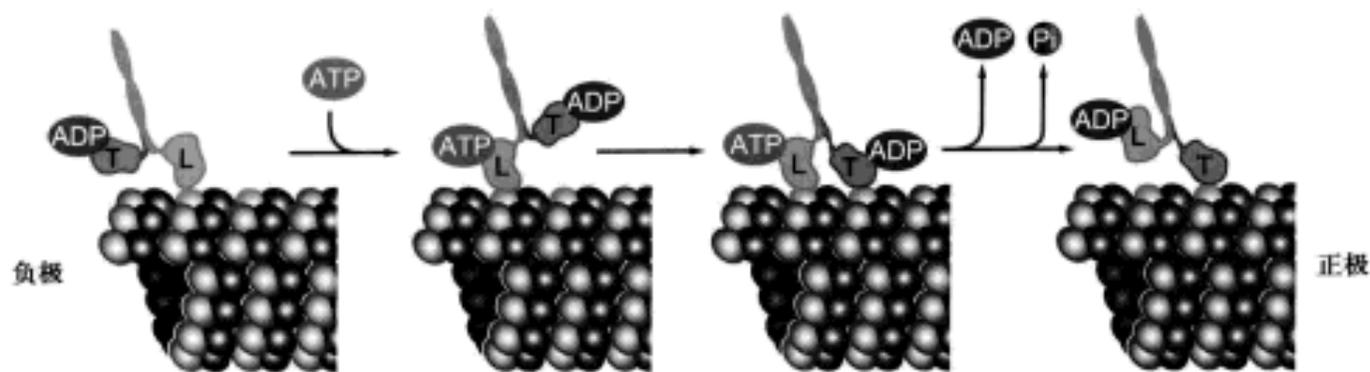


图 10-28 驱动蛋白沿微管运动的步行模型

驱动蛋白 1 有两条重链，其头部结构域（用 L 和 T 表示它们开始时所处的位置）伴随着 ATP 的结合、水解和 Pi 及 ADP 的释放而在微管表面行走。在整个过程中，两个头部结构域至少有一个与微管处于结合状态。

白头部的构象几乎处于竖直状态。肌球蛋白头部和微丝上新的肌动蛋白亚基的微弱结合导致无机磷酸的释放，这一过程使头部恢复原来的构象，ADP 被释放，头部与肌动蛋白紧密结合，从而回到初始状态。新一轮 ATP 与肌球蛋白头部的结合导致下一个循环的开始。在这个循环中，肌球蛋白的头部与微丝结合的时间仅占循环所需总时间的 5%。

引发驱动蛋白分子沿微管持续向前移动的原因有两个：第一，在每个驱动蛋白分子中两个马达结构域的化学机械循环是互相协调的，因此在一个马达结构域还没有与微管结合之前，另一个马达结构域不会从微管上掉下来，从而保证了步行的连续性，即马达分子和所运送的“货物”或细胞器不会脱离微管。第二，驱动蛋白的马达结构域在 ATP 酶循环的大部分时间里都与微管紧密结合。

肌球蛋白不具备沿微丝持续向前运动的能力，但却能提高其整体移动的速度，在由肌球蛋白组成的巨大复合物（如粗肌丝）中，大量规则排列的肌球蛋白头部与相同的微丝相互作用，复合物中肌球蛋白头部的协同作用使得在单一循环时间内，它们能将微丝移动相当 20 步的总距离，而驱动蛋白只能沿微管移动 2 步。这样，即便是两者在水解 ATP 速度和分子步距上相当，但肌球蛋白却能以比驱动蛋白更快的速度沿细胞骨架移动。

货物，由一个相对分子质量接近  $1.5 \times 10^6$  的巨大蛋白复合物组成，含多个多肽亚单位：两条具有 ATP 酶活性的使其沿微管移动的重链（约  $5.2 \times 10^5$ ），两条中间链（约  $7.4 \times 10^4$ ），四条中间轻链（ $3.3 \times 10^4 - 5.9 \times 10^4$ ）和一些轻链（ $1.0 \times 10^4 - 1.4 \times 10^4$ ）（图 10-29，图 10-30）。细胞质动力蛋白与被称为动力蛋白激活蛋白（dynactin）的蛋白复合物（含 p150<sup>Glued</sup>，p62，dynamitin，Arp1，CAPZa，CAPZb，p27 和 p24）密切相关。动力蛋白激活蛋白调节动力蛋白活性和动力蛋白与其“货物”的结合能力。与驱动蛋白和肌球蛋白超家族的多样性相比，细胞质动力蛋白只有两个重链家族成员，Dync1h1 和 Dync1h2。Dync1h1 主要担负向微管的负极端的胞质转运，Dync1h2 主要在鞭毛内的反向转运中起作用。Dync1h1 可通过直接结合或动力蛋白亚基的选择性组装（包括多条中间轻链、中间链和轻链）来与多种货物相连，而驱动蛋白和肌球蛋白则演化出大量的家族成员，

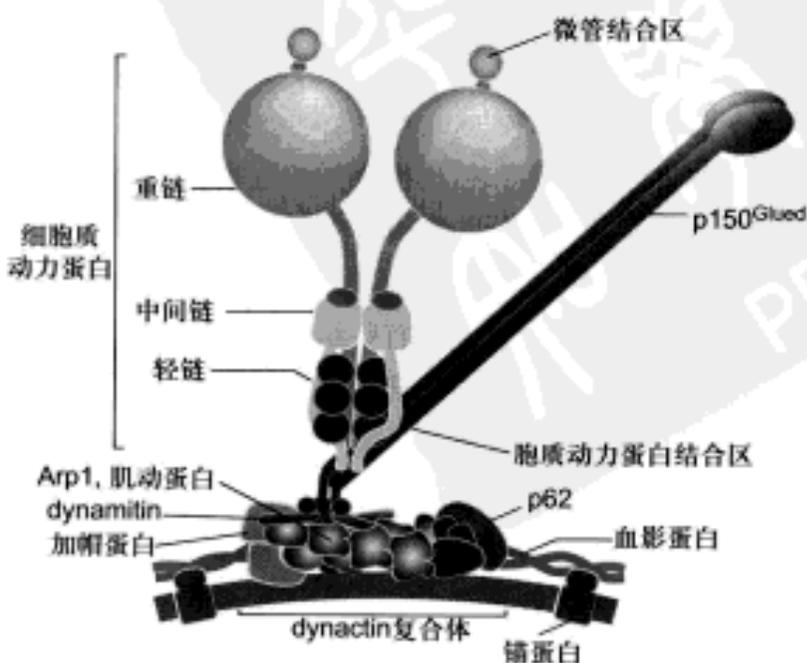


图 10-29 细胞质动力蛋白结构示意图

## (二) 细胞质动力蛋白及其功能

动力蛋白超家族由 2 组蛋白质组成：细胞质动力蛋白（cytoplasmic dynein）和轴丝动力蛋白（axonemal dynein）。后者也称为纤毛或鞭毛动力蛋白。动力蛋白的重链同样含有 ATP 结合部位和微管结合部位，通过水解 ATP 沿微管运动，但动力蛋白和驱动蛋白在分子起源上没有同源性。动力蛋白是已知马达蛋白中最大、移动速度最快的成员。细胞质动力蛋白沿细胞质微管转运

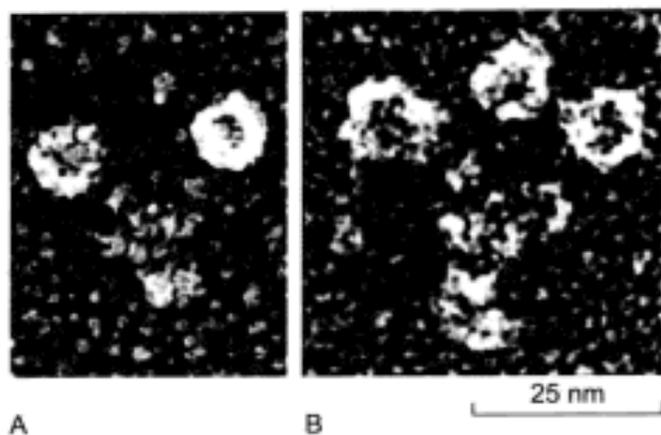


图 10-30 细胞质动力蛋白 (A, 2 个头部) 和轴丝动力蛋白 (B, 3 个头部) 分子的马达结构域 (John Heuser 博士惠赠)

并利用它们自身的尾部结构域 (或少数轻链) 识别并结合货物。

轴丝动力蛋白的种类远多于细胞质动力蛋白, 结构和组成成分也相当复杂。根据动力蛋白在轴丝上的位置, 可以将其分为内侧动力蛋白臂 (inner dynein arm) 和外侧动力蛋白臂 (outer dynein arm)。不同类型的轴丝动力蛋白所含的重链 (马达结构域) 数量也不同, 构成外侧臂的动力蛋白具有 2 个或 3 个马达结构域 (图 10-30), 而在 7 个已知的内侧臂动力蛋白成员中, 有 1 个含有 2 个马达结构域, 其他 6 个只有 1 个马达结构域。

细胞质动力蛋白被认为与胞内体/溶酶体、高尔基体及其他一些膜泡的运输, 动粒和有丝分裂纺锤体的定位, 及细胞分裂后期染色体的分离等事件密切相关。将抗动力蛋白的抗体注入有丝分裂期的细胞, 可诱导纺锤体结构的崩解。剔除细胞质动力蛋白重链基因 ( $cDHC^{-/-}$ ) 的小鼠在胚胎早期便死亡。因此, 可以认为  $cDHC$  是高等真核生物生长和发育所必需的。 $cDHC^{-/-}$  胚胎细胞内高尔基体膜囊片段化, 并均匀分散在整个细胞质中, 而不像正常细胞内那样聚集在细胞核周围。在  $cDHC^{-/-}$  细胞中, dynactin 复合体中的 Arp1 和 p150<sup>Glued</sup> 以及胞内体/溶酶体等细胞器都分散在整个细胞质中, 与正常细胞内的分布状况明显不同, 表明  $cDHC$  是高尔基复合体的形成和正常定位所必需的。有趣的是在  $cDHC^{-/-}$  细胞中“片段化”的高尔基体膜囊以及溶酶体仍附着在微管上。显然除  $cDHC$  外, 还存在其他的蛋白质分子参与高尔基体、溶酶体等细胞器与微管的相互作用。

## 八、纤毛和鞭毛的结构与功能

纤毛 (cilia) 和鞭毛 (flagellae) 是由质膜包围, 且突出于细胞表面、由微管和动力蛋白等构成的高度特化的细胞结构。鞭毛常见于精子和原生动物, 通过波状摆动使细胞在液体介质中游动。纤毛与鞭毛的结构相似, 但较鞭毛短。纤毛是一些原生动物的运动装置。在一些高等动物体内, 纤毛存在于多种组织的细胞表面, 如输卵管、神经元、外胚层、脑膜等组织。相邻的纤毛可以几乎同步运动, 使组织表面产生定向流动。在人体呼吸道内, 数目众多的纤毛可以清除进入气管的异物; 输卵管中的纤毛可以使卵细胞向子宫方向移动。近年来, 随着鞭毛内转运机制的发现以及一些纤毛相关蛋白缺失后引起的一系列在细胞水平、组织水平乃至个体水平上的表型变化使人们对这种细胞结构装置又有了新的认识。组织学家们发现, 除了作为运动装置外, 纤毛还与细胞信号转导、细胞增殖与分化、组织与个体发育等过程密切相关。

### (一) 纤毛的结构及组装

#### 1. 纤毛的结构

纤毛或鞭毛的外部包裹的纤毛膜是质膜的特化部分, 内部是由微管及其附属蛋白组装而成的轴丝。轴丝是由 250 多种不同的蛋白质组装而成的高度有序的结构, 这一结构从位于细胞皮层 (膜内侧) 的基体发出, 直达纤毛顶端。轴丝微管排列方式主要有 3 种模式: ① 9+2 型: 轴丝的外围是 9 组二联体微管, 中间是 2 根由中央鞘所包围的中央微管。② 9+0 型: 外周与 9+2 型相同, 有 9 组二联体微管, 但缺乏中央微管。③ 9+4 型: 极少数的纤毛属于这一类型, 轴丝中央含有 4 根单体微管。9+0 型纤毛一般是不动纤毛, 而 9+2 型纤毛则大多为动纤毛 (kinocilia)。但这种分类不是绝对的, 如斑马鱼的脊髓中央管中就存在 9+0 型的运动性室管膜纤毛, 而蛙嗅觉上皮细胞上 9+2 型纤毛却为不动纤毛。缺乏运动能力的 9+0 型纤毛是构成各种感受器的基础 (如化学感受器和本体感受器)。这些存在于感受器细胞上的不动纤毛通常被称为原生纤毛 (primary cilia)。

轴丝微管的正极端都指向纤毛或鞭毛的顶端。外围的二联体微管由 A 管和 B 管组成, 其中 A 管为完全微管, 由 13 个球形亚基环绕而成, B 管为不完全微管, 仅由 10 个亚基构成, 另 3 个亚基与 A 管共用。中央

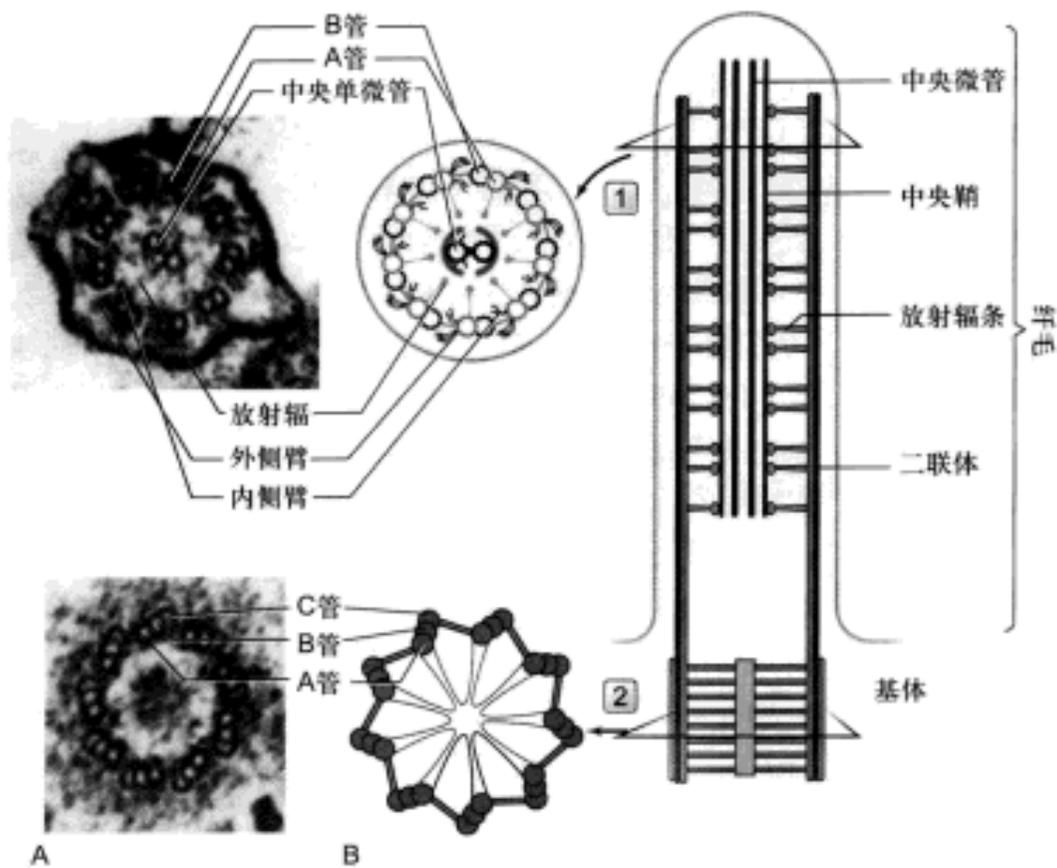


图 10-31 基体及轴丝的结构和示意图

A. 四膜虫纤毛的纤毛横切面的电镜图像。  
B. 轴丝微管的结构及其附属结构示意图。1. 轴丝的横切面，其外围是9组相互联系的微管二联体，中央是有中央鞘包围的两根微管。2. 基体横切面，其外围是9组相互联系的微管三联体。(A图由丁明孝提供)

微管均为完全单体微管(图 10-31)。中央鞘和外周9组二联体微管的A管之间由放射辐(radial spoke)相连。相邻的二联体之间通过连接蛋白(nexin)相连。有2个动力蛋白臂(dyenein arm)从二联体微管的A管伸出,分别位于轴丝的内侧和外侧,它们沿相邻二联体微管的B管滑动使纤毛或鞭毛产生局部弯曲(参见图 10-34B)。

位于纤毛和鞭毛基部的基体在结构上与中心粒类似。基体外围含有9组三联体微管,没有中央微管,呈“9+0”排列。其中A管为完全微管,而B管和C管则是不完全微管。基体中的A管和B管向外延伸而成为纤毛或鞭毛中的二联体微管(图 10-31)。

## 2. 纤毛的组装(发生)

纤毛是一种极性的细胞结构,起始于位于细胞膜内侧的基体。基体的结构类似于中心粒,其外围是9组三联体微管(图 10-31)。在细胞周期运行过程中,基体和中心粒的主体结构是可以通用的,变换过程中仅需要更换一些蛋白质部件。

原生纤毛的形成和细胞周期是紧密相关的。当细胞进入G<sub>1</sub>期或G<sub>0</sub>期,纤毛开始形成;当细胞进入有丝分裂期,则纤毛解体。利用电子显微镜观察培养的成纤维细胞和平滑肌细胞,发现原生纤毛的形成分为4个阶段(图 10-32)。①一个从高尔基体上分离的膜泡形成中心粒膜泡(centriolar vesicle, CV),包裹在成熟的

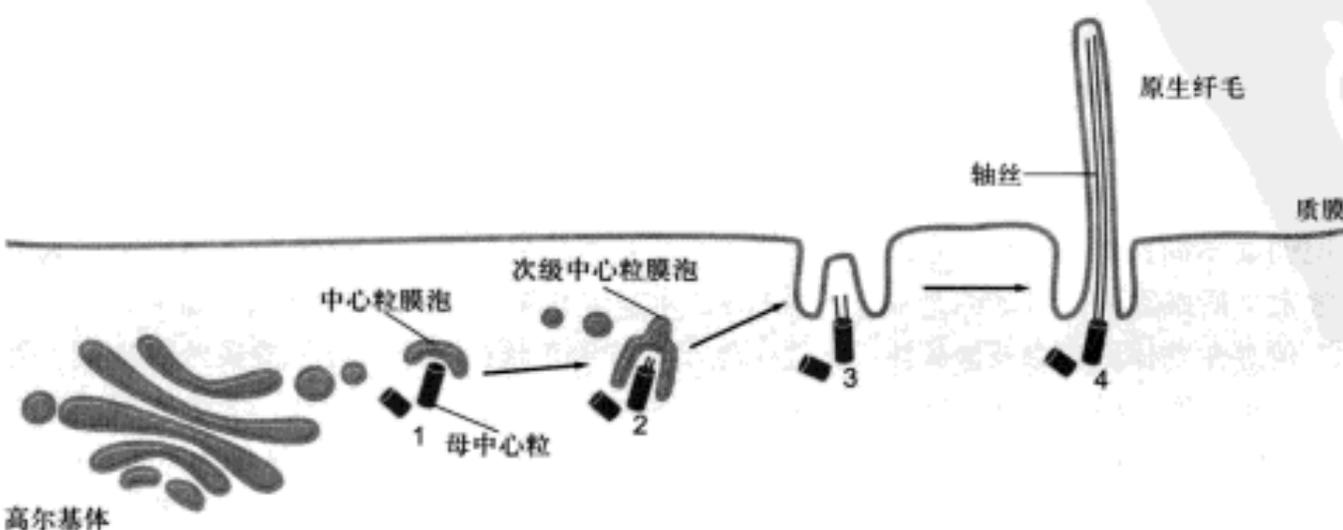
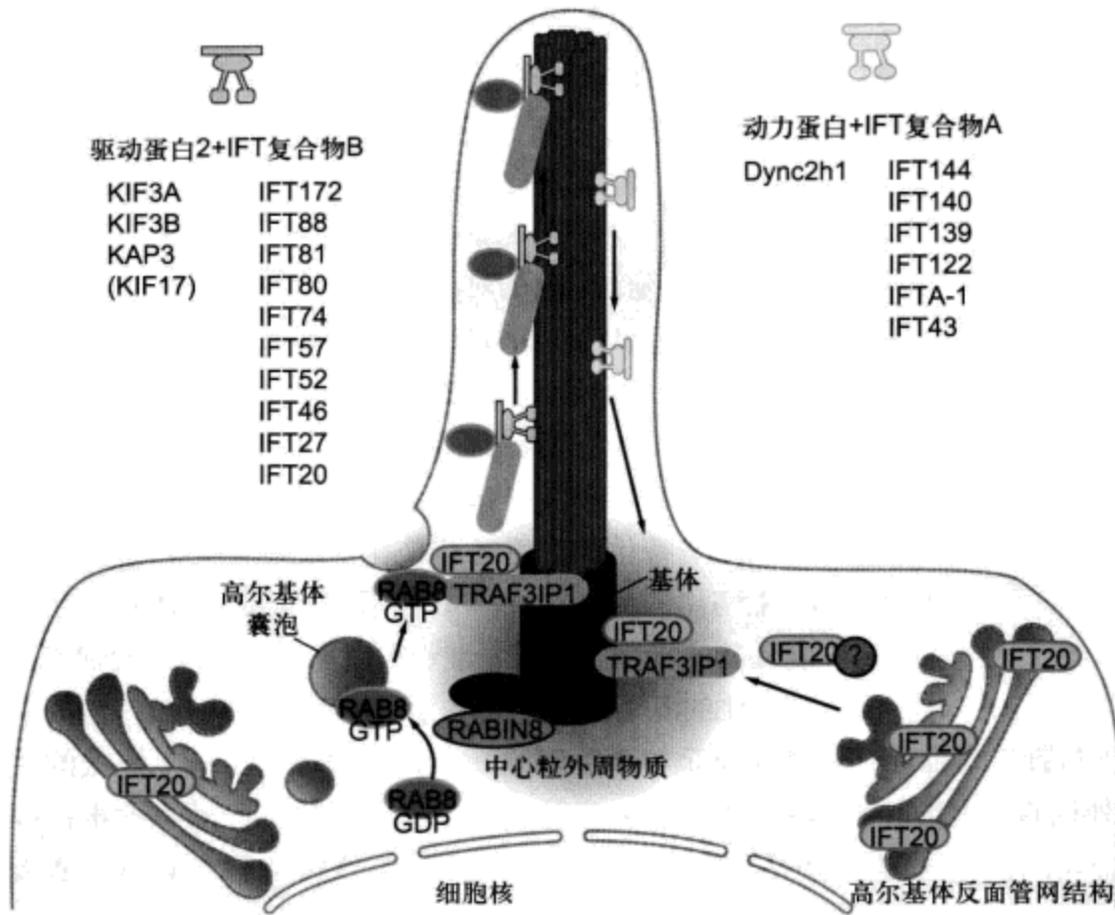


图 10-32 原生纤毛的形成过程

图 10-33 膜泡运输和鞭毛内运输



驱动蛋白 2 自鞭毛或纤毛的基部运送 IFT 复合物 B 至顶端，动力蛋白将 IFT 复合物 A 自鞭毛的顶端运向基部。

母中心粒的顶端，一些中心体蛋白如 Cep97 和 CP110 会从母中心粒的顶端移除；② 母中心粒开始延伸并获取成为基体所需的附属结构，初生轴丝开始显现。随着新的膜泡的融合，CV 慢慢变大，最终成为次级中心粒膜泡 (secondary centriolar vesicle, SCV)；③ 母中心粒随同 SCV 向质膜下迁移，当母中心粒锚定在细胞质膜下的纤毛组装位点时，SCV 与质膜融合形成一个杯状结构，称为纤毛项链；④ 在鞭毛内运输 (intraflagellar transport, IFT) 复合物的介导下，原生鞭毛进一步装配并延长。

纤毛或鞭毛的延伸和维持依赖于鞭毛内运输。IFT 是位于二联体微管和纤毛膜之间的双向运输系统。IFT 颗粒由驱动蛋白 2 将纤毛组装所需的轴丝前体组分从纤毛基部运送到顶部进行组装，再由动力蛋白将回收物带回胞体 (图 10-33)。IFT 颗粒包含两部分，分别为复合物 A (包含 6 种纤毛组分) 和复合物 B (包含 10 种纤毛组分)。这些编码 IFT 组分的基因在真核生物中高度保守，几乎对于所有真核细胞的纤毛或鞭毛的组装都是必需的。复合物 B 的运输由驱动蛋白 2 承担，将纤毛组装和维持其功能所需的物质从胞体运往纤毛顶端，而复合物 A 由动力蛋白负责从纤毛的顶端向胞体方向运送，所运输的货物包括复合物 B 上的一些已经完成使命的蛋白质，如 KIF3A/B, KAP3 等。

## (二) 纤毛或鞭毛的运动机制

纤毛或鞭毛的运动本质是由轴丝动力蛋白所介导的相邻二联体微管之间的相互滑动。采用改变 pH 等方法可以使细胞表面的鞭毛脱落，再除去其表面的膜结构，并用蛋白酶做轻微的处理以打断在微管二联体之间起连接作用的连接蛋白 (nexin)，使相邻的二联体微管仅靠动力蛋白彼此联系，而失去其他蛋白质的束缚。如果此时加入 ATP，就可以观察到相邻的微管二联体之间会相互滑动而分开 (图 10-34A)。其原因是从一个外周二联体微管的 A 管伸出的动力蛋白的马达结构域在相邻的二联体的 B 管上“行走”，导致二联体之间会产生滑动。然而，在完整的纤毛或鞭毛内部，组成轴丝的 9 组二联体微管之间，外周微管与中央鞘之间都有规律地分布着许多辅助蛋白，将微管横向连成一体，相邻二联体微管之间的滑动受到“整体性”的阻碍，于是纤毛动力蛋白的行走所产生的动力便转化成纤毛的局部弯曲运动 (图 10-34B)。

纤毛或鞭毛的弯曲首先发生在其基部，因为这里的动力蛋白首先被活化。随着轴丝上的动力蛋白依次被特异地活化或者失活，这种弯曲有规律地沿着轴丝向顶端传播。动力蛋白的活化受中央微管和放射辐的调控，缺少这些结构的突变体鞭毛没有拍打能力。在纤毛或鞭毛

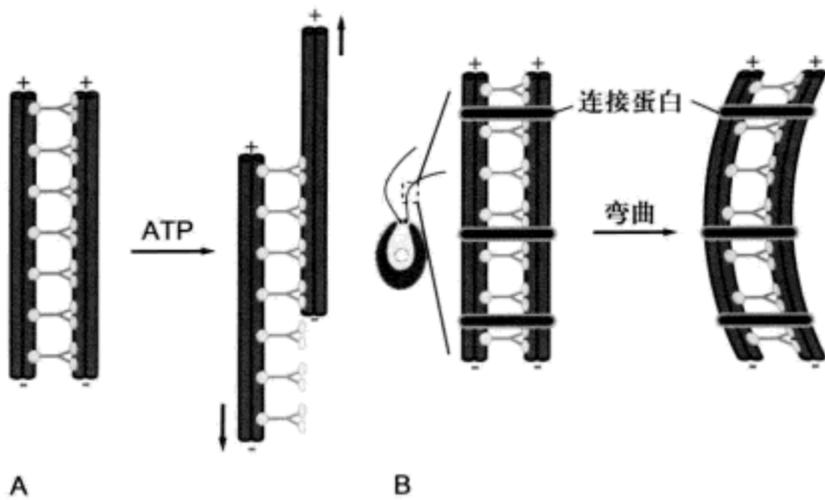


图 10-34 纤毛或鞭毛的运动过程中相邻二联体微管的滑动模型

A. 在分离的微管中：动力蛋白导致微管滑动。B. 在普通的鞭毛中：动力蛋白导致微管弯曲。

的拍打过程中，内侧的动力蛋白臂主要与鞭毛弯曲相关，决定鞭毛弯曲波形的大小和形态，外侧的动力蛋白臂则增加拍力和拍频。

### （三）纤毛的功能

对于单细胞原生生物而言，纤毛或鞭毛是其主要的运动装置，它们的运动可以推动生物个体在液体介质中向一定方向运动，实现觅食或应答环境变化。一些动物细胞也带有纤毛，纤毛的运动可以推动组织表面的液体做定向流动，从而传输某些信号分子，影响靶细胞的定向分化与发育。此外，纤毛也作为感受装置，接收和传递外界物理或化学信号刺激，参与一系列细胞或机体内信号调控过程，影响细胞的生理状态或组织器官的发育。

在动物胚胎发育过程中，细胞或器官表面纤毛的结构和运动对决定躯体各器官的正常分布发挥重要的作用，如驱动蛋白家族的成员 KIF3 与 IFT 相关。KIF3A 或 KIF3B 的基因剔除小鼠表现为发育过程中左右体轴形成不全。究其原因，是由于小鼠胚胎发育过程中胚胎结细胞所具有的单纤毛 (monocilia) 结构发育不全。KIF3A 或 KIF3B 的基因剔除小鼠的胚胎结细胞纤毛 (nodal cilia) 中微管的排列方式与野生型小鼠“9+2”排列模式不同，呈不能运动的“9+0”结构。通过高分辨录像显微镜观察发现，野生型小鼠胚胎结细胞的纤毛呈涡旋运动，产生一个左旋的液流，从而打破了小鼠胚胎发育过程中的对称性，为左右体轴的形成提供了可能。而在 KIF3A 或 KIF3B 的基因剔除小鼠体内由于该基因缺失，胚胎结细胞纤毛形成缺乏所必需的结构成分，导致纤毛发育不全，致使胚胎结处的左旋液流的形成受

阻，最终导致左右体轴形成障碍。研究频发内脏易位的小鼠品系的胚胎发育过程发现，胚胎结细胞的纤毛异常是其主要原因。

存在于肾脏上皮细胞的原生纤毛是突出于细胞表面的物理感受器 (mechanosensor)，它通过感受液体的流动来起始细胞内的钙信号通路。polycystin-1 (PC1)、polycystin-2 (PC2) 和 PKHD1 polyductin/fibrocystin (PD) 这 3 个定位于纤毛膜上的蛋白质是构成物理感受器的重要组成部分，如果这些蛋白质缺失，那么就算纤毛结构完整，钙信号通路仍然无法启动，最终导致多囊肾的发生。

一些特化的纤毛还行使化学感受器的功能，它对于生物体的光感受和嗅觉是不可或缺的。例如，在哺乳动物的视网膜上视锥细胞和视杆细胞，这两类细胞利用特化的纤毛来感受光信号，并将信息传递给下游的双极神经元和水平细胞。感光细胞包括由纤毛连接的外段和内段，外段是高度动态的结构，而动态的维持则依赖于 IFT。如果 IFT 缺失，外段结构会解体，从而导致失明。

哺乳动物的嗅觉神经元利用它们的球状树突末端的 15~20 根纤毛来感受气味。纤毛缺陷的小鼠和患 Bardet-Biedl 综合征的病人，会出现嗅觉丧失的症状。

此外纤毛参与了发育过程中的两类重要的信号通路——Hedgehog (Hh) 信号通路和 Wnt 信号通路。如果纤毛缺失，通路就无法对外源信号做出应答，从而会造成神经管无法闭合、脑形态异常、多指、左右体轴异常和肾囊肿等发育缺陷。

## 九、纺锤体和染色体运动

当细胞从间期进入有丝分裂期，间期细胞的微管网络解聚为游离的微管蛋白亚基，然后组装形成纺锤体，介导染色体的运动；分裂末期，纺锤体微管解聚，又组装形成胞质微管网络。

纺锤体微管包括动粒微管、极微管和星体微管。动粒微管连接染色体动粒与位于两极的中心体。极微管从两极发出，在纺锤体中部赤道区相互交错重叠。星体微管从中心体向周围呈辐射状分布。

有丝分裂过程中染色体的运动有赖于纺锤体微管的组装和去组装。在这一过程中动粒微管与动粒之间的滑动主要是靠结合在动粒部位的驱动蛋白 13 家族的成员和细胞质动力蛋白沿微管的运动来完成。极微管在纺锤体的中部交错重叠，分布在该区域的驱动蛋白 5 家族的

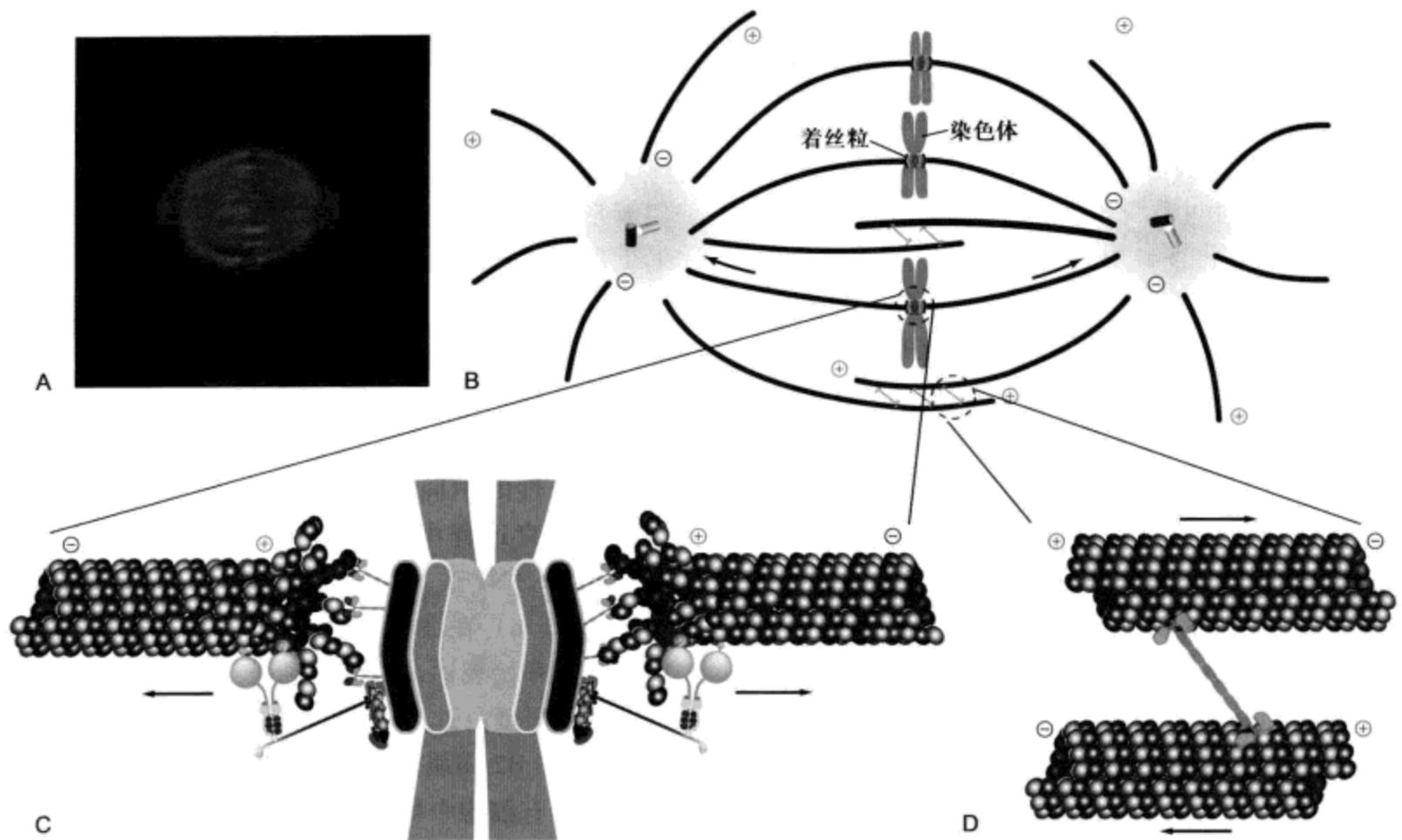


图 10-35 马达蛋白介导的纺锤体的行为

A. 免疫荧光染色显示有丝分裂（中期）纺锤体的微管和染色体的排列方式。B. 有丝分裂中期纺锤体的结构模式图，显示动粒微管与染色体之间的连接，极微管之间通过驱动蛋白相互作用。C. 显示动粒结构域与微管之间通过细胞质动力蛋白和驱动蛋白 13 家族的成员相互作用。此时，姐妹染色体即将分离，细胞质动力蛋白将向微管的负极端运动，而驱动蛋白 13 作用于动粒微管的正极端，导致此处微管的解聚。D. 显示驱动蛋白 5 作用于来自纺锤体两极的微管，并通过两端的马达结构域向微管的正极运动，这一过程将导致纺锤体两极间的距离变长。

成员如 CIK1 和 CIN1 等为双极马达蛋白，其中 2 个马达结构域沿一条微管运动，另 2 个马达结构域沿来自另外一极的微管运动。由于重叠的 2 条微管的极性相反，故当双极驱动蛋白四聚体沿微管向正极运动时，纺锤体两极间的距离延长（图 10-35），这是有丝分裂后期发生的重要事件。

### 第三节 中间丝

中间丝又称中间纤维（intermediate filament, IF），最初是在平滑肌细胞内发现的直径为 10 nm 的绳索状结构。因其粗细介于肌细胞的粗肌丝和细肌丝之间，故命名为中间丝（图 10-36）。中间丝存在于绝大多数动物细胞内。细胞质中间丝通常是围绕细胞核开始组

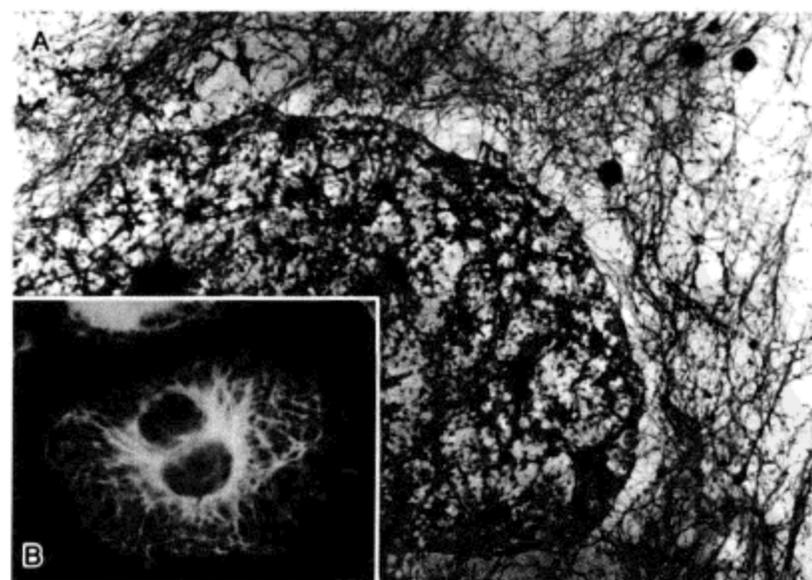


图 10-36 HeLa 细胞中间丝

A. 经非离子去垢剂处理和高盐缓冲液抽提后的细胞质中间丝网络的电镜照片。B. 免疫荧光染色显示细胞质中间丝的分布。（蔡树涛和翟中和提供）

装，并伸展到细胞边缘与细胞质膜上的细胞连接如桥粒、半桥粒相连。通过细胞连接，中间丝将相邻的细胞连成一体。在核膜的内侧，由一类特殊的中间丝蛋白成员构成的核纤层以正交网络形式分布，通过位于内层核膜上的 lamin B 受体与核膜相连。中间丝结构较微管和微丝稳定得多，用高盐溶液和非离子去垢剂处理细胞时，构成细胞骨架的微管和微丝组分及其他细胞结构基本上都被除去，但由于中间丝有很强的抗抽提能力而被保存下来。

与微管和微丝的情况不同，中间丝蛋白并不是所有真核细胞都必需的结构组分。在植物细胞的基因组内尚未发现编码中间丝蛋白的基因，在酵母的核膜内侧也不存在核纤层结构。在线虫细胞中表达的某些中间丝蛋白与角蛋白有较高的相似性，但具有外骨骼的动物，如果蝇仅仅表达两种类型的核纤层蛋白，却没有细胞质中间丝。人体内的一些组织细胞，如神经系统的少突胶质细胞，它们的细胞质部分形成包绕神经轴突的髓鞘，也没有观察到细胞质内有中间丝结构。

## 一、中间丝的主要类型和组成成分

中间丝的组成成分比微丝和微管要复杂得多，不同来源的组织细胞表达不同类型的中间丝蛋白（表 10-2）。根据中间丝蛋白的氨基酸序列、基因结构、

组装特性以及在发育过程的组织特异性表达模式等，可将中间丝分为 6 种主要类型。酸性（I 型）和中性和碱性（II 型）角蛋白（keratin）在上皮细胞内以异源二聚体的形式参与中间丝的组装；而 III 型中间丝，如波形蛋白（vimentin）、结蛋白（desmin）、微管成束蛋白（syncoilin）、胶质丝酸性蛋白（glial filament acidic protein, GFAP）与外周蛋白（peripherin），则通常在各自的细胞内形成同源多聚体。波形蛋白在源于中胚层的细胞和发育早期的一些外胚层细胞中表达，且常在结蛋白、GFAP 和神经丝蛋白等一些有分化特异性的中间丝蛋白表达之前形成网络。在神经系统发育过程中，IV 型中间丝，包括 3 种神经丝蛋白亚基（NF-L、NF-M 和 NF-H）和  $\alpha$ -介连蛋白（ $\alpha$ -internexin）在波形蛋白和巢蛋白（nestin）表达一定时间后开始表达，并加入到已经存在的中间丝网络中。核纤层蛋白 A 及其剪切体核纤层蛋白 C 与核纤层蛋白 B1 和 B2 同属于 V 型中间丝蛋白，其中核纤层蛋白 B 在所有细胞中均表达，而核纤层蛋白 A 只在原肠胚形成后分化的细胞中表达。巢蛋白与 desmuslin 属于 VI 型中间丝蛋白家族的成员（表 10-2）。另外，晶状体中发现的 phakinin/CP49 和丝晶蛋白（filensin）属于“孤儿”类型（orphan）。在人类基因组中至少包含 67 种不同的中间丝蛋白基因，组成了人类基因组中最大的基因家族之一。这种中间丝蛋白的多样性与人体

表 10-2 中间丝蛋白的类型和组织分布

型别	中间丝种类	基因数	相对分子量 / $\times 10^3$	组织分布
I	酸性角蛋白	>25	40~64	上皮细胞
II	中性角蛋白	>25	52~68	上皮细胞
III	波形蛋白	1	55	各种中胚层来源的细胞以及某些体外培养细胞 肌细胞 星形胶质细胞 外周神经系统神经元 肌细胞
	结蛋白	1	52	
	胶质丝酸性蛋白	1	51	
	外周蛋白	1	57	
	微管成束蛋白	1	54	
IV	神经丝蛋白三组分	3	68~200	中枢神经系统 中枢神经系统
	$\alpha$ -介连蛋白	1	66	
V	核纤层蛋白 A/C	1	72/62	细胞核
	核纤层蛋白 B1	1	65	细胞核
	核纤层蛋白 B2	1	78	细胞核
VI	巢蛋白	1	240	异质的
	联丝蛋白 (synemin)	1	182	肌肉
	desmuslin	1	140	肌肉
未归类	晶状体蛋白 /CP49	1	46	晶状体
	丝晶蛋白	1	83	晶状体

内 200 多种细胞类型相关, 这些细胞所表现的不同功能和机械性能又与其特殊的细胞骨架成分密切相关, 因此, 中间丝蛋白被认为是区分细胞类型的身份证。中间丝为每种细胞类型提供了独特的细胞骨架网络结构, 在其 N 端和 C 端序列上的差异为不同的细胞类型提供了独特的细胞质环境, 而核纤层蛋白则在核膜内侧形成纤维网络。

不同种类的中间丝蛋白有非常相似的二级结构。作为中间丝蛋白的重要结构特征, 细胞质中间丝蛋白分子的中部都有一段由约 310 个氨基酸残基组成的高度保守的杆状区, 其两侧是高度多变的头部和尾部。杆状区内  $\alpha$  螺旋区的氨基酸序列严格按照每 7 个氨基酸 (a~g) 一组重复排列, 其中 a 和 d 为亲水性氨基酸。这样形成的  $\alpha$  螺旋结构的表面有一个疏水性的沟槽, 供二聚体组装时发挥作用。中间丝蛋白杆状区长度约 47 nm, 该区域被插入了 3 个  $\beta$  片层结构, 其中 L12 将整个杆状区分成螺旋 1 和螺旋 2。螺旋 1 和螺旋 2 的长度各约 22 nm, 螺旋 1 和螺旋 2 又分别被 L1 和 L2 隔为 A、B 两个亚区, 4 个螺旋区间分别被称为 1A 与 1B 和 2A 与 2B (图 10-37)。V 型中间丝蛋白在其 1B 区增加了 6 组 (42 个) 氨基酸的重复, 其杆状区的长度为 352 个氨基酸。

中间丝的核心部分直径为 8~9 nm, 主要由中间丝蛋白的杆状区构成。中间丝蛋白的头部和尾部结构域参与中间丝的组装, 较长的尾部结构域大多突出于中间丝的核心之外, 中间丝 22 nm 或 48 nm 的纵向周期与末端区域形成的突出有关。中间丝真正的直径取决于肽链末端的大小, 通常为 12~16 nm, 由于外侧 2~3 nm 的密

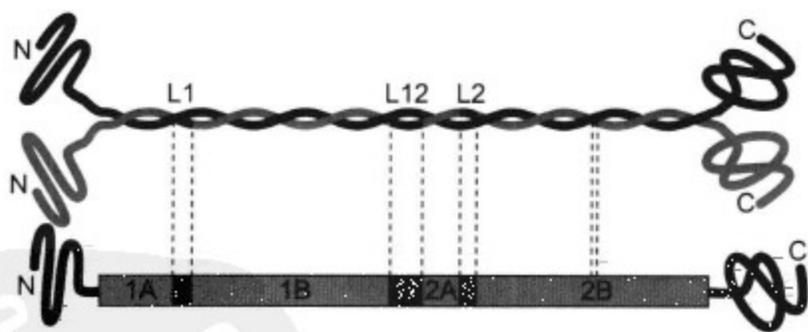


图 10-37 中间丝蛋白分子结构模式图

中间丝蛋白的中部是由大约 310 个氨基酸组成的杆状区, 两侧是高度多变的 N 端头部和 C 端尾部。由  $\alpha$  螺旋组成的杆状区是中间丝蛋白最保守的区域, 该区域被一段  $\beta$  片层结构 L12 分隔成螺旋 1 和螺旋 2, 螺旋 1 和螺旋 2 又分别被 2 段  $\beta$  片层结构 L1 和 L2 分隔。两个中间丝蛋白分子平行排列形成双股螺旋的二聚体结构。

度较低, 电镜下难以分辨, 故中间丝在电镜下直径一般为 10 nm 左右。由中间丝核心伸出的末端区可能和中间丝与细胞结构的相互作用及功能有关。不同类型的中间丝的末端结构域序列变化较大, 长度相差甚远, 通常折叠成球状结构。在电镜下观察到的波形纤维是表面比较光滑的丝状结构, 而神经丝在神经元的轴突内部平行排列成束状结构, NF-M 和 NF-H 的 C 端突出于神经丝的表面, 并在相邻的神经丝之间以及神经丝和微管等其他细胞结构之间形成横桥, 将神经元突起内的微管和中间丝网络连接成一体。

## 二、中间丝的组装与表达

与微管和微丝的组装过程不同, 中间丝蛋白在合适的缓冲体系中能自我组装成 10 nm 的丝状结构, 而且组装过程不需要 ATP 或 GTP 提供能量。中间丝蛋白的组装首先是两个单体的杆状区以平行排列的方式形成双股螺旋的二聚体。该二聚体可以是同型二聚体 (homodimer), 如波形蛋白、GFAP 等, 但如果是角蛋白, 则肯定是一条 I 型角蛋白和另一条 II 型角蛋白构成异型二聚体 (heterodimer)。二聚体的长度约 50 nm。然后是两个二聚体以反向平行和半分子交错的形式组装成四聚体 (tetramer)。四聚体可能是细胞质内中间丝组装的最小结构单位。由于四聚体是由两个二聚体以反向平行的方式组装而成, 因此没有极性。作为中间丝组装的基本结构单位, 四聚体之间在纵向 (首尾) 和侧向相互作用, 最终组装成横截面由 32 个中间丝蛋白分子组成, 长度不等的中间丝。中间丝的主干主要是由中间丝蛋白的杆状区构成, 其 N 端和 C 端除了在中丝丝的组装过程中发挥作用之外, 还是与细胞的其他结构组分相互作用的主要位点 (图 10-38)。

中间丝的装配与解聚和微丝与微管的动态特征有所不同, 并不表现为典型的踏车行为。

向细胞内导入荧光标记的中间丝蛋白, 然后观察中间丝的组装过程, 结果显示带荧光标记的中间丝蛋白可以在已经存在的中间丝的多个位点加入, 而不是像微管和微丝那样仅仅在末端加入。随着时间的延长, 整个中间丝上都显示荧光标记。可见中间丝的组装模式与微管和微丝完全不同, 在细胞内新的中间丝蛋白可以通过交换的方式掺入到原有的纤维中去。用胰蛋白酶处理体外培养的成纤维细胞, 在细胞变圆的同时, 细胞内的中间丝网络解聚。在除去胰蛋白酶以后, 新的中间丝似乎从

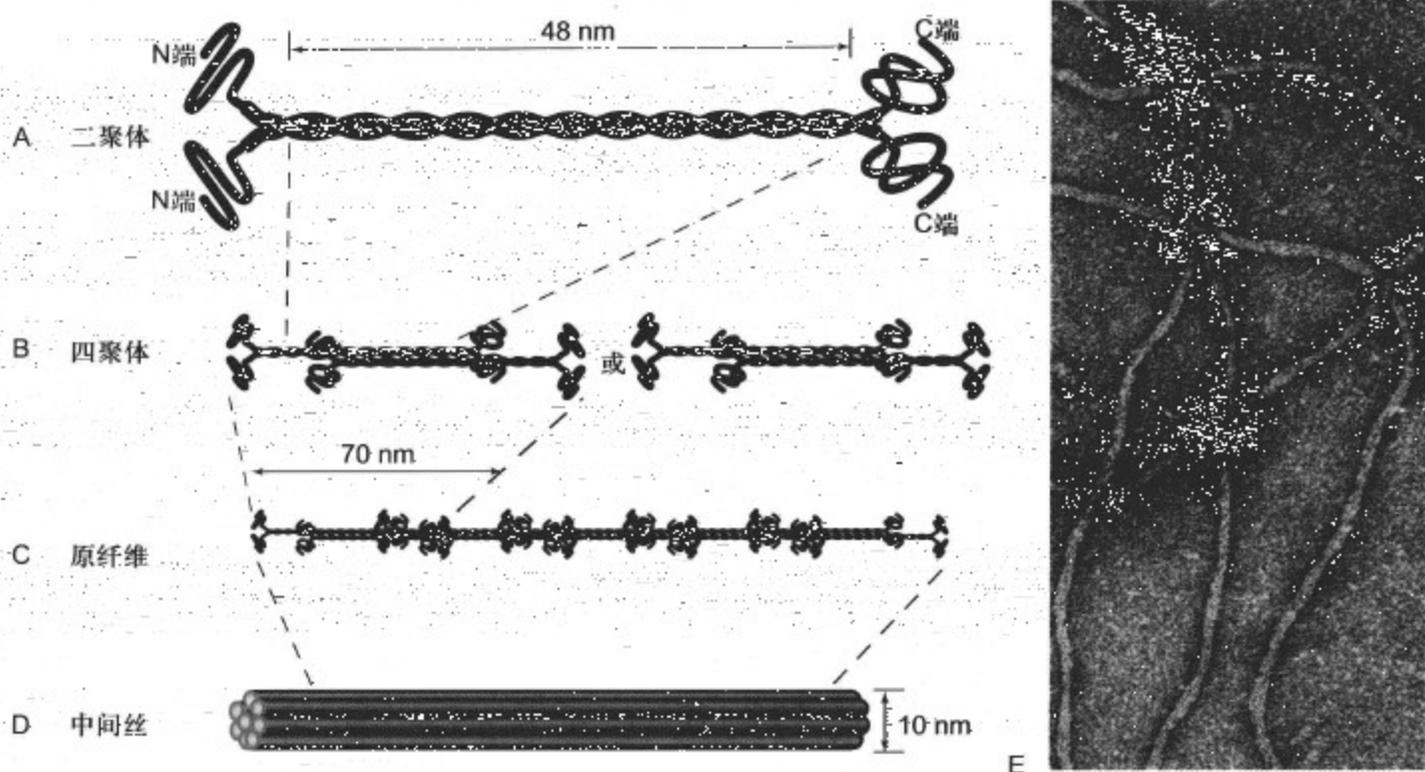


图 10-38 中间丝的组装模型

A. 由 2 个中间丝蛋白亚基平行排列组装而成双股螺旋的二聚体。B. 两个二聚体按反向平行、半分子交叠的方式组装成中间丝组装的基本结构单位——四聚体。C. 四聚体首尾相连形成原纤维。D. 8 根原纤维构成圆柱状的 10 nm 纤维。E. 中间丝负染后的电子显微镜图像。(E 图由 Ueli Aebi 博士惠赠)

细胞核的周围开始组装，并向细胞边缘延伸，这时的中间丝好像是从头开始组装，新的中间丝蛋白会加到纤维的末端使纤维延长。

在细胞周期的运行过程中，细胞质中间丝网络在细胞分裂前解体，分裂结束后又重新组装。中间丝的去组装和重新组装过程似乎与中间丝蛋白亚基的磷酸化和去磷酸化有关。有丝分裂前期即将去组装的中间丝被磷酸化，然后中间丝上被磷酸化的蛋白亚基与 14-3-3 蛋白结合，导致中间丝网络解体。分裂结束后，中间丝蛋白的可溶性组分发生去磷酸化，14-3-3 蛋白从中间丝蛋白亚基上脱落，中间丝蛋白重新参与中间丝网络的组装。

在细胞分化过程中，细胞内中间丝的类型随着细胞的分化过程而发生变化。如在小鼠胚胎发育过程中，最初胚胎细胞中表达的中间丝蛋白是角蛋白，待胚胎发育到第 8~9 天，在将要发育为间叶组织的细胞中，角蛋白表达量下降直至停止，取而代之的是波形蛋白的表达。类似的表达谱变化还见于神经外胚层的发育中，首先表达的是角蛋白，第 11 天左右，角蛋白停止表达，波形蛋白出现，随后是巢蛋白表达。当神经干细胞最终分化成神经元和神经胶质细胞时，神经前体细胞内波形蛋白和巢蛋白停止表达，改为表达神经丝

蛋白。作为中枢神经系统中数量众多的星形胶质细胞通常同时表达波形蛋白和胶质丝酸性蛋白，它们可以共同组装成中间丝，而在一些有丝分裂失控的胶质细胞瘤细胞内可以重新检测到巢蛋白的表达。由此可见，胚胎细胞能根据其发育方向调节中间丝蛋白基因的表达。在一种类型的中间丝蛋白向另一种类型的中间丝蛋白转变的过程中，新的蛋白似乎是通过交换的方式掺入到原来的中间丝网络中去。

### 三、中间丝与其他细胞结构的联系

电镜提供的图像信息显示，中间丝在胞质中形成发达的纤维网络，并与细胞质膜上特定的部位连接，并通过一些跨膜蛋白与细胞外基质或相邻细胞的中间丝间接相连。在细胞的内部，许多细胞质中间丝源自细胞核的周缘，并且与核膜有联系。由 V 型中间丝蛋白组装而成的核纤层结构在核膜的内侧呈正交网状排列（图 10-39）。核纤层与内核膜上的核纤层蛋白受体相连，从而成为核膜的重要支撑结构。此外，核纤层还是染色质的重要锚定位点。

在细胞分裂过程中，核纤层结构发生解聚和重新组装。在细胞分裂前期，核纤层解聚，核膜崩解，核纤层

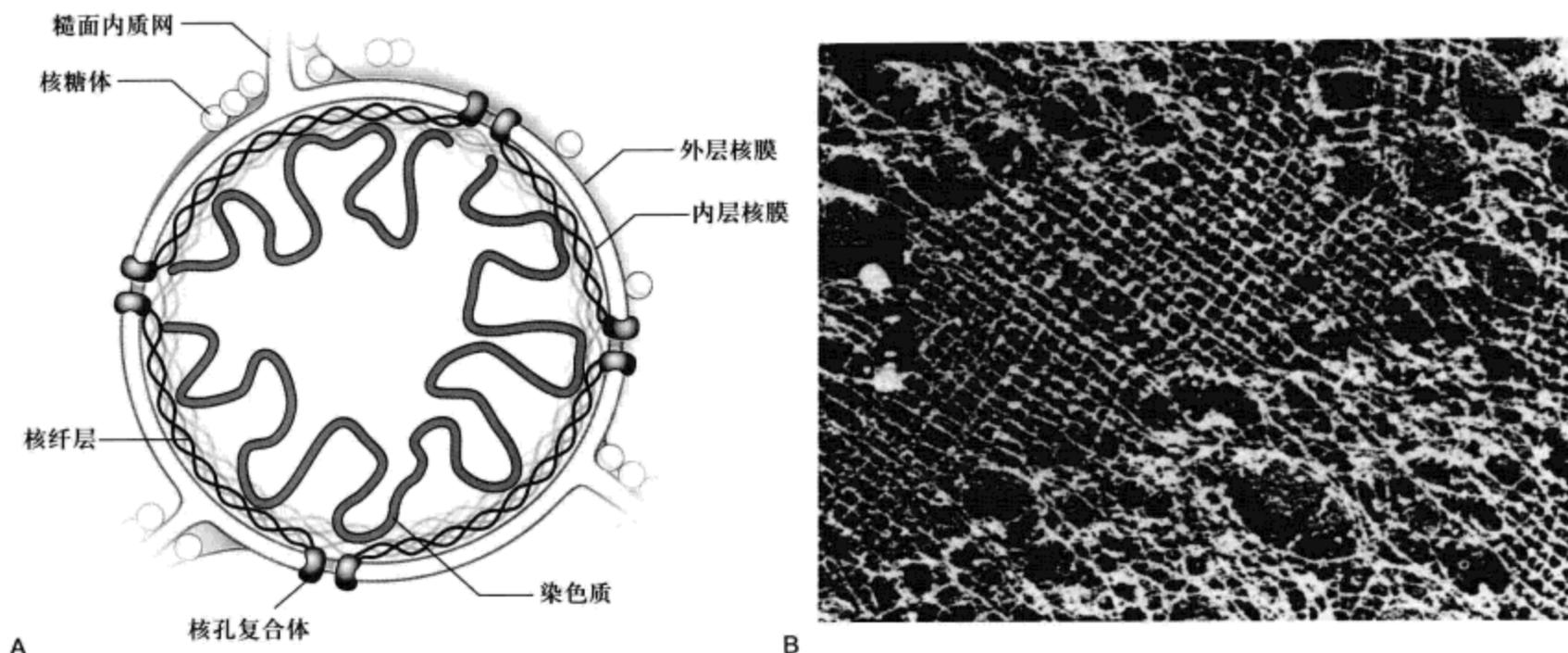


图 10-39 核纤层的结构

A. 核纤层结构示意图。B. 非洲爪蟾卵细胞核膜经 Triton X-100 处理去膜，金属投影显示核纤层纤维网络。(B 图由 Ueli Aebi 博士惠赠)

蛋白 A 以可溶性单体形式弥散在细胞中；而核纤层蛋白 B 则与核膜解体后形成的核膜小泡保持结合状态。分裂末期，结合有核纤层蛋白 B 的核膜小泡在染色质周围聚集，并渐渐融合形成新的核膜，而核纤层蛋白则在核膜的内侧组装成子细胞的核纤层。这一过程有赖于核纤层蛋白与染色质之间的相互作用。细胞分裂过程中核纤层的解体和重新组装与核纤层蛋白的磷酸化水平相关。细胞有丝分裂前，核纤层蛋白的磷酸化水平增加，至核膜解体前核纤层蛋白被高度磷酸化，而在有丝分裂的末期则发生去磷酸化，提示核纤层蛋白的磷酸化与去磷酸化可能是有丝分裂过程中核纤层结构动态变化的调控因素。一些研究结果表明，核纤层蛋白是有丝分裂促进因子 (MPF)  $p34^{cdc2}$  亚基的直接作用底物， $p34^{cdc2}$  亚基具有蛋白激酶活性。有丝分裂前期，MPF 可以使核纤层蛋白分子的 Ser22 和 Ser392 磷酸化，这两个丝氨酸残基分别位于其头部和尾部结构域，磷酸化导致这两个与中间丝组装直接相关的结构域的构象发生变化，从而导致核纤层解聚。采用点突变方法改变这些磷酸化位点可干扰核纤层解聚及核膜崩解。

细胞质中间丝在那些受到机械应力作用的组织细胞中特别丰富。处于不同分化阶段的上皮细胞中有不同类型的 I 型及 II 型角蛋白组装而成的中间丝。不同种类的

角蛋白具有不同的头部和尾部。这两个结构域除了参与中间丝的组装外，还是细胞其他结构组分的锚定位点。可见不同的上皮细胞所表达的不同的角蛋白种类与细胞所担负的使命相关。上皮细胞中的角蛋白丝往往贯穿整个细胞，其末端与细胞质膜上特定的区域，特别是桥粒和半桥粒结构相连，而暴露在角蛋白丝表面的角蛋白的头部和尾部结构域则与细胞质中的其他组分相结合。角蛋白丝通过桥粒将上皮组织中的各个上皮细胞连成一体，以分散皮肤所受外力的作用。相关基因的突变将干扰上皮细胞中角蛋白丝的组装，如单纯大疱性表皮松懈症患者的皮肤只要受到轻微的外力作用就会发生破裂，出现水疱。

在神经元内，NF-M 和 NF-H 的尾部结构域突出于神经丝的表面，在与之相邻的神经丝、微管以及一些膜性结构之间形成横桥，将轴突内部的细胞骨架等结构连成一体，为这个细长的细胞突起提供必要的内部支撑。波形蛋白和胶质丝酸性蛋白是星形胶质细胞中间丝的主要成分，剔除编码这两种蛋白的基因，将导致星形胶质细胞的一些功能如细胞的迁移能力和脑受伤后形成胶质疤痕的能力受损。可见中间丝与细胞其他结构组分的相互作用对于维持组织的整体功能是非常重要的。

## ● 思考题 ●

1. 通过本章的学习, 你对生命体的自组装原则有何认识?
2. 除支持作用和运动功能外, 细胞骨架还有什么功能? 怎样理解“骨架”的概念?
3. 细胞中同时存在几种骨架体系有什么意义? 是否是物质和能量的一种浪费?
4. 为什么说细胞骨架是细胞结构和功能的组织者? 细胞内一些细胞器和生物大分子的不对称分布有什么意义?
5. 如何理解细胞骨架的动态不稳定性? 这一现象与细胞生命活动过程有什么关系?

## ● 参考文献 ●

1. Cooper J A, Schafer D A. Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12:97-103.
2. Hill T L, Kirschner M W. Subunit treadmilling of microtubules of actin in the presence of cellular barriers: possible conversion of chemical free energy into mechanical work. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79:490-494.
3. Hirokawa N, Tkemura R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(3):201-214.
4. Holmes K C, Popp D, Gebhard W, *et al.* Atomic model of the actin filament. *Nature*, 1990, 347:44-49.
5. Howard J. Molecular motors: structural adaptations to cellular fuuctions. *Nature*, 1997, 389:561-567.
6. Nogales E, Wolf S G, Downing K H. Structure of the  $\alpha/\beta$ -tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 1988, 391:199-203.
7. Paavilainen V O, Bertling E, Falck S, *et al.* Regulation of cytoskeletal dynamics by actin monomer binding proteins. *Trends Cell Biol*, 2004, 14:386-394.
8. Vale R D, Reese T S, Sheetz M P. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*, 1985, 42(1):39-50.



# 细胞核与染色质

细胞核是真核细胞内最大、最重要的细胞器，是细胞遗传与代谢的调控中心，是真核细胞区别于原核细胞最显著的标志之一。自1831年R. Brown发现并命名细胞核(nucleus, 复数: nuclei)以来，对于细胞核的研究始终倍受重视。

所有真核细胞，除高等植物韧皮部成熟的筛管和哺乳动物成熟的红细胞等极少数例外，都含有细胞核。一般说来，真核细胞失去细胞核会导致细胞的死亡。细胞核大多呈球形或卵圆形，但也随物种和细胞类型不同而有很大变化。细胞核与细胞质在体积之间通常存在一个大致比例，即细胞核的体积约占细胞总体积的10%，这被认为是制约细胞最大体积的主要因素之一。核的大小依物种不同而变化，高等动物细胞核直径一般为5~10 μm，高等植物细胞核直径一般为5~20 μm，低等植物细胞核直径为1~4 μm。

细胞核主要由核被膜、核纤层、染色质、核仁及核体组成(图11-1)。细胞核是遗传信息的储存场所，与细胞遗传及代谢活动密切相关的基因复制、转录和转录初产物的加工过程均在此进行。

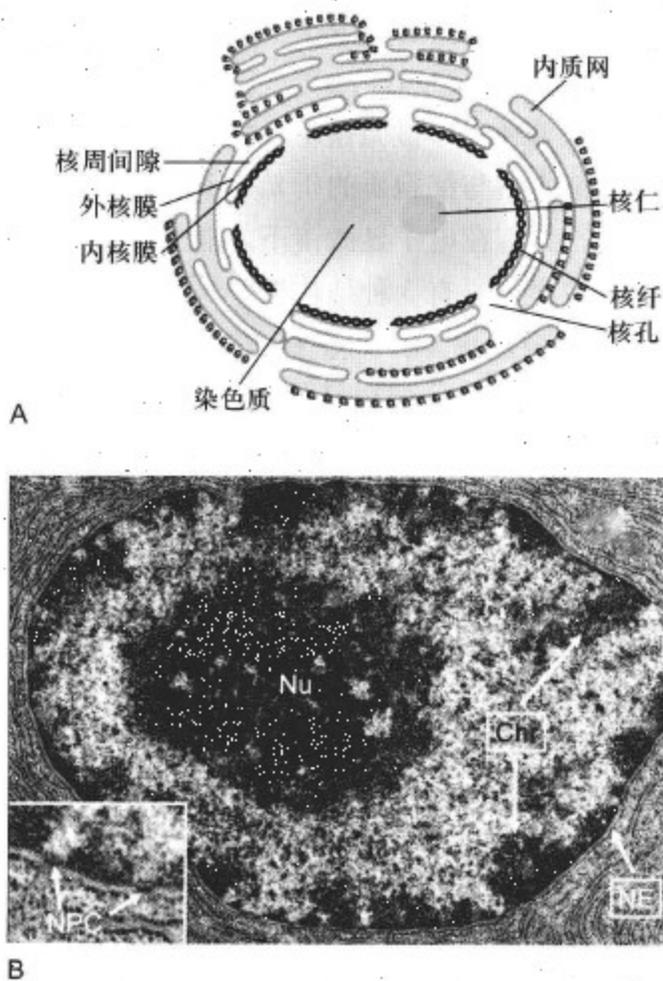


图 11-1 细胞核截面图

A. 细胞核结构组成示意图。B. 透射电镜图片显示胰腺细胞核: Nu, 核仁; NPC, 核孔复合体; Chr, 染色质; NE, 核被膜。(B图由梁凤霞博士惠赠)

## 第一节 核被膜

核被膜 (nuclear envelope) 位于细胞核的最外层, 是细胞核与细胞质之间的界膜。特殊的位置决定了它具有两方面的功能: 一方面, 核被膜构成了核、质之间的天然选择性屏障, 将细胞分成核与质两大结构与功能区域, 使得 DNA 复制、RNA 转录与加工在核内进行, 而蛋白质翻译则局限在细胞质中。这样既避免了核质间彼此相互干扰, 使细胞的生命活动秩序更加井然, 同时还能保护核内的 DNA 分子免受损伤。另一方面, 核被膜调控细胞核内外的物质交换和信息交流。核被膜并不是完全封闭的, 核质之间进行着频繁的物质交换与信息交流。这些物质交换与信息交流主要是通过核被膜上的核孔复合体进行的。

核被膜在普通光学显微镜下难以分辨, 在相差显微镜下, 由于细胞核与细胞质的折光率不同, 可以看出核被膜的界限, 只有在电子显微镜下才能看清核被膜的细微结构。核被膜主要有 3 种结构组分: 双层核膜、核孔复合体与核纤层 (图 11-1)。核纤层 (nuclear lamina) 紧贴内层核膜下, 是一层由纤维蛋白构成的网络结构, 它与胞质中间丝、核基质有密切联系。当真核细胞用非离子去垢剂、核酸酶及高盐溶液等分级抽提后, 核纤层往往与核孔复合体、胞质中间丝、核基质一起被保存下来, 成为贯穿于细胞核与细胞质的骨架结构体系。

### 一、核膜

#### (一) 核膜结构

核被膜由内外两层平行但不连续的单位膜构成。面向核质的一层膜称作内 (层) 核膜 (inner nuclear membrane), 而面向胞质的另一层膜称为外 (层) 核膜 (outer nuclear membrane)。两层膜厚度相同, 约为 7.5 nm。两层膜之间有 20~40 nm 的透明空隙, 称为核周间隙 (perinuclear space) 或核周池 (perinuclear cisternae)。核周间隙宽度随细胞种类不同而异, 并随细胞的功能状态而改变。内、外核膜各有特点: ① 外核膜表面常附有核糖体颗粒, 且常常与糙面内质网相连续, 使核周间隙与内质网腔彼此相通。从这种结构上的联系出发, 外

核膜可以被看做是糙面内质网的一个特化区域。② 内核膜表面光滑, 无核糖体颗粒附着, 但紧贴其内表面有一层致密的纤维网络结构, 即核纤层。内核膜上有一些特有的蛋白成分, 如核纤层蛋白 B 受体 (lamin B receptor, LBR)。

双层核膜互相平行但并不连续, 内、外核膜常常在某些部位相互融合形成环状开口, 称为核孔 (nuclear pore)。在核孔上镶嵌着一种复杂的结构, 叫做核孔复合体 (nuclear pore complex, NPC)。核孔周围的核膜特称为孔膜区 (pore membrane domain), 它也有一些特有的蛋白成分, 如核孔复合体特有的跨膜糖蛋白 gp210、Pom121 等。

#### (二) 核膜的崩解与组装

在真核细胞中, 核膜伴随着细胞周期的进行有规律地解体与重建。在分裂期, 双层核膜崩解成单层膜泡, 核孔复合体解体, 核纤层去组装; 到分裂末期, 核被膜开始围绕染色体重新形成。那么, 子细胞的核被膜是来源于旧核被膜碎片, 还是来自其他膜结构? 对此一直存在两种意见。通过对变形虫的研究, 很多人支持第一种说法, 即新核膜来自旧核膜。将变形虫培养在含有  $^3\text{H}$ -胆碱的培养基中,  $^3\text{H}$ -胆碱掺入到膜脂的磷脂酰胆碱中, 这样核膜便被  $^3\text{H}$  标记。将带有放射性标记的核取出, 移植到正常的去核变形虫中, 追踪观察一个细胞周期, 结果发现子代细胞形成后, 原有的放射性标记全部平均分配到子细胞的核被膜中, 说明旧核膜参与了新核膜的构建。

对于核膜组装的机制及其与核孔复合体、核纤层的关系, 目前尚无定论。一种以非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 卵提取物为基础的非细胞核组装体系 (cell-free nuclear assembly system) 为研究该问题提供了很好的实验模型。非洲爪蟾的成熟卵母细胞处于第二次减数分裂中期。此时的卵母细胞体积很大, 直径可达 1 mm, 其中储存了大量的营养物质, 为受精后快速卵裂做准备。一个成熟的卵母细胞所储备的原料可供形成  $10^3 \sim 10^4$  个细胞核。现已设法用这种卵提取物在体外成功地模拟出细胞核的构建及解体过程。目前越来越多的证据表明, 一种直径 200 nm 左右的单层小膜泡直接参与了核膜的形成。它们首先附着到染色质表面, 在染色质表面排列并相互融合形成双层膜, 同时在膜上的某些部位内、外膜相互融合并形成核孔复合体结构。对 HeLa 细胞有丝分裂过程的研究发现, 核被膜在细胞周期中发生

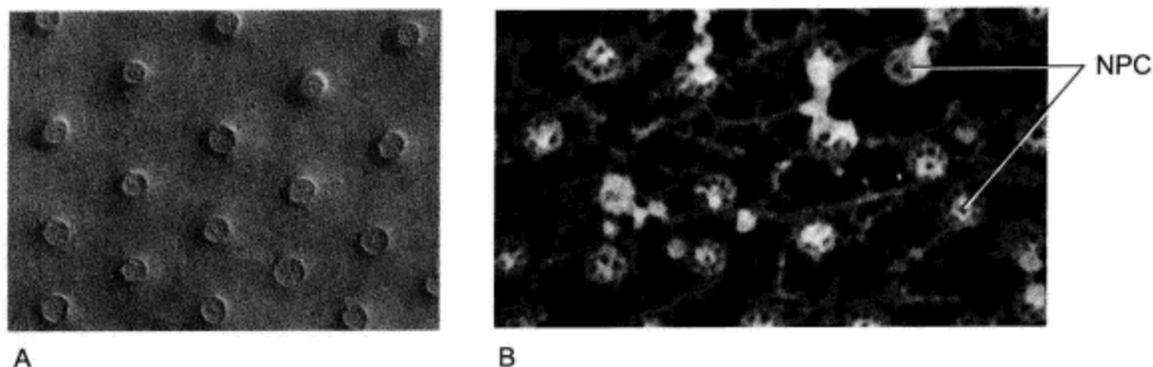


图 11-2 用冷冻蚀刻电镜技术 (A) 和高分辨率扫描电镜 (B) 显示的核孔复合体 (NPC)

(A 图由 Basera 博士惠赠; B 图由 Has Ris 博士惠赠)

有序的去组装与重组装。从处于分裂期的 HeLa 细胞中可以分离出两种膜泡组分：一组富含 LBR，另一组富含 gp210。这说明核被膜的去组装不是随机的，而是具有区域特异性 (domain-specific)。在有丝分裂后期核被膜重新组装时，富含 LBR 的膜泡首先与染色质结合，而富含 gp210 的膜泡与染色质结合较晚。近期的研究发现，Ran GTP 酶及其结合蛋白参与了核被膜的组装调控。这些蛋白质不仅调控膜泡在染色质表面的募集，也参与膜泡的融合和核孔复合体组装。此外，核被膜的去组装、重组装变化受细胞周期调控因子的调节，这种调节作用可能通过对核纤层蛋白、核孔复合体蛋白等进行磷酸化与去磷酸化修饰来实现。

## 二、核孔复合体

1949—1950 年间，H. G. Callan 与 S. G. Tomlin 在用透射电子显微镜观察两栖类卵母细胞的核被膜时发现了核孔。随后人们逐渐认识到核孔并不是一个简单的孔洞，而是一个相对独立的复杂结构。1959 年 M. L. Watson 将这种结构命名为核孔复合体。迄今已知的所有真核细胞，从酵母到人，其间期细胞核普遍存在核孔复合体。核孔复合体在核被膜上的数量、分布密度与分布形式随细胞类型、细胞核的功能状态的不同而有很大的差异。

一般来说，转录功能活跃的细胞，其核孔复合体数量较多。一个典型的哺乳动物细胞核被膜上的核孔复合体总数为 3 000~4 000 个，相当于 10~20 个/ $\mu\text{m}^2$ 。

### (一) 结构模型

核孔复合体镶嵌在内外核膜融合形成的核孔上。核孔的直径为 80~120 nm，而核孔复合体稍大一些，直径为 120~150 nm，因为它有一部分结构嵌入核被膜内。有关核孔复合体的结构一直是一个令人感兴趣的问题。自从被发现以来，不断有新的结构模型提出，但至今并不完善，仍有一些关键性的问题有待阐明。这主要是因为分离纯化核孔复合体的方法还不够完善，并且还受到电镜制样技术与观察方法的限制。研究核孔复合体形态结构的经典方法主要有 3 种：树脂包埋超薄切片技术、负染色技术和冷冻蚀刻技术。20 世纪 80 年代以来，计算机图像处理技术应用于电镜的图像分析，高分辨率场发射扫描电镜技术 (HR-FESEM) 的发展，以及快速冷冻-冷冻干燥制样技术的发展，使人们对核孔复合体的形态结构有了更深入的了解 (图 11-2)。综合已有的资料人们提出了一个最新的核孔复合体结构模型 (图 11-3)。

对于这个模型的结构组成目前有两种理解：① 从横向上看，核孔复合体由周边向核孔中心依次可分为

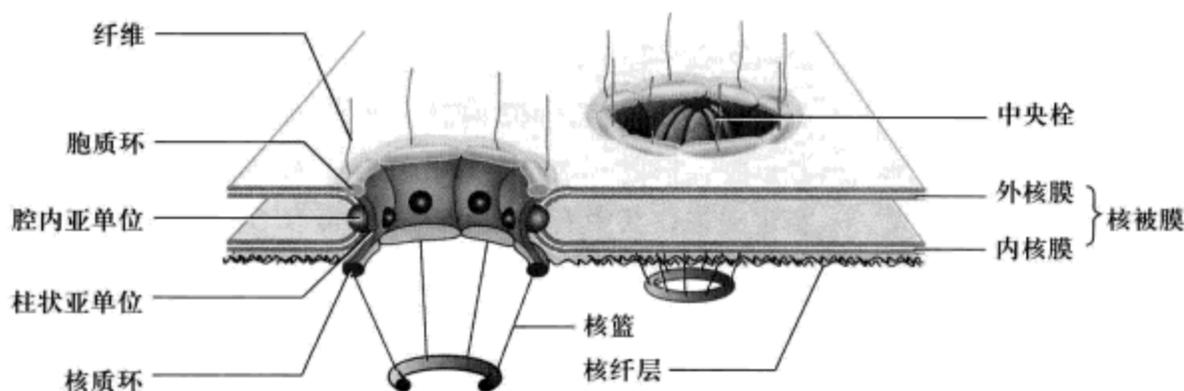


图 11-3 核孔复合体结构模型

环、辐、栓 3 种结构亚单位。② 从纵向上看，核孔复合体由核外（胞质面）向核内（核质面）依次可分为胞质环、辐（+栓）、核质环 3 种结构亚单位，形成“三明治”（sandwich）式的结构。综合起来，核孔复合体主要有以下 4 种结构组分：① 胞质环（cytoplasmic ring）：位于核孔边缘的胞质面一侧，又称外环。环上有 8 条短纤维对称分布并伸向胞质。② 核质环（nuclear ring）：位于核孔边缘的核质面一侧，又称内环。内环比外环结构复杂，环上也对称地连有 8 条细长的纤维，向核内伸入 50~70 nm。在纤维的末端形成一个直径为 60 nm 的小环，小环由 8 个颗粒构成。这样整个核质环就像一个“捕鱼笼”（fish-trap）样的结构，也有人称之为核篮（nuclear basket）结构。③ 辐（spoke）：由核孔边缘伸向中心，呈辐射状八重对称。它的结构也比较复杂，可进一步分为 3 个结构域：主要的区域位于核孔边缘，连接内、外环，起支撑作用，称作“柱状亚单位”（column subunit）。在这个结构域之外，接触核膜部分的区域称为“腔内亚单位”（luminal subunit），它穿过核膜伸入双层核膜的核周间隙。在“柱状亚单位”之内，靠近核孔复合体中心的部分称作“环带亚单位”（annular subunit），由 8 个颗粒状结构环绕形成核孔复合体核质交换的通道。④ 栓：或称中央栓（central plug），位于核孔的中心，呈颗粒状或棒状，所以又称为中央颗粒（central granule）。由于推测它在核质交换中起一定的作用，所以也把它叫做“transporter”。不过不是在所有的核孔复合体中都能观察到这种结构，因此有人认为它不是核孔复合体的结构组分，而只是正在通过核孔复合体的被转运的物质。由上述结构模型可见，核孔复合体相对于垂直于核膜通过核孔中心的轴呈辐射状八重对称结构，而相对于平行于核膜的平面则是不对称的，即核孔复合体在核质面与胞质面两侧的结构明显不对称，这与其在功能上的不对称性是一致的。

H. Ris 与 M. Malecki 运用 HR-FESEM 观察非洲爪蟾卵母细胞核膜上的核孔复合体，发现“fish-trap”并非中断且游离在核质中，而是与一种称为“cable”的网络通道相连通。这种 cable 由与“fish-trap”类似的结构单位串联而成，看上去像是“fish-trap”上的纤维与小环在核质中的周期性重复与延续。从“fish-trap”末端小环的 8 个颗粒上又发出 8 条细长的纤维，在纤维上周期性地间隔有 8 个颗粒构成的环状结构。不同的“fish-trap”发出的 cable 相互交叉，使 cable 成为一个遍布核质、相互贯通的复杂的网络。这种与“fish-trap”相连、

结构相似的 cable 有何功能尚不清楚，推测它很可能与核孔复合体的核质转运功能有关。

## （二）组成成分

核孔复合体主要由蛋白质构成，其总相对分子质量约为  $1.25 \times 10^8$ ，新近推测可能含有 30 余种不同的多肽，共 1 000 多个蛋白质分子。通过生化与遗传学技术相结合，在酵母中已鉴定出 30 余种与核孔复合体相关的蛋白质成分。迄今已鉴定的脊椎动物的核孔复合体蛋白质成分也已达 10 多种（表 11-1），其中 gp210 与 p62 是最具有代表性的两个成分，它们分别代表着核孔复合体蛋白的两种类型。实际上，核孔复合体的整个结构在进化上是高度保守的。gp210 与 p62 这两类蛋白质成分在从酵母到人的多种生物中都被发现证实，它们在不同的物种中有很强的同源性。目前人们倾向于把所有的核孔复合体蛋白统一命名为“核孔蛋白”（nucleoporin, Nup）。

gp210 代表一类结构性跨膜蛋白，是第一个被鉴定出来的核孔复合体蛋白，相对分子质量为  $2.1 \times 10^5$ ，位于核膜的“孔膜区”，故认为它在锚定核孔复合体的结构上起重要作用。目前认为 gp210 主要有 3 方面的功能：① 介导核孔复合体与核被膜的连接，将核孔复合体锚定在“孔膜区”，从而为核孔复合体组装提供一个起始位点。② 在内、外核膜融合形成核孔中起重要作用。③ 在核孔复合体的核质交换功能活动中起一定作用，如 gp210 核周间隙内肽段的抗体能够降低蛋白质入核转运的速度。

p62 代表一类功能性的核孔复合体蛋白。脊椎动物的 p62 分子主要分为两个结构域：① 疏水性 N 端区：具有 FXFG（F：苯丙氨酸，X：任意氨基酸，G：甘氨酸）形式的重复序列，这个区域可能在核孔复合体功能活动中直接参与核质交换。② C 端区：具有疏水性的 7 肽重复序列，类似一些纤维蛋白（如中间丝蛋白、核纤层蛋白）的杆状区，适合形成  $\alpha$  螺旋。这个区域可能通过卷曲螺旋与其他核孔复合体蛋白成分相互作用，从而将 p62 分子稳定到核孔复合体上，为其 N 端进行核质交换活动提供支持。p62 对核孔复合体行使正常的功能非常重要。目前，这一类核孔复合体蛋白成分已有很多被鉴定出来，其中有些像 p62 一样带有 O-连接 GlcNac 类型的糖基化修饰，并且含有一些重复序列，如 Nup153 中的 FXFG，Nup98 中的 GLFG（L：亮氨酸），也有些没有任何糖基化修饰或类似的重复序列。

表 11-1 已知的脊椎动物核孔复合体的蛋白质成分简表

蛋白质名称	对应的 NPC 结构	功能与特性
gp210	孔膜区, 跨膜蛋白	能与 ConA 结合; N 端位于膜周间隙, C 端将 NPC 锚定在核膜上
Pom121	孔膜区, 跨膜蛋白	能与 WGA 结合; C 端有 FXFG 重复序列
Nup153	"fish-trap"	能与 WGA 结合; N 端有 FXFG 重复序列; 具有锌指结构, 能够结合 DNA ( <i>in vitro</i> )
Nup180	胞质环及其纤维	不能与 WGA 结合; 其抗体对核质交换没有抑制作用; 介导 NPC 与胞质骨架的联系
Nup155	核质面与胞质面	不能与 WGA 结合
p62	中央颗粒	能与 WGA 结合; 具有 FXFG 重复序列; 其抗体对核质交换有抑制作用; 能与 p58, p54, p45 形成 p62 复合体; 与酵母的 Nsp1p 同源
p58		具有 FG 重复序列; 与酵母的 Nup49p 同源
p54		具有 FG 重复序列; 与酵母的 Nup57p 同源
p45		具有 FG 重复序列
Nup84 (大鼠) 或 Nup88 (人)	胞质环纤维	与 Nup214/CAN 结合, 并将其连接到核孔复合体上
Nup214/CAN	胞质环纤维	能与 WGA 结合
Nup107		与酵母的 Nup84p 同源
Nup98		具有 GLFG 重复序列; 与酵母的 Nup116p 同源
Nup155		与酵母的 Nup170 同源
p260/Tpr	胞质环纤维	不能与 WGA 结合

### (三) 功能

从功能上讲, 核孔复合体可以看做是一种特殊的跨膜运输蛋白复合体, 并且是一个双功能、双向性的亲水性核质交换通道。双功能表现在它有两种运输方式: 被动扩散与主动运输。双向性表现在既介导蛋白质的入核转运, 又介导 RNA、核糖核蛋白颗粒 (RNP) 的出核转运 (图 11-4)。

#### 1. 通过核孔复合体的被动扩散

核孔复合体作为被动扩散的亲水通道, 其有效直径为 9~10 nm, 有的可达 12.5 nm, 即离子、小分子以及直径在 10 nm 以下的物质原则上可以自由通过。对于球形蛋白质, 这种有效直径相当于允许相对分子质量在  $40 \times 10^3 \sim 60 \times 10^3$  的蛋白质分子自由穿过核孔。但实际上并不是所有符合这个条件的蛋白质都可以随意出入细胞核。有许多小分子的蛋白质, 如组蛋白 H1, 其相对分子质量虽只有  $2.1 \times 10^4$ , 但由于它本身带有具信号功能的氨基酸序列, 所以是通过主动运输进入细胞核的; 有的小分子蛋白质本身虽然没有信号序列, 但可以与其他有信号序列的成分结合, 一起被主动运输到核内。因此, 核孔复合体的这种被动扩散通道并不意味着所有 10 nm 以下的小分子在核被膜两侧就一定均匀分布。有

些小分子蛋白质可能会因为与其他大分子相结合, 或是一些不溶性结构成分 (如中间丝、核基质等) 结合而被限制在细胞质或细胞核内。

#### 2. 核孔复合体的主动运输

生物大分子的核质分配如亲核蛋白的核输入, RNA 分子及核糖核蛋白颗粒 (RNP) 的核输出, 在细胞核功能活性的控制中起非常重要的作用。对于真核细胞来说, 典型的哺乳类细胞的核被膜上有 3 000~4 000 个核孔 ( $10 \sim 20$  个  $\mu\text{m}^2$ )。如果细胞正在合成 DNA, 为了确保染色质包装, 则需要每 3 min 从细胞质向核内输入  $10^6$  个组蛋白分子, 这意味着每个核孔每分钟要运进 100 个组蛋白分子。如果细胞在迅速生长, 则需要每个核孔每分钟从细胞核向细胞质输出 3 对核糖体大小亚基, 以确保蛋白质合成的需要。现在已知, 这种大分子的核质分配主要是通过核孔复合体的主动运输完成的, 具有高度的选择性, 并且是双向的。其主动运输的选择性表现在以下 3 个方面: ① 对运输颗粒大小的限制。主动运输的功能直径比被动运输大, 为 10~20 nm, 甚至可达 26 nm。像核糖体亚基那样大的 RNP 也可以通过核孔复合体从核内运输到细胞质中, 表明核孔复合体的有效直径的大小是可调节的。② 通过核孔复合体的主动运输是一个信号识别与载体介导的过程, 需要消耗 ATP 能量, 并

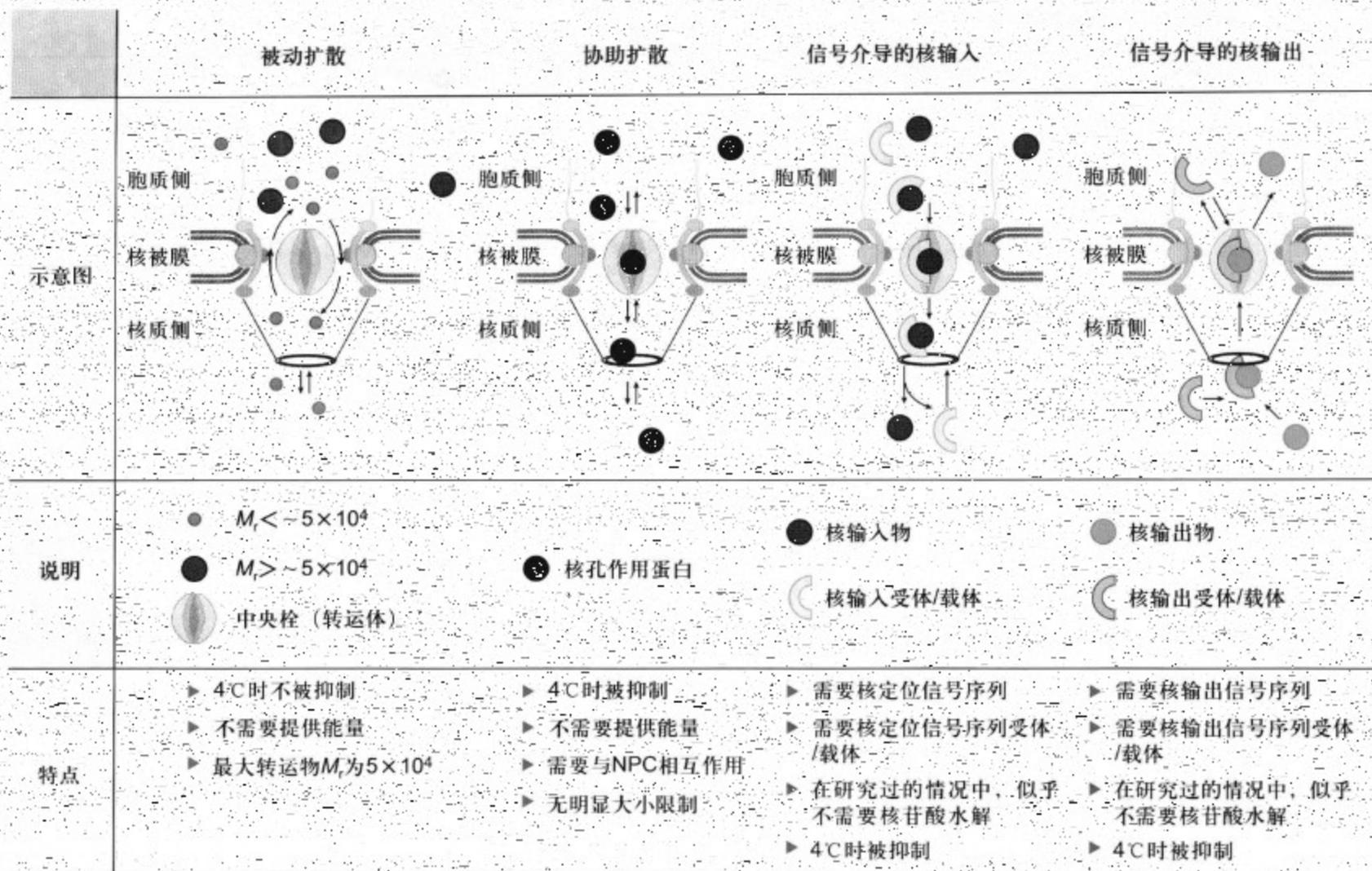


图11-4 通过核孔复合体物质运输的功能示意图

表现出饱和和动力学特征。③ 通过核孔复合体的主动运输具有双向性, 即核输入与核输出, 它既能把复制、转录、染色体构建和核糖体亚单位组装等所需要的各种因子如DNA聚合酶、RNA聚合酶、组蛋白、核糖体蛋白等运输到核内; 同时又能将翻译所需的RNA、组装好的核糖体亚单位从核内运送到细胞质。有些蛋白质或RNA分子甚至两次或多次穿越核孔复合体, 如核糖体蛋白、snRNA等。

近期对于亲核蛋白的入核转运机制的研究进展较快。亲核蛋白(karyophilic protein)是指在细胞质内合成后, 需要或能够进入细胞核内发挥功能的一类蛋白质。大多数的亲核蛋白往往在一个细胞周期中一次性地被转运到核内, 并一直停留在核内行使功能, 典型的如组蛋白、核纤层蛋白等; 但也有一些亲核蛋白需要穿梭于核质之间进行功能活动, 如importin。通过研究核质蛋白(nucleoplamin)的入核转运, 人们逐步发现了指导亲核蛋白入核的信号。亲核蛋白一般都含有特殊的氨基酸序列, 这些内含的特殊短肽保证了整个蛋白质能够通过核孔复合体被转运到细胞核内。这段具有“定

向”、“定位”作用的序列被命名为核定位序列(nuclear localization sequence)或核定位信号(nuclear localization signal, NLS)。第一个被确定序列的NLS来自猴肾病毒(SV40)的T抗原(相对分子质量 $9.2 \times 10^4$ )。这个NLS由7个氨基酸残基构成: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val。其中仅一个氨基酸残基的突变就会导致该蛋白在胞质内不正常积累。如果将这段NLS序列连接到非亲核蛋白上, 则非亲核蛋白就会被转运到核内。此后, 又陆续鉴定出一些其他亲核蛋白的NLS。目前认为NLS是存在于亲核蛋白内的一些短的氨基酸序列片段, 富含碱性氨基酸残基, 如Lys、Arg, 此外还常常含有Pro。这些氨基酸残基片段可以是一段连续的序列, 如上述SV40 T抗原的NLS; 也有分成两段存在于亲核蛋白的氨基酸序列中, 两段之间往往间隔约10个氨基酸残基, 如核质蛋白的NLS。在不同的NLS之间尚未发现共有的特征序列。与指导蛋白质跨膜运输的信号肽不同, NLS序列可存在于亲核蛋白的不同部位, 并且在指导亲核蛋白完成核输入后并不被切除。

亲核蛋白通过核孔复合体的转运是分步进行的,

根据整个过程对能量的需求可粗略分为两步：结合 (binding) 与转移 (translocation)。亲核蛋白首先结合到核孔复合体的胞质面，这一步不需要能量，但依赖正常的 NLS；随后的转移步骤则需要 GTP 水解供能。亲核蛋白除了本身具有 NLS 外，其入核转运还需要一些胞质蛋白因子的帮助。目前比较确定的因子有 importin  $\alpha$ 、importin  $\beta$ 、Ran 和 NTF2 等。在它们的参与下，亲核蛋白的入核转运可分为如下几个步骤 (图 11-5)：① 亲核蛋白通过 NLS 识别 importin  $\alpha$ ，与可溶性 NLS 受体 importin  $\alpha$ /importin  $\beta$  异二聚体结合，形成转运复合物。② 在 importin  $\beta$  的介导下，转运复合物与核孔复合体的胞质纤维结合。③ 转运复合物通过改变构象的核孔复合体从胞质面被转移到核质面。④ 转运复合物在核质面与 Ran-GTP 结合，并导致复合物解离，亲核蛋白释放。⑤ 受体的亚基与结合的 Ran 返回胞质，在胞质内 Ran-GTP 水解形成 Ran-GDP 并与 importin  $\beta$  解离，Ran-GDP 返回核内再转换成 Ran-GTP 状态。

对于 RNA 及核糖体亚基的出核转运机制了解得较少。真核细胞中 RNA 一般要经过转录后加工、修饰成为成熟的 RNA 分子后才能被转运出核。① 由 RNA 聚合酶 I 转录的 rRNA 分子，总是在核仁中与从胞质中转运进来的核糖体蛋白结合形成核糖体亚基，以 RNP 的形式离开细胞核，转运过程需要能量。② 由 RNA 聚合酶 III 转录的 5S rRNA 与 tRNA 的转运是一种由蛋白质介导的过程。③ 由 RNA 聚合酶 II 转录的核内异质 RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA)，首先需要在核内进行 5' 端加帽和 3' 端附加多腺苷酸序列 (poly A) 以及剪接等加工过程，然后形成成熟的 mRNA 出核，

出核转运也是一个需要载体的主动运输过程。真核细胞的 snRNA、mRNA 与 tRNA，无论在细胞质还是细胞核中，都是与相关的蛋白质结合在一起，即以各种 RNP 的形式存在的。所谓 RNA 的出核转运实际上是 RNA-蛋白质复合体的转运，即 RNA 的核输出离不开特殊的蛋白因子的参与，这些蛋白因子本身含有出核信号。目前人们正致力于寻找在 RNA 分子与核孔复合体之间起桥梁作用的信号与载体。现已发现一些与 RNA 共同出核的蛋白因子，如 HIV 病毒的 Rev 蛋白、转录因子 TF III A、蛋白激酶 A 抑制因子 PKI 等，含有对它们的出核转运起决定作用的氨基酸序列，命名为核输出信号 (nuclear export signal, NES)。此外，有迹象表明入核转运与出核转运之间可能有某种联系，如它们可能需要某些共同的因子。

### 三、核纤层

哺乳动物体细胞的核纤层主要由 3 种核纤层蛋白构成，它们分别是 lamin A、lamin B 以及 lamin C。其中，lamin A 和 lamin C 是同一个基因的不同拼接体 (splicing variants)，前 566 个氨基酸完全相同，但是 C 端的序列是不一样的。lamin A/C 的表达具有组织与发育时期的特异性，但 lamin B 则在哺乳动物的所有细胞中表达。在早期小鼠胚胎中，lamin A 核纤层蛋白不表达，所以它们被认为可能与细胞的分化相关。lamin B 缺失的小鼠成纤维细胞的细胞核变形、细胞分化异常、染色体倍数增加以及过早地衰老。

核纤层蛋白本身形成纤维状网络结构 (图 11-6)。

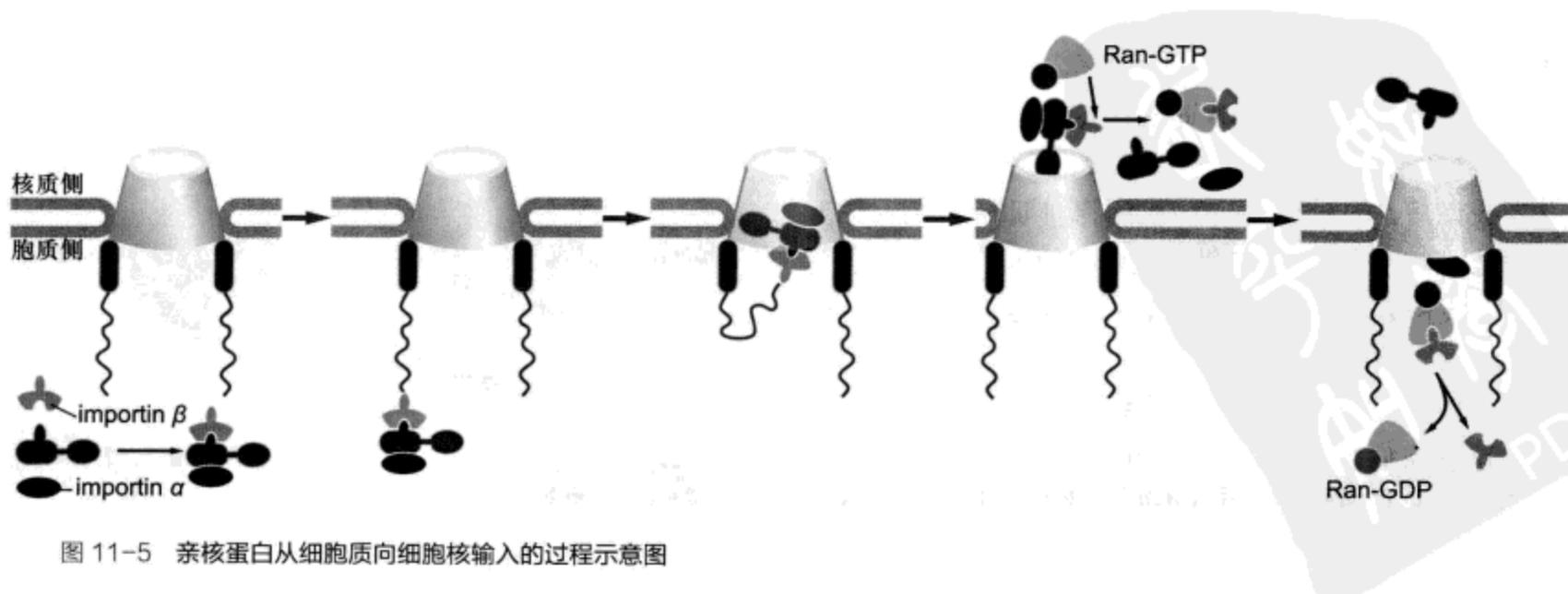


图 11-5 亲核蛋白从细胞质向细胞核输入的过程示意图

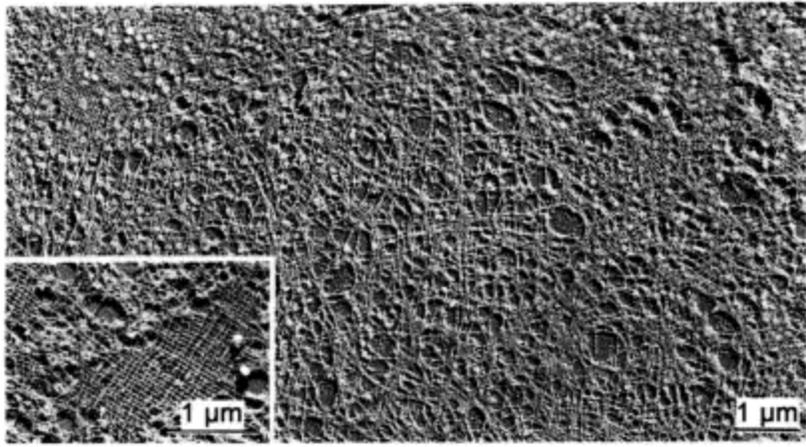


图 11-6 冷冻蚀刻电镜技术显示核纤层的纤维结构 (Uli Aebi 博士惠赠)

纤维直径与中间丝类似, 约 10 nm。所以, 有人也将核纤层蛋白认为是一类特殊的中间丝蛋白。核纤层蛋白与其他蛋白质存在结构与功能上的相互关系。这些蛋白质主要包括一些核被膜内膜蛋白 (INM protein), 如 SUN1 (Sad1-Unc84)、LAPs (lamin-associated polypeptides) 等; 核孔复合体蛋白; 细胞骨架结合蛋白, 如 Nesprin 等; 核基质与染色质结合蛋白, 如 BAF (barrier-to-autointegration factor) 等。

核纤层的功能主要包括以下几个方面: ① 结构支撑功能。核纤层蛋白形成骨架结构支撑于核被膜的内侧, 使得核被膜能起到细胞核与细胞质之间的隔离与信息交换功能。核纤层的骨架功能还得以使细胞核维持正常的形状与大小。② 调节基因表达。果蝇细胞中基因组范围的研究结果表明, 沉默基因更倾向于分布于核纤层附近, 异染色质更易与核纤层结合, 而且核纤层附近的染色质的乙酰化水平较低。然而, 在酵母细胞中活跃转录的基因也分布于核纤层附近, 它们常与核孔复合体结合。所以, 核纤层与基因表达的确切关系还不是非常清楚。很可能在不同物种的细胞中, 甚至不同组织的细胞中情况不一样。③ 调节 DNA 修复。研究表明, lamin A 核纤层蛋白是双链 DNA 断裂修复必需的。核纤层蛋白功能异常病人细胞中的基因组变得不稳定, DNA 修复反应滞后, 端粒变短。④ 与细胞周期的关系。细胞分裂过程中, 核纤层蛋白解聚成可溶的单体或与崩解后的核被膜相结合。新核形成时, 核被膜与染色质结合的同时, 核纤层也最后重新形成。

核纤层蛋白基因的突变导致的核纤层功能丧失会引起多种疾病。已知的与 lamin A 相关的疾病有 11 种之多。如 Hutchinson-Gilford 早老综合征是由于 lamin A 的 C 端的 50 个氨基酸的缺失, 非典型性 Werner 综

合征是由于 A57P、R133L 和 L140R 的氨基酸改变等。lamin B 受体功能改变则会引起 Pelger-Huët 异常疾病。

## 第二节 染色质

染色质 (chromatin) 是遗传物质的载体。1879 年, W. Flemming 提出了染色质这一术语, 用以描述细胞核中能被碱性染料强烈着色的物质。1888 年, Waldeyer 正式提出染色体的命名。经过一个多世纪的研究, 人们认识到, 染色质和染色体是在细胞周期不同阶段可以互相转变的形态结构。

染色质是指间期细胞核内由 DNA、组蛋白、非组蛋白及少量 RNA 组成的线性复合结构, 是间期细胞遗传物质存在的形式。染色体是指细胞在有丝分裂或减数分裂的特定阶段, 由染色质聚缩而成的棒状结构。实际上, 二者之间的区别主要并不在于化学组成上的差异, 而在于包装程度不同, 反映了它们在细胞周期不同的功能阶段中所处的不同的结构状态 (图 11-7)。在真核细胞的细胞周期中, 大部分时间是以染色质的形态而存在的。

如果说细胞核是细胞遗传与代谢的调控中心, 那么这个中心的最重要成员便是染色质。几乎所有细胞生

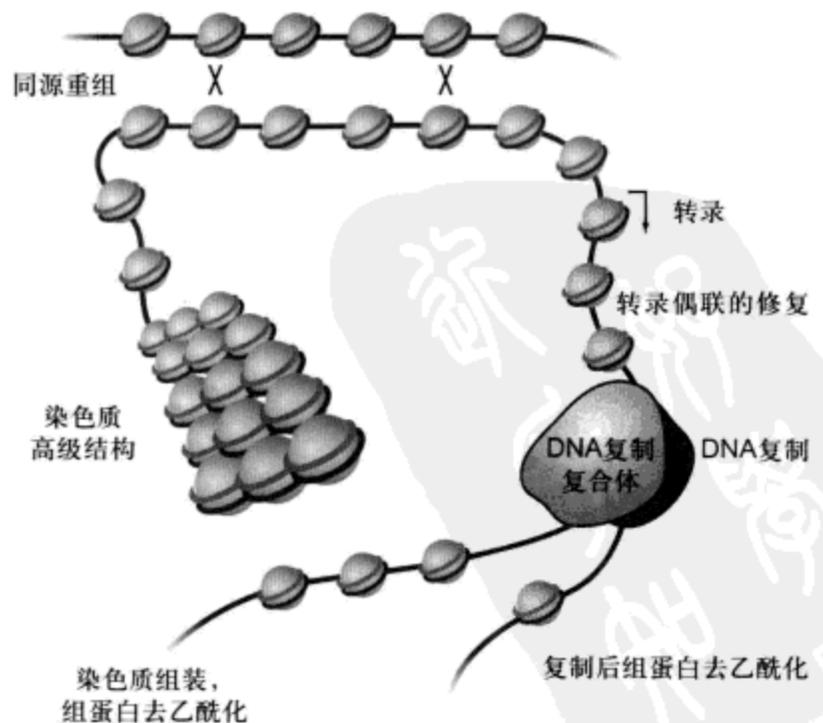


图 11-7 DNA 复制、转录和重组都是在染色质水平进行

命活动都要从染色质开始。我们知道细胞的生长、分裂甚至衰老与死亡都是受基因控制的，而细胞内基因存在与发挥功能的基础是染色质。与基因组直接相关的细胞活动都是在染色质水平进行的，如DNA复制、基因转录、同源重组、DNA修复，包括转录偶联的修复(transcription coupled repair)以及DNA和组蛋白的各种修饰(图11-7)。这些修饰包括甲基化、乙酰化、磷酸化、亚硝基化和泛素化等。

通过分离胸腺、肝或其他组织细胞的核，用去垢剂处理后再离心收集染色质进行生化分析，确定染色质的主要成分是DNA和组蛋白，还有非组蛋白及少量RNA。大鼠肝细胞染色质常被当做染色质成分分析模型，其中组蛋白与DNA含量之比近于1:1，非组蛋白与DNA之比是0.6:1，RNA/DNA比值为0.1:1。DNA与组蛋白是染色质的稳定成分，非组蛋白与RNA的含量则随细胞生理状态不同而变化。下面我们将对染色质DNA和染色质蛋白质进行详细叙述。

## 一、染色质DNA

### (一) 基因组大小比较

除部分病毒的遗传物质是RNA以外，凡是具有细胞形态的生物其遗传物质都是DNA。在真核细胞中，每条未复制的染色体包含一条纵向贯穿的DNA分子。狭义而言，某一生物的细胞中储存于单倍染色体组中的总遗传信息，组成该生物的基因组(genome)。真核生物基因组DNA的含量比原核生物高得多。大肠杆菌的基因组含 $4.6 \times 10^6$  bp，基因平均长度为1.2 kb，基因数目约4 288；而真核生物芽殖酵母基因组3~4倍于大肠杆菌，为 $1.2 \times 10^7$  bp，基因平均长度为1.4 kb，约有6 000个基因；果蝇高达40倍( $1.8 \times 10^8$  bp)，基因平均长度为11.3 kb，约有13 600个基因；人的单倍体基因组几乎高达800倍，为 $3.2 \times 10^9$  bp，基因平均长度为16.3 kb，有30 000~40 000个基因(表11-2)。然而，突变分析结果表明，并非所有基因都是细胞生存的必需基因(essential gene)，如酵母基因组有40%的基因属于非必需基因(nonessential gene)；果蝇基因组只有5 000个必需基因；最小最简单的细胞支原体(生殖支原体，*Mycoplasma genitalium*)，有迄今发现的能独立生活的有机体的最小基因组(470个基因)，其中只有256个必需基因。

表 11-2 已测序的基因组比较

物种	基因组大小 /Mb	基因数目	蛋白编码序列
细菌			
生殖支原体	0.58	470	88%
流感嗜血杆菌	1.8	1 743	89%
大肠杆菌	4.6	4 288	88%
酵母			
芽殖酵母	12	6 000	70%
裂殖酵母	12	4 800	60%
无脊椎动物			
秀丽隐杆线虫	97	19 000	25%
果蝇	180	13 600	13%
植物			
拟南芥	125	26 000	25%
水稻	440	30 000~50 000	~10%
哺乳动物			
人	3 200	30 000~40 000	1%~1.5%

Mb = 百万碱基对。

### (二) 基因组DNA类型

生物基因组DNA可以分为以下几类(以人类基因组为例)：① 蛋白编码序列，以三联体密码(triplet)方式进行编码。编码DNA在基因组中所占比例随物种而异(表11-2)，在人类细胞基因组中，这一比例为1%~1.5%。这类编码序列主要是非重复的单一DNA序列，一般在基因组中只有一个拷贝(单一基因)。然而，也可能有两个或几个拷贝甚至多达上千个拷贝的情况，这些都来自于从基因家族里派生出来的重复基因(duplicated genes in gene families)或多基因(diverged genes in gene families)。② 编码rRNA、tRNA、snRNA和组蛋白的串联重复序列。它们在基因组中一般有20~300个拷贝，人类基因组中约含0.3%这样的DNA。③ 含有重复序列的DNA。这类DNA在基因组中占有很大一部分。它们又可分为两个亚类：简单序列DNA(simple sequence DNA)和散在重复(interspersed repeats)序列。DNA转座子、LTR反转座子、非LTR反转座子和假基因都属于散在重复序列。非LTR反转座子包括短散在元件(short interspersed element, SINE)和长散在元件(long interspersed element, LINE)。典型SINE其长度少于500 bp，如人和灵长类基因组中大量分散存在的Alu家族。人基因组中有50万~70万份Alu拷贝，相当于平均每隔4 kb就有一个Alu序列。典型LINE其长度为6~8 kb，如人基因组中L1家族，有100 000个L1拷贝。④ 未分类的间隔DNA(unclassified

表 11-3 人类基因组 DNA 类型及在基因组中含量

种类	长度	人类基因组中的拷贝数	人类基因组中的含量 /%
蛋白编码序列			
单一基因	可变	1	约 15 <sup>*</sup> (0.8 ↑)
双重基因或基因家族里分出的基因	可变	2 至约 1 000	约 15 <sup>*</sup> (0.8 ↑)
编码 rRNA、tRNA、snRNA 和组蛋白的串联重复基因	可变	20~300	0.3
重复序列 DNA			
简单序列 DNA	1~500 bp	可变	3
散在重复序列			
DNA 转座子	2~3 kb	300 000	3
LTR 反转座子	6~11 kb	440 000	8
非 LTR 反转座子			
LINE	6~8 kb	860 000	21
SINE	100~300 bp	1 600 000	13
编译假基因	可变	1 至约 100	约 0.4
未分类的间隔 DNA	可变	n.a.	约 25

\* 表示包括内含子的完整转录单位；↑ 表示编码蛋白的外显子。人类基因组编码蛋白的基因有 30 000~35 000 个，但这一数目可能被低估。n.a. 表示：不适用于此。来源于：E. S. Lander *et al.*, *Nature*, 2001, 409:860。

spacer DNA) (表 11-3)。

此外，真核细胞基因组中还含有高度重复 DNA 序列。每个基因组中至少含 105 拷贝，约占脊椎动物总 DNA 的 10%。高度重复 DNA 序列由一些短的 DNA 序列呈串联重复排列，可进一步分为几种不同类型：① 卫星 DNA (satellite DNA)，重复单位长 5~100 bp，不同物种重复单位碱基组成不同，一个物种也可能含有不同的卫星 DNA 序列。主要分布在染色体着丝粒部位，如人类染色体着丝粒区的  $\alpha$ -卫星 DNA 家族，其功能不明。② 小卫星 DNA (minisatellite DNA)，重复单位长 12~100 bp，重复 3 000 次之多，又称数量可变的串联重复序列。每个小卫星区重复序列的拷贝数是高度可变的，因此早前常用于 DNA 指纹技术 (DNA finger-printing) 做个体鉴定。研究发现小卫星序列的改变可以影响邻近基因的表达，基因的异常表达会导致一系列不良后效应。③ 微卫星 DNA (microsatellite DNA)，重复单位序列最短，只有 1~5 bp，串联成簇长度 50~100 bp。人类基因组中至少有 30 000 个不同的微卫星位点，具高度多态性 (polymorphism)，在不同个体间有明显差别，但在遗传上却是高度保守的，因此可作为重要的遗传标记，用于构建遗传图谱 (genetic map) 及个体鉴定等。

生物的遗传信息储存在 DNA 的核苷酸序列中，生物界物种的多样性也寓于 DNA 分子 4 种核苷酸千变万化的排列之中。DNA 分子不仅一级结构具有多样性，而且二级结构也具有多态性。所谓二级结构是指两条多核苷酸链反向平行盘绕所生成的双螺旋结构。DNA 二级结构构型分 3 种：B 型 DNA (右手双螺旋 DNA) 是“经典”的 Watson-Crick 结构，二级结构相对稳定，水溶液和细胞内天然 DNA 大多为 B 型 DNA，A 型 DNA 是一般 B 型 DNA 的重要变构形式，同样是右手双螺旋 DNA，其分子形状与 RNA 的双链区和 DNA/RNA 杂交分子很相近；第三种是 Z 型 DNA，呈左手螺旋，也是 B 型 DNA 的变构形式。

3 种构型 DNA 中，大沟的特征在遗传信息表达过程中起关键作用。基因表达调控蛋白都是通过其分子上特定的氨基酸侧链与沟中碱基对两侧潜在的氢原子供体 (=NH) 或受体 (O 和 N) 形成氢键而识别 DNA 遗传信息的。由于大沟和小沟中这些氢原子供体和受体各异以及排列不同，所以大沟携带的信息要比小沟多。此外，沟的宽窄及深浅也直接影响碱基对的暴露程度，从而影响调控蛋白对 DNA 信息的识别。B 型 DNA 是活性最高的 DNA 构型，变构后的 A 型 DNA 仍有较高活性，变构后的 Z 型 DNA 活性明显降低。人们推测，在生理

状态下, 由于细胞内各种化学修饰的影响和结合蛋白的作用有可能使 3 种构型的 DNA 处于一种动态转变之中。此外, DNA 双螺旋能进一步扭曲盘绕形成特定的高级结构, 正、负超螺旋是 DNA 高级结构的主要形式。DNA 二级结构的变化与高级结构的变化是相互关联的, 这种变化在 DNA 复制、修复、重组与转录中具有重要的生物学意义。

## 二、染色质蛋白

与染色质 DNA 结合的蛋白质负责 DNA 分子遗传信息的组织、复制和阅读。这些 DNA 结合蛋白包括两类: 一类是组蛋白 (histone), 与 DNA 结合但没有序列特异性; 另一类是非组蛋白 (nonhistone), 与特定 DNA 序列或组蛋白相结合。

### (一) 组蛋白

组蛋白是构成真核生物染色体的基本结构蛋白, 富含带正电荷的 Arg 和 Lys 等碱性氨基酸, 等电点一般在 pH 10.0 以上, 属碱性蛋白质, 可以和酸性的 DNA 紧密结合, 而且一般不要求特殊的核苷酸序列。用聚丙烯酰胺凝胶电泳可以区分 5 种不同的组蛋白: H1、H2A、H2B、H3 和 H4。几乎所有真核细胞都含有这 5 种组蛋白, 而且含量丰富, 每个细胞每种类型的组蛋白约有  $6 \times 10^7$  个分子。表 11-4 列举了 5 种组蛋白的一些特性。

5 种组蛋白在功能上分为两组: ① 核小体组蛋白 (nucleosomal histone), 包括 H2A、H2B、H3 和 H4。这 4 种组蛋白有相互作用形成复合体的趋势, 它们通过 C 端的疏水氨基酸 (如 Val, Ile) 互相结合, 而 N 端带正电荷的氨基酸 (Arg、Lys) 则向四面伸出以便与 DNA 分子结合, 从而帮助 DNA 卷曲形成核小体的稳

定结构。这 4 种组蛋白没有种属及组织特异性, 在进化上十分保守, 特别是 H3 和 H4 是所有已知蛋白质中最为保守的。例如牛和豌豆的 H4 组蛋白的 102 个氨基酸残基中仅有 2 个不同, 而它们的分歧时间已有 3 亿年的历史。从这种保守性可以看出, H3 和 H4 的功能几乎涉及它们所有的氨基酸, 任何位置上氨基酸残基的突变可能对细胞都将是有害的。② H1 组蛋白。其分子较大 (215 个氨基酸)。球形中心在进化上保守, 而 N 端和 C 端两个“臂”的氨基酸变异较大, 所以 H1 在进化上不如核小体组蛋白那么保守。在构成核小体时 H1 起连接作用, 它赋予染色质以极性。H1 有一定的种属和组织特异性。在哺乳类细胞中, 组蛋白 H1 约有 6 种密切相关的亚型, 氨基酸序列稍有不同。在成熟的鱼类和鸟类的红细胞中, H1 为 H5 取代。有的生物如芽殖酵母缺少 H1。

### (二) 非组蛋白

与染色质组蛋白不同, 非组蛋白主要是指与特异 DNA 序列相结合的蛋白质, 所以又称序列特异性 DNA 结合蛋白 (sequence specific DNA binding protein)。利用非组蛋白与特异 DNA 序列亲和的特点, 通过凝胶延滞实验 (gel retardation assay), 可以在细胞抽提物中进行检测。首先制备一段带有放射性标记的已知特异序列的 DNA, 将要检测的细胞抽提物与标记 DNA 混合, 进行凝胶电泳。未结合蛋白质的自由 DNA 在凝胶上迁移最快, 而与蛋白质结合的 DNA 迁移慢, 一般结合的蛋白质分子越大, DNA 分子的延滞现象越明显, 然后通过放射性自显影分析, 即可发现一系列 DNA 带谱, 每条带分别代表不同的 DNA-蛋白质复合物。每条带相对应的结合蛋白随后再通过细胞抽提物组分分离方法被进一步分开。

非组蛋白具有以下特性:

表 11-4 5 种组蛋白的某些特性

种类	类型	碱性氨基酸			酸性氨基酸	碱性氨基酸 / 酸性氨基酸	氨基酸残基数	相对分子质量	核小体上位置
		Lys	Arg	Lys/Arg					
H1	极度富含 Lys	29%	1%	29	5%	6.0	215	23 000	连接
H2A	同上	11%	9%	1.2	15%	1.3	129	14 500	核心
H2B	同上	16%	6%	2.7	13%	1.7	125	13 774	核心
H3	轻度富含 Lys	10%	13%	0.77	13%	1.8	135	15 324	核心
H4	富含 Arg	11%	14%	0.79	10%	2.5	102	11 822	核心

(1) 非组蛋白具有多样性 非组蛋白占染色质蛋白的 60%~70%，不同组织细胞中其种类和数量都不相同，代谢周转快。包括多种参与核酸代谢与修饰的酶类如 DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶、高速泳动族蛋白 (high mobility group, HMP)、染色体支架蛋白、肌动蛋白和基因表达调控蛋白等。

(2) 识别 DNA 具有特异性 能识别特异的 DNA 序列，识别信息来源于 DNA 核苷酸序列本身，识别位点存在于 DNA 双螺旋的大沟部分，识别与结合靠氢键和离子键。在不同的基因组之间，这些非组蛋白所识别的 DNA 序列在进化上是保守的。这类序列特异性 DNA 结合蛋白具有一个共同特征，即形成与 DNA 结合的螺旋区并具有蛋白二聚化的能力。

(3) 具有功能多样性 虽然与 DNA 特异序列结合的蛋白质在每个真核细胞中只有 10 000 个分子左右，约占细胞总蛋白的 1/50 000，但它们具有多方面的重要功能，包括基因表达的调控和染色质高级结构的形成。如帮助 DNA 分子折叠，以形成不同的结构域；协助启动 DNA 复制，控制基因转录，调节基因表达。

### 三、核小体

20 世纪 70 年代以前，人们关于染色质结构的传统看法认为，染色质是组蛋白包裹在 DNA 外面形成的纤维状结构。直到 1974 年 Kornberg 等人根据染色质的酶切和电镜观察，发现核小体 (nucleosome) 是染色质组装的基本结构单位，提出染色质结构的“串珠”模型，从而更新了人们关于染色质结构的传统观念。

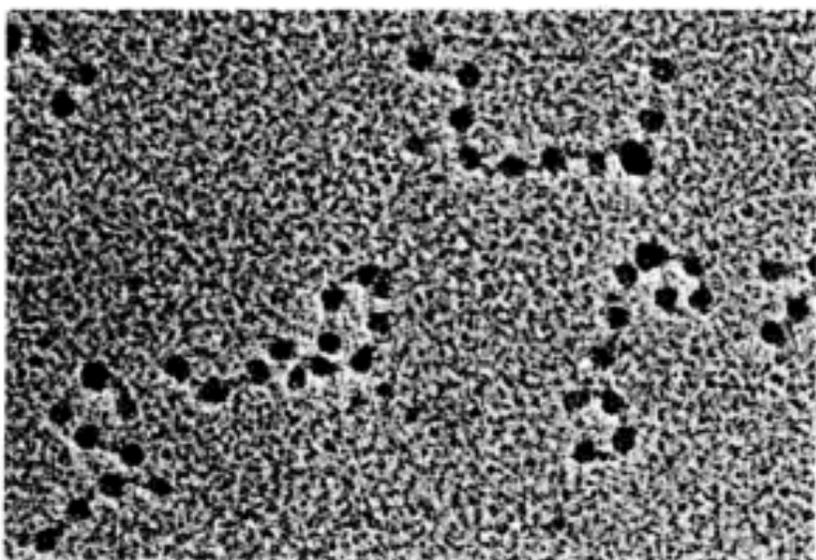


图 11-8 透射电镜显示串珠状 11 nm 的核小体结构 (李国红博士惠赠)

#### (一) 核小体的发现

(1) 用温和的方法裂解细胞核，将染色质铺展在电镜铜网上，通过电镜观察，未经处理的染色质自然结构为 30 nm 的纤丝，经盐溶液处理后解聚的染色质呈现一系列核小体彼此连接的串珠状结构，串珠的直径为 11 nm (图 11-8)。

(2) 用非特异性微球菌核酸酶 (micrococcal nuclease) 消化染色质时，经过蔗糖梯度离心及琼脂糖凝胶电泳分析，发现绝大多数 DNA 被降解成大约 200 bp 的片段；如果部分酶解，则得到的片段是以 200 bp 为单位的单体、二体 (400 bp)、三体 (600 bp) 等。蔗糖梯度离心得到的不同组分，在波长 260 nm 的吸收峰的大小和电镜下所见到的单体、二体和三体的核小体组成完全一致。如果用同样方法处理裸露的 DNA，则产生随机大小的片段群体。从而提示染色体 DNA 除某些周期性位点之外均受到某种结构的保护，避免核酸酶的接近。

(3) 应用 X 射线衍射、中子散射和电镜三维重建技术，研究染色质结晶颗粒，发现核小体颗粒是直径为 11 nm、高 6.0 nm 的扁圆柱体，具有二分对称性 (dyad symmetry)。核心组蛋白的构成是先形成  $(H3)_2 \cdot (H4)_2$  四聚体，然后再与两个  $H2A \cdot H2B$  异二聚体结合形成八聚体 (图 11-9)。

(4) SV40 微小染色体 (minichromosome) 分析。用 SV40 病毒感染细胞，病毒 DNA 进入细胞后，与宿主的组蛋白结合，形成串珠状微小染色体，电镜观察 SV40 DNA 为环状，周长 1 500 nm，约 5.0 kb。若

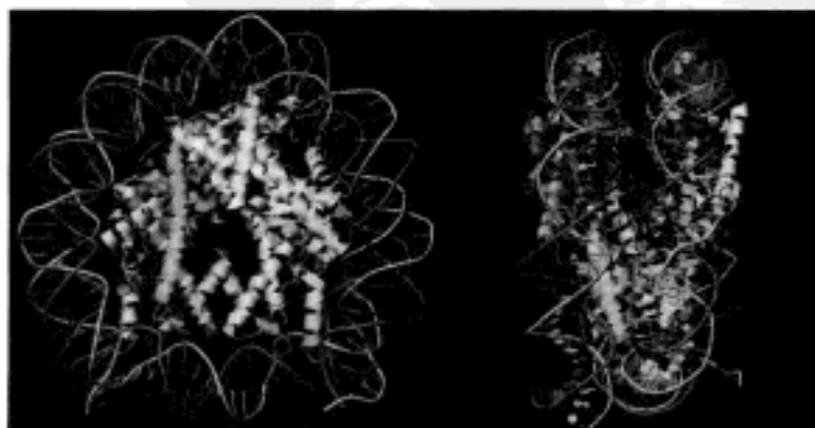


图 11-9 由 X 射线晶体衍射所揭示的人类细胞核小体三维结构  
A. 通过 DNA 超螺旋中心轴所显示的核小体核心颗粒 8 个组蛋白分子的位置。B. 垂直于中心轴的角度所见到的核小体核心颗粒的盘状结构。(基于 PDB 数据 3AFA 结构绘制)

200 bp 相当于一个核小体，则可形成 25 个核小体，实际观察到 23 个，与推断基本一致。如用 0.25 mol/L 盐酸将 SV40 溶解，可在电镜下直接观察到组蛋白的聚合体。若除去组蛋白，则完全伸展的 DNA 长度恰好为 5.0 kb。

## (二) 核小体的结构

(1) 每个核小体单位包括 200 bp 左右的 DNA 超螺旋和一个组蛋白八聚体以及一个分子的组蛋白 H1 (图 11-10)。

(2) 组蛋白八聚体构成核小体的盘状核心颗粒，相对分子质量为  $100 \times 10^3$ ，由 4 个异二聚体组成，包括两个 H2A·H2B 和两个 H3·H4。

(3) 146 bp 的 DNA 分子超螺旋盘绕组蛋白八聚体 1.75 圈。组蛋白 H1 在核心颗粒外结合额外 20 bp DNA，锁住核小体 DNA 的进出端，起稳定核小体的作用。

(4) 两个相邻核小体之间以连接 DNA (linker DNA) 相连，典型长度为 60 bp，不同物种变化值为 0-80 bp 不等 (图 11-10)。

(5) 组蛋白与 DNA 之间的相互作用主要是结构性的，基本不依赖于核苷酸的特异序列。正常情况下不与组蛋白结合的 DNA (如噬菌体 DNA 或人工合成的 DNA)，当与从动、植物中分离纯化的组蛋白共同孵育时，可以体外组装成核小体亚单位。

(6) 核小体沿 DNA 的定位受不同因素的影响。如非组蛋白与 DNA 特异性位点的结合，可影响邻近核小体的相位 (positioning)；DNA 盘绕组蛋白核心的弯曲也是核小体相位的影响因素，因为富含 AT 的 DNA 片段优先存在于 DNA 双螺旋的小沟，而富含 GC 的 DNA 片段优先存在于 DNA 双螺旋的大沟，结果核小体倾向于形成富含 AT 和富含 GC 区的理想分布，从而通过核小体相位改变影响基因表达。

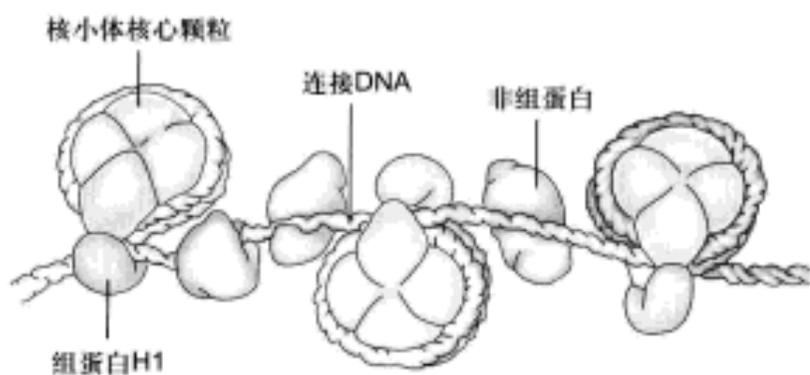


图 11-10 核小体的结构要点示意图

## 四、染色质组装

人的每个体细胞所含 DNA 约  $6 \times 10^9$  bp，分布在 46 条染色体中，总长达 2 m，平均每条染色体 DNA 分子长约 5 cm。然而，细胞核直径只有 5-8  $\mu\text{m}$ ，这就意味着从染色质 DNA 组装成染色体要压缩近万倍，相当于一个网球内包含有 2 km 长的细线。

### (一) 染色质组装的前期过程

图 11-11 是关于 DNA 组装成染色质的整个过程的描述。① 最开始是 H3·H4 四聚体 (两个异二聚体) 的结合，由 CAF-1 (chromatin assembly factor 1) 介导与新合成的裸露的 DNA 结合。② 然后是两个 H2A·H2B 异二聚体由 NAP-1 和 NAP-2 (nucleosome assembly protein) 介导加入。为了形成一个核心颗粒，新合成的组蛋白被

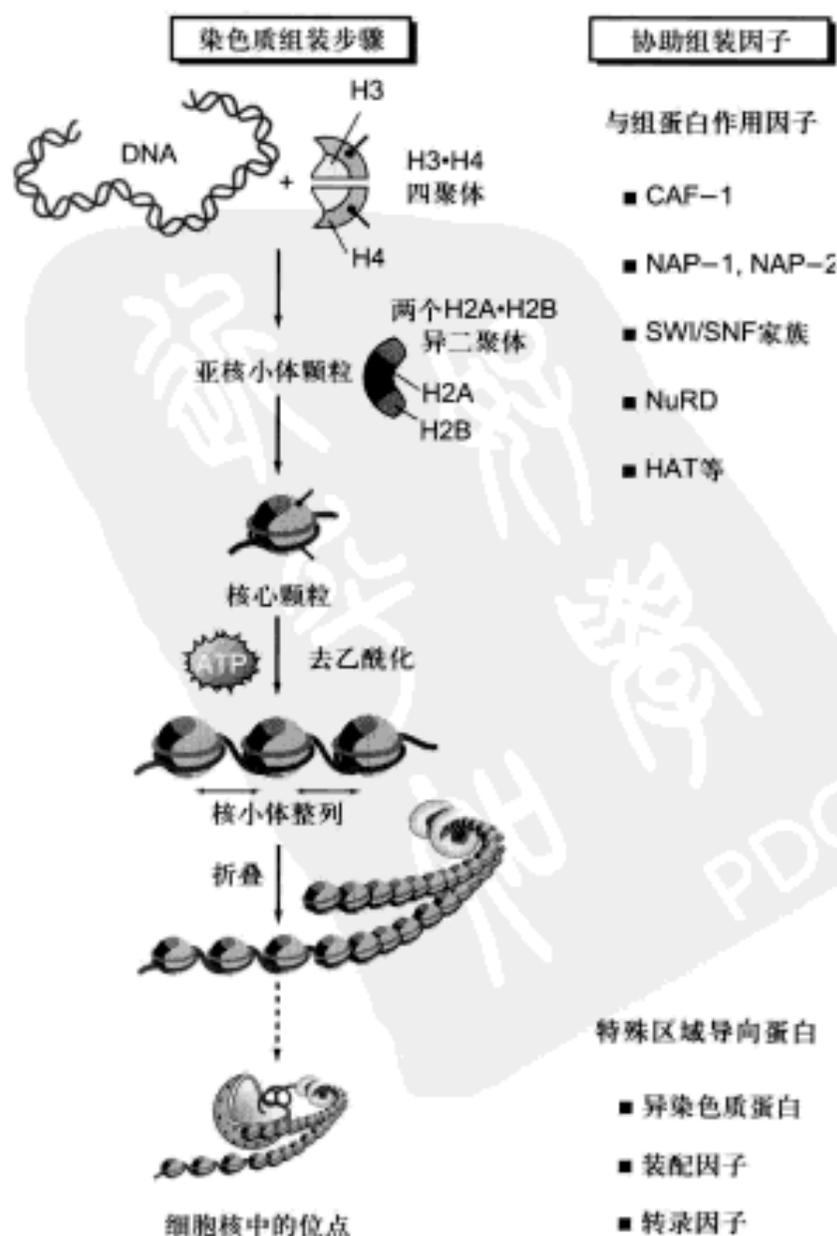


图 11-11 DNA 组装成染色质的过程及各阶段的协助组装因子

特异地修饰。组蛋白 H4 的 Lys5 和 Lys12 两个位点被乙酰化。③ 核小体最后的成熟需要 ATP 来创建一个规则的间距以及组蛋白的去乙酰化。ISWI 和 SWI/SNF 家族的蛋白参与此过程的调节。连接组蛋白 (H1) 的结合伴随着核小体的折叠。④ 6 个核小体组成一个螺旋或由其他的组装方式形成一个螺线管结构 (下面将详细讨论)。⑤ 进一步的折叠事件将使染色质在细胞核中最终形成确定的结构。在图的右侧列出了各个环节中相应的参与因子, 这些因子对于促进整个组装过程的顺利进行发挥了重要的作用。

这样一个高度压缩的结构极大地阻碍了像转录这样的细胞核活动的进行。为了解决这个问题, 有两个家族的染色质修饰酶在染色质上作用, 使染色质更接近于转录机器。第一个家族是通过在组蛋白尾部的共价修饰而发挥作用, 这些修饰包括组蛋白的磷酸化、乙酰化和泛素化等, 它们会影响以后与 DNA 或组蛋白相互作用因子的作用。第二个家族成员的主要特点是它们能够利用 ATP 水解时释放的能量来破坏核小体中的组蛋白-DNA 接触 (染色质结构与基因表达的关系将在下一节中详细叙述)。

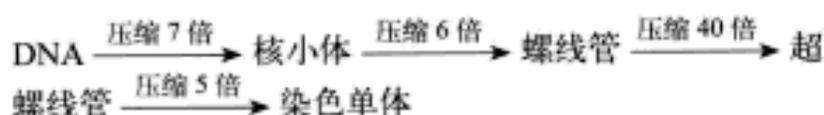
染色质组装的前期过程, 即从裸露 DNA 组装成直径 30 nm 的螺线管已有直接的实验证据, 并被绝大多数科学家认可。然而, 染色质如何进一步组装成更高级结构, 直至最终成染色体的过程尚不是非常清楚, 目前主要有两种模型。

## (二) 染色质组装的多级螺旋模型

由 DNA 与组蛋白组装成核小体, 在组蛋白 H1 的介导下核小体彼此连接形成直径约 10 nm 的核小体串珠结构, 这是染色质组装的一级结构。不过在细胞中, 染色质很少以这种伸展的串珠状形式存在。当细胞核经温和处理后, 在电镜下往往会看到直径为 30 nm 的染色质纤维。在有组蛋白 H1 存在的情况下, 由直径 10 nm 的核小体串珠结构螺旋盘绕, 每圈 6 个核小体, 形成外径 25~30 nm, 螺距 12 nm 的螺线管 (solenoid)。组蛋白 H1 对螺线管的稳定起着重要作用。螺线管是染色质组装的二级结构。

Bak 等 (1977) 从人胎儿离体培养的分裂细胞中分离出染色体, 经温和处理后, 在电镜下看到直径 0.4  $\mu\text{m}$ , 长 11~60  $\mu\text{m}$  的染色线, 称为单位线 (unit fiber)。在电镜下观察, 判明单位线是由螺线管进一步螺旋化形成直径为 0.4  $\mu\text{m}$  的圆筒状结构, 称为超螺线管 (supersolenoid), 这是染色质组装的三级结构。这种超螺线管进一步螺旋

折叠, 形成长 2~10  $\mu\text{m}$  的染色单体, 即染色质组装的四级结构。根据多级螺旋模型 (multiple coiling model), 从 DNA 到染色体经过四级组装:



经过四级螺旋组装形成的染色体结构, 共压缩了 8 400 倍。

## (三) 染色质组装的放射环结构模型

Laemmli 等人用 2 mol/L 的 NaCl 或硫酸葡聚糖加肝素处理 HeLa 细胞中期染色体, 除去组蛋白和大部分非组蛋白后, 在电镜下可观察到由非组蛋白构成的染色体骨架 (chromosomal scaffold) 和与骨架相连的无数的 DNA 侧环。此外, 实验观察发现, 一些特殊染色体如: 两栖类卵母细胞的灯刷染色体或昆虫细胞的多线染色体, 几乎都含有类似的袢环结构域 (loop domain), 从而提示袢环结构可能是染色体高级结构的普遍特征 (表 11-5)。

关于染色体骨架和染色质袢环的研究, 使染色体袢环结构模型近年来引起人们的重视。该模型认为, 30 nm 的染色线折叠成环, 沿染色体纵轴, 由中央向四周伸出, 构成放射环, 即染色体的骨架-放射环结构模型 (scaffold radial loop structure model)。J. Painta 和 D. Coffey (1984) 对该模型进行了较详细的描述: 首先是直径 2 nm 的双螺旋 DNA 与组蛋白八聚体构建成连续重复的核小体串珠结构, 其直径 10 nm。然后按每圈 6 个核小体为单位盘绕成直径 30 nm 的螺线管。由螺线管形成 DNA 复制环, 每 18 个复制环呈放射状平面排列, 结合在核基质上形成微带 (miniband)。微带是染色体高级

表 11-5 DNA 袢环的一般性质

DNA 袢环特征	平均数	数值范围
每个环的碱基数 /bp	63 000	30 000~100 000
每个环占有 DNA 的长度 / $\mu\text{m}$	21.1	10~34
每个环所含有的核小体数	315	150~500
环线的直径 /nm	30	30
每个环所含螺线管的盘绕数	52	25~83
环的长度 / $\mu\text{m}$	0.52	0.52~0.83
环的高度 / $\mu\text{m}$	0.26	0.12~0.41
DNA 的压缩比	40	40
每个体细胞的总复制环数	95 000	60 000~400 000

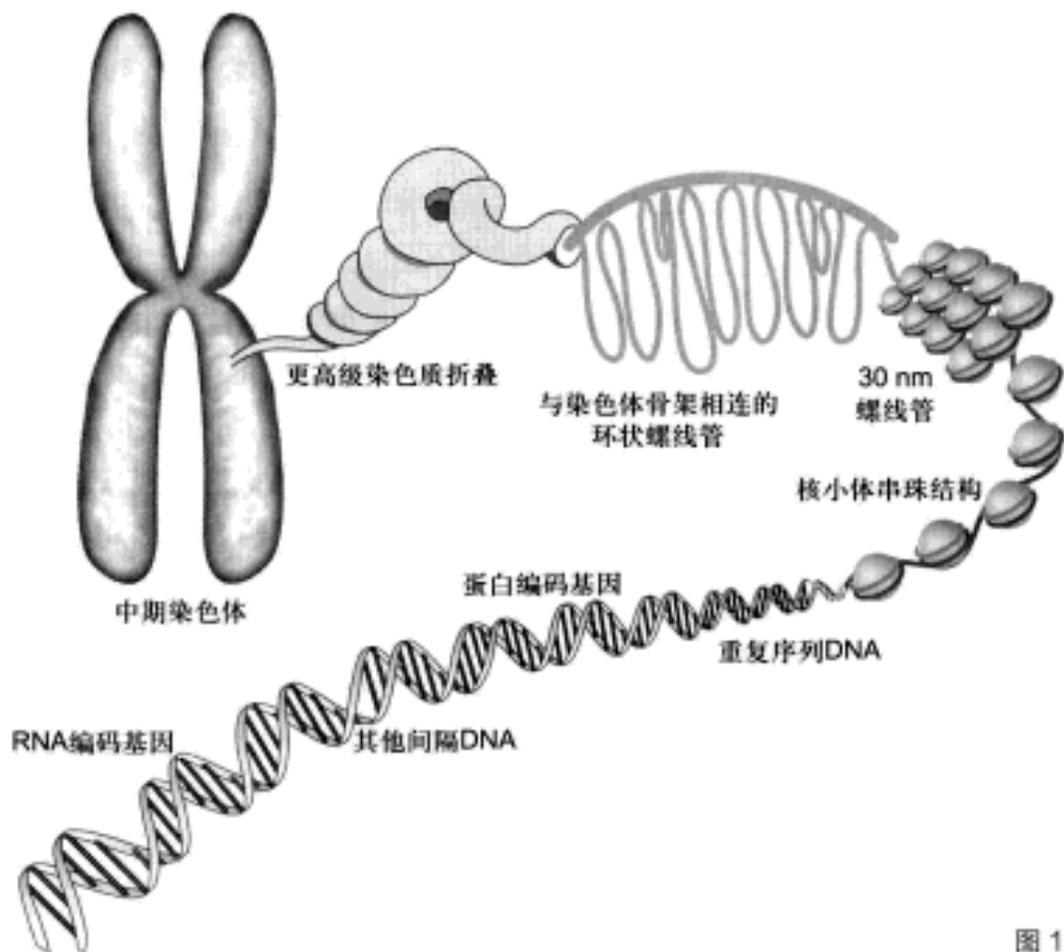


图 11-12 基因组结构和染色质组装一览图

结构的单位，大约  $10^6$  个微带沿纵轴构建成子染色体。

上述两种关于染色体高级结构的组织模型，前者强调螺旋化，后者强调环化与折叠。二者都有一些实验与观察的证据，也许在不同的组装阶段这些机制共同起作用。图 11-12 是融两种机制在内的染色质组装模型。

## 五、染色质类型

间期染色质按其形态特征、活性状态和染色性能区分为两种类型：常染色质 (euchromatin) 和异染色质 (heterochromatin)。

### (一) 常染色质与异染色质

常染色质是指间期细胞核内染色质纤维折叠压缩程度低，相对处于伸展状态，用碱性染料染色时着色浅的那些染色质。在常染色质中，DNA 组装比为  $1/2\ 000 \sim 1/1\ 000$ ，即 DNA 实际长度为染色质纤维长度的  $1\ 000 \sim 2\ 000$  倍。构成常染色质的 DNA 主要是单一序列 DNA 和中度重复序列 DNA (如组蛋白基因和 tRNA 基因)。常染色质并非所有基因都具有转录活性，处于常染色质状态只是基因转录的必要条件，而不是充分条件。

异染色质是指间期细胞核中染色质纤维折叠压缩

程度高，处于聚缩状态，用碱性染料染色时着色深的那些染色质。异染色质又分结构异染色质或组成型异染色质 (constitutive heterochromatin) 和兼性异染色质 (facultative heterochromatin)。结构异染色质指的是各种类型的细胞中，在整个细胞周期均处于聚缩状态，没有较大变化的异染色质。在间期核中，结构异染色质聚集形成多个染色中心 (chromocenter)。在哺乳类细胞中，这些染色中心随细胞类型和发育阶段不同而变化。结构异染色质有如下特征：① 在中期染色体上多定位于着丝粒区、端粒、次缢痕及染色体臂的某些节段。② 由相对简单、高度重复的 DNA 序列构成，如卫星 DNA。③ 具有显著的遗传惰性，不转录也不编码蛋白质。④ 在复制行为上与常染色质相比表现为晚复制、早聚缩。⑤ 占有较大部分核 DNA，在功能上参与染色质高级结构的形成，导致染色质区间性，作为核 DNA 的转座元件，引起遗传变异。兼性异染色质是指在某些细胞类型或一定的发育阶段，原来的常染色质聚缩，并丧失基因转录活性，变为异染色质。这类兼性异染色质的总量随不同细胞类型而变化，一般胚胎细胞含量很少，而高度特化的细胞含量较多，说明随着细胞分化，较多的基因渐次以聚缩状态而关闭，从而再也不能接近基因活化蛋白。因此，染色质通过紧密折叠

压缩可能是关闭基因活性的一种途径。例如雄性哺乳类细胞的单个 X 染色体呈常染色质状态；而雌性哺乳类体细胞的核内，两条 X 染色体之一在发育早期随机发生异染色质化而失活。在上皮细胞核内，这个异固缩的 X 染色体称性染色质或巴氏小体 (Barr body)。因此，检查羊水中胚胎细胞的巴氏小体可以预报胎儿的性别。在多形核白细胞的核内，此 X 染色体形成特殊的“鼓槌”结构。

## (二) 常染色质与异染色质间的转变

有些染色质并不是固有的异染色质或常染色质，而是在异染色质或常染色质之间随着发育时期或细胞周期的变化而相互转化。异染色质与常染色质之间的转变常常需要伴随着一些组蛋白与 DNA 修饰。如图 11-13 所示，由常染色质转变成异染色质时，H3S10 (组蛋白 H3 第十位丝氨酸) 位上首先要被 JIL-1 磷酸酶去磷酸化，同时 HDAC1 负责 H3K9 的去乙酰化，这样使得 H3K9 (组蛋白 H3 第九位赖氨酸) 位点的甲基化 (由 Su (Var) 3-9 负责) 得以进行，而这是异染色质化的一个重要标志。除此之外，H3K4 位点上的甲基则需要被 LSD1 去甲基化。H3K9 甲基化使得异染色质蛋白 HP1 能够顺利与染色质结合，HP1 的多聚化能够使得染色质进一步浓缩。在这一过程中，染色质组装因子 CAF-1 (chromatin assembly factor 1) 也起着非常重要的调节作用。H3K9 的甲基化也伴随着 H3K27 的甲基化和 H4K20 的甲基化。它们共同决定最终异染色质的形成。另一方面，由异染色质转变为常染色质的过程

则伴随着基本上相反的组蛋白修饰过程。DNA 甲基化在决定染色质的异染色质化 / 常染色质化过程中也起着重要的调节作用。

## (三) 活性染色质与非活性染色质

按功能状态的不同可将染色质分为活性染色质 (active chromatin) 和非活性染色质 (inactive chromatin)。对绝大多数细胞而言，在特定阶段具有转录活性的基因只占基因总数的 10% 以下，而 90% 以上的基因在转录上是不活跃的。所谓活性染色质是指具有转录活性的染色质，非活性染色质是指没有转录活性的染色质。

活性染色质由于核小体构型发生改变，往往具有疏松的染色质结构，从而便于转录调控因子与顺式调控元件结合和 RNA 聚合酶在转录模板上滑动。当染色质结构处于疏松状态时，利用核心组蛋白 H3 暴露出来的游离巯基与有机汞的亲合性，可采用有机汞亲和层析和二硫苏糖醇 (DTT) 洗脱的方法将活性染色质分离出来。

### 1. 活性染色质对 DNase I 超敏感

当染色质用 DNase I 消化时，可将染色质降解成酸溶性的 DNA 小片段。若从鸡红细胞中提取染色质进行上述处理，发现  $\beta$ -珠蛋白基因很快就被降解，而卵清蛋白基因的降解程度则很低。相反，若从鸡输卵管细胞中提取染色质作同样处理，则优先降解的是卵清蛋白基因而不是  $\beta$ -珠蛋白基因。结果表明，凡有基因表达活性的染色质 DNA 对 DNase I 的降解作用比没有转录活性的染色质 DNA 要敏感得多。进一步发

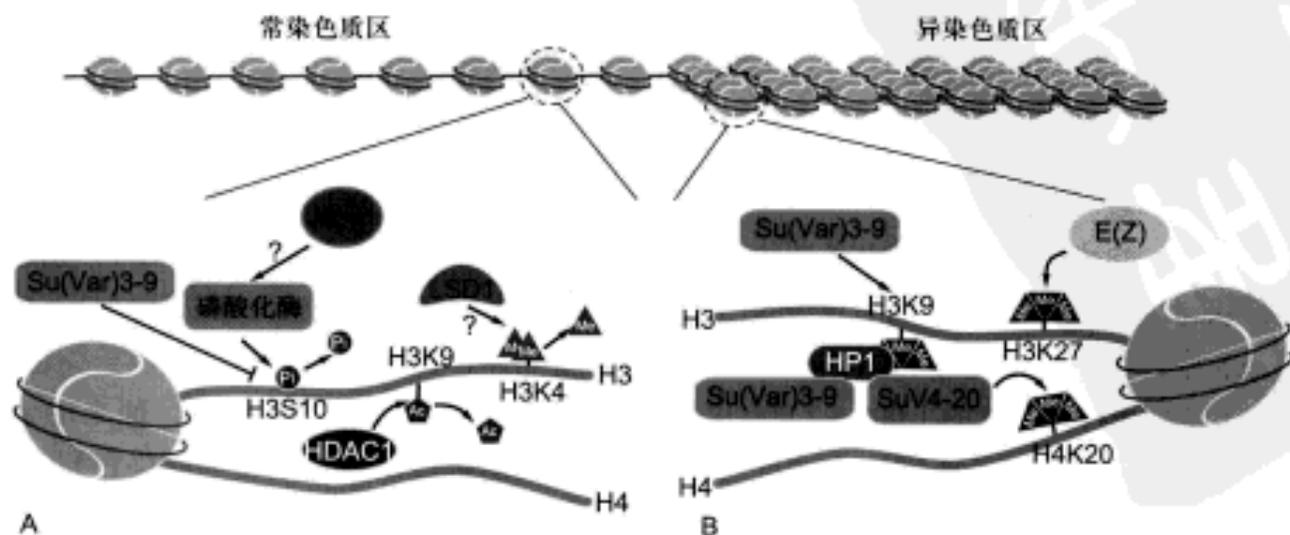


图 11-13 常染色质与异染色质转变过程中伴随的组蛋白修饰的变化

A. 常染色质相关组蛋白修饰 (绿色和蓝色)。如: H3K10 的磷酸化、H3K9 的乙酰化及 H3K4 的甲基化。B. 与异染色质形成和维持直接相关的特异组蛋白修饰 (红色)。如: H3K9、H3K27 及 H4K20 的甲基化。

现，正在转录或具有潜在转录活性而未转录的基因对 DNase I 同样敏感，说明活化染色质对 DNase I 的优先敏感性 (preferential sensitivity) 不是由于转录过程中 RNA 聚合酶的作用，而是可转录染色质的一个基本特征。用 DNase I 处理染色质时，优先释放出两种 HMG 非组蛋白，它们是 HMG14 和 HMG17。当把这两种非组蛋白从鸡红细胞染色质中用低盐溶液抽提出来以后，珠蛋白基因就不再表现出对 DNase I 的优先敏感性，而在盐抽提过的染色质中加入这两种非组蛋白后，敏感性又可恢复，说明活化染色质对 DNase I 的优先敏感性与这两种非组蛋白有关。然而，把这两种蛋白质加入盐抽提过的鸡脑细胞染色质后，其中的珠蛋白基因并不表现出对 DNase I 优先敏感性，说明这些 HMG 蛋白不是造成这种优先敏感性的唯一原因。红细胞和脑细胞中一定还存在其他因子的差异，这些因子决定了红细胞的珠蛋白基因在 HMG14 和 HMG17 存在时对 DNase I 敏感。

如用很低浓度的 DNase I 处理染色质，切割将首先发生在少数特异性位点上，这些特异性位点叫做 DNase I 超敏感位点 (DNase I hypersensitive site)。超敏感位点的存在是活性染色质的特点，若用游离 DNA 作底物则无超敏感位点出现。通过对大量基因进行试验发现，每个活跃表达的基因都有一个或几个超敏感位点，大部分位于基因 5' 端启动子区域，少部分位于其他部位如转录单位的下游。并且发现，5' 端超敏感位点只出现在基因正在活跃表达的细胞中，而该基因不表达的细胞中则不存在。例如，对于鸡  $\beta$ -珠蛋白基因族，胚胎阶段超敏感位点出现在胚胎型基因而不是成体型基因的 5' 端；而在成体阶段情况则恰好相反，超敏感位点出现在成体型而不是胚胎型  $\beta$ -珠蛋白基因的 5' 端。这说明超敏感位点和基因活性有一定的关系。现已知道，超敏感位点实际上是一段长 100~200 bp 的 DNA 序列特异暴露的染色质区域。由超敏感位点所代表的染色质结构变化，可能在于超敏感序列首先与其他蛋白质结合而阻止核小体的组装。这样，该序列不被组蛋白八聚体所保护，所以一个典型的超敏感位点区对核酸酶攻击的敏感性是其他染色质区域的 100 倍以上。活性基因的超敏感位点建立在启动子附近，并与启动子功能有关，很可能是为 RNA 聚合酶、转录因子或其他蛋白调控因子提供结合位点。现有证据表明 5' 端超敏感位点的建立发生在转录起始之前，但很可能是起始转录的必要条件而非充分条件。有人为说明超敏感

位点的稳定性，用温度敏感的肿瘤病毒转化导致珠蛋白基因的激活，并建立超敏感位点；如果转化在非许可的较高温度下完成，则珠蛋白基因不被激活，也不出现超敏感位点；在低温下珠蛋白基因被转化激活后，若提高温度可使其失活而不表达，但已建立的超敏感位点却至少要保持到细胞复制 20 次以后。这一结果也证实了超敏感位点的建立只是起始转录所必要的特征之一，但建立超敏感位点的事件与保持该位点的事件可能是不同的。

## 2. 活性染色质的蛋白组成与修饰变化

根据对活性染色质蛋白组分的生化分析发现：① 活性染色质很少有组蛋白 H1 与其结合。② 活性染色质的 4 种核心组蛋白虽然以常量存在，但是与非活性染色质相比较，活性染色质上的组蛋白乙酰化程度高。③ 活性染色质的核小体组蛋白 H2B 与非活性染色质相比较，很少被磷酸化。④ 核小体组蛋白 H2A 在许多物种包括果蝇和人的活性染色质中很少有变异的形式存在。⑤ 最新研究表明，组蛋白 H3 的变种 H3.3 只在活跃转录的染色质中出现。⑥ HMG 蛋白是染色体非组蛋白中一组较丰富、不均一、富含电荷的蛋白质。其中 HMG14 和 HMG17 只存在于活性染色质中，与 DNA 结合。平均每 10 个核小体中有 1 个核小体是与 HMG14 和 HMG17 结合的，其氨基酸序列在进化中高度保守，表明其具有重要功能。

许多研究工作已经清楚地表明，一些组蛋白的修饰直接影响染色质的活性。这些修饰包括甲基化、乙酰化和磷酸化。乙酰化一般是活性染色质的标志 (下面会详细叙述)，而甲基化和磷酸化则在活性染色质与非活性染色质中都存在。不同组蛋白或同一组蛋白的不同氨基酸残基上的修饰决定染色质处于活性或非活性状态。图 11-14 举例说明了 H3 组蛋白的修饰与染色质活性的关系。活性染色质的标志是：H3 N 端第 4 个赖氨酸的甲基化，第 9 和 14 个赖氨酸的乙酰化以及第 10 个丝氨酸的磷酸化；非活性染色质的标志是：H3 N 端第 9 个赖氨酸



图 11-14 H3 组蛋白修饰与染色质活性的关系

酸甲基化而不是乙酰化。此外，其他蛋白修饰如泛素化 (ubiquitination) 修饰也可在组蛋白上发生，如 H2A119 位赖氨酸和 H2B120 位赖氨酸都可被泛素化修饰，然而这些修饰与染色质活性的关系目前还不是非常清楚。

及其修饰是否存在半保留复制机制？鉴于近年来表观遗传学研究的快速发展，相信核小体的复制机制也将终被解释。

### 第三节 染色质的复制与表达

#### 一、染色质的复制与修复

细胞分裂对于生命的维持至关重要（见细胞周期与细胞分裂一章）。细胞分裂的第一步是遗传信息的复制。遗传信息的复制不仅仅是 DNA 的复制，同时包括 DNA 的载体——核小体的复制，两者正常复制是染色质复制的基础。DNA 的复制已经研究得比较深入，但在此不予详述（请参考生物化学或分子遗传学的有关教科书）。核小体的复制是如何进行的至今并不清楚。比如，组蛋白

#### (一) 染色质的复制

在真核生物细胞周期的 S 期，染色质的完全复制不仅需要基因组 DNA 的复制，也需要把复制好的 DNA 组装成染色质。普遍认为，在复制叉移动的同时，染色质短暂地解组装，然后在两条复制好的子代 DNA 链上重新进行组装。新复制的 DNA 主要通过以下两种途径组装成染色质：第一，在复制叉的移动期间，父代的核小体核心颗粒与 DNA 分离，到该段 DNA 复制完成，父代的核小体核心颗粒直接转移到两条子链 DNA 的一条上；第二，染色质组装因子利用刚刚合成的、乙酰化的组蛋白介导核小体在复制 DNA 上组装。图 11-15 显示的是异染色质区域染色质复制的模型以及相关的调节因子。

#### (二) 染色质的修复与基因组稳定性

染色质的形成，特别是高度浓缩的染色质结构对基

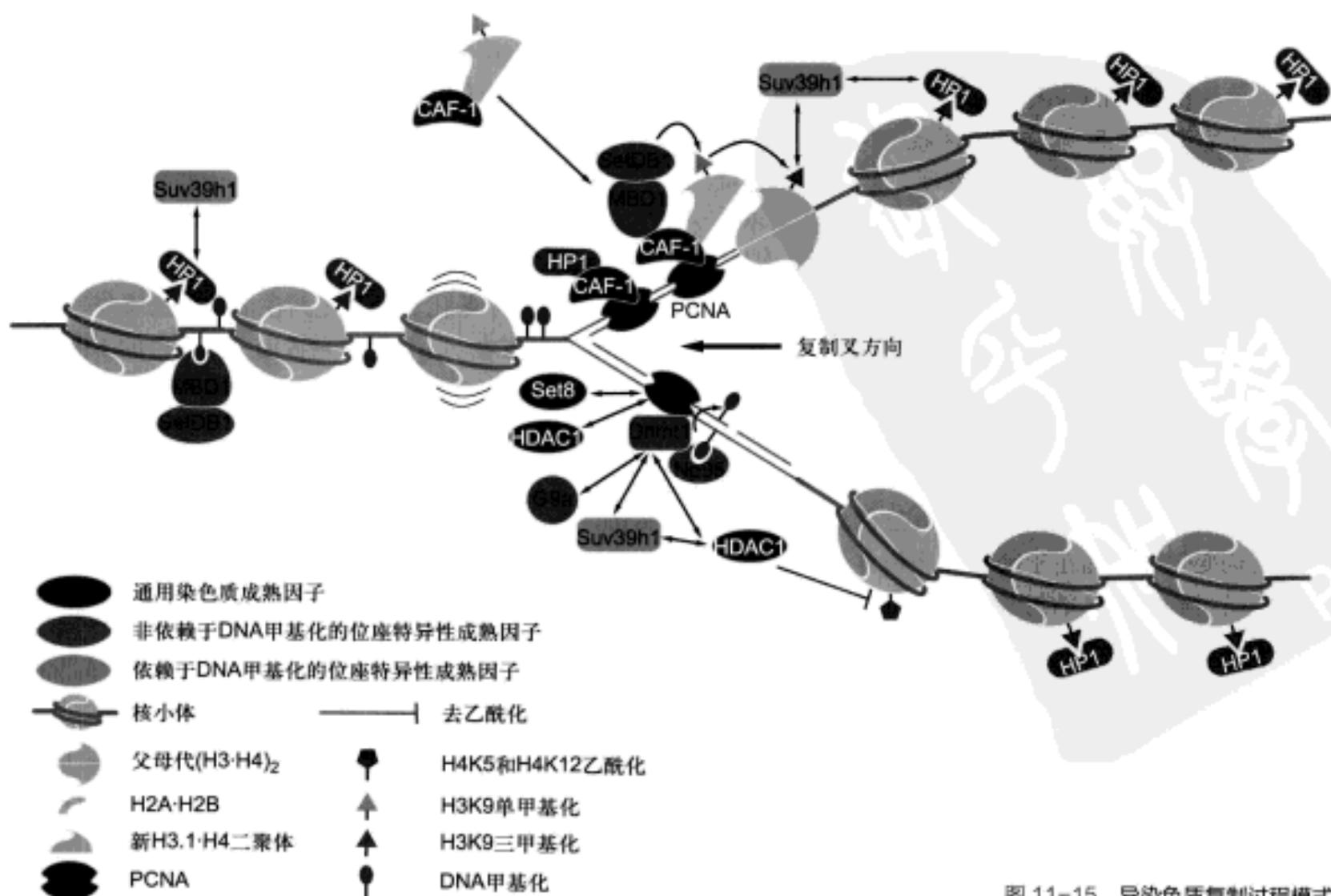


图 11-15 异染色质复制过程模式图

基因组 DNA (染色质 DNA) 具有重要的保护作用。然而, 即使如此, 因为细胞中的染色质 DNA 随着细胞周期的变化会暴露或部分暴露于其周围环境中, 所以, 基因组 DNA 会受到细胞内外化学的与物理的因素的作用而产生突变。这种突变有些是致命的, 首先导致相关基因功能的丧失, 然后导致细胞的死亡或癌化。不过, 细胞中存在一整套的 DNA 修复机器来应对各种各样的 DNA 突变 (有关具体内容请见细胞周期与细胞分裂一章)。细胞一旦丧失了 DNA 修复的部分或全部能力, 细胞的基因组就会变得不稳定。基因组的不稳定性是直接导致肿瘤发生的重要原因之一。

此外, 修复好的 DNA 必须及时地与组蛋白结合, 组装成染色质。否则, 裸露的 DNA 很容易被重新突变或断裂。在修复后的 DNA 组装成染色质的过程中 (这一过程称染色质修复, chromatin restoration), 染色质组装因子 CAF-1, 组蛋白乙酰转移酶 Tip60, 染色质重塑因子 SWI 等起着重要的调节作用。

## 二、染色质的激活与失活

随着 20 世纪 70 年代核小体结构的发现, 科学家们提出了一个重要问题, 那就是 RNA 聚合酶、转录因子等非组蛋白如何能与同组蛋白核心紧密结合的 DNA 相互作用? 事实上, 有证据表明, DNA 与核小体组蛋白的结合会阻断 DNA 与转录因子及基础转录装置的接近, 从而阻断了转录的进行。但同时, 又有些证据表明, DNA 在与组蛋白形成复合物的情况下仍可被转录。所以, 这其中的关键问题是虽然 DNA 都被包装成染色质, 但染色质存在不同的活性状态。当前染色质结构改变与基因活化的关系的研究主要集中在如下 3 个方面: 一是如何形成活性染色质, 以便 RNA 聚合酶能起始转录; 二是具有转录活性的染色质结构域如何与周围的非活性区域隔离; 三是 RNA 聚合酶如何通过染色质模板结合进行转录。

### (一) 染色质的激活

染色质的疏松状态源于核小体的结构改变或核小体的解聚。根据核小体结构与功能关系, 可能有以下原因:

#### 1. DNA 结构与核小体相位的变化

和细胞其他部分一样, 染色质并不是一个静止的结构, 而是一个动态、可塑的蛋白质与核酸组成的复合

体。当一个调控蛋白结合到染色质 DNA 的一个特定的位点上时, 不管是在核小体间还是在一个核小体内, 染色质都很容易被引发二级结构的改变。这些改变使得其他的一些结合位点与调控蛋白的结合变得要么更加容易, 要么更加困难。有证据表明, 结合到 DNA 上的基因调控蛋白在相当远的地方都能发生其影响。比如, 某一特定的转录因子结合到一段离基因编码区较远的增强子序列上后, 有利于在该基因较近的 TATA 盒序列上进行前起始复合体的组装。该复合体一旦组装后, 就可以作为转录因子与其他调控因子结合的“靶点”, 结果使染色质上某一特定区域从转录非活化状态转变成转录活化状态。似乎细胞具有某些“工具”能撬开被核小体阻断的 DNA 区域, 从而允许转录因子与 DNA 接触。例如酵母和人类细胞具有一种多亚基复合物 SWI/SNF, 利用 ATP 水解释放的能量破坏组蛋白-DNA 之间的相互作用, 使转录因子得以同基因调控区结合 (图 11-16)。此外, 不同的拓扑异构酶能调整 DNA 双螺旋的局部构象和高级结构的变化, 使之超螺旋化或松弛。实验发现, 拓扑异构酶 II 抑制果蝇 *hsp* 基因的转录; 拓扑异构酶 I 分布于果蝇多线染色体中具转录活性的基因座上; B 型 DNA (右旋) 变成 Z 型 DNA (左旋), 会导致核心组蛋白八聚体与 DNA 的亲合力降低。核小体并非沿 DNA 随机分布, 而通常是定位在特殊位点。一种情况

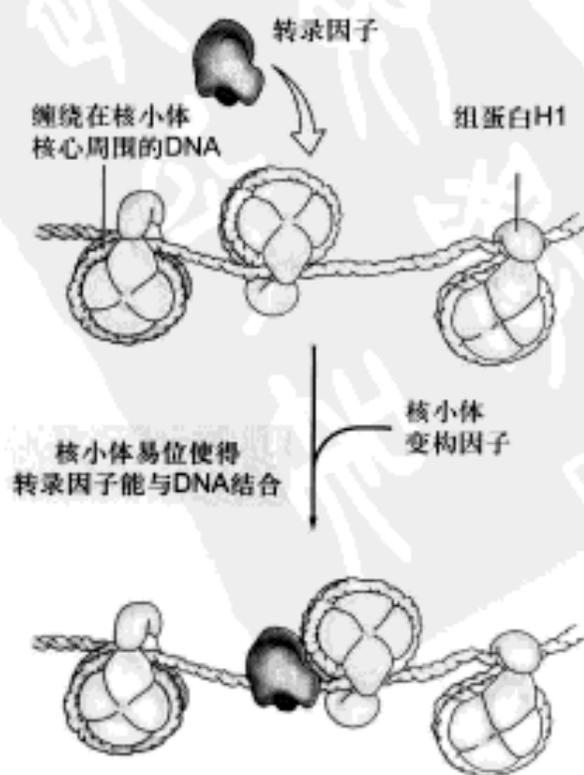


图 11-16 核小体变构因子通过改变核小体的相位而调节染色质的活性

是基因关键调控元件（增强子和启动子）位于核小体颗粒之外，使之便于与转录因子结合；另一种情况是基因调控元件位于盘绕核心组蛋白的 DNA 上，则增强子和启动子两种调控元件通过转录因子被联系起来。

## 2. 组蛋白的修饰

组成核小体的组蛋白八聚体的 N 端都暴露在核小体之外，某些特殊的氨基酸残基会发生乙酰化、甲基化、磷酸化或 ADP 核糖基化等修饰。这些基团修饰的意义：一是改变染色质的结构，直接影响转录活性；二是核小体表面发生改变，使其他调控蛋白易于和染色质相互接触，间接影响转录活性。

(1) 核心组蛋白的赖氨酸残基乙酰化 (acetylation) 组蛋白的赖氨酸残基乙酰化是核小体变构的一种重要方式。乙酰化后的组蛋白赖氨酸侧链不再带有正电荷，这样就失去了与 DNA 紧密结合的能力，使相邻核小体的聚合受阻，同时影响泛素与组蛋白 H2A 的结合，导致蛋白质的选择性降解。H3 和 H4 是蛋白酶修饰的主要组蛋白，它们的乙酰化可能有类似促旋酶 (gyrase) 的活性，使核小体间的 DNA 因产生过多的负超螺旋而易于从核小体上脱离，致使对核酸酶敏感性增高，并有利于转录调控因子的结合。负责组蛋白乙酰化的酶已经被鉴定。此外，近年来还发现大量的辅激活子 (coactivator) 具有组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferase) 的功能，将乙酰基从乙酰 CoA 供体转移到组蛋白特异的赖氨酸残基上 (图 11-17)。辅激活子作为一种接头蛋白，在 DNA 上游位点将转录因子同基础转录装置连接

起来。通过具有组蛋白乙酰基转移酶活性的辅激活子的作用，特定的启动子可被看做是核小体解体的起始点。由许多激素受体所介导的基因转录可以说明这一途径。当激素受体与 DNA 上相应的激素应答元件 (hormone response element) 结合时，同时与 CBP 辅激活子相互作用，CBP 辅激活子使位于核心启动子区的核小体的组蛋白侧链乙酰化，进而打开启动子并促使转录装置的组装，最终导致相关基因的转录。另一个很好的例子是在酵母中激活因子指导的组蛋白 N 端的超乙酰化。激活因子 GCN4 的 DNA 结合域与其调控基因的上游激活序列 UAS (upstream activating sequence) 结合，然后它的激活结构域与一些组蛋白乙酰化酶复合物相互作用，GCN5 的催化亚基就是这样的乙酰化酶之一。随后对 GCN4 结合的附近核小体组蛋白 N 端尾巴的大量乙酰化促使基础转录因子与 DNA 的结合 (图 11-18)。

染色质的乙酰化状态是一种动态过程。细胞内既存在使组蛋白乙酰化的酶即组蛋白乙酰化酶 (histone acetylase)，也存在使组蛋白去乙酰化的酶即组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase)。组蛋白去乙酰化伴随着对转录的抑制。实际上有许多转录辅助抑制因子 (transcriptional co-repressor) 作为组蛋白去乙酰化酶而发挥作用。在酵母中，抑制因子能够指导组蛋白 N 端尾巴的去乙酰化。图 11-18 显示的是抑制因子 UME6 的 DNA 结合域与它所调控的基因的特异的上游控制因子 (URS1) 相互作用，UME6 的抑制结构域 RD (repression domain) 与 SIN3 结合，SIN3 是一个去乙酰化酶复合物

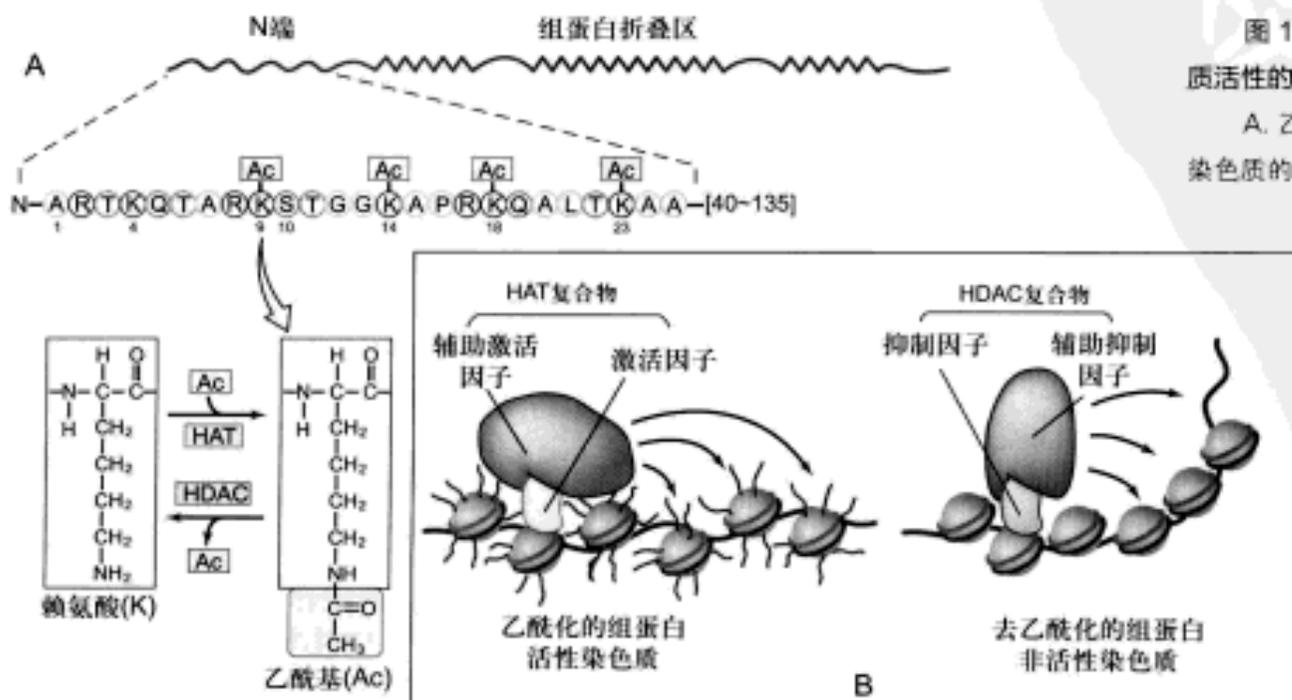


图 11-17 乙酰化和去乙酰化对染色质活性的影响

A. 乙酰化和去乙酰化的位置。B. 导致染色质的变化。

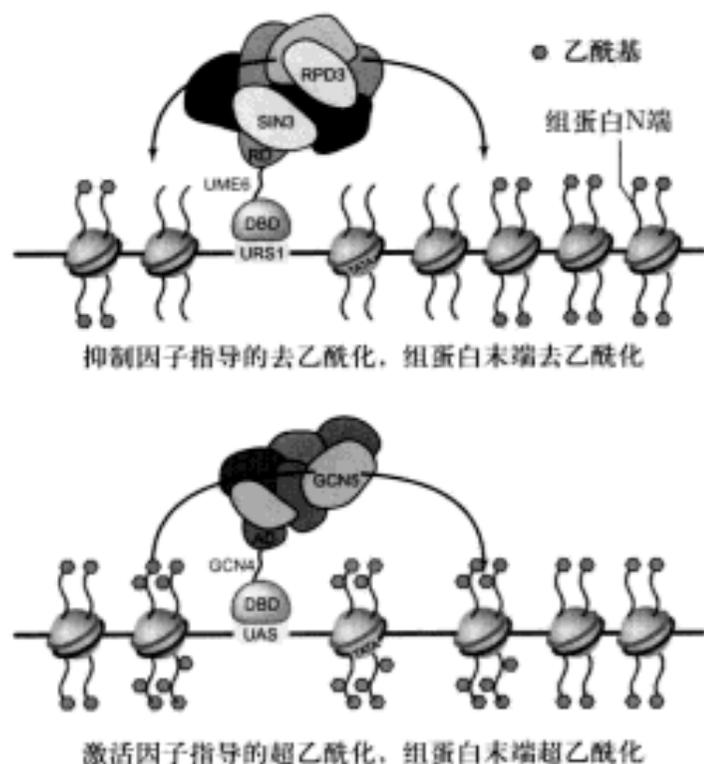


图 11-18 酵母组蛋白乙酰化与去乙酰化控制转录的作用机制

URS: 上游抑制序列 (upstream repression sequence); UAS: 上游激活序列; RD: 抑制结构域; AD: 激活结构域。

的成分之一, RPD3 也是这个复合物的成员。对 URS1 附近的组蛋白 N 端尾巴的去乙酰化使得通用转录因子不能与 TATA 盒结合从而抑制基因转录。

(2) 组蛋白 H1 的磷酸化 (phosphorylation) 组蛋白 H1 丝氨酸残基的磷酸化主要发生在有丝分裂期, 细胞分裂后其磷酸化水平下降到峰值的 20%。由于 H1 在染色质组装过程中发挥重要作用, 它确定核小体的方向, 并对 30 nm 的螺线管起维持稳定的作用, 因此, H1 磷酸化必然导致染色质疏松, 直接影响染色质的活性。

(3) 不同组蛋白修饰之间的关系 如前所述, 乙酰化一般是活性染色质的标志, 而甲基化和磷酸化则在活性染色质与非活性染色质中都存在。组蛋白 H3K9 的甲基化在调节基因表达、染色质组装和异染色质的形成过程中发挥重要作用。然而, H3S10 的短暂磷酸化足以使 H3K9 甲基化引起的染色质浓缩变得疏松。这是一个两种组蛋白修饰同时调节染色质组装状态的典型例子: 稳定的甲基化和动态的磷酸化标记。

### 3. HMG 蛋白的影响

高速泳动族非组蛋白 HMG1 和 HMG2 有 A、B 和 C 3 个结构域: A、B 结构相似, C 含有酸性的羧基尾部, 与 H1 结合。RNA 聚合酶 I 相关的转录因子 UBF 的 DNA 结合域是 85 个氨基酸残基的重复区, 与 HMG1 和 HMG2 的 A、B 结构相似, 所以这种特征性结构被命

名为“HMG”结构域。与这一结构域相应的 DNA 序列称为“HMG box”, 而具有一个或多个 HMG 结构域的蛋白质称为 HMG 结构域蛋白。HMG 结构域蛋白有细胞特异性, 根据结构域拷贝数、序列识别特性和进化关系等分为两个亚簇: 一个亚簇广泛存在于各种细胞中, 如 HMG1 和 HMG2, UBF (RNA 聚合酶 I 的转录因子)。该类蛋白一般有多个 HMG 结构域, 没有 DNA 识别特异性, 执行不同的功能。另一个亚簇只存在于特定的细胞中, 能识别特异的 DNA 序列, 只有一个 HMG 结构域, 如淋巴细胞增强子结合因子 LEF-1 (lymphoid enhancer binding factor 1)、TCF-1 (T-cell factor 1) 和 SRY (sex determining region of the Y chromosome)。

HMG 结构域蛋白结合在 DNA 双螺旋的小沟中, 以 40 倍的优势选择富含嘧啶的核苷酸元件。HMG 结构域蛋白的功能之一是与 DNA 弯折和 DNA-蛋白质复合体高级结构的形成有关。研究发现, HMG 结构域可识别某些异型的 DNA 结构, 使 DNA 链产生  $90^{\circ} \sim 130^{\circ}$  的弯折。一般来说, 150 bp 的 DNA 双链很难自发形成环状结构, 但在非特异的 HMG1 存在时, 可改变 DNA 双螺旋结构而形成 66 bp 的 DNA 环。具转录活性的核小体常缺乏 H1, 但有非组蛋白 HMG14、HMG17 存在。在爪蟾中发现 HMG17 会促进 RNA 聚合酶 III 的转录, HMG14 则直接参与 RNA 聚合酶 II 对染色质中基因的转录。

## (二) 染色质的失活

### 1. X 染色体失活

通过比较有活性的 X 染色体 ( $X_a$ ) 与失活的 X 染色体 ( $X_i$ ), 我们可以发现: 雌性哺乳动物中失活的 X 染色体上的 H4 组蛋白不发生乙酰化, 而雄性中有活性的 X 染色体上的 H4 都是乙酰化的, 前者不表达, 后者表达。用乙酰化 H4 的抗体标记人和小鼠的中期染色体, 除  $X_i$  外, 其他染色体都被标记, 所以中期染色体上 H4 乙酰化程度的高低, 可代表基因转录活性的高低。据推算 H2B、H3、H4 可能具有 30 多种不同的乙酰化方式, 而每种乙酰化方式都可能使核小体结构发生改变, 或使核小体上供结合蛋白识别的表面发生变化, 从而对转录起始复合体的组装起不同的作用。

在小鼠胚胎发育的早期是来自父方的 X 染色体 ( $X_p$ ) 失活, 这一过程似乎是印记 (imprinting) 而来。到囊胚期以后, 原先失活的  $X_p$  重新被激活。之后, 来自父方的  $X_p$  与来自母方的 X 染色体  $X_m$  二者之一随机

### 三、染色质与基因表达调控

#### (一) 以染色质为模板的转录

真核细胞中基因转录的模板是染色质而不是裸露的DNA，因此染色质呈疏松或紧密结构，即是否处于活化状态是决定RNA聚合酶能否有效行使转录功能的关键。现在普遍认为，转录起始伴随着染色质上某一基因调节序列内部或者周围的结构改变。某些情况下，如在两栖类卵子发生过程中，rRNA基因进行活跃转录时，染色质DNA似乎没有核小体。不过，研究发现大多数转录基因仍然保留了它们的核小体，即使有RNA聚合酶沿着DNA模板移动也是如此。RNA聚合酶是一个大分子，差不多有两个核小体那么大。它和大约50 bp DNA结合，而且还不能有损伤。因此DNA模板不太可能牢固地结合在未解开的核小体的核心结构上而被转录。RNA聚合酶被认为是用“核小体犁”(nucleosome plow)来克服这一障碍的，即用“核小体犁”来解除组蛋白和DNA间的相互作用。图11-21给出了一种模式，描绘了转录过程在有核小体存在时是如何进行的。目前，上述过程还有许多问题留待解决，比如SWI/SNF复合物何时停止工作？谁将转录过的染色质重新组装起来？等等。

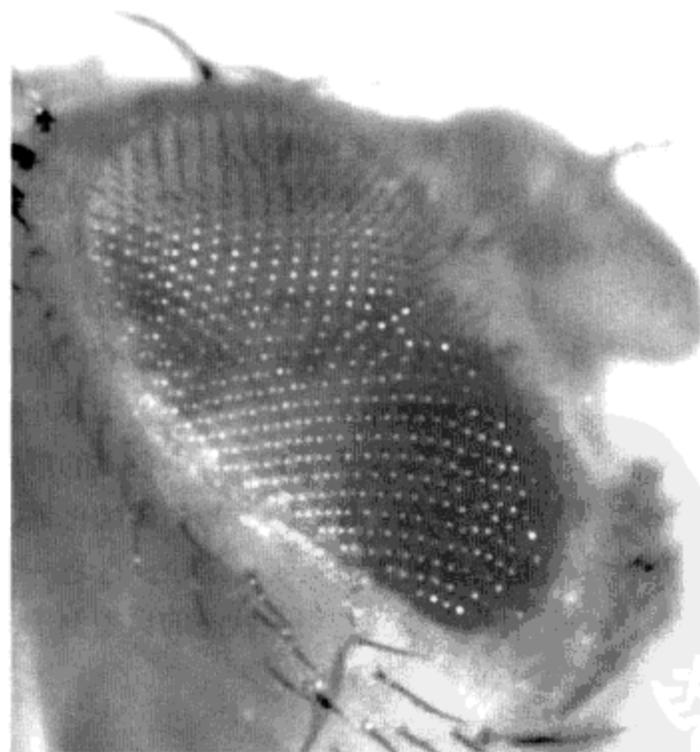


图 11-20 果蝇的 *white* 基因受位置效应影响呈现表达或被抑制状态

*white* 转基因的插入位点位于常染色质与异染色质交界处，所以它的表达（引起红眼）与抑制（引起白眼）在果蝇复眼中的不同单眼中是随机的，因而产生了花斑眼的表型。（宋延俊和焦仁杰博士提供）

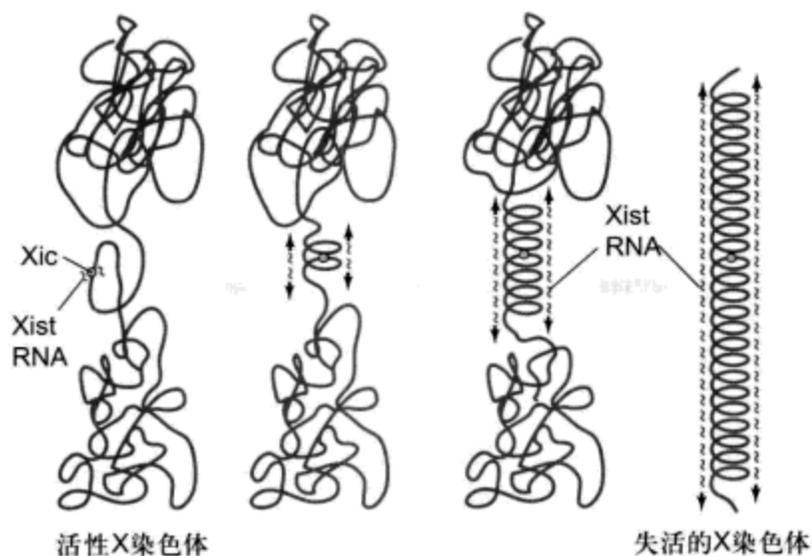


图 11-19 哺乳动物 X 染色体失活模型

Xic: X 染色体失活中心; Xist RNA: X 染色体失活特异性转录物 RNA (X-inactivation specific transcript RNA)。

失活。这一过程依赖于一种独特的非翻译 RNA (Xist 或 X 染色体失活特异性转录本) 的活性 (图 11-19)。Xist RNA 覆盖于某一 X 染色体的表面并使之失活，其机制至今仍不清楚。早期 Xp 的失活也与 Xist 的活性有关，同时伴随着组蛋白 H3K4 的大量甲基化和 H3K9 的乙酰化。当大量 Polycomb 类蛋白在 Xp 染色体上聚集后，H3K27 也发生甲基化。到目前为止，X 染色体失活的调节过程仍然不清楚。

#### 2. 位置花斑效应

基因表达有位置效应，有的活性基因转位到异染色质区附近时会失活 (图 11-20)。这一现象称为位置花斑效应 (position effect variegation)。位于抑制状态与活化状态的染色质结构域之间、能防止不同状态的染色质结构域的结构特征向两侧扩展的染色质 DNA 序列，称为隔离子 (insulator)。研究表明，隔离子可能有以下作用：一是作为异染色质定向形成的起始位点；二是作为结构域两端的锚定点，提供拓扑隔离区，使结构域外的增强子成分不能进入；三是涉及追踪机制，远端增强子处组成的复合体沿染色质模板运动直到启动子，而隔离子可阻止这个复合体超越正常作用范围。虽然 3 种作用模式均不能满意地解释所有观察到的隔离子现象，但却提示隔离子是以不同方式行使功能的。果蝇中 SCS (specialized chromosome structure) 是一段 250~300 bp 的 DNA 序列，插入启动子与增强子之间可阻断来自增强子的转录激活作用。如当红眼报告基因 (*white*) 整合进果蝇基因组的 SCS 序列附近时，SCS 可以使这个基因免于产生位置效应。

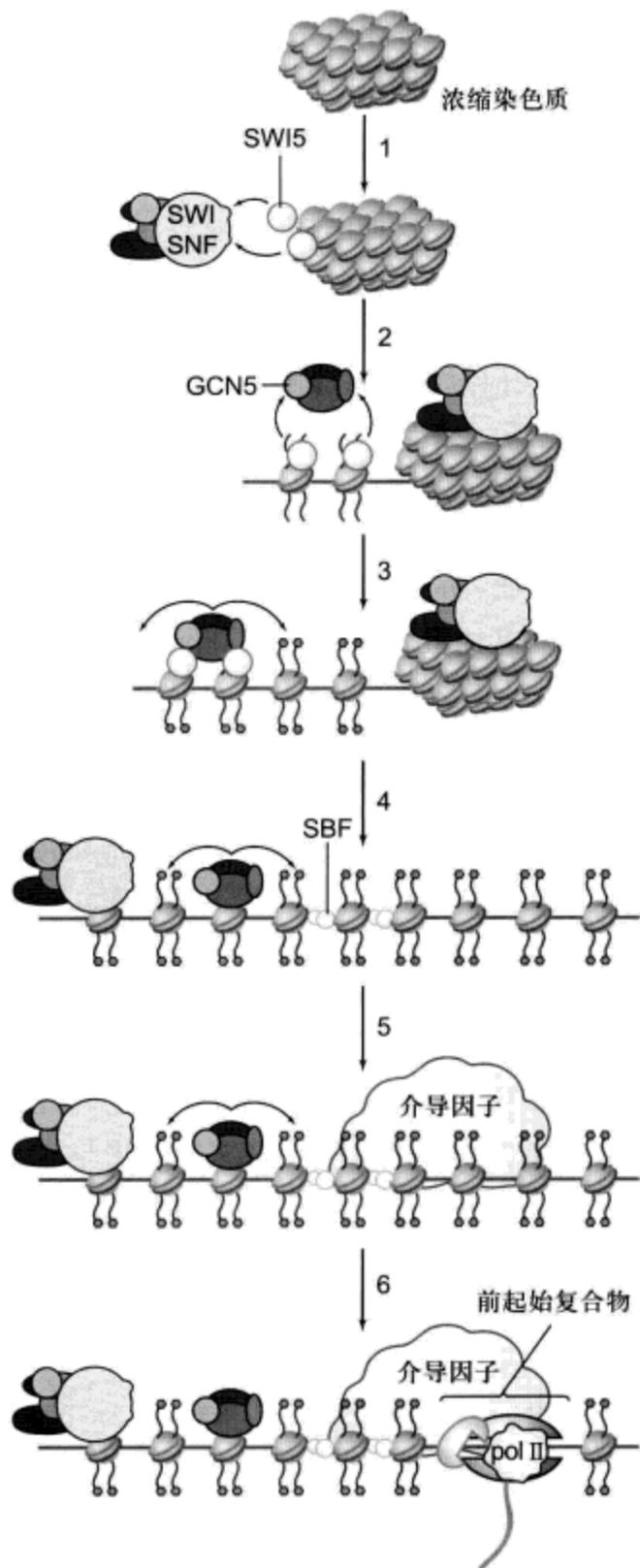


图 11-21 酵母激活因子及辅激活子有顺序地相互作用于 *HO* 基因在染色质水平调节其表达

1. 最初 *HO* 是包装在浓缩染色质内的，当 SWI5 激活因子与位于基因上游 1 200~1 400 bp 处的增强子结合并与 SWI/SNF 染色质重构物相互作用时，基因转录开始被激活；
2. SWI/SNF 复合物行使功能使染色质解凝聚，以暴露组蛋白尾巴；
3. 含有 GCN5 的组蛋白乙酰酶复合体与 SWI5 结合并使 *HO* 中组蛋白尾巴乙酰化，同时 SWI/SNF 复合物继续行使功能使染色质解凝聚；
4. SWI5 离开 DNA，而 SWI/SNF 复合物和 GCN5 仍然与 *HO* 的调控区结合，它们的作用使得 SBF 与近基因启动子段的位点结合；
5. SBF 与转录介导因子复合物结合；
6. RNA 聚合酶 II (pol II) 的结合及基础转录因子共同组装成转录起始复合物，转录开始。

## (二) 转录因子介导的基因表达调控

DNA 序列对转录的调节，并不依靠 DNA 本身，而是依靠特异识别这些 DNA 序列并与之结合的蛋白质，这些蛋白质叫做转录因子 (transcription factor)。转录因子从功能上可分为两类：通用转录因子 (general transcription factor)，与结合 RNA 聚合酶的核心启动子位点结合；特异转录因子 (specific transcription factor)，与特异基因的各种调控位点结合，促进或阻遏这些基因的转录。

有了通用转录因子和 RNA 聚合酶，基因就可以开始转录了。但一般情况下，真核生物的基因转录还需要其他蛋白因子的参与，以帮助通用转录因子和 RNA 聚合酶在染色质上组装。这些辅助因子通常与 DNA 元件结合，这些 DNA 元件称为增强子 (enhancer)。因为它们的存在能够显著加强目的基因的转录。增强子有的位于启动子附近，也有一些增强子距离启动子相当远，甚至可以相距几千碱基。增强子没有方向性，无论在启动子的上游或下游，都可以增强基因转录。

像大多数蛋白质一样，在转录水平上参与基因表达调控的转录因子也含有不同的结构域。典型的转录因子至少包括两个结构域：DNA 结合域 (DNA binding domain)，结合特异的 DNA 序列；激活结构域 (activation domain)，激活转录。此外，许多转录因子还含有一个促进该蛋白与其他蛋白形成二聚体的表面。二聚体的形成是许多不同类型转录因子的共同特征，在基因表达调控中起重要作用。

除了激活转录的转录因子之外，还有一些转录因子起抑制基因转录的作用。编码这些转录因子的基因发生突变，会导致某些基因的转录失控，由调节型表达变为组成型表达。果蝇和线虫中都曾经发现这类突变，造成胚胎中本来不应该表达的基因发生转录，导致胚胎发育异常。转录抑制因子 (transcriptional repressor) 在功能上与转录激活因子正好相反，它们结合于特定的调节 DNA 序列，抑制结合区附近的基因转录。在结构上，转录抑制因子也是由两部分组成，即 DNA 结合域和抑制结构域 (repression domain)。它的活性也受到其他蛋白质的调控。激活与抑制转录因子的作用决定了某个基因在组织甚至细胞水平表达的特异性，即某个基因可能同一组织的某些细胞中表达，而同时在另外一些细胞中不表达 (图 11-22)。

转录因子的 DNA 结合域之所以能够识别并结合特



图 11-22 基因表达的时空特异性

图中红色显示的是在果蝇的翅膀成虫盘 (wing disc) 中, dpp-GAL4 介导的 Uif 的表达在前后分界处。绿色是在同一个盘中的背腹分界处的 Wg 的表达。(谢更强和焦仁杰博士提供)

异的 DNA 序列, 是因为这些蛋白质的表面与 DNA 双螺旋的特定区域有特异的亲和性, 亲和性的大小决定于 DNA 序列。蛋白质与 DNA 结合的机制, 在于蛋白质插入 DNA 分子的大沟, 与某些碱基对以氢键、离子键或疏水力等相互作用。蛋白质和 DNA 之间的结合强度, 取决于这类非共价键的数量。如果这些非共价键形成较多, 蛋白质与 DNA 之间就可以形成很强的结合, 这也决定了蛋白质识别 DNA 序列的特异性。

虽然蛋白质与 DNA 的结合方式千差万别, 但是它们都需要形成某些特殊的空间结构, 以结合 DNA 双螺旋的大沟。这些结构称为 DNA 的结合基序 (DNA binding motif)。转录因子中最常见的几种基序 (结构模式), 包括“锌指” (zinc finger)、“螺旋-转角-螺旋” (helix-turn-helix)、“亮氨酸拉链” (leucine zipper) 结构和同源异型结构域。同源异型结构域由 3 段  $\alpha$  螺旋组成, 属于“螺旋-转角-螺旋”家族。从真菌到各种动、植物, 在调节不同类型细胞活动的大量蛋白质中都发现了这些结构模式。值得注意的是, 尽管转录因子是调节基因表达的重要因素, 但它并不是唯一的调控机制。细胞还存在其他调控基因转录的机制, 比如 DNA 的甲基化。

### (三) DNA 甲基化介导的基因表达调控

现有研究发现, DNA 甲基化 (DNA methylation) 与基因表达的阻遏有关。对哺乳动物及其他脊椎动物的 DNA 研究表明, 每 100 个核苷酸就有一个含有甲基

基团, 并且通常是结合在胞嘧啶的 5'-C 位上。这种简单的化学修饰被认为是一种“标记”, 使特定的 DNA 区域与其他区域区别开来。几乎所有的甲基化胞嘧啶残基都出现在对称序列 (symmetrical sequence) 的 5'-GC-3' 二核苷酸上。这种序列在 DNA 上并不是随机分布, 而是集中于富含 GC 的区域, 这种区域称为“GC 岛” (GC rich island)。GC 岛常位于转录调控区或其附近, 它的甲基化程度直接影响转录的活性。

一般而言, 非活跃转录基因的 DNA 甲基化程度普遍高于活跃转录的基因; 当含有甲基化 DNA 的非活性基因活化后, 通常伴随失去许多甲基基团。在发育过程中, 处于活化状态的基因调节区的甲基化水平会显著下降。例如, 与其他组织相比, 婴儿肝细胞 DNA 中位于  $\gamma$ -球蛋白基因上游区域的甲基化水平显著降低。造成这种差异的原因是在婴儿发育期, 这个基因处于高水平转录状态。许多研究证据表明, DNA 甲基化对维持基因长期处于非活化状态起重要作用。比如雌性哺乳动物失活的 X 染色体中, DNA 就是高度甲基化的。因此, 甲基化是使 DNA 转入持久遏制状态的重要条件。

甲基化作用通过两种方式抑制转录: 一是干扰转录因子对 DNA 结合位点的识别, 二是将转录激活因子识别的 DNA 序列转换为转录抑制因子的结合位点。不过需要指出的是, DNA 甲基化和去甲基化与基因活性的关系并不是绝对的。DNA 甲基化也不是使基因表达失活的一种普遍机制。动物种属之间 DNA 甲基化的程度有很大差别。脊椎动物尤其是哺乳动物比无脊椎动物甲基化程度高得多。无脊椎动物, 如果蝇和其他双翅目昆虫, 细胞中 DNA 甲基化水平可能很低。这说明 DNA 甲基化是一种进化事件, 并随进化程度的提高而逐步增强。因此, 甲基化和去甲基化在基因表达活性调控中的意义依生物不同而有差异。

基因组印记 (genomic imprinting) 是哺乳动物所特有的现象, 是说明甲基化作用在基因表达调控中具有重要意义的最好例证。直到 20 世纪 80 年代中期人们还认为, 子代基因组中来自父亲的一套染色体和来自母亲的一套染色体在功能上是等价的。但事实并非如此。在哺乳动物发育早期, 某些特定基因是活化还是失活仅仅依赖于它们是被精子还是被卵子带入受精卵。例如, 在小鼠的早期发育中, 编码类胰岛素生长因子 2 (insulin like growth factor 2, IGF2) 的基因只在由父亲传递下来的染色体上有活性。而编码这种蛋白的受体 (IGF2R) 的基因, 只在由母亲传递下来的染色体上有活性。这些类型

的基因被认为是按照其亲本的来源带上印记。据估计,哺乳动物的基因组含有超过 100 个这类基因。

DNA 甲基化在基因组印记中具有重要作用。在某些情况下,甲基化不足的基因是有活性的;在另一些情况下,含有额外甲基的基因是有活性的,而甲基化不足的模板是无转录活性的。印记基因的这些差异,不受在早期胚胎中出现的去甲基化和复甲基化的影响。当个体产生配子(精子或卵)的时候,从亲本遗传来的印记才会消除。

#### (四) 组蛋白修饰介导的基因表达调控

真核生物转录因子调节基因转录的一种重要机制,就是调整染色质的结构,以影响通用转录因子对启动子的结合能力。我们都知道,真核生物的遗传物质是以染色质而不是裸露 DNA 的形式存在于细胞核中。染色质的基本组成单位是核小体,它是由约 147 bp 长的 DNA 缠绕在组蛋白核心上形成的。如果基因的启动子位于核小体当中,则组蛋白核心会阻碍通用转录因子在启动子上的组装以及 RNA 聚合酶与启动子的结合,基因转录就无法进行。转录因子能够调节组蛋白核心的结构,从而改变核小体和染色质的紧密程度,影响通用转录因子和 RNA 聚合酶对启动子的结合,调控基因的表达。

转录激活因子的存在,通常有利于那些导致染色质或组蛋白结构松散的蛋白质复合物发挥作用,如组蛋白乙酰化酶。每种组蛋白的 N 端以及组蛋白 H2A 的 C 端,都从核小体表面向外伸出,称为组蛋白尾。这些组蛋白的尾部能够被某些酶可逆修饰,从而改变核小体的结构。其中组蛋白乙酰化酶对组蛋白 H3 和 H4 的修饰对核小体结构的调节起了最重要的作用(详见本章前文)。转录抑制因子通常会加强那些促进染色质结构紧密的蛋白质的作用,如组蛋白去乙酰化酶。它的作用与乙酰化酶正好相反,使核小体结构更紧密,转录起始复合物越发难以结合到启动子上。因此,染色质结构紧密的地方,往往也是基因转录活性很低的地方,这可能就是为什么不活跃基因常常和异染色质相联系的原因。然而,异染色质区的基因(这类基因虽然不多,但确实存在)的正常表达则依赖于异染色质结构的存在。

## 四、染色质与表观遗传

2003 年 6 月 15 日,包括中国在内的 6 个国家(美

国、英国、法国、德国、日本和中国)的领导人在美国华盛顿宣布人类基因组计划完成。至此,我们已经清楚地知道了从大肠杆菌到线虫、果蝇、小鼠等几种模式生物以及人类的基因组序列。但是了解基因的序列,并不代表了解了生命的奥秘,更不意味着我们可以用这些基因去重构生命,尽管任何生物的 DNA 都编码了该生命体的细胞和机体构建以及生命活动的进行所需要的全部信息。生物之所以成为生物,除了它包含遗传信息外,更重要的是它要恰如其分地使用这些遗传信息,在正确的时间、正确的位置来正确地表达或关闭某些遗传信息。

表观遗传现象最早是 T. H. Morgan 的学生 H. J. Muller 在 1930 年研究 X 射线诱导的染色体重组时发现的。当时他称自己得到的红白嵌合眼果蝇是“位置花斑效应”现象。20 世纪 40 年代, C. Waddington 提出了表观遗传的概念:基因与环境相互作用产生的可遗传表型。随后科学家们发现了一系列类似的现象,如:20 世纪 50 年代 McClintock 第一次将染色体位置效应与玉米中染色体上不同位置的突变频率联系起来;20 世纪 60 年代 Mary Lyon 发现的哺乳动物雌性个体细胞中 X 染色体失活现象。后来,科学家们发现了 DNA 的甲基化与基因表达的关系;脊椎动物细胞中的染色体印记现象;酵母细胞中的端粒沉默(telomeric silencing)现象等。不过,从最初的表观遗传现象发展至现今的表观遗传学领域还得归功于十几年以前开始发现的一系列组蛋白修饰酶:乙酰化酶、去乙酰化酶、甲基化酶、去甲基化酶、磷酸化酶、磷酸酶、泛素化酶、去泛素化酶等,以及这些酶与一些染色质重塑因子之间的相互作用等。

下面将具体讲述表观遗传学所涉及的内容以及表观基因组的概念。

### (一) 表观遗传与遗传

中心法则,即 DNA 到 RNA 再到蛋白质,是遗传学的基础,也是孟德尔遗传规律的根本。这也就是我们通常所说的基因型(DNA 序列)决定表型(性状);然而,自然界的许多生命现象却很难用孟德尔规律去解释。如双胞胎、克隆猫、肿瘤组织等,虽然它们的 DNA 序列是一样的,却经常有很大的表型上的差异。现在已知,这些差异是由表观遗传的修饰不同造成的。如肿瘤细胞中 DNA 甲基化的变化使得抑癌基因失活。表观遗传现象在哺乳类、果蝇、酵母及植物中都

广泛存在。值得指出的是：表观遗传修饰在干细胞的分化以及体细胞的去分化过程中发挥着举足轻重的作用。遗传学的变化是通过 DNA 序列的突变实现的，通过生殖细胞得以遗传。表观遗传的变化是通过组蛋白和 DNA 的不同修饰而实现的。它只在体细胞中出现。表观遗传修饰可以遗传但富于变化，它是通过改变染色质的结构而改变基因组信息的表达。这些可改变染色质结构的途径主要包括：各种组蛋白修饰共同构成组蛋白密码子 (histone code)、染色质重塑 (chromatin remodeling)、组蛋白异型体 (histone variants)、DNA 甲基化和非编码 RNA (noncoding RNAs) 的作用。这些染色质上的各种标记可以在细胞分裂过程中被遗传下去。它们共同构成特定细胞在特定时期的表观基因组 (epigenome)。

## (二) 表观遗传的工作模型

如果遗传学可以被认为是 DNA 双螺旋或 DNA 序列的话，那么表观遗传学便是在此基础上通过改变染色质结构而调控遗传信息表达的一个过程，它可以将初始调控信号放大并储存在细胞中形成长时程表观遗传记忆 (epigenetic memory)。这样的记忆是如何在细胞分裂过程中从母细胞传给子细胞的？最初有人提出半保留复制的模型：即与 DNA 的半保留复制类似，细胞分裂过程中的组蛋白也呈半保留复制模式。这样组蛋白上的表观遗传标记便可以从母代细胞的模板中拷贝到子代细胞中去。然而，这一假说缺乏实验依据，而且现在越来越多的实验证明在染色质 /DNA 复制过程中，新合成的组蛋白很可能是随机组装到新的核小体中去的，也就是说母代核小体的“模板”根本就不存在。所以，表观遗传记忆的本质可能是 DNA 修饰、多种组蛋白修饰、染色质重塑因子及组蛋白伴侣等因素共同决定的。

## (三) 表观遗传的问题

如遗传学一样，表观遗传学的问题无处不在。然而，目前我们还知之甚少。表观遗传学也许不会像遗传学一样可以寻找到一个普遍性的规律，因为很显然生物界中总是存在着显著的个体差异，这些差异与表观遗传学直接相关。从单细胞到多细胞生物，不同个体之间它们的组蛋白修饰的类型、组蛋白异型体的种类与数量、DNA 甲基化的程度以及 RNAi 复合体的使用都可能是有差异的。然而，科学家正在以前所未有的速度用

生化与遗传的方法解析表观遗传调控的各个通路以及试图解析人类细胞基因组一样研究人类细胞的表观基因组。如果说人类个体之间的基因组存在个体差异的话，那么它们的表观基因组除此以外还存在组织 / 细胞以及发育时期的特异性。所以这将是一个巨大的工程。不过以下关于表观遗传的一系列基本问题的解决将直接回答表观遗传在细胞分化、机体发育以及疾病发生过程中的调控作用：表观遗传密码子是什么？表观遗传是如何传代的？图 11-23 是根据目前科学家们对表观遗传的理解提出的 3 种可能的表观遗传修饰的遗传方式。这里也牵涉到细胞表观遗传记忆的本质是什么？生殖细胞中有没有表观遗传印记来保持它的全能性？非编码 RNA 在表观遗传调控中的作用是什么？表观遗传如何控制干细胞的全能或多能性？它又是如何控制干细胞的定向分化的？在组织再生过程中表观遗传标记是如何建立的？不同细胞类型的细胞特征的建立与表观遗传的关系是什么？表观遗传在衰老过程中的作用是什么？表观遗传调控失去功能的后果是什么？表观基因组如何维持稳定？等等。

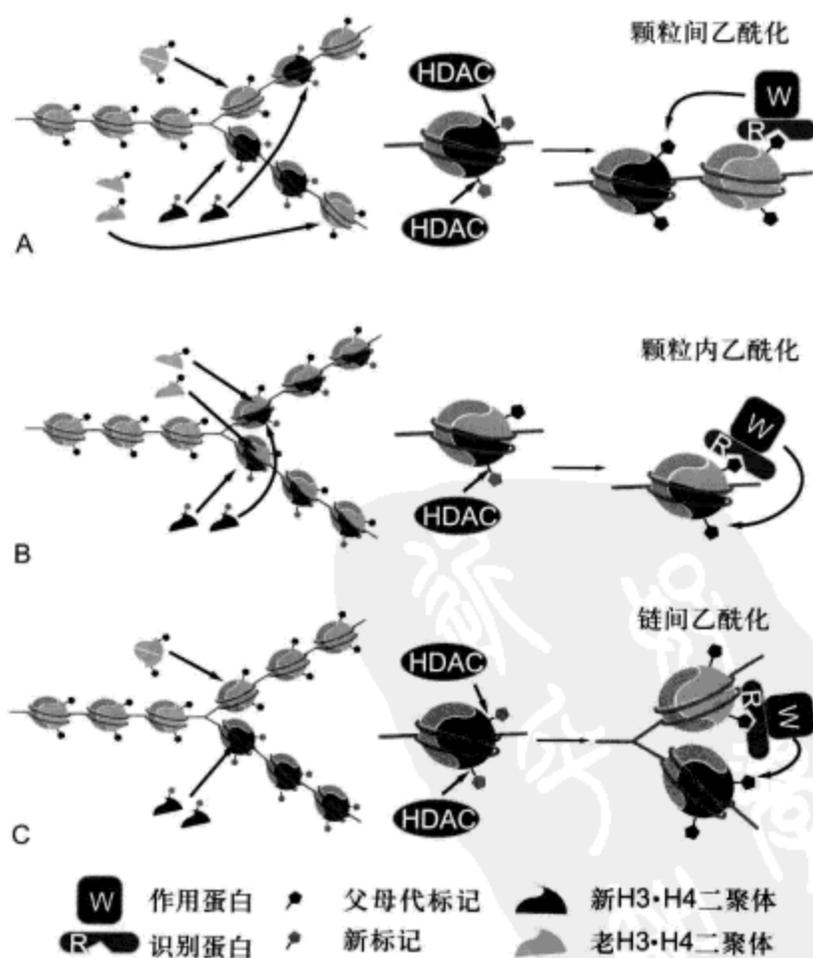


图 11-23 组蛋白表观遗传修饰的 3 种可能遗传机制示意图  
A. 随机分布。B. 半保留分布。C. 不对称分布。

## 第四节 染色体

染色体是细胞在有丝分裂（或减数分裂）时遗传物质存在的特定形式，是间期细胞染色质结构紧密组装的结果。不同生物的细胞中含有不同数目的染色体（表 11-6）。所有单倍染色体组包含的 DNA 组成该生物基因组。

### 一、染色体的形态结构

中期染色体具有比较稳定的形态，它由两条相同的姐妹染色单体（chromatid）构成，彼此以着丝粒（centromere）相连。根据着丝粒在染色体上所处的位置，可将中期染色体分为 4 种类型（图 11-24，表 11-7）：中着丝粒染色体（metacentric chromosome），两臂长度相等或大致相等；亚中着丝粒染色体（submetacentric chromosome）；亚端着丝粒染色体（subtelocentric chrom-

表 11-6 不同生物的基因组大小和染色体数目

物种	基因组大小 /Mb	染色体数目
芽殖酵母	12	16
黏霉菌 ( <i>Dictyostelium</i> )	70	7
拟南芥	125	5
秀丽隐杆线虫	97	6
果蝇	180	4
非洲爪蟾	3 000	18
玉米	5 000	10
洋葱	15 000	8
百合 ( <i>Lilium</i> )	50 000	12
肺鱼 ( <i>Neoceratodus forsteri</i> )	50 000	17
鸡 ( <i>Gallus gallus</i> )	1 200	39
小鼠 ( <i>Mus musculus</i> )	3 000	20
牛 ( <i>Bos taurus</i> )	3 000	30
狗 ( <i>Canis lupus</i> )	3 000	39
人	3 000	23

基因组大小和染色体数目都是单倍体。

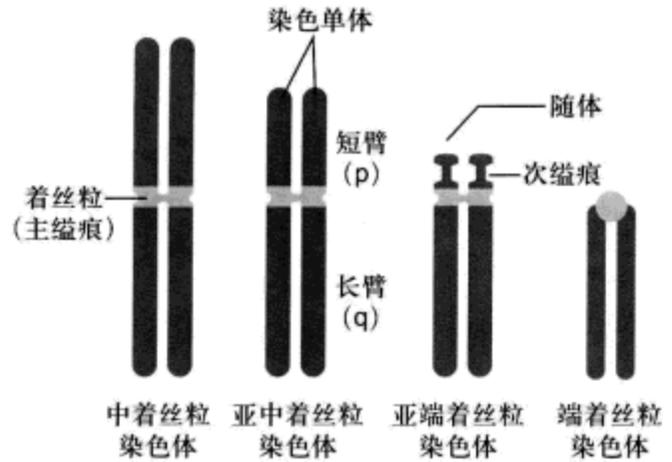


图 11-24 根据着丝粒位置进行的染色体分类图示

表 11-7 根据着丝粒位置进行的染色体分类

着丝粒位置	染色体符号	着丝粒比*	着丝粒指数**
中着丝粒	m	1.00~1.67	0.500~0.375
亚中着丝粒	sm	1.68~3.00	0.373~0.250
亚端着丝粒	st	3.01~7.00	0.249~0.125
端着丝粒	t	7.01~∞	0.125~0.000

\* 长臂长度 / 短臂长度; \*\* 短臂长度 / 染色体总长度。(Levan 等, 1964; Green 等, 1980)

osome), 具有微小短臂; 端着丝粒染色体 (telocentric chromosome)。

染色体各部的的主要结构如下:

#### (一) 着丝粒与动粒

着丝粒连接两个染色单体，并将染色单体分为两臂：短臂 (p) 和长臂 (q)。由于着丝粒区浅染内缢，所以也叫主缢痕 (primary constriction)。近年来的研究表明，着丝粒是一种高度有序的整合结构，在结构和组成上都是非均一的，至少包括 3 种不同的结构域：

(1) 沿着着丝粒外表面的动粒结构域 (kinetochore domain) 哺乳类动粒 (又称着丝点, kinetochore) 超微结构可分为 3 个区域 (图 11-25)：一是与着丝粒中央结构域相联系的内板 (inner plate)；二是中间间隙 (middle space)，电子密度低，呈半透明区；三是外板 (outer plate)。在没有动粒微管结合时，覆盖在外板上的第 4 个区称为纤维冠 (fibrous corona)，由微管蛋白构成。动粒微管与内外板相连，并沿纤维冠相互作用，与内板相联系的染色质是与微管相互作用的位点。已有证据表明，动粒结构域的化学组成包括与动粒结构与功能相关的两类蛋白质以及着丝粒 DNA，但是目前关于动

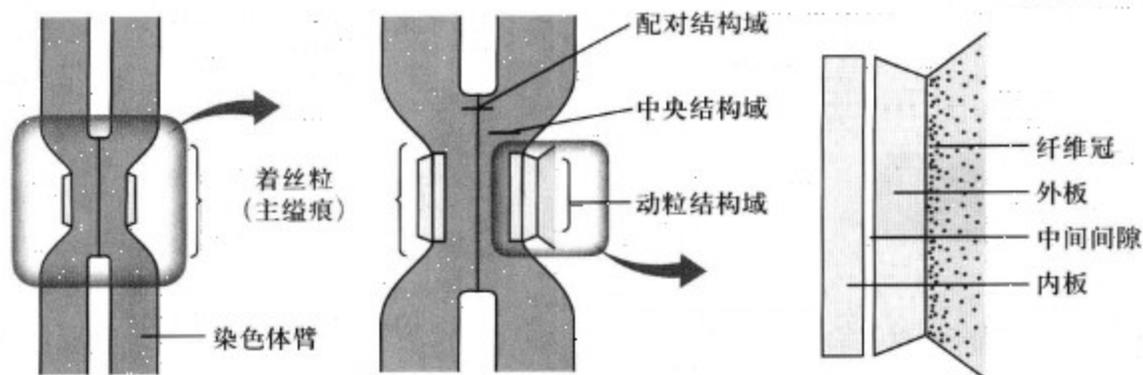


图 11-25 着丝粒的结构域组织

粒的结构模型尚无定论。

(2) 中央结构域 (central domain) 这是着丝粒区的主体, 由串联重复的卫星 DNA 组成。这些重复序列大部分是物种专一的。人染色体的着丝粒 DNA 由  $\alpha$  卫星 DNA 组成, 重复单位 17 bp, 每一着丝粒串联重复 2 000~30 000 次, 可达 250 kb 至 400 kb, 但不同染色体着丝粒的  $\alpha$  卫星 DNA 序列存在差别。其中一个亚类含有 17 bp 的 DNA 模式 (5'-CTTCGTTGGAAACGGGA-3'), 能与动粒蛋白 CENP-B 结合, 这一 DNA 模式被称为 CENP-B 框。通过免疫印迹分析, 在哺乳类染色体着丝粒区已发现 CENP-A、B、C、E 和 F 5 种动粒蛋白, 这些动粒蛋白和细胞分裂及其调控有密切关系, 因而也是极为保守的。

(3) 配对结构域 (pairing domain) 位于着丝粒内表面的配对结构域。代表中期姐妹染色单体相互作用的位点。已经发现有两类蛋白: 一类是内部着丝粒蛋白 INCENP (inner centromere protein), 另一类是染色单体连接蛋白 CLIPS (chromatid linking protein), 二者与染色单体配对有关。

虽然 3 种结构域具有不同的功能, 但它们并不能独自发挥作用。正是 3 种结构域的整合功能, 才确保细胞在有丝分裂中染色体与纺锤体整合, 发生有序的染色体分离。

## (二) 次缢痕

除主缢痕外, 染色体上其他的浅染缢缩部位称次缢痕 (secondary constriction)。它的数目、位置和大小是某些染色体所特有的形态特征, 因此也可以作为鉴定染色体的标记。

## (三) 核仁组织区

核仁组织区 (nucleolar organizing region, NOR) 位于染色体的次缢痕部位, 但并非所有次缢痕都是 NOR。

染色体 NOR 是 rRNA 基因所在部位 (5 S rRNA 基因除外), 与间期细胞核仁形成有关。

## (四) 随体

随体 (satellite) 指位于染色体末端的球形染色体片段, 通过次缢痕区与染色体主体部分相连。它是识别染色体的重要形态特征之一, 有随体的染色体称为 sat 染色体。

## (五) 端粒

端粒 (telomere) 是染色体两个端部特化结构。端粒通常由富含鸟嘌呤核苷酸 (G) 的短的串联重复序列 DNA 组成 (TEL DNA), 伸展到染色体的 3' 端。一个基因组内的所有端粒都是由相同的重复序列组成, 但不同物种的端粒的重复序列是不同的 (表 11-8)。哺乳类和其他脊椎动物端粒的重复序列中的保守序列是 TTAGGG, 串联重复 500~3 000 次, 序列长度在 2 kb 到 20 kb 之间不等。端粒的长度与细胞及生物个体的寿命有关。端粒的生物学作用在于维持染色体的完整性和独立性, 可能还与染色体在核内的空间排布等有关。

表 11-8 不同生物中端粒 DNA 序列比较

物种	端粒 DNA 重复序列
酵母	
芽殖酵母	$G_{7-9}T$
裂殖酵母	$G_{2-5}TTAC$
原生动	
<i>Tetrahymena</i>	GGGGTE
<i>Dictyostelium</i>	$G_{1-8}A$
植物	
拟南芥	AGGGTTT
哺乳动物	
人	AGGGTT

## 二、染色体的功能元件

在细胞世代中确保染色体的复制和稳定遗传，染色体起码应具备3种功能元件（functional element）（图11-26）：至少一个DNA复制起点，确保染色体在细胞周期中能够自我复制，维持染色体在细胞世代传递中的连续性；一个着丝粒，使细胞分裂时已完成复制的染色体能平均分配到子细胞中；最后，在染色体的两个末端必须有端粒，保持染色体的独立性和稳定性。构成染色体DNA的这3种关键序列（key sequence）称为染色体DNA的功能元件。近年来采用分子克隆技术把真核细胞染色体的复制起点、着丝粒和端粒这3种DNA关键序列分别克隆成功，并把它们互相搭配或改造而构成所谓“人造微小染色体”（artificial minichromosome）。

### （一）自主复制DNA序列

应用DNA重组技术，将带有正常酵母亮氨酸合成酶的 $leu$ 基因的DNA限制酶片段重组到大肠杆菌的质粒中。用这种重组质粒去转化亮氨酸合成代谢缺陷型酵母细胞，发现单纯质粒不能转化酵母细胞，而重组质粒能在酵母细胞中复制、表达和遗传。可见该酵母DNA插入片段除含有 $Leu$ 的基因外，还含有一段酵母染色体自主复制DNA序列（autonomously replicating DNA sequence, ARS）。该序列首先在酵母基因组DNA序列中发现，它能使含有这一序列的重组质粒高效转化酵母细胞，并能在酵母中独立于宿主染色体而存在。根据不同来源的ARS的DNA序列分析，发现它们都具有一段11~14 bp的同源性很高的富含AT的共有序列

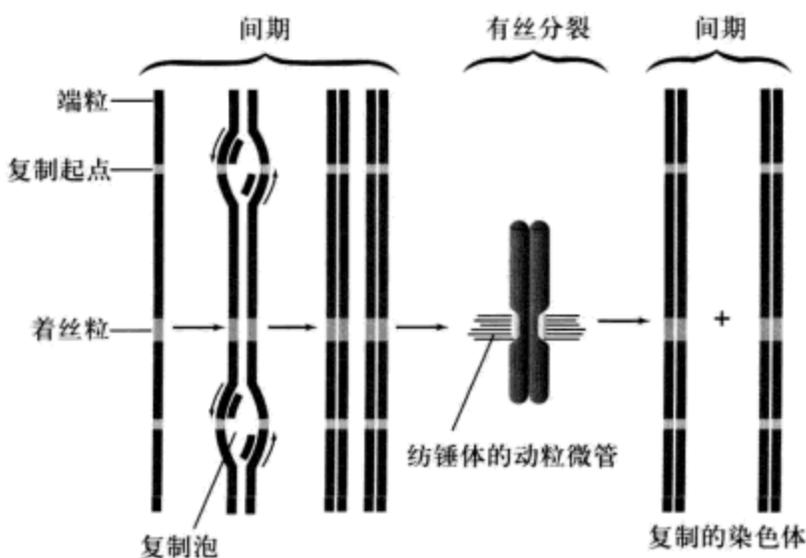


图 11-26 真核细胞染色体的3种功能元件示意图

(consensus sequence)，同时证明这段共有序列及其上、下游各200 bp左右的区域是维持ARS功能所必需的。现在已利用双向电泳定位复制起点的技术，直接证明了ARS在质粒以及酵母染色体上与复制起点（replication origin）共定位的现象。绝大多数真核细胞的染色体含有多个复制起点，以确保全染色体快速复制。现在还没有确定真核生物的复制起点的DNA序列是否具有固定模式，但大多包含一个富含AT的序列。

### （二）着丝粒DNA序列

上述插入ARS的重组质粒，虽然能在酵母细胞中复制和表达，但由于它缺少着丝粒，因此不能在酵母细胞有丝分裂时平均分配到子细胞中去。当把酵母染色体上的着丝粒DNA序列（centromere DNA sequence, CEN）插入到这个含ARS的重组质粒中，这种新的插有酵母染色体的ARS和CEN序列的重组质粒，在有丝分裂中便表现出与正常染色体相似的复制与分离行为。根据不同来源的CEN序列分析，发现它们的共同特点是有两个彼此相邻的核心区，一个是80~90 bp的AT区，另一个是11 bp的保守区。通过CEN缺失损伤试验或插入突变试验，发现一旦伤及这两个核心区序列，CEN即丧失其生物学功能。

### （三）端粒DNA序列

将插入ARS和CEN序列的环状重组质粒DNA在单一位点切开，形成一个具有两个游离端的线性DNA分子。虽然这段线性DNA可以在酵母细胞中复制并附着到有丝分裂的纺锤体上，但最终将从子细胞中丢失，结果细胞无法生长。如果在切开的线性DNA两端加上端粒DNA序列（telomere DNA sequence, TEL），则转染细胞生长。这是因为环状DNA变成线性DNA分子以后无法解决“末端复制问题”，即新合成的DNA链5'末端RNA引物被切除后变短的问题。真核细胞染色体端粒的重复序列不是染色体DNA复制时连续合成的，而是由端粒酶（telomerase）合成后添加到染色体末端。端粒酶是一种核糖核蛋白复合物，具有反转录酶的性质，由物种特异的内在RNA作模板，把合成的端粒重复序列再添加到染色体的3'端（图11-27）。人的生殖系细胞染色体末端比体细胞染色体末端长几千个碱基对，这是因为迄今为止只发现在生殖系细胞和部分干细胞里有端粒酶活性，而在所有体细胞里则尚未发现端粒酶的活性。端粒起到细胞分裂计时器的作用。不管是体

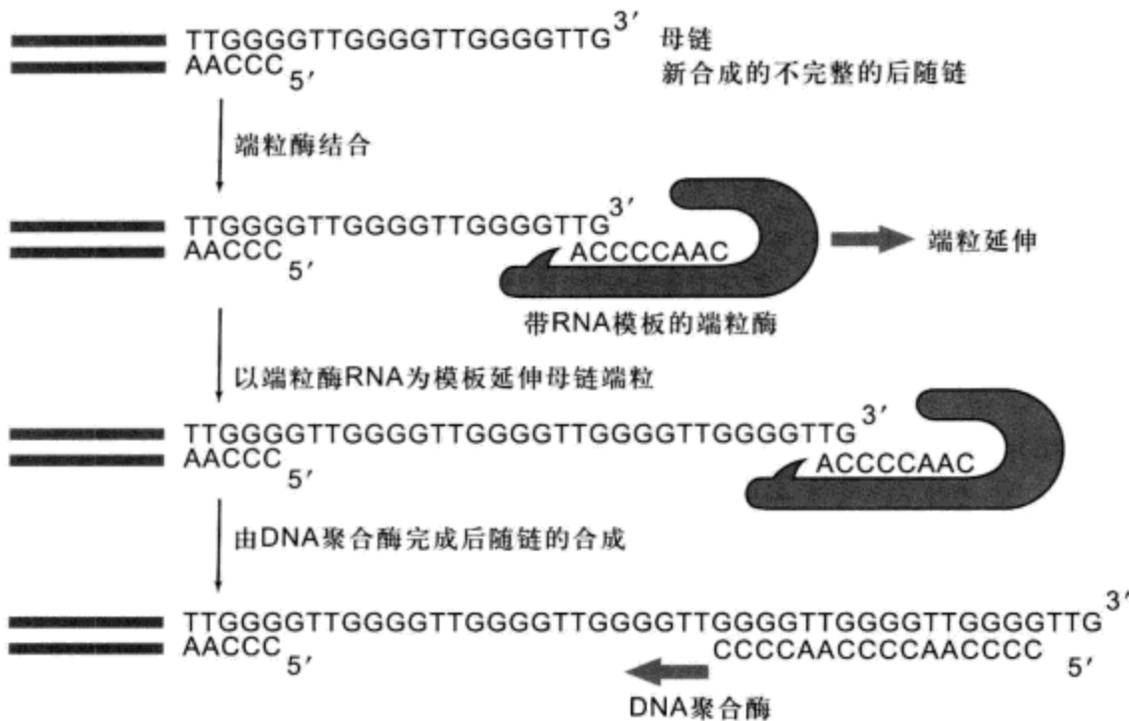


图 11-27 端粒酶的作用示意图

内还是体外，体细胞每分裂一次，端粒重复序列就缩短一些。表明端粒重复序列的长度与细胞分裂次数和细胞的衰老有关。肿瘤细胞具有表达端粒酶活性的能力，使癌细胞得以无限制地增殖。

除了端粒酶能维持端粒的长度外，另外一个端粒变长的途径是 ALT (alternative lengthening of telomeres)，这一途径不依赖于端粒酶的存在。3' 端突出的端粒 DNA 最终与 5~10 kb 之外的另一条链上的 TTAGG 同源序列配对形成一个 D 形环（或 T 形环），以稳定端粒末端结构。这一过程由 TRF2 催化完成。

### 三、染色体带型

核型 (karyotype) 一词首先由苏联学者 G. A. Levitsky 等人在 20 世纪 20 年代提出。核型分析的发展有 3 项技术起了很重要的促进作用：一是 1952 年美籍华人细胞学家徐道觉发现的低渗处理技术，使中期细胞的染色体分散良好，便于观察；二是秋水仙素的应用便于富集中期细胞分裂相；三是植物凝集素 (PHA) 刺激血淋巴细胞转化、分裂，使以血培养方法观察动物及人的染色体成为可能。

核型是指染色体组在有丝分裂中期的表型，是染色体数目、大小、形态特征的总和。核型分析是在对染色体进行测量计算的基础上，进行分组、排队、配对并进行形态分析的过程。核型分析对于探讨人类遗传病的机制、物种亲缘关系、远缘杂种的鉴定等都有重要意义。将一个染色体组的全部染色体逐个按其特征绘制下来，

再按长短、形态等特征排列起来的图像称为核型模式图 (idiogram)，它代表该物种的核型模式 (图 11-28)。

在染色体显带技术发展之前，核型分析主要是根据染色体形态和着丝粒位置的差别来进行的，因此有时对染色体仍不易精确识别和区分。1968 年由瑞典细胞学家 Caspersen 首先建立的染色体 Q 带技术及其以后的发展，为核型研究提供了有力的工具。Q 带技术即喹吖因荧光染色技术，显示中期染色体经氮芥喹吖因或双盐酸喹吖因染色以后，在紫外线照射下所呈现的荧光亮带和

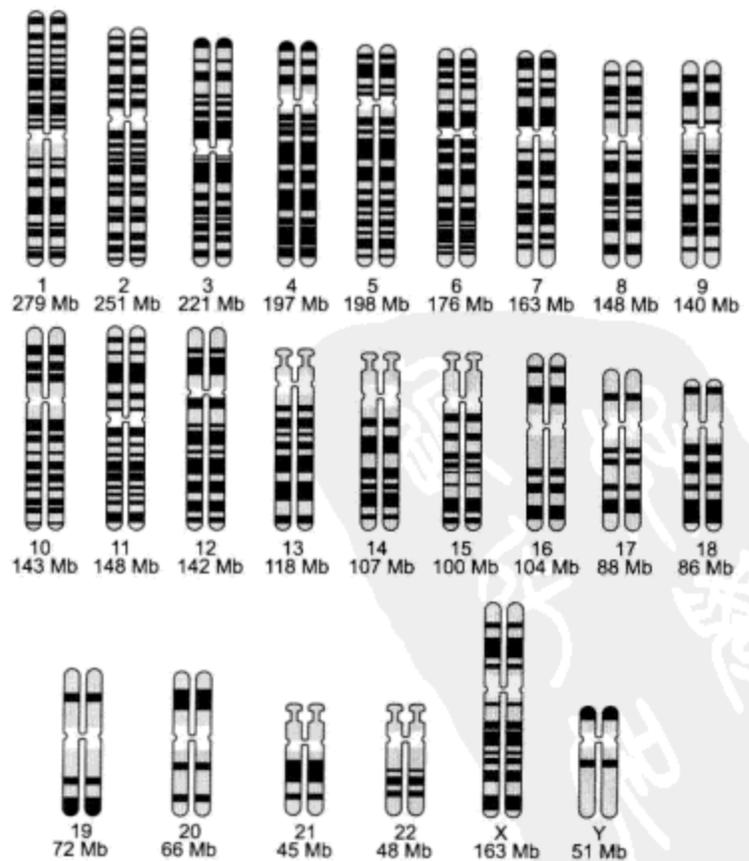


图 11-28 人类细胞中期染色体显带及染色体大小示意图

暗带。一般富含 AT 碱基的 DNA 区段表现为亮带，富含 GC 碱基的 DNA 区段表现为暗带。G 带即 Giemsa 带，是将中期染色体制片经胰酶或碱、热、尿素、去污剂等处理后再用 Giemsa 染料染色后所呈现的染色体区带。一般来说，G 带与 Q 带相符，但也有例外，如 Q 带显示的人 Y 染色体的特异荧光，在 G 带带型上并不出现。R 带是指中期染色体经磷酸盐缓冲液保温处理，以吖啶橙或 Giemsa 染色，结果所显示的带型和 G 带明暗相间带型正好相反，所以又称反带 (reverse band)。C 带主要显示着丝粒结构异染色质及其他染色体区段的异染色质部分。T 带又称末端带 (terminal band)，是染色体端粒部位经吖啶橙染色后所呈现的区带，在分析染色体末端结构畸变时有用。N 带又称 Ag-As 染色法，主要用于染核仁组织者区的酸性蛋白质。1975 年以来，美国细胞遗传学家 Yunis 等建立了染色体高分辨显带技术，用氮甲蝶呤使培养的细胞同步化后，再用秋水仙胺短暂处理，获得大量晚前期和早中期分裂相，这些时期的染色体比典型中期染色体长，显带后可得到更多更细的带纹。如在人体细胞晚前期染色体组中可以分辨出 843~1 256 条带，而中期染色体只能观察到 320~550 条带，因而更有助于发现细微的染色体异常。

染色体显带技术最重要的应用就是明确鉴别一个核型中的任何一条染色体，乃至某一个易位片段。同时显带技术也用于染色体基因定位和染色体重构，如染色体着丝粒的罗伯逊式融合 (Robertsonian fusion) 与染色体着丝粒的罗伯逊式裂解 (Robertsonian fission)。

从果蝇到人，有丝分裂的染色体普遍存在特殊的带型。一个物种某一条染色体上的标准带型是非常稳定的并是特征性的。这就提示，染色体带作为更大范围的结构域对细胞的功能可能是重要的。有人估计，即使最细的带纹也应含有 30 个或更多的环状结构域，并且已知富含 AT 的带和富含 GC 的带都含有基因。近年来发展的显带染色体显微切割和分子微克隆技术，已有可能研究染色体某几个带纹的 DNA 性质，这是联系细胞遗传学与分子遗传学之间的重要桥梁。

#### 四、特殊染色体

在某些生物的细胞中，特别是在发育的某些阶段，可以观察到一些特殊的体积很大的染色体，包括多线染色体 (polytene chromosome) 和灯刷染色体 (lampbrush chromosome)，这两种染色体总称为巨大染色体 (giant

chromosome)。

#### (一) 多线染色体

多线染色体是 1881 年由意大利细胞学家 Balbiani 首先在双翅目摇蚊幼虫的唾腺细胞中发现的，它也存在于双翅目昆虫的幼虫组织细胞内，如唾腺、气管、肠和马尔比基氏管。此外，在不同植物的不同类型的细胞中，如胚珠细胞 (胚乳、胚柄和反足细胞) 也发现多线染色体。

多线染色体来源于核内有丝分裂 (endomitosis)，即核内 DNA 多次复制而细胞不分裂。产生的子染色体并行排列，且体细胞内同源染色体配对，紧密结合在一起从而阻止染色质纤维进一步聚缩，形成体积很大的多线染色体。多线化的细胞处于永久间期，并且体积也相应增大。同种生物的不同组织以及不同生物的同种组织的多线化程度各不相同。在果蝇唾腺细胞中，染色体进行 10 次 DNA 复制，因而形成  $2^{10}=1\ 024$  条同源 DNA 拷贝，形成的多线染色体比同种有丝分裂染色体长 200 倍以上，4 条配对的染色体全长可达 2 mm。配对染色体的着丝粒部位结合在一起形成染色中心 (图 11-29)。

早期遗传学分析认为，果蝇多线染色体一条带代表一个基因，一个基因编码一种基本蛋白质。Bossy 等 (1984) 在果蝇基因组中克隆出一段 315 kb 的连续 DNA 序列，以该 DNA 为探针检测该区段 DNA 所转录的 mRNA，结果发现 mRNA 的种类是被鉴定的带的数目的 3 倍。所以把每条带看做一个特异的基因组区更为恰

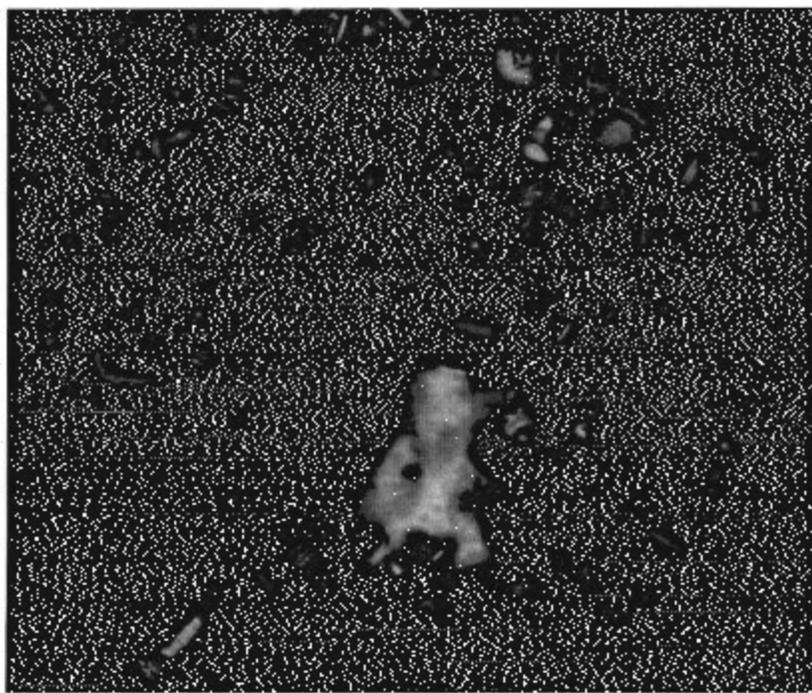


图 11-29 果蝇唾腺细胞全套多线染色体

图中红色信号表示异染色质蛋白 HP1 在多线染色体上的分布，绿色是 dCAF-1-p180 蛋白的分布。(黄海和焦仁杰博士提供)

当。最近的研究表明，多线染色体的带和间带都含有基因，有可能“持家”基因 (housekeeping gene) 位于间带，而有细胞类型特异性的“奢侈”基因 (luxury gene) 位于带上。

### (二) 灯刷染色体

灯刷染色体在 1882 年由 W. Flemming 在研究美西螈卵巢切片时首次报道，但由于其形态特殊而未能肯定。1892 年，Rukert 研究鲨鱼卵母细胞时，给灯刷染色体以正式命名。现已知道，灯刷染色体几乎普遍存在于动物界的卵母细胞中，其中两栖类卵母细胞的灯刷染色体最典型，也研究得最深入。在植物界，也有关于灯刷染色体的报道。如垂花葱 (*Allium cernuum*) 和玉米雄性配子减数分裂中出现不很典型的灯刷染色体，而大型的单细胞藻类地中海伞藻 (*Acetabularia mediterranea*) 却有典型的灯刷染色体。

灯刷染色体是卵母细胞进行减数分裂第一次分裂时停留在双线期的染色体。它是一个二价体，包含 4 条染色单体。此时同源染色体尚未完全解除联会，因此可见到几处交叉。这一状态在卵母细胞中可维持数月或数年之久。

灯刷染色体轴由染色粒轴丝构成，每条染色体轴长约 400  $\mu\text{m}$  (多数有丝分裂染色体 < 10  $\mu\text{m}$ )。从染色粒向两侧伸出两个相类似的侧环，每个环相当于一个袢环结构域，一个平均大小的环约含 100 kb DNA。两栖类一套灯刷染色体约含 10 000 个这样的染色质侧环，不同的侧环有各自的特异 DNA 序列，每个环在细胞中有 4 个拷贝。

灯刷染色体的形态与卵子发生过程中营养物储备是密切相关的。大部分 DNA 以染色粒形式存在，没有转录活性，而侧环是 RNA 活跃转录的区域，一个侧环往往是一个大的转录单位或几个转录单位组合构成的。转录的 RNA 副本 3' 端借助 RNA 聚合酶固定在侧环染色质轴丝上，游离的 5' 端捕获大量蛋白质形成核糖核蛋白复合物，组成环周围的基质。环的粗细变化表示基质的厚薄和转录 RNA 的长短。转录起始点 RNA 短，随着 RNA 聚合酶读码而逐渐延长。用 RNase 和蛋白酶可将基质消化，侧环轴丝保留。改用 DNase 消化，侧环轴丝解体消失，说明基质由 RNP 组成，轴丝由 DNA 组成。灯刷染色体合成的 RNA 主要为前体 mRNA，有些类型的 mRNA 可翻译成蛋白质，有些 mRNA 与蛋白质结合，暂不翻译而储存在卵母细胞中。

核仁 (nucleolus) 是真核细胞间期核中最显著的结构。在光镜下被染色的细胞、相差显微镜下的活细胞或分离细胞的细胞核都容易看到核仁，它们通常表现为单一或多个匀质的球形小体。核仁的大小、形状和数目随生物的种类、细胞类型和细胞代谢状态不同而变化。蛋白质合成旺盛、活跃生长的细胞 (如分泌细胞、卵母细胞) 的核仁大，可占总核体积的 25%；不具蛋白质合成能力的细胞如肌细胞、休眠的植物细胞，其核仁很小。在细胞周期过程中，核仁又是一个高度动态的结构，在有丝分裂期间表现出周期性的消失与重建。

真核细胞的核仁具有重要功能，它是 rRNA 合成、加工和核糖体亚单位的组装场所。

### 一、核仁的结构

电镜下核仁的超微结构与胞质中的大多数细胞器不同，它没有被膜包裹。尽管核仁的大小、形态和超微结构明显地随所研究的细胞类型和细胞的代谢状态不同而变化，但 3 种基本的核仁结构组分仍可通过超薄切片的电镜观察加以识别 (图 11-30)。

#### (一) 纤维中心

在电镜下观察，纤维中心 (fibrillar center, FC) 是包埋在颗粒组分内部一个或几个浅染的低电子密度的圆形结构。电镜细胞化学和放射自显影研究已经确证，在纤维中心存在 rDNA、RNA 聚合酶 I 和结合的转录因子，并且光镜及电镜水平的原位分子杂交也证明了这种 DNA 具有 rRNA 基因 (rDNA) 的性质。根据形态相似性和嗜银蛋白的存在，通常认为 FC 代表染色体 NOR 在间期核的副本。然而由于核仁活性的变化，FC 的数目可能超过染色体 NOR 的数目。并且有证据表明，FC 中的染色质不形成核小体结构，也没有组蛋白存在，但存在嗜银蛋白。其中磷蛋白 C23 的存在已得到免疫电镜的证明，并认为它是和 rDNA 结合在一起的，可能与核仁中染色质结构的调节有关。

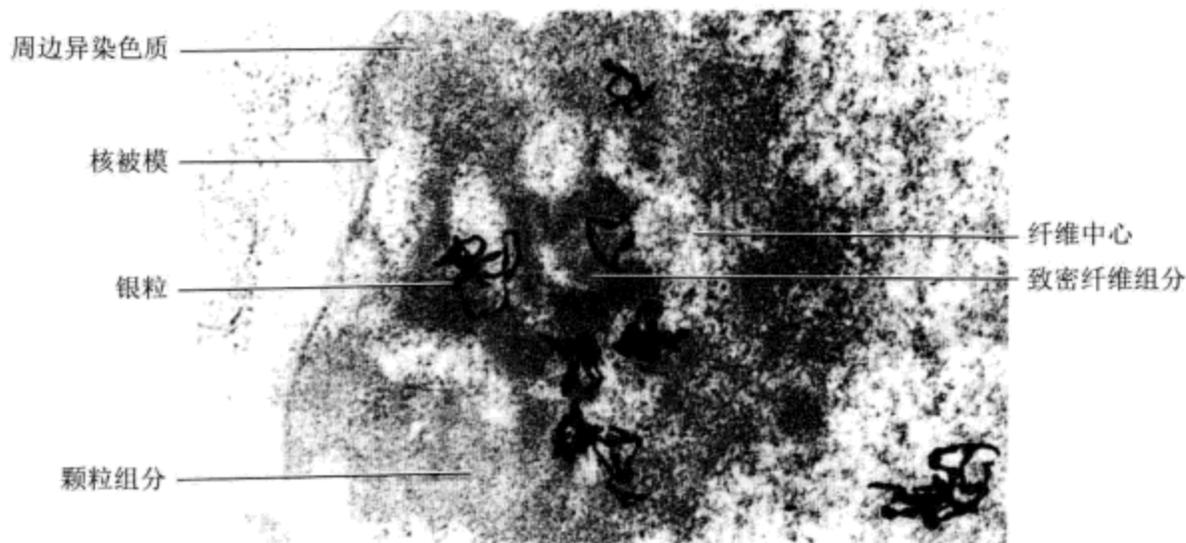


图 11-30 BHK-21 细胞核仁的电镜照片

银粒示 rRNA 转录部位。(丁明孝提供)

## (二) 致密纤维组分

在电镜下观察，致密纤维组分 (dense fibrillar component, DFC) 是核仁超微结构中电子密度最高的部分，呈环形或半月形包围 FC，由致密的纤维构成，通常见不到颗粒。用  $^3\text{H}$  作为 RNA 前体物对细胞进行脉冲标记，根据电镜放射自显影观察，带放射性标记的第一个核仁结构就是 DFC。电镜原位分子杂交也证明 rRNA 以很高的密度出现在 DFC 区域。此外，研究还发现 DFC 有特异性结合蛋白，其中比较清楚的是核仁纤维蛋白 (fibrillarin)、核仁蛋白 (nucleolin) 和 Ag-NOR 蛋白。

## (三) 颗粒组分

在代谢活跃的细胞的核仁中，颗粒组分 (granular component, GC) 是核仁的主要结构。它由直径 15~20 nm 的 RNP 构成，可被蛋白酶和 RNase 消化。这些颗粒是正在加工、成熟的核糖体亚单位前体颗粒。间期核中核仁的大小差异主要是由颗粒组分数量的差异造成的。

除上述 3 种基本核仁组分外，在观察电镜超薄切片时会发现，核仁虽然没有膜包裹，但被或多或少的染色质所包围，这层染色质称为核仁相随染色质 (nucleolar associated chromatin)；有时还深入到核仁内，称为核仁内染色质 (intranucleolar chromatin)；而包围核仁的染色质称为核仁周边染色质 (perinucleolar chromatin)。此外，应用 RNase 和 DNase 处理核仁，在电镜下看到核仁的残余结构，称为核仁基质 (nucleolar matrix) 或核仁骨架。FC, DFC 和 GC 3 种组分都湮没在这种无定形的核仁基质中。

现有研究资料普遍认为，上述 3 种基本核仁组分以某种方式和 rRNA 的转录与加工形成 RNP 的不同事件有

关。比较一致的看法认为，FC 是 rRNA 基因的储存位点，转录主要发生在 FC 与 DFC 的交界处。初始 rRNA 转录本首先出现在 DFC 并在那里加工，某些加工步骤也发生在 GC 区，并负责将 rRNA 与核糖体蛋白组装成核糖体亚基，所以 GC 代表核糖体亚基成熟和储存的位点。目前，关于 rRNA 基因转录的确切位点仍有不同见解。

## 二、核仁的功能

核仁的主要功能与核糖体的生物发生 (ribosome biogenesis) 相关。这是一个向量过程 (vectorial process)，从核仁纤维组分开始，再向颗粒组分延续。这一过程包括 rRNA 的合成、加工和核糖体亚单位的组装。详细内容请参见本书第十二章。

除此之外，核仁的另一个功能涉及 mRNA 的输出与降解。最初的观察发现，哺乳类细胞通过紫外线照射灭活核仁，可阻止非核糖体 RNA 的输出。虽然在高等真核细胞大量 poly (A) RNA 并不定位于核仁，但是一些特殊的 mRNA (如 MyoD、N-myc 的转录本) 已在核仁中检测到。在酵母中也发现，*mtr1-1* 和 *mtr2-1* 基因突变或重度热休克 (severe heat shock) 会干扰 mRNA 的运输，导致 poly (A) RNA 在核仁中的积累。

## 三、核仁的动态周期变化

在细胞周期中，核仁是一种高度动态的结构，在形态和功能上都发生很大的变化。当细胞进入有丝分裂时，核仁首先变形和变小，然后随着染色质凝集，核仁消失，所有 rRNA 合成停止，致使在中期和后期细

胞中没有核仁；在有丝分裂末期，rRNA合成重新开始，核仁的重建随着核仁物质聚集成为分散的前核仁体（prenucleolar body, PNB）而开始，然后在NOR周围融合成正在发育的核仁。

在细胞周期中核仁周期（nucleolar cycle）性变化的分子过程还不十分清楚。但研究表明，核仁的动态变化是rDNA转录和细胞周期依赖性的。在细胞周期的间期，核仁结构完整性（structure integrity）的维持，以及有丝分裂后核仁结构的重新建成，都需要rRNA基因的活性。用带有荧光标记的RNA聚合酶I抗体显微注射到体外培养的PtK2细胞核中，rRNA基因的转录被选择性抑制。通过双标记免疫荧光显微术（double label immunofluorescence microscopy）和电镜观察发现，注射RNA聚合酶I抗体后，DFC很快开始去整合并导致核仁解体，核质内充满大量核仁外体（extra nucleolar body），用fibrillarin抗体染色证明，这些核仁外体具有DFC性质，残余的核仁失去DFC，主要由FC和GC组成。由此可见，DFC在核仁中的定位与整合，关键依赖于正在转录的rRNA基因。

采用上述相同的方法，将RNA聚合酶I抗体注射到有丝分裂中期的细胞内。被注射的细胞虽然能继续完成分裂并且子细胞按正常周期运转进入G<sub>1</sub>期，但它们却不能重建核仁，而是在核中充满许多PNB。PNB含有fibrillarin及其他核仁蛋白，但没有RNA聚合酶I和拓扑异构酶I，也没有rDNA。结果表明，预先形成的PNB围绕染色体NOR重建核仁，同样需要RNA聚合酶I的活性形式，rRNA基因转录的抑制是阻止核仁重建的早期步骤。

#### 四、核体

虽然核仁是细胞核里最显著的结构，但细胞核内也存在其他一些核体（nuclear body）结构。这些结构包括：Cajal体（Cajal body）、GEMS（Gemini of coiled body）以及染色质间颗粒（interchromatin granule clusters, speckles）。与核仁一样，这些亚核结构没有膜的包被，并且是高度动态变化的。它们的出现可能是蛋白质和RNA组分（或许也有DNA）相互作用的结果。这些组分与在基因表达过程中发挥作用的生物大分子的合成、组装和储存相关。Cajal体和GEMS非常相似，它们常常在核内成对出现，其实人们并不清楚它们的结构是否真正不同。它们可能是snRNAs和snoRNAs最后加工

及与蛋白质组装的场所。组成snRNPs的RNA和蛋白质都是首先在细胞质中部分组装，然后转运到细胞核中进行最后的加工。Cajal体/GEMS被认为也是snRNPs循环利用的场所。相反，染色质间颗粒被认为是成熟的、可直接用于pre-mRNAs剪接的snRNPs的储存地点。

研究这些亚核结构的功能一直存在许多困难。然而，最新的研究表明：Cajal体与端粒酶复合物（telomerase holoenzyme）有着直接的关系。端粒酶是维持祖细胞和癌细胞端粒长度的关键因子。端粒的长短直接与细胞及机体的寿命相关。Elizabeth H. Blackburn、Carol W. Greider和Jack W. Szostak因在端粒酶的发现及相关功能方面的研究获得了2009年的诺贝尔生理学或医学奖。TCAB1（telomerase Cajal body protein 1）被发现是端粒酶复合体的成分之一。它参与端粒的维持，同时它也是Cajal体的成分之一，参与RNA的剪切修饰过程。用RNA干扰的方法去除TCAB1的功能，Cajal就不能与TERC（telomerase RNA）相结合，端粒酶也就不能维持端粒的长度。

通过遗传学的手段（包括基因剔除鼠和人类自发突变），科学家发现GEMS包含SMN（survival of motor neurons）蛋白。该蛋白编码基因的突变导致可遗传的脊柱肌肉萎缩症（spinal muscular atrophy）。这一疾病的病因可能是由于snRNPs组装的细微缺陷而引起的pre-mRNAs剪接缺陷。

## 第六节 核基质

在真核细胞的核内除染色质、核膜与核仁外，还有一个以蛋白质成分为主的网架结构体系，这一网架结构体系最初由Coffey和Berezney等人（1974）从大鼠肝细胞核中分离出来。他们用核酸酶（DNase和RNase）与高盐溶液对细胞核进行处理，将DNA、组蛋白和RNA抽提后发现核内仍残留有纤维蛋白的网架结构，并将其称之为核基质（nuclear matrix）。因为它的基本形态与胞质骨架很相似，又与胞质骨架体系有一定的联系，因此有人称之为核骨架（nuclear skeleton）。近年来，核骨架的研究取得很大进展，已成为细胞生物学研究的一个前沿领域。目前，对核骨架可以有两种理解：广义的概念，核骨架应包括核基质、核纤层（或核纤层-核孔复合体结构体系），以及染色体骨架

(chromosome scaffold)；另一种狭义的概念仅把核骨架具体理解为核基质。这里明确提出的核基质就是指在细胞核内，除了核被膜、核纤层、染色质与核仁以外的网架结构体系。从这一理解出发，核骨架与核基质具有等同含义。

迄今为止，对核骨架的研究认识大致可归纳为：

(1) 核骨架是存在于真核细胞核内的结构体系。

(2) 核骨架与核纤层、中间丝相互连接形成的网络体系，是贯穿于核与质的一个相对独立的结构系统。

(3) 核骨架的主要成分是由非组蛋白的纤维蛋白构成的，含有多种蛋白质成分。少量RNA的存在可能对维持核骨架结构的完整性是必要的。

(4) 核骨架与DNA复制、基因表达及染色体的组装与构建有密切关系。

## ● 思考题 ●

1. 概述细胞核的基本结构及其主要功能。
2. 试述核孔复合体的结构及其功能。
3. 染色质按功能分为几类？它们的特点是什么？
4. 组蛋白与非组蛋白如何参与表观遗传的调控？
5. 试述从DNA到染色体的包装过程。DNA为什么要包装成染色质？
6. 分析中期染色体的3种功能元件及其作用。
7. 概述核仁的结构及其功能。
8. 如何保证大量的细胞生命活动在很小的细胞核内有序进行？
9. 自行选择重要名词并进行解释。

## ● 参考文献 ●

1. Cooper G M, Hausman R E. The Cell: a molecular approach. 3rd ed. Washington: ASM Press, 2004.
2. Dorigo B, Schalch T, Kulangara A, *et al.* Nucleosome arrays reveal the two start organization of the chromatin fiber. *Science*, 2004, 306:1 571-1 573.
3. Fischle W, *et al.* Regulation of HP1 chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, 2005, 438: 1 116-1 122.
4. Huang H, Yu Z, Zhang S, Liang X, Chen J, Li C, Ma J, Jiao R. Drosophila CAF-1 regulated HP<sub>1</sub>-mediated epigenetic silencing and pericentric heterochromatin stability. *J Cell Sci*, 2010, 123: 2 853-2 861.
5. Lewin B. Genes VIII. New York: Oxford University Press, 2004.
6. Luger K, *et al.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 1997, 389:251-259.
7. Okamoto I, *et al.* Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, 2004, 303: 644-649.
8. Probst A V, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nature Rev*, 2009, 10:192-206.
9. Tachiwana H, Kagawa W, Osakabe A, Kawaguchi K, Shiga T, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Kurumizaka H. Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107:10 454-10 459.
10. Towbin B D, Meister P, Gasser S M. The nuclear envelope – a scaffold for silencing? *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 18:180-186.
11. Tran E J, Wentz S R. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell*, 2006, 125:1 041-1 053.
12. Venteicher A S, Abreu E B, Meng Z, *et al.* A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomerase synthesis. *Science*, 2009, 323:644-648.
13. Zhang C, Clarke P R. Chromatin independent nuclear envelope assembly induced by Ran GTPase in *Xenopus* egg extracts. *Science*, 2000, 288:1 429-1 432.

# 核糖体

核糖体是一种核糖核蛋白颗粒 (ribonucleoprotein particle), 是细胞内合成蛋白质的细胞器, 其功能是按照 mRNA 的信息将氨基酸高效精确地合成多肽链。1953 年, E. Robinson 和 R. Brown 用电镜观察植物细胞时发现了这种颗粒结构。1955 年 G. E. Palade 在动物细胞中也观察到类似的结构。因为富含核苷酸, 1958 年 R. B. Roberts 建议把这种颗粒命名为核糖核蛋白体, 简称核糖体 (ribosome)。

核糖体几乎存在于一切细胞内。不论是原核细胞还是真核细胞, 均含有大量的核糖体。即使最小最简单的细胞——支原体, 也至少含有数以百计的核糖体。线粒体和叶绿体中含有合成自身某些蛋白质的核糖体。目前, 仅发现在哺乳动物成熟的红细胞等极个别高度分化的细胞内没有核糖体, 因此可以说核糖体是细胞最基本的不可缺少的结构。核糖体是一种不规则的颗粒状结构, 没有生物膜包裹, 其直径为 25~30 nm, 主要成分是 RNA 与蛋白质。核糖体 RNA 称为 rRNA, 蛋白质称 r 蛋白, RNA 约占 2/3, 而蛋白质约占 1/3。r 蛋白分子主要分布在核糖体的表面, 而 rRNA 则主要位于内部, 二者靠非共价键结合在一起。rRNA 对控制翻译的精确性、tRNAs 的选择、蛋白因子的结合、肽键的形成等发挥主要作用。在真核细胞中很多核糖体附着在内质网

的膜表面, 称为附着核糖体, 它与内质网形成复合细胞器, 即糙面内质网 (或称粗面内质网)。在原核细胞的质膜内侧也常有附着核糖体。还有一些核糖体不附着在膜上, 呈游离状态, 分布在细胞质基质中, 称游离核糖体。附着核糖体与游离核糖体的结构与化学组成完全相同, 只是所合成的蛋白质种类不同。

核糖体常常分布在细胞内蛋白质合成旺盛的区域, 其数量与蛋白质合成程度有关。处在指数生长期的细菌, 每个细胞内大约有数以万计的核糖体, 其含量可达细胞干重的 40%。而在培养的饥饿细胞内, 仅有几百个核糖体。在体外培养的 HeLa 细胞中, 核糖体的数目为  $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$  个。

核糖体发现至今已有 50 多年时间。作为蛋白质合成的场所, 核糖体在细胞代谢中具有举足轻重的地位。其复杂的结构, 更是人们了解生物大分子及其复合物结构与功能关系的一个非常好的范例。因此, 自从确定核糖体的生物学功能以来, 研究者就对其发挥功能的结构基础非常关注, 希望解开核糖体的结构之谜。2000 年, 对核糖体的三维结构研究取得了突破性进展, 这对更加全面地认识核糖体总体结构及翻译过程具有重要意义。核糖体的实质是核酶, 核酶的发现为生命起源于 RNA 世界的假说提供了支撑。

## 第一节 核糖体的类型与结构

### 一、核糖体的基本类型与化学组成

核糖体有两种基本类型：一种是原核细胞核糖体，另一种是真核细胞核糖体。两种核糖体都由两个大小不同的亚基 (subunit) 组成，每个亚基都含有大量的 rRNA 和蛋白质。原核细胞核糖体沉降系数为 70 S (S 为 Svedberg 沉降系数单位)，相对分子质量为  $2.5 \times 10^6$ ；真核细胞核糖体沉降系数为 80 S，相对分子质量为  $4.2 \times 10^6$ 。体外实验表明，70 S 核糖体在  $Mg^{2+}$  浓度小于 1 mmol/L 的溶液中，易解离为 50 S 与 30 S 的大小亚基 (图 12-1)。当溶液中  $Mg^{2+}$  浓度大于 10 mmol/L 时，两个核糖体常常形成 100 S 的二聚体。真核细胞线粒体与叶绿体内有自身的核糖体，沉降系数近似于 70 S。

用 EDTA、尿素和一价盐可逐级去掉核糖体上的 r 蛋白，最后得到纯的 rRNA。对核糖体的成分分析结果如表 12-1 所示。在原核细胞大肠杆菌中，50 S 与 30 S 的大小亚基的相对分子质量分别为  $1.6 \times 10^6$  和  $0.9 \times 10^6$ 。小亚基中含有一个 16 S 的 rRNA 分子，相对分子质量为  $0.6 \times 10^6$ ，由 1 542 个核苷酸组成。大亚基含有一个 23 S 的 rRNA 分子，相对分子质量为  $1.2 \times 10^6$ ，由 2 904 个核苷酸组成。大亚基还含有一个 5 S 的 rRNA，相对分子质量为  $3 \times 10^4$ ，仅由 120 个核苷酸组成。从 30 S 小亚基中已发现有 21 种不同的蛋白质分子 (称 S 蛋白)，50 S 的大亚基约含 34 种蛋白质 (称 L 蛋白)。在大肠杆菌核糖体中除了 L7/L12 有 4 个拷贝、S6 有 2 个拷贝外，其余的 r 蛋白仅有一个拷贝。

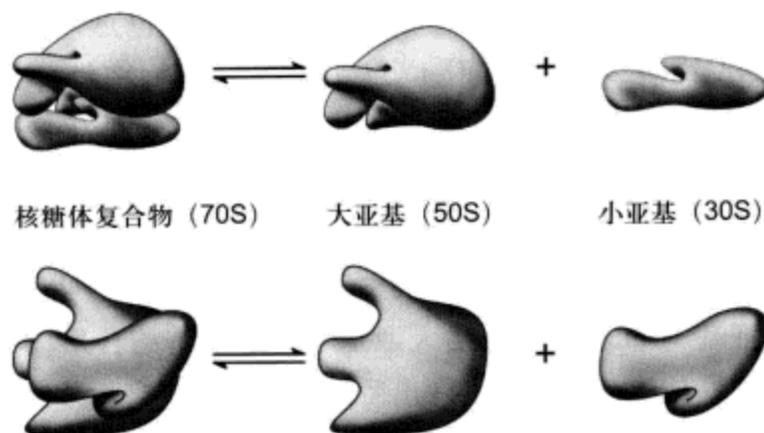


图 12-1 原核细胞核糖体结构模式图 (不同侧面观)

80 S 核糖体普遍存在于真核细胞内，对分离的核糖体进行理化性质测定，发现与原核细胞核糖体具有类似的特征。随着溶液中  $Mg^{2+}$  浓度的降低，80 S 核糖体可离解为 60 S 与 40 S 的大小亚基，当  $Mg^{2+}$  浓度增高时，80 S 核糖体又可形成 120 S 的二聚体。对 80 S 核糖体的成分分析结果如表 12-1 所示，60 S 与 40 S 亚基的相对分子质量分别为  $2.8 \times 10^6$  与  $1.4 \times 10^6$ 。小亚基中含有一个 18 S 的 rRNA 分子，相对分子质量为  $0.9 \times 10^6$ 。大亚基中含有一个 28 S 的 rRNA 分子，相对分子质量为  $1.6 \times 10^6$ ，还含有一个 5 S 的 rRNA 分子和一个 5.8 S 的 rRNA 分子。在不同的真核细胞中，核糖体也存在着差异，如动物细胞核糖体的大亚基内有 28 S rRNA，而植物细胞、真菌细胞与原生动物细胞核糖体的大亚基中却不是 28 S rRNA，而是 25~26 S rRNA；在低等真核生物细胞中，构成核糖体的 rRNA 类型比较复杂，可能不仅限于以上几种。真核细胞核糖体的小亚基约含 33 种蛋白，大亚基约含 49 种蛋白 (表 12-1)。

rRNA 中的某些核苷酸残基被甲基化修饰，甲基化常发生在 rRNA 序列较为保守的区域。如 16 S rRNA 3' 端高度保守序列中 2 个相邻的腺嘌呤核苷酸中的 4 个甲基化位点 G-m<sup>6</sup>A-m<sup>6</sup>A，它可能参与 30 S 和 50 S 亚基的

表 12-1 原核细胞与真核细胞核糖体成分比较

类型	核糖体大小		亚基	亚基大小		亚基蛋白数	亚基 RNA		
	S 值	相对分子质量		S 值	相对分子质量		S 值	碱基数	
原核细胞核糖体	70 S	$2.5 \times 10^6$	大亚基	50 S	$1.6 \times 10^6$	34	23 S	2 904	
			小亚基	30 S	$0.9 \times 10^6$		5 S	120	
真核细胞核糖体	80 S	$4.2 \times 10^6$	大亚基	60 S	$2.8 \times 10^6$	~49	25~28 S	≤4 700	
			小亚基	40 S	$1.4 \times 10^6$		~33	5.8 S	160
								18 S	1 900

结合过程。16 S rRNA 一般有 10 个甲基化位点，23 S rRNA 约有 20 个甲基化位点。在哺乳动物核糖体的 18 S rRNA 和 28 S rRNA 中，其甲基化位点分别为 43 个和 74 个，约占全部核苷酸总数的 2%，远高于原核细胞的 rRNA。

核糖体大小亚基常常游离于细胞质基质中，只有当小亚基与 mRNA 结合后大亚基才与小亚基结合形成完整的核糖体。肽链合成终止后，大小亚基解离，又游离于细胞质基质中。

## 二、核糖体的结构

作为蛋白质的翻译机器，核糖体是细胞中最为复杂的结构之一，它很像一个流动的小工厂，在其他辅助因子的帮助下，以极快的速度合成肽链（真核细胞每个核糖体每秒能将 2 个氨基酸添加到肽链上，而细菌核糖体合成速度可达 20 个氨基酸/秒）。对核糖体结构进行精细分析的必要手段是 X 射线衍射分析，其前提是获得高质量的核糖体晶体。由于核糖体相对分子质量太大，结构太复杂，直到 20 世纪 70 年代，许多结晶学家对于核糖体能否结晶仍然表示怀疑。1980 年，以色列科学家 Ada E. Yonath 等得到了核糖体的第一个晶体。随后，通过不断改进，得到了死海微生物嗜盐细菌 (*Haloarcula marismortui*) 核糖体 50 S 大亚基 0.24 nm 分辨率图谱以及嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) 0.33 nm 和 0.3 nm 分辨率的 30 S 小亚基图谱，*E. coli* 0.35 nm 70 S 完整核糖体图谱也成功获得 (图 12-2)。美国科学家 V. Ramakrishnan、T. A. Steitz 以及以色列科学家 Yonath 因为对核糖体三维结构和功能研究做出了突出贡献而获得 2009 年诺贝尔化学奖。在核糖体结构研究中，电子显微镜也发挥了关键作用。20 世纪 50 年代，Palade 发现了核糖体，20 年后，电镜下观察到了大肠杆菌完整核糖体及其大小亚基的形态。20 世纪 90 年代中期，因为低温电子显微镜技术 (EM) 的应用，逐渐获得了核糖体与延伸因子 (EF-Tu) 以及 tRNA 等分子相互作用的动态图。结合 X 射线晶体衍射和低温电子显微镜两种方法获得的数据，人们对核糖体结构和功能的认识更加深入。这些研究结果揭示了核糖体蛋白质与 rRNA 的三维关系以及核糖体与翻译起始因子、mRNA、tRNA 相互作用的详细信息，对核糖体生物学活性部位有了更加准确的认识，也为基于核糖体结构的抗生素药物设计提供了基础。

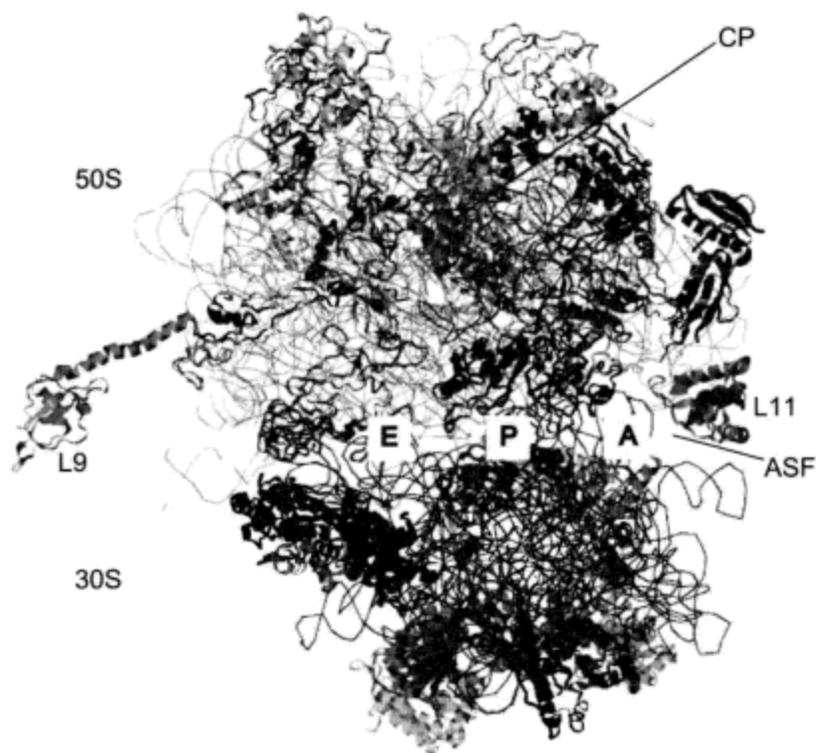


图 12-2 大肠杆菌 70 S 完整核糖体 X 射线晶体学结构

线条表示 rRNA，条带表示核糖体蛋白质。30 S 亚基包括头部、颈部、平台、主体、肩部等，50 S 亚基包括 L9 蛋白，中央凸起 (central protuberance, CP)，A 位点手指结构 (A-site finger, ASF) 以及 L11 蛋白。核糖体 A、P、E 位点存在于大小亚基连接面。核糖体分辨率为 0.35 nm。(基于 PDB 数据库 2AWB 结构绘制)

从图 12-2 可见，rRNA 折叠成高度压缩的三维结构，不但构成了核糖体的核心，还决定了核糖体的整体形态。这些 rRNA 类似三维拼图玩具的部件一样在核糖体中相互连锁，从而构成一个单一的实体。与 rRNA 的核心地位不同的是，核糖体蛋白通常定位在核糖体的表面，或填充于 rRNA 之间的缝隙。核糖体蛋白质大多有一个球形结构域和伸展的尾部。最出人意料的是，核糖体蛋白的球形结构域分布于核糖体表面，而其伸展的多肽链尾部则伸入核糖体内折叠的 rRNA 分子中。分析表明这些肽链由约 26% 的精氨酸、赖氨酸以及丰富的甘氨酸和脯氨酸组成。但核糖体上的活性部位——催化蛋白肽键形成的地方——只包括 rRNA。这表明核糖体蛋白质本身不参与将遗传信息变成蛋白质的反应，它们的作用类似于黏土或砂浆，将关键的 rRNA “砖”粘在一起，从而稳定 rRNA，有助于 RNA 催化蛋白质合成时自身构象的改变。

对核糖体高分辨率的 X 射线衍射图谱分析表明：

(1) 每个核糖体含有 4 个 RNA 分子的结合位点，其中 1 个位点供 mRNA 结合，3 个位点供 tRNA 分子结合，分别为 A 位点 (aminoacyl site)、P 位点 (peptidyl

site) 和 E 位点 (exit site)。这些位点横跨核糖体大小亚基结合面。

(2) 在核糖体大小亚基结合面, 特别是 mRNA 和 tRNA 结合处, 无核糖体蛋白分布。这也意味着在核糖体起源之初可能仅由 RNA 组成。

(3) 催化肽键形成的活性位点由 RNA 组成。

(4) 大多数核糖体蛋白有一个球形结构域和伸展的尾部, 球形结构域分布于核糖体表面, 而其伸展的多肽链尾部则伸入核糖体内折叠的 rRNA 分子中。也有些核糖体蛋白完全没有球形结构域, 如小亚基的 S14 及大亚基的 L39e 蛋白。许多核糖体蛋白与 RNA 具有多个结合位点, 发挥稳定 rRNA 三级结构的作用。

对于 rRNA, 特别是 16 S rRNA 结构的研究已积累了丰富的资料。测序表明, 大肠杆菌 16 S rRNA 有 1 542 个碱基。通过对 500 多种不同生物的 rRNA 序列的分析, 发现其一级结构在进化上非常保守, 某些序列完全一致。16 S rRNA 的二级结构具有更高的保守性, 尽管不同种的 rRNA 的一级结构可能有所不同, 但它们都折叠成相似的二级结构——即由多个茎环 (stem-loop structure) 所组成的结构。其中不到半数的碱基配对, 且配对区一般小于 8 bp, 而未配对的碱基形成环 (loop)。整个 16 S rRNA 可分成 4 个结构域, 即中心结构域 (central domain)、5' 端结构域 (5' domain)、3' 端主结构域 (3' major domain) 及 3' 端次结构域 (3' minor domain)。23 S rRNA 结构比 16 S rRNA 复杂, 其二级结构有 6 个结构域, 分别为结构域 I~VI。

rRNA 三级结构的稳定涉及多种作用力, 如 rRNA 螺旋间的相互作用以及腺嘌呤插入螺旋小沟的作用力等。在形成三级结构后, 16 S rRNA 每一个大的结构域都对应小亚基的一个形态部位。如 5' 端结构域形成了小亚基的主体 (body), 中心结构域形成了平台 (platform), 3' 端主结构域形成了头部 (head), 3' 端次结构域横跨了界面。而 23 S rRNA 的 6 个结构域在 50 S 大亚基中却是相互交织在一起, 形成一个“集成”结构。这种差异可能体现了韧性是小亚基发挥功能所需要的。

### 三、核糖体蛋白质与 rRNA 的功能

核糖体上具有一系列与蛋白质合成有关的结合位点与催化位点 (图 12-3):

(1) 与 mRNA 结合的位点 蛋白质的起始合成首先需要 mRNA 与小亚基结合。原核生物中, 核糖体与

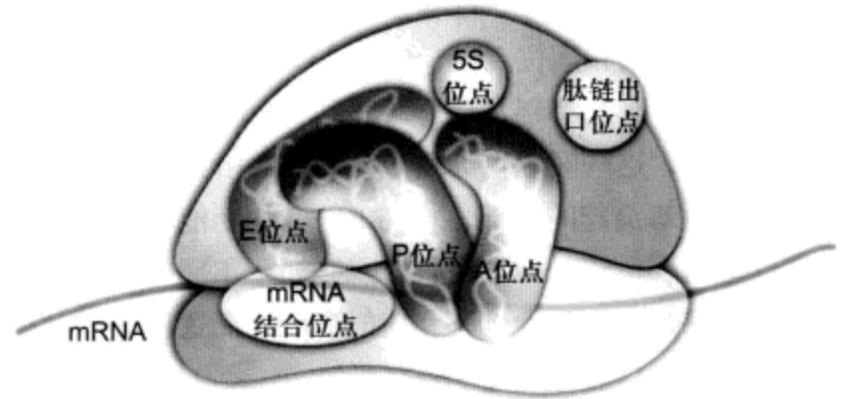


图 12-3 核糖体中主要活性部位示意图

mRNA 的结合位点位于 16 S rRNA 的 3' 端, 其准确识别的基础是细菌 mRNA 有一段特殊的 Shine-Dalgarno 序列 (SD 序列), 位于起始密码子上游 5~10 bp 处。SD 序列能与核糖体小亚基 16 S rRNA 的 3' 端序列互补结合。真核生物没有 SD 序列, 核糖体小亚基准确识别 mRNA 的基础主要依赖于 mRNA 5' 端的甲基化帽子结构。

(2) A 位点 与新掺入的氨酰-tRNA 结合的位点——氨酰基位点。

(3) P 位点 与延伸中的肽酰-tRNA 结合的位点——肽酰基位点。

(4) E 位点 脱氨酰 tRNA 的离开 A 位点到完全释放的一个位点。

(5) 与肽酰 tRNA 从 A 位点转移到 P 位点有关的转移酶 (即延伸因子 EF-G) 的结合位点。

(6) 肽酰转移酶的催化位点。

此外还有与蛋白质合成有关的其他起始因子、延伸因子和终止因子的结合位点。这些结合位点位于核糖体的哪个亚基及其确切位点, 已有比较多的了解。

已知与 tRNA 结合的 P 位点、A 位点或 E 位点各自都涉及一套 rRNA 上不同的区域。16 S rRNA 与 tRNA 同 P 位点和 A 位点的结合有关, 23 S rRNA 与 tRNA 同 P 位点、A 位点和 E 位点的结合有关。例如, 与 tRNA 结合的 A 位点, 在 16 S rRNA 中主要位于 530 和 1 400/1 500 区域两部分 (数码指 rRNA 核苷酸序号), 这也是 16 S rRNA 两个最保守的区域, 与 tRNA 结合最强的区域是 G530、A1 492 和 A1 493 (英文字母代表碱基种类), 其次是 A1 408 和 G1 494。在 16 S rRNA 和 23 S rRNA 中与 A 位点、P 位点或 E 位点有关的碱基序列几乎都是共同的保守序列, 而且与各结合位点有关的一套碱基又各自不同。某些 r 蛋白, 如小亚基上的 S2、S3 和 S14 参与氨酰-tRNA 与 A 位点的结合; L13 和 L27 则是大亚基

上 P 位点的组成成分。延伸因子 EF-G 和 EF-Tu 结合到大亚基的一套相同位点上, 位于 23 S rRNA 2660 区域的共同保守序列, 特别是与 G2655、A2660 和 G2661 结合更为紧密, 这些区域也涉及 r 蛋白 L11 和 L7/L12, 它们位于大亚基突起的底部, 均与 EF-G 的功能有关。在研究这些结合位点时, 人们也注意到处于不同的结合条件下, 核糖体的构象发生了相应的变化, 而这些变化对核糖体行使其功能可能是十分必要的。

核糖体中最主要的活性部位是肽酰转移酶的催化位点。早些时候人们普遍认为既然酶的本质是蛋白质, 那么核糖体中一定有某种蛋白质与蛋白质合成中的催化作用有关。虽然 RNA 占核糖体的 60% 以上, 但长期以来它仅仅被看做是 r 蛋白的组织者, 即形成核糖体的内部结构框架或是与蛋白质合成过程中所涉及的 RNA 碱基配对有关。在对 r 蛋白和 rRNA 进行大量研究特别是利用化学方法和遗传突变株来研究 r 蛋白的功能以后, 人们对 r 蛋白是否具有催化蛋白质合成的活性提出了疑问:

(1) 很难确定哪一种蛋白质具有催化功能, 在大肠杆菌中很多 r 蛋白突变甚至缺失对蛋白质合成并没有表现出“全”或“无”的影响, 即并不引起蛋白质合成的完全抑制。

(2) 多数抗蛋白质合成抑制剂的突变株, 并非由于 r 蛋白的基因突变而往往是 rRNA 基因发生了突变。

(3) 在整个进化过程中, rRNA 的结构比 r 蛋白的结构具有更高的保守性。越来越多的事实使人们推测, rRNA 在蛋白质合成过程中可能具有重要作用。

H. F. Noller 用高浓度的蛋白酶 K、强离子型去污剂 SDS 以及苯酚等试剂处理大肠杆菌 50 S 的大亚基, 去掉与 23 S rRNA 结合的各种 r 蛋白。结果发现, 得到的 23 S rRNA 仍具有肽酰转移酶的活性。用对肽酰转移酶敏感的抗生素处理或用核酸酶处理均可抑制其合成多肽的活性, 但用阻断蛋白质合成其他步骤的抗生素处理, 则肽酰转移酶活性不受影响。这些结果初步揭示了在 50 S 核糖体大亚基中, 23 S rRNA 参与催化肽酰转移酶的功能。当然抽提后的 23 S rRNA 中, 还残存不到 5% 的 r 蛋白, 这些蛋白质很可能是维持 rRNA 构象所必需的。1985 年, T. R. Cech 发现 RNA 具有催化 RNA 拼接过程的活性; 1992 年又证明, RNA 具有催化蛋白质合成的活性, 这一重要发现不仅有力推动了对核糖体结构与功能的研究, 而且对生命的起源与进化过程的探索也提供了重要的依据。2000 年, 耶鲁大学研究小组在核糖体晶体图谱中定位了肽酰转移酶位点 (peptidyl-transferase site), 发现在该位点的成分全是 rRNA, 这

些成分属于 23 S rRNA 结构域 V 的中央环。因此, 人们相信 rRNA 才具有催化功能, 核糖体实际上是核酶 (ribozyme)。

目前认为, 在核糖体中, rRNA 是起主要作用的结构成分, 其主要功能是:

(1) 具有肽酰转移酶的活性。

(2) 为 tRNA 提供结合位点 (A 位点、P 位点和 E 位点)。

(3) 为多种蛋白质合成因子提供结合位点。

(4) 在蛋白质合成起始时参与同 mRNA 选择性地结合以及在肽链的延伸中与 mRNA 结合。此外, 核糖体大小亚基的结合、校正阅读 (proofreading)、无意义链或框架漂移的校正, 以及抗生素的作用等都与 rRNA 有关。

r 蛋白在翻译过程中也起着重要的作用, 如果缺失某一种 r 蛋白或对它进行化学修饰, 或 r 蛋白的基因发生突变, 都将会影响核糖体的功能, 降低多肽合成的活性。目前关于 r 蛋白的功能有多种推测, 主要有: ① 对 rRNA 折叠成有功能的三维结构是十分重要的; ② 在蛋白质合成中, 核糖体的空间构象发生一系列的变化, 某些 r 蛋白可能对核糖体的构象起“微调”作用。

## 第二节 多核糖体与蛋白质的合成

### 一、多核糖体

核糖体是蛋白质合成的机器。但核糖体在细胞内并不是单个独立地执行功能, 而是由多个甚至几十个核糖体串联在一条 mRNA 分子上高效地进行肽链的合成。这种具有特殊功能与形态结构的核糖体与 mRNA 的聚合体称为多核糖体 (polyribosome 或 polysome) (图 12-4)。每种多核糖体所包含的核糖体数量是由 mRNA 的长度来决定的, 也就是说, mRNA 越长, 合成的多肽相对分子质量越大, 核糖体的数目也越多。J. R. Waner 和 A. Rich 等发现网织红细胞内合成血红蛋白分子的多核糖体常常含有 5 个核糖体。根据血红蛋白的一条多肽链的大小 (约 150 个氨基酸) 可推算出其 mRNA 分子的长度约为 150 nm。他们将密度梯度离心技术与电镜负染色技术相结合, 观察到网织红细胞内, 多核糖体是由一条直径 1~1.5 nm 的 mRNA 串联 5 个 (有时 6 个或 4 个)

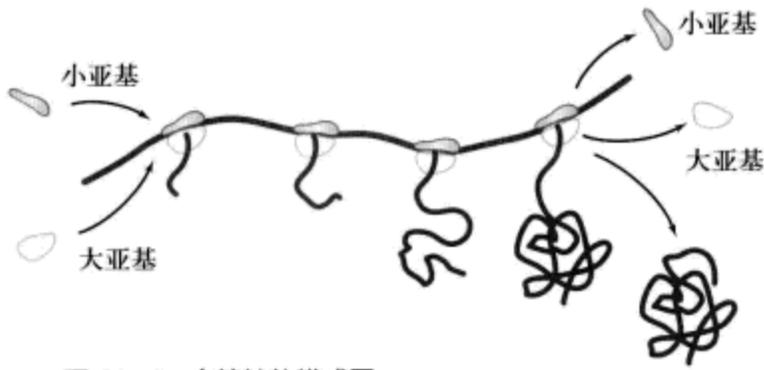


图 12-4 多核糖体模式图

核糖体组成，相邻核糖体的中心间距为 30~35 nm，多核糖体的总长约 150 nm，这与前面的推论相符。细菌的  $\beta$ -半乳糖苷酶由 1 100 个氨基酸残基组成，它的多核糖体中含有约 50 个核糖体，如将  $\beta$ -半乳糖苷酶的基因截短，mRNA 的长度随之缩短，多核糖体的大小及核糖体的数目也成比例地减少。

在真核细胞中每个核糖体每秒能将两个氨基酸残基加到多肽链上，而在细菌细胞中可将 20 个氨基酸加到多肽链上，因此合成一条完整的多肽链平均需要 20 s 至几分钟。即使在这样短的时间里，当第一个核糖体结合到 mRNA 上起始蛋白质合成后，不久第二个核糖体便结合到 mRNA 上，相邻的核糖体间距约 80 个核苷酸的距离。由于蛋白质的合成是以多核糖体的形式进行，这样细胞内各种多肽的合成，无论其相对分子质量的大小或是 mRNA 的长短如何，单位时间内所合成的多肽分子数目都大体相等，即在相同数量的 mRNA 的情况下，可大大提高多肽合成速度，特别是对于相对分子质量较大的多肽。多肽合成速度提高的倍数与结合在 mRNA 上的核糖体数目成正比。在细胞周期的不同阶段，细胞中数以万种的 mRNA 有些在合成，有些在降解，其种类与浓度不断发生变化，以多核糖体的形式进行多肽合成，这对 mRNA 的利用及对其数量的调控更为经济 and 有效。

原核细胞中，在 mRNA 合成的同时，核糖体就结合到 mRNA 上，即 DNA 转录成 mRNA 和 mRNA 翻译成蛋白质这两个生命活动是同时并几乎在同一部位进行的，所分离的多核糖体常常与 DNA 结合在一起。真核细胞中，多核糖体或附着在内质网上，或游离在细胞质基质中。

## 二、蛋白质的合成

蛋白质合成，或称蛋白质翻译是细胞中最复杂、最

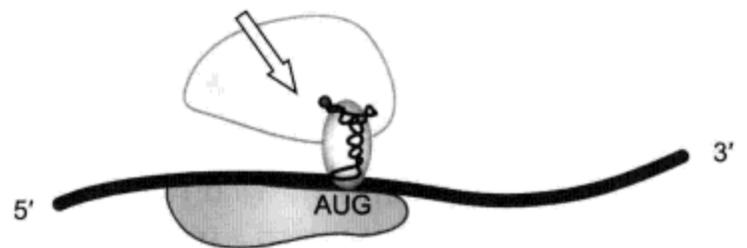
精确的生命活动之一。蛋白质的合成需要各种携带氨基酸的 tRNA、核糖体、mRNA、多种蛋白质因子、阳离子及 GTP 等的参与。在蛋白质合成过程中，有 3 个关键问题，即如何催化肽键的形成？如何识别正确的 tRNA？tRNA 和 mRNA 如何通过核糖体的活性位点？目前这些问题都有了答案。

原核细胞蛋白质合成最为清楚，以原核细胞为例，蛋白质合成包括 3 个主要阶段：肽链的起始、肽链的延伸和肽链的终止（图 12-5）。

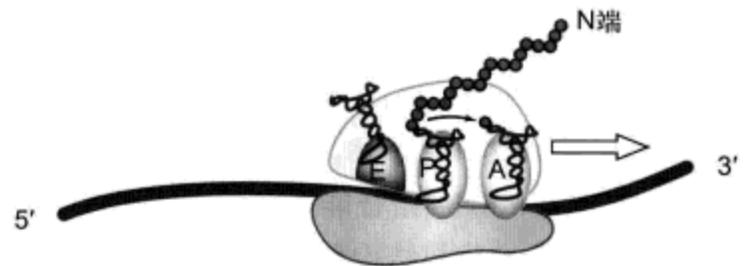
### （一）肽链的起始

蛋白质合成起始（initiation）涉及 mRNA、起始

起始：50S 亚基和氨酰-tRNA 与结合在 mRNA 上的 30S 亚基结合



延伸：核糖体沿 mRNA 移动并通过转肽反应使多肽链延长



终止：多肽链从 tRNA 上释放，核糖体大小亚基解聚

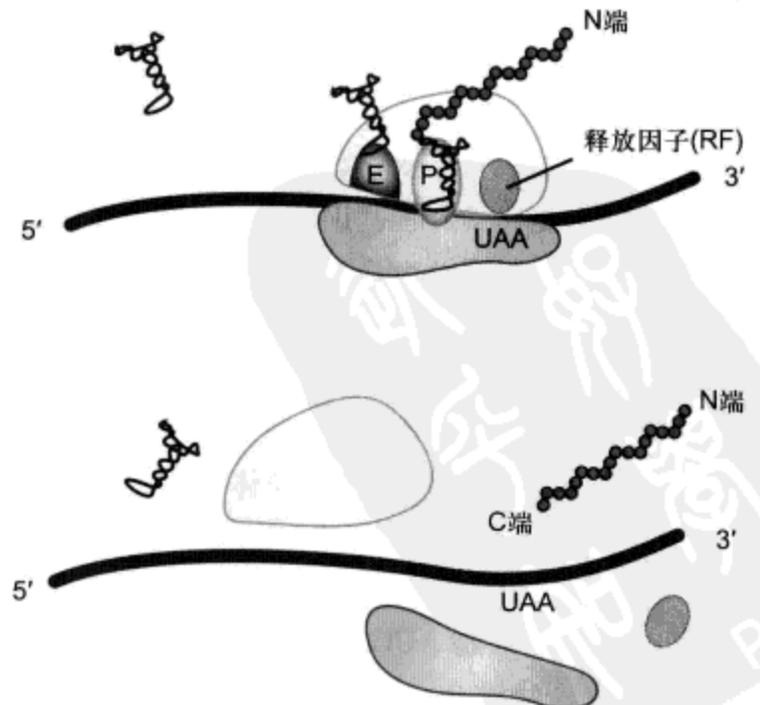


图 12-5 蛋白质合成的 3 个阶段

tRNA 和核糖体小亚基间相互作用和装配。

### 1. 30 S 小亚基与 mRNA 的结合

蛋白质合成起始阶段, mRNA 只能够与细胞质基  
质中游离的核糖体 30 S 小亚基结合, 此时, 结合部位  
是 mRNA 的起始密码子 (initiation codon) AUG。由于  
mRNA 内部仍然可能有密码子 AUG, 那么 30 S 小亚基  
是如何准确识别起始密码子 AUG 的呢? 研究发现, 在  
细菌 mRNA 起始密码子 AUG 上游 5~10 个碱基处有一  
段特殊的序列, 即 SD 序列。SD 序列能与核糖体小亚  
基 16 S rRNA 3' 端的碱基序列互补结合, 从而保证 30 S  
小亚基能准确识别起始密码子 AUG, 并结合到 mRNA  
上。SD 序列为: 5' ...AGGAGG... 3', 16 S rRNA 3' 端  
与此互补的序列为: 3' ...UCCUCC... 5'。

30 S 小亚基与 mRNA 的结合需要起始因子 (initiation  
factor, IF) 的帮助。这些起始因子仅位于 30 S 亚基上,  
而且一旦 30 S 亚基与 50 S 亚基结合形成 70 S 核糖体后  
便释放。显然, 起始因子的主要作用是帮助形成起始复  
合物。原核细胞有 3 种起始因子, 即 IF1、IF2 和 IF3。  
其中, 30 S-IF1 复合物晶体结构显示, IF1 与 30 S 亚基  
A 位点结合, 协助 30 S 亚基与 mRNA 的结合, 并防止  
氨酰-tRNA 错误进入核糖体的 A 位点; IF2 是一种 GTP  
结合蛋白, 协助第一个氨酰-tRNA 进入核糖体; IF3 能  
防止核糖体 50 S 大亚基提前与小亚基结合, 并有助于  
第一个氨酰-tRNA 进入核糖体, 在调节核糖体动态平衡  
以及 30 S 亚基与 mRNA 结合能力方面发挥了重要作用  
(图 12-6)。结合生化与结构数据, 发现在蛋白质翻译  
起始阶段, 30 S 亚基所有的 tRNA 结合位点都被占据,  
如 A 位点被 IF1 占据, P 位点被起始 tRNA 占据, 而 E  
位点被 IF3 占据。其生物学意义可能与蛋白质合成的正  
确起始有关。

真核细胞蛋白质翻译的起始与原核细胞类似, 但有  
差异, 如真核细胞 40 S 小亚基识别 mRNA 结合位点的机  
制不同, 小亚基首先识别 mRNA 5' 端甲基化帽子, 然后  
沿着 mRNA 移动扫描, 直到第一个 AUG 的出现为止。

### 2. 第一个氨酰-tRNA 进入核糖体

当 mRNA 与小亚基结合后, 携带有甲酰甲硫氨酸  
的起始 tRNA ( $tRNA_i^{Met}$ ) 进入核糖体 P 位点, 通过反  
密码子与 mRNA 中的 AUG 识别, 之后释放 IF3。

### 3. 完整起始复合物的装配

一旦起始 tRNA 与 AUG 密码子结合, 核糖体大亚  
基便与起始复合物结合, 形成完整的 70 S 核糖体——  
mRNA 起始复合物。该过程伴随与 IF2 结合的 GTP 水

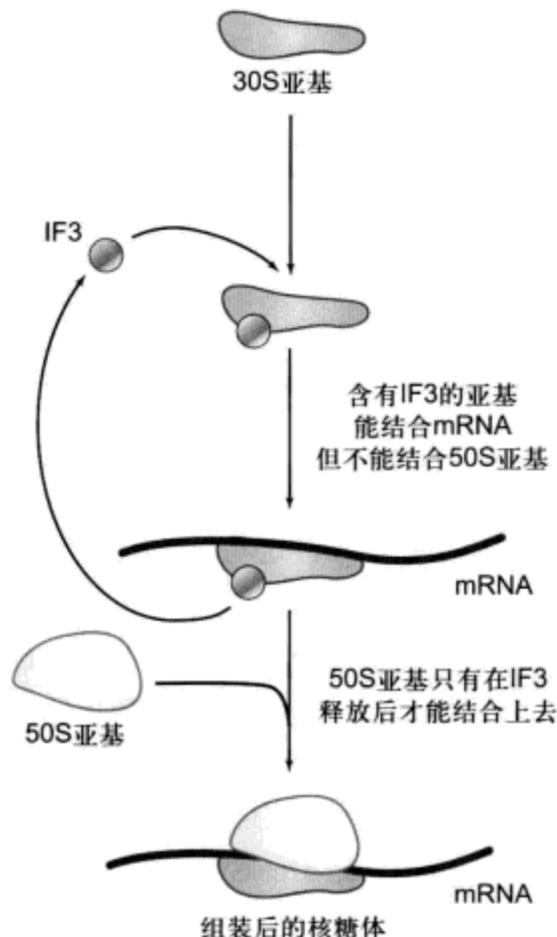


图 12-6 30 S 亚基与 IF3

解, IF1、IF2 和 IF3 释放。

## (二) 肽链的延伸

一旦起始复合物形成, 蛋白质合成随即开始, 这一  
过程称为肽链的延伸 (elongation)。主要包括 4 个步骤:  
氨酰-tRNA 进入核糖体 A 位点的选择、肽键的形成、转  
位 (translocation) 和脱氨酰-tRNA 的释放 (图 12-7)。

### 1. 氨酰-tRNA 进入核糖体 A 位点的选择

起始的  $tRNA_i^{Met}$  占据 P 位点, 核糖体接受第二  
个氨酰-tRNA 进入 A 位点, 这就是肽链延伸的第一步。  
为了有效地结合 A 位点, 第二个氨酰-tRNA 必须与有  
GTP 的延伸因子 (elongation factor, EF) EF-Tu 结合形  
成复合物氨酰-tRNA · EF-Tu · GTP。尽管任何形成复  
合物的氨酰-tRNA 都能够进入 A 位点, 但只有其反密  
码子能与 A 位点的 mRNA 密码子匹配的氨酰-tRNA 才  
能被核糖体牢牢捕捉并定位在 A 位点, 从而保证正  
确识别 tRNA。到位后, 结合在 EF-Tu 上的 GTP 水解,  
EF-Tu 连同结合在一起的 GDP 离开核糖体, 被另一  
个因子 EF-Ts 介导生成 EF-Tu · GTP。

### 2. 肽键的形成

当核糖体的 P 位点与 A 位点都有 tRNA 时, 通过  
肽键的生成将两个氨基酸结合起来。具体来讲, 是 A 位

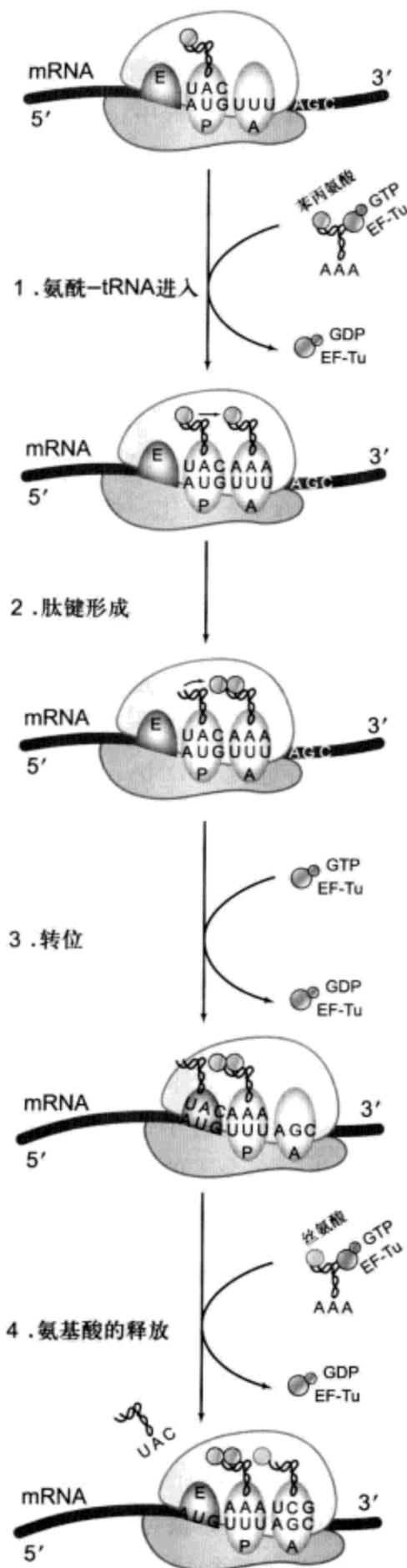


图 12-7 多肽链延伸过程示意图

主要通过 4 个步骤完成：1. 氨酰-tRNA 分子结合到核糖体 A 位点；2. 肽酰转移酶催化形成新的肽键；3. 核糖体沿 mRNA 由 5' → 3' 准确移动 3 个核苷酸的距离；4. E 位点 tRNA 从核糖体释放，另一氨酰 tRNA 可以结合到 A 位点。如此循环完成整个多肽链的延伸。

点氨酰-tRNA 氨基酸的氨基与 P 位点 tRNA 上氨基酸的羧基形成肽键。这一反应由肽酰转移酶催化，该酶是核糖体大亚基 rRNA，活性位点位于 23 S rRNA 结构域 V 的中央环。

### 3. 转位

形成第一个肽键时，A 位点的 tRNA 分子一端仍然与 mRNA 的密码子结合，另一端与一个二肽结合。此时，P 位点的 tRNA 分子已经如释重负，没有携带任何氨基酸。接下来便是延伸反应的第三步：转位，即核糖体沿着 mRNA 分子的 5' → 3' 方向移动 3 个核苷酸（一个密码子）。在转位过程中，携带二肽的 tRNA 从 A 位点移位到 P 位点，而没有携带任何氨基酸的 tRNA 从 P 位点移位到 E 位点。原核细胞 GTP 结合的延伸因子 EF-G 能促进移位过程的发生（真核生物是延伸因子 eEF2）。

### 4. 脱氨酰-tRNA 的释放

延伸反应的最后一步是脱氨酰-tRNA 离开核糖体 E 位点。一旦肽酰-tRNA 通过转位从 A 位点移位到 P 位点后，A 位点再次接受下一个能与 mRNA 第三个密码子匹配的氨酰-tRNA，又开始新的肽链延伸循环。

### (三) 肽链的终止

如果 A 位点 mRNA 是 UAA、UGA 或 UAG 终止密码子 (termination codon 或 stop codon)，由于没有与之匹配的反密码子，氨酰-tRNA 不能结合到核糖体上，于是蛋白质合成终止。释放因子 (release factor, RF) RF1 可识别 UAA 或 UAG，RF2 识别 UAA 或 UGA，催化蛋白质合成的终止 (termination)。RF1 或 RF2 识别 A 位点的终止密码子并促使肽酰转移酶催化水分子添加到肽酰-tRNA 上。这一过程实际上与肽键形成类似，只不过是水分子代替了氨基成为活化肽酰基的受体。这一反应使得多肽链末端的羧基游离出来，肽链延伸终止形成完整的蛋白链。蛋白链随即脱离核糖体进入细胞质基质，而核糖体也从 mRNA 上释放下来，解离成 30 S 和 50 S 亚基。

研究发现，新生肽链通过核糖体大亚基的一个特定通道进入细胞质基质，该通道称为肽通道。肽通道大小为 10 nm × 1.5 nm，是一个亲水性通道，内壁主要由 23 S rRNA 组成，仿佛不粘锅表面的聚四氟乙烯 (teflon) 一样，由于没有与肽链互补的结构存在，因此，新生肽链能顺利地通过肽通道。肽通道大小也提示，新生肽链通过肽通道时，往往不会以  $\alpha$  螺旋等二级

结构形式通过。从核糖体释放后，新合成的蛋白质将在分子伴侣的帮助下，形成正确的三维构象。

核糖体晶体结构的解析使我们对蛋白质合成的了解发生了很大变化。随着对结合了延伸因子与释放因子的70 S核糖体晶体结构的解析，特别是在整个翻译周期中核糖体结构状态的解析，汇合结构、生化及功能研究数据，相信不久后一场核糖体如何合成蛋白质的分子“电影”就将更加清晰地呈现在我们面前。

### 三、核糖体与 RNA 世界

#### (一) 核糖体的本质是核酶

核酶是指一类具有催化活性的 RNA 分子。1981 年，Cech 和他的同事在研究四膜虫的 26 S 前体 rRNA (precursor rRNA) 加工去除内含子时惊奇地发现，内含子的切除是由 26 S 前体 rRNA 自身催化的，而不是蛋白质，这一现象称为 RNA 自剪接 (self-splicing)。这说明 RNA 分子具有催化活性，因此被命名为核酶。Cech 因为首次发现了核酶而获得 1989 年诺贝尔化学奖。从前面的介绍可以看到，核糖体是一种相对分子质量大、结构复杂的细胞器，由大约 2/3 的 RNA 和 1/3 的蛋白质组成。尽管早先证据表明，在蛋白质合成过程中催化肽键形成的肽酰转移酶是 23 S rRNA，但一直没有在核糖体的结构研究中获得直接证据。2000 年核糖体大小亚基三维结构研究进一步证实，rRNA 负责核糖体整体结构的确定、tRNA 在 mRNA 上的定位等。最有意义的发现是肽键形成位点，即肽酰转移酶中心仅由 23 S rRNA 组成。显然，肽键形成的催化反应是由 rRNA 执行。另外，核糖体的 3 个结合位点，即 A 位点、P 位点和 E 位点也主要是由核糖体 RNA 组成。因此，核糖体的实质是核酶。

#### (二) RNA 世界与生命起源

遗传信息的表达需要一套复杂的机器，这套机器将 DNA 中储存的遗传信息表达为生命活动的主要执行者蛋白质。显然，在遗传信息表达过程中，蛋白质的合成依赖于 DNA 和 RNA，而 DNA 和 RNA 的合成又离不开蛋白质。这就提出了一个有关生命起源最有趣的问题：在生命起源之初，究竟先有核酸，还是先有蛋白质。20 世纪 80 年代，W. Gilbert 等人大胆提出，最早出现的生物大分子很可能是 RNA，它兼具了 DNA 与蛋白质的功能，不但可以像 DNA 一样储存遗传信息，而且

还像蛋白质一样进行催化反应，DNA 和蛋白质则是进化的产物。这就是著名的 RNA 世界 (RNA world) 假说。根据这一假说，原始的具有自我复制和催化能力的 RNA 在以后的亿万年进化过程中，逐渐将其携带遗传信息的功能让位于性质上更加稳定的 DNA 分子，将其催化功能让位给了催化能力更强的蛋白质。

核糖体 23 S rRNA 具有肽酰转移酶的活性，在蛋白质合成中催化肽键形成。核糖体是核酶的发现，对生命起源于 RNA 世界假说起到了很大的支撑作用。除了 RNA 可催化 RNA 和 DNA 水解、连接、mRNA 的拼接 (splicing) 等现存“活化石”证据外，在体外已证明人工合成的 RNA 还可催化 RNA 聚合反应以及 RNA、DNA 的磷酸化，RNA 氨酰基化、烷基化；能催化糖苷键形成、氧化还原反应等多种反应。

那么，RNA 是如何实现向 DNA 的转变的呢？通过体外加速进化手段，研究人员成功地在试管中将具有核酶活性的 RNA 转变成了 DNA。这些发现有助于理解生命起源过程中 RNA 是如何实现向 DNA 转变的。遗传信息的储存让位于 DNA，在进化来讲，更为有利，因为双链 DNA 比单链 RNA 稳定，且 DNA 链中胸腺嘧啶代替了 RNA 链中的尿嘧啶，使之易于修复，作为遗传物质载体可储存大量的信息并能更稳定地遗传。

此外，蛋白质的合成又是如何进化的呢？在今天的细胞中，蛋白质的合成是在一个结构非常复杂、由蛋白质和 RNA 组成的核糖体中完成的，显然，进化中，蛋白质合成必须是在有了一个原始的蛋白质合成机器后才可能发生。在今天的细胞中，有些短肽的合成就是通过肽合成酶的催化完成的，它不需要复杂的蛋白质翻译机器核糖体，也不需要 mRNA 的指令。这不禁让人推测，在 RNA 世界中，原始蛋白质的合成不需要 mRNA，很可能就是直接通过 RNA 分子催化完成的。这种由 RNA 分子催化肽键形成的功能在今天的细胞中仍然被遗留下来了，只不过起催化作用的 RNA 与蛋白质一道形成核糖体，而且，实验室中的核酶也能执行氨酰化反应。因此，很可能在 RNA 世界，类似 tRNA 一样的接头分子能和特异的氨基酸结合。随后，一种特异性不高的肽酰转移酶随着时间的推移，逐渐获得了将氨酰-tRNA 精确定位到模板 RNA 分子上的功能，最终出现了现有的核糖体，蛋白质合成得以进化。而蛋白质因为自身的多样性，最终接管了 RNA 分子的绝大多数催化与结构功能，成为结构和功能复杂

的细胞进化的基础。

如果生命起源于RNA世界的假说是对的，我们就不难勾画出生命起源的大致轮廓。生命的最早形式可能是由膜包裹的一套具有自我复制能力的分子体系和简单的物质与能量供应体系组成，其遗传物质的载体是RNA（原始RNA）而不是DNA。构成核酸的基本成分是核糖，而脱氧核糖是由核糖还原而成的事实也说明了这点。在最早的细胞中，可能还存在一个前RNA世界（pre-RNA world），集遗传、结构与催化功能于一身，尔后RNA分子逐渐接管了这些功能。RNA的催化效率远远低于蛋白质，在漫长的进化过程中，由RNA催化产生了蛋白质，进而DNA代替了RNA的遗传信息功能，蛋白质则取代了绝大部分RNA作为酶的功能，逐渐演化成今天遗传信息流的模式——中心法则（图12-8）。

很有趣的是，生命进化到现在，仍然存在一个RNA世界。至今在遗传信息表达过程中，不仅还要通过RNA完成遗传信息的传递和密码的翻译，而且一些重要的反应过程如mRNA的拼接和蛋白质的合成仍需要RNA的催化作用。同时，RNA（包括microRNA）还可通过RNA干扰等方式决定mRNA的命运、对DNA进行修饰以调控基因的表达甚至使整条染色体失活（如哺乳动物X染色体失活）等。因此，无论在生命起源之初，还是在今天的细胞中，RNA对生命进化的影响、对基因表达的调控都发挥着很重要的作用，也许我们对其认识才刚刚开始。

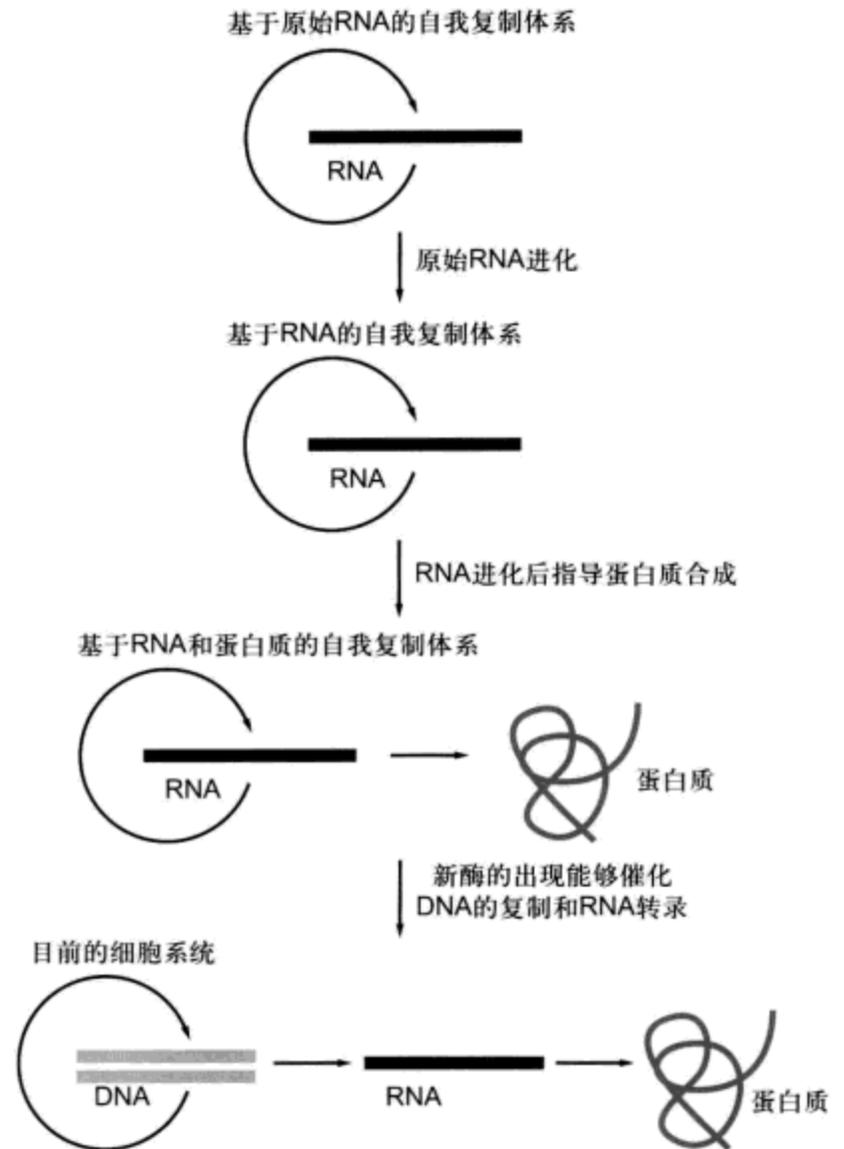


图12-8 RNA在生命起源中的地位及演化过程的假说

## ● 思考题 ●

1. 核糖体上有哪些活性部位？它们在多肽合成中各起什么作用？
2. 何谓多核糖体？以多核糖体的形式行使功能的生物学意义是什么？
3. 试比较原核细胞与真核细胞的核糖体在结构、组分及蛋白质合成上的异同点。
4. 有哪些实验证据表明肽酰转移酶是rRNA，而不是蛋白质？rRNA催化功能的发现有什么意义？

## ● 参考文献 ●

1. Ban N, Nissen P, Hansen J, Capel M, Moore P B, Steitz T A. Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50 S ribosomal subunit. *Nature*, 1999, 400: 841-847.
2. Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore P B, Steitz T A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 2000, 289:905-920.
3. Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore P B, Steitz T A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 2000, 289: 920-930.

4. Orgel L. Origin of life, a simpler nucleic acid. *Science*, 2000, 290: 1 306-1 307.
5. Ramakrishnan V, Moore P B. Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11:144-154.
6. Schuwirth B S, Borovinskaya M A, Hau C W, *et al.* Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 2005, 310: 827-834.
7. Steitz T A, Moore P B. RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 411-418.
8. Williamson J R. The ribosome at atomic resolution. *Cell*, 2009, 139: 1 041-1 043.
9. Wimberly B T, Brodersen D E, Clemons W M J, Morgan-Warren R, von Rhein C, Hartsch T, Ramakrishnan V. Structure of the 30 S ribosomal subunit. *Nature*, 2000, 407:327-339.



# 细胞周期与细胞分裂

细胞增殖 (cell proliferation) 是细胞生命活动的重要特征之一。细胞增殖最直观的表现是细胞分裂 (cell division), 即由原来的一个亲代细胞 (mother cell) 变为两个子代细胞 (daughter cell), 使细胞的数量增加。各种细胞在分裂之前, 还必须进行一定的物质准备。不然, 细胞便不能分裂。物质准备和细胞分裂是一个高度受控的相互连续的过程。这一相互连续的过程即为细胞增殖。新形成的子代细胞再经过物质准备和细胞分裂, 又会产生下一代的子细胞。这样周而复始, 使细胞的数量不断增加。因而, 细胞增殖过程也称为细胞周期 (cell cycle), 或称为细胞分裂周期 (cell division cycle)。也有人将细胞增殖过程称为细胞生活周期 (cell life cycle) 或细胞繁殖周期 (cell reproductive cycle)。

细胞增殖是生物繁育和生长发育的基础。单细胞生物, 如酵母, 细胞增殖将直接导致生物个体数量的增加。自然界中, 由于各种因素的作用, 每时每刻都会有大量的生物个体消亡, 尤其是那些个体小、结构比较简单的单细胞生物。这些单细胞生物要保持物种的存在, 必须依赖大量的细胞增殖, 增加个体数量。多细胞生物是由一个单细胞即受精卵分裂发育而来。它的产生, 肯定需要许多次甚至无数次的细胞增殖, 并经过复杂的细胞分化过程。但不管细胞增殖次数多少, 细胞分化如何复杂, 我们都不难看出, 细胞增殖也是多细胞生物繁殖和生长发育的基础。

成体生物仍然需要细胞增殖, 以弥补代谢过程中的细胞损失。就我们人体而言, 每天都会有大量的细胞

衰老死亡, 如皮肤细胞、血细胞、肠上皮细胞等。要维持细胞数量的平衡和机体的正常功能, 必须依赖细胞增殖。另外, 机体创伤愈合、组织再生、病理组织修复等, 都要依赖细胞增殖。

在本章我们将重点介绍细胞增殖过程。

## 第一节 细胞周期

### 一、细胞周期概述

如前所述, 细胞周期是一个由物质准备到细胞分裂高度受控、周而复始的连续过程。细胞只有经过各种必要的物质准备, 才能进行细胞分裂。经过分裂产生的子代细胞, 只有再经过物质准备, 才能进行下一轮的细胞分裂。细胞经过物质准备与细胞分裂, 完成一个循环过程, 即完成一个细胞周期。通常, 我们将从一次细胞分裂结束开始, 经过物质准备, 直到下一次细胞分裂结束为止, 称为一个细胞周期。细胞周期是一个十分复杂而又必须精确的生命活动过程, 在细胞周期过程中至少涉及 3 个需要解决的根本问题: 一是细胞分裂前遗传物质 DNA 精确的复制; 二是完整复制的 DNA 如何在细胞分裂过程中确保准确分配到两个子细胞; 三是物质准备与细胞分裂是如何调控的。这 3 个问题的任何环节的错

误都可能影响细胞的生死存亡，或导致细胞周期调控紊乱，诸如细胞恶性增殖和肿瘤发生。

人们最初从细胞形态变化考虑，将一个细胞周期简单地划分为两个相互延续的时期，即细胞有丝分裂期 (mitosis) 和居于两次分裂期之间的分裂间期 (interphase)。分裂间期是细胞增殖的物质准备和积累阶段，分裂期则是细胞增殖的实施过程。细胞经过细胞分裂间期和细胞分裂期，完成一个细胞周期，细胞数量也相应地增加一倍。后来的工作发现，在细胞分裂期，也有一些物质准备，主要用于调控细胞分裂进程。

20 世纪 50 年代初，人们用  $^{32}\text{P}$  标记蚕豆根尖细胞并作放射自显影实验，发现 DNA 合成是在分裂间期中的某个特定时期进行的。这一特定时期称为 DNA 合成期 (DNA synthesis phase, 简称 S 期)。进一步研究发现，S 期不在分裂间期的开始，也不在分裂间期的末尾，而是在其中间某个时期。因而，从上次细胞分裂结束至 S 期 DNA 复制之前必然存在一个时间间隔 (gap)。人们称这一时间间隔为第一间隔期，简称为  $G_1$  期；在 S 期 DNA 复制完成至细胞分裂之前，也必然存在一个时间间隔。人们将这一时间间隔期称为第二间隔期，简称为  $G_2$  期。由此可见，一个细胞周期可以人为地划分为先后连续的 4 个时相，即  $G_1$  期、S 期、 $G_2$  期和 M 期。绝大多数真核细胞的细胞周期都包含这 4 个时相，只是时间长短有所不同。因而，通常将含有这 4 个不同时相的细胞周期称为标准的细胞周期 (standard cell cycle) (图 13-1)。

同种细胞之间，细胞周期时间长短相似或相同；不同细胞种类之间，细胞周期时间长短差别很大。自然界细胞种类繁多，有的细胞每增殖一次仅需几十分钟 (如细菌和蛙胚细胞)，有的需要十几小时或几十小时 (如小肠上皮细胞)，有的长达一年至数年 (如高等动物体内的某些组织细胞)。就高等生物体的细胞而言，细胞周期时间长短主要差别取决于  $G_1$  期，而 S 期、 $G_2$  期和 M 期的总时间相对恒定。尤其是 M 期持续的时间更为恒定，常常仅持续半小时左右。

多细胞生物，尤其是高等生物，可以看做是由一个受精卵经过许多次分裂、分化所形成的细胞社会。在这个细胞社会中，可将细胞群体分为 3 类：① 周期中细胞 (cycling cell)，这类细胞可能会持续分裂，即细胞周期持续运转。如上皮组织的基底层细胞，通过持续不断的分裂，增加细胞数量，弥补上皮组织表层细胞死亡脱落所造成的细胞数量损失。②  $G_0$  期细胞，也称静止期

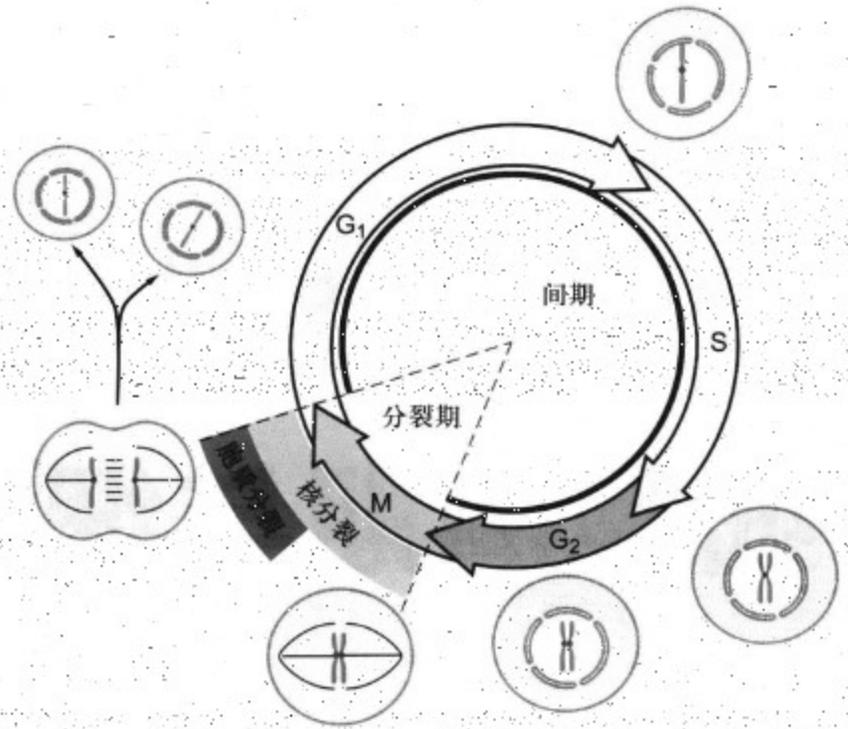


图 13-1 标准的细胞周期

一个标准的细胞周期一般包括 4 个时相：DNA 合成期 (S)、细胞分裂期 (M) 以及介于三者之间的  $G_1$  期和  $G_2$  期。细胞周期从  $G_1$  期开始，经 S 期和  $G_2$  期，到 M 期结束。

细胞 (quiescent cell)，这类细胞会暂时脱离细胞周期，停止细胞分裂，但仍然活跃地进行代谢活动，执行特定的生物学功能 (图 13-2)。周期中细胞转化为  $G_0$  期细胞多发生在  $G_1$  期。 $G_0$  期细胞只是暂时脱离细胞周期，一旦得到信号指使，会快速返回细胞周期，分裂增殖，如结缔组织中的成纤维细胞，平时并不分裂，一旦所在的组织部位受到伤害，它们会马上返回细胞周期，分裂产生大量的成纤维细胞，分布于伤口部位，促使伤口愈合。体外培养的细胞，在某些营养物质缺乏时，也可以进入  $G_0$  期。此时的细胞仅可以生存，但不能进行分裂。一旦得到营养物质补充， $G_0$  期细胞很快会重返细胞周期，开始细胞分裂。对  $G_0$  期细胞的产生和它们重返细胞周期机理的研究，已越来越受到人们的重视，这不仅涉及对细胞分化和细胞增殖调控过程的探讨，而且对生物医学如肿瘤发生和治疗、药物设计和药物筛选等，都具有重要的指导意义。③ 终末分化细胞 (terminally differentiated cell)，在机体内另有一类细胞，由于分化程度很高，一旦特化定型后，执行特定功能，则终生不再分裂。如大量的横纹肌细胞，血液多型核白细胞，某些生物的有核红细胞等。 $G_0$  期细胞和终末分化细胞的界限有时难以划分，有的细胞过去认为属于终末分化细胞，目前可能又被认为是  $G_0$  期细胞。

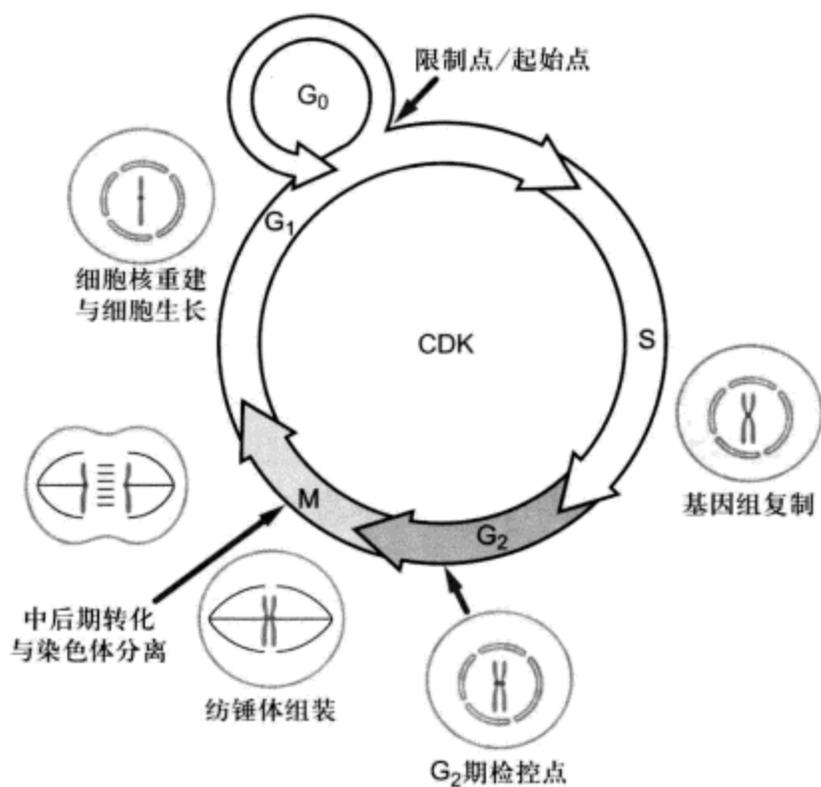


图 13-2 细胞周期检验点及其主要事件

## 二、细胞周期中各不同时相及其主要事件

在组成细胞周期的 4 个不同时相里，要发生许多不同的事件。人们对这些事件已有不同程度的认识，有的已有所了解，有的已比较深入，有的可能还不为人知。在这里我们仅对其中的一些主要事件做一概括介绍（图 13-2）。

G<sub>1</sub> 期是一个细胞周期的第一阶段。上一次细胞分裂之后，产生两个子代细胞，标志着 G<sub>1</sub> 期的开始。新生成的子代细胞立即进入一个细胞生长期，开始合成细胞生长所需要的各种蛋白质、糖类、脂质等，但不合成细胞核 DNA。在 G<sub>1</sub> 期的晚期阶段有一个特定时期。如果细胞继续走向分裂，则可以通过这个特定时期，进入 S 期，开始细胞核 DNA 合成，并继续运行，直到完成细胞分裂。在芽殖酵母中，这个特定时期被称为起始点（start）。起始点过后，细胞开始出芽，DNA 也开始复制。起始点最初的概念是指细胞出芽的开始，但事实上控制着新一轮细胞周期的运转。在其他真核细胞中，这一特定时期称为限制点（restriction point, R 点），或检验点（checkpoint）。

起始点被认为是 G<sub>1</sub> 期晚期的一个基本事件。细胞只有在内、外因素共同作用下才能完成这一基本事件，顺利通过 G<sub>1</sub> 期，进入 S 期并合成 DNA。任何因素影响

到这一基本事件的完成，都将严重影响细胞从 G<sub>1</sub> 期向 S 期转换。影响这一事件的外在因素主要包括营养供给和相关的激素刺激等，而内在因素则主要是一些与细胞分裂周期相关基因（cell division cycle gene, *cdc* 基因）调控过程相关的因素。*cdc* 基因的产物是一些蛋白激酶、蛋白磷酸水解酶等。这些酶活性的变化将直接影响到细胞周期的变化。而这些酶活性变化本身在时间和空间上又受到内在和外在因素的调节。

限制点的概念多用于高等真核细胞，尤其是哺乳动物细胞。其实质尚不完全清楚，但已发现与酵母中的起始点在形式上有许多共同之处，但也有明显不同，可能比后者更为复杂。实验发现，绝大多数细胞若在限制点前进行无生长因子培养（growth factor starvation），细胞会很快进入休眠期，不能复制 DNA，也不能进行细胞分裂。倘若在限制点之后进行无生长因子培养，细胞则可以进入 S 期，复制 DNA。

检验点是目前细胞周期研究领域用得较多的一个术语。这一术语的出现可能源于早期对大肠杆菌 DNA 复制调控的研究。当大肠杆菌 DNA 受到损伤，或 DNA 复制受到抑制时，会激活 RecA 蛋白，酶解 LexA 抑制子，诱导 SOS 基因的大量表达。有些 SOS 基因产物参与受损 DNA 的修复，有些则参与阻止细胞分裂。这种细胞周期进程被抑制的原因并不是由于 DNA 损伤或 DNA 复制尚未完成本身所引起的，而是由于细胞内存在一系列监控机制（surveillance mechanism）。这些特异的监控机制可以鉴别细胞周期进程中的错误，并诱导产生特异的抑制因子，阻止细胞周期进一步运行。在真核细胞中也发现多种监控机制，即指细胞周期的某些关键时刻，存在一套监控机制，以调控周期各时相有序而适时地进行更迭，并使周期序列过程中后一个事件的开始依赖于前一个事件的完成，从而保证周期事件高度有序地完成。进一步研究发现，检验点不仅存在于 G<sub>1</sub> 期，也存在于其他时相，如 S 期检验点、G<sub>2</sub> 期检验点、纺锤体组装检验点等。从分子水平看，检验点是作用于细胞周期转换时序的调控信号通路，其监控作用在于保证基因和基因组的稳定性，而不是细胞分裂的基本条件。

S 期即 DNA 合成期。细胞经过 G<sub>1</sub> 期，为 DNA 复制的起始做好了各方面的准备。进入 S 期后，细胞立即开始合成 DNA。DNA 复制的起始和复制过程受到多种细胞周期调节因子的严密调控。同时，DNA 复制与细胞核结构如核骨架、核纤层、核膜等密切相关。目前

已经知道，真核细胞 DNA 的复制和原核生物一样，是严格按照半保留复制的方式进行的。真核细胞新合成的 DNA 立即与组蛋白结合，共同组成核小体串珠结构。新的组蛋白也是在 S 期合成的。关于真核细胞 DNA 复制的起始、复制过程及其调控机制等，目前已取得了许多突破性进展；DNA 复制与细胞核结构的关系等，也在积极研究之中。

DNA 复制完成以后，细胞即进入  $G_2$  期。此时细胞核内 DNA 的含量已经增加一倍，即每条染色体含有 2 个拷贝的 DNA，由  $G_1$  期细胞的染色体倍性 ( $2n$ ) 变成了  $G_2$  期的染色体倍性 ( $4n$ )。其他结构物质和相关的亚细胞结构也已完成进入 M 期的必要准备。通过  $G_2$  期后，细胞即进入 M 期。但细胞能否顺利地进入 M 期，要受到  $G_2$  期检验点的控制。 $G_2$  期检验点要检查 DNA 是否完成复制，细胞是否已生长到合适大小，环境因素是否利于细胞分裂等。只有当所有利于细胞分裂的因素得到满足以后，细胞才能顺利实现从  $G_2$  期向 M 期的转化。

M 期即细胞分裂期。真核细胞的细胞分裂主要包括两种方式，即有丝分裂 (mitosis) 和减数分裂 (meiosis)，体细胞一般进行有丝分裂；成熟过程中的生殖细胞进行减数分裂，也称为成熟分裂。减数分裂是有丝分裂的特殊形式。细胞经过分裂，将其经过 S 期复制的染色体 (DNA) 平均分配到两个子细胞中。关于细胞分裂过程，下面将详细介绍。

细胞周期中各个时相的有序更迭和整个细胞周期的运行，需要“引擎”分子的驱动，即是在细胞周期依赖的蛋白激酶复合物 (cyclin-dependent kinase complex, CDK) 统一调控下进行的。CDK 通过调节靶蛋白磷酸化而调控细胞周期的运转。与 CDK 相对应的是蛋白磷酸水解酶，促进已磷酸化的靶蛋白去磷酸化。已知的 CDK 已有十来种，在不同的时期有不同的 CDK 起调控作用。参与调控细胞周期的蛋白磷酸水解酶也有多种。此外，还有不少其他因素，通过调控 CDK 和蛋白磷酸水解酶的活性或其他相关反应，从而参与调控细胞周期。下文还将进一步介绍细胞周期调控的机制。

细胞种类众多，繁殖速度有快有慢，细胞周期长短差别很大。单细胞生物如此，多细胞生物也是如此。就人体细胞而言，如神经细胞、肌肉细胞、血细胞、肝细胞、小肠上皮细胞等，其生长繁殖速度差异很大。体外培养的细胞也是如此，细胞来源不同，其细胞周期时间长短各异。细胞周期长短与细胞所处的外界环

境也有密切关系。就环境温度而言，在一定范围之内，温度高，细胞分裂繁殖速度加快，温度低，则分裂繁殖速度减慢。

在某些工作中，常常会涉及细胞周期时间长短的测定。测定方法也多种多样，如脉冲标记 DNA 复制和细胞分裂指数观察测定法、流式细胞仪测定法等。若仅需要测定细胞周期总时间，只要通过在不同时间里对细胞群体进行计数，就可以推算出细胞群体的倍增时间，即细胞周期总时间。或者应用缩时摄像技术，不仅可以测定准确的细胞周期时间，还可以测定分裂间期和分裂期的准确时间。

### 三、细胞周期同步化

在同种细胞组成的细胞群体中，不同的细胞可能处于细胞周期的不同时相，为了某种目的，人们常常需要整个细胞群体处于细胞周期的同一个时相。事实上，在自然界中已经存在一些细胞群体处于细胞周期的同一时相的例子。例如有一种黏菌 (*Physarum polycephalum*) 的变形体 *plasmodia*，只进行核分裂而不进行细胞质分裂，结果形成多核原生质体结构。所有细胞核在同一细胞质中进行同步分裂，细胞核数目可多达  $10^8$  个，多核原生质体 (细胞) 直径可达 5~6 cm。又如，大多数无脊椎动物和个别脊椎动物的早期胚胎细胞，可同步化卵裂数次甚至十多次，形成数量可观的同步化细胞群体。这种自然界存在的细胞周期同步化过程，称为天然同步化 (natural synchronization)。

细胞周期同步化也可以进行人工选择或人工诱导，统称为人工同步化 (artificial synchronization)。人工选择同步化是指人为地将处于周期不同时相的细胞分离开来，从而获得不同时相的细胞群体。例如，处于对数生长期的单层培养细胞，细胞分裂活跃，大量处于分裂期的细胞变圆，从培养瓶 (皿) 壁上隆起，与培养瓶 (皿) 壁的附着力减弱。若轻轻振荡培养瓶 (皿)，处于分裂期的细胞即会从瓶 (皿) 壁上脱落，悬浮到培养液中。收集培养液，通过离心，即可获得一定数量的分裂期细胞 (图 13-3)。将这些分裂期细胞重新悬浮于一定体积的培养液中培养，细胞即开始分裂，进行细胞周期同步运转，由此可以获得不同时相的细胞。这种人工选择同步化方法目前仍被广泛采用。其优点是，细胞未经任何药物处理和伤害，能够真实反映细胞周期状况，且细胞同步化效率较高。但此方法也有不理想之处，即

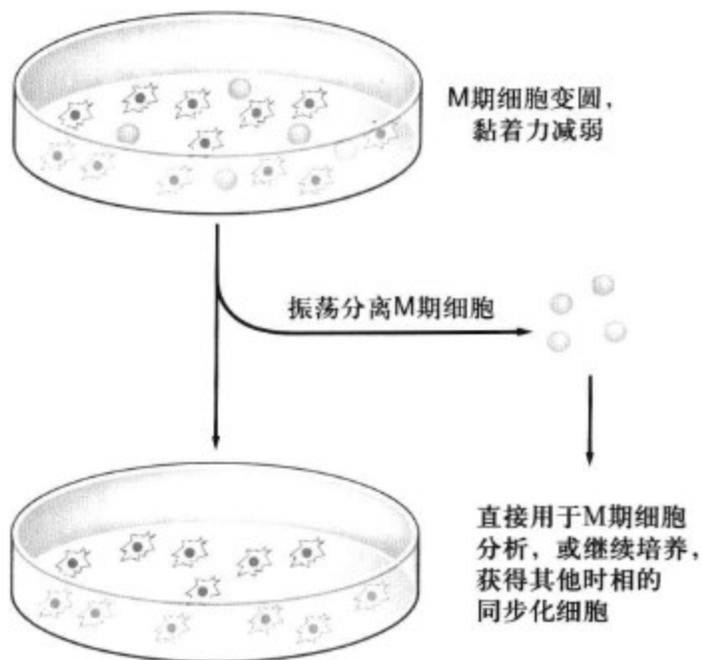


图 13-3 从培养细胞中收集 M 期细胞的同步化方法

分离的细胞数量少。要获得足够数量的细胞，其成本大大高于采用其他方法。人工选择同步化的另一个方法是密度梯度离心法。有些种类的细胞，如裂殖酵母，不同时期的细胞在体积和质量上差别显著，可以采用密度梯度离心方法分离出处于不同时期的细胞。这种方法简单省时，效率高，成本低。但缺点是，对大多数种类的细胞并不适用。

细胞同步化可以通过人工诱导而获得，即通过药物诱导，使细胞同步化在细胞周期的某个特定时相。目前应用较广泛的诱导同步化方法主要有两种，即 DNA 合成阻断法和分裂中期阻断法。

### 1. DNA 合成阻断法

DNA 合成阻断法是一种采用低毒或无毒的 DNA 合成抑制剂特异地抑制 DNA 合成，而不影响处于其

他时相的细胞进行细胞周期运转，从而将被抑制的细胞抑制在 DNA 合成期的实验方法。目前采用最多的 DNA 合成抑制剂为 TdR 或羟基脲 (hydroxyurea, HU)。将一定剂量的抑制剂加入培养液并继续培养一定时间 ( $G_2+M+G_1$ )，所有细胞即被抑制在 S 期。注意，此时的 S 期细胞可能处于 S 期中的任何时期，其时间区段仍然较宽。若将抑制剂去除，细胞仍然不能有效地进行同步化运转。要解决这一问题，通常的做法是，采用两次 DNA 合成抑制剂处理，将细胞最终抑制在  $G_1/S$  期交界处狭窄的时间区段。抑制剂去除后，细胞即可以进行同步细胞周期运转 (图 13-4)。将过量的 TdR 加入细胞培养液，凡处于 S 期的细胞立刻被抑制，而其他各期的细胞则照常运转，培养一定时间 ( $G_2+M+G_1$ ) 后，所有这些细胞则被抑制在  $G_1$  期和 S 期的交界处；将 TdR 洗脱，更换新鲜培养液后，阻断于 S 期的细胞，开始复制 DNA 并沿细胞周期运转。再向培养液中第二次加入 TdR，经过一定时间的培养，所有细胞则会被抑制在  $G_1/S$  期交界处。将 TdR 洗脱，更换新鲜培养液并继续培养一定时间，即可以获得 S 期和  $G_2$  期不同时间点的同步化细胞。此方法的优点是同步化效率高，几乎适合于所有体外培养的细胞体系。这种方法目前被广泛采用。

### 2. 分裂中期阻断法

某些药物，如秋水仙素、秋水酰胺和诺考达唑 (nocodazole) 等，可以抑制微管聚合，因而能有效地抑制细胞纺锤体的形成，将细胞阻断在细胞分裂中期。处于间期的细胞，受药物的影响相对较弱，常可以继续运转到 M 期。因而，在药物持续存在的情况下，处于 M 期的细胞数量会逐渐累加。通过轻微振荡，将变圆的 M 期细胞摇脱，经过离心，可以得到大量的分裂中期细

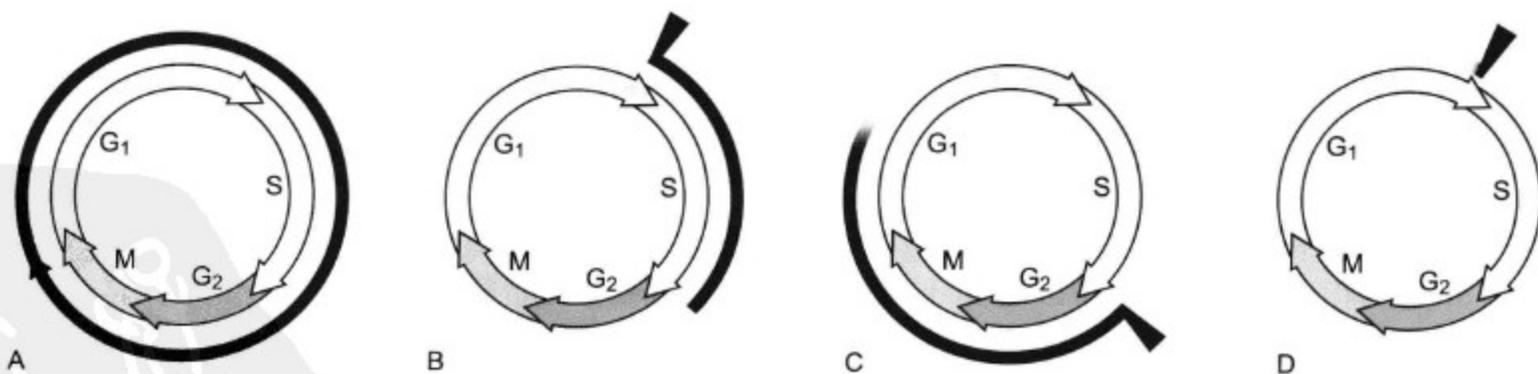


图 13-4 应用过量的 TdR 阻断法进行细胞周期同步化

A. 处于对数生长期的细胞。B. 第一次加入 TdR，所有处于 S 期的细胞立即被抑制，其他细胞运行到  $G_1/S$  期交界处被抑制。C. 将 TdR 洗脱，解除抑制，被抑制的细胞沿细胞周期运行。D. 在解除抑制的细胞到达  $G_1$  期终点前，第二次加入 TdR 并继续培养，所有的细胞被抑制在  $G_1/S$  期交界处。

胞。将分裂中期细胞悬浮于新鲜培养液中继续培养，它们可以继续分裂并沿细胞周期同步运转，从而获得  $G_1$  期不同阶段的细胞。此方法的优点是操作简便，效率高。缺点是这些药物的毒性相对较大，若处理的时间过长，所得到的细胞常常不能恢复正常的细胞周期运转。

在实际工作中，人们常将几种方法并用，以获得数量多、同步化效率高的细胞。我们曾用低温、TdR 和诺考达唑综合处理法获取大量的分裂中期细胞，将这些中期细胞匀浆用来进行非细胞体系细胞核重建实验，获得了体外重建的细胞核，不仅实现了细胞同步化，而且证明这些同步化的 M 期细胞仍可以进行正常的细胞周期运转。

目前，人们已经分离了许多与细胞周期调控有关的条件依赖性突变株。将这些突变株转移到限定条件下培养，所有细胞便被同步化在细胞周期中某一特定时相。

## 四、特殊的细胞周期

特殊的细胞周期是指那些特殊的细胞所具有的与标准的细胞周期相比有着鲜明特点的细胞周期。应用这些细胞所进行的细胞周期研究，不仅大大简化了实验条件，获得了许多重要结果，加深了人们对细胞周期的认识，而且这些研究仍在向深入发展。

### (一) 早期胚胎细胞的细胞周期

早期胚胎细胞的细胞周期主要指受精卵在卵裂过程中的细胞周期。它与一般体细胞的细胞周期明显不同，尤其是两栖类、海洋无脊椎类以及昆虫类的早期胚胎细胞等。最显著的特点是，卵细胞在成熟过程中已经积累了大量的物质基础，基本可以满足早期胚胎发育的物质需要，其细胞体积也显著增加；当受精以后，受精卵便开始迅速卵裂，卵裂球数量增加，但其总体积并不增加，因而，卵裂球体积将越分越小。每次卵裂所持续的时间，即一个细胞周期所持续的时间，与体细胞周期相比，周期时间大大缩短。早期胚胎细胞周期的  $G_1$  期和  $G_2$  期非常短，以至于被误认为早期胚胎细胞周期仅含有 S 期和 M 期，即一次卵裂后，新的卵裂球迅速开始 DNA 合成，然后立即开始下一轮卵裂。以非洲爪蟾早期胚胎为例，当卵细胞受精以后，第一个细胞周期，即第一次卵裂，持续时间约 75 min。从第二个细胞周期到第 12 个细胞周期，即从第二次卵裂到第 12 次卵裂，每个细胞周期仅持续 30 min。12 个细胞周期共需要 8 个

多小时。而一个非洲爪蟾体细胞的细胞周期持续时间约 24 h。虽然早期胚胎细胞周期有其鲜明的特点，但细胞周期的基本调控因子和监控机制与一般体细胞标准的细胞周期基本是一致的。在过去的几十年中，人们选用早期胚胎细胞作为材料所进行的细胞周期调控研究，多次取得突破性进展，大大推动了学科发展。

### (二) 酵母细胞的细胞周期

利用酵母细胞所从事的细胞周期研究，在整个细胞周期研究领域占有重要位置。几十年来，用酵母细胞进行细胞周期调控研究取得了大量突破性的成果，如许多与细胞周期调控直接相关的基因的成功分离等。用于进行细胞周期调控研究的酵母主要有两种，即芽殖酵母和裂殖酵母。

酵母细胞的细胞周期与标准的细胞周期相比有许多相同之处。首先，酵母细胞周期运转过程也包括  $G_1$  期、S 期、 $G_2$  期和 M 期 4 个时相。更基本的是酵母细胞周期调控过程与标准的细胞周期非常相似，许多参与调控细胞周期的基因与高等生物的也基本相同。

酵母细胞周期也有其明显的特点。首先，酵母细胞周期持续时间较短，大约为 90 min。和许多其他单细胞生物一样，细胞分裂过程属于封闭式，即在细胞分裂时，细胞核核膜不解聚。与细胞核分裂直接相关的纺锤体不是在细胞质中，而是位于细胞核内。此外，还有其他一些特点。例如，和其他真菌相似，酵母在一定环境因素作用下，也进行有性繁殖。

芽殖酵母和裂殖酵母虽同称为酵母，但二者之间的亲缘关系甚远，分属于两个属，据 rRNA 序列分析，二者在两亿年前即已开始分歧演化。芽殖酵母和裂殖酵母在细胞结构和生命过程方面也有明显差别。

芽殖酵母以出芽方式进行分裂，因而很容易在生活状态下观察细胞周期进程。如图 13-5 所示，芽殖酵母细胞在  $G_1$  期呈卵圆形，含有一个细胞核，基因组为单倍体。细胞周期起始点位于  $G_1$  期的后期阶段。起始点过后，细胞马上开始出芽。根据芽体的大小比例可以粗略估计细胞所处的时期。细胞出芽后，很快便进入 S 期，开始 DNA 复制，同时，纺锤体开始组装。纺锤体的两端为纺锤体极体 (spindle polar body)。另一个与标准的细胞周期显著不同的是，酵母的纺锤体组装与 S 期 DNA 复制同时进行，而不是在 DNA 复制之后。S 期过后，经过短暂的  $G_2$  期，染色质开始凝集，纺锤体逐渐延长，细胞逐步向 M 期推进。随着时间延

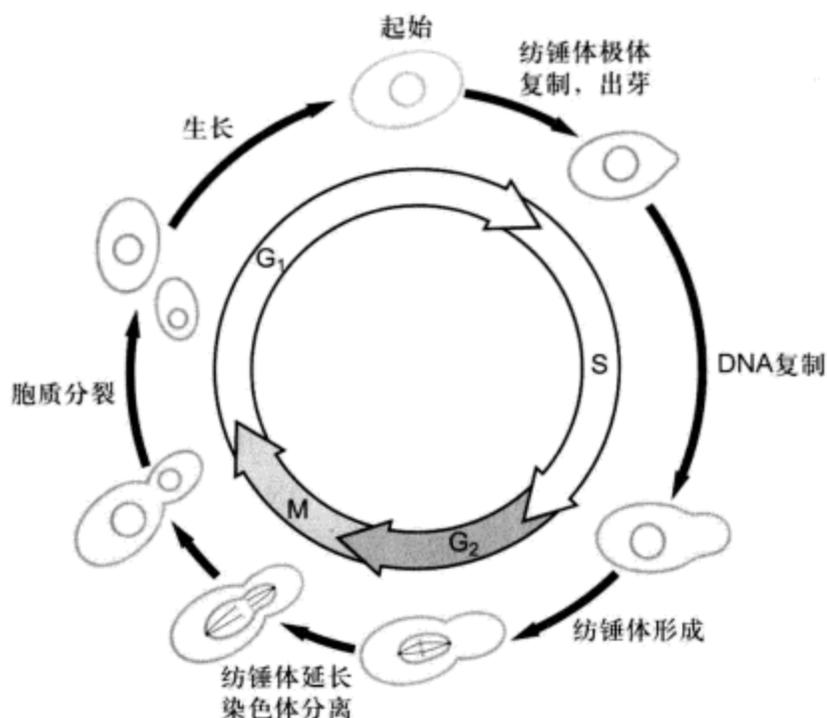


图 13-5 芽殖酵母的细胞周期

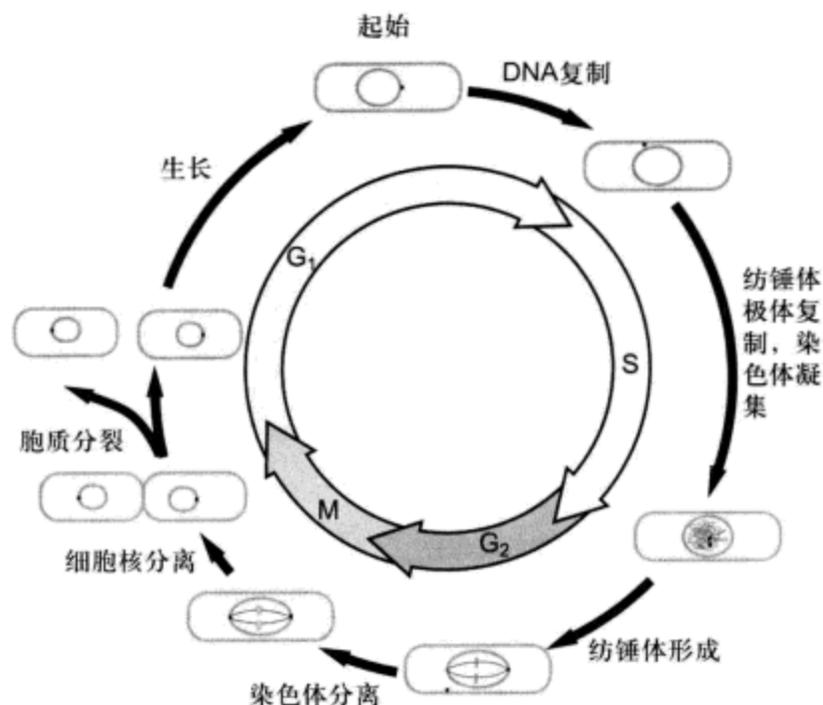


图 13-6 裂殖酵母的细胞周期

长, 芽体也不断增长, 细胞核一分为二, 分别分配到母体细胞和子细胞芽体中。再经过胞质分裂, 形成相互独立的两个细胞。芽殖酵母细胞分裂为不等分裂, 即生成的两个细胞体积大小不等, 以芽体逐渐形成的子细胞体积较小。

芽殖酵母子细胞形成后, 如果环境因素适宜, 它们可以继续进入下一轮细胞周期。如果环境因素不适宜, 如营养物质缺乏等, 它们或者直接进入  $G_0$  期状态, 或者改变生活周期, 由通过有丝分裂方式转化为减数分裂方式进行有性生殖。两个雌雄单倍体细胞会发生接合, 细胞质相互融合, 细胞核也随之融合, 形成一个二倍体细胞。该二倍体细胞再经过起始点、一轮 DNA 复制、减数分裂等, 最终形成 4 个单倍体孢子。一旦环境因素适应, 单倍体孢子又可以萌发, 回到无性生殖状态。

裂殖酵母形态呈棒状。其细胞周期与芽殖酵母有不少相似之处, 也有显著不同 (图 13-6)。 $G_1$  期裂殖酵母细胞为短棒状。经过一段时间的生长, 细胞增加到一定长度, 到达起始点。和芽殖酵母相似, 经过起始点后, 细胞很快进入 S 期, 开始复制 DNA, 同时继续生长。S 期过后, 细胞进入  $G_2$  期, 并将继续生长一定时间, 待细胞达到一定体积后, 方能启动 M 期。经染色体凝集、纺锤体极体复制、纺锤体在细胞核内组装并逐渐延长、细胞核拉长等一系列变化, 分裂成两个细胞核。再经胞质分裂, 形成两个大小相同的子细胞。裂殖

酵母在环境因素不利时, 也会由有丝分裂生殖转化为减数分裂生殖。但与芽殖酵母细胞不同, 两个不同性别的单倍体裂殖酵母细胞可以直接接合, 通过减数分裂, 形成 4 个单倍体孢子。此外, 裂殖酵母的起始点无明显的形态学标志。因而难以像芽殖酵母那样, 可以通过观察芽体的大小来估计细胞所在的细胞周期位置。但裂殖酵母有两个鲜明的特点: 一是细胞分裂为均等分裂, 即分裂后生成的两个子细胞大小相等; 二是细胞生长仅是细胞长度的增加, 细胞直径保持不变。根据这两个特点, 可以通过测定细胞长度, 比较容易地确定细胞周期变化。

### (三) 植物细胞的细胞周期

植物细胞的细胞周期与动物细胞的标准细胞周期非常相似, 也含有  $G_1$  期、S 期、 $G_2$  期和 M 期 4 个时相。但植物细胞的细胞周期至少含有两个突出特点 (图 13-7): 第一, 高等植物细胞不含中心体, 但在细胞分裂时可以正常组装纺锤体。在动物细胞, 中心体被认为是微管组织中心, 是纺锤体组装所必需的。在缺乏中心体的情况下, 是什么因素控制纺锤体组装, 长期以来一直是植物细胞周期研究领域中的重要课题之一。第二, 植物细胞分裂是在成膜体指导下, 以形成细胞板 (中间板) 的形式完成胞质分裂。研究植物细胞胞质分裂的调控过程, 也是探讨细胞周期调控中的重要课题之一。

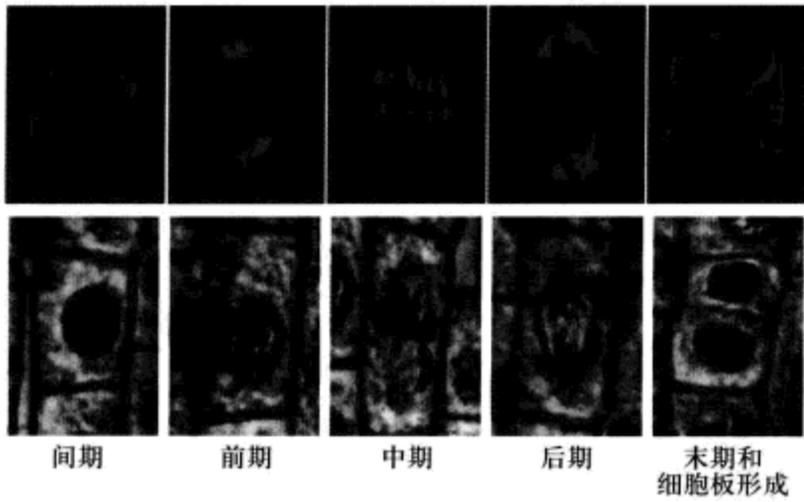


图 13-7 植物细胞的有丝分裂

上排各图用两种荧光染色，绿色荧光显示胞质微管（纺锤体），红色荧光显示细胞核（染色体）。下排各图用福尔根染色法显示有丝分裂及胞质分裂过程。（苏都莫日根博士提供）

#### （四）细菌的细胞周期

近些年来，研究细菌细胞周期也成为细胞周期调控研究中重要课题之一。但细菌种类繁多，细胞周期变化很大。在这里仅以大肠杆菌为例，简单介绍其细胞周期过程，以获得对细菌细胞周期的一般认识。

与所有其他细胞相似，DNA 复制是细菌细胞周期中的重要事件之一（图 13-8）。细菌 DNA 为一环形分子，含有一个复制起始点（origin）。一般情况下，细菌生长缓慢，在 DNA 复制之前，一般要经过一个临界时间（threshold），调节 DNA 复制的起始。在 DNA 复制之后和细胞分裂之前，也有一个临界时间。只有通过这个临界时间，细胞才能开始分裂。从这种慢生长情况来看，细菌细胞周期过程与真核细胞周期过程有一定相似之处。其 DNA 复制之前的准备时间与  $G_1$  期类似。分裂之前的准备时间与  $G_2$  期类似。再加上 S 期和 M 期，细菌的细胞周期也基本具备 4 个时相（图 13-8A）。但是，细菌在快生长情况下，细胞周期过程发生较大变化。最主要的变化在于细胞如何协调快速分裂和最基本的 DNA 复制速度之间的矛盾。在快生长情况下，细菌细胞每分裂一次（即一个细胞周期时间）仅需要 35 min，而完成一次 DNA 复制却需要 40 min。而且，在 DNA 复制之前，需要 10 min 的复制起始准备，在 DNA 复制之后还需要 20 min 的染色体分离和细胞分裂。由此可见，真正完成一轮 DNA 复制实际需要 70 min。细菌细胞是如何来协调快速分裂和慢速的 DNA 复制之间的矛盾呢？原来，如图 13-8B 所示，在上一次细胞分裂结束时，细胞内的 DNA 已经复制到一半路程。细

胞分裂后，立即开始新一轮的 DNA 复制。10 min 后，DNA 复制起始，复制的起点不是在一个 DNA 分子上，而是在两个正在形成中的 DNA 分子上同时开始。随着上次 DNA 复制的结束，染色体开始分裂，细胞也随之分裂。到两个细胞完全形成时，刚才开始的 DNA 复制又已经走过一半路程。前后时间持续 35 min。新的细胞又开始新一轮的 DNA 复制准备。可以看出，快生长时，在一个细胞周期中每个 DNA 分子复制仅能完成一半，但 DNA 复制是在两个正在形成中的 DNA 分子上同时进行的。结果，经过 70 min，两个 DNA 分子完成复制，得到 4 个 DNA 拷贝，细胞完成两轮细胞周期，产生 4 个细胞。

细菌在一定环境条件下，其慢生长和快生长可以相互转化。若慢生长转化为快生长，在第一次 DNA 复制起始之后立即开始新一轮的 DNA 复制起始，使两个 DNA 分子同时复制，细胞分裂后，形成两个各含 DNA 复制完成一半路程的子细胞。若快生长转化为慢生长，在细胞分裂之后仅开始新一轮的细胞周期，而不起始新的 DNA 复制，结果生成两个各含一个 DNA 分子子细胞。

关于细菌细胞 DNA 复制起始调控和染色体分离及细胞分裂调控等方面的研究，已经获得了许多成果，目前仍在深入进行中。

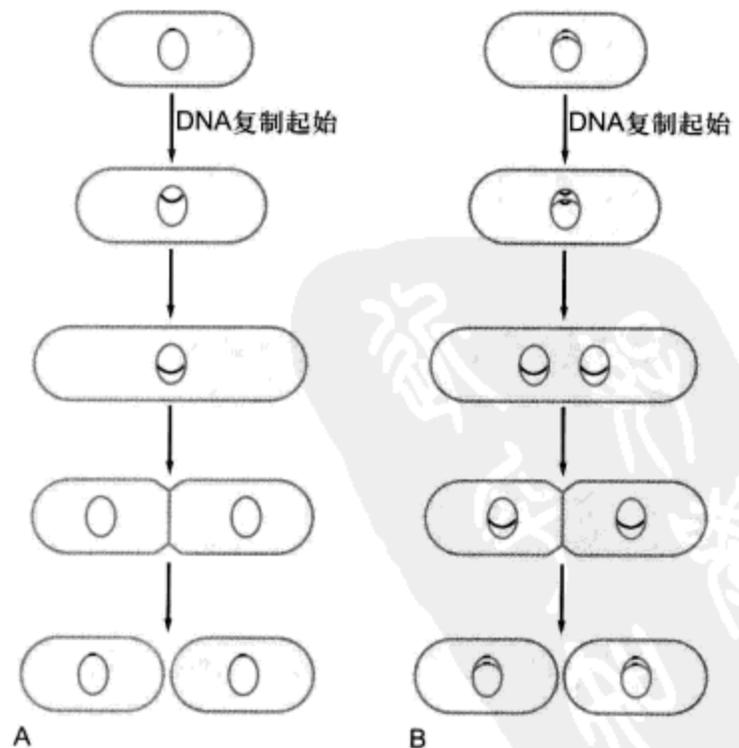


图 13-8 细菌的细胞周期  
A. 慢生长。B. 快生长。

## 第二节 细胞分裂

### 一、有丝分裂

在细胞周期的M期时相包括核分裂与胞质分裂两个相互联系的过程。细胞有丝分裂即指核分裂,根据细胞分裂期核膜、染色体、纺锤体装配及核仁等形态结构的规律性变化,传统上人们将有丝分裂过程又人为地划分为前期、前中期、中期、后期和末期。胞质分裂(cytokinesis)相对独立,一般开始于细胞有丝分裂后期,完成于细胞有丝分裂末期。通过核分裂与胞质分裂,使已经复制好的染色体DNA平均分配到2个子细胞中。在整个细胞分裂过程中,细胞骨架系统是核分裂与胞质分裂的主要执行者。图13-9中的照片摄自经抗

微管抗体和DNA染料双重荧光染色的动物细胞。在细胞间期,细胞核结构清晰,微管以一个中心体为核心向四周辐射装配。随着细胞进入分裂期,细胞核结构和微管排列方式等,将发生一系列有序的变化。基于光镜下所见有丝分裂基本过程,在中学及大学其他先行课程中已多有描述,故此不再赘述。

#### (一) 有丝分裂各期的重要事件及其结构装置

##### 1. 前期

前期(prophase)是有丝分裂过程的开始阶段。在前期主要发生两个事件:

(1) 染色体凝缩(chromatin condensation) 染色体凝缩是指由间期细长、弥漫样分布的线性染色质,经过进一步螺旋化、折叠和包装(packing)等过程,逐渐变短变粗,形成光镜下可辨的早期染色体结构。已复制的染色体的两个姐妹染色单体间彼此黏着和凝缩是有丝分裂和减数分裂期间基因组准确分离的先决条件。不同水平染色体高级结构的组织是依赖于不同的Smc

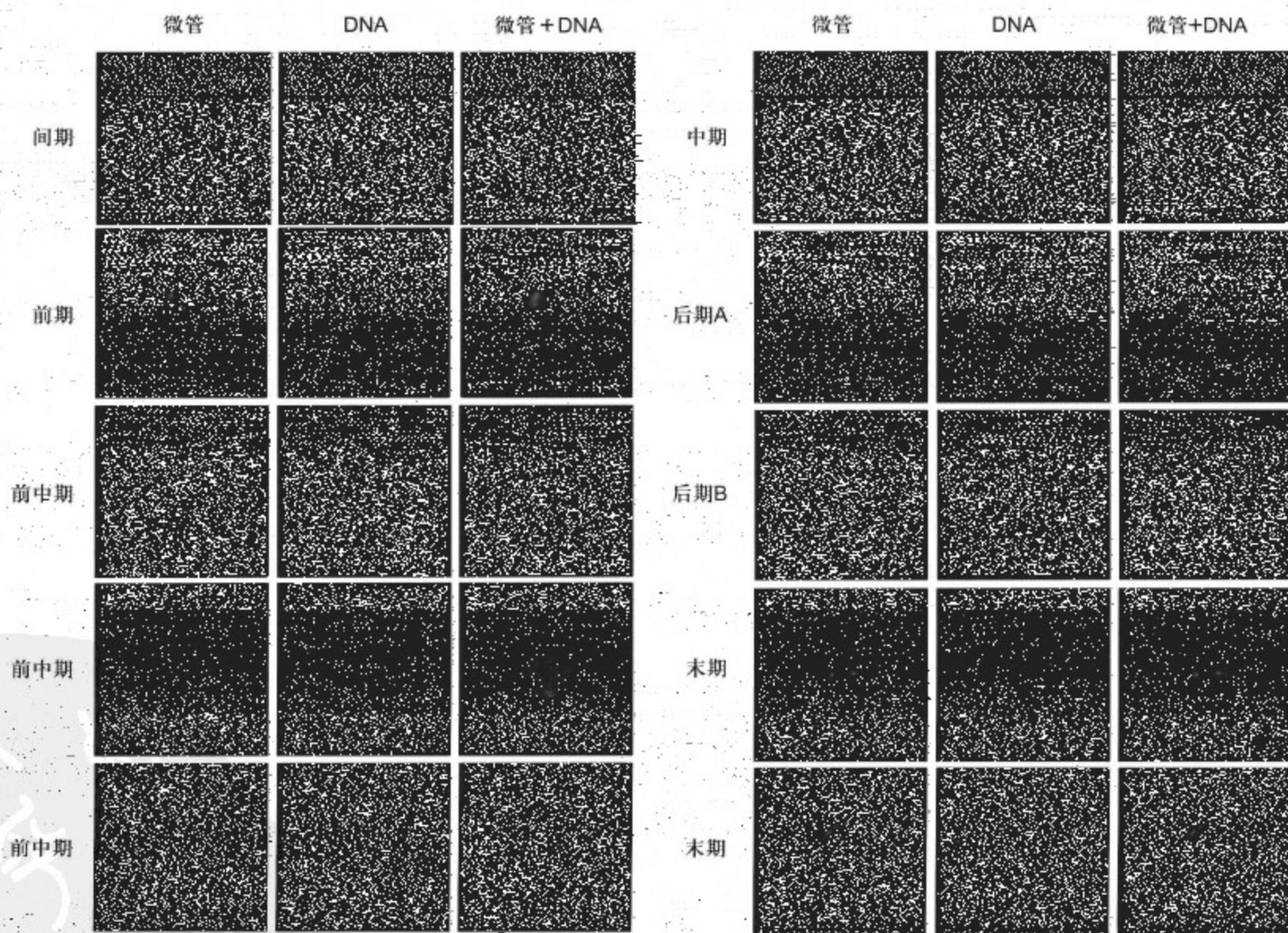


图13-9 高等动物细胞有丝分裂过程(付文祥和张传茂博士提供)

(structural maintenance of chromosome) 蛋白复合物来维持的。两类结构上相关的蛋白复合物分别是黏连蛋白 (cohesin) 和凝缩蛋白 (condensin), 二者均是由多个亚基构成的。黏连蛋白介导姐妹染色单体的黏着, 凝缩蛋白介导染色体凝缩。它们的核心组分为具有 ATPase 活性的 Smc 家族成员, 从细菌到高等生物, 在进化上高度保守, 在染色体高级结构组织、包装和配对等方面行使关键作用。典型真核生物的 Smc 复合物由 2 个 Smc 蛋白异二聚体和 2 个或多个非 Smc 蛋白亚基组成。黏连蛋白为 Smc 1/3 异二聚体以及非 Smc 蛋白如 Mcd1 (Scc1 或 Rad21) 和 Scc3 亚基; 凝缩蛋白最初在爪蟾卵细胞抽提物中被纯化, 除 Smc2/4 异二聚体外, 还有其他 3 种非 Smc 蛋白 (CAP-H, -G 和 -D2) 参与复合物的组成。每个异二聚体被中间铰链区分为 2 个卷曲螺旋臂, 每个臂的末端是球形类 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC), 这种结构特点使得 Smc 复合物可以利用水解 ATP 释放的能量保持高度动态性和可塑性, 以确保分子间或分子内的相互作用。在其他非 Smc 蛋白亚基参与下, 黏连蛋白通过臂端类 ABC 结构域与 DNA 结合, 将两条姐妹染色单体黏着在一起 (分子间交联), 直至有丝分裂中-后期转换时染色单体彻底分离。染色单体间除通过黏连蛋白而交联外, 在主缢痕区还组装形成另一种蛋白质复合物结构, 称为着丝粒与动粒 (详见第十一章第二节染色质); 凝缩蛋白介导染色体 DNA 分子内交联, 利用水解 ATP 释放的能量, 促进染色体凝缩 (图 13-10)。

(2) 细胞分裂极的确立和纺锤体的装配 不管是细胞常规的有丝分裂, 还是像酵母那样的核内有丝分裂, 在起始阶段, 分裂极的确立至关重要。动物细胞分裂极的确立, 与中心体的复制、分离和有星纺锤体的装配密

切相关。中心体建立两极纺锤体, 确保细胞分裂过程的对称性和双极性, 而这一功能对染色体的精确分离是必需的。高等植物细胞没有中心体, 但有丝分裂时也要装配形成无星纺锤体, 因此分裂极的确立机制尚不清楚。动物细胞中心体被称为微管组织中心 (MTOC), 中心体内含有一对桶状的中心粒, 它们彼此垂直分布, 外面被无定形的中心粒外周物质所包围 (参见图 10-23)。在细胞周期过程中中心体的周期变化如图 13-11 所示。

在分裂间期, 中心体精确的复制周期为有丝分裂做前期准备, 这一过程被称之为中心体复制。在  $G_1$  期晚期垂直分布的母中心粒和子中心粒分离, 这是中心体复制开始的征兆, 现普遍认为, 中心体在  $G_1$  期末开始复制, 在 S 期完成复制, 随着中心体复制完成, 在  $G_2$  期分离, 半保留复制的中心粒进入子代中心体。细胞进入有丝分裂前期, 复制并分离后的两个子中心体作为微管组织中心, 开始放射状微管装配, 中心体及其周围微管形成两个星体 (aster), 这便是分裂极的确立和纺锤体装配的起始。根据中心体生化分析, 中心体长驻蛋白包括  $\alpha/\beta/\gamma/\delta/\epsilon$  微管蛋白、中心体蛋白 (centrin)、中心粒周蛋白 (pericentrin) 等。许多研究表明,  $\gamma$  微管蛋白是微管组织中心的组成成分, 最初发现于一种真菌中, 后来证实它普遍存在于其他真核生物, 是一种非常保守的蛋白质, 而且可能也由多基因编码,  $\gamma$  微管蛋白连接微管和中心体。尽管它在细胞中含量很少, 但对微管的装配、微管的取向等起着很重要的调节作用。中心体蛋白是相对分子质量为  $2.0 \times 10^4$  的一个钙结合蛋白家族, 主要定位于中心体及其同源结构中。目前已鉴别出 4 种中心体蛋白 (centrin 1p, 2p, 3p, 4p)。centrin 2p 和 centrin 3p 普遍表达于哺乳动物细胞中, 两种蛋白主要位于中心粒的远端。研究表明在 HeLa 细胞中, 如

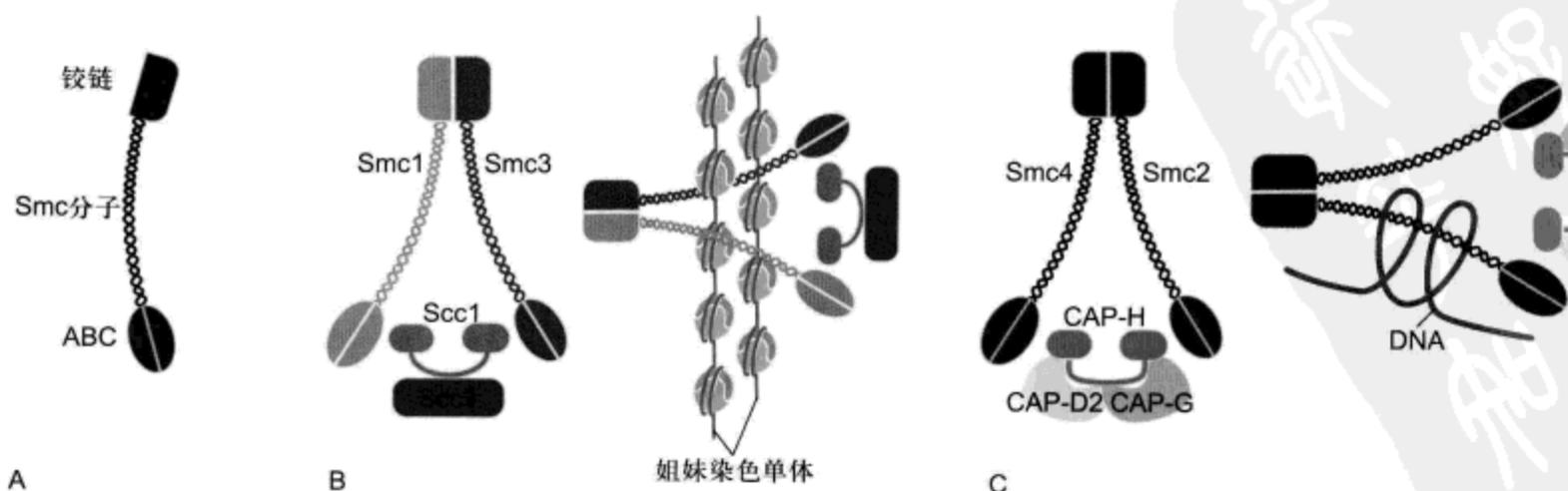


图 13-10 Smc 蛋白 (A) 及其黏连蛋白 (Smc 1/3) (B)、凝缩蛋白 (Smc2/4) (C) 异二聚体的作用

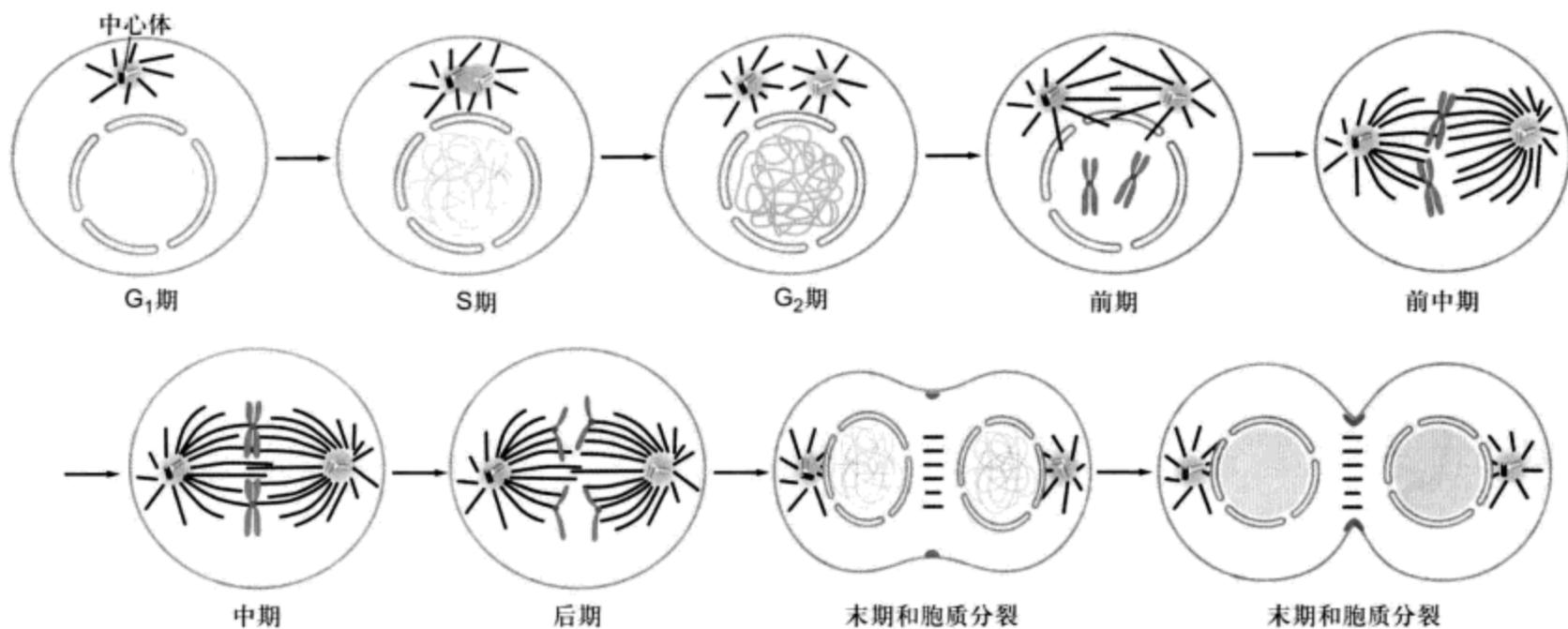


图 13-11 动物细胞中心体的复制与细胞周期的关系

在每个细胞周期中，中心体进行一次半保留复制。在有丝分裂末期，每个子代细胞继承一个中心体，而在下次有丝分裂开始之前，它又包含 2 个中心体。

果 centrin 2p 的表达被干扰 RNA 灭活，中心粒的复制将被抑制并导致细胞周期连续性的缺损。研究发现，中心体蛋白在中心体的复制和分离中发挥重要作用，在哺乳动物细胞中，中心体蛋白的定位具有细胞周期依赖性的特点，推测中心体蛋白参与了有丝分裂过程。中心粒周蛋白是中心粒周围物质的组成成分，它参与组织中心体的结构。现已有实验证据表明，中心体复制的起始需要多种调节因子介入，在  $G_1/S$  期限限制点，需要 cyclin E-CDK2（细胞周期依赖激酶 2，参见第十三章第一节）参与，为中心体复制签发通行证；中心体复制由钙调蛋白依赖激酶 II (CaMK II) 触发，细胞内自由钙离子浓度增加使 CaMK II 激活，CaMK II 激活触发中心体复制的开始，在 S 期中中心体复制依靠 cyclin A-CDK2 复合物。

动物细胞有丝分裂前期纺锤体的装配起始于两个星体的形成，它们并排于核膜附近。典型的有星纺锤体由星体微管、极间微管和染色体动粒微管排列组成。有丝分裂前期，星体微管和极间微管通过向其远离中心体的一端（正极端）加入  $\alpha/\beta$  微管蛋白二聚体而不断延长，在基于微管的马达蛋白的介导下推动中心体向细胞两极移动。

如果中心体复制异常，或细胞未能协调好中心体复制和 DNA 复制的关系，将不可避免地导致形成单极或多极纺锤体，而单极或多极纺锤体将驱使染色体异常分离，最终导致染色体倍性的改变。早在 20 世纪初，T. Boveri 就提出恶性肿瘤细胞极性的改变和染色体

分裂异常（非整倍体）可能是由于中心体功能缺陷引起的。事实上，染色体组型的改变在癌细胞中非常普遍，现在已经有越来越多的研究结果证实了这一观点。如今人们已经认识到，中心体复制功能障碍可能是引起染色体分裂异常的重要原因，并且最终导致癌的形成。

## 2. 前中期

前中期 (prometaphase) 的标志性事件之一是核膜崩解。核纤层蛋白形成骨架结构支撑于核被膜的内侧，得以使细胞核维持正常的形状与大小。在细胞有丝分裂中核被膜经历有规律地解体与重建过程 (图 13-12)。

核膜的崩解与核纤层的解体是相互偶联的事件。细胞分裂过程中核纤层的解体和重新组装与核纤层蛋白的磷酸化水平相关。核纤层蛋白的磷酸化与去磷酸化可能是有丝分裂过程中核纤层结构动态变化的调控因素。一些研究表明，核纤层蛋白是有丝分裂促进因子 (MPF) 的直接作用底物。MPF 具蛋白激酶活性，有丝分裂前期，MPF 可以使核纤层蛋白 22 位和 392 位丝氨酸磷酸化，结果导致这两个与核纤层组装直接相关的结构域发生构象变化，从而导致核纤层蛋白四聚体解聚和核纤层解聚。解聚的核纤层蛋白 A 以可溶性单体形式弥散在细胞中，而核纤层蛋白 B 则与核膜解体后形成的核膜小泡保持结合状态。在分裂末期，结合有核纤层蛋白 B 的核膜小泡在染色质周围聚集，并渐渐融合形成新的核膜，而核纤层蛋白则在核膜的内侧组装成子细胞的核纤层。

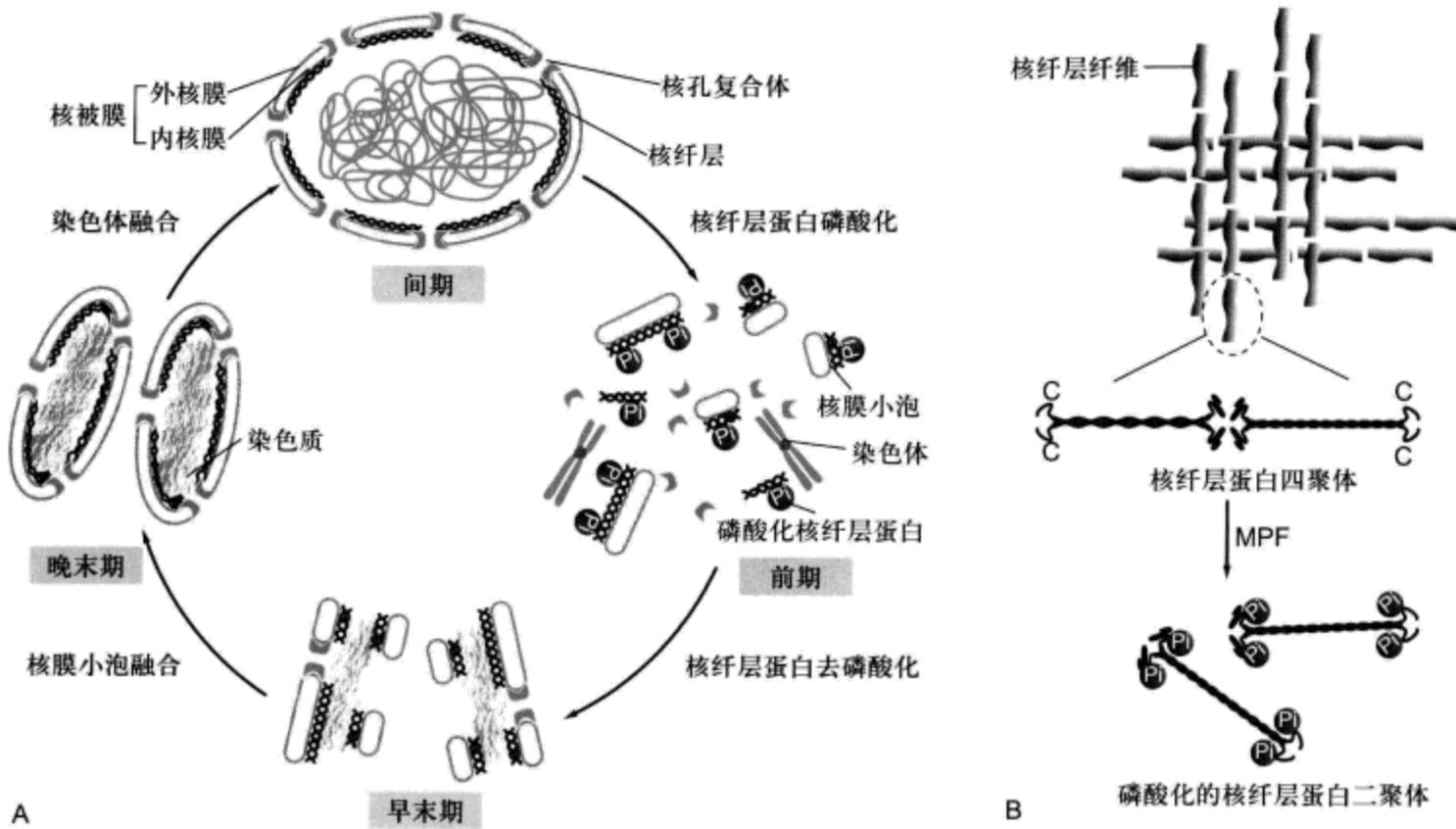


图 13-12 细胞分裂过程中核被膜和核纤层的动态变化  
A. 核被膜在细胞有丝分裂中有规律地解体与重建。B. 核纤层解聚。

前中期标志性事件之二是完成纺锤体装配，形成有丝分裂器 (mitotic apparatus)。在前期，两个星体的形成和向两极的运动，事实上标志着纺锤体组装的开始。有丝分裂进入前中期，随着核膜的解体，由纺锤体两极发出的一些星体微管可进入“核”内，通过其正极端迅速捕获染色体，并分别与染色体两侧的动粒结合，形成动粒微管 (kinetochore microtubule)。至此，由微管及其结合蛋白组成的纺锤体基本完成组装，由星体微管、染色体动粒微管和极间微管及其结合蛋白构成有星纺锤体，即动物细胞的有丝分裂器 (图 13-13)。此时的纺锤体赤道直径相对较大，两极直径的距离也相对较短。与同一条染色体的两个动粒相连接的两极动粒微管并不等长。因而染色体并不完全分布于赤道板，相互排列貌似杂乱无章。

纺锤体 (spindle) 是细胞分裂过程中的一种与染色体分离直接相关的细胞器。植物细胞不含中心体，但能形成无星纺锤体介导植物细胞的核分裂。

纺锤体组装是一个十分复杂的过程。首先要涉及微管在中心体周围组装和已经完成复制的中心体的分离。如前所述，中心体的复制和周围微管的组装需要许多调节因素的参与，如  $\gamma$  微管蛋白、中心体蛋白、中心粒周蛋白等。中心体的分离需要驱动蛋白相关蛋白 (kinesin-

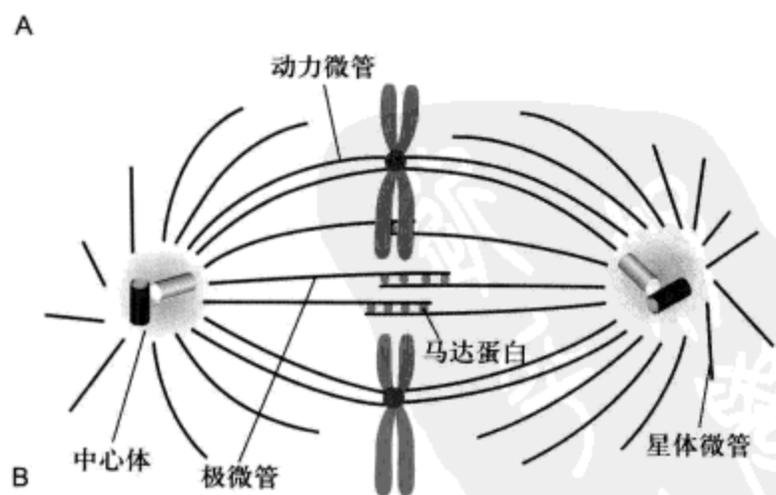


图 13-13 高等动物细胞纺锤体结构

A. DNA 染料 DAPI 荧光染色 (蓝色) 和抗微管蛋白抗体免疫荧光染色 (红色)。B. 染色体和纺锤体结构模式图。(A 图由付文祥和张传茂博士提供)

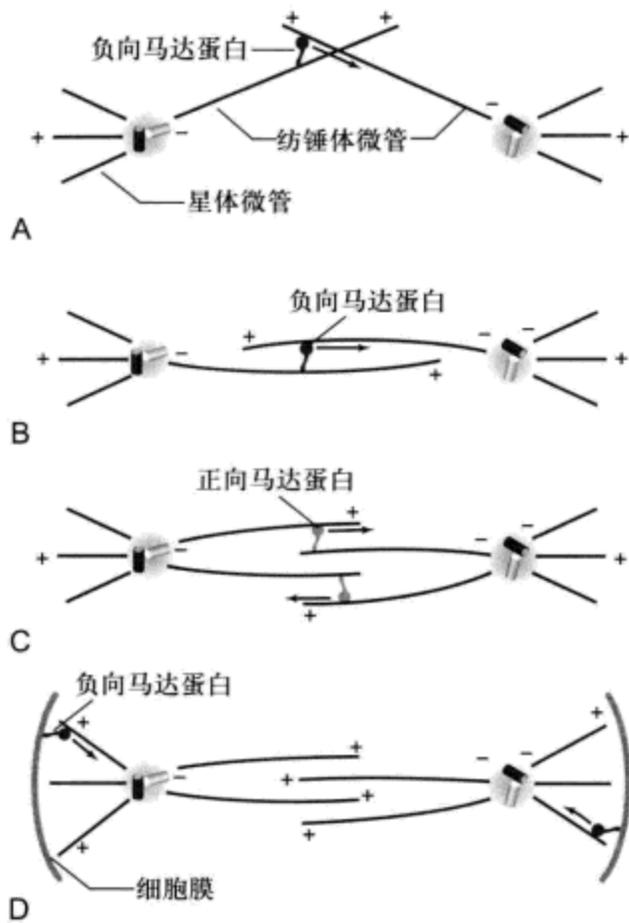


图 13-14 纺锤体组装过程

A. 中心体分离，负向运动马达蛋白与来自姐妹中心体的纺锤体微管结合。B. 借助马达蛋白向微管负极运动，将纺锤体微管牵拉在一起，形成早期纺锤体。C. 正向运动马达蛋白在纺锤体微管之间搭桥，借助正向运动，将纺锤体拉长。D. 负向运动的马达蛋白在细胞膜和星体微管之间搭桥，借助负向运动，将中心体进一步拉近两极的细胞膜，纺锤体进一步被拉长。

related proteins, KRPs; 参见表 10-1 驱动蛋白家族成员介绍) 和细胞质动力蛋白 (dynein) 等的作用 (图 13-14)。KRPs 主要为一些向微管负极运动 (负向运动)

的蛋白，而细胞质动力蛋白主要为向微管正极运动 (正向运动) 的蛋白。中心体分离时，负向运动的动力蛋白在来自姐妹中心体的微管之间搭桥，通过向负极运动，将被结合的微管牵拉在一起，组成纺锤体微管；中心体也自然形成了纺锤体的两极。这一过程称为中心体列队 (centrosome alignment)，即分裂极的确立 (图 13-14A, B)。然后，正向运动的动力蛋白在纺锤体微管之间搭桥，借助向微管正极运动，将纺锤体拉长，中心体之间的距离逐渐加大 (图 13-14C)。当纺锤体拉长到一定程度后，负向运动的动力蛋白在细胞膜和星体微管之间搭桥，借助负向运动，将星体向两极细胞膜拉近，纺锤体也进一步被拉长 (图 13-14D)。

前中期标志性事件之三是染色体整列 (chromosome alignment)。由纺锤体极体发出的微管捕捉染色体动粒，形成染色体动粒微管，这是染色体整列的必要前提。没有动粒的染色体不能与纺锤体微管结合向两极运动，同样，染色体动粒如果未被纺锤体微管捕获，也不能和其他染色体一起向两极运动。着丝粒和动粒是染色体结构的重要组分 (参见第十一章染色体的主要结构)，由于着丝粒和动粒联系紧密，结构成分相互穿插，在功能方面又密切相关，因此二者常被合称为着丝粒-动粒复合体 (centromere-kinetochore complex)，这是一种高度有序的整合结构。在电镜下，动粒为一个圆盘状结构，分内、中、外三层。动粒的外侧主要用于纺锤体微管附着，内侧与着丝粒相互交织 (图 13-15)。每条中期染色体上含有两个动粒，分别位于着丝粒的两侧。细胞分裂后，两个动粒分别被分配到两个子细胞中。当细胞再

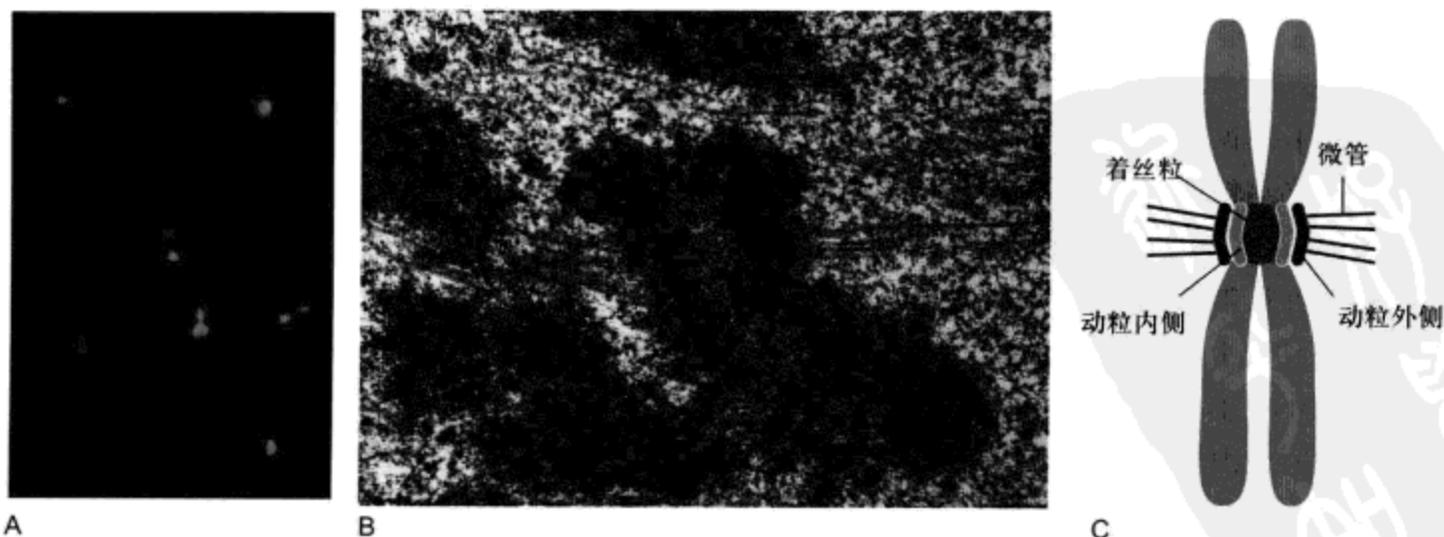


图 13-15 应用免疫荧光技术和电镜技术显示动粒位置和结构

A. DNA (蓝色) 和动粒蛋白 HEC1 (红色) 双重荧光染料染色。B. 透射电镜技术显示染色单体上的动粒结构及其与动粒微管的连接。C. 动粒结构及动粒-微管相互连接示意图。(A、B 图由付文祥、吕全龙和张传茂提博士提供)

次进入 S 期后, 动粒又会重新复制。用抗动粒蛋白的抗体作免疫荧光染色, 可以清楚地识别动粒所在位置。

着丝粒 DNA 主要由  $\alpha$  卫星 DNA 构成。着丝粒 DNA 片段大小由芽殖酵母的一百多碱基对、裂殖酵母的 100 kb 到人类的几千千碱基对不等。大的着丝粒 DNA 片段则主要由一些特殊序列重复排列构成。着丝粒 DNA 也伸入到动粒的内层, 成为动粒内层的组成成分。目前已经分离了几种着丝粒动粒蛋白质成分, 如哺乳类的 CENP-A、CENP-B、CENP-C、CENP-E、CENP-F、INCENP、HEC1 等。CENP-A 的相对分子质量约为  $1.7 \times 10^4$ , 是一种组蛋白 H3 类的蛋白质, 与组蛋白 H3 在 C 端有 62% 的同源序列。免疫标记技术证实 CENP-A 定位于动粒的内层。CENP-B 相对分子质量约为  $8.0 \times 10^4$ , 主要定位于动粒内层内侧的着丝粒上。CENP-C 的相对分子质量约为  $1.4 \times 10^5$ , 定位于动粒的内层。CENP-E 相对分子质量约  $3.12 \times 10^5$ , 是一种驱动蛋白, 定位于动粒外层表面的冠上。CENP-E 被认为在促使染色体与来自两极的微管相联结过程中起重要作用。CENP-E 在前中期与微管结合, 以后逐渐转移到动粒上。到分裂后期, CENP-E 离开动粒, 转移到纺锤体的中间区。CENP-F 相对分子质量约为  $3.3 \times 10^5$ 。CENP-F 在间期是一种核骨架蛋白, 在分裂前期, 转移到动粒上, 到分裂后期, 再转移到纺锤体的中间区域, 到末期, 再度转移到中体上。在酵母细胞中也已分离到了在结构和功能上与此类同的蛋白质。HEC1 是定位于动粒外板的结构蛋白, 相对分子质量约为  $7.6 \times 10^4$ 。至于着丝粒染色质是如何组装的, 着丝粒形成后又是如何引导动粒在其附近装配的, 以及动粒的分子结构至今并不十分清楚。

长期以来染色体整列问题一直困扰着有关生物学家。直到最近, 这一研究领域才终于取得了突破性进展。近期的研究发现, 至少有数种蛋白质参与染色体整列事件, 其中首要的两组蛋白称为 Mad 和 Bub 蛋白。Mad 和 Bub 可以使动粒敏化, 促使微管与动粒接触。免疫荧光染色发现, Mad2 和 Bub1 位于前期和前中期染色体的动粒上。如果染色体被纺锤体微管捕获, Mad2 和 Bub1 很快会从动粒上消失。一侧的动粒被微管捕捉, 一侧的 Mad2 和 Bub1 消失; 两侧的动粒被微管捕捉, 两侧的 Mad2 和 Bub1 消失。如果染色体不被微管捕捉, 则 Mad2 和 Bub1 不从动粒上消失。因而认为 Mad2 和 Bub1 与染色体组装入纺锤体有关。进一步研究发现, 由于某些染色体不能被微管及时捕捉而滞后, Mad2 和 Bub1 不能从这些染色体的动粒上消失, 后期则不能启

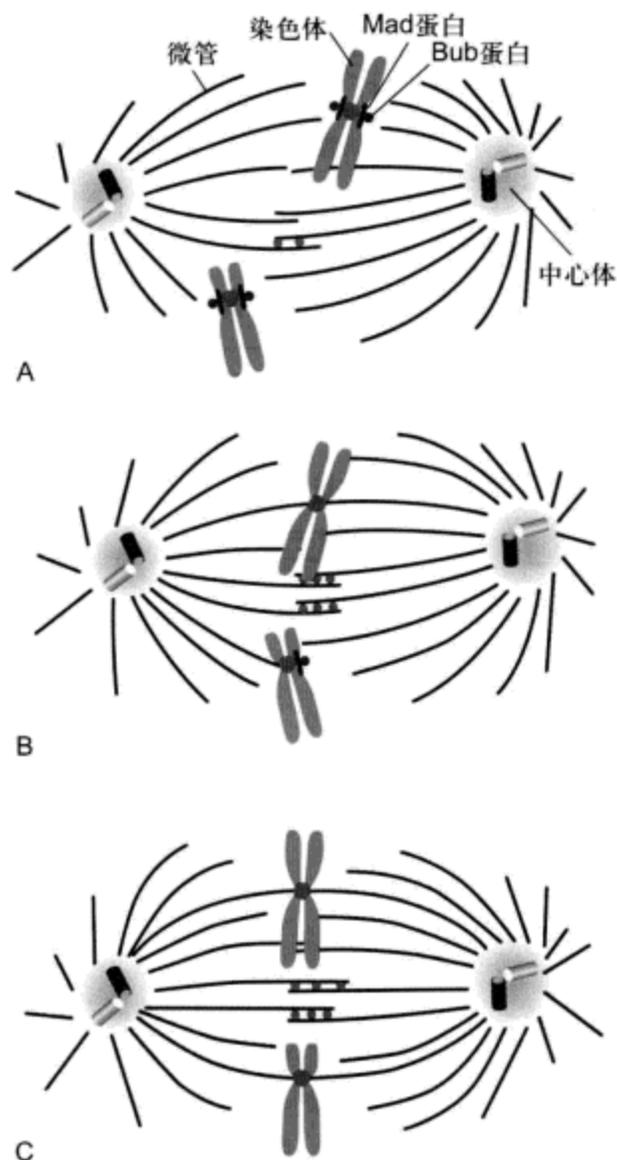


图 13-16 染色体整列

A. 细胞分裂前期和前中期, Mad 和 Bub 蛋白在染色体的动粒上聚集。B. 微管与动粒联结后, Mad 和 Bub 蛋白消失, 某些染色体滞后, 未与微管联结的动粒依然含有 Mad 和 Bub 蛋白。C. 所有染色体的动粒均与微管联结, Mad 和 Bub 蛋白消失, 染色体列队到赤道板。

动, 染色单体不能相互分离。只有等到这些染色体也被微管捕捉并排列到赤道板上, Mad2 和 Bub1 从动粒上消失, 后期才能开始启动 (图 13-16)。

### 3. 中期

细胞有丝分裂进入中期 (metaphase) 的主要标志是染色体整列完成并且所有染色体排列到赤道面上, 纺锤体结构呈现典型的纺锤样。当染色体上的两个动粒被微管捕捉后, 细胞通过什么机制将染色体排列到赤道面上呢? 目前对此解释流行两种学说, 即牵拉 (pull) 假说和外推 (push) 假说 (图 13-17)。牵拉假说认为, 染色体向赤道面方向运动, 是由于动粒微管牵拉的结果。动粒微管越长, 拉力越大, 当来自两极的动粒微管的拉力相等时, 染色体即被稳定在赤道面上; 外推假说认为, 染色体向赤道方向移动, 是由于星体的排斥力将

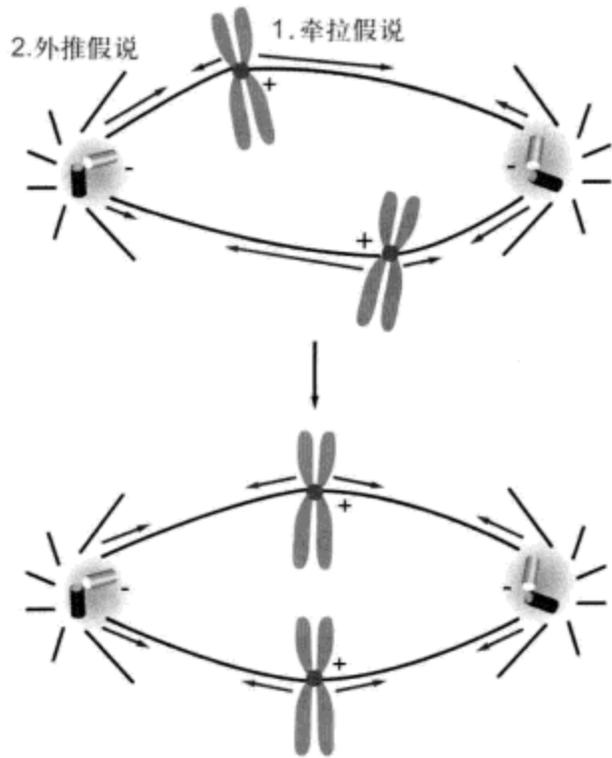


图 13-17 解释染色体在赤道面整列的两种假说

染色体外推的结果。染色体距离中心体越近，星体对染色体的外推力越强，当来自于两极的推力达到平衡时，染色体即被稳定在赤道面上。这两种假说也许并不相互排斥，有可能同时发挥作用，或有其他机制共同参与。

染色体向赤道面运动的过程称为染色体整列或染色体中板聚合 (congression)。当染色体完成在赤道面整列之后，两侧的动粒微管长度相等，作用力均衡。除动粒微管外，许多极性微管在赤道区域也相互搭桥，形成貌似连续微管结构。整个纺锤体微管数量，在不同物种之间变化很大，少则十来根，多的数千根甚至上万根。如真菌 *Phycomyces* 仅有 10 根纺锤体微管，产于澳大利亚的一种小袋鼠 (rat kangaroo)，其纺锤体微管约有 1 500 根，而网球花属植物 (*Haemanthus*) 的纺锤体微管约有 10 000 根。染色体整列的运动速度非常之快，一般在每秒  $0.05 \sim 1 \mu\text{m}$  之间。染色体排列到赤道面上以后，其两个动粒分别面向纺锤体的两极。在每一个动粒上结合的动粒微管可以多达几十根。

#### 4. 后期

后期 (anaphase) 发生的标志性事件是中期整列的染色体其两条姐妹染色单体分离，分别向两极运动。当染色体在赤道面上完成整列后，在各种调节因素的共同作用下，细胞有丝分裂由中期向后期转换，姐妹染色单体分离并逐渐向两极移动。后期大致可以划分为连续的两个阶段，即后期 A 和后期 B。在后期 A，动粒微管变短，牵动染色体向两极运动；在后期 B，极性微管长度

增加，两极之间的距离逐渐拉长。整个后期阶段约持续数分钟。染色体运动的速度为  $1 \sim 2 \mu\text{m}/\text{min}$ 。

染色体向两极的运动依靠纺锤体微管的作用。用破坏微管的药物如秋水酰胺、秋水仙素或诺考达唑等处理，染色体的运动会立即停止。去除这些药物，染色体并不能立即恢复运动，而是要等到纺锤体重新装配后才能恢复。可见染色单体与纺锤体微管的联系也是染色体向极部运动所必需的。用实验方法破坏这种联系，染色单体运动停止，直到这种联系恢复，染色体的运动才能恢复。

曾有多种假说解释后期染色单体分离和向两极移动的运动机制。目前比较广泛支持的假说是后期 A 和后期 B 两个阶段假说。在后期 A，动粒微管变短，将染色体逐渐拉向两极。一般认为，动粒微管变短是由于其动粒端解聚所造成的；而这种解聚又是由于动力蛋白沿动粒微管向极部运动的结果。如图 13-18 所示，微管动力

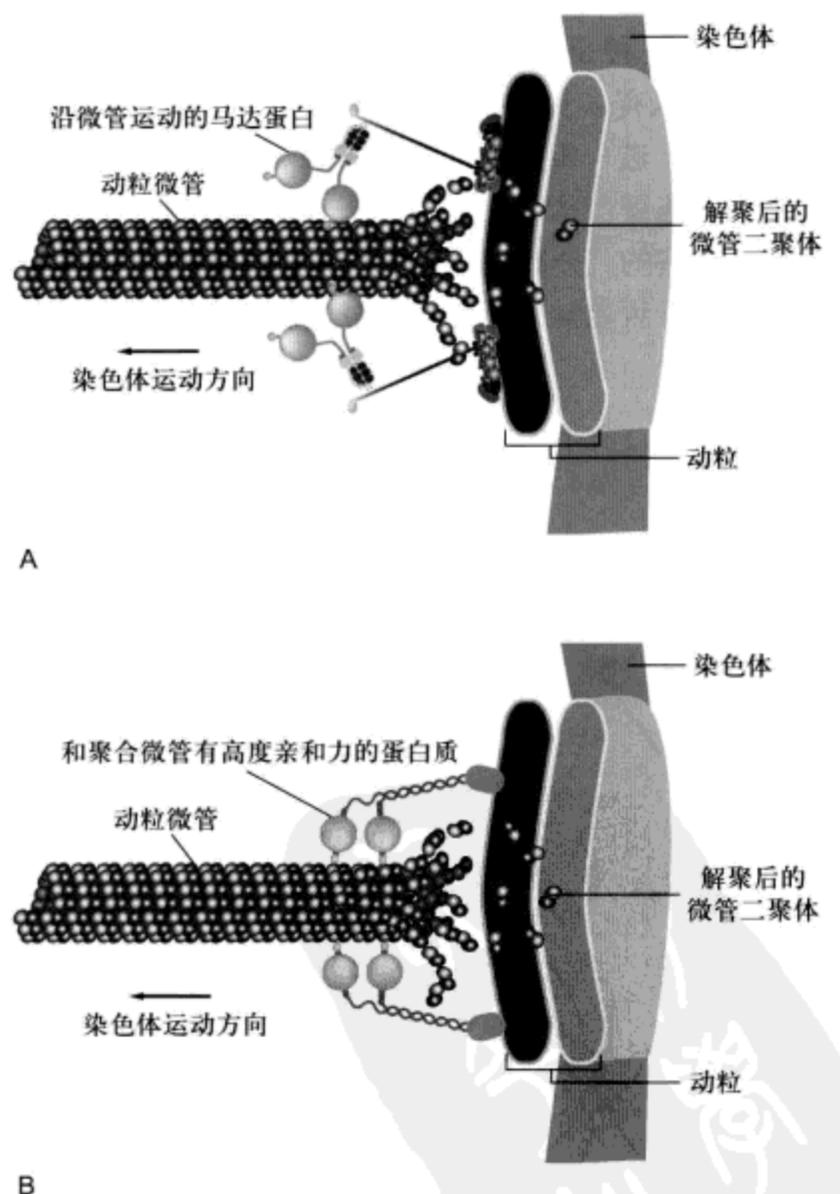


图 13-18 细胞有丝分裂后期由 ATP 驱动的马达蛋白沿微管向极部运动使染色体分开

A. ATP- 驱动的染色体运动促使微管解聚。B. 微管解聚促使染色体运动。

蛋白首先结合到动粒上，在 ATP 分解提供能量的情况下，沿动粒微管向极部运动，并带动动粒和染色体向极部运动。动粒微管的末端随之降解成微管蛋白二聚体，动粒微管变短，动粒和染色单体与两极之间的距离逐渐拉近。当染色单体接近两极，后期 A 结束，转向后期 B。在后期 B，极性微管游离端（正极）在 ATP 提供能量的情况下与微管蛋白聚合，使极性微管加长，形成较宽的极性微管重叠区。KRPs 与极性微管重叠区的微管结合并在来自两极的极性微管之间搭桥。KRPs 向微管正极行走，促使来自两极的极性微管在重叠区相互滑动（如双极四聚体 kinesin-5），使重叠区逐渐变得狭窄，两极之间的距离逐渐变长。同时，胞质动力蛋白在星体微管和细胞膜之间搭桥，并向星体微管负极运动，进一步将两极之间的距离拉长（图 13-19）。

研究发现，在姐妹染色单体分离之前，彼此间通过黏连蛋白相互黏着在一起（图 13-10）。黏连蛋白至少含有 4 种亚单位，即 Smc1、Smc3、Scc1/Mcd1 和 Scc3。只有该复合体解聚的情况下，姐妹染色单体才能分离。进一步研究发现，在姐妹染色单体分离过程中，黏连蛋白是被一种称为分离酶（separase）的蛋白酶所降解的。分离酶主要剪切黏连蛋白的 Scc1 亚单位，结果导致姐妹染色单体的分离。分离酶剪切 Scc1

的过程是在严格的调控下进行的。通常情况下，分离酶与一种抑制性蛋白 securin 结合而不表现出蛋白酶活性。CDK1 也通过磷酸化分离酶而抑制其活性。当后期开始时，后期促进因子复合体（anaphase-promoting complex, APC）介导 securin 的降解，解除其对分离酶的抑制作用；APC 也通过介导 cyclin B 降解，使 CDK1 活性丧失，失去对分离酶的磷酸化作用，促进分离酶活化。活化的分离酶剪切 Scc1，导致姐妹染色单体分离（图 13-20）。

在所有染色体排列到赤道板上之前，为什么后期不能启动呢？有人认为，动粒在与微管联结之前，会发出抑制信号，抑制细胞周期向下一个阶段运转。另一些科学家为了验证这一观点，用激光特异地破坏滞后染色体尚未与微管联结的动粒，发现尽管染色体依然滞后，细胞周期却可以随之向下一阶段转化，提示未与微管联结的动粒确实可以发出抑制信号，抑制细胞周期向下一阶段运转。更为直接的证据显示，Mad2 可以与 APC 及其他相关物质结合，抑制 APC 的活性，阻止细胞周期向下一阶段发展。

微管与动粒联结后，抑制后期启动的信号又是如何解除的呢？有人认为 CENP-E 和 Bub 蛋白在这一过程中起了重要作用。当微管与动粒联结后，CENP-E 分

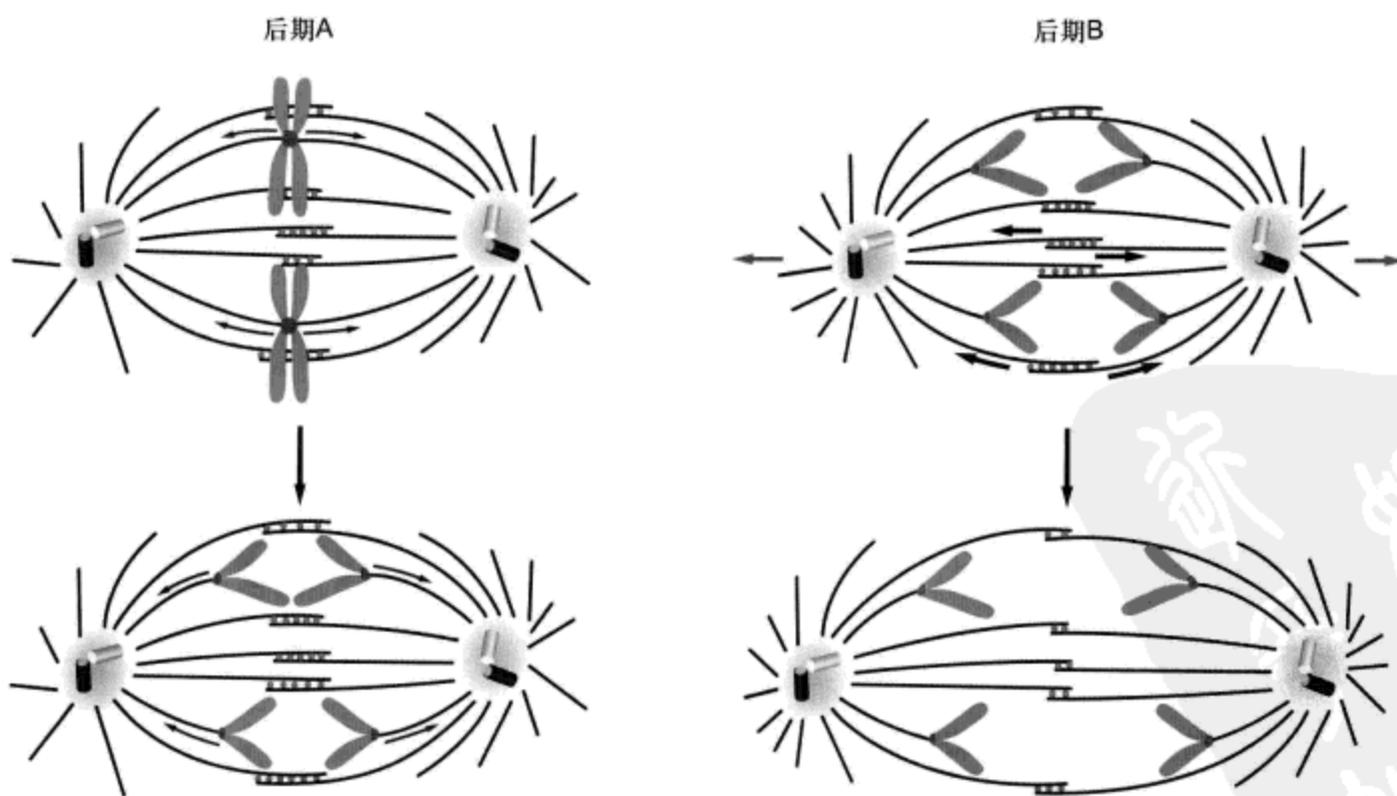


图 13-19 细胞分裂后期 A 和后期 B 产生染色体向极部运动的示意图

后期 A：动粒微管在两端解聚缩短，致使姐妹染色单体向两极运动。后期 B：通过星体微管牵拉和极微管重叠区滑动，使纺锤体两极和染色体进一步分开。

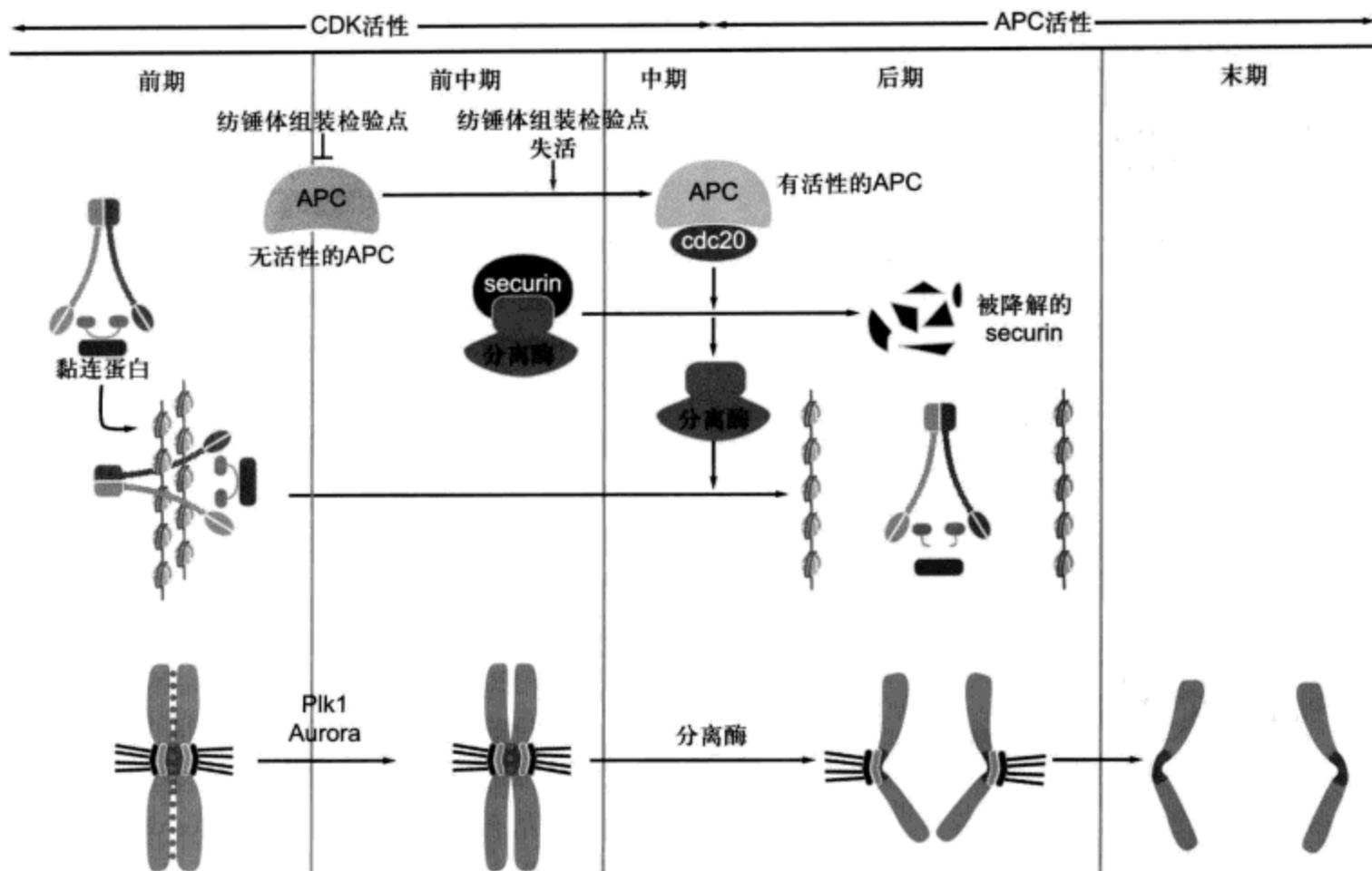


图 13-20 有丝分裂中后期转换

有丝分裂中 - 后期转换是由活化 APC 启动的，抑制物 securin 的降解导致分离酶活化，进而黏连蛋白被切割，致使姐妹染色单体分离。

子的结构和位置将发生变化，这些变化进一步影响到 Bub1 的活性。Bub1 活性变化，又进一步影响到 Mad2 的稳定性和与其他有关物质的结合，最终导致 Mad2 对 APC 抑制的解除。

### 5. 末期

姐妹染色单体分离到达两极，有丝分裂即进入末期 (telophase)。动粒微管消失，极微管继续加长，较多地分布于两组染色单体之间。到达两极的染色单体开始去浓缩，在每一个染色单体的周围，伴随核纤层蛋白去磷酸化，核纤层与核膜重新组装，分别形成两个子代细胞核。在核膜形成的过程中，核孔复合体同时在核膜上装配。随着染色单体的去浓缩，核仁也开始重新组装，RNA 合成功能逐渐恢复。

### 6. 胞质分裂

胞质分裂与核分裂 (有丝分裂) 是相关的事件。胞质分裂一般始于细胞分裂后期，完成于细胞分裂末期；而有丝分裂即使在没有胞质分裂的情况下也要发生。胞质分裂开始时，在赤道板周围细胞表面下陷，形成环形缢缩，称为分裂沟 (furrow)。随着细胞由后期

向末期转化，分裂沟逐渐加深，直至两个子代细胞完全分开。分裂沟的形成靠多种因素的相互作用。实验证明，肌动蛋白和肌球蛋白 II 参与了分裂沟的形成和整个胞质分裂过程。在分裂沟的下方，除肌动蛋白之外，还有微管、核膜小泡等物质聚集，共同构成一个环形致密层，称为中体 (midbody)。随着胞质分裂，中体将一直持续到两个子细胞完全分离。胞质分裂开始时，大量的肌动蛋白和肌球蛋白 II 在中体处组装成反向排列的微丝束，环绕细胞，称为收缩环 (contractile ring)。收缩环收缩，分裂沟逐渐加深，细胞形状也由原来的圆形逐渐变为椭圆形、哑铃形，直到两个子细胞相互分离。用抗肌动蛋白和抗肌球蛋白的抗体作免疫荧光染色，可见随分裂沟的形成，其下面的荧光亮度逐渐增强，并明显高于其他部位。在电镜下，可见大量的微丝结构分布于分裂沟下。用抗肌动蛋白、抗肌球蛋白或特异破坏微丝的药物如细胞松弛素 B 处理处于分裂期的活细胞，收缩环的收缩活动停止，分裂沟逐渐消失。胞质分裂整个过程可以简单地归纳为 4 个步骤，即分裂沟位置的确立、肌动蛋白聚集和收缩环形成、收缩环收缩、收缩环处细胞

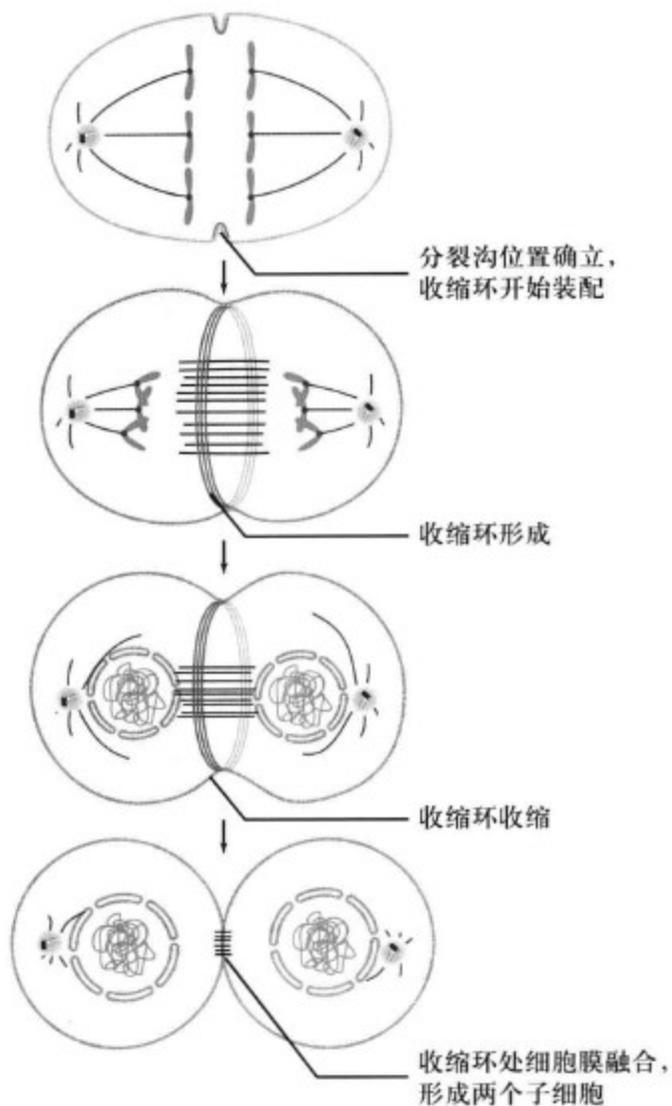


图 13-21 动物细胞胞质分裂示意图

膜融合并形成两个子细胞 (图 13-21)。

分裂沟的定位与纺锤体的位置明显相关。人为地改变纺锤体的位置可以使分裂沟的位置改变。对分裂沟定位的分子作用机制目前尚不清楚,但在动物细胞分裂时,越来越多的证据显示,中央纺锤体和星体微管共同决定了分裂沟形成的位置,星体微管参与了分裂沟的形成 (图 13-22)。有实验显示,在培养细胞

分裂中期,人为干扰中央纺锤体发出的信号 (图 13-22A),将会阻止分裂沟的形成。在末期开始时,星体微管加长直到与细胞膜下的皮层接触。微管末端对细胞皮层刺激,促使分裂沟形成 (图 13-22B)。也有实验显示,在远离分裂沟的端部,星体微管可能发出抑制细胞皮层收缩的信号,促使该处细胞膜松弛,加速分裂沟的形成 (图 13-22C)。目前,对肌动蛋白与肌球蛋白 II 的聚集和收缩环的形成也不完全了解。对于收缩环收缩和收缩环处细胞膜融合两个步骤的研究,近年来有了较大进展。M. R. Laroche 等 (1996, 1997) 在网柄菌属 (*Dictyostelium*) 中发现 *ras* 基因家族中的 *racE* 基因产物在收缩环收缩和细胞膜融合过程中起重要作用。*racE* 基因产物是一个小相对分子质量的 GTP 酶。另外两组科学家则发现,两种参与调节小分子 GTP 酶活性的蛋白 GapA 和 RgaA/DPAP1 也参与收缩环收缩和细胞膜融合过程。目前已知有二十多种调节因子参与了分裂沟的定位、收缩环的形成和胞质分裂。这些调节因子主要包括:微管结合蛋白 PRC1、KIF4、Aurora-B 激酶及其结合蛋白、RhoA 信号通路的各成员以及与膜融合相关的调节因子等。

也有实验证明,钙离子浓度的变化也会影响分裂沟的形成。将荧光标记的钙离子指示剂注入细胞,发现在分裂沟下钙离子浓度上升。将钙离子直接注射到蛙卵细胞膜下,可以刺激分裂沟形成。

## 二、减数分裂

减数分裂是一种特殊的有丝分裂形式,仅发生于有性生殖细胞形成过程中的某个阶段。按照真核生物减数分裂所发生的阶段不同,可将减数分裂区分为 3 种类型 (图 13-23): ① 配子减数分裂,又称终末减数分裂

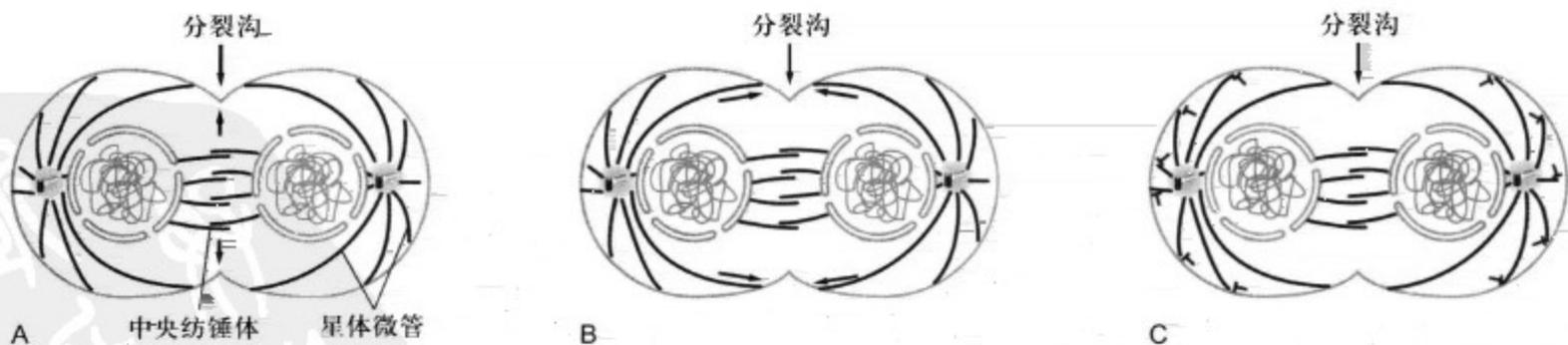


图 13-22 中央纺锤体和星体微管作用于细胞皮层并诱导分裂沟形成

A. 中央纺锤体发出的信号决定分裂沟的定位。B. 接近分裂沟位置的纺锤体微管发出信号,促进分裂沟的形成。C. 远离分裂沟位置的星体微管发出抑制性信号 (T 形箭头),抑制远离分裂沟端部的细胞皮层收缩,间接促进分裂沟的形成。

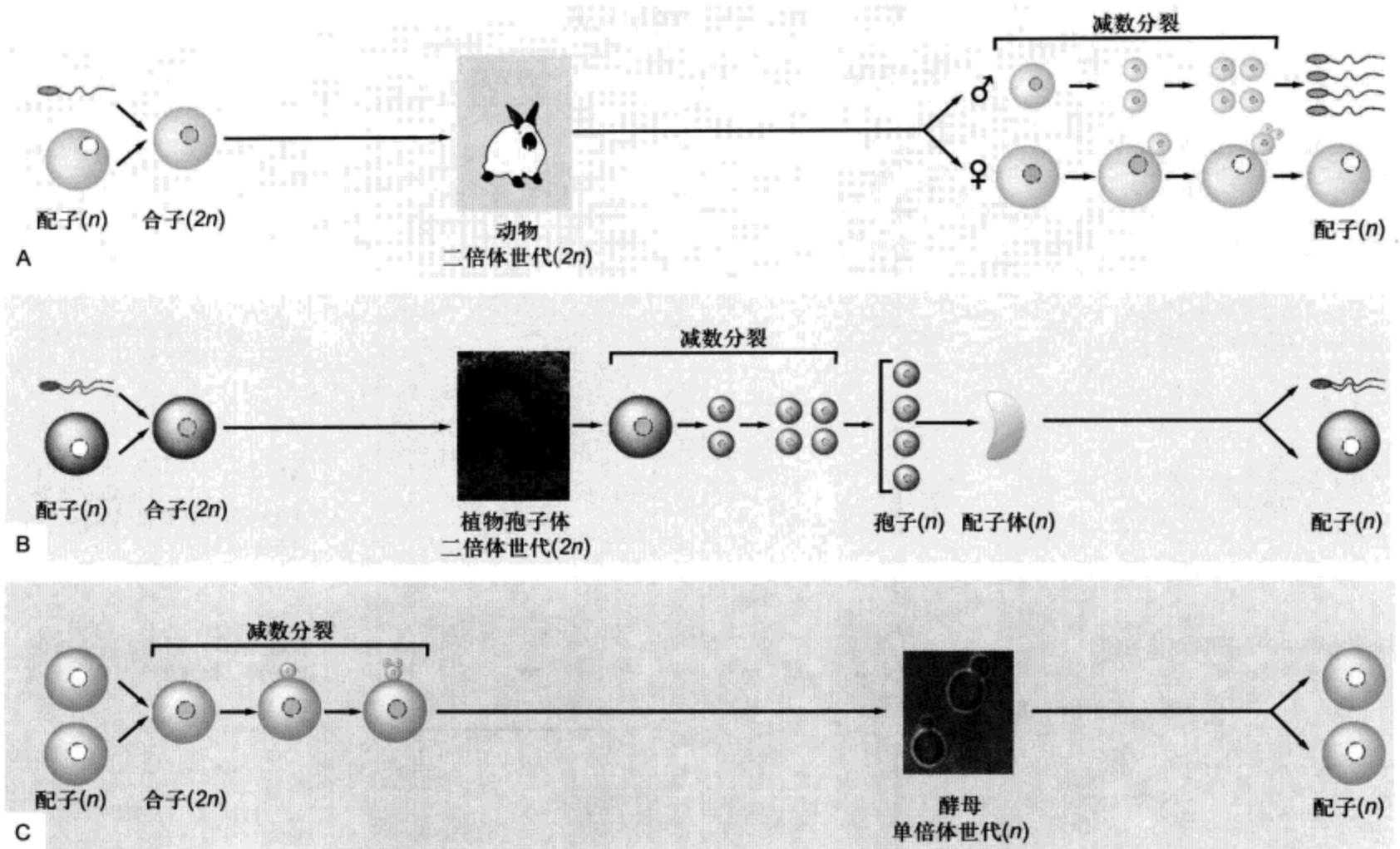


图 13-23 真核生物减数分裂的 3 种类型

A. 配子减数分裂。B. 孢子减数分裂。C. 合子减数分裂。

(gametic/terminal meiosis), 发生在所有多细胞动物和许多原生生物配子形成阶段; ② 孢子减数分裂, 又称居间型减数分裂 (sporic/intermediate meiosis), 所有高等植物和某些藻类减数分裂发生阶段既与配子形成无关, 又与受精作用无关, 发生在孢子体某一阶段; ③ 合子减数分裂, 又称起始减数分裂 (zygotic/initial meiosis), 某些原生生物、真菌和少数藻类, 在有性生活史起始, 即受精后便发生减数分裂, 形成单倍体孢子。

减数分裂与有丝分裂相比, 其主要不同列于表 13-1 中。减数分裂最主要特征是, 细胞仅进行一次 DNA 复制, 随后细胞连续两次分裂。两次分裂分别称为减数分裂 I 和减数分裂 II。在两次分裂之间, 还有一个短暂的分裂间期。减数分裂的结果, 子细胞各自的染色体数目减半。再经过受精, 形成合子, 染色体数恢复到体细胞的染色体数目。减数分裂的意义在于, 既有效地获得双亲的遗传物质, 保持后代的遗传稳定性, 又可以增加更多的变异, 确保生物的多样性, 增强生物适应环境变化的能力。相反, 假如在有性生殖过程中没有减数分裂, 生殖细胞染色体数不能减半, 经过受精, 其染色体数

必将倍增。细胞体积也会相应增加, 生物个体体积也会增大。代代相传, 其生命活动将无法适应环境变化, 终将会被自然淘汰。因而, 减数分裂是生物有性生殖的基础, 是生物遗传、进化和生物多样性的重要保证。

与有丝分裂相似, 在减数分裂之前的间期阶段, 也可以人为地划分为  $G_1$  期、S 期、 $G_2$  期 3 个时相。但此间期阶段也有其鲜明的特殊性。为区别于一般的细胞间期, 常把减数分裂前的细胞间期称为减数分裂前间期 (premeiotic interphase)。

### (一) 减数分裂前间期

减数分裂前间期的最大特点在于其 S 期持续时间较长, 同时也发生一系列与减数分裂相关的特殊事件。例如, 蝾螈 (*Triturus*) 体细胞有丝分裂前 S 期约为 12 h, 而减数分裂前 S 期则可持续 10 天。小鼠有丝分裂前 S 期为 5~6 h, 而其减数分裂前 S 期约为 14 h。另一个重要特点是, 在网球花属植物中发现, 其减数分裂前间期的 S 期仅复制其 DNA 总量的 99.7%~99.9%, 而剩下的 0.1%~0.3% 要等到减数分裂前期阶段才进行

表13-1 有丝分裂与减数分裂比较

有丝分裂特征	有丝分裂	减数分裂	减数分裂特征
有丝分裂发生在体细胞，在时空上无严格限定			减数分裂只发生在有性生殖的特定时空
在有丝分裂间期，每个体细胞核DNA复制1次，细胞分裂1次			减数分裂前间期DNA复制1次，细胞连续分裂2次
有丝分裂前期一般不发生同源染色体配对，也不发生交换和重组			减数分裂前期 I 发生同源染色体配对(联会)，并伴随发生同源染色体非姐妹染色单体之间交换和重组
有丝分裂中-后期同源染色体姐妹染色单体分离			减数分裂中-后期 I 同源染色体分离，姐妹染色单体不分离
子细胞染色体数目与母细胞染色体数目相同(2n→2n) 有丝分裂产生2个子细胞，保持遗传稳定			减数分裂中-后期 II 姐妹染色单体分离

复制。科学家发现，这些推迟复制的DNA被分割为5 000~10 000个小片段，分布于整个基因组中，每个小片段长1 000~5 000个碱基对。另外还发现，有一种蛋白质，称为L蛋白，在减数分裂前间期与上述DNA小片段结合，阻止其复制。这些DNA小片段被认为与减数分裂前期 I 染色体配对和基因重组有关。

大多数生物，减数分裂前间期的细胞核大于其体细胞核。染色质也多凝集成异染色质。这种变化的意义虽不明了，但一般认为与染色体配对和基因重组有关。另外，根据生物种类不同，减数分裂前间期的G<sub>2</sub>期的长短变化较大。有的G<sub>2</sub>期短，有的则和有丝分裂前间期的G<sub>2</sub>期长短相当，也有的可以在G<sub>2</sub>期停滞较长一段时间，直到受到新的刺激来打破这种停滞。

## (二) 减数分裂过程

由减数分裂前G<sub>2</sub>期细胞进入两次有序的细胞分裂，即减数第一次分裂和减数第二次分裂。两次减数分裂之间的间期或长或短，但无DNA合成。减数分裂过程见图13-24。

### 1. 减数分裂 I

减数分裂 I (meiosis I) 与体细胞有丝分裂有许多相似之处，其过程也可以人为地划分为前期 I、前中期 I、中期 I、后期 I、末期 I 和胞质分裂 I 6个阶段。但减数分裂 I 又有其鲜明的特点，其主要表现是分裂前期 I 的同源染色体配对和基因重组以及其后的染色体分离方式等。

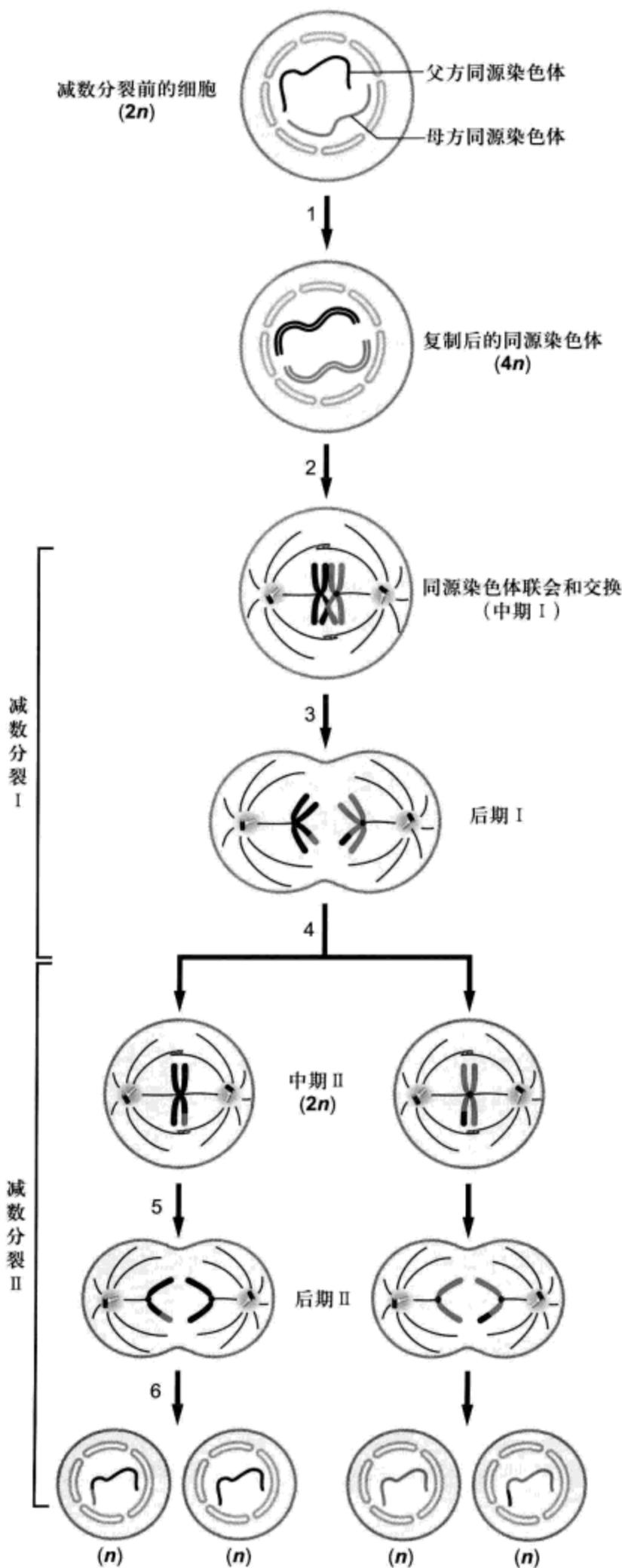


图 13-24 减数分裂过程图解

(1) 前期 I 前期 I (prophase I) 持续时间较长。在高等生物, 其时间可持续数周、数月、数年, 甚至数十年。在低等生物, 其时间虽相对较短, 但也比有丝分裂前期持续的时间长得多。在这漫长的时间过程中, 要进行同源染色体配对和基因重组。此外, 也要合成一定量的 RNA 和蛋白质。根据细胞染色体形态变化, 又可以将前期 I 人为地划分为细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期 5 个阶段。

细线期 (leptotene, leptonea): 为前期 I 的开始阶段。首先发生染色质凝缩, 染色质纤维逐渐螺旋化、折叠, 包装成在显微镜下可以看到的细纤维样染色体结构。因而, 有人将细线期也称为凝缩期 (condensation stage)。细线期与有丝分裂前期起始阶段既有相似特点, 如减数分裂前期 I 每个同源染色体的两条姐妹染色单体在黏连蛋白介导下被紧密约束在一起而不分离, 待同源染色体配对时, 黏连蛋白则参与联会复合体的装配; 与有丝分裂前期也有明显不同, 在细线期染色质在凝集前已复制, 但仍呈单条细线状, 看不到成双的染色体。但在电子显微镜下, 可观察到此期的染色体是由两条染色单体构成的。不过, 由于 DNA 复制在减数分裂前间期 (S 期) 尚未全部完成, 因而未被复制的 DNA 片段可能是将两条姐妹染色单体紧密联系在一起的可能因素之一 (图 13-25); 此期另外一个明显不同点是, 在细纤维样染色体上, 出现一系列大小不同的颗粒状结构, 称为染色粒 (chromomere)。虽然已经知道染色粒是由染色质紧密包装而成, 但其功能并不清楚。细线期还有一个明显的特点, 即染色体端粒通过接触斑与核膜相连。对玉米细胞减数分裂的研究发现, 玉米细线染色体的端粒开始是分布在整個细胞核中, 在邻近细线期结束时, 端粒定位到核膜的内侧。由于很多细线染色体的端粒与核膜结合, 使染色体装配成花束状, 所以细线期又称花束期。

偶线期 (zygotene, zygonema): 主要发生同源染色体配对 (pairing), 即来自父母双方的同源染色体逐

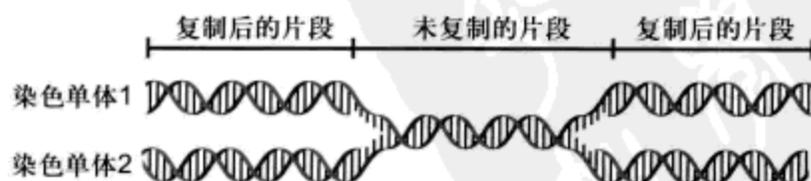


图 13-25 偶线期 DNA 在减数分裂前期 I 才进行复制示意图

可能是由于此种未复制的 DNA 片段的存, 导致两条姐妹染色单体紧密联系在一起。

渐靠近，沿其长轴相互紧密结合在一起。因而，偶线期又称为配对期 (pairing stage)。配对过程是专一性的，仅发生于同源染色体之间，非同源染色体之间不进行配对。关于同源染色体之间相互识别的机制，目前尚不清楚。配对以后，两条同源染色体紧密结合在一起所形成的复合结构，称为二价体 (bivalent)。由于每个二价体由两条同源染色体构成，共含有 4 条染色单体，因而又称为四分体 (tetrad)。但此时的四分体结构并不清晰可见。同源染色体配对的过程称为联会 (synapsis)。联会初期，同源染色体端粒与核膜相连的接触斑相互靠近并结合。从端粒处开始，这种结合不断向其他部位伸延，直到整对同源染色体的侧面紧密联会。联会也可以同时发生在同源染色体的其他位点上。在联会的部位形成一种特殊的复合结构，称为联会复合体 (synaptonemal complex)。联会复合体沿同源染色体长轴分布，宽  $1.5 \sim 2 \mu\text{m}$ ，在电镜下可以清楚地显示其细微结构 (图 13-26)。联会复合体被认为与同源染色体联会和基因重组有关。在偶线期发生的另一个重要事件是合成在 S 期未合成的约 0.3% 的 DNA (偶线期 DNA，即 zygDNA)。若用 DNA 合成抑制剂抑制 zygDNA 合成，联会复合体的形成将受到抑制。zygDNA 在偶线期转录活跃。转录的 RNA 被称为 zygRNA。zygDNA 转录也被认为与同源染色体配对有关。

**粗线期 (pachytene, pachynema)：**开始于同源染色体配对完成之后。这一过程可以持续几天至几个星期。在此过程中，染色体进一步凝缩，变粗变短，并与核膜继续保持接触。同源染色体仍紧密结合，并发生等位基因之间部分 DNA 片段的交换和重组，产生新的等位基因的组合。此时在联会复合体部位的中间，出现一个新的结构即重组节 (combination nodule)。重组节是同源染色体配对联会复合体中的球形、椭圆形或棒状的结节，直径约为 90 nm，是由蛋白质装配成的小体，结构不清楚 (图 13-26)。重组节中含有催化遗传重组的酶类，因此推测某些重组节与染色体重组有关。交叉与重组节在总的数量上是相等的，而在联会染色体上的分布方式两者也极为相似，果蝇的某些突变引起了交叉分布的异常，重组频率因此降低，此时，可发现重组节不仅数量减少，分布也发生了变化，这也从另一个角度证明重组节与染色体交换的发生有关。在粗线期，也合成一小部分尚未合成的 DNA，称为 P-DNA。P-DNA 大小为  $100 \sim 1000 \text{ bp}$ ，编码一些与 DNA 剪切 (nicking) 和修复 (repairing) 有关的酶类。

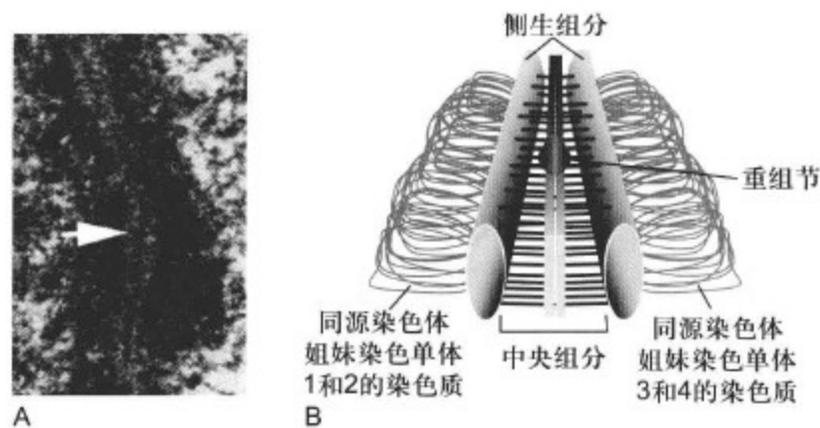


图 13-26 电镜下见到的联会复合体和重组节结构 (A) 及其图解 (B)

A. 照片显示联会复合体和重组节 (箭头所指)。B. 图解显示侧生组分、中央组分、重组节和同源染色体的姐妹染色单体。(A 图由马红博士惠赠)

粗线期另一个重要的生化活动是，合成减数分裂期专有的组蛋白，并将体细胞类型的组蛋白部分或全部地置换下来。这种置换也许在一定程度上参与了基因重组过程，或反映出减数分裂前期染色体结构的变化。

在许多动物的卵母细胞发育过程中，粗线期还要发生 rDNA 扩增。即编码 rRNA 的 DNA 片段从染色体上释放出来，形成环形的染色体外 DNA，游离于核质中，并进行大量复制，形成数千个拷贝的 rDNA。如在非洲爪蟾卵母细胞中，经过 rDNA 扩增，可以产生大约 2500 个拷贝的 rDNA。这些 rDNA 将参与形成附加的核仁，进行 rRNA 转录。

**双线期 (diplotene, diplonema)：**重组阶段结束，同源染色体相互分离，仅留几处相互联系。同源染色体的四分体结构变得清晰可见。同源染色体仍然相联系的部分称为交叉 (chiasma)。交叉的数量变化不定，但一般认为“交叉”是遗传学“交换” (crossover) 的细胞学基础。即使在同种物种的不同细胞之间，交叉的数量也不相同 (图 13-27)。在电镜下可见交叉部位含有残

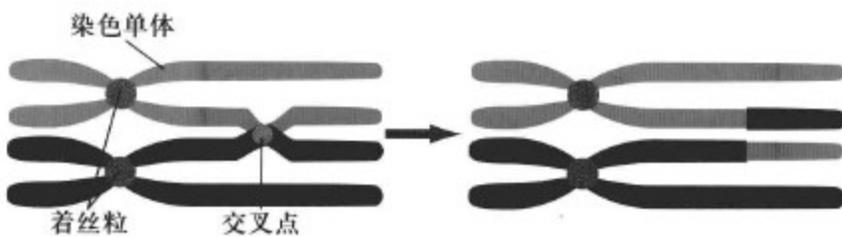


图 13-27 双线期二价染色体图解

可见 4 条染色单体，两个交叉，两个同源染色体各自的两个姐妹着丝粒并排存在。

留的联会复合体结构。

许多动物在双线期阶段，同源染色体或多或少地要发生去凝集，RNA 转录活跃。关于染色体去凝集的程度，有的种类低到不易觉察，有的种类则高到几乎与一般间期细胞相似。在许多动物，尤其是鱼类、两栖类、爬行类和鸟类的雌性动物，染色体去凝集形成一种特殊的巨大染色体结构，形似灯刷，故称灯刷染色体 (lampbrush chromosome)。在灯刷染色体上有许多侧环结构，是进行 RNA 活跃转录的部位。RNA 转录、蛋白质翻译以及其他物质的合成等，是双线期卵母细胞体积增长所必需的 (见本书第十一章)。

目前比较清楚的是，在灯刷染色体侧环上合成的 RNA 主要为前体 mRNA。前体 mRNA 合成以后，很快被剪辑为 mRNA。有些种类的 mRNA，如编码组蛋白、核糖体蛋白和卵黄蛋白的 mRNA 很快会在细胞质中翻译为蛋白质。许多其他种类的 mRNA 则和蛋白质结合，以非活跃形式储备在卵母细胞质中。直到卵细胞成熟并受精以后，这些储备的 mRNA 才能转变为活跃状态，进行蛋白质翻译。在灯刷染色体一定的侧环上，也可以检测到 tRNA 和 5S rRNA 的转录。

双线期持续时间一般较长，其长短变化很大。两栖类卵母细胞的双线期可持续将近一年，而人类的卵母细胞双线期从胚胎期的第五个月开始，短者可持续十几年，到性成熟期开始；长者可达四五十年，到生育期结束。

终变期 (diakinesis)：染色体重新开始凝集，形成短棒状结构。如果有灯刷染色体存在，其侧环回缩，RNA 转录停止，核仁消失，四分体较均匀地分布在细胞核中。同时，交叉向染色体臂的端部移行。此移行过程称为端化 (terminalization)。到达终变期末，同源染色体之间仅在其端部和着丝粒处相互联结。终变期的结束标志着前期 I 的完成。

(2) 中期 I 前期 I 结束，细胞逐渐转入减数分裂中期 I (metaphase I)。在此过程中，要进行纺锤体组装。纺锤体结构和形成过程与一般有丝分裂过程中的相类似。核膜破裂标志着中期 I 的开始。纺锤体微管侵入核区，捕获分散于核中的四分体。四分体逐渐向赤道方向移动，最终排列在赤道面上。和有丝分裂不同的是，每个四分体含有四个动粒。其中一条同源染色体的两个动粒位于一侧，另一条同源染色体的两个动粒位于另一侧。从纺锤体一极发出的微管只与一个同源染色体的两个动粒相连，从另一极发出的微管也只与另一个同源染

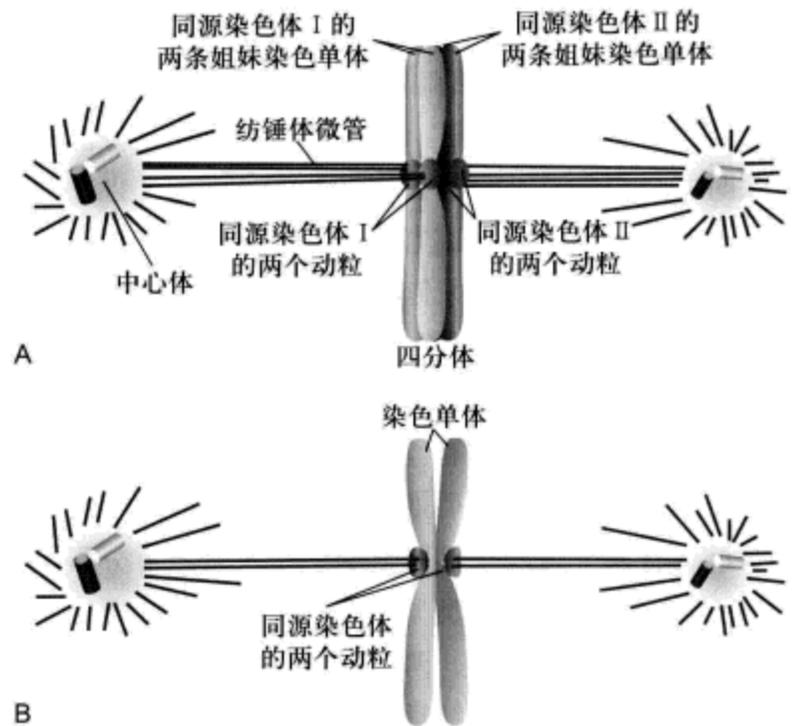


图 13-28 减数分裂中期 I (A) 与减数分裂中期 II (B) 动粒与纺锤体的联系示意图

在减数分裂中期 I，四分体中同源染色体的两个动粒位于同侧，只与从同一极发出的纺锤体微管相联结；减数分裂中期 II 与一般有丝分裂中期相似，每个染色体的两个动粒分别位于染色体的两侧，分别与从两极发出的纺锤体微管相联结。

色体的两个动粒相连 (图 13-28)。

(3) 后期 I 同源染色体对分离并向两极移动，标志着后期 I (anaphase I) 的开始。移向两极的每个同源染色体均含有两条姐妹染色单体。其结果，到达每一极的染色体 DNA 含量由 4C 变为 2C。以减数分裂前间期细胞复制后的染色体数目为基数，减数分裂的第一次分裂后的染色体数减半。另外，两套同源染色体在功能上是等价的，解除配对的同源染色体向两极移动是一个随机分配、自由组合的过程，因而到达两极的染色体会出现众多的组合方式。如人类细胞有 23 对染色体，从理论上讲将会产生  $2^{23}$  种不同的排列方式。如此庞大的排列方式，即使不发生基因重组，得到遗传上完全相同的配子概率也只有八百四十万分之一。再加上基因重组和精子与卵子的随机结合，要获得遗传上完全相同的子代个体几乎是不可能的，除非是同卵双生个体，其遗传性状可能相同。

(4) 末期 I、胞质分裂 I 和减数分裂间期 经过后期 I 后，细胞进一步的变化主要有两种类型：第一种类型，染色体到达两极，并逐渐进行去凝集。在染色体的周围，核被膜重新组装，形成两个子细胞核。同时，随着染色体分离并向两极移动，细胞质也开始分裂，形成

两个间期子细胞。此时的间期细胞虽具有一般间期细胞的基本结构特征，但又有着重要区别，即它们不再进行DNA复制，也没有G<sub>1</sub>期、S期和G<sub>2</sub>期时相之分。间期持续时间一般较短，有的仅作短暂停留。为区别于一般细胞间期，特将其称为减数分裂间期（interkinesis）。第二种类型，即细胞进入末期后，不是完全回复到间期阶段，而是立即准备进行减数第二次分裂Ⅱ。

## 2. 减数分裂Ⅱ

减数分裂Ⅱ过程与有丝分裂过程非常相似，即经过分裂前期Ⅱ、中期Ⅱ、后期Ⅱ、末期Ⅱ和胞质分裂Ⅱ等几个过程。每个过程中细胞形态变化也与有丝分裂过程相似。对于上述第二种类型，染色体到达两极后，减数分裂Ⅰ的纺锤体去组装，两极的中心粒和星体此时一分为二，重新组装成两个纺锤体。染色体在原来两极的位置重新排列，形成新的赤道板。此时即为中期Ⅱ。此后的发展则与一般有丝分裂相似。

经过减数分裂Ⅱ，共形成4个子细胞。但它们以后的命运随生物种类不同而不同。在雄性动物，4个细胞大小相似，称为精子细胞，经变态进一步发育成4个精子。在雌性动物，减数分裂Ⅰ为不等分裂，即第一次分裂后产生一个大的卵母细胞和一个小的极体，称为第一极体。第一极体将很快死亡解体，有时也会进一步分裂为两个小细胞，但没有功能。卵母细胞将继续进行减数分裂Ⅱ，也为不等分裂。其结果是产生一个卵细胞和一个第二极体。第二极体也没有功能，很快解体。因此，雌性动物减数分裂仅形成一个有功能的卵细胞。高等植物减数分裂与动物减数分裂类似，即雄性产生4个有功能活性的精子，而雌性仅产生一个有功能活性的卵细胞。

### （三）减数分裂过程的特殊结构及其变化

#### 1. 性染色体的分离

在染色体组型中与性别决定相关的染色体称性染色体。XY型性别决定是所有哺乳类动物、多数雌雄异株植物、昆虫、某些鱼类和两栖类动物的性别决定方式。不同性别之间，其性染色体构成不同。性染色体组成为XX的个体是雌性，性染色体组成为XY或XO（即无Y染色体）的个体是雄性。另一种为ZW型性别决定，刚好与XY型相反，雌性个体的性染色体组成为ZW，雄性个体的性染色体组成为ZZ。ZW型性别决定方式普遍存在于鸟类、鳞翅目昆虫、某些两栖类和爬行类之中。对于含有两条XX性染色体的细胞，两条XX染色

体像常染色体一样进行正常配对、交换和分离。而含有XY性染色体的细胞，两条性染色体的形态结构不同，基因含量也不同。在前期Ⅰ，二者是如何配对和分离的呢？一般讲，有些物种的XY染色体间可能会含有一些同源区段，有的可能不含任何同源区段。对于含有同源区段的XY染色体，如人类的XY染色体，在前期Ⅰ可以进行配对。不管XY染色体配对与否，二者都将和常染色体一样，在分裂中期Ⅰ排列到赤道面上。其后，随常染色体分离而相互分离，并各自移向两极。到减数分裂Ⅱ，XY染色体和常染色体一样，其两条染色单体再进行分离。偶尔也可出现XY染色体的染色单体在减数分裂Ⅰ时就相互分离的现象，致使产生的两个细胞各含有一个X染色单体和一个Y染色单体。到第二次减数分裂时，每个细胞的X和Y染色单体再分配到两个细胞中。

对于XO物种（主要是昆虫），在第一次减数分裂时，X染色体移向一极。结果将产生一个含X染色体的细胞和一个不含性染色体的细胞。到第二次减数分裂，含X染色体的细胞分裂为两个含X染色单体的细胞；不含性染色体的细胞也一分为二，形成两个不含性染色体的细胞。偶尔也可以看到X染色体的两个染色单体在第一次减数分裂时即相互分离，产生两个各含一个X染色单体的细胞。到第二次减数分裂时，X染色单体仅分配到一个细胞中。最终结果是，一个XO细胞经过减数分裂，产生两个含X染色体的细胞和两个无性染色体的细胞。

#### 2. 联会复合体和基因重组

联会复合体是减数分裂期间（前期Ⅰ）在两个同源染色体之间形成的一种临时性蛋白质梯状结构。这种结构是M. J. Moses于1956年用电镜观察蝾螈卵母细胞时发现的。随后证实，联会复合体在动物和植物减数分裂过程中广泛存在，主要功能是介导同源染色体之间配对（联会）和遗传重组（交换）。现在也有证据表明，联会复合体对于遗传重组不是必需的，因为不仅发现重组可以发生在联会复合体装配之前，而且发现突变的酵母细胞即使不能形成联会复合体，也能实现遗传信息的交换。所以近来又认为联会复合体的主要功能是为相互作用的染色单体之间完成交换提供一种结构框架。联会复合体在同源染色体联会处沿同源染色体长轴分布，由位于中间的中央组分和位于两侧的侧生组分共同构成。侧生组分的外侧则为配对的同源染色体（图13-29）。联会复合体中央组分宽约100 nm，侧生组分

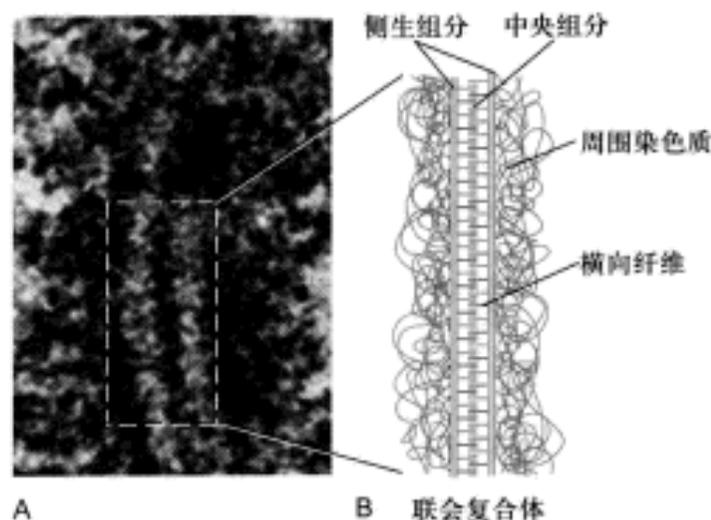


图 13-29 粗线期的联会复合体

A. 联会复合体电镜照片。B. 联会复合体图解。(A 图由马红博士惠赠)

宽 20~40 nm。从两侧的侧生组分向中央组分方向发出横向纤维 (transverse fibers)，交会于中央组分的中间部位。

蛋白质是联会复合体的主要组成成分之一。用胰蛋白酶、链霉蛋白酶等处理联会复合体，其中央组分、侧生组分以及横向纤维等结构消失。现已鉴定出联会复合体 3 种特异性蛋白：SC protein-1 (SYCP1)，SC protein-2 (SYCP2) 和 SC protein-3 (SYCP3)，并已在人类已确定其编码基因的染色体定位。SYCP3 和 SYCP2 参与侧生组分组成，SYCP1 参与中央组分组成，也是横向纤维的主要成分。

P. B. Moens 实验室等曾经分离出几种联会复合体

结构蛋白，并用其制备了特异抗体。用免疫电镜方法证实，其中有两种小分子蛋白位于侧生组分，二者的相对分子质量分别为  $3 \times 10^4$  和  $3.3 \times 10^4$ 。第三种蛋白相对分子质量为  $1.25 \times 10^5$ ，位于中央组分。第四种蛋白的相对分子质量约为  $1.9 \times 10^5$ ，既分布于侧生组分，也分布于中央组分。这些蛋白分子的功能尚不清楚。另外，用同样方法也证明，DNA 拓扑酶 II 存在于侧生组分和其周围的染色质中。

DNA 片段也是联会复合体的组成成分之一。这些 DNA 片段多位于 50 ~ 550 bp 之间。它们很可能是挂在或包含与侧生组分的染色体纤维的部分 DNA 片段。Moens 等用 DNA 酶消化分离多线染色体，发现这些 DNA 片段被联会复合体保护而免遭 DNA 酶消化。序列分析显示，这些 DNA 片段中并无特殊的 DNA 序列。不同细胞之间，这些 DNA 片段的大小和碱基的序列会有明显差别。这些结果提示，DNA 与联会复合体结合不需要特殊的 DNA 序列；染色体的任何部分都可能与联会复合体的侧生组分结合。这些 DNA 片段很可能完全穿越侧生组分而进入中央组分，在此处参与同源染色体的基因重组。

在中央组分和侧生组分中还发现有 RNA。因此，联会复合体可能含有核糖核蛋白复合物。

联会复合体被认为从细线期开始组装，经过偶线期至粗线期形成典型的联会复合体结构，同时在粗线期重组节开始组装。双线期联会复合体开始去装配，终变期时完全消失。

## ● 思考题 ●

1. 什么是细胞周期？细胞周期各时相的主要变化是什么？
2. 细胞周期时间是如何测定的？
3. 细胞周期同步化有哪些方法，比较其优缺点？
4. 试比较有丝分裂与减数分裂的异同点。
5. 细胞通过什么机制将染色体排列到赤道板上？有何生物学意义？
6. 说明细胞分裂后期染色单体分离和向两极移动的运动机制。
7. 试述动粒的结构及功能。
8. 说明细胞分裂过程中核膜破裂和重装配的调节机制。

## 参考文献

1. Archambault V, Glover D M. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(4):265-275.
2. Bettencourt-Dias M, Glover D M. Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, (6):451-463.
3. Burgoyne P S, Mahadevaiah S K, Turner J M. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(3):207-216.
4. Clarke P R, Zhang C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(6):464-477.
5. Glotzer M. The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(1):9-20.
6. Güttinger S, Laurell E, Kutay U. Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(3):178-191.
7. Jackman M, Lindon C, Nigg E A, Pines J. Active cyclin B1-CDK1 first appears on centrosomes in prophase. *Nature Cell Biol*, 2003, 5: 143-148.
8. Jeyaprasath A A, Klein U R, Lindner D, Ebert J, Nigg E A, Conti E. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell*, 2007, 131(2):271-285.
9. Musacchio A, Salmon E D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(5):379-393.
10. Nigg E A. Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends Cell Biol*, 2007, 17(5):215-221.
11. Nigg E A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(1):21-32.
12. Nigg E A, Raff J W. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*, 2009, 139(4):663-678.
13. Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw W C. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(10):798-812.
14. Sullivan M, Morgan D O. Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11):894-903.
15. Walczak C E, Cai S, Khodjakov A. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(2):91-102.

数字资源  
PDG

# 细胞增殖调控与癌细胞

细胞增殖是生物繁殖和生长发育的基础，是细胞重大生命活动之一。细胞增殖是通过细胞周期来实现的，这是高度严格受控的细胞生命活动的全过程。为确保细胞增殖这一生命过程严格有序地进行，细胞内发展了一系列调控机制，在细胞周期不同阶段有一系列检验点对该过程进行严密监控。任何细胞，不管是简单的单细胞，还是高等生物体内的细胞，其增殖过程都必须遵循一定的规律。例如，遗传物质 DNA 在没有完全复制之前，细胞不能分裂；在 DNA 复制准备阶段尚未完成之前，DNA 不能起始复制等。在细胞增殖过程中，任何一个关键步骤的错误，都有可能引起严重后果，或者引发细胞癌变，或者导致细胞死亡。在高等生物中，细胞增殖调控更为复杂。它不仅要遵循细胞自身的增殖调控规律，同时还要服从生物体整体的调控。不然，不受约束而生成的细胞将被机体免疫系统所清除，或者癌变，转化为癌细胞。癌细胞不仅表现出增殖失控，同时还具有浸润和转移的特征，最终导致个体的死亡。

在本章我们将重点介绍细胞增殖调控的机制以及癌细胞的发生。

## 第一节 细胞增殖调控

人们开展细胞周期调控研究已有几十年历史。在

20 世纪五六十年代，S 期的发现和细胞周期中 4 个时相的划分，使细胞周期调控研究辉煌多时。最近 20 年，细胞周期调控研究再现辉煌，并取得了突飞猛进的发展，获得了许多突破性成果。

### 一、MPF 的发现及其作用

MPF，即卵细胞成熟促进因子 (maturation-promoting factor)，或细胞有丝分裂促进因子 (mitosis-promoting factor)，也称 M 期促进因子 (M-phase-promoting factor)。MPF 最早发现并被命名于 20 世纪 70 年代初期。随后的工作不仅逐步鉴定了 MPF 的构成，同时也逐步证明了其在细胞周期调控中的重要作用。

1970 年，R. T. Johnson 和 P. N. Rao 将 HeLa 细胞同步化在细胞周期中的不同时相，然后将 M 期细胞与其他间期细胞在仙台病毒介导下融合，并继续培养一定时间。他们发现，与 M 期细胞融合的间期细胞发生了形态各异的染色体凝缩，并称之为早熟染色体凝缩 (premature chromosome condensation, PCC)。此种染色体则称为早熟凝缩染色体。不同时期的间期细胞与 M 期细胞融合，产生的 PCC 的形态各不相同。G<sub>1</sub> 期 PCC 为细单线状，S 期 PCC 为粉末状，G<sub>2</sub> 期 PCC 为双线染色体状 (图 14-1)。PCC 的这种形态变化可能与 DNA 复制状态有关。早熟染色体凝缩在其他细胞中也被证明。M 期细胞可以诱导 PCC，提示在 M 期细胞中可能存在一种诱导染色体凝缩的因子，称为细胞有丝分裂促进因子。

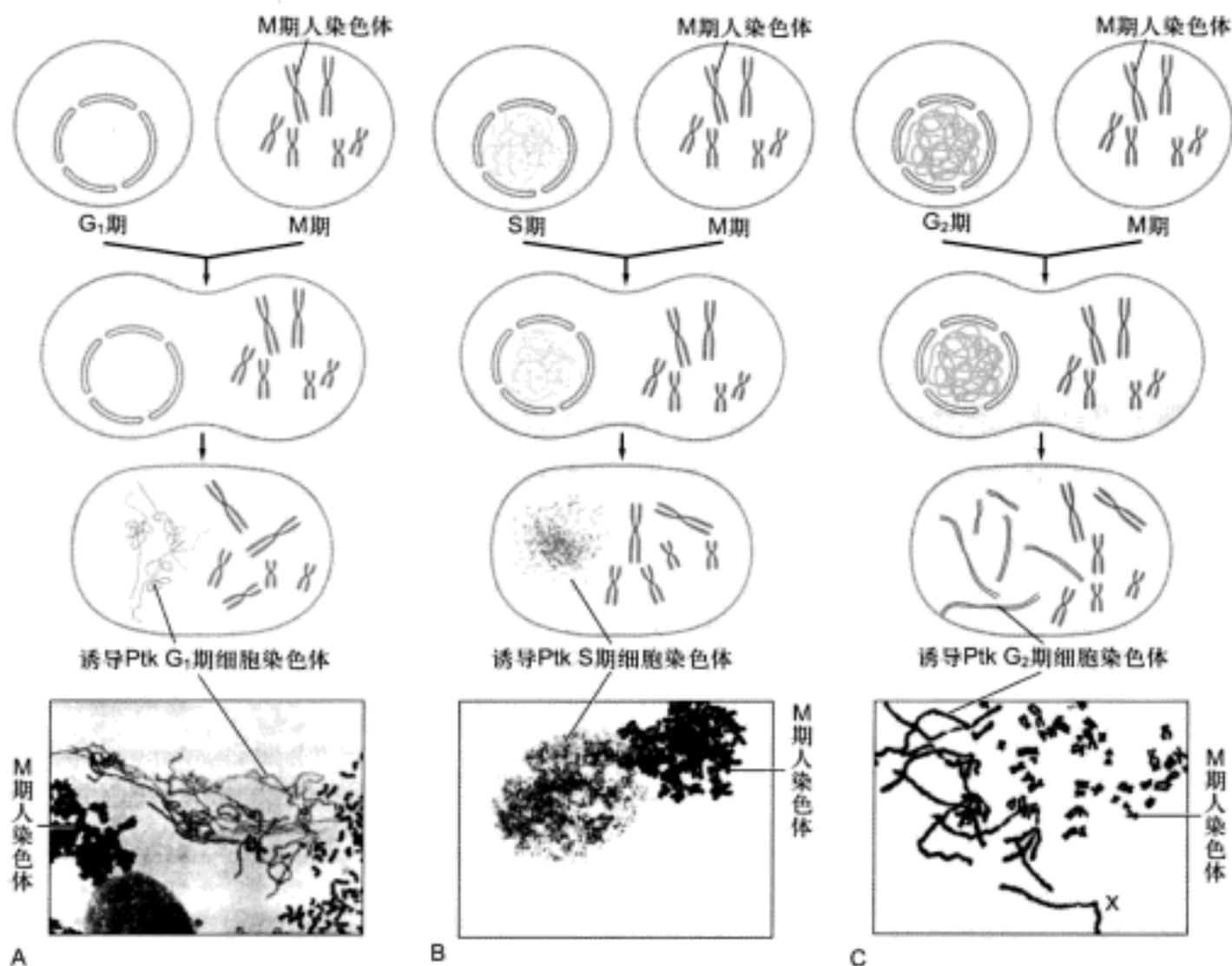


图 14-1 M 期细胞与 G<sub>1</sub>、S 和 G<sub>2</sub> 期细胞融合诱导早熟染色体凝缩

A. M 期细胞与 G<sub>1</sub> 期细胞融合。B. M 期细胞与 S 期细胞融合。C. M 期细胞与 G<sub>2</sub> 期细胞融合。(照片由 Potu N. Rao 博士惠赠)

1971 年, Y. Masui 和 C. L. Markert 用非洲爪蟾卵做实验, 明确提出了 MPF 这一概念。非洲爪蟾卵细胞发育过程可以划分为 6 个阶段, 即第 I、II、III、IV、V 和 VI 期。第 I 至 IV 期为卵母细胞生成和生长阶段。第 IV 期卵母细胞达到一定体积, 停止生长, 等待成熟。此时的卵母细胞处于减数第一次分裂前期阶段, 有一个体积较大的细胞核, 称为生发泡 (germinal vesicle, GV)。卵母细胞成熟需要孕酮的刺激。在孕酮作用下, 卵母细胞向 V 和 VI 期转化, 生发泡破裂 (GV broken down, GVBD), 染色体凝缩, 进行减数分裂 I; 然后立即进行减数分裂 II, 并停留在分裂中期 II, 即成熟的卵细胞 (第 VI 期卵细胞)。卵细胞受精后, 形成受精卵, 很快便开始卵裂 (图 14-2)。

Masui 和 Markert 用解剖方法分离第 IV 期卵母细胞, 并用孕酮进行体外刺激, 诱导卵母细胞成熟, 然后进行细胞质移植实验。他们发现, 将孕酮诱导成熟的卵细胞的细胞质注射到卵母细胞中, 可以诱导后者成熟; 再将后者的细胞质少量注射到一些新的卵母细胞中, 这些新

的卵母细胞仍被诱导成熟 (图 14-3)。因而他们认为, 在成熟的卵细胞的细胞质中, 必然有一种物质, 可以诱导卵母细胞成熟。他们将这种物质称作成熟促进因子, 即 MPF。

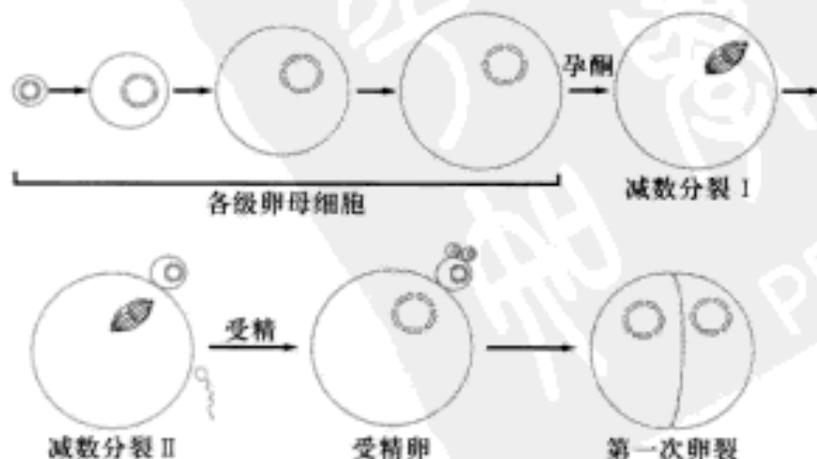


图 14-2 非洲爪蟾卵细胞成熟过程、受精和第一次卵裂示意图

非洲爪蟾卵母细胞成熟过程可人为地划分为 6 个时期。第 I 至 IV 期为各级生长卵母细胞。第 IV 期卵母细胞在孕酮作用下向第 V 和第 VI 期转化, 随即开始减数分裂 I 和 II。成熟卵细胞受精后, 便开始第一次卵裂。

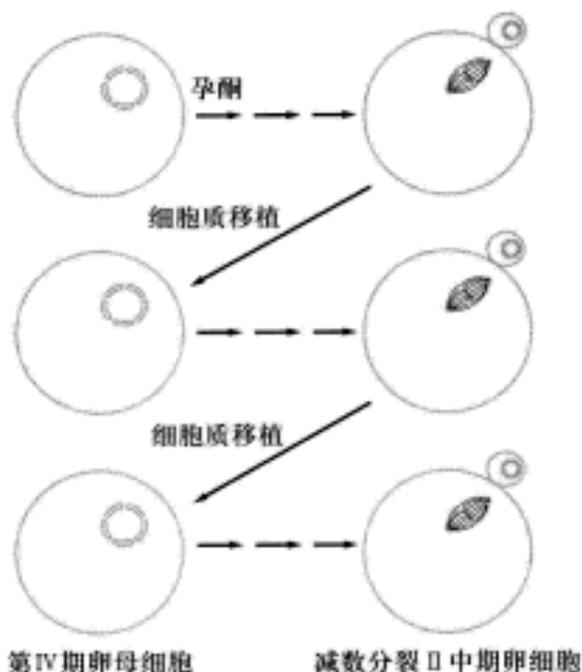


图 14-3 成熟卵细胞细胞质移植发现 MPF 的存在

进一步研究发现，用孕酮诱导卵母细胞成熟，卵母细胞需要进行一定程度的蛋白质合成。在有蛋白质合成抑制剂存在的情况下，孕酮不能诱导卵母细胞成熟。成熟卵细胞的细胞质诱导卵母细胞成熟，则不需要蛋白质合成；在蛋白质合成抑制剂存在的情况下，也可以诱导卵母细胞成熟。这些实验结果提示，在成熟卵细胞中，MPF 已经存在，只是处于非活性状态，被称为前体 MPF (pre-MPF)。非活性态的前体 MPF 通过翻译后修饰，可以转化为活性态的 MPF。

MPF 被发现以后，不少学者便着手 MPF 的纯化工作，但一直进展缓慢，直到 1988 年，James Maller 实验室的 Lohka 等人以非洲爪蟾卵为材料，分离获得了微克级的纯化 MPF，并证明其主要含有 p32 和 p45 两种蛋白。p32 和 p45 结合后，表现出蛋白激酶活性，可以使多种蛋白质底物磷酸化。因而证明，MPF 是一种蛋白激酶。

## 二、p34<sup>cdc2</sup> 激酶的发现及其与 MPF 的关系

在研究 MPF 工作的同时，另一批生物学家则以酵母为材料，从另一个侧面对细胞周期调控进行着深入研究。以 L. Hartwell 为代表的酵母遗传学家在不同温度条件下培养芽殖酵母，分离获得了数十个温度敏感型突变株 (temperature-sensitive mutants, *ts*)。对芽殖酵母来说，允许温度 (permissive temperature) 常为 20~23℃，限定温度 (restrictive temperature) 通常为 35~37℃。突变

株最基本的特点是，在允许温度条件下，可以正常分裂繁殖，而在限定温度条件下，则不能正常分裂繁殖。这种在限定温度下失去正常分裂繁殖能力的现象，是由于某个基因发生突变而引起的。不同的突变株，发生突变的基因不同；在限定温度下，细胞在细胞周期中所停留的时相以及细胞所表现出的形态结构也常常是不同的，因而可以对不同突变株的基因变化和基因表达进行综合分析。以 Paul Nurse 为代表的另一批酵母生物学家在不同温度下培养裂殖酵母细胞，也分离出了数十个温度敏感型突变株。和芽殖酵母类似，在限定温度下，不同突变株的某个基因也发生了突变，其细胞停留在细胞周期中的某个特定时相。*cdc* 基因调控酵母细胞分裂和细胞周期，根据 *cdc* 基因被发现的先后顺序等，对这些基因进行了命名，如 *cdc2*、*cdc25*、*cdc28* 等，尽管当时 *cdc* 基因尚未被分离出来。

*cdc2* 基因是裂殖酵母细胞中最重要的基因之一。*cdc2* 基因突变导致细胞停留在 G<sub>2</sub>/M 期交界处。*cdc2* 基因也是第一个被分离出来的 *cdc* 基因。它的表达产物为一种相对分子质量为 3.4 × 10<sup>4</sup> 的蛋白质，被称为 p34<sup>cdc2</sup>。进一步研究发现，p34<sup>cdc2</sup> 具有蛋白激酶活性，可以使多种蛋白底物磷酸化，因而又被称为 p34<sup>cdc2</sup> 激酶。p34<sup>cdc2</sup> 激酶在裂殖酵母细胞周期调控过程中，起着关键性作用。在芽殖酵母中也有一个关键性的 *cdc* 基因，称为 *cdc28*。*cdc28* 基因突变，芽殖酵母细胞或者停留在 G<sub>1</sub>/S 期交界处，或者停留在 G<sub>2</sub>/M 期交界处。*cdc28* 基因是继 *cdc2* 基因之后，第二个被分离出来的 *cdc* 基因。*cdc28* 基因产物也是一种相对分子质量为 3.4 × 10<sup>4</sup> 的蛋白质，称为 p34<sup>cdc28</sup>。p34<sup>cdc28</sup> 也是一种蛋白激酶，在 G<sub>2</sub>/M 期转换过程中起着中心调节作用，因而是 p34<sup>cdc2</sup> 的同源物。同时，p34<sup>cdc28</sup> 对 G<sub>1</sub>/S 期转换，也是必需的。更进一步的研究发现，不管是 p34<sup>cdc2</sup>，还是 p34<sup>cdc28</sup>，其本身并不具有激酶活性，只有当其与有关蛋白质结合后，其激酶活性才能够表现出来。例如，p34<sup>cdc2</sup> 必须和另一种蛋白质 p56<sup>cdc13</sup> 结合，才具有激酶活性。

知道 p34<sup>cdc2</sup> 与 MPF 都具有激酶活性并能够促进 G<sub>2</sub>/M 期转换以后，人们不禁要问，p34<sup>cdc2</sup> 和 MPF 有何关系呢？当 MPF 的基本构成被确认以后，James Maller 实验室和 Paul Nurse 实验室立即开始合作，很快便证明 MPF 中的 p32 可以被 p34<sup>cdc2</sup> 特异抗体所识别，并且 p34<sup>cdc2</sup> 多肽片段可以增强 MPF 活性，表明二者为同源物。其同源性又被后来的序列分析进一步证明。了解 p32

与 p34<sup>cdc2</sup> 以后, 人们进一步提出, 蛙 MPF 的 p45 和酵母的 p56<sup>cdc13</sup> 是否也有一定关系呢?

在开展上述工作的同时, 以 Tim Hunt 为代表的另一些科学家以海胆卵为材料, 对细胞周期调控进行了深入的研究。J. R. Evans 等人于 1983 年报道, 在海胆卵细胞中存在有两种特殊蛋白质。这两种蛋白质的含量随细胞周期进程变化而变化, 一般在细胞间期内积累, 在细胞分裂期内消失, 在下一个细胞周期中又重复这一消长现象, 因而他们将这两种蛋白质命名为周期蛋白 (cyclin)。随后, 这些周期蛋白很快便被分离和克隆出来, 并被证明广泛存在于从酵母到人类等各种真核生物中。进一步研究证明, 周期蛋白为诱导细胞进入 M 期所必需。而且, 各种生物之间的周期蛋白在功能上有着广泛的互补性。将海胆 cyclin B 的 mRNA 引入到非洲爪蟾卵非细胞体系中, 其翻译产物可以诱导该非细胞体系进行多次细胞周期循环。将一种基因工程表达的抗降解的 cyclin  $\Delta 90$  引入非洲爪蟾卵非细胞体系或直接显微注射到非洲爪蟾卵细胞中, 可以稳定 MPF 活性。所有这些实验结果均提示周期蛋白可能参与 MPF 的功能调节。当 MPF 被提纯以后, James Maller 实验室和 Tim Hunt 实验室立即开始合作, 并很快证明 MPF 的另一种主要成分为 cyclin B。序列分析证明, cyclin B 与酵母的 p56<sup>cdc13</sup> 为同源物。至此, MPF 的生化成分便被确定下来, 它含有两个亚单位, 即 cdc2 为其催化亚单位, 周期蛋白为其调节亚单位。当二者结合后, 表现出蛋白激酶活性。

### 三、周期蛋白

自 1983 年首次发现周期蛋白后, 许多科学家纷纷开展周期蛋白研究。在短短的十年间, 人们便从各种生物体中克隆分离了数十种周期蛋白, 如酵母的 Cln1、Cln2、Cln3、Clb1~Clb6, 高等动物的周期蛋白 A1、A2、B1、B2、B3、C、D1、D2、D3、E1、E2、F、G、H、L1、L2、T1、T2 等。目前在人体中已经发现 25 种周期蛋白。这些周期蛋白在细胞周期内表达的时相有所不同, 所执行的功能也多种多样。这些周期蛋白有的在 G<sub>1</sub> 期表达并只在 G<sub>1</sub> 期和 S 期转化过程中执行调节功能, 所以常被称为 G<sub>1</sub> 期周期蛋白, 如 cyclin C、D、E、Cln1、Cln2、Cln3 等; 有的虽然在间期表达和积累, 但到 M 期时才表现出调节功能, 所以常被称为 M 期周期蛋白, 如 cyclin A、B 等。G<sub>1</sub> 期周期蛋白在细胞周期中

存在的时间相对较短。M 期周期蛋白在细胞周期中则相对稳定。

各种周期蛋白之间有着共同的分子结构特点, 但也各有特性。首先, 它们均含有一段相当保守的氨基酸序列, 称为周期蛋白框 (cyclin box) (图 14-4)。周期蛋白框约含 100 个氨基酸残基, 其功能是介导周期蛋白与 CDK 结合。不同的周期蛋白框识别不同的 CDK, 组成不同的 cyclin-CDK 复合体, 表现出不同的 CDK 活性。M 期周期蛋白的分子结构还有另一个特点, 在这些蛋白质分子的近 N 端含有一段由 9 个氨基酸残基组成的特殊序列 (RXXLGXIXN, 其中 X 代表可变性氨基酸), 称为破坏框 (destruction box)。在破坏框之后, 为一段约 40 个氨基酸残基组成的赖氨酸富集区。破坏框主要参与泛素依赖性的 cyclin A 和 B 的降解。G<sub>1</sub> 期周期蛋白分子中不含破坏框, 但其 C 端含有一段特殊的 PEST 序列。据认为, PEST 序列与 G<sub>1</sub> 期周期蛋白的更新有关。

不同的周期蛋白在细胞周期中表达的时期不同, 并与不同的 CDK 结合, 调节不同的 CDK 活性。图 14-5 显示了几种周期蛋白在哺乳动物细胞和酵母细胞中的表达和积累状况。在哺乳动物细胞中, cyclin A 在 G<sub>1</sub> 期的早期即开始表达并逐渐积累, 到达 G<sub>1</sub>/S 期交界处, 其含量达到最大值并一直维持到 G<sub>2</sub>/M 期。cyclin B 则从 G<sub>1</sub> 期晚期开始表达并逐渐积累, 到 G<sub>2</sub> 期后期阶段达到最大值并一直维持到 M 期的中期阶段, 然后迅速降解。作为 G<sub>1</sub> 期周期蛋白的 cyclin D 在细胞周期中持续表达, 而 cyclin E 则在 M 期的晚期和 G<sub>1</sub> 期早期开始表达并逐渐积累, 到达 G<sub>1</sub> 期的晚期, 其含量达到最大值, 然后逐渐下降, 到达 G<sub>2</sub> 期的晚期, 其含量降到最低值。在

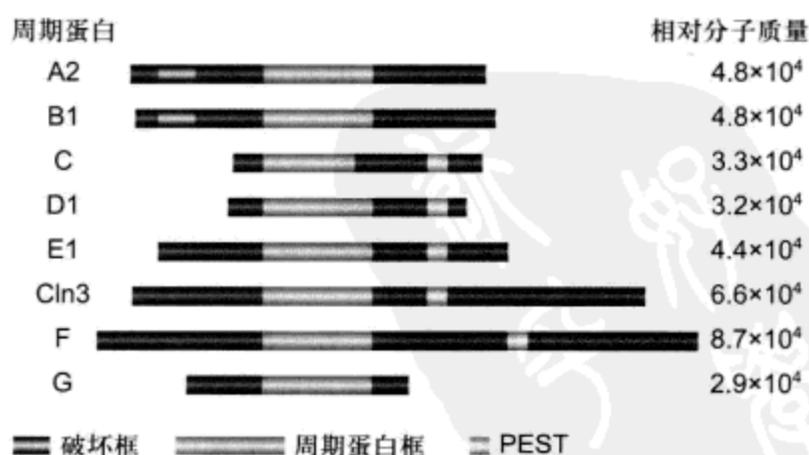


图 14-4 部分周期蛋白分子结构特征

图中显示的, 除 Cln3 外, 均为人类的周期蛋白分子。所有这些分子均含有一个周期蛋白框。M 期周期蛋白 (A2、B1) 分子的 N 端含有一个破坏框。G<sub>1</sub> 期周期蛋白的 C 端含有一个 PEST 序列。

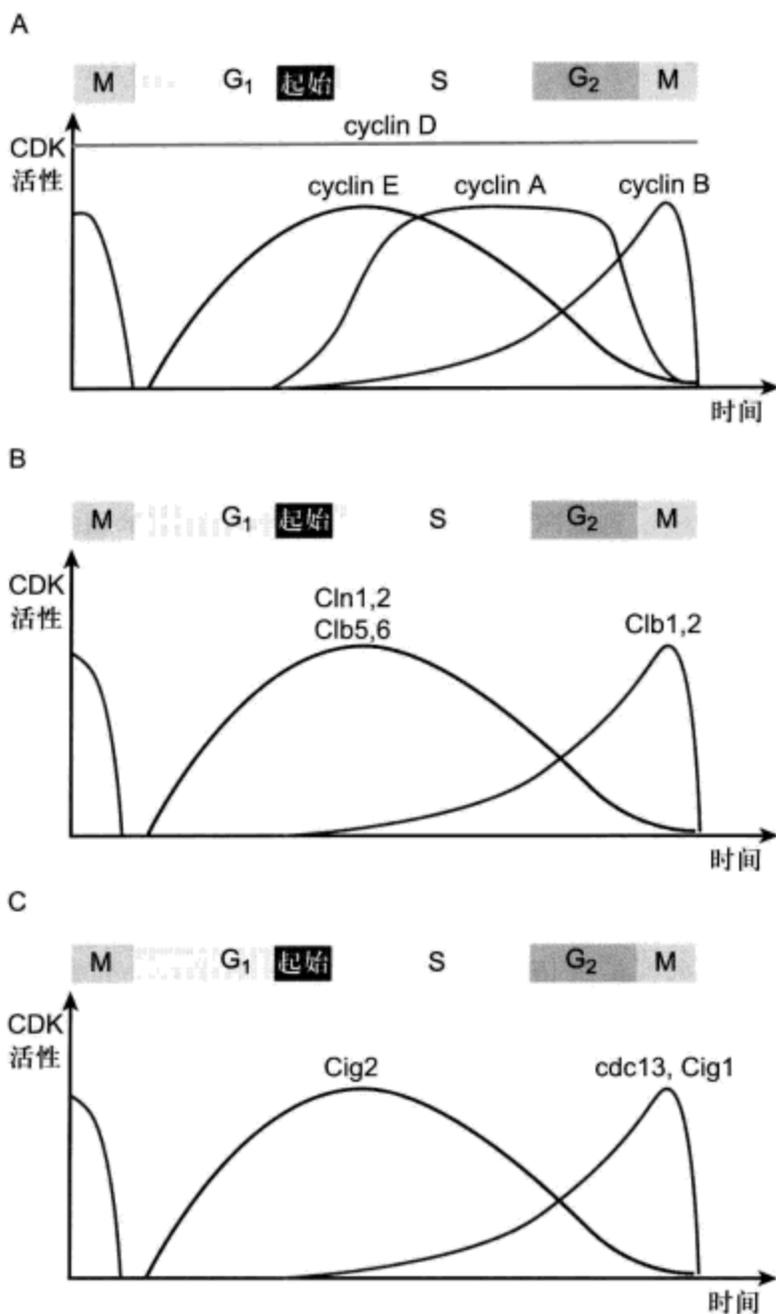


图 14-5 部分哺乳动物和酵母细胞周期蛋白在细胞周期中的积累及其与 CDK 活性的关系

A. 哺乳动物细胞周期。B. 芽殖酵母细胞周期。C. 裂殖酵母细胞周期。

裂殖酵母和芽殖酵母中，周期蛋白含量的消长情况与哺乳动物细胞中的有许多相似之处。作为 M 期周期蛋白，芽殖酵母中的 Clb1、Clb2 和裂殖酵母中的 cdc13、Cig1 均在 G<sub>1</sub> 期的后期开始表达，到 G<sub>2</sub> 期达到最大值，到达 M 期中期后则迅速消失。作为 G<sub>1</sub> 期周期蛋白，芽殖酵母中的 Cln1、Cln2 和裂殖酵母中的 Cig2 则在 M 期的后期开始表达，到达 G<sub>1</sub> 期后期的“起始点”前，其含量达到最大值，然后逐渐降低，到达 G<sub>2</sub> 期时降到最低值。另外，在裂殖酵母中还发现其他两种 B 类周期蛋白 Clb3、Clb4。二者的表达早于 Clb1 和 Clb2。但对其功能尚了解不多。有人推测它们可能在 G<sub>1</sub>/S 期转化和 S 期中起调节作用。

对于其他种类的周期蛋白的功能研究，有的已经取得重要进展，有的尚在积极研究之中。

#### 四、CDK 和 CDK 抑制因子

当酵母 *cdc2* 和 *cdc28* 基因被分离出来后，几个实验室便立即着手 *cdc2* 或 *cdc28* 类同基因的分离工作。他们首先通过 PCR 技术构建了人类、非洲爪蟾和果蝇的 cDNA 文库，然后对 cDNA 文库进行筛选。结果成功分离到了十多个 *cdc2* 相关基因。通过基因序列和蛋白质功能分析，证明有的确实是 *cdc2* 类同基因，与酵母 *cdc2* 基因相比较，不仅同源性强，在蛋白质功能方面也有很强的互补性。也有的不仅在序列方面与 *cdc2* 有一定差异，在蛋白质功能方面也表现出一定的特殊性。但是，它们又含有两个共同的特点：一个是它们含有一段类似的氨基酸序列，另一个是它们都可以与周期蛋白结合，并以周期蛋白作为调节亚单位，进而表现出蛋白激酶活性。因而，它们被统称为周期蛋白依赖性蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK)。目前在人体中已发现并被命名的 CDK 包括 *cdc2*、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK8、CDK9、CDK10、CDK11、CDK12、CDK13 等。由于 *cdc2* 第一个被发现，而其他几个 CDK 则是通过与其相比较而得来，因而 *cdc2* 激酶被命名为 CDK1。不同的 CDK 所结合的周期蛋白不同，在细胞周期中执行的调节功能也不相同。对不同的 CDK 的功能认识，有的比较清楚，有的正在深入。某些 CDK 与周期蛋白的配对关系，见表 14-1。

各种 CDK 分子均含有一段类似的 CDK 激酶结构域 (CDK kinase domain)。与 CDK1 激酶结构域相比，其它几种 CDK 激酶结构域的保守程度有所不同 (图 14-6)。但是，在 CDK 激酶结构域中，有一小段序列则相当保守，即 PSTAIRE 序列。据认为，此序列与周期蛋白结合有关。此外，在 CDK 分子中也发现一些重要位点。对这些位点进行磷酸化修饰，将对 CDK 活性起重要调节作用。细胞内存在多种因子，对 CDK 分子结构进行修饰，参与 CDK 活性的调节。

除周期蛋白和上述修饰性调控因子对 CDK 活性进行调控之外，细胞内还存在一些对 CDK 活性起负调控的蛋白质，称为 CDK 抑制因子 (cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)。到目前为止，已经发现多种对 CDK 起负调控作用的 CKI，分别归为 Cip/Kip 家族和 INK4 家族。Cip/Kip 家族成员主要包括 p21<sup>Cip/WAF1</sup>、p27<sup>Kip1</sup> 和

表 14-1 某些 CDK 与周期蛋白的配对关系及执行功能的时期

CDK 种类	可能结合的周期蛋白	执行功能的可能时期
CDK1(p34 <sup>cdc2</sup> )	A, B1, B2, B3	G <sub>2</sub> /M
CDK2	A, D1, D2, D3, E	G <sub>1</sub> /S, S
CDK3		G <sub>1</sub> /S
CDK4	D1, D2, D3	G <sub>1</sub> /S
CDK5	D1, D3	
CDK6	D1, D2, D3	G <sub>1</sub> /S
CDK7	H	
CDK8	C	
CDK9	T1, T2a, T2b, K	
CDK10		G <sub>2</sub> /M
CDK11p58		G <sub>2</sub> /M
CDK11p110		
CDK12L	L1, L2	
CDK12S	L1, L2	

p57<sup>Kip2</sup>, 其中 p21<sup>Cip/WAF1</sup> 为此家族的典型代表。p21 主要对 G<sub>1</sub> 期 CDK (CDK2、CDK3、CDK4 和 CDK6) 起抑制作用。p21 还可以与 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 直接结合。PCNA 是 DNA 聚合酶  $\delta$  的辅助因子, 为 DNA 复制所必需。p21 与 PCNA 结合, 可以直接抑制 DNA 复制。INK4 家族成员主要包括 p16、p15、p18 和 p19 等, p16 为此家族的典型代表。p16 主要抑制 CDK4 和 CDK6 活性。

## 五、细胞周期运转调控

目前已经公认, CDK 对细胞周期运行起着核心性调控作用, 因此将其称为周期引擎分子 (engine molecule)。不同种类的周期蛋白与不同种类的 CDK 结合, 构成不同的 CDK。不同的 CDK 在细胞周期的不同时期表现活性, 因而对细胞周期的不同时期进行调节。例如, 与 G<sub>1</sub> 期周期蛋白结合的 CDK 在 G<sub>1</sub> 期起调节作用, 与 M 期周期蛋白结合的 CDK 在 M 期起调节作用。

### (一) G<sub>2</sub>/M 期转化与 CDK1 的关键性调控作用

如上所述, CDK1 即 MPF, 或 p34<sup>cdc2</sup> 激酶, 由 p34<sup>cdc2</sup> (或 p34<sup>cdc28</sup>) 蛋白和 cyclin B 结合而成。p34<sup>cdc2</sup> 蛋白在细胞周期中的含量相对稳定, 而 cyclin B 的含量

CDK 蛋白	CDK 激酶结构域	与 CDK1 序列相似度百分比
CDK1(cdc2)	PSTAIRE	100%
CDK2	PSTAIRE	65%
CDK3	PSTAIRE	66%
CDK4	PV/STVRE	44%
CDK5	PSSALRE	57%
CDK6	PLSTIRE	47%
CDK7(p40 <sup>MO15</sup> )	NRTAIRE	40%

图 14-6 通过 PCR 技术测定与 CDK1 类似的 CDK 蛋白分子图解

图中以 CDK1 (cdc2) 氨基酸序列为标准 (100%), 将其他 CDK 激酶结构域的氨基酸序列与其比较, 得到序列相似度百分比。

则呈现周期性变化。p34<sup>cdc2</sup> 蛋白只有与 cyclin B 结合后才有可能表现出激酶活性。因而, CDK1 活性首先依赖于 cyclin B 含量的积累。cyclin B 一般在 G<sub>1</sub> 期的晚期开始合成, 通过 S 期, 其含量不断增加, 到达 G<sub>2</sub> 期, 其含量达到最大值。随 cyclin B 含量积累到一定程度, CDK1 活性开始出现。到 G<sub>2</sub> 期晚期阶段, CDK1 活性达到最大值并一直维持到 M 期的中期阶段。CDK1 活性和 cyclin B 含量的关系见图 14-7。cyclin A 也可以与 CDK1 结合成复合体, 表现出 CDK1 活性。

CDK1 通过使某些底物蛋白磷酸化, 改变其下游的某些靶蛋白的结构和启动其功能, 实现其调控细胞周期的作用。CDK1 催化底物磷酸化有一定的位点特异性, 即选择底物中某个特定序列中的某个丝氨酸或苏氨酸残基。CDK1 可以使多种底物蛋白磷酸化, 其中包括组蛋白 H1, 核纤层蛋白 A、B、C, 核仁蛋白 (nucleolin), No38, p60<sup>c-Src</sup>, C-abl 等 (表 14-2)。组蛋白 H1 磷酸化, 促进染色质凝缩; 核纤层蛋白磷酸化, 促使核纤层

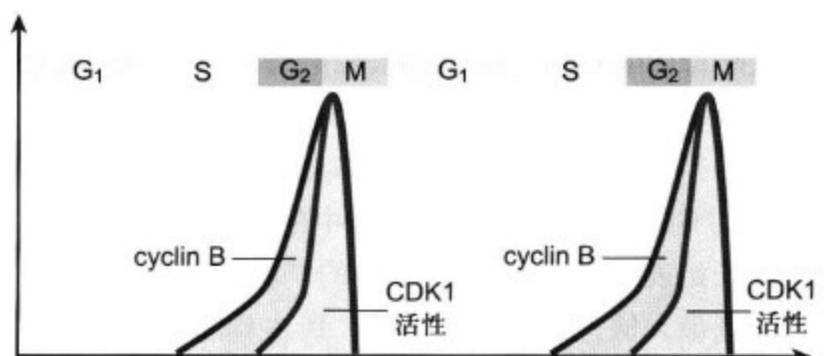


图 14-7 cyclin B 在 CDK1 活性调节过程中的作用

CDK1 活性首先依赖于 cyclin B 含量的积累。cyclin B 的含量达到一定值并与 CDK 蛋白结合, 同时其他一些因素的调节下, 逐渐表现出最高激酶活性。

解聚；核仁蛋白磷酸化，促使核仁解体；p60<sup>c-Src</sup> 蛋白磷酸化，促使细胞骨架重排；C-abl 蛋白磷酸化，促使细胞形态调整等。

CDK 活性受到多种因素的综合调节。周期蛋白与 CDK 结合是激活 CDK 活性的先决条件。但是，仅周期蛋白与 CDK 结合，并不能使 CDK 激活。还需要其他几个步骤的修饰，才能表现出激酶活性。首先，当周期蛋白与 CDK 结合形成复合物后，wee1/mik1 激酶和 CDK 活化激酶 (CDK1-activating kinase) 催化 CDK 第 14 位的苏氨酸 (Thr14)、第 15 位的酪氨酸 (Tyr15) 和第 161 位的苏氨酸 (Thr161) 磷酸化。但此时的 CDK 仍不表现激酶活性 (称为前体 MPF)。然后，CDK 在蛋白磷酸水解酶 cdc25C 的催化下，使其 Thr14 和 Tyr15 去磷酸化，才能表现出激酶活性。CDK1 活性

调控见图 14-8。

在体外培养的细胞和单细胞生物中，CDK 活性是细胞生命活动所需要的。解除 CDK 活性，往往导致细胞生命活动停滞和死亡。但在小鼠中，敲除一些被认为是细胞生命活动所必需的 CDK 活性，如 CDK2、CDK4、CDK6、cyclin A、cyclin E、cyclin D 等，动物可以存活，因而推测 CDK 之间可以代偿一些功能。CDK 活性敲除实验也揭示了 CDK 在个体发育等方面的功能。例如，CDK4 敲除小鼠个体矮小，内分泌组织发育不良，导致糖尿病和不育等。CDK6 敲除小鼠个体不正常，脾和胸腺发育不全，某些 T 淋巴细胞类群对抗原的应答滞后等。CDK2 敲除小鼠不育。由此可见，细胞周期调控因子对生物体个体和器官的发育也起着重要调节作用。

表 14-2 某些 CDK1 底物及其磷酸化后可能产生的生理效应

CDK1 底物	序列	M 期的可能作用
核纤层蛋白 B	PLSPTR	核纤层解聚，核膜崩解
核纤层蛋白 A	TLSPTR	核纤层解聚，核膜崩解
核纤层蛋白 C	—	核纤层解聚，核膜崩解
核纤层 L67 (clam)	SPTR	核纤层解聚，核膜崩解
波形蛋白	—	分裂期中间纤维体系再调整
微管结合蛋白 MAP-220	SSPGG	使其失去刺激微管组装作用
组蛋白 H1	—	染色体凝缩
p60 <sup>c-Src</sup>	K/RS/TPXK	进一步磷酸化其他物质 (细胞骨架重排)
No38	QTPNK	核仁分解；抑制核糖体合成?
核仁蛋白	TPXKK	核仁分解；抑制核糖体合成?
cyclin B	TPXKK	调节 CDK1 活性
EF-1b, EF-1r	—	翻译抑制
SV40T	—	—
p53	HSTPPKKRKRK	影响其亚细胞定位
C-abl	SSSPQK	调节细胞形态
C-myb	APDTPEL	降低与 DNA 结合能力
钙调蛋白结合蛋白 (caldesmon)	PAVSPLL	降低与 actin 结合，从微丝上游离下来
肌球蛋白	S/TPXK/R	抑制胞质分裂
GTP 结合蛋白	SP/TP	抑制细胞内物质运输
HMG1	ser1, 2; Thr9 KIQSTPVK; RSPR ZPSZTPK	降低与 DNA 结合能力

催化位点通式: S/TPXZ。S/T: Ser/Thr; X: 一种极性氨基酸残基; Z: 一般为一种碱性氨基酸残基。斜体字母表示磷酸化氨基酸残基位点。

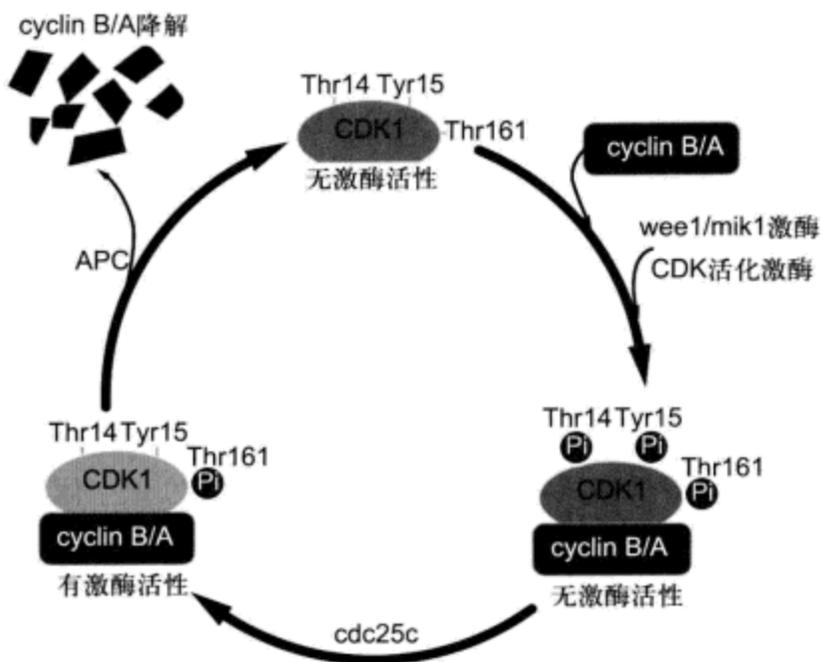


图 14-8 CDK1 激酶活性综合调控示意图

## (二) M 期周期蛋白与细胞分裂中期向后期转换

细胞周期运转到分裂中期后，M 期 cyclin A 和 B 将迅速降解，CDK1 活性丧失，上述被 CDK1 磷酸化的靶蛋白去磷酸化，细胞周期便从 M 期中期向后期转化。目前已经知道，cyclin A 和 B 的降解是通过泛素化依赖途径实现的。

如前所述，伴随 cyclin-CDK 复合物形成，CDK 亚基 Thr14、Tyr15 和 Thr161 残基磷酸化，以及 Thr14 和 Tyr15 去磷酸化，cyclin-CDK 复合物激酶活性表现出来，Thr161 位点保持磷酸化状态是 CDK1 活性表现所必需的（图 14-8）。有丝分裂中期过后，周期蛋白与 CDK 分离，在 APC 的作用下，M 期 cyclin A 和 B 通过泛素化依赖途径被蛋白酶体降解（参见图 7-2 由泛素和蛋白酶体所介导的蛋白降解途径）。M 期周期蛋白在泛素化途径降解过程中，其分子中的破坏框起着重要的调节作用。用基因突变方法将破坏框去除，所得到的突变分子将不能被泛素化途径所降解，因而可以较长时间地保持活性。

1995 年，两个实验室率先分离并部分纯化了具有 E3 活性的蛋白质复合物。首先，V. Sudakin 等人在青蛙卵中分离到了一个  $1.5 \times 10^6$  的蛋白质复合物，称为 cyclo-some。在 E1、E2、泛素和 ATP 再生体系存在的情况下，cyclo-some 可以在体外将 cyclin A 和 B 通过泛素化途径降解。几乎与此同时，King 等人在非洲爪蟾卵中分离到了一个 20 S 的蛋白质复合物，即后期促进因子复合物（APC），也支持 cyclin B 通过泛素化途径

体外降解。此后证明，cyclo-some 和后期促进因子复合物为同源物，而“后期促进因子复合物”这一名词则更为应用，其简称为“APC”。APC 的发现是细胞周期研究领域中的一大进展，表明细胞分裂中期向后期转换也受到精密调控。进一步研究证明，APC 至少有 15 种成分组成，分别称为 APC1~APC15。这些蛋白质成分在不同物种中大部分已鉴定出来，如在人体中已鉴定了 APC1~APC8，APC10~APC13，以及 cdc26 等 13 种，在芽殖酵母和裂殖酵母中也已分别鉴定出了 13 种 APC 成分。在不同物种中鉴定的 15 种成分中，有的为过去已知的成分，如 cdc16、cdc23、cdc27 和 BimE 等，有的为未知成分。Tugendreich 等人（1995）克隆了人类的 *cdc16* 和 *cdc27* 基因，并证明 cdc16Hs 和 cdc27Hs 蛋白位于哺乳动物细胞的中心体和纺锤体上。用抗 cdc27Hs 的抗体进行显微注射，可以将细胞抑制在分裂中期。在非洲爪蟾体系中，用抗 cdc27Hs 的抗体处理上述 20 S 的 APC，可以使 APC 的泛素化活性丧失。在 Kim Nasmyth 实验室工作的另一些科学家则在芽殖酵母细胞中证明，cdc16 和 cdc23 也为 cyclin B 的降解所必需。*BimE* 基因最早发现于构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）温度敏感突变株 *BimE7*。*BimE7* 细胞在正常温度下可以正常生活，若放到限定温度下培养，*BimE7* 基因会发生突变，引起细胞早熟性地进入分裂期。即使用药物处理，将细胞先抑制在 S 期，然后再放到限定温度下培养，也会引起细胞早熟性地进入分裂期，说明 *BimE* 是一种细胞分裂负调控因子。对 *BimE* 的确切作用机制，目前尚不甚清楚。APC 除了调节 M 期周期蛋白泛素化依赖降解途径外，还调节其他一些与细胞周期调控有关的非周期蛋白类蛋白质的降解，如裂殖酵母中的 Cut2 和芽殖酵母中的 Pds1p 等。已知 Cut2 和 Pds1p 均为细胞分裂由中期向后期转换的负调控因子。

了解 APC 活性变化是认识细胞周期由分裂中期向后期转换的关键问题之一。APC 活性受到多种因素的综合调节。目前已知，细胞中存在正、负两类 APC 活性调节因子。激活 APC 的正调控因子有 cdc20/Fizzy 和 Cdh1/Fzy 等，负调控因子有 Emi1、Emi2、Mad2、BubR1 等。首先，已知各类 APC 在分裂间期中表达，但只有到达 M 期后才表现出活性，提示 M 期 CDK 激酶活性可能对 APC 的活性起着调节作用。体外实验显示，APC 可以被活化的 M 期 CDK 所激活，且多种 APC 作为底物被 M 期 CDK 磷酸化；而活化的 APC 则可以被

蛋白磷酸水解酶作用而失活。其次发现, *cdc20* 为 APC 有效的正调控因子。*cdc20* 主要位于染色体动粒上, 为姐妹染色单体分离所必需。APC 活性亦受到纺锤体组装检验点 (spindle assembly checkpoint) 的调控。纺锤体组装不完全, 或所有动粒不能被动粒微管全部捕捉, APC 则不能被激活。目前已经知道, 在纺锤体组装调控过程中, Mad2 (mitosis arrest deficient 2) 蛋白起着重要作用。正常情况下, Mad2 定位在早中期和错误排列的中期染色体的动粒上, 纺锤体组装不完全, 动粒不能被动粒微管捕捉, Mad2 则不能从动粒上解离下来。因此, Mad2 蛋白为细胞延迟进入后期提供了一种“等待”信号。Mad2 与 *cdc20* 结合, 有效地抑制 *cdc20* 的活性。当纺锤体组装完成以后, 动粒全部被动粒微管捕捉, Mad2 从动粒上消失, 从而解除对 *cdc20* 的抑制作用, 促使 APC 活化, 导致 M 期周期蛋白降解, M-CDK 活性丧失; 在酵母细胞中, 促使 Cut2/Pds1p 降解, 解除其对姐妹染色单体分离的抑制, 细胞则由中期向后期转化。

### (三) $G_1/S$ 期转化与 $G_1$ 期周期蛋白依赖性 CDK

细胞由  $G_1$  期向 S 期转化是细胞增殖过程中的关键事件之一。细胞能否成功地实现由  $G_1$  期向 S 期转化, 标志着该细胞能否完成其 DNA 复制和其他相关生物大分子的合成, 进而完成细胞分裂。目前一般认为, 细胞由  $G_1$  期向 S 期转化主要受  $G_1$  期周期蛋白依赖性 CDK 所控制。在哺乳动物细胞中,  $G_1$  期周期蛋白主要包括 cyclin D、E, 或许还有 cyclin A。与  $G_1$  期周期蛋白结合的 CDK 主要包括 CDK2、CDK4 和 CDK6 等。cyclin D 主要与 CDK4 和 CDK6 结合并调节后者的活性, 而 cyclin E 则与 CDK2 结合。cyclin A 常被认为属 M 期周期蛋白, 但 cyclin A 也可与 CDK2 结合使后者表现激酶活性, 提示 cyclin A 可能参与调控  $G_1/S$  期转化过程。

目前已知哺乳动物细胞中表达 3 种 cyclin D, 即 D1、D2 和 D3, 但三者的表达有细胞和组织特异性。据推测, 在快速增殖的细胞中至少表达一种 cyclin D。一般情况下, 一种细胞仅表达两种 cyclin D, 即 D3 和 D1 或 D2。在细胞水平上所做的实验, 包括特异的抗 cyclin D 的抗体显微注射和反义 RNA 显微注射等, 显示 cyclin D 为细胞  $G_1/S$  期转化所必需。cyclin D-CDK4 和 cyclin D-CDK6 不能使组蛋白 H1 磷酸化。对 cyclin D-CDK 的底物仍已知甚少, 目前仅知道 Rb 蛋白

(retinoblastoma protein, 成视网膜细胞瘤蛋白) 为其底物。Rb 蛋白是 E2F 的抑制因子, 在哺乳类  $G_1$  期细胞中起“刹车”作用, 因此 Rb 蛋白是  $G_1/S$  期转化的负调控因子, 在  $G_1$  期的晚期阶段通过磷酸化而失活。

cyclin E 是哺乳类细胞中表达的另一种  $G_1$  期周期蛋白。它在  $G_1$  期的晚期开始合成, 并一直持续到细胞进入 S 期。当细胞进入 S 期后, cyclin E 很快即被降解。cyclin E 与 CDK2 结合形成复合物, 呈现 CDK2 活性。因而, cyclin E-CDK2 活性峰值时间为  $G_1$  期晚期到 S 期的早期阶段。大量实验显示, cyclin E-CDK2 活性为 S 期启动所必需。在果蝇胚胎发育过程中, 如果将 cyclin E 进行基因突变, 该胚胎的细胞则被阻止在  $G_1$  期。将抗 cyclin E 的特异抗体做细胞显微注射, 被注射的细胞便停留在  $G_1$  期。用非洲爪蟾卵提取物进行细胞核重建和 DNA 复制实验, 如果事先将 cyclin E 从卵提取物中用免疫沉淀方法去除, 重建的细胞核不能复制 DNA。在哺乳动物细胞中, TGF- $\beta$  是一种生长抑制因子。有实验表明, cyclin E-CDK2 是 TGF- $\beta$  作用的主要靶酶。TGF- $\beta$  可以有效地抑制 cyclin E-CDK2 活性, 进而将细胞阻止在  $G_1$  期。也有一些证据显示, cyclin E 在肿瘤细胞中的含量比正常细胞中要高得多。在细胞中提高 cyclin E 的表达, 该细胞则快速进入 S 期, 而且对生长因子的依赖性降低。

实验表明, cyclin E-CDK2 可以与类 Rb 蛋白 p107 和转录因子 E2F 结合形成复合物。与 Rb 蛋白相似, p107 可以将 SAOS 细胞抑制在  $G_1$  期。而 E2F 则可以促进与  $G_1/S$  期转化和 DNA 复制有关的基因转录。一般认为, 当 cyclin E-CDK2 激酶与 p107 和 E2F 结合形成复合物之后, CDK2 催化 p107 磷酸化, 使 p107 失去抑制作用, 则 E2F 的作用被显现出来, 促进有关基因的转录, 从而促使细胞周期由  $G_1$  期向 S 期转化。此外, 最近有几个实验室相继证明, cyclin E-CDK2 直接参与了中心体复制的起始调控。

cyclin A 也可以与 CDK2 结合, 形成 cyclin A-CDK2。cyclin A 的合成开始于  $G_1/S$  期转化时期。进入 S 期后, cyclin A-CDK2 激酶成为该时期主要的 CDK。目前有实验显示 cyclin A-CDK2 与 DNA 复制有关。在 S 期, cyclin A-CDK2 复合物位于 DNA 复制中心。将抗 cyclin A 的抗体注射到细胞中将抑制细胞 DNA 的合成。在体外, cyclin A-CDK2 可以使 DNA 复制因子 RF-A 磷酸化并使其活性增强。此外, cyclin A-CDK2 也可以与 p107 和 E2F 结合形成复合物, 进而影响 E2F 促进基因

转录的功能。

到达S期的一定阶段，G<sub>1</sub>期周期蛋白也是通过泛素化依赖途径降解的，但与M期周期蛋白的降解有所不同。G<sub>1</sub>期周期蛋白的降解是通过SCF(Skp-cullin-F-box protein)泛素化途径降解的，同时需要G<sub>1</sub>期CDK活性的参与。G<sub>1</sub>期周期蛋白分子中不含有破坏框序列，而是含有PEST序列。PEST序列对G<sub>1</sub>期周期蛋白降解起促进作用。此外，一些参与DNA复制的调控因子如Cdt1和ORC1，以及CDK抑制因子如p21、p27和p57等，也是通过SCF泛素化依赖途径降解的。SCF通过降解细胞周期的不同时期的不同的底物从而在整个细胞周期中都发挥作用(图14-9)。SCF是一种多亚基构成的蛋白复合物，具有E3泛素连接酶的功能。SCF主要由Skp1、Cul1和Rbx1三种亚基构成，可以被Skp2、Fbw7和β-Trcp三种F-box蛋白分别活化，催化底物蛋白的泛素化。SCF的底物特异性的识别是由F-box蛋白来决定的(图14-10)。

除G<sub>1</sub>期周期蛋白依赖性CDK活性之外，细胞内还存在其他多种因素对DNA复制起始活动进行综合调

控。首先，DNA复制起始点的识别，是DNA复制调控中的重要事件之一。已经发现，从酵母细胞到高等哺乳类细胞，均存在一种多亚基蛋白复合物，称为复制起始点识别复合物(origin recognition complex, ORC)。ORC含有6个亚基，分别称为ORC1~6。ORC识别DNA复制起始位点并与其结合，是DNA复制起始所必需的。其次，cdc6和cdc45也是DNA复制所必需的调控因子。如果将cdc6和cdc45去除，DNA便不能起始复制。cdc6在G<sub>1</sub>期早期与染色质结合，到S期早期从染色质上解离下来。cdc45约在G<sub>1</sub>期晚期才与染色质结合，CDK6对cdc45与染色质结合起促进作用，但尚不知道是起直接作用还是间接作用。另外，在20世纪80年代末，人们还提出了一种“DNA复制执照因子学说”(DNA replication-licensing factor theory)，并在此后的研究中取得突破性进展。人们早已知道，在整个细胞周期中DNA复制一次，而且只能一次。是什么因素控制细胞在一个细胞周期中DNA只能复制一次呢？为此，Julian Blow和Ron Laskey通过实验提出，在细胞的胞质内存在一种执照因子，对细胞核染色质DNA复制发行“执照”(licensing)。在M期，细胞核膜破裂，胞质中的执照因子与染色质接触并与其结合，使后者获得DNA复制所必需的“执照”。细胞通过G<sub>1</sub>期后进入S期，DNA开始复制。随DNA复制过程的进

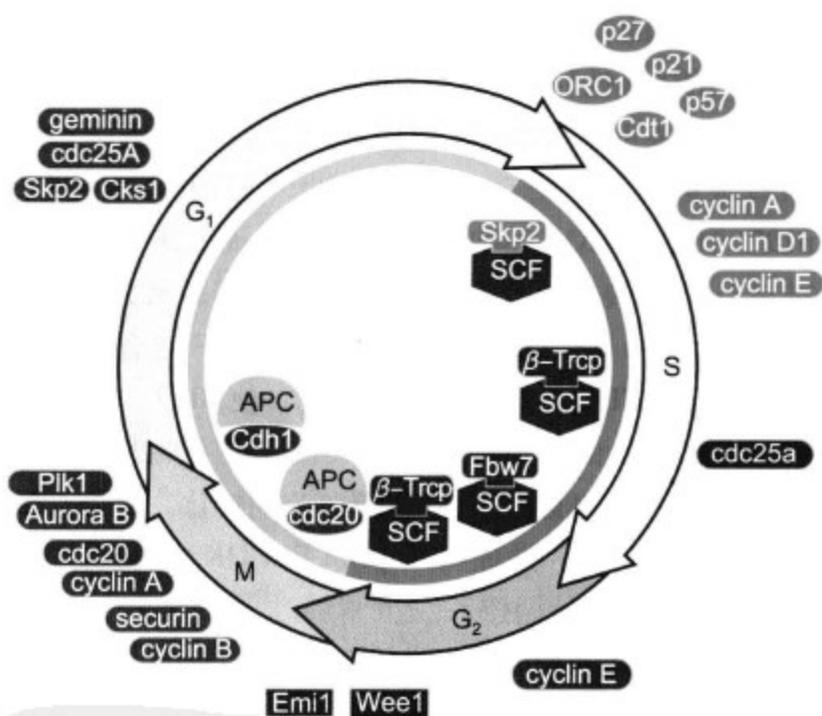


图14-9 APC和SCF在细胞周期中的活性及其底物

图中显示细胞周期不同时相SCF和APC泛素化连接酶的底物蛋白。SCF主要在细胞间期G<sub>1</sub>、S和G<sub>2</sub>期发挥作用。SCF的3种F-box蛋白Skp2、Fbw7和β-Trcp分别用3种不同的颜色表示，其相应的底物也用相应的颜色表示。APC主要在细胞有丝分裂期M期以及G<sub>1</sub>期早期发挥作用。APC的两个负责底物识别的因子cdc20和Cdh1分别用两种不同的颜色表示，其相应的底物也用相应的颜色表示。

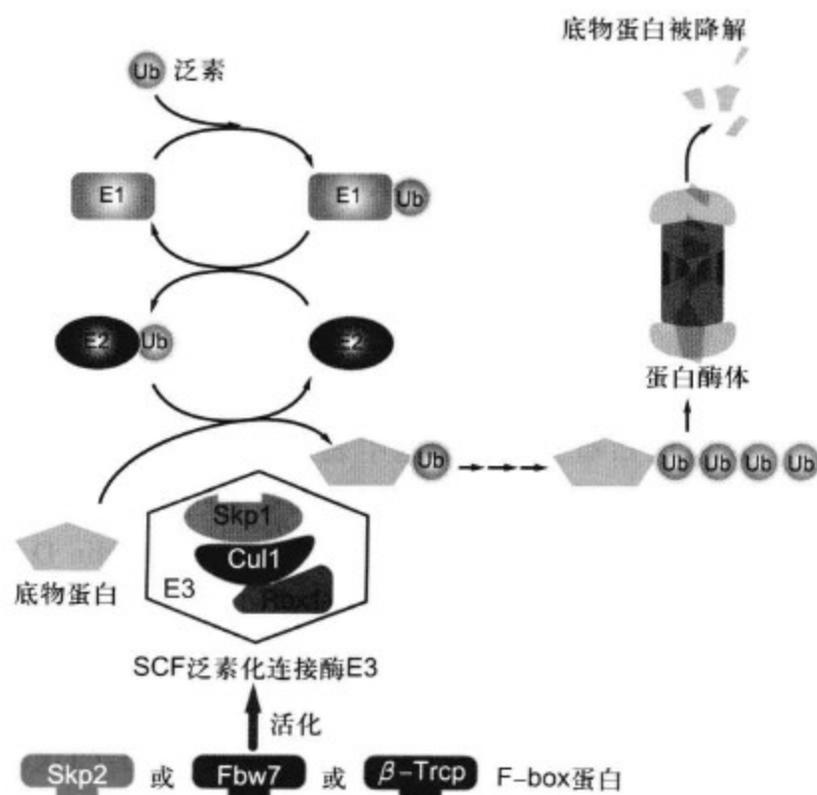


图14-10 SCF泛素化依赖蛋白质降解途径



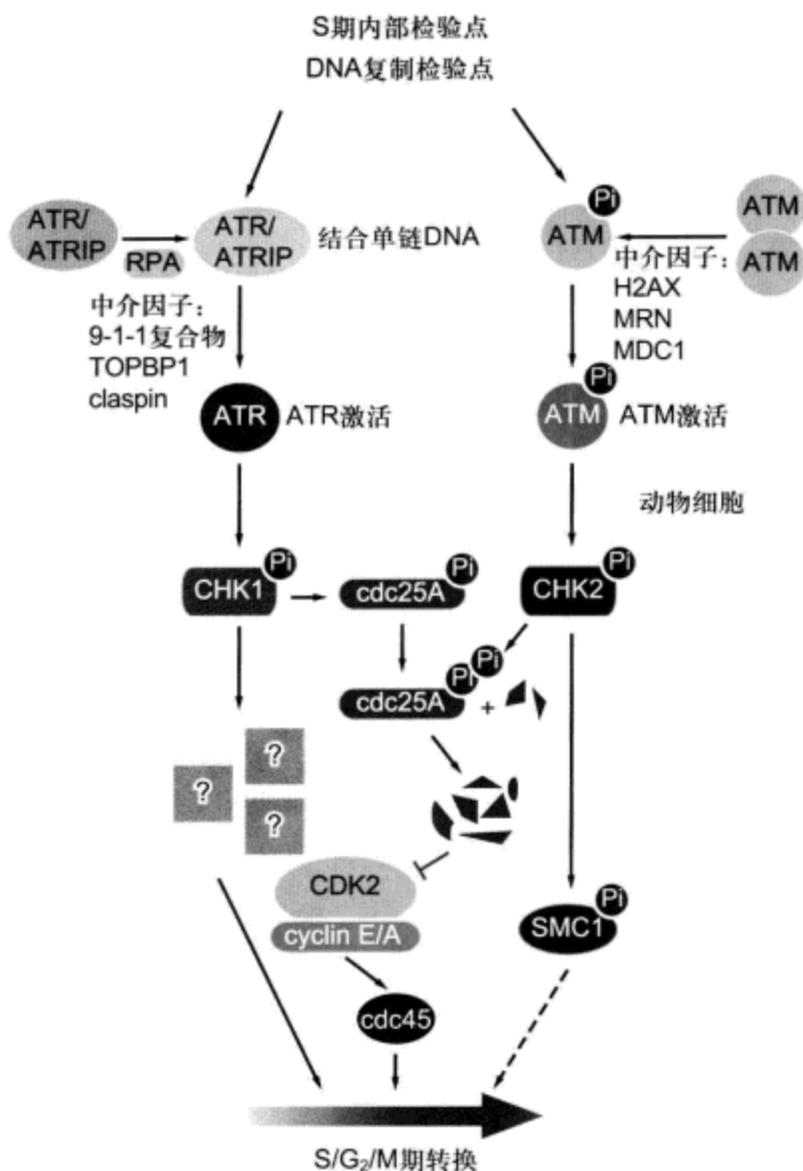


图 14-12 S/G<sub>2</sub>/M 期转化与 DNA 复制检验点

S 期内部检验点和 DNA 复制检验点能够将细胞停滞在 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期。当 DNA 复制叉阻断引发单链 DNA 时，ATR-CHK1 通路被激活。当 DNA 双链断裂时，ATM-CHK2 通路被激活。S 期内部检验点由 SMC1 磷酸化通路和 cdc25A-CDK2/cyclin E/A-cdc45 通路介导。DNA 复制检验点主要是由 ATR/CHK1 介导的 cdc25A 降解从而抑制 cyclin E/A-CDK2。ATM/ATR 是与 PI-3-K 同源的激酶，也是 DNA 损伤信号感受因子，进而激活下游信号通路。CHK2/CHK1：哺乳类细胞中 DNA 损伤信号感受因子的底物，又是下游效应器分子 Ser/Thr 激酶。

## 六、其他因素在细胞周期调控中的作用

除上述各种因素参与细胞周期调控之外，还有不少其他因素参与细胞周期调控，其中最为重要的一类因素为癌基因和抑癌基因。癌基因和抑癌基因均是细胞生命活动所必需的基因，其表达产物对细胞增殖和分化起着重要的调控作用。癌基因异常表达可导致细

胞转化、增殖失控，甚至细胞癌变。目前已经分离了一百多种癌基因，其表达产物大致可归纳为蛋白激酶、多肽类生长因子、膜表面生长因子受体和激素受体、信号转导器、转录因子、类固醇和甲状腺激素受体、核蛋白等几个类型。它们在细胞周期信号调控过程中各自起着不同的作用。例如，生长因子与细胞表面的生长因子受体结合，可以促使 G<sub>0</sub> 期的细胞返回细胞周期，开始细胞增殖。抑癌基因表达产物对细胞增殖起负调节作用，如 p53、Rb 等。p53 是近年来研究较多的人类抑癌蛋白之一。p53 基因突变，使细胞癌变的机会大大增加，已经证实，有许多肿瘤同时伴随 p53 基因突变。

除细胞内在因素外，细胞和机体的外在因素对细胞周期也有重要影响，如离子辐射、化学物质作用、病毒感染、温度变化、pH 变化等。离子辐射对细胞最直接的影响之一是 DNA 损伤。DNA 损伤后，细胞会很快启动其 DNA 损伤修复调控体系，抑制细胞周期运转，直到 DNA 损伤得以完全修复；或者最终不能完成修复，致使细胞走向死亡。在人类细胞 DNA 损伤修复过程中，p53 表达水平大大提高，通过一些下游调控因子，抑制 CDK1、CDK2、CDK4 等激酶活性，从而影响细胞周期运转。化学物质种类繁多，有的可直接参与调控 DNA 代谢，影响细胞周期变化；有的可以通过其他途径，影响酶类和其他调节因素的变化，改变细胞周期进程。病毒感染也是影响细胞周期进程的主要因素之一。有的病毒感染能快速抑制细胞周期，有的则可以诱导细胞转化和癌变，使整个细胞周期进程发生改变。

## 第二节 癌细胞

多细胞生物是由不同类型细胞受控于严格的调控机制而形成的细胞社会。癌细胞 (cancer cell) 脱离了细胞社会赖以构建和维持的规则的制约，表现出细胞增殖失控和侵袭并转移到机体的其他部位生长这两个基本特征，其结果破坏了组织和器官的正常生理功能。全世界每年死于癌症的人数达人口总数的万分之一至万分之三点五。基因突变的结果有可能招致某些分化细胞的生长

与分裂失控，脱离了衰老和死亡的正常途径而成为癌细胞。癌细胞与正常分化细胞明显不同的一点是，分化细胞的细胞类型各异，但都具有相同的基因组；而癌细胞的细胞类型相近，但基因组却发生不同形式的改变。随着环境因素的影响，基因突变率提高，细胞癌变的概率也随之增加。此外少数癌细胞其基因组DNA序列并未改变，但由于其DNA或组蛋白的修饰发生了变化，即表观遗传改变 (epigenetic change)，导致基因表达模式的改变，从而引起癌症的发生。因此，对癌细胞形成与特征的了解不仅有助于了解细胞增殖、分化与凋亡的调节及其分子机制，而且也是人类健康所面临的十分严峻的问题。

## 一、癌细胞的基本特征

动物体内因细胞分裂调节失控而无限增殖的细胞称为肿瘤细胞 (tumor cell)。具有转移能力的肿瘤称为恶性肿瘤 (malignancy)，源于上皮组织的恶性肿瘤称为癌。目前癌细胞已作为恶性肿瘤细胞的通用名称。其主要特征是：

### (一) 细胞生长与分裂失去控制

在正常机体中细胞或生长与分裂，或处于静息状态，执行其特定的生理功能（如肝细胞和神经细胞）。在成体一些组织中，会有新生细胞的增殖、衰老细胞的死亡，在动态平衡中维持组织与器官的稳定，这是一种严格受控的过程。而癌细胞失去控制，成为“不死”的永生细胞，核质比例增大，分裂速度加快，结果破坏了正常组织的结构与功能。

### (二) 具有浸润性和扩散性

动物体内特别是衰老的动物体内常常出现肿瘤，这些肿瘤细胞仅位于某些组织特定部位，称之为良性肿瘤，如疣和息肉。如果肿瘤细胞具有浸润性和扩散性，则称之为恶性肿瘤，即癌症发生。

良性肿瘤与恶性肿瘤细胞的最主要区别是：恶性肿瘤细胞（癌细胞）的细胞间黏着性下降，具有浸润性和扩散性，易于浸润周围健康组织，或通过血液循环或淋巴途径转移并在其他部位黏着和增殖。由转移并在身体其他部位增殖产生的次级肿瘤称为转移灶 (metastasis)。这是癌细胞的基本特征 (图 14-13)。此外，癌细胞在分化程度上低于正常细胞和良性肿瘤细胞，失去了原组织细胞的某些结构和功能。

### (三) 细胞间相互作用改变

正常细胞之间的识别主要通过细胞表面特异性蛋白的相互作用实现的，进而形成特定的组织与器官。癌细胞冲破了细胞识别作用的束缚，在转移过程中，除了会产生水解酶类（如用于水解基底膜成分的酶类），而且要异常表达某些膜蛋白，以便与别处细胞黏着和继续增殖。并借此逃避免疫系统的监视，防止天然杀伤细胞等的识别和攻击。

### (四) 表达谱改变或蛋白质活性改变

癌细胞的种种生物学特征主要归结于基因表达及调控方式的改变。人们曾用基因表达谱分析技术 (serial analysis of gene expression, SAGE) 对乳腺癌和直肠癌细胞与正常细胞中基因表达谱进行了比较。在检测的 30 万个转录片段 (transcripts)，至少相当于 4.5 万个所表达的基因中只有 500 个转录片段（相当于 75 个基因）有明显不同，仅占整个基因表达谱中很少一部分。

癌细胞的蛋白质表达谱系中，往往出现一些在胚胎细胞中所表达的蛋白质，如在肝癌细胞中表达胚肝细胞中的多种蛋白质。多数癌细胞中具有较高的端粒酶活性。此外癌细胞还异常表达与其恶性增殖、扩散等过程相关的蛋白质组分，如纤粘连蛋白减少，某些蛋白如蛋白激酶 Src、转录因子 Myc 等过量表达。

此外，由于癌细胞基因突变位点不同，同一种癌甚至同一癌灶中的不同癌细胞之间也可能具有不同的表型，而且其表型不稳定，特别是具有高转移潜能的癌细胞其表型更不稳定，这就决定了癌细胞异质性的特征。生物芯片技术可用于检测细胞 mRNA 或蛋白质的表达谱，目前已用于肿瘤的研究、诊断，并有望用于优化对肿瘤患者的个体化治疗。

### (五) 体外培养的恶性转化细胞的特征

应用人工诱导技术可培养出恶性转化 (malignant transformation) 的细胞及恶性程度不同的转化细胞。恶性转化细胞同癌细胞一样具有无限增殖的潜能，在体外培养时贴壁性下降，可不依附在培养器皿壁上生长，有些还可进行悬浮式培养；正常细胞生长到彼此相互接触时，其运动和分裂活动将会停止，即所谓接触抑制。癌细胞失去运动和分裂的接触抑制，在琼脂培养基中可形成细胞克隆，这也是细胞恶性程度的标志之一。当将恶性转化细胞注入易感染动物体内时，往往会形成肿瘤。对

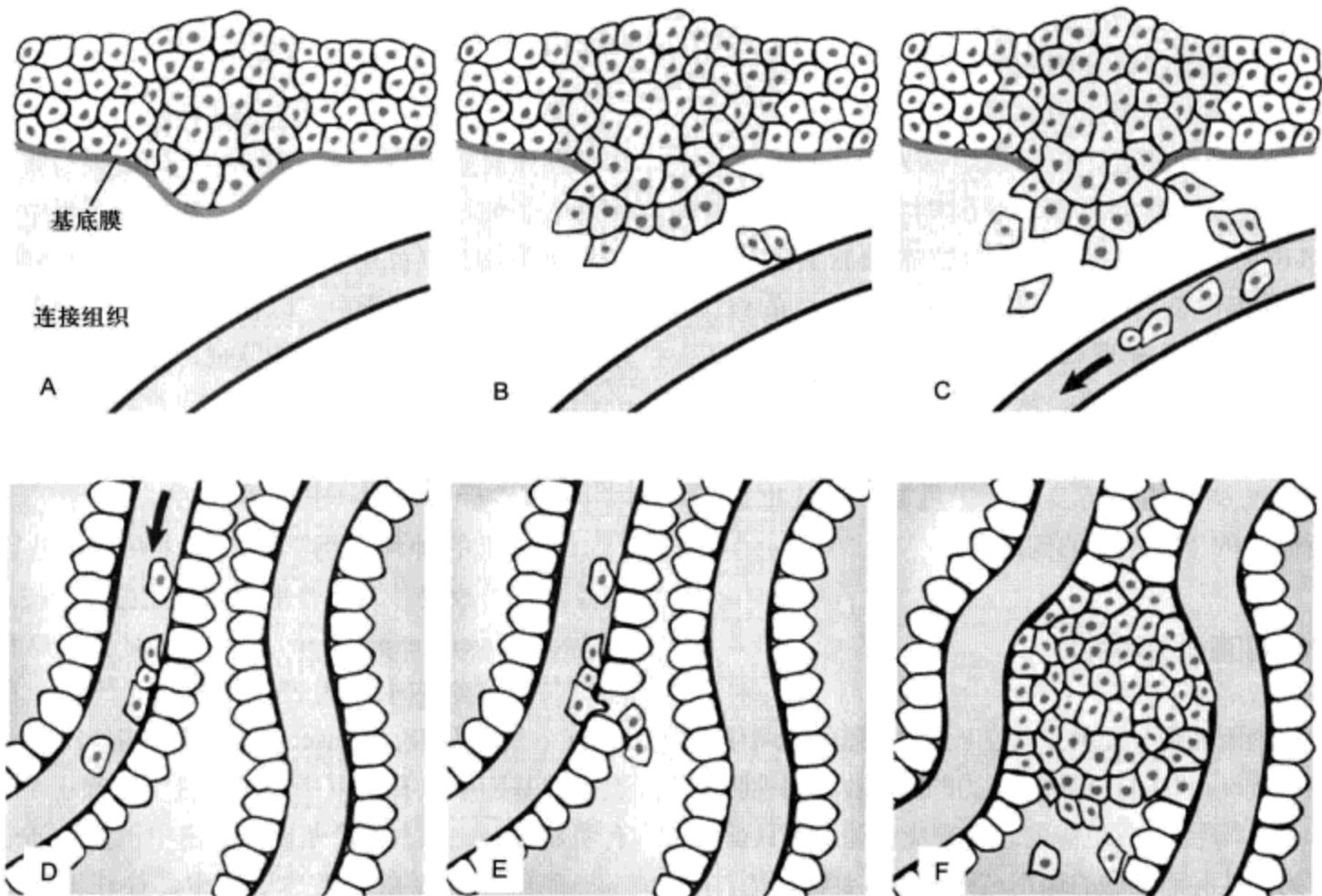


图 14-13 癌细胞的扩散

癌细胞在上皮中恶性增殖 (A) 后, 突破基膜的障碍 (B), 通过管壁进入血管或淋巴管 (C)。进入淋巴管的癌细胞, 首先滞留于淋巴结, 形成淋巴结转移。只有不到 1/1 000 的细胞能够转移到其他组织并形成新的肿瘤。这里显示的是癌细胞从肺向肝转移的情况, 癌细胞黏附于肝的血管壁 (D), 穿过血管壁 (E) 后, 在肝中增殖形成转移灶 (F)。

体外培养的恶性转化细胞及癌细胞的比较研究有助于了解癌细胞的特征及发生机制。

## 二、癌基因与抑癌基因

癌症主要是由携带遗传信息的 DNA 的病理变化而引起的疾病。与遗传病不同, 癌症主要是体细胞 DNA 突变, 而不是生殖细胞 DNA 突变。然而由于癌症涉及多个基因位点的突变, 因此生殖细胞某些基因位点的突变无疑也会加大癌变的可能性。

癌基因 (oncogene) 是控制细胞生长和分裂的一类正常基因, 其突变能引起正常细胞发生癌变。癌基因最早发现于诱发鸡肿瘤的劳氏肉瘤病毒 (Rous sarcoma virus, 属于反转录病毒), 称之为 *Src* 基因。该基因对病毒繁殖不是必需的, 但当病毒感染鸡后, 可以引起细胞癌变, 导致肉瘤。19 世纪 70 年代中后期和 80 年代, J. Michael Bishop 和 Harold E. Varmus 证实癌基因起源

于细胞, 并普遍存在于许多生物基因组中, 二人因此获得 1989 年诺贝尔生理学或医学奖。癌基因可以分成两大类: 一类是病毒癌基因, 指反转录病毒的基因组里带有可使受病毒感染的宿主细胞发生癌变的基因, 简写成 *v-onc* (*v* 是 *virus* 的缩写); 另一类癌基因是细胞癌基因, 简写成 *c-onc* (*c* 是 *cell* 的缩写), 又称原癌基因 (proto-oncogene)。在后来的研究中, 大多数 *c-onc* 基因是依靠病毒的 *v-onc* 基因探针找到的。近年来研究表明, 许多致癌病毒中的癌基因不仅与致癌密切相关, 而且与正常细胞中的某些 DNA 序列高度同源, 从而推测病毒癌基因起源于细胞的原癌基因。反转录病毒所携带的癌基因, 可能是由于这类病毒特殊的增殖方式而从宿主细胞中获得的。病毒中的癌基因由于碱基序列的突变, 引起所编码的蛋白质产物超活化或失去控制, 最终导致肿瘤的发生。

*c-onc* 是在正常细胞基因组中对细胞正常生命活动起主要调控作用的基因, 这些基因一旦发生突变或被异常激活, 可使细胞发生恶性转化。换言之, 在每一个

正常细胞基因组里都带有原癌基因，但它不出现致癌活性，只是在发生突变或被异常激活后才变成具有致癌能力的癌基因。因为已活化的癌基因或是从癌细胞里分离出来的癌基因，可将体外培养的哺乳类细胞，转化成为具有癌变特征的癌细胞，所以癌基因有时又被称为转化基因 (transforming gene)。因此，*c-onc* 基因是一类具有正常的生理功能的基因，而只有在发生突变或异常表达的情况下才会引起细胞癌变。实际上，*c-onc* 基因向癌基因的转化是一种功能获得性突变，即细胞的 *c-onc* 基因被不适当地激活后，会造成蛋白质产物的结构改变，*c-onc* 基因出现组成型激活，以及过量表达或不能在适当的时刻关闭基因的表达等。

目前已识别的 *c-onc* 基因有 100 多个，其编码的蛋白质主要包括生长因子、生长因子受体、信号转导通路中的分子、基因转录调节因子、细胞凋亡蛋白、DNA 修复相关蛋白和细胞周期调控蛋白等几大类型 (图 14-14)。当然，因突变而诱发癌症的基因还不止这些。细胞信号转导是细胞增殖与分化过程的基本调控方式，而信号转导通路中蛋白因子的突变是细胞癌变的主要原因。如人类各种癌症中约 30% 的癌症是信号转导通路中的 *ras* 基因突变过表达引起的。此外，很多癌基因在进化上是相当保守的，如 *c-ras* 基因在酵母、果蝇、小鼠和人的正常基因组均有存在。

人们还注意到，视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma) 是由于 *Rb* 基因突变失活而导致的。随后又发现 *p53* 等基因均有类似的现象。这类基因称为抑癌基因或肿瘤抑制基因 (tumor-suppressor gene)，又称抗癌基因 (antioncogene)，或者更为确切地说是这类基因编码的蛋白质，其功能是正常细胞增殖过程中的负调控因子，在细胞周期的检验点上起阻止周期进程的作用 (图 14-15)，或者是促进细胞凋亡，或者既抑制细胞周期调节，又促进细胞凋亡。如果抑癌基因突变，丧失其细胞增殖的负调控作用，则导致细胞周期失控而过度增殖。抑癌基因是基因的功能丢失性突变。抑癌基因原先有对细胞分裂周期或细胞生长设置限制的功能，当抑癌基因的一对等位基因都缺失或都失去活性时，这种限制功能也就随之丢失，于是出现了细胞癌变。抑癌基因与癌基因之间的区别在于癌基因的突变性质是显性的，抑癌基因的突变性质是隐性的。目前已发现的抑癌基因有 10 多种。例如，*p53* 基因是于 1979 年发现的第一个抑癌基因，开始时被认为是一种癌基因，因为它能加快细胞分裂的周期，以后的研究发现只有

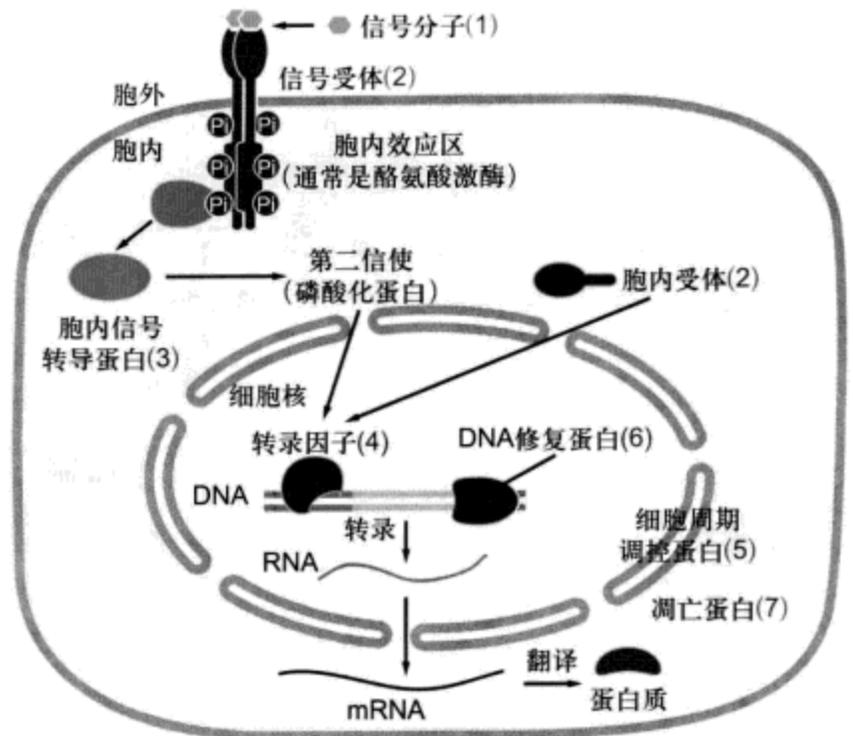


图 14-14 控制细胞生长和增殖，并与肿瘤发生相关的 7 类蛋白  
有 7 类蛋白调控细胞的增殖，它们的突变都可能致癌。很多胞外信号分子 (1)、信号受体 (2)、胞内信号转导蛋白 (3) 和转录因子 (4) 能够刺激细胞增殖，它们的致癌突变是显性的。而抑制细胞周期的调控蛋白 (5) 和负责修复 DNA 的蛋白 (6) 由抑癌基因编码，它们的致癌突变是隐性的。凋亡蛋白 (7) 也是抑癌蛋白，通过诱导细胞凋亡而抑制细胞的增殖。

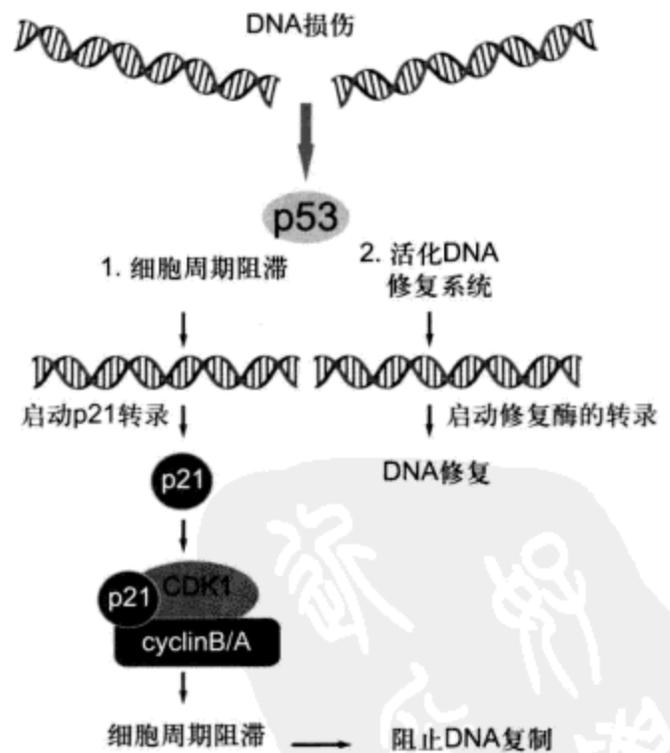


图 14-15 *p53* 与细胞 DNA 损伤

*p53* 是一种转录因子，DNA 的损伤会导致 *p53* 的水平上升，激活 DNA 的修复系统，同时启动很多下游基因的转录，其中包括 *p21<sup>CIP</sup>*。*p21* 能够与各种 cyclin-CDK 复合物结合，抑制它们的活性，使细胞周期阻滞，等待 DNA 完成修复。在 DNA 严重损伤的情况下，*p53* 将诱导凋亡因子的表达，使细胞进入程序化死亡。

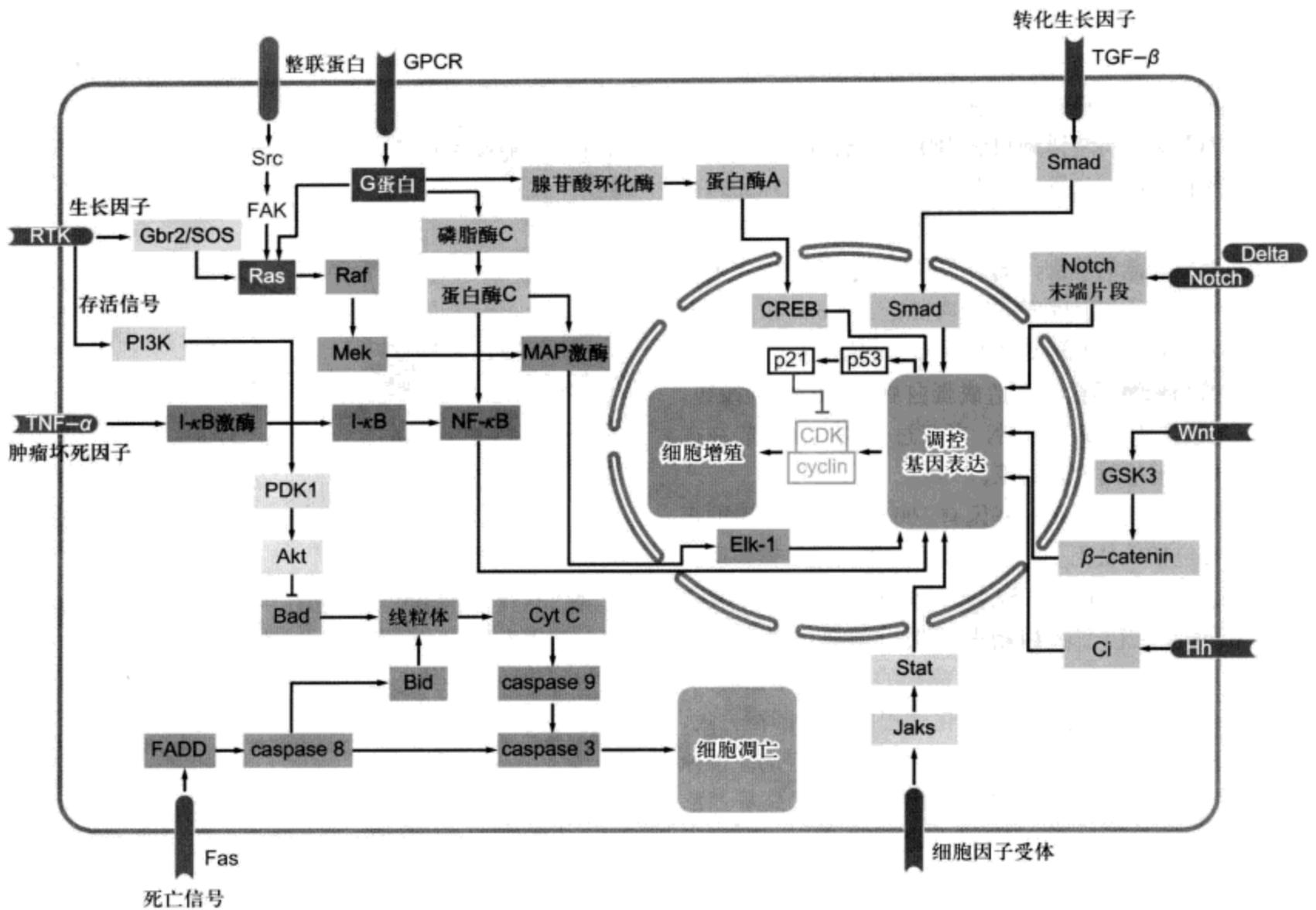


图 14-16 细胞信号调控网络及肿瘤发生相关的主要调控因子

与肿瘤发生相关的调控因子主要包括胞外信号分子、信号受体、胞内信号转导蛋白和转录因子、细胞周期调控蛋白、DNA 损伤修复调控蛋白和促凋亡蛋白等。它们参与细胞生命活动的各条信号调控通路（见本书第九章）。这些调控因子的失调，将引起细胞生命活动的阻滞，或者不受约束地快速增殖即癌变，或者细胞的死亡（见本书第十六章）。

在 *p53* 的失活或突变时才会导致细胞癌变，才认识到它是一个抑癌基因。抑癌基因或其编码的蛋白质的主要功能可概括为 3 类：① 偶联细胞周期与 DNA 损伤，即只要细胞有 DNA 损伤，那么细胞将不会分裂。如果 DNA 损伤被修复，那么细胞周期可以继续运行。② 如果 DNA 损伤未被修复，那么细胞将起始凋亡程序，以解除这类细胞可能对机体造成的危险。③ 与细胞黏着有关的某些蛋白质可以防止肿瘤细胞的扩散，阻止接触抑制的丧失并抑制转移，这类蛋白质起转移抑制者作用。

细胞癌变的基本特征之一是细胞增殖失控，而细胞的增殖是通过细胞信号调控网络中细胞增殖相关基因和抑制细胞增殖相关基因的协同作用而调控的。细胞的癌变归根结底也恰恰是这两大类基因的突变或异常表达，

破坏了正常的细胞增殖的调控机制，形成了具有无限分裂潜能的肿瘤细胞（图 14-16）。

### 三、肿瘤的发生是基因突变逐渐积累的结果

根据 DNA 复制过程中的基因突变率 ( $10^{-6}$ ) 及人的一生中细胞分裂次数 ( $10^{16}$ ) 推测，人类基因组中每个基因都可能发生  $10^{10}$  次的突变。如果再考虑生活环境中的致癌因素（如辐射等物理因素、化学诱变剂等化学因素和肿瘤病毒感染等生物因素），令人们感到惊奇的并不是细胞为什么会癌变，而是肿瘤的发生频率为什么如此之低。

根据大量的病例分析，癌症的发生一般并不是单一基因的突变，而至少在一个细胞中发生 5~6 个基因突

变，才能赋予癌细胞所有的特征，即癌细胞不仅增殖速度快，而且其子代细胞能够逃脱细胞衰老的命运，取代相邻正常细胞的位置，不断从血液中获取营养，进而穿越基膜与血管壁在新的组织部位安置、存活与生长。因此，细胞基因组中产生与肿瘤发生相关的某一原癌基因的突变，并非马上形成癌，而是继续生长直至细胞群体中新的偶发突变的产生。某些在自然选择中具有竞争优势的细胞，再经过类似的过程，逐渐形成具有癌细胞一切特征的恶性肿瘤。如结肠癌发生的病程中开始的突变仅在肠壁形成多个良性的肿瘤（息肉），进一步突变才发展为恶性肿瘤（癌），全部过程至少需要10年或更长时间（图14-17）。从这一点上看，癌症是一种典型的老年性疾病，它涉及一系列的原癌基因与抑癌基因的致癌突变的积累。

在人的二倍体细胞中抑癌基因有两个拷贝，只要其中一个拷贝正常，便可保证正常的调控作用。如两个拷贝都丢失或失活，才能引起细胞增殖的失控，而原癌基因的两个拷贝中只需要一个基因发生突变，便可能起到与癌基因类似的作用。

在某些癌症病例中，其生殖细胞中原癌基因或肿瘤抑制因子发生致癌突变，结果个体所有的体细胞的相应基因都已变异。在这种情况下，癌变发生所需要的基因突变数的积累时间就会减少，携带这种基因突变的家族成员更易患癌症（图14-18）。

同样白血病等血细胞的恶性增生，并不涉及浸润这一环节，而直接随血流遍布全身。因此，只有少数基因突变，便可导致癌症发生，患病年龄也相应提早。

#### 四、肿瘤干细胞

在长期的肿瘤研究与临床治疗中人们注意到两个值得关注的现象：

(1) 在恶性肿瘤组织中，并非将每一个癌细胞移植到免疫缺陷的裸鼠体内，都能形成肿瘤，肿瘤的形成往往需要 $10^6$ 个癌组织的细胞。

(2) 化学药物是治疗恶性肿瘤的有效方法，但总有少量癌细胞依然存活，因而常常引起肿瘤的复发。

显然，癌组织中各细胞的致癌能力及对化学药物的抗性是有很大的差别的。近年来，随着干细胞研究的进展，人们自然会联想到肿瘤组织中是否也存在着类似于成体干细胞的肿瘤干细胞（cancer stem cell）？这也是涉及肿瘤发生机制及肿瘤治疗策略的重要问题。

肿瘤干细胞是一群存在于某些肿瘤组织中的干细胞样细胞。自1997年首次报导分离出白血病肿瘤干细胞后，陆续报道分离与鉴定了乳腺癌干细胞、脑瘤干细胞和黑色素瘤干细胞，并建立了脑瘤干细胞和乳腺癌干细胞的体外培养。随着肿瘤干细胞在更多的不同肿瘤组织中分离成功，更有力地证明了肿瘤干细胞的存在，同时为深入探讨肿瘤的发生、发展及评价预后等提供了新的理论依据，同时也为肿瘤的治疗带来了新的思路。

干细胞具有自我更新和几乎无限增殖的能力，具有迁移至某些特定组织和排除有毒化学因子的能力。而肿瘤干细胞也具有无限增殖、转移和抗化学毒物损伤

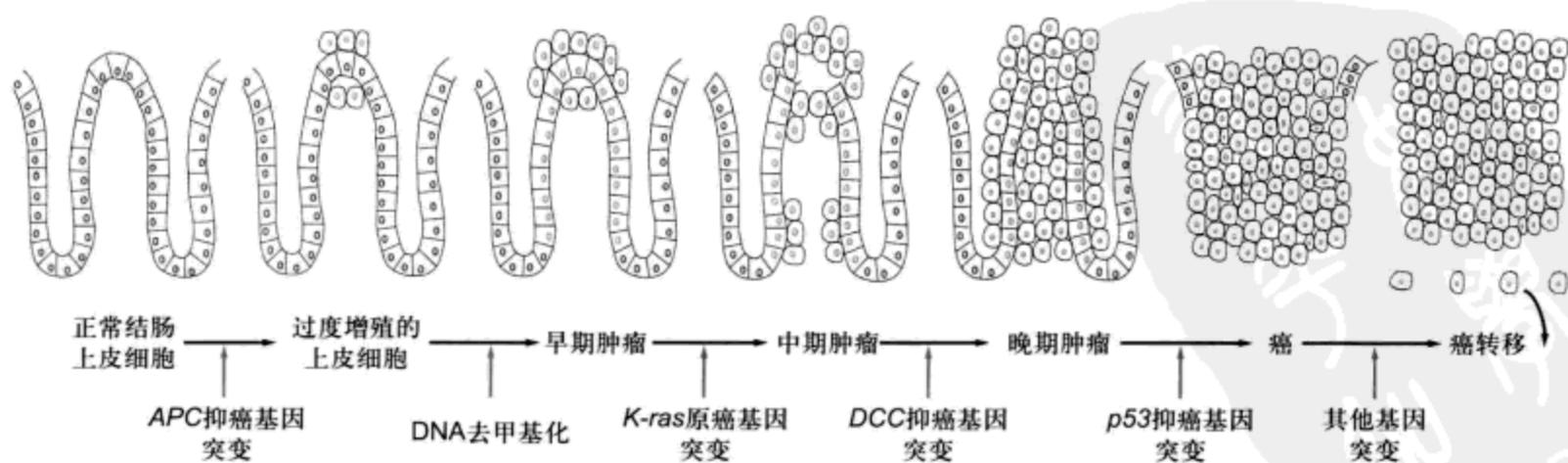


图14-17 一系列相关基因突变导致结肠癌发生

APC, adenomatosis polyposis coli ; DCC, deleted in colorectal cancer。

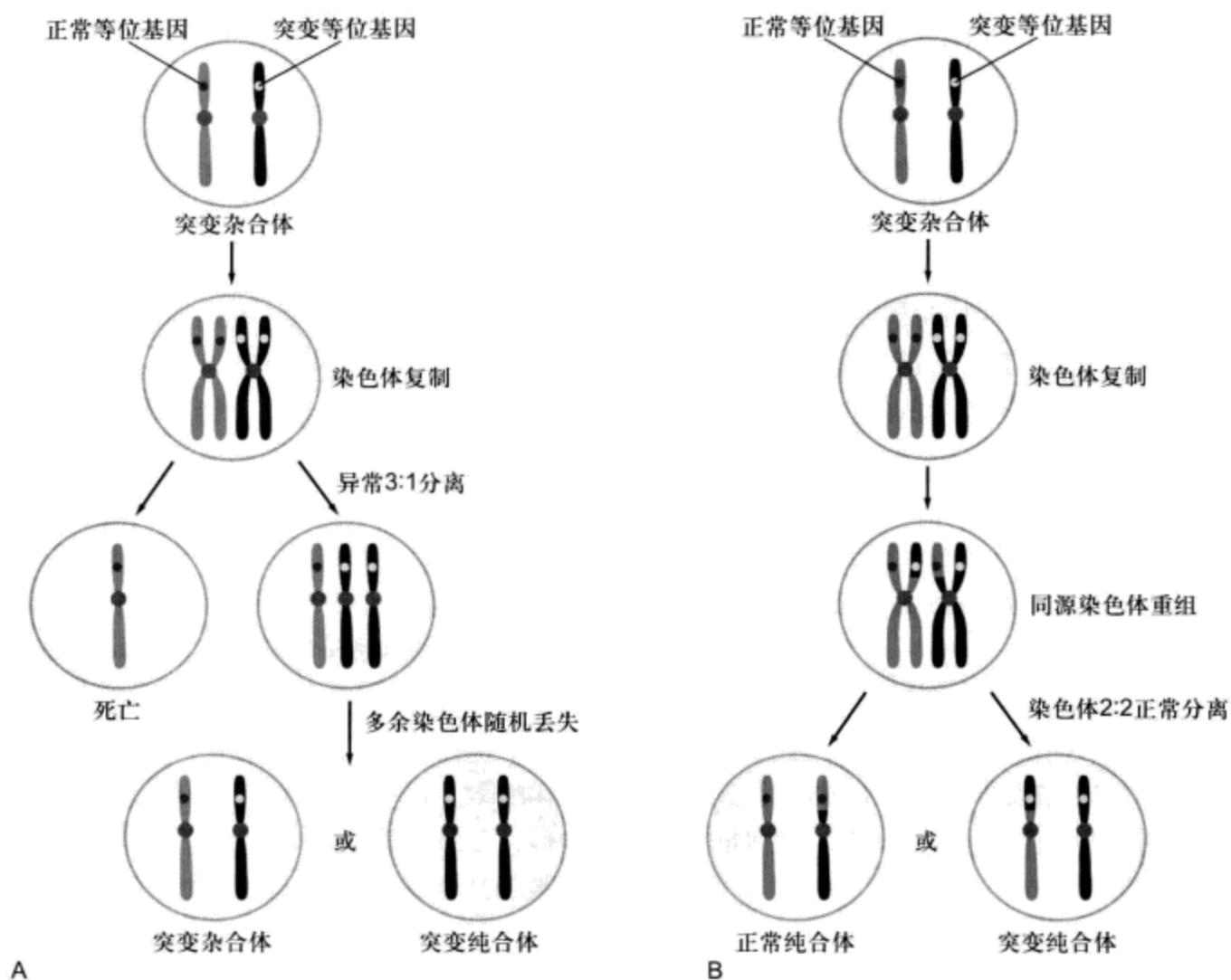


图 14-18 造成杂合性缺失的两种机制

细胞如果含有一个正常的抑癌基因和一个突变的等位基因，一般是正常的。细胞分裂过程中，如果出现纺锤体结构的缺陷，导致染色体的错误分离（A），或者带有野生型和突变型的染色体之间发生重组（B），就可能形成抑癌基因的一对等位基因都突变的细胞。

的能力。而且，二者使用一些共同的信号转导通路，如 Wnt、Notch 和 Shh 信号通路及相关的信号分子。然而肿瘤干细胞和正常干细胞在细胞增殖、分化潜能和细胞迁移等行为上有明显差异。正常干细胞的增殖（又称为自我更新）是严格受控的过程，具有迁移到特定组织分化成多种功能细胞的潜能，以构建正常的组织器官。而肿瘤干细胞增殖失控，失去正常分化的能力，转移到多种组织后形成异质性的肿瘤，破坏正常组织与器官的功能。与一般肿瘤细胞相比，肿瘤干细胞具有高致瘤性。很少量的肿瘤干细胞在体外培养，就能生成集落。将很少量的肿瘤干细胞注入实验动物体内，即可以形成肿瘤。肿瘤干细胞耐药性强。多数肿瘤干细胞的细胞膜上

表达 ATP 结合盒（ABC）家族膜转运蛋白。这类蛋白质大多可运输并外排包括代谢产物、药物、毒性物质、内源性脂质、多肽、核苷酸及固醇类等多种物质，使之对许多化疗药物产生耐药性。目前认为肿瘤干细胞的存在是导致肿瘤化疗失败的主要原因。

通过上面的比较，人们很容易想到肿瘤干细胞起源于成体干细胞的可能性。而且，与终末分化细胞相比较，成体干细胞的寿命要长得多（图 14-19），细胞基因组发生多个位点突变的可能性更大。当然这也并不排除肿瘤干细胞来源于已分化细胞的可能性。因此，研究肿瘤干细胞存在的普遍性及探索其发生的机制，是目前肿瘤生物学研究的一个非常重要的课题。

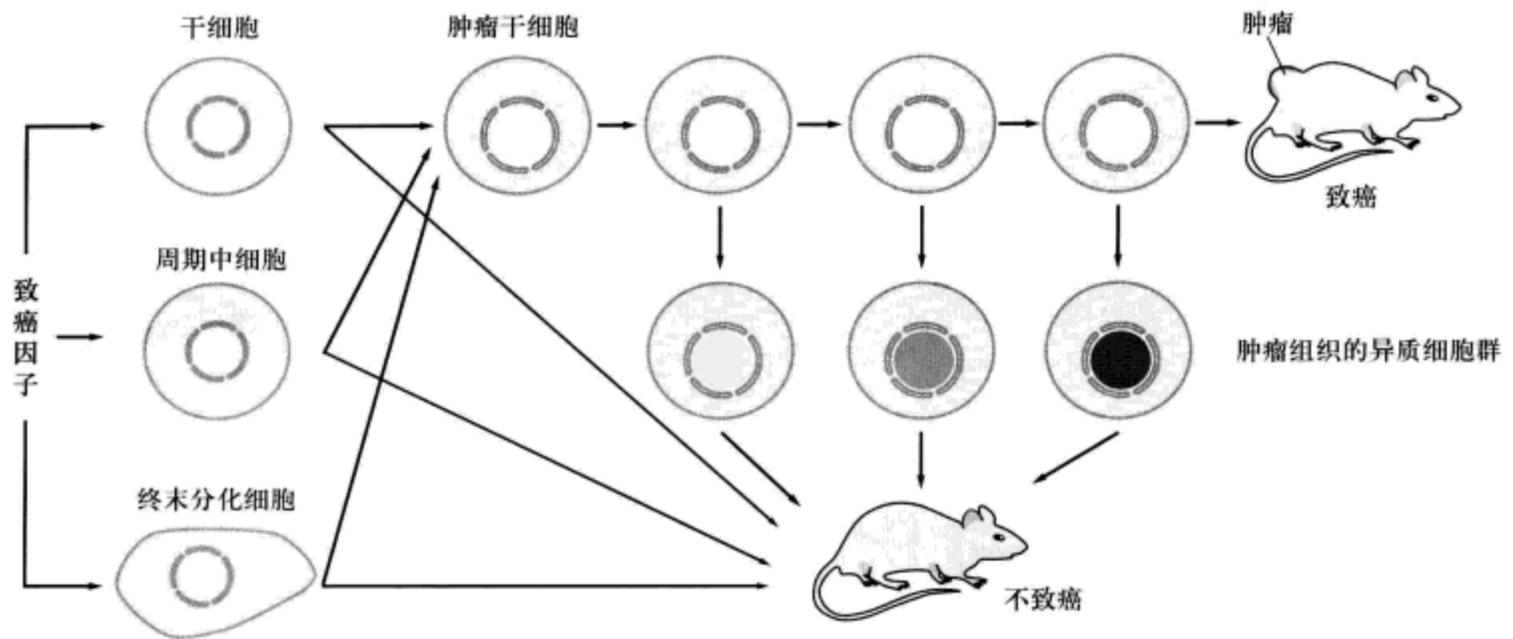


图 14-19 肿瘤干细胞与肿瘤的发生机制模型

在正常情况下，干细胞、周期中细胞和终末分化细胞不具致癌性。在致癌因子的诱导下，这些细胞可能转化为肿瘤干细胞，最终能够增生为肿瘤。在肿瘤干细胞增生过程中，部分细胞也会发生异质化，失去致癌性，不能再增生为肿瘤。

## ● 思考题 ●

1. 简述p34<sup>cdc2</sup>/cyclin B蛋白激酶的发现过程。
2. 细胞周期中有哪些主要检验点,各起何作用?
3. 举例说明CDK在细胞周期中是如何执行调节功能的?
4. 说明癌症的发生与癌基因和抑癌基因的关系。为什么抑癌基因突变在细胞水平上是隐性的，却表现为典型的显性孟德尔遗传?
5. 为什么说肿瘤的发生是基因突变逐渐积累的结果?
6. 什么是肿瘤干细胞?

## ● 参考文献 ●

1. Araki H. Cyclin-dependent kinase-dependent initiation of chromosomal DNA replication. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(6):766-771.
2. Besson A, Dowdy S F, Roberts J M. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*, 2008, 14(2):159-169.
3. Bloom J, Cross F R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(2):149-160.
4. Blow J J, Dutta A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(6):476-486.
5. Coudreuse D, Nurse P. Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature*, 2010, 468(7 327):1 074-1 079.
6. Croce C M. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*, 2008, 358 (5): 502-511.
7. Hohegger H, Takeda S, Hunt T. cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(11):910-916.
8. Izawa D, Pines J. How APC/C-cdc20 changes its substrate specificity in mitosis. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(3):223-233.
9. Loog M, Morgan D O. Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature*, 2005, 434: 104-108.
10. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(3):153-166.
11. Nakayama K I, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5):369-381.
12. Peters J M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 644-656.
13. Queralt E, Uhlmann F. Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(6):661-668.
14. Reddy S K, Rape M, Margansky W A, Kirschner M W. Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature*, 2007, 446(7 138):921-925.
15. Sullivan M, Morgan D O. Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11):894-903.

# 细胞分化与胚胎发育

多细胞有机体是由各种不同类型的细胞组成的（表 15-1），而这些细胞通常是一个受精卵细胞经增殖分裂和细胞分化衍生而来的后裔。在个体发育中，由一种相同的细胞类型经细胞分裂后逐渐在形态、结构和功能上形成稳定性差异，产生不同的细胞类群的过程称为细胞分化（cell differentiation）。细胞分化的关键在于不同类型细胞中特异性蛋白质的合成，而特异性蛋白质合成的实质是基因在特定的时间和空间中选择性的表达。细胞分化是多细胞有机体发育的基础，也是目前干细胞（stem cell）研究中所面临的核心问题。

在个体发育过程中，通过有控制的细胞分裂增加细胞数目，通过有序的细胞分化增加细胞类型，进而由不

同类型的细胞构成生物体的组织与器官，执行不同的功能。显然，细胞分化为各种细胞类型并通过相互协同作用完成各种复杂特殊的生物学功能，从而为生命向更高层次的发展与进化奠定了基础。

然而有限的基因选择性表达如何分化出形态功能各异的细胞，精确地构建成各种组织、器官以及多姿多彩的生命体，一直是人们十分关注的热点，也是生命科学中面临的最具有挑战性的问题之一。随着人们对细胞分化与胚胎发育机制的深入了解，特别是干细胞体外分化研究的进展，有关发育各阶段的分散的局部的知识，正迅速汇集到一起，各种完全不同的生物模式逐渐显示出发育过程内在的共性，正如拼板玩具一样迅速地向最终图谱迈进。长期令人困惑不解的细胞分化与胚胎发育过程的奥妙之处，不仅在于其过程与结果的复杂性，而且在于构建多种细胞组织及机体过程中难以置信的经济性。在生物长期演化过程中，很可能仅利用有限的较为简单的基因产物为工具，凭借重复而富有创造性的方式指导细胞的行为，分化并产生当今世界上多种生命体。与此同时，生命体又展现出另一方面的特征，即高度终末分化的细胞——精子和卵细胞，一旦结合将成为一个新的生命的起点，不仅分化产生各种类型的细胞，而且上一代个体的衰老与疾病在子代个体中几乎全部消失。

表 15-1 几种生物的细胞数目与类型

物种	细胞数 / 个	细胞类型 / 种
团藻	$10^2$	2
海绵	$10^3$	5~10
水螅	$10^5$	10~20
涡虫	$10^9$	100
人	$10^{14}$	>200

## 第一节 细胞分化

### 一、细胞分化的基本概念

#### (一) 细胞分化是基因选择性表达的结果

早期人们推测细胞分化是由于细胞在发育过程中遗传物质的选择性丢失所致。现代分子生物学的证据表明, 绝大多数的细胞分化不是因为遗传物质的丢失, 而是由于细胞选择性地表达各自特有的专一性蛋白质而导致细胞形态、结构与功能的差异。如鸡的输卵管细胞合成卵清蛋白, 成红细胞合成 $\beta$ -珠蛋白, 胰岛 $\beta$ 细胞合成胰岛素, 这些细胞都是在个体发育中逐渐产生的。分别用上述3种蛋白的基因作探针, 对3种细胞中提取的总DNA进行Southern杂交实验, 结果显示, 上述3种细胞的基因组DNA中都含有卵清蛋白基因、 $\beta$ -珠蛋白基因和胰岛素基因(表15-2); 然而用同样的3种探针, 对上述3种细胞中提取的总RNA进行Northern杂交实验, 结果表明, 卵清蛋白mRNA仅在输卵管细胞中表达, 成红细胞中仅表达 $\beta$ -珠蛋白mRNA, 胰岛 $\beta$ 细胞中表达胰岛素mRNA。

这一经典的实验表明, 不同类型的细胞各自表达一套特异的基因, 其产物不仅决定细胞的形态结构, 而且执行特定的生理功能。目前, 人们可用基因芯片(gene chip)技术检测某一类型细胞中所表达的几乎所有种类的mRNA及其丰度, 用双向电泳和质谱技术等分析蛋白质表达谱, 从而为深入了解细胞分化的机制提供了重要的研究途径。

#### (二) 管家基因与组织特异性基因

细胞分化是通过严格而精密地调控基因表达实现的。分化细胞基因组所表达的基因大致可分为两种基本类型: 一类是管家基因, 另一类称为组织特异性基因(tissue-specific gene)。管家基因是指所有细胞中均表达的一类基因, 其产物是维持细胞基本生命活动所必需的, 如糖酵解酶系基因等。这类基因一般在细胞周期S期的早期复制。组织特异性基因是指不同类型细胞中特异性表达的基因, 所以又称细胞类型特异性基因(cell type-specific gene)。其产物赋予各种类型细胞特异的形态结构特征与特异的功能, 如卵清蛋白基因、胰岛素基因等。这类基因的复制一般也在细胞周期S期的早期, 但是在不表达这类基因的其他细胞里, 则在S期的晚期复制。

与细胞分化相关的基因在时间与空间上的差异表达, 不仅涉及基因转录水平和转录后加工水平上的调控, 而且涉及染色体和DNA水平(如DNA与组蛋白的修饰)以及蛋白质翻译和翻译后加工与修饰等复杂而严格的调控过程。

早期实验结果提示, 在哺乳动物基因组中, 多数基因为管家基因。然而, 随着DNA芯片实验技术的发展以及检测的细胞类型的增多, 人们发现真正意义上的管家基因可能仅占基因总数很少一部分(有人估计不超过3%)。一般管家基因转录的起始部位没有TATA框, 仅有CG富集区(又称CG岛)。其内含子相对很短。管家基因编码的产物多为细胞基础代谢活动所需的酶类、核糖体蛋白、膜转运蛋白, 以及细胞周期调控的主要蛋白质等细胞生命活动必需的蛋白质。相形之下, 组织特异性基因占基因总数的绝大多数, 它们调控并参与了细胞分化和组织与器官的构建。

表 15-2 分子杂交技术检测基因及其 mRNA 的表达

	细胞总 DNA			细胞总 RNA		
	输卵管细胞	成红细胞	胰岛 $\beta$ 细胞	输卵管细胞	成红细胞	胰岛 $\beta$ 细胞
卵清蛋白基因探针	+	+	+	+	-	-
$\beta$ -珠蛋白基因探针	+	+	+	-	+	-
胰岛素基因探针	+	+	+	-	-	+
实验方法	Southern 杂交			Northern 杂交		

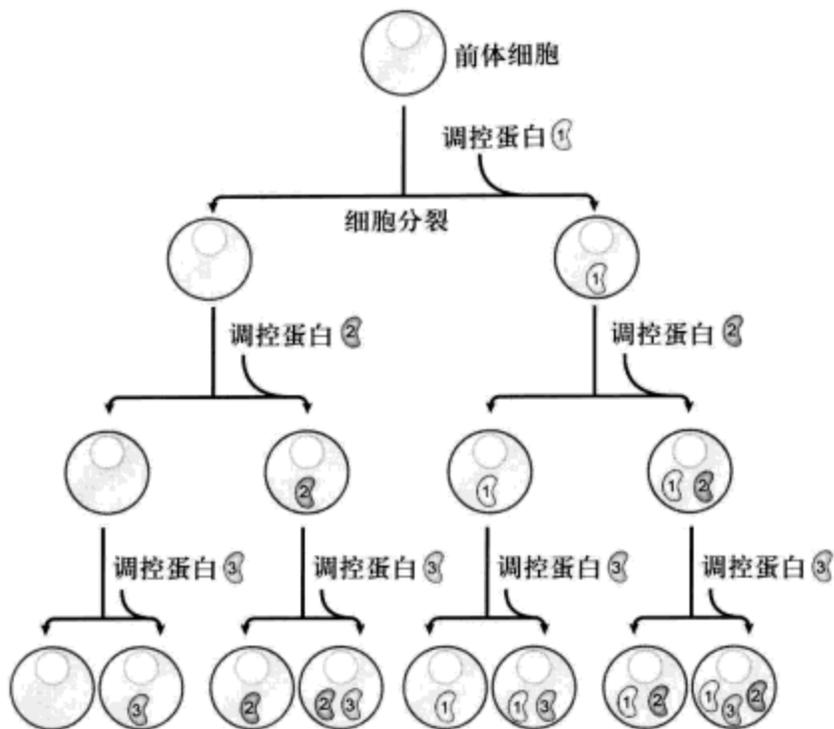


图 15-1 组合调控的作用机制示意图

3 种调控蛋白（分别以 1、2、3 表示）理论上可以调控产生 8 种不同类型的细胞。

### （三）组合调控引发组织特异性基因的表达

人体至少有 200 多种不同类型（有的学者认为有 500 种以上）的细胞。如果每种类型的细胞分化都需要一种调控蛋白的话，那么至少需要 200 种以上的调控蛋白。然而，实际上是有限的少量调控蛋白启动了为数众多的特异细胞类型的分化程序。其机制就是组合调控（combinational control）的方式，即每种类型的细胞分化是由多种调控蛋白共同参与完成的。这样，如果调控蛋白的数目是  $n$ ，则其调控的组合在理论上可以启动分化的细胞类型为  $2^n$ 。在理论上，3 种调控蛋白（调控蛋白 1、2、3）可以调控产生 8 种不同类型的细胞（图 15-1）。

在启动细胞分化的各类调节蛋白中，往往存在一两种起决定作用的调控蛋白，编码这种蛋白的基因称为主导基因（master gene）。有时，主导基因的表达就有可能启动整个细胞的分化过程。例如，MyoD 是一种在成肌细胞分化为骨骼肌细胞过程中的关键性调控蛋白。如果将其基因转入体外培养的成纤维细胞中表达，结果使来自皮肤结缔组织的成纤维细胞表现出骨骼肌细胞的特征，例如合成大量的肌动蛋白和肌球蛋白，在质膜上产生对神经信号敏感的受体蛋白和离子通道蛋白，并融合成肌细胞样的多核细胞等。显然在成纤维细胞中已经具备了肌细胞特异性基因表达所需要的其他必要调控蛋白，一旦加入 MyoD 后，即形成了启动肌细胞分化的特

异的调控蛋白组合。

借助于组合调控，一旦某种关键性基因调控蛋白与其他调控蛋白形成适当的组合，不仅可以将一种类型的细胞转化成另一种类型的细胞，而且遵循类似的机制，甚至可以诱发整个器官的形成。这一点已在研究果蝇、小鼠和人眼发育中得到证实。在眼的发育中，有一种关键性调控蛋白称 Ey（果蝇）或 Pax-6（脊椎动物）。如在发育的早期，把果蝇 *ey* 基因转入到将发育成腿的幼虫细胞中表达，结果诱导产生构成眼的不同类型细胞的有序三维组合，最终在腿的中部形成眼。显然 Ey 蛋白除了能启动细胞某些特异基因的表达，诱导某种类型细胞分化外，其启动的某些基因本身可能又调控另一些基因，它们进一步启动其他特异基因表达，诱导分化出更多的细胞类型，形成由多种不同类型细胞组成的有序三维群体即器官的形成。

通过一种关键性调节蛋白对其他调节蛋白的级联启动，是一种令人惊奇的高效而经济的细胞分化调控机制。复杂的有机体正是通过这一机制的重复运行逐渐完成形态建成的。

### （四）单细胞有机体的细胞分化

细胞分化并非多细胞有机体独有的特征，单细胞生物甚至原核生物也存在细胞分化，如原核生物枯草杆菌芽孢的形成，鱼腥藻（一种蓝藻）具有正常增殖的营养体细胞和具有固氮作用的异形胞（见图 2-7）。

真核生物芽殖酵母有 3 种不同类型的细胞：二倍体细胞 ( $\alpha/a$ ) 和由单倍体孢子萌发形成的  $\alpha$  和  $a$  两种交配型。目前人们对上述细胞分化的机理已经有较深入的了解，这也为多细胞有机体细胞分化的研究提供了有意义的资料。黏菌（如盘形网柱黏菌 *Dictyostelium discoideum*）的营养体是直径约 1 mm，如同变形虫似的单细胞有机体。在孢子形成过程中，由单细胞变形体形成多细胞的蛞蝓形假原质团（pseudoplasmodium），并进一步分化成为菌柄和孢子（图 15-2）。在每一个过

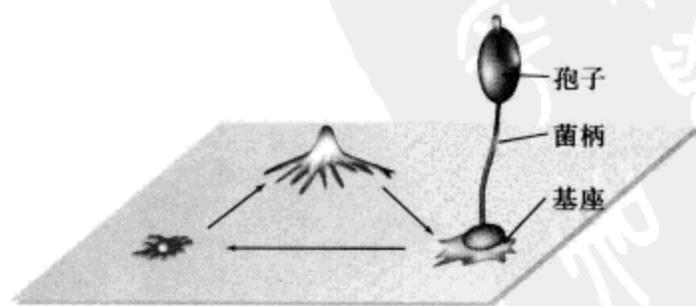


图 15-2 黏菌繁殖过程示意图

程中,均涉及一系列特异基因的表达。这也是研究低等生物体细胞分化的一种很好的材料。然而与多细胞有机体细胞分化的不同之处是:前者多为适应外界的生活环境的改变,而后者则通过细胞分化构建执行不同功能的组织与器官。因此,多细胞有机体在其分化程序与调节机制方面显得更为复杂。

## (五) 转分化与再生

一种类型的分化细胞转变成另一种类型的分化细胞的现象称转分化(transdifferentiation),如水母横纹肌细胞经转分化可形成神经细胞、平滑肌细胞和上皮细胞,甚至可形成刺细胞。分化程度低的神经干细胞也可形成骨髓细胞和淋巴样细胞。然而,对高等动物成体干细胞的转分化现象及其机理还有待于进一步研究。

转分化往往经历去分化和再分化的过程。去分化又称脱分化,是指分化细胞失去其特有的结构与功能变成具有未分化细胞特征的过程。植物的体细胞在一定条件下形成未分化的细胞团——愈伤组织,即为脱分化现象。愈伤组织可进一步被诱导,使其再分化形成根和芽的顶端分生组织的细胞,并最终长成植株。高等动物的克隆也涉及细胞去分化的过程,但已分化细胞的细胞核需要在卵细胞质中才能完成其去分化的程序。这一过程又称为重编程(reprogramming),其中涉及DNA与组蛋白修饰的改变。

生物界普遍存在再生现象(regeneration)。广义的再生可包括细胞水平、组织与器官水平及个体水平的再生。但一般再生是指生物体缺失部分后重建的过程,如幼体蟾蜍附肢切除后,伤口处部分细胞凋亡,多数细胞(包括皮肤、肌肉、软骨和其他结缔组织的细胞)经去分化形成间充质或成纤维细胞样的细胞团——再生芽基(regeneration blastema)。芽基细胞再分化形成以有序方式排列的从肱骨直至指骨的完整附肢。

另一典型的例子是沃尔夫晶体的再生(Wolftian lens regeneration)。若将发育中的蝶螈晶状体摘除,其背面的虹膜上含黑色素的平滑肌细胞就会去分化,失去黑色素和肌纤维,然后再分化或转分化成为产生晶状体蛋白的晶状体细胞。

不同的有机体,其再生能力有明显的差异。一般来说,植物比动物再生能力强,低等动物比高等动物再生能力强。从只有二胚层的腔肠动物水螅中部切下仅占体长5%的部分,便可长成完整的水螅;具有三胚层的扁

形动物涡虫同样具有极强的再生能力,目前已成为研究机体再生与干细胞的增殖和分化的一种模式生物。而两栖类却只能再生形成附肢,人和其他高等动物只具有组织水平(除胚外)的再生能力。再生的能力通常随个体年龄增大而下降。

再生现象从另一个侧面反映了细胞的全能性。在不同物种中,细胞分化状态的可塑性有很大不同。DNA的复制有利于重新编程和获得新的分化状态。当然,在再生过程中,有些细胞并不涉及转分化,如肝细胞只是从G<sub>0</sub>期进入细胞周期。此外,再生过程往往需要干细胞的参与并涉及细胞的凋亡。

## 二、细胞的全能性与多能干细胞

### (一) 细胞的全能性

细胞全能性(totipotency)是指细胞经分裂和分化后仍具有形成完整有机体的潜能或特性。动物的受精卵及卵裂早期的胚胎细胞是具有全能性的细胞。植物的体细胞在适宜的条件下可培育成正常的植株,这不仅为细胞全能性提供了有力的证据,而且也广泛地应用在植物基因工程的实践中。然而对动物细胞特别是高等动物的细胞,随着胚胎的发育和细胞分化,细胞逐渐丧失了发育成个体的能力,仅具有分化成多种细胞类型及构建组织的潜能,这种潜能称为多能性(pluripotency)。具有分化潜能的细胞称为干细胞(stem cell)。

在整个发育过程中,细胞分化潜能逐渐受到限制,即由全能性细胞转化为多能和单能干细胞(图15-3)。但是对于细胞核而言,却始终保持其基因组的全能性。如在早期的研究中,利用两栖类动物进行核移植试验证明,将蛙的囊胚期细胞甚至发育成蝌蚪的已经分化为肠上皮细胞的细胞核植入去核的卵子中,可发育成蝌蚪甚至发育成蛙。

1997年人们将羊的乳腺细胞的细胞核植入去核的羊卵细胞中,成功地克隆了多莉羊以及随后关于小鼠、牛、猪、猴、大鼠和狗等一系列动物克隆成功的报道,进一步证明了即使是哺乳动物终末分化的细胞,其细胞核也具有全能性。然而与植物细胞不同,高等动物的体细胞至今仍不能发育成一个完整的个体。它不仅显示高等动物细胞分化的复杂性,而且也说明其卵细胞的细胞质对细胞分化的重要作用。哺乳动物克隆技术的基本理论问题或主要难题之一是供体细胞核的重编程问题,即已分化的细胞特别是细胞核中的染色质如何重新“编

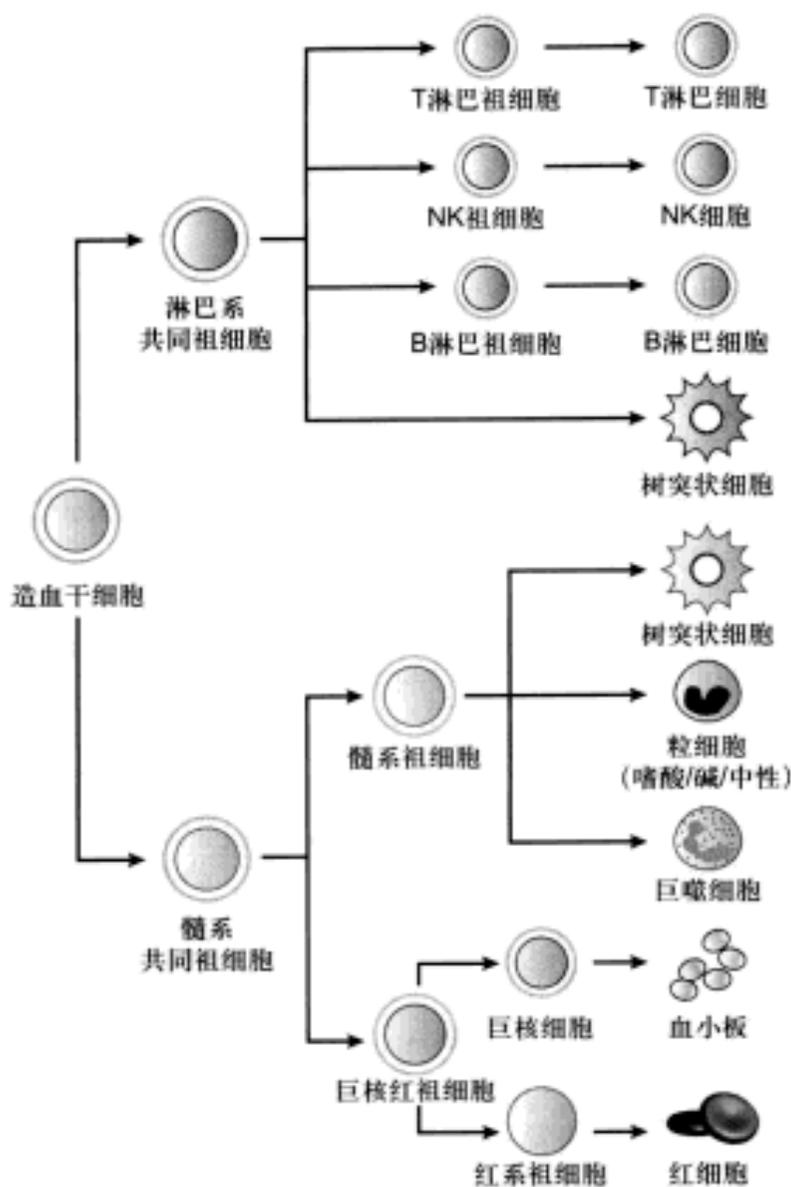


图 15-3 造血干细胞逐级分化为各种类型的血细胞

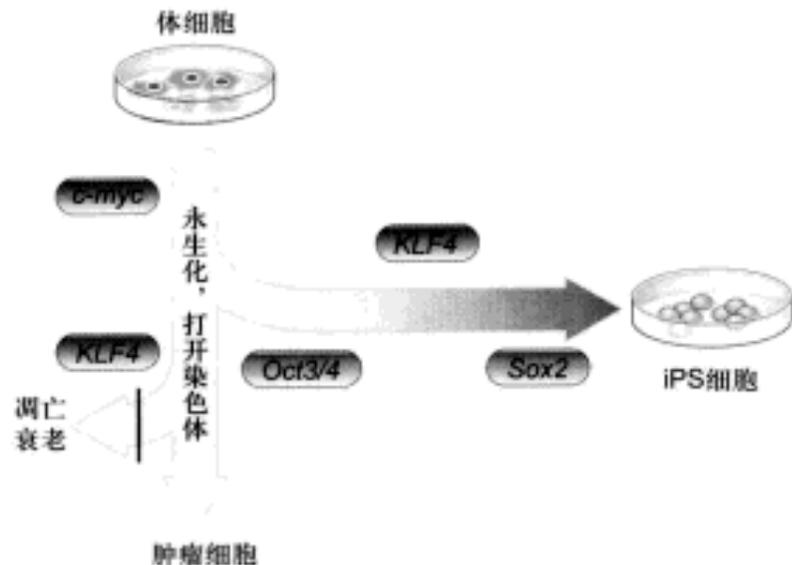


图 15-4 iPS 细胞建系过程的示意图

建立 iPS 细胞系所转入的 4 种基因在重编程过程中, 起非常重要的作用。

## (二) 干细胞

干细胞是机体中能进行自我更新(产生与自身相同的子代细胞)和多向分化潜能(分化形成不同细胞类型)并具有形成克隆能力的一类细胞。因此, 它们在细胞分化和个体发育中, 起着关键和决定性的作用。

根据的分化潜能不同, 干细胞可分为全能干细胞(totipotent stem cell)、多能干细胞(pluripotent stem cell)和单能干细胞(unipotent stem cell)。干细胞最终形成特化细胞类型的过程称为终末分化(terminal differentiation)。

根据来源不同, 干细胞又可分为胚胎干细胞(embryonic stem cell)和成体干细胞(adult stem cell)。成体干细胞还可以根据干细胞的组织来源分为造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞、肌肉干细胞等。因此, 成体干细胞又称组织干细胞。

实际上, 真正含义上的哺乳动物全能干细胞只有受精卵和卵裂早期的细胞(一般不超过 16 个细胞的卵裂球)。它们不仅可以分化产生 3 个胚层中的各种类型的细胞, 而且还能发育成胎盘组织, 最终产生子代个体。多潜能干细胞通常是指在一定条件下, 能分化产生 3 个胚层中的各种类型的细胞并形成器官的一类干细胞, 如胚胎干细胞和生殖嵴(genital ridge)干细胞。小鼠的胚胎干细胞在体内和体外都可以分化产生 3 个胚层的各种细胞类型, 当移植到发育的囊胚中后, 还可以发育成新生的个体。因此也有人认为, 胚胎干细胞是一种全能干细胞。但如将其植入子宫中, 由于不能分化成胚外组织, 所以无法发育成正常个体。

程”回到初始未分化的细胞状态, 然后才有可能沿正常的发育程序分化成各种类型的细胞。

2006 年, 日本京都大学教授山中伸弥(Shinya Yamanaka)实验室发现向小鼠的成纤维细胞中转入 4 种基因(*Oct4*、*Sox2*、*c-myc* 和 *KLF4*)就可以诱导产生一种多能干细胞, 称“诱导多能干细胞”(induced pluripotent stem cell, iPS cell), 其性质与胚胎干细胞类似(图 15-4)。随后, 几个实验室同时应用类似的技术, 将人成纤维细胞等体细胞诱导产生了人的 iPS 细胞。2008 年我国的周琪等两个实验室进一步证明了植入小鼠囊胚中的 iPS 细胞, 可以发育成小鼠。上述实验结果表明了 iPS 细胞与胚胎干细胞极其相似, 从而极大推进了细胞重编程机理的研究, 进一步加深了人们对细胞全能性的理解, 同时为多能干细胞的临床应用开创了一条新的途径。

目前, 虽然重编程的机理还很不清楚, 但至少证明细胞重编程与染色质的修饰如 DNA 的甲基化、组蛋白的甲基化和乙酰化等密切相关。显然卵细胞的细胞质和

存在于人体骨髓中的造血干细胞可以分化成红细胞、血小板和淋巴细胞等十种以上的血细胞（见图 15-3），骨髓间充质干细胞也具有分化为成骨细胞、软骨细胞等多种分化潜能。通常称这类干细胞为多能干细胞。它们属于成体干细胞的范畴，其分化的潜能是有限的，一般局限于分化产生同一胚层的细胞类型。单能干细胞仅能分化产生一种或几种类型的细胞。如小肠上皮中的干细胞，能够分化为小肠上皮细胞等 4 种细胞；神经干细胞可分化产生神经元、寡突胶质细胞和星形胶质细胞等 3 种细胞；而肝胆管中的干细胞仅能产生肝细胞和胆管细胞。显然这与各种干细胞所存在的部位和它们所承担的功能相关。由于各种干细胞，特别是多数组织干细胞还没有发现其确切的表面标志分子，因而也就无法识别和纯化，这就给研究成体干细胞的发生以及其分化潜能带来很大的困难。因此上述对干细胞分类的认识，还需要充实和完善。

成体干细胞的数量很少，如骨髓中的造血干细胞仅占骨髓细胞总数的万分之一，而且增殖速率很慢。干细胞的增殖表现为 2 种方式：对称性分裂和不对称性分裂。前者用于干细胞自身数目的扩增，而后者除了自我更新外，还产生了分化的细胞。早期分化的细胞称为祖细胞或前体细胞，它们可以大量扩增，并进一步分化产生各种不同类型的细胞（见图 15-3）。这些复杂的过程是在特定的微环境（niche）中，精确调控完成的。因此，在体外培养条件下，如何在干细胞传代培养过程中，维持其自身的特性不变，以及如何在体外诱导干细胞向某种类型细胞的定向分化，一直是干细胞研究领域中所面临的难题。

### （三）胚胎干细胞

1981 年，英国科学家 M. J. Evans 等首次在外体建立了小鼠胚胎干细胞系。小鼠胚胎干细胞具有向 3 个胚层细胞分化的潜能，植入胚胎后，参与正常的胚胎发育和器官的形成，在特定的条件下还能发育成正常的小鼠。这项研究为基因打靶技术的建立打下了基础，开创了哺乳动物功能基因组学研究的新途径，并于 2007 年获诺贝尔生理学或医学奖。

1998 年，美国威斯康星大学教授 J. A. Thomson 等在建立灵长类动物恒河猴胚胎干细胞系的基础上，又成功地建立了人胚胎干细胞系（图 15-5）。这一成果极大地推进了细胞分化，特别是人类细胞分化机理研究的发展，而且开辟了生物医学一个崭新的领域。

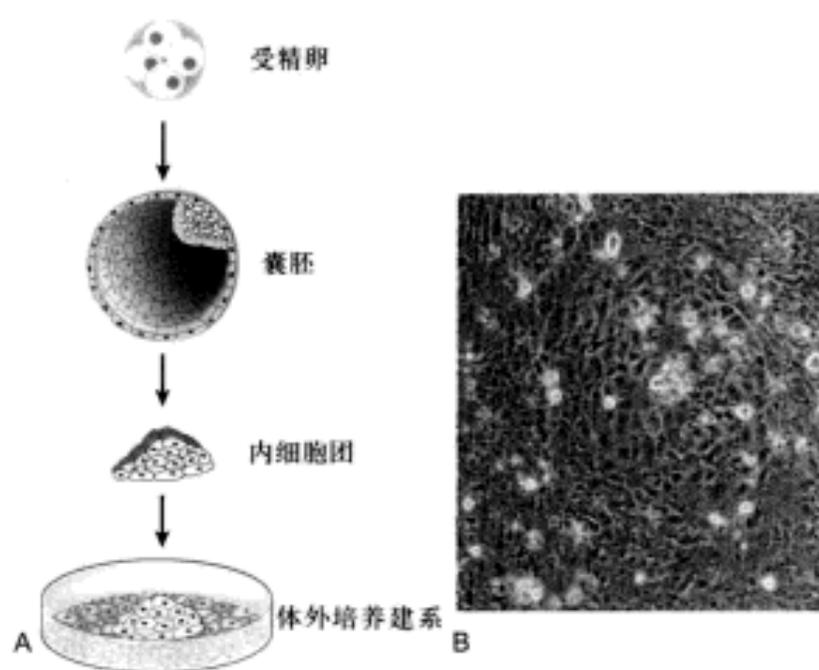


图 15-5 人胚胎干细胞建系的示意图

A. 人胚胎发育 5-6 天至囊胚期时，取出内细胞团。分散后培养在体外的滋养层细胞（一般为经处理后，不能继续分裂的小鼠成纤维细胞）上，随后传代培养建系。B. 体外培养的人胚胎干细胞。（B 图由邓宏魁博士惠赠）

人胚胎发育 5-7 天形成的结构称为囊胚（图 15-5），此时细胞已经出现了明显的分化：囊胚的外表由一层致密的扁平细胞组成，称为滋养层，这层细胞将发育成胎盘等胚外组织；囊胚中心的空腔称为囊胚腔，腔内的一侧有一团细胞，称为“内细胞团”（约 140 个细胞）。内细胞团的细胞均为未分化的细胞，随着胚胎的发育，它们将进一步分化形成 3 个胚层的 200 多种细胞，最终发育成人体的各种组织与器官。

Thomson 等从 14 个通过体外受精的人卵细胞发育而来的囊胚中分离出了内细胞团，培养在经  $\gamma$  射线照射后不再分裂的小鼠胚胎成纤维细胞（mouse embryonic fibroblast），即饲养层细胞上。随后加入特定成分的培养基进行增殖和传代，最终得到了 5 株具有正常 XY 或 XX 核型的人的胚胎干细胞系。同年，约翰霍普金斯大学的 J. Gearhart 教授等采用了与 Thomson 小组不同的方法，从 5-9 周龄流产胎儿的生殖嵴中，也获得了具有正常核型的干细胞系，称为胚胎生殖嵴干细胞。此后，在 Thomson 等工作的基础上，包括我国在内的很多国家的实验室相继建立了多株人胚胎干细胞系（图 15-5B）。

基于人胚胎干细胞系的建立和克隆羊的成功，2001 年 B. Haseltine 提出了再生医学（regenerative medicine）的概念，这一旨在将治疗性克隆技术与人胚胎干细胞的

论和应用上的研究又迈进了关键的一步。

### 三、影响细胞分化的因素

基因的选择性表达主要是由调节蛋白所启动。调节蛋白的组合是影响细胞分化的主要的直接因素。一般来说,这种影响主要受胞外信号系统的调控,而胞外信号及细胞微环境又是通过细胞的信号转导调控网络来起作用。在很多物种中影响细胞分化的胞内因素可以追溯到单细胞受精卵中细胞质的作用。此外,外部的环境对某些物种细胞分化乃至个体发育也会产生很大的影响。

#### (一) 受精卵细胞质的不均一性对细胞分化的影响

在卵母细胞的细胞质中除了储存有营养物质和各种蛋白质外,还含有多种 mRNA。其中多数 mRNA 与蛋白质结合处于非活性状态,成为隐蔽 mRNA,不能被核糖体识别。在卵母细胞发育到卵细胞的过程中,很多物种其 mRNA 在卵细胞质中呈不均匀分布,受精后部分母体 mRNA 被激活,合成早期胚胎发育所需要的蛋白质。随着受精卵早期细胞分裂,隐蔽 mRNA 也不均一地分配到子细胞中。通过对角贝和海胆受精卵发育的研究证明,在卵裂过程中不同的细胞质分配到不同的子细胞中,从而决定未来细胞分化的命运,产生分化方向的差异。根据这一现象,人们提出了决定子(determinant)的概念,即指影响卵裂细胞向不同方向分化的细胞质成分。通过对果蝇生殖细胞和体细胞分化过程的比较研究,证明了果蝇卵细胞后端存在决定生殖细胞分化的细胞质成分即生殖质(germplasm),它就是种质细胞的决定子。在很多物种中,决定细胞向某一方

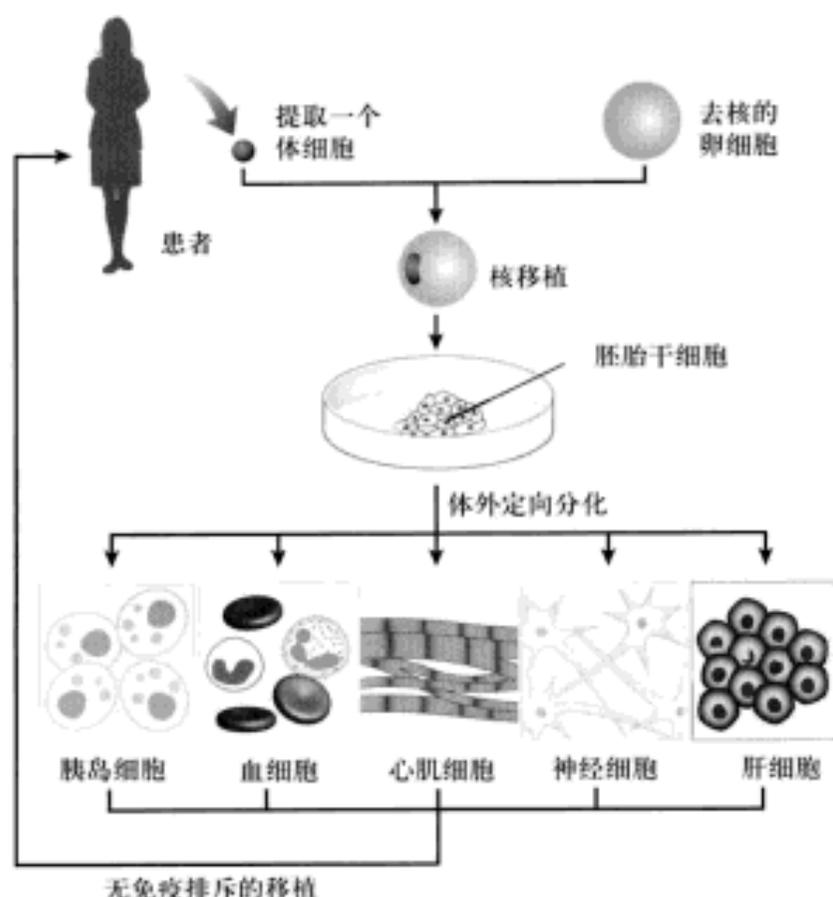


图 15-6 人类的治疗性克隆与再生医学的设想

制备相结合,利用体外构建的自身组织与器官来使患者得以康复的新的治疗理念,极大地促进了干细胞体外定向分化及其相关领域研究的发展(图 15-6)。近年来,由胚胎干细胞定向诱导分化成造血细胞、神经细胞、肌肉细胞以及胰岛 $\beta$ 细胞(图 15-7)等一系列的研究结果,不仅加深了对细胞全能性和细胞分化机理的了解,而且在细胞治疗及用于组织与器官移植的组织工程(tissue engineering)的研究与实践都具有重要意义。

iPS 细胞系的建立,使人们有可能避开使用人的卵细胞以及所涉及的颇有争论的伦理问题,使干细胞在理

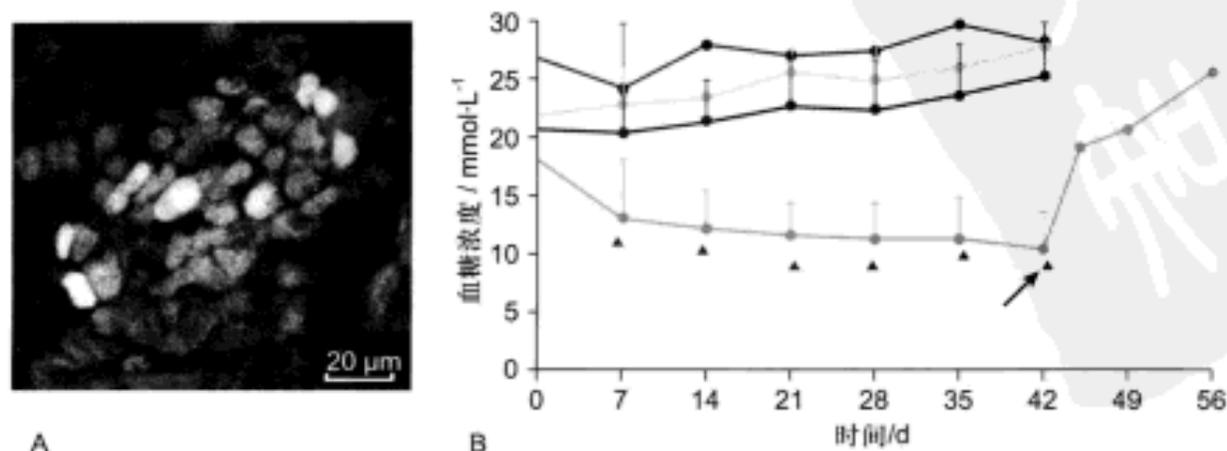


图 15-7 人的胚胎干细胞诱导分化成胰岛 $\beta$ 细胞

A. 体外诱导产生的经 3 种特异标志蛋白染色的胰岛 $\beta$ 细胞。B. 将这些细胞移植到糖尿病模型小鼠体内,一周后,小鼠的血糖趋于正常。移植后 6 周取出移植体(箭头所指),结果血糖明显升高。(A 图由邓宏魁博士惠赠)

向分化的初始信息储存于卵细胞中，卵裂后的细胞所携带的信息已开始有所不同，这种区别又通过信号分子影响其他细胞产生级联效应。这样，最初储存的信息不断被修饰并逐渐形成更为精细、更为复杂的指令，最终产生分化各异的细胞类型。

## (二) 胞外信号分子对细胞分化的影响

在研究早期胚胎发育过程中发现，一部分细胞会影响周围细胞使其向一定方向分化，这种作用称近端组织的相互作用 (promixate tissue interaction)，也称为胚胎诱导 (embryonic induction)。其中一个典型的例证就是在眼发生中的逐级诱导过程。正常情况下，早期的视泡诱导与之接触的外胚层上皮细胞发育成晶状体，随后在视泡和晶状体的共同诱导下，外侧的表皮细胞形成角膜。如果把早期的视泡移植在头部的其他部位，也可诱导与之接触的外胚层发育成晶状体。

近端组织的相互作用主要通过细胞旁分泌产生的信号分子来实现的，已知至少包括成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) 以及 Wnt 家族等。干细胞生物学特性的维持及其定向分化也都是由不同的信号分子的组合作用

得以实现 (图 15-8)。

另一种远距离细胞间相互作用对细胞分化的影响主要是通过激素来调节的。如无尾两栖类的蝌蚪变态过程中，尾部退化及前后肢形成等变化是由甲状腺分泌的甲状腺素和三碘甲状腺原氨酸增加所致，昆虫变态过程主要是由 20-羟蜕皮素和保幼素共同调控的。

此外，人体血细胞定向分化也受到多种细胞因子的调控。

## (三) 细胞间的相互作用与位置效应

在胚胎学研究中，人们早已注意到细胞间的相互作用对细胞分化与器官构建的影响，即胚胎诱导，胚胎诱导作用可分成不同的层次并不断强化。虽然人们对胚胎诱导作用的机制还不完全清楚，但旁分泌的信号分子的作用显然是其主要因素。

细胞所处的位置不同对细胞分化的命运有明显的影响。实验证明，改变细胞所处的位置可导致细胞分化方向的改变，这种现象称位置效应 (position effect)。如在鸡胚发育的原肠胚期，在由脊索 (notochord) 细胞分泌的由 *shh* (sonic hedgehog) 基因编码的信号蛋白的作用下，靠近脊索的细胞分化形成底板 (floor plate)，而远

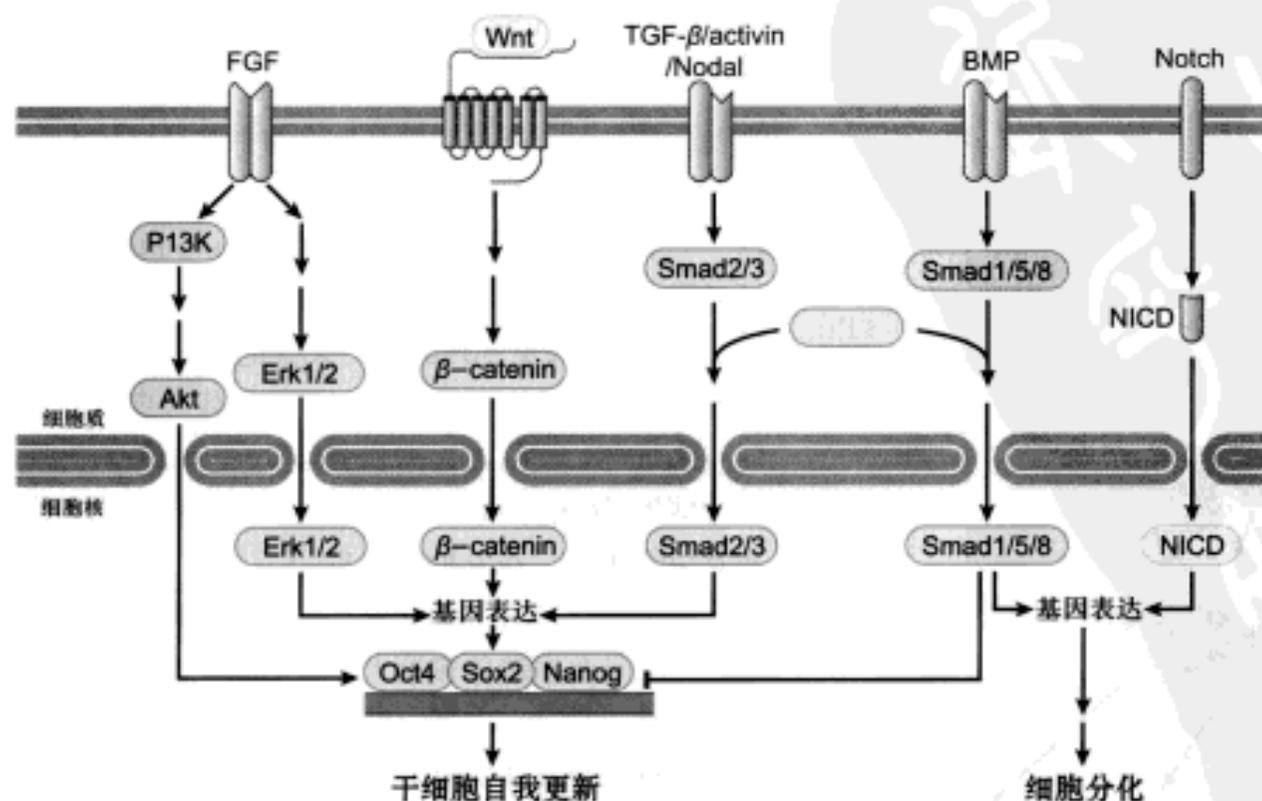


图 15-8 与人胚胎干细胞的维持相关的主要信号分子及信号通路示意图

在 FGF、Wnt 和 TGF-β 等信号分子的作用下，转录因子 Oct4、Sox2 和 Nanog 等的基因得以表达，进而使相关的基因转录维持干细胞的状态。而 TGF-β 超家族的另一成员——骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 具有抑制人胚胎干细胞的自我更新和诱导细胞分化的双重功能。

离脊索的细胞分化成运动神经元，如将另一个脊索植入鸡胚中线一侧，则会以同样方式诱导底板和运动神经元的发育。

如果 *shh* 基因发生突变，则会导致中枢神经系统发育异常，甚至可出现面部仅有一只眼和一个鼻孔的畸胎。同样，*shh* 蛋白也通过位置效应调节肢体的发育。趾的长度、形态和内部结构，均受控于细胞与这一蛋白信号分子源的距离，即取决于 *shh* 蛋白的浓度或某些由它调控的其他因子的浓度

近年来，通过对胚胎干细胞其中包括人胚胎干细胞在内的细胞定向分化的研究显示，细胞分化与3个胚层发生这一复杂的过程，不仅依赖于各种信号分子的组合，而且与其浓度也就是细胞相互的位置密切相关（图15-9）。人们越来越关注细胞所处的微环境，它对细胞状态的维持以及分化的命运往往起着决定性的作用。

#### （四）细胞记忆与决定

信号分子的有效作用时间是短暂的，然而细胞可以将这种短暂的作用储存起来并形成长时间的记忆，逐渐向特定方向分化。果蝇幼虫的成虫盘（*imaginal disc*）是一些未分化的细胞群，在幼虫变态过程中，不同的成虫盘发育为成虫不同的器官，如腿、翅和触角等。人们

曾把果蝇幼虫的成虫盘细胞植入成虫体内，连续移植9年，细胞增殖多达1800代，然后将这种成虫盘细胞再移植回幼虫体内，依然发育成为相应的器官。

早期的研究提出“决定早于分化”这一概念，所谓决定（*determination*）是指一个细胞接受了某种指令，在发育中这一细胞及其子代细胞将区别于其他细胞而分化成某种特定的细胞类型，或者说在形态、结构与功能等分化特征尚未显现之前就已确定了细胞的命运。

细胞的决定与细胞的记忆有关，而细胞记忆可能通过两种方式实现：一是正反馈途径（*positive feedback loop*），即细胞接受信号刺激后，激活转录调节因子，该因子不仅诱导自身基因的表达，还诱导其他组织特异性基因的表达。二是染色体结构变化（DNA与蛋白质相互作用及其修饰）的信息传到子代细胞，如同两条X染色体中，其中一条始终保持凝集失活状态并可在细胞世代间稳定遗传一样。上述细胞记忆的机理也可以用来解释某些能够继续增殖的终末分化细胞，如平滑肌细胞和肝细胞分裂后只能产生与亲代相同的细胞类型。近年来表观遗传学的研究结果，表明了染色质构象的改变及DNA与组蛋白的化学修饰在基因表达中的重要作用，显然，这与细胞的记忆与决定有密切的关系。

#### （五）环境对性别决定的影响

性别决定是细胞分化和生物个体发育研究领域的重要课题之一。环境对性别决定的影响早已被人们发现和研究，其中典型的例子是许多爬行动物，如两种蜥蜴（*Agama agama* 和 *Eublepharis macularius*），它们在较低温度条件下（24℃）全部发育为雌性，而温度提高（32℃）则全部发育为雄性。某些龟类（*T. graetta* 和 *C. caretta*）又出现相反的情况，即在较低温度条件下全部发育为雄性，而温度提高则全部发育为雌性。另外，有一种蜗牛（*Crepidula*），它们的性别决定取决于个体间的相互位置关系，在它们形成的上下相互叠压的群体中，位于下方的个体发育为雌性，而位于上方的个体发育为雄性。斑马鱼在群体密度大，营养条件差时，大部分发育成雄性；反之，大部分发育成雌性。人们对于环境影响性别的机制还不清楚，但是它无疑表明，环境因素对细胞分化可产生影响，并进而影响到生物的个体发育。但是，这些影响因素又都是通过细胞自身的遗传机构发挥作用的。因此总的来说，个体发育中的细胞分化的基础建立在细胞的内部，而环境因素只是条件。

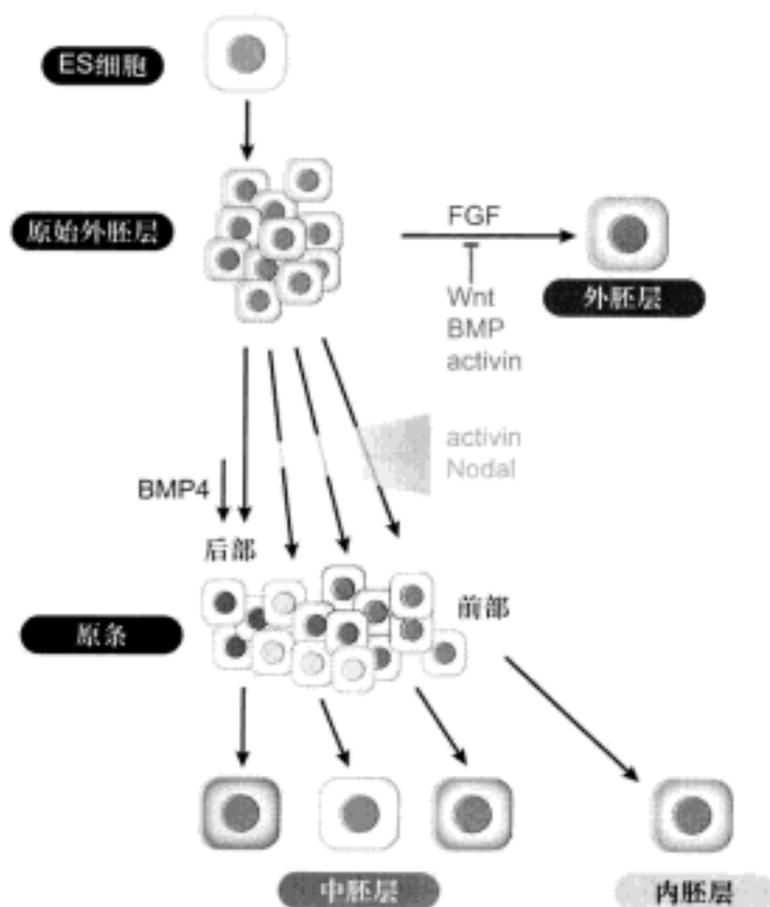


图 15-9 细胞分化与3个胚层发生的分子机理的示意图

## （六）染色质变化与基因重排对细胞分化的影响

一百多年前人们就发现马蛔虫在卵裂过程中，染色体出现消减现象，追踪至 32 个细胞的分裂球阶段，发现除一个细胞（将分化成生殖细胞）保留正常的染色体外，其余将分化成体细胞的细胞中，全部出现染色体丢失。显然这是细胞分化的一个特例，但在当时成为种质学说的重要依据。

原生动物纤毛虫的营养核中，染色体 DNA 也存在大量缺失的现象。纤毛虫类（如草履虫、四膜虫）的细胞内存在 2 个细胞核，小核称为生殖核，包含完整的二倍体基因组，但基因基本不表达；大核称为营养核，丢失 10%~90% 的 DNA，剩余的 DNA 经重排与扩增后形成多倍体，其基因活跃地转录并决定其一切表型特征。大核是在有性生殖过程中，由小核发育而来，细胞虽未分化但细胞核“分化”成 2 种不同的类型。

基因重排是细胞分化的另一种特殊方式。抗体是由浆细胞分泌的，而浆细胞是由 B 淋巴细胞分化而来。在这一过程中，B 淋巴细胞中的 DNA 经过断裂丢失与重排的复杂变化从而利用有限的免疫球蛋白基因，在理论上可表达出数百亿种抗体。T 淋巴细胞在分化过程中也存在类似的基因重排现象。

## 第二节 胚胎发育中的细胞分化

细胞是构成生命的基本单位。有些生物仅由单个细胞构成，称之为原生生物 (protozoan)；更多的生物则由很多个细胞组成，称为后生生物 (metazoan)。两类生物的生命周期都肇始于单细胞，所不同的是原生生物终生维持单细胞状态，而后生生物则经历一个由单细胞到多细胞的过程，最终形成成熟的个体，这个过程称为发育 (development)。这也是将大多数多细胞生物称作后生生物的原因。

后生生物，尤其是后生动物的发育过程，是最为复杂的生命过程，也是最为神奇、最引人入胜的生命过程。从单细胞的受精卵 (fertilized egg, 也称为合子 zygote) 到多细胞的胚胎再到成体的过程，实际上是一个受到精密调控的细胞分裂、迁移和分化、凋亡的过程，而细胞分化是整个发育的基础与核心。后生生物个体的

最终形成，则是细胞分化最为辉煌的“杰作”。如同仅 88 个键的钢琴能够演奏出无限多美妙的乐曲，生命体内相对有限的基因也能够依靠组合调控，形成各种形态功能迥异的细胞，精确地构建成各类组织、器官以及多姿多彩的生命体。

这里仅以哺乳动物生殖细胞和中枢神经细胞的分化为例，介绍发育的基本过程。

### 一、生殖细胞的分化

发育过程大都起始于受精卵，它是两性生殖细胞融合的产物。从种系 (germ line) 的发生来看，专司生殖功能的性细胞从体细胞 (somatic cell) 分化出来，被认为是后生生物起源的重要标志，并且随着进化水平的提高，生殖细胞的分化程度也呈现不断提高的趋势。生殖细胞的另一重要特征还在于，高度终末分化的精子和卵子一旦结合，既有的分化标记则被全部抹去，从而成为一个新生命的起点，分化产生各种类型的细胞。以下我们主要以哺乳动物为例，看看生殖细胞是如何分化的。

#### （一）哺乳动物的性别分化

大多数高等动物和很多高等植物都有明显的两性分化，性别分化对有性生殖和几乎所有后生动物的繁衍都是至关重要的。亚里士多德 (Aristotle) 认为，雄性动物在性行为过程中的体温决定了后代的性别。对于大多数爬行动物而言，亚里士多德的观点基本接近事实：它们后代的性别由卵孵化时的温度决定（详见第一节）。对于包括人在内的哺乳动物而言，温度几乎起不到任何作用，性别由一对特殊的染色体——性染色体决定。雌性哺乳动物的二倍体细胞含有两个 X 染色体（人类为 46, XX），而雄性仅含一条 X，另一条是比 X 染色体小得多的 Y（人类为 46, XY）。

##### 1. SRY 的发现

性别分化的本质实际上是细胞分化，确切地说是性腺细胞的分化。性腺是一个极为特殊的器官：大多数器官的发育进程，其细胞分化都仅有一个方向，而性腺的分化却具有两个截然不同的方向——睾丸或卵巢。性腺原基 (primordium) 中的每个细胞都具备这两种分化潜能，那么是什么因素决定性腺原基细胞的分化方向呢？研究表明，哺乳动物的 Y 染色体起了决定性作用：只有一条 X 染色体而没有 Y 染色体的人 (45, X) 发育

为女性；具有两个甚至多个 X 染色体，同时具有 Y 染色体的个体则发育为男性。在 XX-XY 嵌合体小鼠的性腺分化过程中，首先产生的分化细胞是睾丸的支持细胞 (Sertoli cell, 又称为滋养细胞)，而这些细胞几乎都是 XY 核型，未分化的其他细胞中 XX 和 XY 核型则保持平衡。这说明，雄性性腺分化早于雌性，而 Y 染色体的存在对睾丸支持细胞的分化似乎是充分必要的，它决定胚胎发育过程中构成原始生殖腺的体细胞——生殖嵴发育为睾丸，而不是卵巢。在没有 Y 染色体干预的情况下，哺乳动物的生殖嵴会按照既定的分化程序发育为卵巢。由此人们怀疑 Y 染色体上携带决定男性性别的关键基因，称之为睾丸决定因子 (testis-determining factor, *TDF*)。

后来人们从性逆转 (sex reverse) 男性 (46, XX) 的一条 X 染色体上克隆到一段来自 Y 染色体的易位 (translocation) 片段，它编码一个与 DNA 特异序列相结合的转录因子，决定睾丸的发育。人们将这个基因命名为 *SRY* (sex-determining region of Y)。XY 的性逆转女性患者中缺乏 *SRY* 的活性，而在 XX 的小鼠中人为转入 *SRY*，它将发育为雄性而不是雌性。由此，科学家苦苦追寻多年的 *TDF* 终于水落石出，它就是 *SRY*。

## 2. *SRY* 与性腺细胞的分化

性腺是生殖细胞生存和分化成熟的场所。哺乳动物的性腺原基在胚胎发育早期 (人类为第 4 周时) 由体腔上皮和间充质的体细胞形成，生殖细胞的前体——原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC) 则由胚外的尿囊

(allantois) 组织沿肠管逐渐迁移到胚胎内部，经过中肾 (mesonephros) 最终进入生殖嵴原基 (图 15-10)。在人类胚胎发育过程中，原始生殖细胞进入生殖嵴原基发生于第 6 周，但直到第 7 周，男女两性的生殖嵴及乌尔夫氏 (Wolffian) 管、穆勒氏 (Mullerian) 管等附属结构也未显示出任何区别。

人类 *SRY* 基因的表达最初出现于胚胎发育第 41 天的部分生殖嵴细胞中，恰恰与 PGC 到达生殖嵴的时间相符。表达 *SRY* 的这些细胞，最终分化为睾丸中最主要的细胞类型——支持细胞，这也是生殖嵴体细胞中最早产生性别分化的细胞。支持细胞诱导性腺中其他体细胞分化为其他类型的睾丸组成细胞，引导性别分化朝向男性 (雄性) 的方向。具体说来，支持细胞主要有以下 4 个功能：

(1) 支持细胞诱导刚刚到达的 PGC 向精子方向分化，如抑制 PGC 进入减数分裂 (详见下述)，以防止其向卵细胞方向分化；如果将 XY 个体的 PGC 引入其他组织，它们将和卵细胞一样，停留于第一次减数分裂前期。

(2) 分泌抗穆勒氏管激素，通过血液循环作用于中肾管之一的穆勒氏管，促使其退化，从而抑制了雌性生殖管道的形成 (穆勒氏管是输卵管、子宫和阴道上部的前身)。

(3) 支持细胞引导邻近间充质组织中的上皮细胞和平滑肌细胞迁移到正在发育的生殖嵴中，为将来精子的形成提供结构支持。

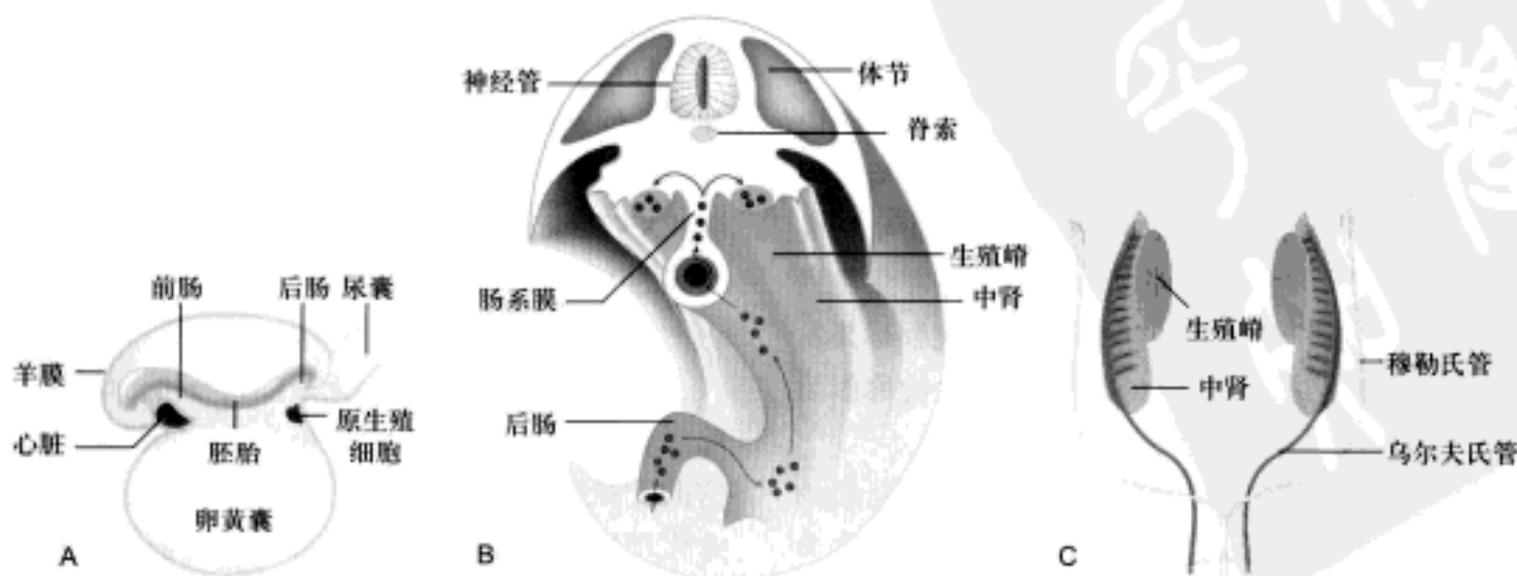


图 15-10 原始生殖细胞的迁移

原始生殖细胞 (PGC) 形成于胚胎发育早期 (小鼠为受精后第 7 天) 的胚外中胚层，首先聚集在尿囊和后肠的交界处 (A)，然后沿卵黄囊的尾部进入后肠，再沿肠系膜向背部迁移，最后通过中肾进入生殖嵴 (B)，PGC 在迁移过程中伴随着快速分裂，数量显著增加。C. 生殖嵴、中肾和乌尔夫氏管、穆勒氏管的相对位置。

(4) 它诱导性腺中其他的体细胞分化为睾丸间质细胞 (myoid cell, 又称为 Leydig 细胞), 间质细胞分泌雄性激素睾酮 (testosterone), 诱导其他雄性生殖器官的发育。在睾酮作用下, 乌尔夫氏管分化为雄性生殖管道, 包括输精管和前列腺等。睾酮还作用于正在发育的脑, 形成性认知、性倾向, 并影响性行为。用睾酮处理发育过程中的雌鼠, 雌鼠长大后的性行为会更像雄性。

在 XX 个体中, 分化为睾丸支持细胞的这部分细胞将分化为卵巢中的滤泡细胞 (follicle cell, 或颗粒细胞 granulosa cell), 而生殖嵴中其他的体细胞将分化为分泌雌激素 (estrogen) 的膜细胞 (theca cell)。

*SRY* 诱导支持细胞的形成和性腺的分化, 与生殖细胞的存在与否没有关系。在缺乏生殖细胞的突变体小鼠 ( $w^w/w^w$ ) 中, 仍然存在来源于体细胞的结构正常的睾丸。同样卵巢的分化也不依赖于生殖细胞的存在, 但成熟雌性个体卵巢形态的维持却有赖于性细胞的存在, 否则卵巢因卵泡细胞无法形成而解体。

### 3. *SRY* 的作用机制

*SRY* 编码一个转录因子, 通过调节下游基因的表达, 引起前体细胞向睾丸支持细胞分化。可以说 *SRY* 的表达, 开启了支持细胞前体向睾丸支持细胞分化途径的第一步, 但细胞是否正常分化, 还依赖于 *SRY* 下游基因的表达。XX-XY 嵌合体小鼠性腺中最初分化出的睾丸支持细胞虽然大部分都是 XY 细胞, 但仍然有少部分为 XX, 这说明直接诱导性腺细胞分化的基因并不是 *SRY*, 而可能是其他染色体上的基因。

很早以前人们就发现, 某些常染色体上的突变也会导致性逆转, 如人类  $17q^{24-25}$  发生突变的 XY 个体, 尽管具有野生型的 *SRY* 基因, 但仍然发育为女性。通过精细的遗传分析, 1994 年 *Sox9* (SRY-related high-mobility group box 9) 基因从这样的病人中被克隆出来。*Sox9* 与 *SRY* 同属于 HMG (high-mobility group) 类 DNA 结合蛋白家族, 是最关键的一个 *SRY* 下游基因, 对睾丸的形成至关重要。在 XX 胚胎的生殖嵴细胞中异位表达 *Sox9*, 胚胎将发育为雄性。实际上, *Sox9* 在性别决定中起着比 *SRY* 更为直接和普遍的作用: 虽然 *Sox9* 不在 Y 染色体上, 但它在所有雄性脊椎动物中都特异表达, 而 *SRY* 仅存在于哺乳动物, 它对性别分化的作用, 是通过激活 *Sox9* 基因的表达来实现的; 在小鼠中, *SRY* 的表达只维持很短的一段时间 (10.5~12.5 dpc) (dpc: days post coitum), 而被它激活的 *Sox9* 则持续表达。可以说, 哺乳动物的 *SRY* 只是 *Sox9* 的“开关”而已, 其他动物可

能利用其他的开关或直接来调控 *Sox9* 的表达。

既然 *SRY* 似乎仅仅是 *Sox9* 的开关, 而 *Sox9* 的持续表达对性别分化很重要, 那么维持 *Sox9* 表达的基因是什么呢? 2001 年人们发现, 一种成纤维细胞生长因子 FGF9 起了关键作用。FGF9 是蛋白类信号分子, 它的缺失导致睾丸支持细胞的分化受阻, 产生完全的性逆转。在性腺早期分化过程中, *FGF9*、*SRY* 和 *Sox9* 构成了一个调控网络: *SRY* 的表达, 启动了 *Sox9* 的表达, 而 *Sox9* 作为转录因子, 激活 *FGF9*。FGF9 蛋白分泌到细胞外, 作为信号分子, 起两方面的作用 (图 15-11):

(1) 通过信号转导过程作用于本身的 *Sox9* 基因, 维持其表达; 同时也作用于邻近细胞, 使前体细胞向睾丸支持细胞分化过程中 *Sox9* 的表达水平保持相对平衡, 保证分化的同步。XX-XY 嵌合体小鼠的部分 XX 细胞分化为睾丸支持细胞, 很可能是因为 XY 细胞分泌 FGF9 等信号分子, 影响了相邻 XX 细胞的分化。

(2) 触发细胞向 XY 性腺中迁移, 稳定睾丸支持细胞的分化状态。细胞迁移和分裂很快改变了 XY 性腺的形态, 形成睾丸索 (testis cord, 曲精细管的前身) 结构, 最终形成睾丸。

*Sox9* 基因所编码的转录因子, 除了激活 *FGF9* 的表达外, 还激活抗穆勒氏管因子的表达, 使穆勒氏管退化, 阻止雌性生殖管道的形成。

### 4. 卵巢的分化

在 *SRY* 基因不存在时, 生殖嵴原基细胞在细胞外信号和细胞内转录因子网络的联合调控下, 发育成为卵巢。可以说雌性 (女性) 的发育方向是哺乳动物基因组中固有的编程, *SRY* 基因使这个程序的某些部分重编,



图 15-11 性腺细胞分化中的信号途径

*SRY* 在上游基因的诱导下表达, 激活了 *Sox9*, 后者又激活 *FGF9* 的表达; FGF9 蛋白分泌到细胞外, 通过信号转导过程维持本身的 *Sox9* 基因表达, 同时也作用于邻近细胞, 保证分化的同步, 并触发睾丸的形成。Sox9 蛋白还促使穆勒氏管退化。Wnt4 与 FGF9 有协同作用, 是卵巢形成必需的。

发育方向才发生改变。当然，卵巢的形成也并非完全被动，如果性腺原基中 *SRY* 和 *Sox9* 等雄性发育相关信号的表达推迟，则睾丸的分化受阻，说明经过某个时间点之后，性腺原基细胞表达了抑制睾丸形成的基因，转而使其向卵巢分化。卵巢的分化也受到很多特异基因的调控，其中以 *Wnt4* 尤为重要。

*Wnt4* (wingless-related MMTV integration site 4) 编码一种生长因子，是 *Wnt* (wingless-type) 家族的成员。*Wnt* 在发育过程中的各个阶段都发挥着重要作用。在性别决定之前，*Wnt4* 在两性的生殖嵴中都有表达；在性别决定发生时（小鼠 12.5 dpc），*Wnt4* 的表达仅限于 XX 个体，在雄性生殖嵴中大大下降。在小鼠中敲除 *Wnt4*，雌性性腺分化为睾丸样结构，穆勒氏管退化，性激素分泌受阻，生殖细胞发生凋亡。可见 *Wnt4* 在雌性性别决定的若干步骤中都有作用。

在性别决定过程中，*Wnt4* 和 *FGF9* 这两种分泌性信号分子具有明显的拮抗作用。在 XY 性腺中，*SRY* 启动 *Sox9* 和 *FGF9* 之间的反馈回路，使 *FGF9* 表达量提高，同时阻遏 *Wnt4* 的表达，性腺朝睾丸方向分化；在 XX 的性腺中消除 *Wnt4* 的表达，足以导致 *FGF9* 和 *Sox9* 表达的上升，尽管这些细胞中并不存在 *SRY* 基因。可见，性腺细胞的分化命运取决于 *FGF9* 与 *Wnt4* 间的拮抗关系（图 15-11）。

### 5. 其他脊椎动物的性别决定

脊椎动物的性腺原基都具有双重的分化方向，然而起始分化的途径却大相径庭。哺乳动物中“第一推动”基因 *SRY* 在单孔类动物 (monotreme)、鸟类、爬行类和鱼类中并不存在。我们已经知道，很多爬行类的性别由温度决定，美洲鳄鱼和蛙的性别则由环境中的激素及其类似物来决定。这并不表明个体间没有遗传上的差异，但环境影响可以将遗传差异完全抵消。

无 *SRY* 基因的脊椎动物性别决定的分子机制仍然不清楚，初步研究表明 *Sox9* 在性别决定中很重要，与之相关的 *FGF9-Wnt4* 间的拮抗关系，是脊椎动物平衡性别比例的普遍方式。来自遗传的、环境的、激素的甚至是行为的因素，可能都是通过影响 *FGF9-Wnt4* 之间的消长，来影响性别分化。

## (二) 生殖细胞的形成与成熟

生殖细胞是最早决定分化方向的细胞之一。在脊椎动物胚胎发育很早的时期，就有一部分细胞决定向生殖细胞分化，这些细胞就是原生殖细胞 (PGC)。PGC 经

过分裂和长距离迁移，最终进入正在发育而尚未分化的生殖嵴（图 15-10），随着生殖嵴向睾丸或卵巢方向的分化，PGC 也相应地向精子或卵细胞分化，经过减数分裂等一系列复杂的过程，最终成为精子或卵子。

### 1. 原生殖细胞的产生

线虫、果蝇等无脊椎动物以及蛙等部分脊椎动物，它们的未受精卵中包含某些特殊的大分子，这些分子在卵细胞中有特异的定位。当卵细胞受精分裂后，继承这些分子的细胞将分化为生殖细胞，其他细胞分化为各种体细胞。这些决定生殖细胞分化方向的大分子很多是 mRNA，其中一种叫做 *Vasa* 的 mRNA 对种质细胞的决定是必需的。*Vasa* 的 mRNA 存在于卵细胞和受精卵中，在卵裂时特异进入生殖细胞中。*Vasa* 决定种质细胞的机制还不是很清楚。

相对而言，哺乳动物的卵细胞是均质的，没有决定生殖细胞的特殊物质，其生殖细胞的分化主要依赖于邻近的细胞提供信号来诱导。哺乳动物最初的几次卵裂所产生的细胞，彼此间没有任何差别，如果分开后给以适当条件，每个细胞都可以发育为一个完整的胚胎，包括生殖细胞，也包括羊膜、绒毛膜等胚外膜。因此，这些细胞是全能性的。随着胚胎发育的进行，某些细胞在邻近细胞的诱导之下，开始向 PGC 方向分化。小鼠卵细胞在受精后 6 天，部分胚外组织的细胞分泌 BMP4 (bone morphogenic protein 4) 蛋白等信号分子，作用于邻近细胞，使几十个细胞 (20~60 个) 分化为 PGC 的前体。

BMP 是 TGF- $\beta$  超家族的成员，以二聚体的形式起信号分子的作用，其受体是由两个 I 型受体和两个 II 型受体组成的四聚体。两种受体都是 Ser/Thr 蛋白激酶，BMP 信号分子与之结合后，II 型受体磷酸化 I 型受体，使其被激活；接着 I 型受体磷酸化下游的 SMAD 蛋白，磷酸化的 SMAD 进入细胞核，作为转录因子调节一系列与 PGC 分化相关的靶基因的表达。SMAD 最初于 20 世纪 90 年代中期发现于果蝇，当时人们发现一种称为 MAD 的蛋白在 TGF- $\beta$  家族成员的信号转导中起重要作用，后来发现线虫中的 SMA 蛋白与之同源，接着又在脊椎动物中发现了同源蛋白，于是命名为 SMAD。现在这个家族有 8 个成员，它们的作用既有联系又有所区别，其中 SMAD1 和 / 或 SMAD5 可能在 PGC 的形成过程中起了主要作用。在它们的作用下，很多体细胞特异表达的基因被逐渐关闭，而一套生殖细胞特异表达的基因被逐渐开启，细胞最终分化为 PGC。

BMP 信号通路的效应分子是 SMAD, SMAD 可能通过调控 *Oct4* 来调控 PGC 的形成。小鼠胚胎发育 8.5~9 dpc 时, *Oct4* 的表达仅限于将来发育为 PGC 的细胞, 并一直持续。此外, *Oct4* 在胚胎最初的细胞分化中也至关重要, 缺失 *Oct4* 的小鼠, 所有胚胎细胞都分化为滋养层, 而没有内细胞团的产生, 即没有胚胎的发育。

PGC 形成后便快速分裂, 同时开始了复杂的迁移。沿途的体细胞为其提供信号, 引导 PGC 因循正确的迁移路径和迁移方向, 最终到达生殖嵴 (图 15-10)。如前所述, PGC 刚刚进入生殖嵴时, 生殖嵴尚未有性别分化, 此时的 PGC 同样尚未决定向卵子抑或精子方向分化, 甚至连它们的 PGC 的“身份”都是可以逆转的: 如果分离这个时期的 PGC, 加以适当的信号分子来诱导, 它们可以去分化成为多潜能细胞, 能够形成胚胎中的任何组织, 只是无法形成胚外膜, 这种性质与胚胎干细胞很类似, 因此这些细胞被称为胚胎种质细胞 (embryonic germ cell, EGC)。

进入生殖嵴的 PGC 将向什么方向分化, 主要是由生殖嵴中体细胞的分化方向来决定, 而不是 PGC 本身的核型。如果把 XX 的 PGC 移入雄性的生殖嵴, 它将向精子方向分化, 而不是形成卵子。

## 2. 原生殖细胞向生殖细胞的分化

哺乳动物两性生殖细胞开始分化的最早迹象, 是具有性别特征的生殖细胞分裂和位点特异的基因甲基化。如前所述, 两性的 PGC 在迁移过程中都进行有丝分裂, 但一旦它们进入生殖嵴, 雌雄 PGC 的表现就有所不同了: 小鼠雄性生殖细胞在 15.5 dpc 就停止分裂, 直到出生后 1~2 天才又重新开始分裂; 雌性生殖细胞则继续有丝分裂并很快进入减数分裂, 但减数分裂不会完成, 而是停止于减数分裂 I 的前期 (图 15-12)。另一方面, 性别特异性的某些基因的甲基化——基因印记 (详见细胞核一章) 也是在 PGC 到达生殖嵴的前后形成, 这个过程是由 PGC 本身的核型所决定的, 与生殖嵴的体细胞无关。

PGC 迁移进入生殖嵴后的细胞分裂方式, 主要取决于生殖嵴的体细胞。将 12.5 dpc 之前正常雌性小鼠胚胎的生殖细胞与 12.5 dpc 雄性小鼠胚胎的生殖嵴细胞混合, 生殖细胞会产生周期阻遏; 而雄性的生殖细胞在雌性的生殖嵴中则可以继续分裂。生殖嵴细胞对生殖细胞分裂周期的调节, 与视黄酸 (retinoic acid, RA) 信号途径密切相关。RA 是一种脂溶性小分子物质, 维生素 A 的衍生物, 其受体是 RAR (retinoic acid receptor)

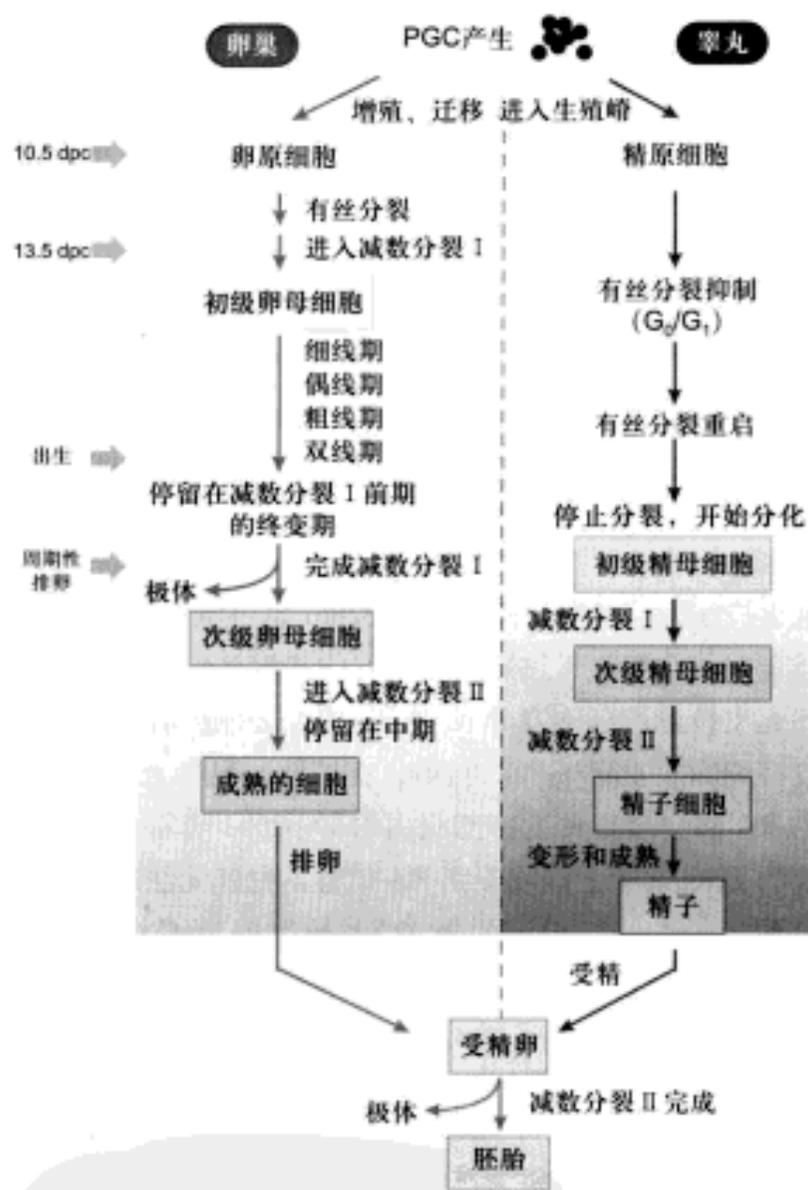


图 15-12 PGC 进入生殖嵴后的细胞分裂

小鼠的 PGC 在 10.5 dpc 进入生殖嵴, 而后其细胞周期在雌雄之间出现很大差异。在卵巢原基中, PGC 继续进行有丝分裂, 并且在 13.5 dpc 进入减数第一次分裂 (此时 PGC 实际上已经分化为初级卵母细胞), 经历细线期、偶线期和粗线期, 进入双线期, 并停留于此。这是在胚胎出生前。胚胎出生后, 减数第一次分裂的初级卵母细胞进入终变期, 直到性成熟后, 在性激素的作用下, 初级卵母细胞才依次完成减数第一次分裂, 进入减数第二次分裂, 并停留在中期。这时卵子从卵巢排出 (排卵), 直到受精后, 减数第二次分裂完成, 排出极体, 成为受精卵。在睾丸原基中, PGC 的有丝分裂受到抑制, 也不会进行减数分裂。幼鼠出生后, 生殖细胞立即进入有丝分裂, 并且在几天后进入减数分裂。两种细胞分裂都完成得很快, 生成大量的精子细胞。整个过程在雄鼠的一生中不断重复, 保证精子的持续产生。

以及 RXR (retinoic X receptor), 两种受体都是位于细胞内的转录因子, RA 与 RAR-RXR 异二聚体结合后, 转录因子被激活, 起始一系列特异基因的表达。

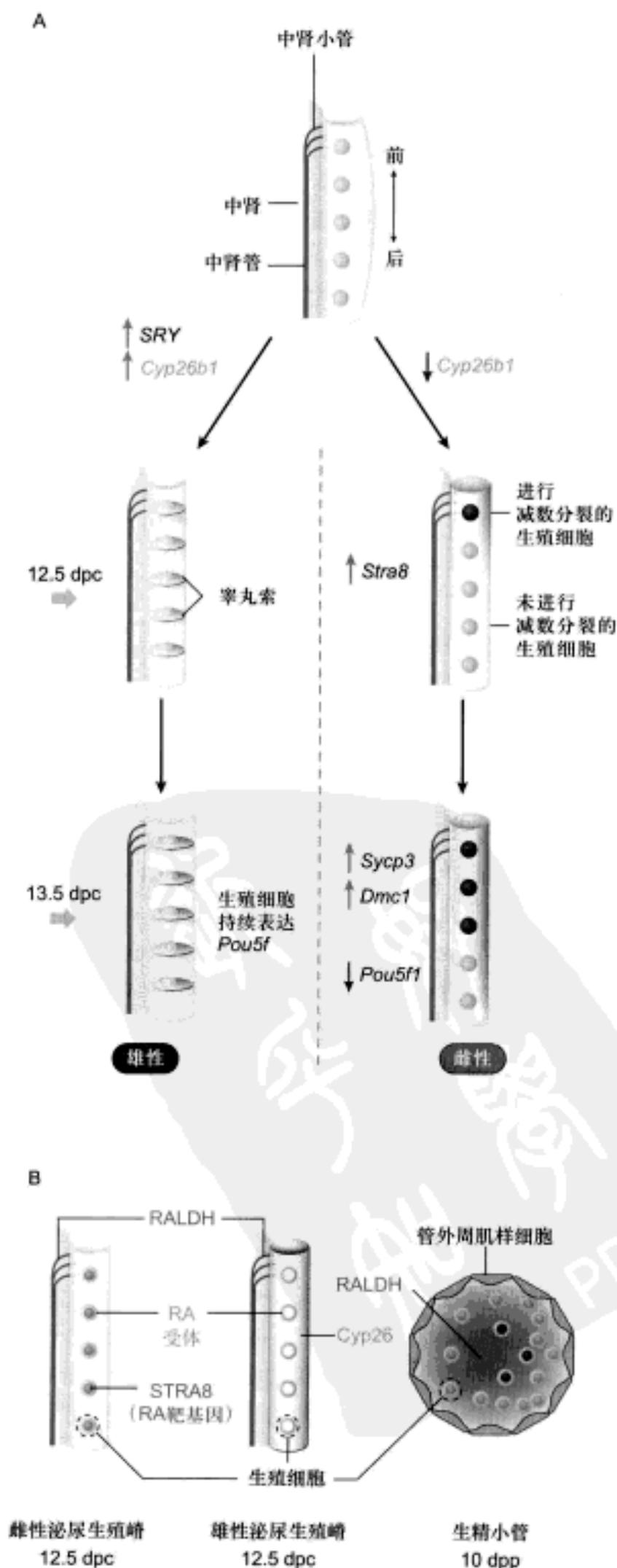
诱导性细胞分化的 RA 是由中肾分泌, 通过扩散进入与之紧密相连的生殖嵴, 作用于迁移到此处的 PGC, 诱导其进入减数分裂。敲除 *RAR* 基因或者用 RA 的拮抗

物处理，都会阻断 PGC 进入减数分裂。RA 信号的下游基因 *Stra8* (stimulated by RA, gene 8) 是生殖细胞特异表达的基因，对减数分裂时 DNA 的复制和联会复合物的形成必不可少，*Stra8* 基因敲除的小鼠无法启动生殖细胞的减数分裂。

在发育过程中，很多组织都分泌 RA 信号，RA 信号转导对多种器官的形成都起重要的诱导作用。因此，生殖细胞即使错误迁移到其他组织，或者在体外培养（血清中有足够的 RA），也会进行减数分裂。既然如此，为什么 XY 的 PGC 迁移到生殖嵴后没有进行减数分裂呢？原来尽管雌雄两性的中肾都分泌 RA，但雄性生殖嵴的睾丸支持细胞会产生一种称为 Cyp26b1 的细胞色素 P450 家族蛋白，它存在于细胞内部，专门降解 RA。如前所述，睾丸支持细胞包裹在 PGC 外部，RA 必须扩散通过睾丸支持细胞，才能与 PGC 接触。在扩散过程中，几乎所有的 RA 都会被睾丸支持细胞内的 Cyp26b1 降解，所以内部的 PGC 实际上接收不到 RA 信号，也就无法进行减数分裂（图 15-13A）。如果将 XY 核型的 PGC 分离培养或移植到其他组织，细胞将发生减数分裂。

图 15-13 生殖嵴对生殖细胞减数分裂的调控

A. 11.5 dpc 的小鼠生殖嵴：具有双向的分化潜能，原生殖细胞已经迁移到里面，生殖嵴侧的中肾管和中肾小管都分泌 RA 信号，而 *Cyp26b1* 在两性的生殖嵴中表达水平都很低。在雄性生殖嵴中，*SRY* 基因此时开始表达，上调 *Cyp26b1* 的表达，尤其是围绕在生殖细胞周围的支持细胞中，*Cyp26b1* 的表达量更高，形成了横条状分布的睾丸索，保护生殖细胞免受 RA 的影响。雄性生殖嵴的生殖细胞在 13.5 dpc 时仍然表达生殖干细胞的标志基因 *Pou5f1*，而不进入减数分裂。在雌性生殖嵴中，低水平表达的 *Cyp26b1* 到 12.5 dpc 时已经消失殆尽，生殖嵴前端开始表达 *Stra8*。到 13.5 dpc 时，减数分裂的标志基因 *Sycp3* 和 *Dmc1* 等开始大量表达，并由前向后扩散。这是因为前部接受的 RA 信号比后部更强。细胞一旦进入减数分裂，*Pou5f1* 就不再表达了。B. 胚胎出生前后，RA 对生殖细胞减数分裂的调控：在 12.5 dpc 的雌性泌尿生殖嵴中，中肾合成 RA 合成酶 *RALDH2*，在它的催化下合成 RA。中肾分泌的 RA 通过中肾管进入生殖嵴。迁入雌性生殖嵴中的生殖细胞有 RA 的受体 RAR，所以这些细胞接受 RA 信号，激活 *Stra8* 的表达。雄性生殖嵴的体细胞（即支持细胞）表达降解 RA 的酶 *Cyp26b1*，因此尽管这里的生殖细胞也表达 RAR，但大部分 RA 经过支持细胞时都被降解，无法到达生殖细胞，所以这些细胞无法对 RA 信号作出反应。而出生后（如 10 dpp, days post partum），支持细胞不再表达 *Cyp26* 基因，转而表达 *RALDH2*，制造 RA，作用于表达 RAR 的生殖细胞，激活 *Stra8* 的表达，促使细胞进入减数分裂。生精小管外周的肌样细胞在此时表达 *Cyp26* 基因，降解外界的 RA 信号，保证生殖细胞的分化不受其他体细胞的影响。



雄性小鼠出生后, 睾丸支持细胞开始合成 RA, 生殖细胞合成 RAR 和 RXR, 这样越接近支持细胞的生殖细胞越早进入减数分裂, 最终形成精子。睾丸生精小管外周的肌样细胞则合成 Cyp26b1, 降解通过组织液扩散到睾丸的 RA, 避免生殖细胞的分化受到身体其他部位分泌的 RA 的影响 (图 15-13B)。如果将刚刚迁移到雄性生殖腺的原生殖细胞与成熟的睾丸共培养, 细胞将进入减数分裂。

虽然 PGC 的减数分裂依赖于周围的体细胞, 但有功能的生殖细胞的最终形成, 也依赖于其本身。将 XY 的 PGC 移入 XX 小鼠的生殖腺或反过来进行移植, 生殖细胞的减数分裂虽然依照性腺体细胞来进行, 但细胞在进入粗线期之前就凋亡殆尽了, 无法形成有功能的性细胞; Cyp26b1 缺失的雄性小鼠的胚胎生殖干细胞很快进入减数分裂, 但分裂后的细胞逐渐凋亡。这些都说明, PGC 本身对其最终的分化命运也十分重要, 性别特异的 DNA 甲基化 (如基因组印记) 以及组蛋白的修饰对生殖细胞的分化必不可少。

### 3. 精子和卵子的形成

精子产生于睾丸中生精小管 (seminiferous tubule) 的腔面上皮, 大体经历精原细胞 (spermatogonium,  $2n$ )、初级精母细胞 (primary spermatocyte,  $n$ )、次级精母细胞 ( $n$ ) 和精子细胞几个阶段, 最终变态为精子。在精子形成的有丝分裂和减数分裂过程中, 细胞并未完全分开, 细胞间有胞质“桥”互相连接, 这不但能够保证细胞分裂同步进行, 更重要的是, 每个细胞都与其他细胞共用细胞质, 都能够得到二倍体基因组所提供的基因产物。因此, 虽然进行了减数分裂, 精子的分化仍然受到二倍体基因组的调控, 这对只得到 Y 染色体的精细胞而言, 意义尤为重要。

雌性动物的 PGC 进入生殖腺后先进行有丝分裂, 这时的细胞称为卵原细胞 (oogonium)。卵原细胞很快开始减数分裂, 并停顿于减数第一次分裂的前期, 这时的细胞称为初级卵母细胞 (primary oocyte)。细胞在这个时期停留的时间相对很长, 对人而言, 至少 13~15 年。这时细胞中的染色体处于四分体时期, 同源染色体间存在很多交叉, 这对同源染色体间遗传信息的交换很重要。性成熟后, 在性激素的刺激下, 初级卵母细胞逐次完成减数第一次分裂。与精子形成过程的细胞分裂不同, 这次分裂是不对称分裂, 产生大小相差悬殊的两个细胞, 大细胞为次级卵母细胞 (secondary oocyte), 是卵子的前身; 小细胞称为极体 (polar body), 最终会退

化。接着细胞进入减数第二次分裂, 并停留于中期。哺乳动物受精之后, 在精子的刺激下减数分裂才会最终完成, 形成卵细胞和另外一个很小的极体。此时的卵细胞其实已经是受精卵。

## 二、早期胚胎发育过程中的细胞分化

由单细胞的受精卵发育成为多细胞的生物个体, 可以说是自然界创造的最大奇迹。在这个过程中, 细胞经历了分裂、分化、迁移等一系列复杂而又精确有序的过程, 细胞之间、细胞与胞外基质之间经历了极其复杂的相互作用, 对脊椎动物来说, 这种作用最终决定了细胞在生命体中的定位和分化方向。基因的选择性有序表达, 全程调控了复杂的发育过程。

### (一) 动物早期发育概述

有性生殖的生物, 其生命一般起始于雌雄生殖细胞, 即卵子和精子的融合, 这个过程叫做受精 (fertilization)。受精过程在不同动物中有所差别, 但几乎都包括两个连续发生的反应——顶体反应 (acrosomal reaction) 和皮层反应 (cortical reaction), 相关内容请参阅“发育生物学”, 在此不再赘述。

受精作用形成合子 (zygote), 使染色体恢复到二倍体状态, 为发育奠定了遗传基础; 受精过程激活了卵细胞内肌醇磷脂 (PI) 信号通路, 使得储存在细胞中的 mRNA 开始翻译, 合成了组蛋白等染色体复制所必需的蛋白质, 最终 DNA 复制启动, 细胞分裂开始。

受精卵 ( $2n$ ) 开始进行一段时间的快速细胞分裂, 称为卵裂。随着卵裂的进行, 卵裂球之间存在的空隙逐渐融合在一起, 形成内部的腔, 这时的胚胎称为囊胚 (blastula)。不同的卵裂方式形成不同形式的囊胚, 哺乳类的囊胚腔内存在内细胞团 (inner cell mass), 它是胚胎发育的基础。在囊胚形成过程中, 细胞黏着分子对形态的维系很重要, 如哺乳动物的 E-cadherin 对维系卵裂球的聚集起关键作用。

囊胚形成后, 胚胎细胞经历了剧烈有序的运动过程, 细胞间的相对位置发生显著改变, 最终形成 3 个胚层 (germ layer), 这个阶段称为原肠胚 (gastrula)。囊胚的一部分细胞通过内陷、外包或迁移等多种形式进入囊胚内部, 形成原肠 (将来发育为消化道上皮及其衍生物), 这就是内胚层 (endoderm)。位于外部的细胞称为外胚层 (ectoderm)。还有一部分细胞进入内外胚层细胞

之间，形成中胚层（mesoderm）。

3个胚层的形成，是动物最基本最重要的细胞分化，是组织和器官形成的基础。脊椎动物的3个胚层中，内胚层和外胚层的形成是自主的，不需要其他细胞提供信号，而中胚层的形成需要内、外胚层的诱导。TGF- $\beta$ 家族蛋白很可能是腹侧中胚层形成的诱导者，而Wnt信号途径的重要效应分子 $\beta$ -catenin对脊索等背部结构的形成很重要。

## （二）神经胚形成中的信号转导

3个胚层生成后的发育过程，无脊椎动物和脊椎动物展现了很大的差别。脊椎动物原肠胚背部的中胚层和覆盖在其表面的外胚层间的相互作用，是脊椎动物后续发育的决定因素，是各种特异性组织和器官产生的基础。概括而言，这种相互作用包括：背部的中胚层组织形成脊索；脊索诱导其上方的外胚层形成神经管，将来发育为中枢神经的脑和脊髓；神经管闭合时产生的神经嵴细胞则经过复杂的迁移，形成外周神经系统、色素细胞等；脊索和神经管的形成对心脏、肝、胰腺等内脏器官的形成也起了重要的诱导作用。因此，神经管开始形成的阶段是脊椎动物发育历程中的重要时期，我们称之为神经胚（neurula）期。

### 1. 脊索的形成

脊椎动物的脊索中胚层是在原肠胚形成过程中最早进入内部的组织之一。它们之间靠钙黏着蛋白紧密黏在一起，与周围的体节中胚层组织存在明显的界线。脊索形成的过程中，这些细胞向背部中心汇聚，互相嵌入，同时向头尾两端延伸，最终形成纵贯头尾的棒状结构——脊索。

在脊索形成过程中，Wnt信号途径起了重要作用。如前所述，经典的Wnt途径在决定脊椎动物胚胎背部形成中起重要作用，其效应分子为转录辅助因子 $\beta$ -catenin。然而，脊索形成过程中所依赖的是非经典的Wnt途径：Wnt信号分子结合于受体Frizzles，活化Dsh后，不是抑制 $\beta$ -catenin的降解，而是活化小G蛋白RhoA和蛋白激酶Rok2，Dsh还在另一种膜蛋白Stbm（strabismus）的协助下，活化了JNK（Jun N-terminal kinase）。这些酶的作用靶点无一例外都是细胞骨架，从而改变了细胞的形态和运动行为，同时胞外基质纤连蛋白引导了细胞迁移的方向，使其向背部中心汇聚。而引导脊索中胚层细胞向头部和尾部延伸的，是Brachyury和Chordin两种蛋白建立的梯度，前者在胚孔处高表

达，后者在头部高表达。

### 2. 神经管的形成

初期的脊索分泌出多种信号分子，对其周围的组织分化起到诱导作用。在脊索的诱导下，覆盖在它表面的外胚层细胞由立方形变为柱状，使得这部分外胚层显著加厚，成为神经板（neural plate）。在这个过程中，微管起了主要作用，它们沿着背腹轴的方向平行排列，使细胞在这个方向上拉长。接着，神经板细胞的背侧一端出现平行排列的微丝束，它们的方向恰与微管束垂直。这些微丝束收缩，使细胞成为楔形，导致神经板向下凹陷，成为神经沟（neural groove）。神经板周围那些将来发育为表皮的外胚层细胞向神经沟方向运动，推挤神经沟两侧上举，逐渐卷起，成为神经褶（neural fold）。神经板与表皮交界处的神经外胚层细胞在微丝和微管的共同作用下，变成背侧宽而腹侧窄的反向楔形，致使神经沟更深地凹陷，左右神经褶逐渐靠近，最终在背部融合，成为神经管（图15-14）。在神经管行将闭合以及闭合后，头部和脊髓的神经嵴（neural crest）细胞开始迁移，最终形成外周神经系统、色素细胞甚至具有中胚层性质的头骨和头部真皮，以及心血管系统的部分结构。神经嵴细胞的分化命运，取决于其迁移和定殖的位置。

神经管的闭合与基因和环境的相互作用有关，在人类，*Pax3*、*sonic hedgehog*和*openbrain*等基因是神经管闭合所必需的。即使没有相关的基因缺陷，叶酸（folate）的缺乏也会导致神经管闭合缺陷，形成脊柱裂或无脑畸形。

神经胚形成后，形成将来各个组织和器官的细胞已经分别到达预定位置，形成器官原基，它们的分化命运也大致确定。因此，神经胚时期奠定了将来躯体的基本模式，以后的发育过程，主要是各种器官原基细胞进一步分裂和分化，最终形成相应的组织和器官。

## （三）神经管的初期分化

器官的形成过程中，细胞进行了更加细致的分化。器官的结构和功能可以说大相径庭，因此可以想到，不同器官形成过程中，细胞分化的方式必然不尽相同。而另一方面，随着研究的深入，人们发现在不同器官的形成中，有一些普遍的规律存在。我们这里以神经管分化为代表，看一看器官形成中细胞分化所因循的基本规律。

最初形成的神经管，仅由单层神经外胚层细胞围成，这些细胞处于旺盛的增殖状态，具有干细胞的性质。有趣的是，对这些细胞而言，细胞核的位置可以显示细

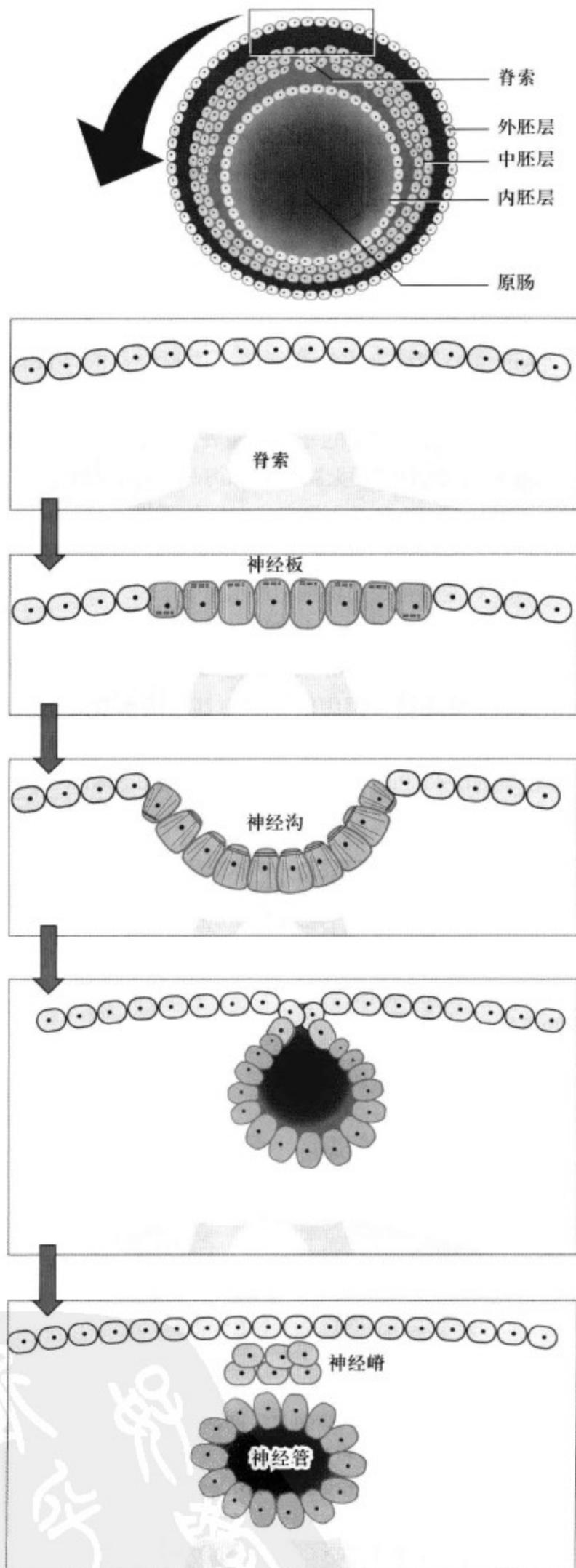


图 15-14 神经管的形成

胞周期的时相：细胞核处于神经管外侧，则细胞在 S 期，细胞核处于神经管腔一侧，则细胞即将进入 M 期。

神经管闭合后不久，就不断有神经上皮细胞脱离细胞周期，并迁移到神经管外围，使得神经管外围逐渐加厚。内部的单层神经上皮仍然维持干细胞特性，形成室管区（ventricular zone），它是神经前体细胞库。神经系统发育完成后，形成室管膜（ependyma）。

神经上皮细胞是继续维持干细胞状态，还是停止分裂向外迁移，取决于细胞在神经管中的初始位置。不同位置的细胞，将受到不同的区域信号（即形态发生原，morphogen）的作用，从而造成不同的分化命运。形态发生原影响细胞分化的方式，一般是通过激活转录调节因子，从而控制决定特异发育命运的一整套基因的表达来实现的。在神经细胞的增殖和分化过程中，有 5 个基本的信号系统发挥了决定性作用，它们是 FGF、RA、Wnt、hedgehog (Hh) 和 TGF- $\beta$ 。

### 1. 发育进程中神经干细胞的维持

我们知道，神经组织的细胞数量极其庞大，仅人类的大脑就包含  $10^{12}$  个细胞。要形成如此大量的细胞，神经组织在发育过程中就必然要维持相当数量的具有旺盛增殖能力的神经前体细胞（或神经干细胞）。

(1) FGF 信号维持神经上皮的干细胞特性 脊椎动物的发育是由前向后进行的。在发育过程中，身体在不断延长，脊髓也随之延长，必然需要后部的神经上皮细胞不断分裂，加入延伸当中的神经管。由此可知，神经管的后部存在干细胞区。实验证据表明，FGF 信号对于干细胞区的维持至关重要。FGF 主要由神经管旁的前体节中胚层（presomitic mesoderm, 未分化为体节之前的轴旁中胚层）分泌，如果将身体后部神经管旁的该组织切除，干细胞的特征标记就会消失。抑制 FGF 受体的活性，会造成神经前体细胞由干细胞区迁移到神经管外围区域，并开始分化。FGF 对细胞干性的维持，是通过抑制促分化基因 *Pax6*，从而诱导 *cyclin D2* 的表达。*cyclin D2* 与 CDK4/6 形成复合物，促进早 G<sub>1</sub> 期的进程。

前面已经提及，只有神经沟闭合成为神经管后，才开始有一部分神经前体细胞脱离细胞周期并在神经管的外围走向分化，这一过程是由 FGF 信号的减弱引起的。当神经管闭合后，其周围的前体节中胚层分化为体节，体节中胚层分泌的 FGF 大大降低，转而分泌另一种信号分子——RA。RA 信号对 FGF 信号起到拮抗作用，促进神经前体细胞的分化（图 15-15）。

如前所述，神经元前体细胞在神经管发育过程中总

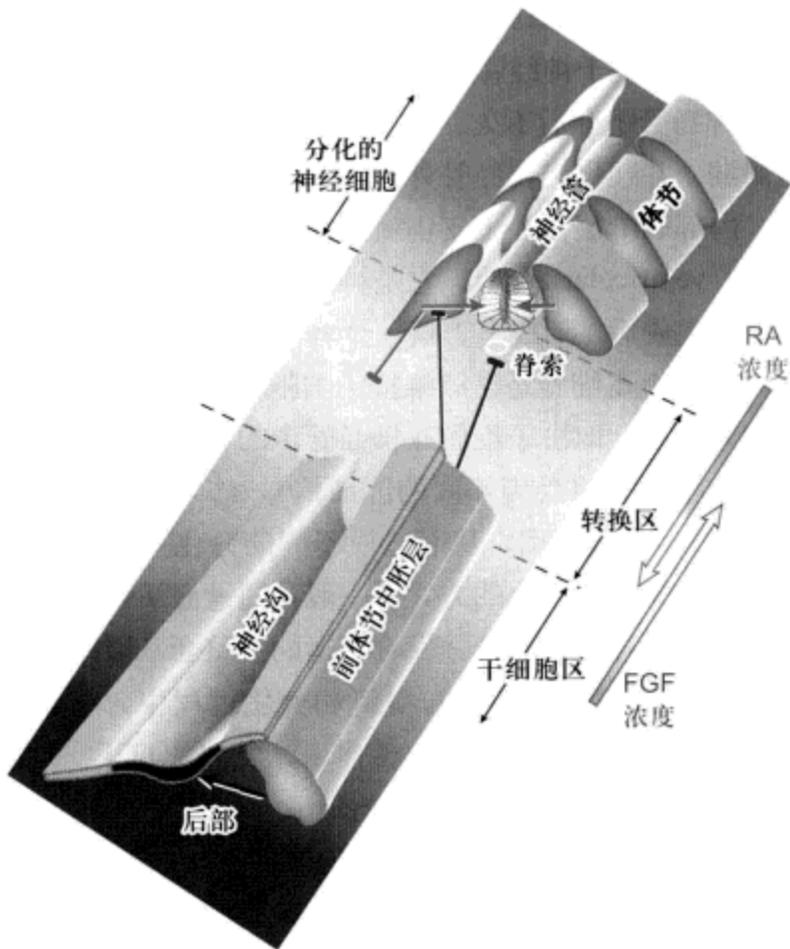


图 15-15 调控脊髓神经细胞增殖的信号系统

胚胎轴旁中胚层分泌 FGF 和 RA，但 FGF 和 RA 的浓度呈现相反的梯度分布格局：后部 FGF 浓度高，神经板细胞保持干细胞特征；在体节形成的区域，神经管闭合，轴旁中胚层分化成的体节表达 RA，诱导部分细胞扩散到神经管外围，脱离细胞周期。Wnt 在整个神经管表达，维持细胞的增殖能力。Shh 在脊索和底板表达，而 BMP 在顶板表达，二者形成方向相反的浓度梯度，调控神经前体细胞的分裂与分化。

是只有一部分细胞发生分化，另一部分细胞仍然维持干细胞状态，这是什么原因呢？原来，在神经元前体细胞特化的过程中，存在一个旁侧抑制 (lateral inhibition) 作用，在这一过程中，Delta-Notch 信号途径扮演了重要角色。转录因子 neurogenin 是决定神经前体细胞是否分化的关键因素，所有构成神经板的细胞都有表达 neurogenin 的潜能，同时这些细胞也表达 Delta 和 Notch。Delta 和 Notch 蛋白的结合，激活了细胞内相应的信号系统，抑制 neurogenin 蛋白的合成，前体细胞便不会分化。随着时间的推移，有一部分细胞会表达更多的 Delta，从而向邻近细胞传递更多的 Delta 信号，更有效地关闭了邻近细胞 neurogenin 的表达，使之继续维持干细胞状态。同时，强的 Delta 信号抑制了邻近细胞 Delta 的合成，这样就解除了邻近细胞对自身的抑制，于是 neurogenin 开始在这些高表达 Delta 信号的前体细

胞中合成，激活了转录因子 neuroD 的表达，前体细胞开始向神经元分化 (图 15-16)。

(2) Wnt 经典途径维持神经管腹侧前体细胞的分裂能力 Wnt 是一个高度保守的分泌蛋白信号家族，关于其信号转导的过程，请参阅本书相关章节，在此不再赘述。在小鼠神经管的发育过程中，Wnt 对维持神经管内前体细胞的增殖至关重要。Wnt 的失活，导致脑和脊髓某些结构的缺失，而过表达 Wnt，会导致神经管背腹方向的过度生长。

Wnt 调控神经上皮细胞增殖，依赖经典的 Wnt 信号途径，即通过  $\beta$ -catenin 调控 cyclin D1 和 c-myc 的转录。 $\beta$ -catenin 在发育中的脊髓普遍表达，在小鼠中敲除  $\beta$ -catenin，导致脊髓、大脑皮层和海马缩小，神经前体细胞无法维系。反之，如果表达有持续活性的  $\beta$ -catenin 突变形式，脑质量将增加，神经前体细胞增多。因而， $\beta$ -catenin 对维持神经前体细胞库很重要。

(3) hedgehog 途径对早期中枢神经系统生长的调控 Sonic hedgehog (Shh) 是 hedgehog 分泌蛋白家族的一个成员，它在很多组织的分化中都起很重要的作用，其中就包括神经组织。Shh 与它的受体——跨膜 11 次的蛋白 Patched (Ptc) 结合，解除对 Smoothened (Smo)

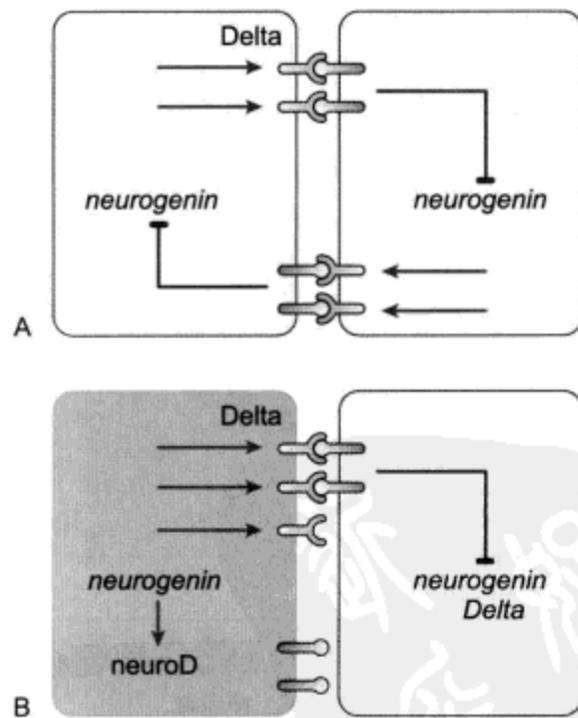


图 15-16 神经元前体细胞通过侧向抑制而特化

A. neurogenin、Delta 和 Notch 基因开始在神经板细胞中都有表达，Delta 和 Notch 的相互作用又会抑制 neurogenin 的表达。B. 一旦某个细胞表达的 Delta 多于它的邻居，就会抑制邻居细胞中 Delta 的合成，从而解除其对自身的抑制，于是该细胞表达 neurogenin 和 neuroD，向神经元分化。

蛋白的活性抑制,从而激活 Gli 家族转录因子,调控一系列下游基因的活性。

在脊椎动物神经管发育过程中, Shh 在神经管的底板 (floor plate, 神经管腹侧最下端, 紧邻脊索) 和脊索中表达, 并形成从腹侧到背侧的浓度梯度, 对神经管的背腹分化起关键作用 (见图 15-15)。Shh 诱导底板、运动神经元和腹侧中间神经元的分化, 敲除 Shh, 这些细胞的分化就被抑制了。除此之外, Shh-Gli 信号途径在背侧脑组织, 包括小脑、大脑新皮质和顶盖 (tectum) 的发育中, 是主要的促细胞分裂原, 它维持了发育晚期以及成体中枢神经系统内神经干细胞的存在。移除 Shh 的主要分泌组织——脊索, 神经管显著减小; 而增强 Shh 信号的活性, 如表达有持续活性的 Smoothed 或过表达 Gli1, 都会使神经管过度生长。

N-myc 和 cyclin D1 可能是 Shh 信号促进神经前体细胞分裂的效应分子, 它们的表达受 Shh 的激活。二者表达量的上升, 导致小脑颗粒前体细胞的分裂。在神经前体细胞中条件敲除 N-myc, 则脑质量显著减小。这样看来, Shh 和 Wnt- $\beta$ -catenin 是通过几乎相同的分子, 来调控神经前体细胞由 G<sub>1</sub> 到 S 的转化, 两种信号系统之间如何相互协调, 现在还不清楚, 值得进一步研究。

(4) BMP 信号调控背侧脊髓细胞的增殖和分化 BMP 是 TGF- $\beta$  分泌蛋白家族的成员, 神经管背部和顶板 (roof plate, 神经管背侧最上端, 是神经板愈合之处) 都表达若干种 BMP 以及 TGF- $\beta$  家族的其他一些信号分子。如同 Shh 一样, BMP 也形成一个浓度梯度, 只是梯度的方向与 Shh 恰好相反 (见图 15-15)。BMP 的梯度对背侧神经管的分化很关键 (详见本节后面的内容)。

除了对神经管背侧的分化至关重要外, BMP 也调控神经前体细胞的分裂增殖。在神经干细胞中表达具有持续活性的 BMP 受体 Ia, 会诱导 Wnt1 和 Wnt3a 等 Wnt 基因的表达, 促进细胞的增殖; 而表达持续活化的 BMP 受体 Ib, 则引起细胞分化。

## 2. 神经管细胞的分化

神经管刚刚形成的时候是一个管状结构, 背侧和腹侧没有显著的差异。成熟的中枢神经系统则不然, 脑的背腹面无论在结构上还是功能上, 差异一目了然; 脊髓的背侧和腹侧也显著不同——背侧集中了感觉神经元, 而腹侧则以运动神经元为主。根据神经元所表达的特异蛋白分子, 脊髓神经元又可以更加细致地分类——背部神经元被分为 6 组不同类型, 而腹部神经元和中间神经元被分为 5 组 (图 15-17A)。

胚胎学家很早就关注神经管的背腹分化, 他们用两栖类和鸟类胚胎进行了大量实验, 证明神经管的背腹分化不是由神经管自身所决定的, 而是取决于其周围的中胚层组织。具体而言, 脊索抑制其邻近的神经管细胞增殖, 形成了相对较薄的底板; 侧面的前体节中胚层组织则诱导与之相邻的神经管细胞增殖, 形成两侧较厚的神经管壁。近年来, 诱导神经管分化的分子机制逐渐清晰起来, 人们现在知道, 诱导神经管出现背腹分化的主要是 4 个信号: FGF、RA、Shh 和 BMP。

(1) Shh 和 RA 在腹侧神经细胞分化中起关键作用 Shh 最早在脊索前体细胞中就已经开始表达, 脊索形成后, 继续表达 Shh, 诱导神经管底板的形成, 而底板形成后也开始表达 Shh。Shh 信号以浓度依赖的方式对神经管发挥作用, 也就是说, 虽然同样接受到 Shh 信号, 由于距离脊索和底板的远近不同, 接受的 Shh 信号浓度就有所差异, 导致神经管不同区域的未分化神经细胞产生不同的应答, 从而走向不同的分化命运。具体地说, 距离脊索和底板最近的腹部神经管区的神经细胞分化为腹侧中间神经元前体 v3, 然后依次是运动神经元 (motor neuron, MN), 腹侧中间神经元 v2、v1 和 v0 (图 15-17A)。

另一方面, 神经管旁的体节中胚层在视黄醛脱氢酶 2 (retinaldehyde dehydrogenase 2, RALDH2) 的催化下, 合成并分泌的另外一种信号分子 RA 也形成了一个浓度梯度, 与 Shh 梯度相颉颃: 距离腹侧近的神经细胞的分化, 几乎完全由 Shh 决定, 如 v3 和 MN 等; 而距离稍远的神经细胞的分化, 则由 Shh 和 RA 两者共同决定, 如 v0 和 v1。

Shh 信号诱导 *Nkx2.1* 和 *Nkx6.1* 等 II 类基因的表达, 同时高浓度的 Shh 抑制 *Pax6*、*Dbx1* 等 I 类基因的表达, RA 恰好相反。I 类和 II 类基因之间又有相互抑制作用, 由此形成了 Shh 和 RA 的梯度效应 (图 15-17B)。

Shh 和 RA 的效应分子都是带有同源结构域 (homeodomain) 的转录因子。这类转录因子由一个称为 *Hox* (homeobox) 的同源异型基因家族编码, 其产物都带有一个彼此同源的结构域, 它由 60 个氨基酸组成, 具有螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix) 结构, 与特定序列的 DNA 结合, 启动相应的下游基因转录。*Hox* 首先在果蝇中发现, 它们的突变, 导致同源器官的替代, 比如平衡棒变为翅, 触角变为附肢等。后来在脊椎动物中也发现了 4 组 *Hox* 基因簇, 分别称为 *Hoxa*、*Hoxb*、*Hoxc* 和 *Hoxd*, 它们的作用与果蝇中相应基因的

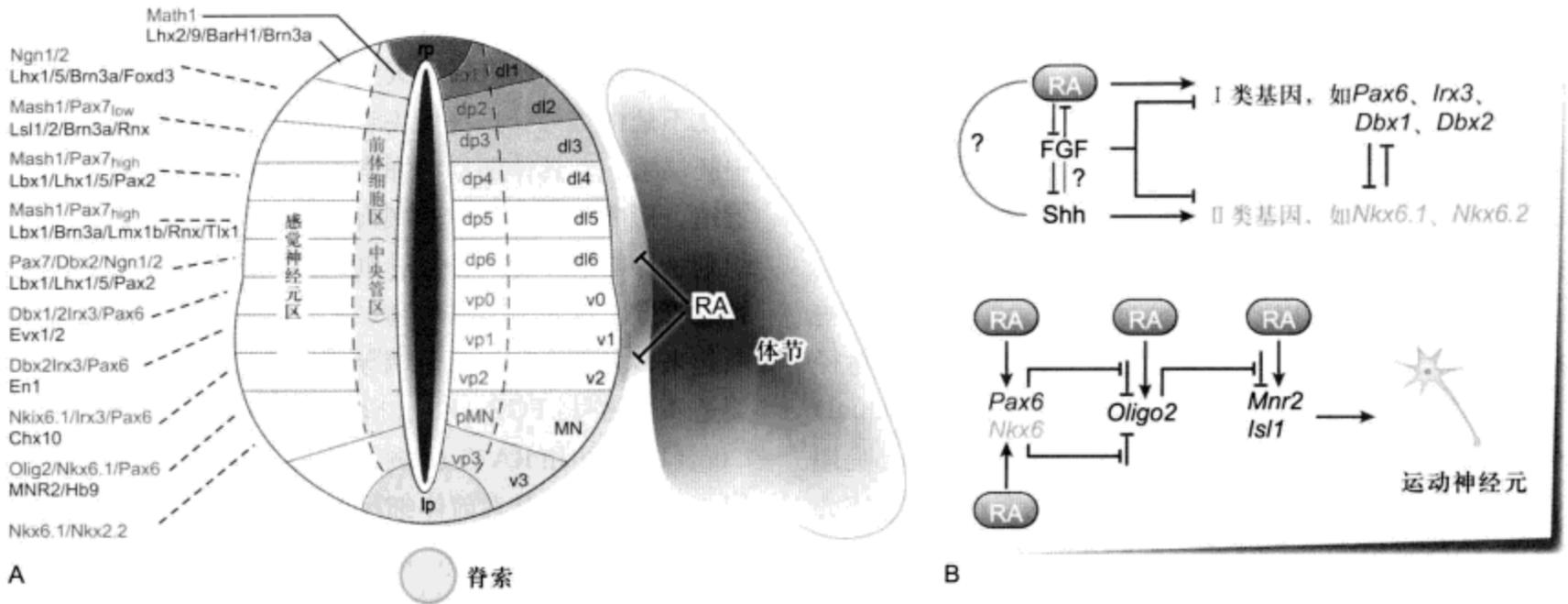


图 15-17 脊髓背腹分化中的信号网络

A. 脊髓的神经元分为 5 类腹侧神经元 (v0~v3、MN) 和 6 类背侧神经元 (dl1~dl6), 它们各有自身的特征标志蛋白 (图左侧所示)。这些神经元的前体来源于神经管靠近中央管的区域 (图中深色部分)。左侧所示为前体细胞的标志蛋白。脊索和底板分泌的 Shh、顶板和其上的外胚层分泌的 BMP 以及体节分泌的 RA 形成各自的梯度, 联合调控不同种类神经元的特化。B. 神经元分化过程中的主要信号系统间的相互作用。上图显示激活和抑制 I 类和 II 类基因的信号间的相互关系和 I、II 类转录因子间的颞颥作用; 下图显示在运动神经元后期分化中, 主要通过抑制解除方式的不断应用, 诱导一系列特异转录因子的表达, 而 RA 信号也被反复使用。

作用很相似, 决定不同体节形成不同结构, 如胸椎具有肋骨, 而腰椎则不着生肋骨。

(2) BMP 在背侧神经细胞分化中起关键作用 背侧神经细胞的分化依赖 BMP。BMP 由顶板和神经管外覆盖的外胚层组织分泌, 而顶板对背侧神经管的分化起决定作用, 其角色相当于决定腹侧神经管分化的脊索。与 Shh 信号类似, BMP 诱导的细胞分化同样有浓度梯度依赖性, 它的效应蛋白也是具有同源结构域的转录因子, 如 Pax3、Lmx 等。Shh 信号对 BMP 信号诱导的细胞分化具有抑制作用, 如果将脊索移植到神经管背侧, 则抑制背部神经元的形成; 降低 BMP 信号的浓度, 会导致背部感觉神经元的减少, 并伴有中间神经元 (由 Shh 和 RA 诱导分化) 的增加。

RA 在背侧神经元的分化中也功不可没。缺失 RA 信号, *Bmp4* 和 *Bmp7* 的表达量和表达范围都减小, 导致背侧神经元减少。可见 RA 负责调控决定背侧神经管分化的基因的表达。RA 的缺失, 使得 *Shh* 和 II 类同源结构域基因的表达范围扩展, 这进一步说明决定神经管腹侧和背侧分化的信号系统之间是相互颞颥的。

(3) 神经元亚类的特化 FGF、RA、Shh 和 BMP 信号所诱导的转录因子体系, 不仅直接调控了下游一系列靶基因的表达, 同时也最终决定了细胞的分化命运。

每个神经细胞特定的分化命运, 是通过对其他方向分化潜能的抑制来实现的。比如在运动神经元分化过程中, 绝大多数转录因子都起抑制转录的作用: 运动神经元前体细胞的标志基因是 *Oligo2*, 而 Shh 的下游基因——编码 II 类同源结构域蛋白的 *Nkx6* 和 *Pax6* 则抑制了对 *Oligo2* 的表达起负调控作用的转录因子, 使 *Oligo2* 在这些前体细胞中得以表达。*Oligo2* 又以同样的方式抑制某些转录因子, 解除它们对运动神经元特异基因 *Mnr2* 和 *Isl-1* 等的抑制。*Mnr2* 和 *Isl-1* 等都编码含有同源结构域的转录因子, 激活了一系列与运动神经元结构、功能相关的基因, 神经前体细胞于是开始向运动神经元方向分化 (图 15-17B)。

RA 在运动神经元的分化中也必不可少, 它激活 I 类基因 *Pax6* 的表达, 促使表达 *Nkx6* 的细胞分化为表达 *Oligo2* 的运动神经元前体细胞; RA 信号同时又作为 *Oligo2* 基因的下游, 激活了运动神经元特异的同源异型转录因子 *Mnr2* 和 *Isl-1* 等的表达, 导致运动神经元的分化 (图 15-17B)。

### 三、果蝇胚胎早期发育中的细胞分化

从脊椎动物胚胎发育的过程我们可以看出, 细

胞附近的组织对细胞分化发挥了巨大作用，细胞的分化命运大部分由其所处环境决定，这就是调整型发育 (regulative development)，也称为依赖型发育。大部分无脊椎动物的发育则与此不同，其细胞分化命运大体是由细胞本身所决定的，对细胞所处环境依赖较小，这称为镶嵌型发育 (mosaic development)，也叫自主型发育。果蝇的发育就是典型的镶嵌型发育。

果蝇的受精卵中含有许多由母体提供的 mRNA 和蛋白质，这些统称为母体基因。母体基因在受精卵中的分布具有明显的区域性，受精后，区域性分布的母体基因通过级联反应，激活或抑制相应的合子基因表达，进一步造成裂隙基因 (gap gene)、成对规则基因 (pair rule gene) 和体节极性基因 (segment polarity gene) 等合子基因表达的区域化，从而决定了果蝇胚胎的前后轴、背腹轴和体节的形成 (详见“发育生物学”)。因此，果蝇胚胎的发育命运，早在卵子成熟时就决定了。受精后，胚胎就按照既定的途径完成发育 (图 15-18)。

任何一种细胞的分化、任何组织的形成以及每个器官的构建都极其复杂，都是一系列信号联合作用的结果，都有其本身的特性——特定的局部环境、特定的一组诱导者和特定的信号途径。另一方面，细胞分化与发育过程的奥妙不仅在于其过程与结果的复杂性，而且在于生物在构建多种组织及机体过程中难以置信的经济性。在我们所列举的细胞分化与发育过程中，都可以见到 FGF、TGF- $\beta$ 、RA、Shh 和 Wnt 等信号系统，都可以发现它们按照极其相似的方式调控各种发育过程——这就是发育的共性。在生物长期演化过程中，很可能仅利用有限的较为简单的基因产物为工具，凭借重复而富

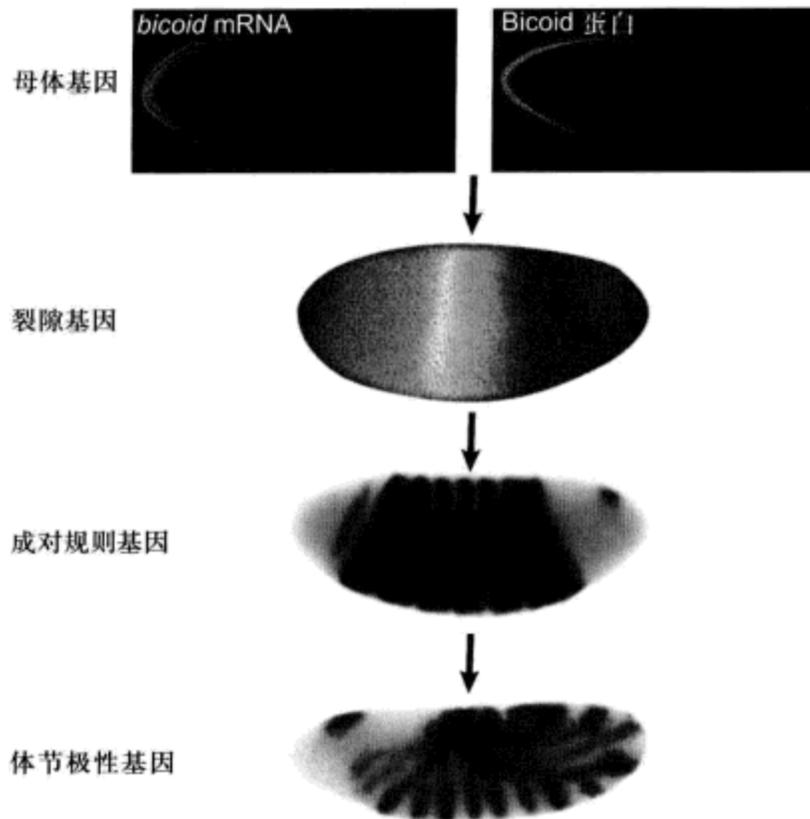


图 15-18 果蝇体节形成中的基因调控

*bicoid* 等母体基因的 mRNA 和蛋白在受精卵中形成浓度梯度，调控裂隙基因的表达，形成各自特异的表达区域；裂隙基因再调控成对规则基因，各形成 7 条横纹状分布的表达区；成对规则基因调控其下游的体节极性基因，形成 14 条表达横纹，相当于 14 个副体节的位置。体节的不同特征则是由同源异型基因决定的。(Markus Noll 博士惠赠)

有创造性的方式指导细胞的行为，分化并产生当今世界上多种生命体。掌握了发育的共性，则明晰了发育的基本规律，“引而伸之，触类而长之，天下之能事毕矣” (《易·系辞上》)。

### ● 思考题 ●

1. 何谓细胞分化？为什么说细胞分化是基因选择性表达的结果？
2. 组织特异性基因的表达是以何种方式调控的？
3. 影响细胞分化的因素有哪些？请予以说明。
4. 什么是干细胞？它有哪些基本类型和各自的基本特征？
5. 什么是诱导多能干细胞？试论述其在理论与医学实践中的重要意义？
6. 从 PGC 到精子的分化过程中，有哪些重要的信号途径是必不可少的？它们如何作用以保证精子的形成？
7. 从 PGC 到卵子的分化过程中，有哪些重要的信号途径是必不可少的？它们如何作用以保证卵子的形成？
8. 生殖细胞进入减数分裂与否是如何调控的？
9. 什么是神经管细胞分化过程中的旁侧抑制？
10. 举例说明 BMP 分子、Shh 分子如何通过浓度梯度来调控细胞分化。

## 参考文献

1. 张红卫, 王子仁, 张士瑞. 发育生物学. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
2. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz J M, *et al.* Beyond *Wnt* inhibition: new functions of secreted frizzled-related proteins in development and disease. *Journal of Cell Science*, 2008, 121: 731-746.
3. Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development*, 2007, 134: 3 401-3 411.
4. Clevers H. *Wnt*/ $\beta$ -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006, 127: 469-480.
5. Davidson E H, Levine M S. Properties of developmental gene regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 20 063-20 066.
6. Dessaud E, McMahon A P, Briscoe J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development*, 2008, 135: 2 489-2 503.
7. Grigoryan T, Wend P, Klaus A, *et al.* Deciphering the function of canonical *Wnt* signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of  $\beta$ -catenin in mice. *Genes & Development*, 2008, 22: 2 308-2 341.
8. Harley V R, Clarkson M J, Argentaro A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (Sex-Determining Region on the Y Chromosome) and SOX9 [SRY-Related High-Mobility Group (HMG) Box 9]. *Endocrine Reviews*, 2003, 24:466-487.
9. Hayward P, Kalmar T, Arias A M. *Wnt*/Notch signalling and information processing during development. *Development*, 2008, 135: 411-424.
10. Ingham P W, McMahon A P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*, 2001, 15:3 059-3 087.
11. Ishii M, Tachiwana T, Hoshino A, *et al.* Potency of testicular somatic environment to support spermatogenesis in XX/Sry transgenic male mice. *Development*, 2007, 134: 449-454.
12. Juan Carlos Polanco J C, Koopman P. Sry and the hesitant beginnings of male development. *Developmental Biology*, 2007, 302: 13-24.
13. Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, *et al.* Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol*, 2006, 4(6): e187.
14. Murry C E, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant population: lessons from embryonic development. *Cell*, 2008, 132: 661-680.
15. Müller W A. *Developmental Biology*. 黄秀英, 劳为德, 郑瑞珍, 译. 北京: 高等教育出版社/Springer, 1998.
16. Rodaway A, Patient P. Mesendoderm: an ancient minireview germ layer? *Cell*, 2001, 105: 169-172.
17. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-667.
18. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes & Development*, 2008, 22:2 454-2 472.
19. Vazin T, Freed W J. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci*, 2010, 28(4): 589-603.
20. Wilson L, Maden M. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental Biology*, 2005, 282: 1-13.
21. Wolpert L, Iessell T, Lawrence P, *et al.* *Principles of Development*. 3rd ed. London: Oxford University Press, 2006.
22. Zhao G Q, Garbers D L. Male germ cell specification and differentiation. *Developmental Cell*, 2002, 2: 537-547.

数字图书馆  
PDG

# 细胞死亡与细胞衰老

但凡生命，最终都会死亡，细胞作为生命的基本单位也不例外。就单细胞生物而言，例如酵母和细菌，细胞死亡 (cell death) 即个体的死亡。对于多细胞生物，细胞的死亡是维持整个生物体的正常生长发育及生命活动的必要条件，其重要性不亚于细胞的增殖。细胞死亡的方式多种多样，包括细胞凋亡 (apoptosis)、坏死 (necrosis) 和自噬性细胞死亡 (autophagic cell death) 等，它们具有不同的形态和分子特征，发挥不同的功能，但均受到细胞内在基因控制，其中有关动物细胞凋亡的功能与机制的研究最为深入。

个体的衰老 (aging) 是指随着年龄的增加，机体功能呈现退行性变化，并伴随生殖能力下降和死亡率上升的现象。人们所关注的个体衰老是一个长时程过程，追踪和研究难度较大，因此人们对于衰老，特别是人体衰老的机制知之甚少。衰老具有多层含义，可以具体表现为个体衰老、细胞衰老 (cell aging)、细胞器衰老、生物大分子衰老等不同层次。个体衰老在某种程度上与细胞衰老有关，因此有相当多的研究者用体外培养的细胞为模型来研究衰老现象。细胞死亡和细胞衰老是两个不同的生理过程，有着不同的分子机制。

## 第一节 细胞死亡

研究发现，不论单细胞生物还是多细胞生物，细

胞死亡往往受细胞内由遗传机制决定的“死亡程序”控制，要求特定的基因表达，是“主动”而非“被动”的过程，所以细胞死亡常常被称为程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD)。这一概念最初是发育生物学家提出的，特指个体发育过程中发生的某类细胞的大量死亡。现在发现动物、植物、真菌 (酵母)，甚至细菌细胞均存在程序性死亡现象，死亡方式主要包括 3 种：凋亡、坏死和由细胞自噬导致的自噬性细胞死亡，这 3 种方式的特征、机制和生理意义各不相同。

### 一、细胞凋亡

细胞凋亡，尤其是动物细胞的凋亡是研究得最为深入的细胞死亡方式之一。早在 1885 年，德国生物学家 Flemming 就曾描述过卵巢滤泡细胞的凋亡形态特征。他观察到卵巢滤泡细胞死亡时伴随染色质的水解，因此将这种细胞死亡现象称作“染色质溶解” (chromatolysis)。但当时学者们并没有意识到这是一种与细胞坏死不同的新的细胞死亡方式，因此这个现象被忽视了将近一个世纪。1965 年，澳大利亚病理学家 John Kerr 观察到结扎大鼠门静脉后，在局部缺血的情况下，大鼠肝细胞连续不断地转化为小的圆形的细胞质团。这些细胞质团由质膜包裹的细胞碎片 (包括细胞器和染色质) 组成。起初他称这种现象为“皱缩型坏死”，后来发现死亡细胞内的溶酶体保持完整，死亡细胞从周围的组织中脱落并被吞噬，机体不发生炎症反应，与细

胞坏死的现象有很大区别。经过深思熟虑, 1972年 J. F. R. Kerr 和另两位研究者 A. H. Wyllie、A. R. Currie 一起将这一现象命名为细胞凋亡 (apoptosis)。“apoptosis (apo-ptosis)”源自古希腊语, 意指花瓣或树叶的脱落、凋零。这一命名的生物学意义在于强调这种细胞死亡方式是正常的生理过程。此后, 研究者们不断发现细胞凋亡的各种生理学及生物化学特征。1977年, M. M. Don 发现了生理或病理性刺激条件下淋巴细胞发育过程中的凋亡现象; 1980年, Wyllie 总结了细胞凋亡的共同形态学特征。到 1986年, Robert Horvitz 利用一系列线虫突变体, 发现了线虫发育过程中控制细胞凋亡的关键基因, 使原先侧重于形态学描述的细胞凋亡概念在基因水平上得以阐释, 即细胞凋亡是受基因调控的主动的生理性自杀行为。Robert Horvitz 因这一研究成果获得了 2002 年诺贝尔生理学或医学奖。此后, 对细胞凋亡分子机制的解析迅速展开, 成为 20 世纪 90 年代生命科学的一大研究热点。

### (一) 细胞凋亡的特征

典型动物细胞凋亡过程, 在形态学上可分为 3 个阶段 (图 16-1)。

#### 1. 凋亡的起始

这一阶段的形态学变化表现为: 细胞表面的特化结构如微绒毛等消失, 细胞间接触消失, 细胞膜依然完整, 仍具有选择通透性; 细胞质中, 线粒体大体完整, 但核糖体逐渐与内质网脱离, 内质网囊腔膨胀, 并逐渐与质膜融合; 细胞核内染色质固缩, 形成新月形帽状结构, 沿着核膜分布。这一阶段历时数分钟, 然后进入第二阶段。

#### 2. 凋亡小体的形成

核染色质断裂为大小不等的片段, 与某些细胞器如线粒体等聚集在一起, 被反折的细胞质膜包裹, 形成球形的结构, 称为凋亡小体 (apoptotic body)。从外观上看, 细胞表面产生许多泡状或芽状突起, 随后逐渐分隔, 形成单个的凋亡小体。

#### 3. 吞噬

凋亡小体逐渐被邻近细胞或吞噬细胞吞噬, 在溶酶体内被消化分解。细胞凋亡最重要的特征, 是整个过程中细胞膜始终保持完整, 细胞内含物不泄漏到细胞外, 因此不引发机体的炎症反应。细胞凋亡的过程很迅速, 从起始到凋亡小体的出现不过数分钟, 大约 30 min 到几个小时后整个凋亡细胞便被吞噬灭迹。因此, 细胞凋

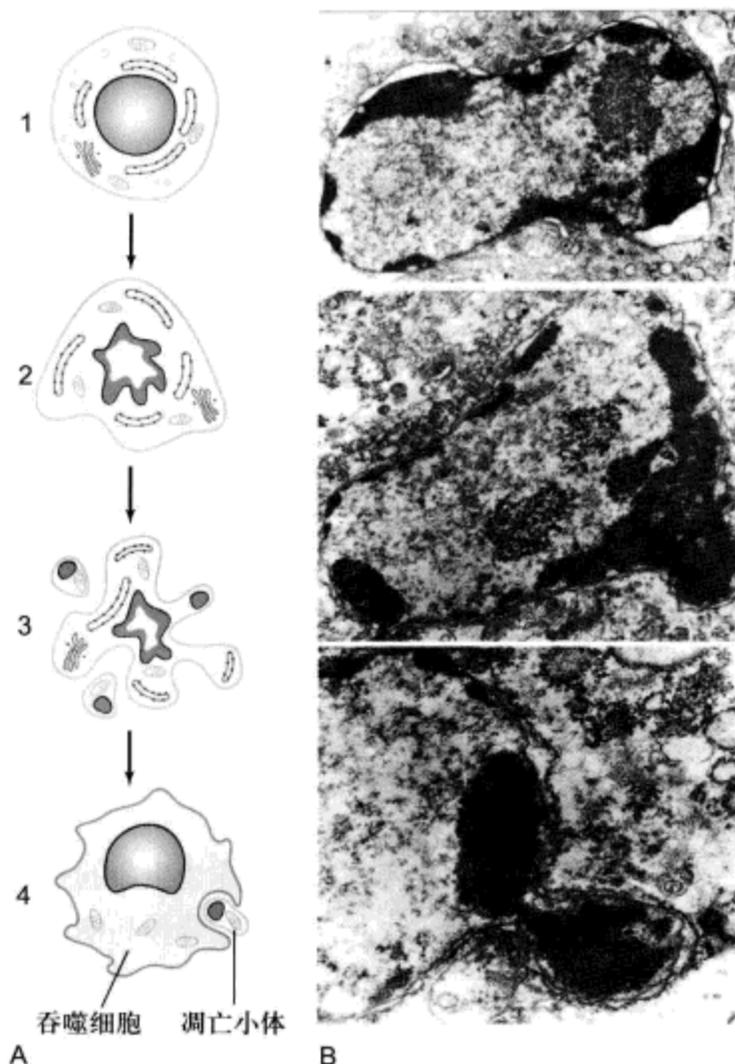


图 16-1 细胞凋亡的过程及特征。

A. 细胞凋亡过程模式图。1. 正常细胞; 2. 细胞凋亡的起始, 染色质固缩、分离并沿核膜分布, 细胞发生皱缩; 3. 凋亡中的细胞, 细胞质膜反折, 包裹染色质片段和细胞器等细胞碎片, 形成芽状突起并逐渐分隔, 形成凋亡小体; 4. 凋亡小体被吞噬细胞吞噬。B. 凋亡细胞的电镜照片, 显示染色质的变化。上图: 染色质凝集并沿核膜分布; 中图, 下图: 染色质逐渐“离开”细胞核, 进入核膜包围的泡状结构。(B 图由丁明孝提供)

亡虽然是机体中频繁发生的细胞死亡方式, 在组织学水平上却难以观察到, 因而也迟迟未引起早期研究者的注意。

### (二) 细胞凋亡的检测方法

细胞凋亡具有明显的形态学和生理生化特征。常用的检测方法如下:

#### 1. 形态学观察

应用各种染色法可观察凋亡细胞的形态学特征。有些染料如台盼蓝 (trypan blue) 无法进入活细胞, 但可使死细胞着色。4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI), 是常用的一种与 DNA 结合的荧光染料, 可以染细胞核, 因此借助荧光显微

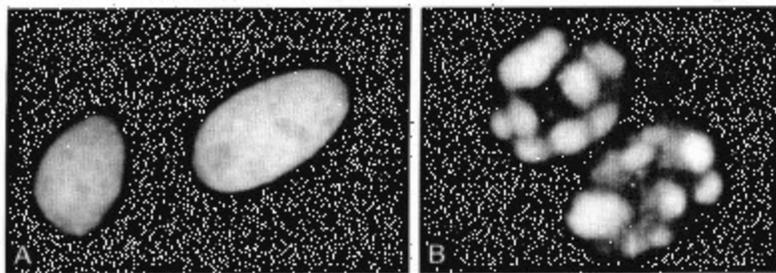


图 16-2 DAPI 染色显示凋亡细胞的染色质凝集  
A. 正常细胞核。B. 凋亡细胞核。(丁明孝提供)

镜, 可以观察到细胞核的形态变化 (图 16-2)。吉姆萨 (Giemsa) 染色法可以使染色质着色, 便于在普通光学显微镜下观察到染色质固缩、趋边化、凋亡小体的形成等凋亡过程。

## 2. DNA 电泳

细胞凋亡时, 细胞内特异性核酸内切酶活化, 染色质 DNA 在核小体间被特异性切割, DNA 降解成 180~200 bp 或其整数倍片段。因此凋亡细胞中提取的 DNA 在进行常规的琼脂糖凝胶电泳时, 这些大小不同的 DNA 片段就呈现出梯状条带 (DNA ladders) (图 16-3)。这一方法是鉴定细胞凋亡最为简便可靠的方法之一。

## 3. DNA 断裂的原位末端标记法

即转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法 (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)。这一方法能对 DNA 分子断裂缺口中的 3'-OH 进行原位标记。正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂, 因而没有 3'-OH 形成, 很少能够被染色; 而凋亡细胞的核 DNA 断裂后产生 3'-OH 末端, 因此可借助一种可观测的标记物如荧光素对单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色, 用荧光显微镜进行观察 (图 16-4)。

## 4. 彗星电泳法

彗星电泳法 (comet assay) 的原理是将单个细胞悬浮于琼脂糖凝胶中, 经裂解处理后, 再在电场中进行短时间的电泳, 并用荧光染料染色。凋亡细胞中的 DNA 降解片段, 在电场中泳动速度较快, 使细胞核呈现出一种彗星式的图案, 而正常的无 DNA 断裂的核在泳动时保持圆球形, 这是一种快速简便的凋亡检测法。

## 5. 流式细胞分析

与正常完整的二倍体细胞相比, 凋亡细胞 DNA 发生断裂和丢失, 呈亚二倍体状态。采用碘化丙啶染色使 DNA 产生激发荧光, 流式细胞仪能够检测出凋亡的亚二倍体细胞。

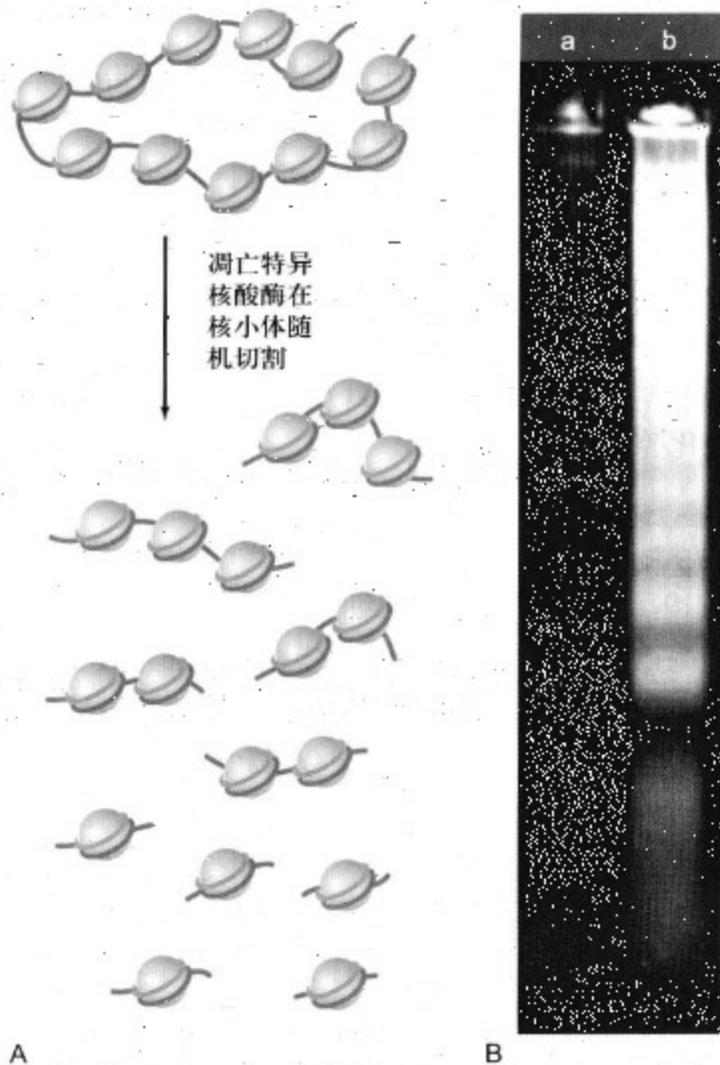


图 16-3 细胞凋亡的典型特征——DNA 梯状条带

A. DNA 梯状条带产生过程示意图。细胞凋亡时, 细胞内特异性核酸内切酶活化, 染色质 DNA 被随机地在核小体间切割, 降解成 180~200 bp 或其整数倍片段。B. 正常细胞与凋亡细胞的 DNA 电泳照片。a 为对照的正常人胚肾 293 细胞 DNA; b 为过量表达肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1) 发生凋亡的 293 细胞 DNA。由于提取 DNA 过程中保持细胞核膜的完整, 因此正常细胞的提取物中几乎没有 DNA; 而凋亡细胞凋亡小体中的 DNA 被提取出来, 长度相差 200 bp 或其整数倍的 DNA 分子电泳呈现梯状条带。(B 图由陈丹英博士提供)

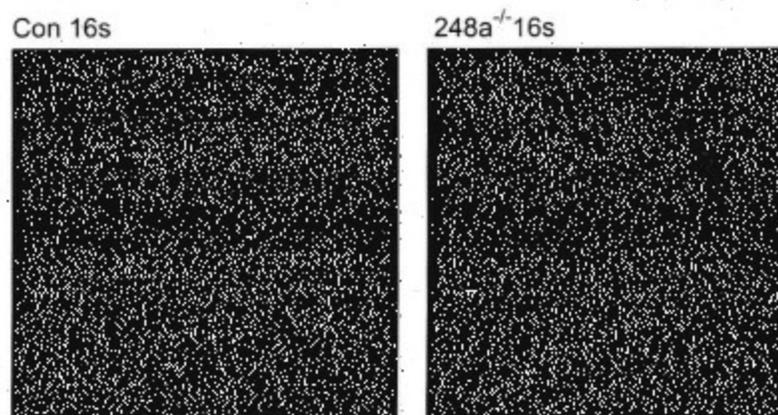


图 16-4 原位末端标记法显示斑马鱼胚胎发育过程中的细胞凋亡  
正常 16 体节期的斑马鱼胚胎 (Con 16s) 在发育过程中有少量细胞发生凋亡, 突变体 (248a<sup>-/-</sup>16s) 的中枢神经细胞发生大量凋亡。(祖尧和佟向军博士提供)

## 6. 检测细胞膜成分变化

细胞凋亡早期，位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸翻转至细胞膜外侧，可以用针对磷脂酰丝氨酸的荧光标记探针进行检测。如一种钙依赖性的磷脂结合蛋白 Annexin V 能特异识别暴露在细胞外侧的磷脂酰丝氨酸。此方法检测早期细胞凋亡较 TUNEL 法更为灵敏。

此外还可借助其他的生理生化方法检测细胞凋亡，如检测 caspases 的激活、Cyt c 的释放、线粒体膜电位的变化等。

### (三) 细胞凋亡的生理学及医学意义

1972 年，Kerr 等确立细胞凋亡的概念时就提出：细胞凋亡降低细胞数量，细胞分裂增加细胞数量，二者同为控制细胞族群大小的两大原动力。为了维持机体组织中适宜的细胞数量，在细胞分裂和细胞死亡之间需要一种精确的动态平衡。对于多细胞动物个体，细胞凋亡在正常发育、自稳态的维持、免疫耐受的形成、肿瘤监控等过程中均发挥重要作用。

在动物个体发育的组织形成时期，一开始往往制造数量过多的细胞，继而再依据某种需求准则来选择最后留存的功能细胞。例如在脊椎动物神经系统的发育过程中，约有 50% 的原始神经元存活并且与靶细胞建立了连接，而没有建立连接的神经元则发生凋亡。这与靶细胞（如肌肉细胞）分泌的一种存活因子——神经生长因子（nerve growth factor, NGF）有关。只有接受了足够量存活因子的神经元才能生存，其他的细胞则发生凋亡。动物机体通过这种方式来调节神经细胞的数量，使之与需要神经支配的靶细胞的数量相适应以建立正确的

神经网络联系（图 16-5）。

动物发育过程中，细胞凋亡是塑造个体及器官形态的机制之一。高等哺乳类动物指（趾）间蹼的消失、顎融合、肠管腔道的形成、视网膜发育等过程都必须有细胞凋亡的参与。动物蜕变过程中幼体器官的缩小和退化（如蝌蚪尾的消失等）也是通过细胞凋亡来实现的。细胞凋亡还参与了免疫耐受的形成。例如胸腺细胞经过一系列的发育过程而成为各种类型的免疫活性细胞，同时通过细胞凋亡，对识别自身抗原的 T 细胞克隆进行选择性地消除。通过这一过程，既形成了有免疫活性的淋巴细胞，又产生了对自身抗原的免疫耐受。T 细胞克隆凋亡的异常会导致自身免疫疾病。

细胞凋亡还是一种生理性保护机制，能够清除体内多余、受损或危险的细胞而不对周围的细胞或组织产生损害。在成熟的动物个体中，机体通过调节细胞凋亡和细胞增殖的速率来维持组织器官细胞数量的稳定以及成体细胞的自然更新。例如用苯巴比妥处理大鼠，其肝细胞受到刺激开始细胞分裂，导致肝体积增大。当药物作用停止后，肝细胞发生凋亡的数量会显著增加，使得一周之内大鼠的肝就恢复到原来的大小。而成体组织在自然更新过程中发生凋亡的细胞数量惊人，健康成人体内每秒分裂产生约 100 000 个新细胞，同时有相当数量的细胞发生凋亡。细胞凋亡也是保护生物体的一项重要机制，机体通过细胞凋亡来剔除受到环境伤害或被病原体感染的细胞。例如杀伤性 T 淋巴细胞能够分泌一种细胞因子——Fas 配体（死亡配体），与被感染的细胞表面的死亡受体——Fas 蛋白结合，启动被感染细胞内的凋亡程序，致使被感染的细胞发生凋亡（见后文）。一些细

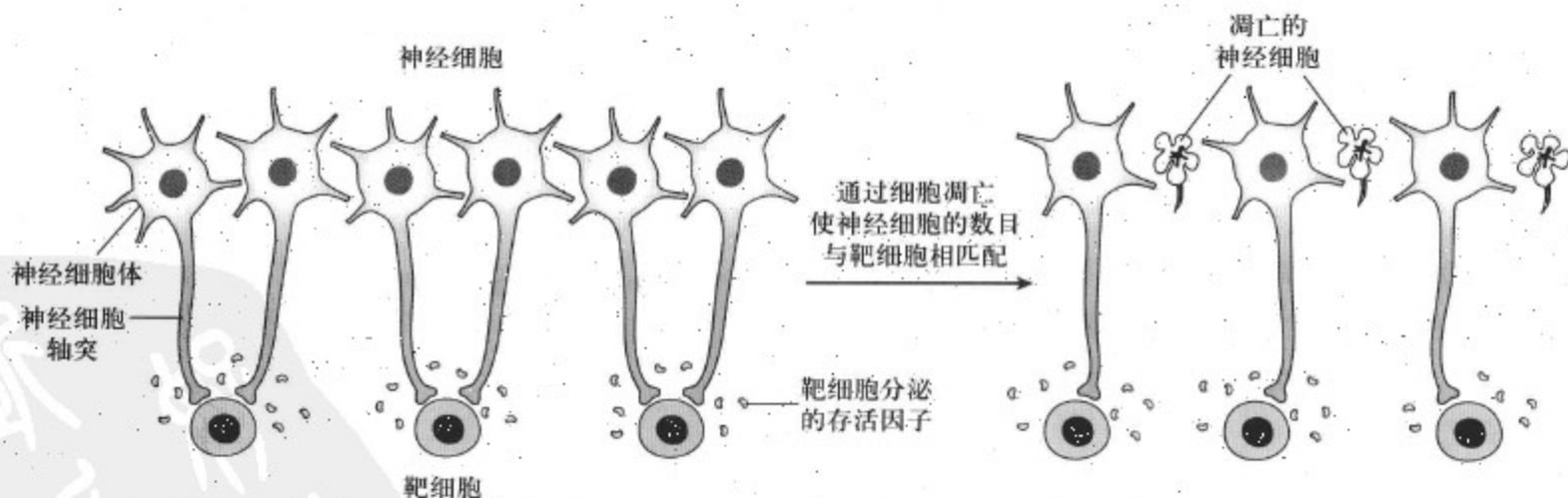


图 16-5 细胞凋亡使得神经细胞与靶细胞的数量相匹配

发育过程中神经细胞的数量较靶细胞多。靶细胞通过分泌存活因子来调节神经细胞的数量。不能获得足够存活因子的神经细胞发生凋亡，使得剩下的神经细胞与靶细胞的数量相当。

胞在受损伤或受胁迫的情况下能够同时产生 Fas 配体和 Fas 蛋白, 导致自身的凋亡。

人体细胞凋亡的失调, 包括不恰当的凋亡激活或抑制会引发多种疾病。研究发现, 细胞凋亡不足会引发肿瘤和自身免疫病。例如正常的 T 淋巴细胞在受到入侵的抗原刺激后被激活, 产生一系列的免疫应答反应。机体为了防止过高的免疫应答, 或防止这种免疫应答无限制地发展下去, 会通过诱导 T 淋巴细胞凋亡来控制 T 淋巴细胞的寿命。自身免疫性淋巴增生综合征 (ALPS) 患者体内的 Fas 配体和 Fas 蛋白均发生突变, 使得增生的 T 淋巴细胞无法正常凋亡, 造成淋巴细胞增殖性的自身免疫疾患。同时临床研究发现, 相当多的恶性肿瘤的凋亡机制受到抑制, 使机体不能正常清除恶变细胞。对凋亡诱导因子敏感性的降低是多种肿瘤细胞的基本特征。肿瘤细胞中有一系列的癌基因过量表达, 其产物不仅可以直接刺激肿瘤细胞的生长, 也能够阻断肿瘤细胞的凋亡, 使肿瘤细胞数目增加。例如哺乳动物细胞的第一个凋亡相关基因 *Bcl-2* 是从滤泡淋巴瘤 (follicular lymphomas) 细胞中克隆出来的。由于染色体重排, 这个凋亡抑制基因的编码区与免疫球蛋白的增强子相连, 导致 *Bcl-2* 蛋白的过量表达, 使瘤细胞能够抵抗凋亡, 持续增殖。

另一方面, 细胞的过度凋亡将会导致免疫功能的丧失或引发炎症。例如人免疫缺陷病毒 HIV 感染引起艾滋病, 其主要的发病机制是感染后 HIV 特异性地破坏 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞, 使 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞以及与其相关的免疫细胞功能缺陷, 极大地增加了机会性感染及肿瘤的发生概率。近年认为, HIV 病毒基因的产物能够直接诱发 T 细胞凋亡或使其对凋亡信号的敏感性大大增强。此外, 多种急性或慢性疾病如败血症、心肌梗塞、急性肝损伤、亨廷顿综合征, 以及神经元退行性疾病帕金森综合征、阿尔茨海默病 (老年性痴呆) 等都与细胞的过度凋亡相关。目前知道阿尔茨海默病的发生主要是由于海马及基底神经核的神经元大量丧失, 其原因可能是  $\beta$ -淀粉样蛋白过量表达, 沉积于神经元内, 激活周围的吞噬细胞释放细胞因子和炎性介质, 促进神经细胞凋亡的发生, 从而导致神经元的大量丧失。

#### (四) 细胞凋亡的分子机制

对于动物细胞, 诱导细胞凋亡的因子大致可分为两大类: ① 物理性因子, 包括射线 (紫外线、 $\gamma$ 射线等), 较温和的温度刺激 (如热激、冷激) 等; ② 化学

及生物因子: 包括活性氧基团和分子 (超氧自由基、羟自由基、 $H_2O_2$ )、钙离子载体、 $VK_3$ 、视黄酸、细胞毒素、DNA 和蛋白质合成的抑制剂 (如环己亚胺)、正常生理因子 (激素, 细胞生长因子等) 的失调, 以及凋亡因子如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) 处理等。

研究表明, 在凋亡诱导因子的刺激下, 所有动物细胞都具有类似的凋亡途径, 可分为接收凋亡信号, 凋亡相关分子的活化, 凋亡的执行, 凋亡细胞的清除 3 个阶段。蛋白酶 caspases (cysteine aspartic acid specific protease) 家族成员在这一过程中发挥了重要作用, 因此这种凋亡方式被称为 caspases 依赖性的细胞凋亡; 近年来还发现, 细胞中还存在着不依赖于 caspases 的凋亡途径。当细胞受到凋亡信号的刺激时, 这两条途径一般能同时被激活。

##### 1. caspases

caspases 是一组存在于细胞质中具有类似结构的蛋白酶。它们的活性位点均包含半胱氨酸残基, 能够特异地切割靶蛋白天冬氨酸残基后的肽键。因此, caspases 称之为天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶。caspases 负责选择性地切割某些蛋白质, 切割的结果是使靶蛋白活化或失活, 而非完全降解。

caspases 的发现源于秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 细胞凋亡的研究。该线虫从胚胎发育到成体的过程中共产生 1 090 个体细胞, 其中 131 个体细胞发生凋亡后消失。1986 年, 美国麻省理工学院的 Robert Horvitz 发现, 当 *ced3* 或 *ced4* 突变后, 原先应该凋亡的 131 个细胞依然存活; 与之相反, *ced9* 的突变导致所有细胞在胚胎期死亡, 无法得到成虫。这一结果证明, *ced3* 和 *ced4* 是线虫发育过程中细胞凋亡的必需基因, *ced9* 的功能是抑制细胞凋亡。鉴于这一重要发现, Robert Horvitz 与另外两位线虫研究模型的建立者: 英国的 Sydney Brenner 和 John E. Sulston 共同获得了 2002 年诺贝尔生理学或医学奖。线虫凋亡基因的发现促进了其他动物特别是哺乳类动物细胞凋亡机制的研究。线虫中 *Ced3* 是半胱氨酸蛋白酶, 它在哺乳动物细胞中的同源蛋白是白介素-1 $\beta$  转换酶 (interleukin-1 $\beta$  converting enzyme, ICE), 负责催化白介素-1 $\beta$  前体的剪切成熟过程。研究者在大鼠成纤维细胞中过量表达 ICE 和 *ced3* 都会引起细胞凋亡, 表明哺乳动物细胞的 ICE 和线虫的 *Ced3* 在结构和功能上具有相似性, ICE 后被命名为哺乳动物细胞 caspases 家族中的 caspase-1。

现在发现的哺乳动物细胞 caspases 家族成员共

表 16-1 caspases 家族成员及其在细胞凋亡过程中的功能

名称 (别名)	在细胞凋亡过程中的功能
caspase-1 (ICE)	白介素前体的切割; 参与死亡受体介导的凋亡
caspase-2 (Nedd-2/ICH1)	起始 caspases 或效应 caspases
caspase-3 (apopain/ CPP32/Yama)	效应 caspases
caspase-4 (Tx/ICH2/ICE <sub>rel</sub> -II)	白介素前体的切割
caspase-5 (ICE <sub>rel</sub> -III/TYF)	白介素前体的切割
caspase-6 (Mch2)	效应 caspases
caspase-7 (ICE-LAP3/Mch3/CMH-1)	效应 caspases
caspase-8 (FLICE/MACH/Mch5)	死亡受体途径的起始 caspases
caspase-9 (ICE-LAP6/Mch6)	起始 caspases
caspase-10 (Mch4/FLICE2)	死亡受体途径的起始 caspases
caspase-11 (ICH3)	白介素前体的切割; 死亡受体途径的起始 caspases
caspase-12	内质网凋亡途径的起始 caspases
caspase-13	未知
caspase-14	未知
caspase-15	未知

有 15 种 (表 16-1)。其中 caspase-1 和-11 (可能还有 caspase-4) 主要负责白介素- $1\beta$  前体的活化, 不直接参与凋亡信号的传递; 其余的 caspase 根据在细胞凋亡过程中发挥的功能不同, 可分为两类: 起始 caspases 和效应 caspases。起始者包括 caspase-2, -8, -9, -10, -11, 负责对效应者的前体进行切割; 效应者包括 caspase-3, -6, -7, 负责切割细胞核内、细胞质中的结构蛋白和调节蛋白, 使其失活或活化, 保证凋亡程序的正常进行。

不论是起始 caspases 还是效应 caspases, 通常均以无活性的酶原形式存在于细胞质中。接收凋亡信号刺激后, 酶原分子在特异的天冬氨酸位点被切割, 产生的两段多肽形成大小两个亚基, 再聚合成异二聚体, 此即具有活性的酶 (图 16-6A)。起始 caspases 的活化属于同性活化 (homo activation), 即同一种酶原分子彼此结合或与接头蛋白结合形成复合物, 在复合物中构象改变被活化, 进而彼此切割产生有活性的异二聚体。起始 caspases 中, caspase-8 和-10 含有串联重复的死亡效应结构域 (death effector domain, DED), 而 caspase-2 和-9 则含有 caspase 募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD)。这两种结构域存在于 caspase 酶原分子和一些凋亡相关接头蛋白分子中, 通过结构域之间的聚合, caspase 能够彼此结合或与接头蛋白结合, 被招募到上

游信号复合物中发生同性活化 (图 16-6A)。

效应 caspases 的活化属于异性活化 (hetero-activation), 一般是已活化的起始 caspases 招募效应 caspases 酶原分子后, 对其进行切割, 产生活性的效应 caspases (图 16-6A)。效应 caspases 负责切割细胞中的结构蛋白和调节蛋白, 使其失活或活化, 此时细胞进入凋亡的执行阶段。

目前已知的效应 caspases 底物约 280 种。caspases 对于这些底物的切割使得细胞呈现出凋亡的一系列形态学和分子生物学特征。可以分为被活化和失活两大类。被 caspase 活化的代表分子是 caspases 激活的核酸酶 CAD (caspase activated DNase)。CAD 一般与其抑制因子 ICAD (inhibitor of CAD) 结合在一起, 处于失活状态。细胞启动凋亡程序后, 活化的效应 caspase-3 降解 ICAD, 使 CAD 释放出来并在核小体间切割 DNA, 形成间隔 200 bp 的 DNA 片段, 琼脂糖电泳时产生凋亡标志性的梯状条带。众多被 caspase 失活的分子都在维护细胞正常状态中发挥关键作用。例如聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 [poly (ADP-ribose) polymerase, PARP] 存在于多数真核细胞中, 能够识别结构损伤的 DNA 片段, 被认为是 DNA 损伤的感受器。它使组蛋白发生 ADP-核糖基化, 从 DNA 上脱离下来, 有助于修复蛋

白与 DNA 结合进行损伤修复。在凋亡过程中 PARP 被 caspases 切割后失活，使细胞对 DNA 的降解不再敏感。另外，效应 caspases 还通过切割细胞骨架蛋白使细胞的骨架体系发生结构变化，便于细胞改变形态以及形成凋亡小体等。例如切割核纤层蛋白使核纤层解聚，导致核膜收缩；切割核孔蛋白以及细胞质骨架蛋白，使细胞核内外的信号传递中断。黏着斑激酶（focal adhesion kinase, FAK）参与黏着斑形成和调节，是整联蛋白介导的信号转导中的重要成员，它同样也是效应 caspases 的底物，FAK 被切割失活导致凋亡细胞与胞外基质或其他细胞的解离。

起始 caspases 和效应 caspases 组成细胞内凋亡信号的级联分子网络（图 16-6B），凋亡“程序”一旦启动，级联网络“顶端”的起始 caspases 首先活化，切割下游 caspases 酶原，使得凋亡信号在短时间内迅速放大并传递到整个细胞，产生凋亡效应。这一过程是不可逆

转的。

由于 caspases 在细胞凋亡途径中发挥关键作用，可将其作为药物设计的靶标分子来对凋亡程序进行控制。在动物模型中，caspase 的抑制剂已被证实对细胞过度凋亡引发的疾病有药理效果。例如研发的新型 caspases 抑制剂可以通过抑制细胞凋亡来降低急性心脏和肝损伤时的损伤度。另一方面，选择性地激活 caspases 或降低其活化的能障，有助于治疗由于凋亡敏感性降低而导致的癌症。例如将肿瘤细胞胞内或胞外的特异性蛋白与 caspases 连接形成融合蛋白，通过特异性蛋白的聚合作用引发 caspases 的活化，从而选择性杀死肿瘤细胞；或者通过将肿瘤细胞中失活的 caspases 及上游因子替换成活性形式，或用 RNA 干扰的方法降低肿瘤细胞中 caspases 抑制因子的表达等方法，使得能够活化的 caspases 分子的数量大大增加，以促进肿瘤细胞的凋亡。

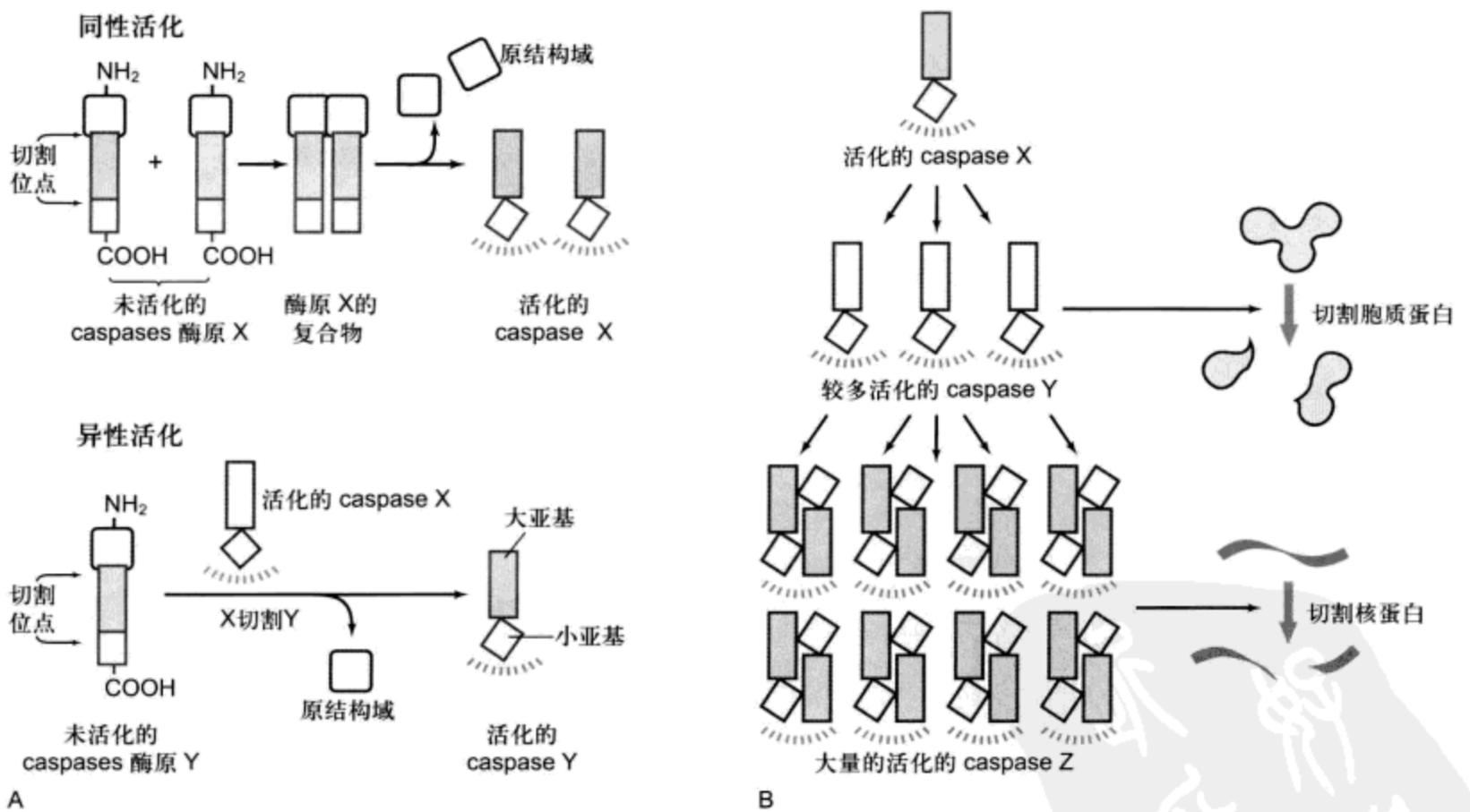


图 16-6 细胞凋亡过程中 caspases 级联效应

A. caspases 酶原的活化。接收凋亡信号刺激后，酶原分子在特异的天冬氨酸位点被切割，产生的两段多肽形成大小两个亚基，聚合成异二聚体即有活性的酶。其中，起始 caspases 酶原的活化属于同性活化，即同一种酶原分子（X）彼此结合或与接头蛋白结合形成复合物，在复合物中构象改变被活化进而彼此切割产生活性形式。效应 caspases 酶原的活化属于异性活化，由已活化的起始 caspases X 切割效应 caspases 酶原分子（Y），产生活性的效应 caspases。B. caspases 级联效应。少量活化的起始 caspase X 能够切割许多下游 caspases 前体（Y），进而通过级联放大作用，产生更大量的活化的下游 caspase Z。其中的效应 caspases 切割细胞质内及细胞核内重要的结构和功能蛋白，产生凋亡效应。

## 2. caspases 依赖性细胞凋亡途径

在哺乳动物细胞中, caspases 依赖性的细胞凋亡主要通过两条途径引发: 由死亡受体起始的外源途径和由线粒体起始的内源途径 (图 16-7)。

死亡受体介导的细胞凋亡起始于死亡配体与受体的结合。死亡配体主要是肿瘤坏死因子 (TNF) 家族成员。肿瘤坏死因子是具有多种生物学效应的细胞因子, 最初发现存在于注射细菌脂多糖后的小鼠血清中, 该蛋白能够使肿瘤组织出血坏死, 故此得名。TNF 主要由激活的单核-巨噬细胞分泌, 诱导细胞凋亡和诱发炎症反应是其主要的生理效应。死亡配体的生物学功能是通过与细胞表面的受体结合来实现的。人类细胞中迄今发现的死亡受体家族成员至少有 8 种: TNF-R1, Fas (Apo-1,

CD95), DR3 (Apo-3, WSL-1, TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2), DR-6, EDA-R (ectodermal dysplasia receptor) 和 NGF-R。它们的胞质部分均含有死亡结构域, 负责招募凋亡信号通路中的信号分子。Fas 是死亡受体家族中的代表成员。配体与之结合后引起 Fas 的聚合, 聚合的 Fas 通过胞质区的死亡结构域招募接头蛋白 FADD 和 caspase-8 酶原, 形成死亡诱导信号复合物 (death inducing signaling complex, DISC) (图 16-7)。caspase-8 酶原在复合物中通过自身切割 (同性活化) 而被激活, 进而切割效应 caspases——caspase-3 酶原, 产生有活性的 caspase-3, 导致细胞凋亡。另一方面, 活化的 caspase-8 还通过切割信号分子 Bid 将凋亡信号传递到线粒体, 引发凋亡的内源途径, 使凋亡信

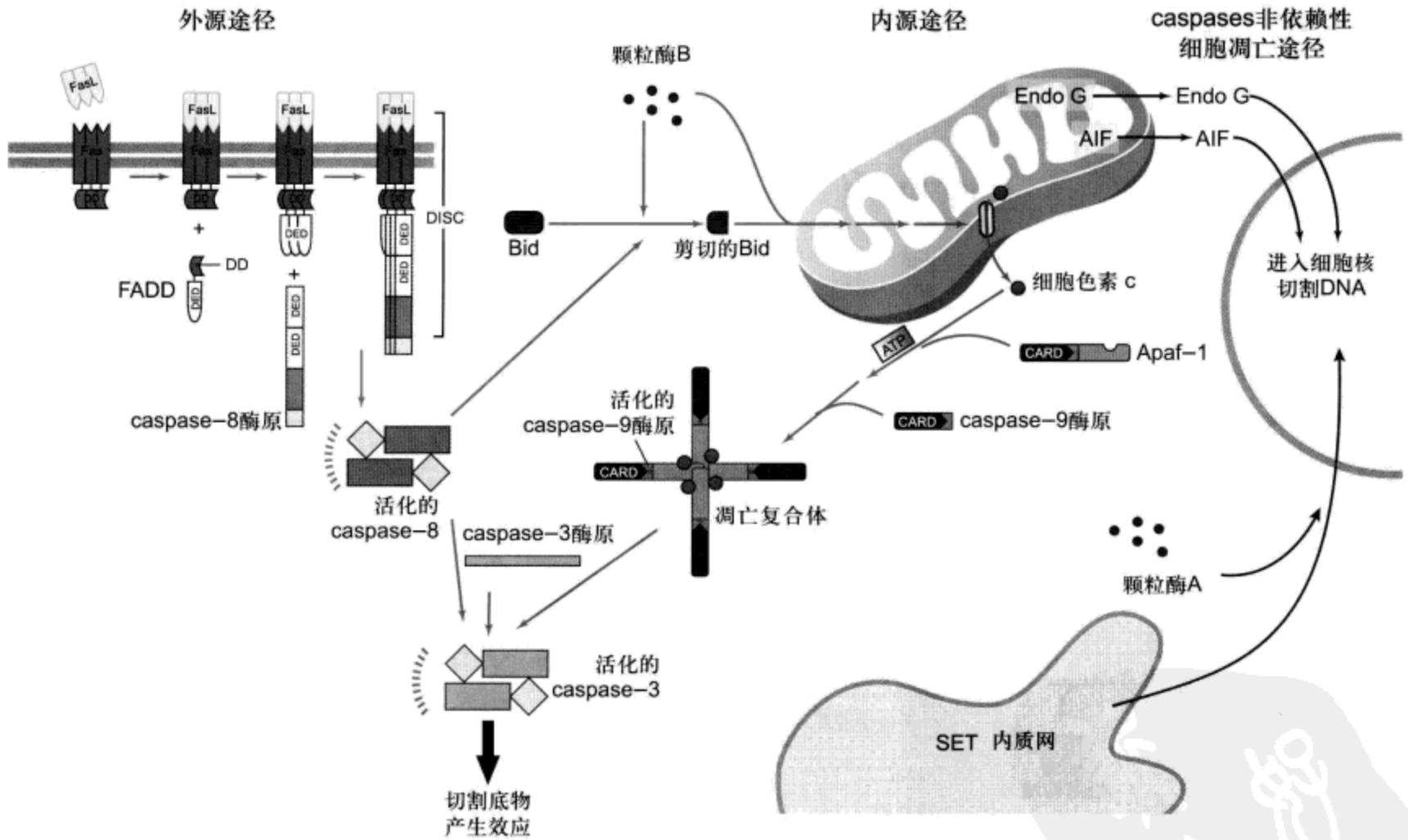


图 16-7 细胞凋亡信号途径

在依赖于 caspases 的外源途径中 (红线), 死亡受体如 Fas 在配体 FasL 的刺激下, 通过接头蛋白 FADD 将 caspase-8 酶原招募到细胞膜上, 形成死亡诱导信号复合物 DISC。caspase-8 酶原在这个复合物中活化, 进而激活下游的 caspases 级联反应; 在依赖于 caspases 的内源途径中 (红线), 线粒体接收到凋亡信号后, 向细胞质内释放 Cyt c。Cyt c 与 Apaf-1 和 caspase-9 前体形成凋亡复合体 apoptosome, 并活化 caspase-9。caspase-9 活化后激活下游的 caspases 级联反应。外源途径中的 caspase-8 以及细胞毒性 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞分泌的颗粒酶 B, 也可以切割并活化 Bcl-2 家族的促凋亡因子 Bid, 激活内源凋亡途径。在 caspases 非依赖性细胞凋亡途径中 (蓝线), 线粒体释放凋亡因子 EndoG, AIF 等, 直接进入细胞核, 引发 DNA 断裂。另一方面颗粒酶 A 能促使位于内质网的 SET 复合物从内质网上解离下来, 转移到细胞核内并活化, 切割核 DNA。

号进一步扩大。通过以上途径,产生 Fas 配体的杀伤性 T 淋巴细胞可以诱导被病原体感染的靶细胞发生凋亡;而被损伤的细胞可以通过自己产生 Fas 配体和蛋白,导致自身的凋亡。

在细胞凋亡的内源途径中,线粒体处于中心地位。当细胞受到内部凋亡信号(如不可修复的 DNA 损伤)或外部的凋亡信号(如紫外线、 $\gamma$  射线、药物、一氧化氮、活性氧等)刺激时,胞内线粒体的外膜通透性会发生改变,向细胞质中释放出凋亡相关因子,引发细胞凋亡。线粒体释放到胞质中的凋亡因子有多种,其中最“著名”的是 Cyt c。1996 年,美国 Emory 大学王晓东博士领导的研究小组发现,在 HeLa 细胞提取物中加入 dATP 能够诱发 caspase-3 活化,以及外源细胞核 DNA 断裂等典型的凋亡特征。他们将 HeLa 细胞提取物经过柱层析后分为两种组分,流出组分和吸附组分,并发现这两种组分只有合并起来才能诱导凋亡。他们进而对吸附组分进行了分级纯化,最终发现相对分子质量为  $1.5 \times 10^4$  的蛋白是凋亡的必需因子。出乎大家的预料,序列测定的结果表明这一蛋白是线粒体电子传递链的组分 Cyt c。紧接着,他们从流出组分中分离克隆到了另外两个凋亡的必需因子: Apaf-1 (apoptosis protease activating factor) 和 caspase-9,从而建立了细胞凋亡内源途径的模型(图 16-7)。Cyt c 是线粒体电子传递链的成员之一,平时在细胞的呼吸作用中担当电子传递的角色。细胞接受凋亡信号刺激,如发生不可修复的 DNA 损伤时, Cyt c 从线粒体中释放到细胞质中,与另一个凋亡因子 Apaf-1 结合,诱导细胞发生凋亡。Apaf-1 是线虫凋亡分子 Ced4 在哺乳动物细胞中的同源蛋白,相对分子质量为  $1.3 \times 10^5$ , N 端含有 caspases 募集结构域 (CARD)。它与 Cyt c 结合后发生自身聚合,形成一个很大的复合物称为凋亡复合体 (apoptosome)(图 16-7),相对分子质量为  $7 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^6$ 。之后, Apaf-1 通过 CARD 结构域招募细胞质中的 caspase-9 酶原, caspase-9 酶原在凋亡复合体中发生自身切割而活化,活化的 caspase-9 再进一步切割并激活 caspase-3 和 caspase-7 酶原,引发细胞凋亡。

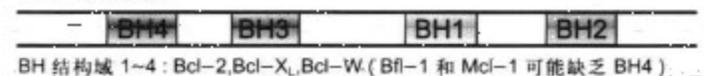
细胞凋亡的内源途径中, Cyt c 的释放是关键,源于线粒体外膜通透性的改变。线粒体外膜的通透性主要受到 Bcl-2 (the B-cell lymphoma gene 2) 蛋白家族的调控。Bcl-2 是线虫凋亡分子 Ced9 在哺乳细胞中的同源物,家族成员大多定位在线粒体外膜上,或受信号刺激后转移到线粒体外膜上。所有成员均含有一

个或者多个 BH (Bcl-2 homology) 结构域,依次命名为 BH1、BH2、BH3 和 BH4 (图 16-8)。按照结构和功能,可将 Bcl-2 家族成员分为 3 个亚族: Bcl-2 亚家族,包括 Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 等,大多具有 4 个 BH 结构域 BH1-4,对细胞凋亡起抑制作用; Bax 亚家族,包括 Bax, Bak, Bok, 它们具有 3 个 BH 结构域 BH1-3,作用与 Bcl-2 亚家族的作用相反,可促进细胞凋亡; BH3 亚家族,包括 Bad, Bid, Bik, Puma, Noxa 等,它们仅有 BH3 结构域,能够充当细胞内凋亡信号的“感受器”,作用也是促进细胞凋亡。关于 Bcl-2 家族调控线粒体外膜通透性,可能的机制是细胞接受凋亡信号后促凋亡因子 Bax 和 Bak 发生寡聚化,从细胞质中转移到线粒体外膜上,并与膜上的电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC) 相互作用,使通道开放到足以使线粒体内的凋亡因子如 Cyt c 等释放到细胞质中,引发细胞凋亡。实验证明,如果细胞中 Bax 和 Bak 基因均被突变,细胞能够抵抗大多数凋亡诱导因素的刺激,说明二者是凋亡信号途径中关键的正调控因子。而抑凋亡因子 Bcl-2 和 Bcl-X<sub>L</sub> 能够与 Bax/Bak 形成异二聚体,通过抑制 Bax 和 Bak 的寡聚化来抑制线粒体膜通道的开启。

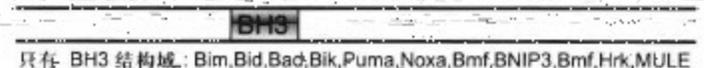
除了线粒体, caspases 的级联激活反应还可能起始于细胞核以及高尔基体、溶酶体、内质网等细胞器。在这些细胞器中发生的凋亡起始的分子机制尚不十分清楚。

上述两种看似迥异的 caspases 依赖性细胞凋亡途径亦有相似之处。即起始 caspases 如 caspase-8, -9 等,均在一些大的多成分复合物中被活化,如 DISC, apoptosome 等。在复合物的形成过程中,多种接头蛋白如 FADD, Apaf-1 等发挥了关键作用,它们负责引导起始 caspases 进入复合物的适当位置,进而使之发生同性活化。

#### Bcl-2 亚家族



#### BH3 亚家族



#### Bax 亚家族



图 16-8 Bcl-2 家族成员结构示意图

细胞中凋亡的外源途径和内源途径也彼此关联。当 caspase-8 通过外源途径被活化后,能够切割促凋亡因子 Bid 使其活化,被激活的 Bid 从细胞质转移到线粒体,促进线粒体上调亡相关因子的释放,从而放大外源凋亡信号的效应;另一方面,凋亡的内源途径被激活后,线粒体上释放的促凋亡因子 Smac (见后文)也能够活化 caspase-8,从而与外源途径交汇。

### 3. caspases 非依赖性的细胞凋亡

研究表明在很多动物细胞中,当使用 caspases 的抑制剂,或者将 caspases 敲除之后,细胞仍然可以发生凋亡。因此,研究者推测细胞内存在不依赖于 caspases 的凋亡途径。相对 caspases 依赖性的细胞凋亡,caspases 非依赖性的细胞凋亡的机制还不完全清楚。已知线粒体在 caspases 非依赖性的细胞凋亡过程中同样发挥了关键作用。除了 Cyt c,线粒体能够向细胞质内释放多个凋亡相关因子,诱发 caspases 非依赖的细胞凋亡(见图 16-7)。

凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF) 是 1999 年克隆的第一个能够诱导 caspases 非依赖性细胞凋亡的蛋白。它位于线粒体外膜。在凋亡过程中,AIF 从线粒体释放到细胞质基质中,进而进入细胞核,引起核内 DNA 凝集并断裂形成约  $5 \times 10^4$  大小的片段,而非 caspases 依赖性细胞凋亡典型的间隔 200 bp 的 DNA 片段。

线粒体释放的另一个因子——限制性内切核酸酶 G (endonuclease G) 也能引发 caspases 非依赖性的细胞凋亡。限制性内切核酸酶 G 属于  $Mg^{2+}$  依赖性的核酸酶家族,定位于线粒体。在线粒体中,它的主要功能是负责线粒体 DNA 的修复和复制。受到凋亡信号的刺激后,限制性内切核酸酶 G 从线粒体中释放出来进入细胞核,对核 DNA 进行切割。在 caspases 未被激活的情况下,产生典型的以核小体为单位的 DNA 片段。研究发现,线虫中限制性内切核酸酶 G 的同源蛋白也具有促凋亡的作用,利用 RNA 干涉技术降低其表达后,线虫发育过程中细胞凋亡进程被明显延迟。

不论是 caspases 依赖性还是非依赖性的细胞凋亡,都会归结到最终阶段:凋亡细胞的清除。凋亡细胞形成的凋亡小体可迅速被周围专职或非专职吞噬细胞识别并吞噬,吞噬信号来自于凋亡细胞表面特有的信号分子。磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine) 是其中的代表性分子。它一般存在于正常细胞质膜脂双层的内叶,细胞发生凋亡时外翻到细胞质膜脂双层外叶,向吞噬

细胞发出“将我吃掉”的信号。因此,作为标志性生化特征,磷脂酰丝氨酸的细胞表面定位是一种有效的细胞凋亡的方法。

### 4. 穿孔蛋白-颗粒酶介导的细胞凋亡

尽管 caspases 依赖性和非依赖性细胞凋亡的生化特征和分子机制有所区别,但在细胞的生理反应过程中往往伴随发生,不分仲伯。细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte) 和自然杀伤细胞 (natural killer cell) 是动物体抗御病毒感染及细胞癌变的“生力军”。它们能够通过多种途径诱导被病毒感染或癌变的靶细胞发生凋亡。途径之一如前所述,分泌死亡配体 Fas 与靶细胞表面受体结合启动 caspases 依赖性的细胞凋亡外源途径;而它们发挥作用的另一种主要方式是通过分泌穿孔蛋白 (perforin) - 颗粒酶介导靶细胞凋亡。

细胞毒性 T 淋巴细胞接收刺激后产生毒性颗粒 (cytotoxic granules) 释放到细胞外,其中主要成分是穿孔蛋白 (perforin) 和颗粒酶 (granzyme) 两类蛋白。穿孔蛋白是跨膜蛋白,能够在靶细胞质膜上形成孔道。颗粒酶是一类丝氨酸蛋白酶,人细胞中迄今发现了 5 个成员:颗粒酶 A、B、H、K、M。其中对颗粒酶 A、B 作用机制的研究较为深入。颗粒酶被 T 淋巴细胞释放到细胞外之后,通过多种方式作用于靶细胞,使之发生凋亡。在靶细胞外,颗粒酶 A、B 切割胞外基质蛋白,使靶细胞与基质及周围细胞脱离;同时,颗粒酶 A、B 在穿孔蛋白的协助下进入靶细胞切割胞内蛋白。进入靶细胞后,颗粒酶通过 caspases 依赖性和非依赖性两种方式促使靶细胞凋亡(见图 16-7)。颗粒酶 B 切割并活化促凋亡因子 Bid,活化的 Bid 转移到线粒体外膜上,与 Bax/Bak 一起改变线粒体外膜通透性,释放 Cyt c 等促凋亡因子,引发 caspases 级联反应,诱导细胞凋亡;颗粒酶 B 还可以通过切割凋亡抑制因子 Mcl-1 诱发细胞凋亡内源途径。颗粒酶 A 则主要通过 caspases 非依赖性细胞凋亡途径促使靶细胞凋亡。同时颗粒酶 A 还通过切割核纤层蛋白和组蛋白破坏细胞核与染色体结构的稳定性,更有利于 DNA 酶的作用。颗粒酶家族的其他成员 H、K 和 M 的作用方式与颗粒酶 A 类似,主要通过 caspases 非依赖途径诱导靶细胞凋亡,其确切的分子机制还有待深入研究。穿孔蛋白-颗粒酶介导的细胞凋亡在机体免疫防御中发挥重要作用。数种家族性遗传病如噬血细胞性淋巴细胞增生症 (familial haemophagocytic lymphohistiocytosis, FHL) 等均与穿孔蛋白-颗粒酶途径异常相关。FHL 的患者穿孔蛋白基因发生突变,颗粒

酶无法进入靶细胞，导致机体不能清除感染源，同时使得 T 淋巴细胞和巨噬细胞不受控制地快速增殖，发生异常的巨噬细胞吞噬红血球、白血球、血小板及其前体细胞现象。

### 5. 生死抉择：细胞凋亡的调控

生物体是高度有序的细胞群体，细胞的增殖和死亡都受到严格的信号控制。控制细胞死亡方式主要有两种：首先，大多数细胞都需要获得存活信号来维持生存，这类信号主要来自于其他细胞分泌的被称为“营养因子”（trophic factor）的细胞因子。如果营养因子的缺乏导致细胞接收不到存活信号，细胞就会激活自杀程序。第二种方式是细胞直接接收到来自于其他细胞的死亡信号，激活自杀程序。

动物细胞的存活依赖于外界信号，如果丧失存活信号，就会启动内部的凋亡程序，引发细胞凋亡。这种依赖性保证了细胞仅生存于适当的时间和地点，如在神经系统的发育过程中过量神经元细胞的凋亡。在动物的发育过程以及成体中，也广泛存在类似的对邻近细胞分泌的生存因子的依赖性。细胞存活因子包括多种有丝分裂原和生长因子。它们与细胞表面的受体结合后，启动细胞内信号途径，抑制凋亡的发生。例如 NGF 与神经细胞表面受体结合后，激活 PI3 激酶途径，活化了蛋白激酶 PKB，活化的 PKB 磷酸化 Bcl-2 家族成员 Bad，导致 Bad 失去活性而无法抑制 Bcl-2，结果细胞处于 Bcl-2 的保护之下不会走向凋亡。在抗凋亡、促存活的多条信号通路中，转录因子 NF- $\kappa$ B（nuclear factor  $\kappa$ B）处于中心地位。NF- $\kappa$ B 是一类在哺乳动物细胞中广泛表达的转录因子，通常与抑制因子 I- $\kappa$ B（inhibitor  $\kappa$ B）结合在一起，以非活性的形式定位在细胞质中，当细胞接受到外界信号时，NF- $\kappa$ B 被激活进入细胞核内起始基因转录，在免疫系统的发育、机体的免疫反应，以及颌颌细胞凋亡等过程中发挥重要作用。NF- $\kappa$ B 基因敲除的小鼠在胚胎第 15 天就死亡，原因是肝细胞发生大量凋亡；而在多种肿瘤细胞中 NF- $\kappa$ B 也始终处于持续激活状态，由此证明 NF- $\kappa$ B 的活化能够拮抗细胞凋亡。NF- $\kappa$ B 激活转录的凋亡抑制因子主要包括 c-IAP、c-FLIP 以及 Bcl-2 家族蛋白 A1 和 Bcl-X<sub>L</sub> 等。多种细胞存活及生长必需的细胞因子，如表皮生长因子（EGF），血小板生长因子（PDGF），神经生长因子等均能通过丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT 活化 NF- $\kappa$ B，抑制细胞凋亡（图 16-9）。

caspases 本身的活性以及与 caspases 酶原活化相

关的信号分子的活性在细胞中均受到严格调控，以保证在必需的情况下凋亡程序才能启动。细胞中存在多种重要的凋亡抑制分子，线虫细胞中的 Ced9 和哺乳动物细胞中 Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>、Bcl-W 等能够抑制线粒体释放 Cyt c。还有一类抑制因子仅存在于哺乳动物细胞和果蝇细胞中：c-IAP（inhibitor of apoptosis）家族成员（表 16-2）。cIAP 家族成员都具有由 70 个氨基酸组成的 BIR（baculoviral IAP repeat）结构域，能够直接与 caspases 活性分子结合，阻抑其对底物的切割作用。而当凋亡程序启动后，Bcl-2 和 c-IAP 家族成员的抗凋亡作用能被特异的促凋亡因子解除。例如，哺乳动物细胞中的 Bid 和 Bim 能够与 Bcl-2 结合，使其构象发生改变

表 16-2 内源性 caspases 抑制因子

名称	抑制底物
NAIP (BIRC1)	caspase-3, -7
c-IAP1(BIRC2)	caspase-3, -7
c-IAP2(BIRC3)	caspase-3, -7
XIAP(BIRC4)	caspase-3, -7, -9
Survivin(BIRC5)	caspase-3, -7
Lin28(BIRC7)	caspase-3, -7, -9
ILP-2(BIRC8)	caspase-9
c-FLIP(I-FLICE)	caspase-8, -10
ARC	caspase-2, -8
BAR	caspase-8

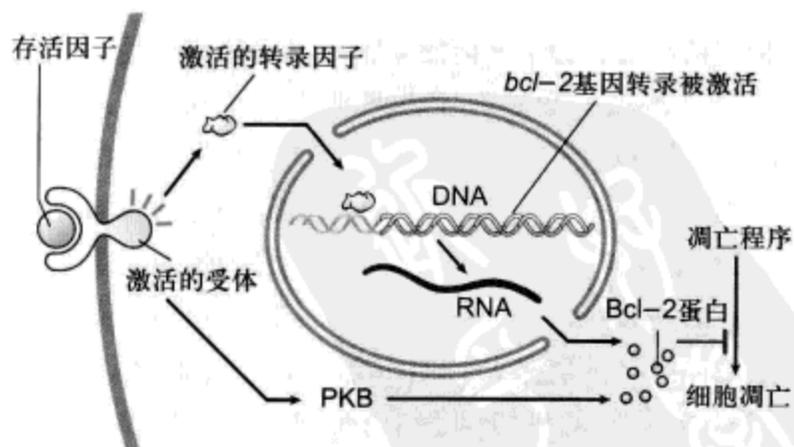


图 16-9 生存因子通过调节 Bcl-2 家族成员的活性及表达抑制细胞凋亡的发生

生存因子与受体的结合活化下游信号通路，从而激活了 NF- $\kappa$ B 等转录因子，启动 Bcl-2 家族成员基因的转录，抑制细胞凋亡。另一些存活因子可以通过活化蛋白激酶促进 Bcl-2 的活性，抑制细胞凋亡。

变,无法发挥抑制作用;接收凋亡刺激信号后,还有两种蛋白与 Cyt c 一起从线粒体中释放出来:其一是 Smac (second mitochondria derived activator of caspase), 又称 DIABLO (direct IAP binding protein with low pI)。该蛋白含有 IAP 结合域 (IAP binding motifs, IBMs), 通常情况下存在于线粒体的膜间隙中。它从线粒体释放出来后能与 IAP 结合,释放出被 IAP 封闭的 caspases, 包括 caspase-8; 其二是丝氨酸蛋白酶 Htra2/Omi, 接受凋亡信号后从线粒体释放出来,通过切割 IAP 解除其抑制凋亡的作用。这二者也被认为是内源性的凋亡激活因子。对 Cyt c 和 Smac 的双重需要确保了 caspases 级联反应仅在信号充分的情况下才被活化。哺乳动物细胞中抗凋亡和促凋亡的调控因子多种多样,单 Bcl-2 家族就有 6 个抗凋亡的成员和 9 个促凋亡的成员。因此细胞的命运:生存或者死亡,可能取决于细胞中这两类调控因子的相对含量以及胞外信号对它们活性的调控。

此外,病毒也演化出相应的对抗机制来抑制 caspases 的活性,阻止宿主细胞发生凋亡,如天花病毒蛋白 CrmA 和杆状病毒蛋白 p35 就是天然的 caspases 抑制剂,疱疹病毒和痘病毒携带细胞 caspases 抑制因子 c-FLIPs 的同源蛋白 v-FLIPs,可与死亡受体 Fas 的接头蛋白 FADD 发生相互作用,从而阻止了 caspase-8 与 FADD 的结合及活化,通过抑制凋亡的外源途径来抑制宿主细胞的凋亡。

线粒体获得的凋亡信号往往来自于细胞内的转录因子 p53。p53 是重要的肿瘤抑制基因和促凋亡因子。一般情况下,细胞中 p53 的活性保持在很低的水平;当细胞遭遇异常情况如 DNA 损伤,原癌基因过量表达引起异常生长信号,或化疗药物、紫外线和蛋白激酶抑制剂处理等,p53 才会被激活,通过阻断细胞周期使细胞生长停滞,甚至引发细胞凋亡。在 p53 依赖性细胞凋亡过程中,p53 通过激活凋亡正调节因子的转录来促进凋亡,如死亡受体家族成员 DR5, Bcl-2 家族成员 Bax、Apaf-1,以及 caspases 非依赖性细胞凋亡因子 PIG3 (p53-inducible gene 3) 等;同时,p53 还能够抑制抗凋亡因子的转录,如 Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>、Survivin 等。研究发现在大多数癌细胞中 p53 均发生突变或丢失。p53 的活性对癌的放射和化学疗法的效果起关键作用。具有 p53 基因野生型拷贝的肿瘤如睾丸癌和儿童急性淋巴母细胞白血病等对放疗和化疗较为敏感;而缺少功能性 p53 基因的肿瘤,如黑色素瘤、结肠癌、前列腺癌和胰腺癌等通常不能被诱发凋亡,从而对放疗和

化疗具有抵抗性。

## 二、细胞坏死

对于动物细胞的死亡,细胞坏死是有别于细胞凋亡的另一种典型方式。当细胞受到意外损伤,如极端的物理、化学因素或严重的病理性刺激的情况下发生。此时细胞内 ATP 浓度已下降到无法维持细胞存活水平,能量的下降使钠钾泵难以运作,细胞通透性增高,钠、钙、水进入细胞内,钾排除细胞外。与此同时,糖酵解造成糖原减少,乳酸增多,细胞内酸度增加,内质网损伤,蛋白质合成发生障碍,进一步导致溶酶体膜损伤,各种水解酶被释放到细胞质基质中,使得细胞内其他结构的损伤进一步加重。细胞质出现空泡,细胞质膜破损,细胞内含物,包括膨大和破碎的细胞器以及染色质片段释放到胞外,引起周围组织的炎症反应。与细胞凋亡不同,细胞坏死过程中染色质不发生凝集,也不产生有规律的 200 bp 的 DNA 降解片段,而是被随机降解,琼脂糖凝胶电泳时呈现弥散性分布,俗称“拖尾”现象,可以利用这一现象区分细胞凋亡和坏死。

长期以来细胞坏死被认为是一种被动的死亡方式。近年的研究表明,细胞也有可能“主动”发生坏死,坏死可能是细胞“程序性死亡”的另一种形式。例如,如果分裂旺盛细胞的 DNA 被持续损伤,就能引发细胞坏死。推测这一现象的原因是 DNA 损伤的积累导致聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 PARP 被活化,使得细胞核及细胞质内的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 大量减少,进而导致糖酵解作用被抑制,细胞内 ATP 水平下降。而快速分裂的细胞需要大量氨基酸和脂肪酸以构建子代细胞,因此无法利用氨基酸和脂肪酸氧化产能来维持胞内 ATP 水平,结果由 DNA 损伤引发的 ATP 水平急降会导致细胞坏死。相比之下,分裂迟滞的细胞抵抗 DNA 损伤的能力较强。这一现象说明细胞坏死过程也可能是信号转导引发的“程序性行为”。再如,原本诱导细胞凋亡的一些细胞因子如 TNF $\alpha$ , TRAIL, Fas 配体也能够诱导某些细胞系,如鼠纤维瘤细胞 L929、人 T 细胞瘤细胞 Jurkat 等发生坏死。最新的研究成果进一步确定了控制细胞坏死的关键信号分子。在细胞因子作用下更“倾向”于启动坏死程序的细胞系与其他启动凋亡程序的细胞系相比较,特异地表达蛋白激酶 RIP3,人为地降低 RIP3 的表达能够阻止细

胞坏死的发生。

细胞坏死可能在细胞的免疫反应中发挥重要作用。一方面,细胞感染病毒等病原体后,可能通过“自杀”方式消灭病原体,如果此时凋亡不能正常发生,坏死可以作为凋亡的“替补”方式被细胞采用。研究发现,病毒为了保证自我复制顺利完成,防止宿主细胞提前“自杀”,除了携带抑制凋亡的基因,还会携带抑制坏死的基因。另一方面,被感染的细胞坏死后,胞内的病原体信号分子如病毒核酸等被释放出来,能够被免疫细胞识别,促发固有免疫反应。目前,对于细胞坏死的分子机制的解析正在进行。可以预见,在不久的将来人们对细胞坏死生理功能及分子机制的了解程度将于细胞凋亡比肩。

### 三、自噬性细胞死亡

细胞自噬 (autophagy) 是细胞通过溶酶体与双层膜包裹的细胞自身物质融合,从而降解细胞自身物质

的过程。正常的动物细胞为了维持细胞内环境的动态平衡,需要不断降解功能失常或不需要的细胞结构,如各种蛋白质、细胞器以及各种胞质组分。通常,寿命较短的蛋白质如调控蛋白等通过泛素-蛋白酶体系统进行降解;而寿命较长的蛋白质及细胞结构则通过细胞自噬途径,由溶酶体进行降解。电镜观察到的细胞自噬的形态特征(图16-10),是细胞中出现大的双层膜包裹的泡状结构,其中常见包裹着整个的细胞器,如线粒体、过氧化物酶体等。细胞内的这种结构称为自噬体 (autophagosome), 其双层膜来自内质网或细胞质中的膜泡。细胞自噬的过程包括膜泡的形成、扩展,自噬体的形成,自噬体与溶酶体融合后形成自噬溶酶体 (autophagolysosome), 继而其内含物被溶酶体中的水解酶消化(图16-10)。

在正常细胞中细胞自噬持续地以较低速率进行,当细胞遭遇特殊情况,如动物发育的特殊阶段或细胞面临代谢压力时会大量发生。引发细胞自噬的信号机制是新近的研究热点之一,研究者已克隆了若干与细胞自噬作

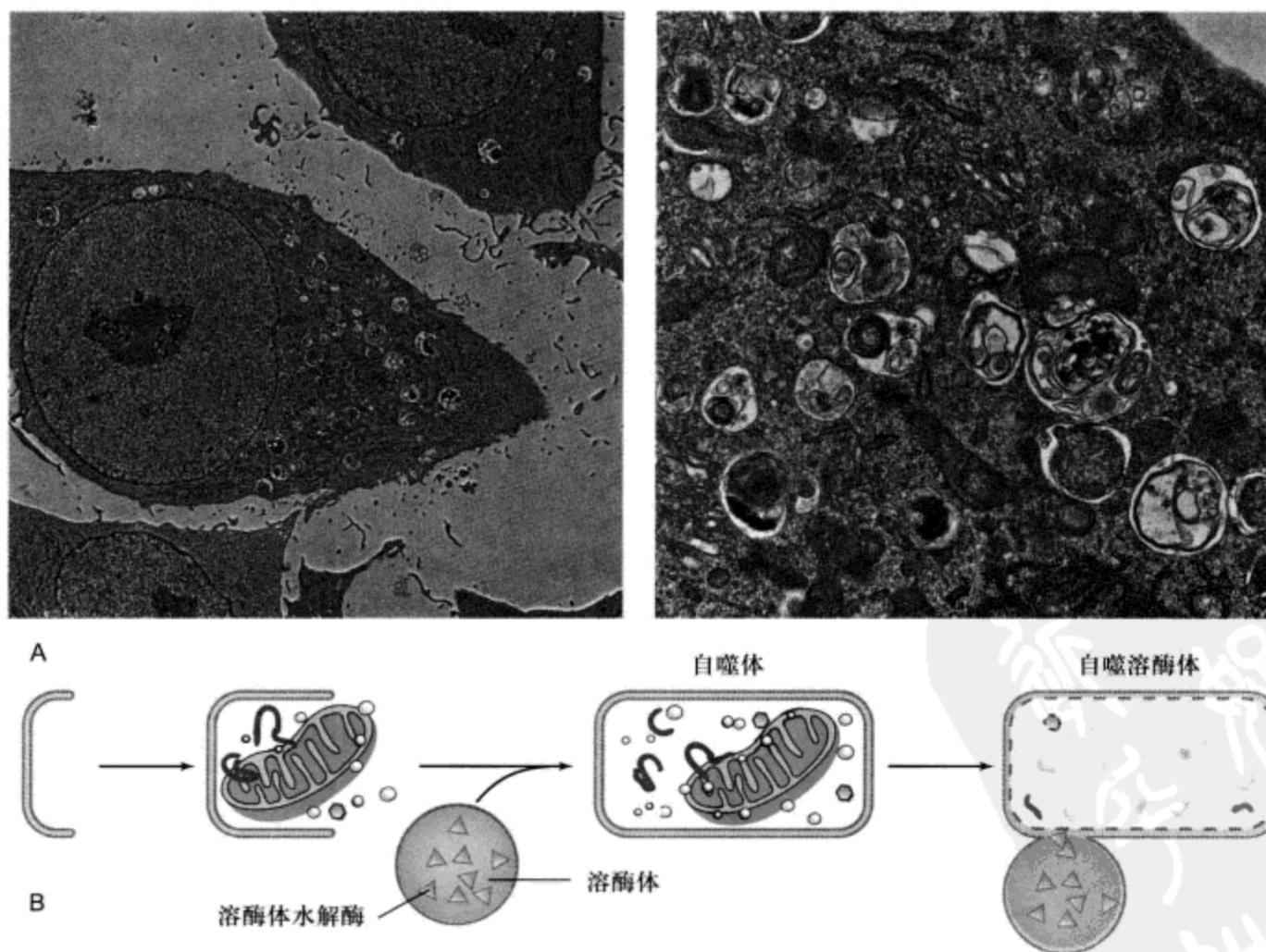


图 16-10 细胞自噬的特征及过程

A. 自噬细胞的电镜照片,显示自噬体,右图为左图的局部放大。B. 细胞自噬过程示意图。来自内质网或细胞质中的双层膜形成膜泡,并逐渐扩展,包裹细胞内待降解的细胞器或其他细胞内含物,然后闭合形成自噬体,进而与溶酶体融合,形成自噬溶酶体,内含物被消化分解。(A图由俞立博士惠赠)

用相关的基因。Atg (autophagy-related) 是细胞自噬过程中关键的执行因子, 其基因家族首先在酵母中发现, 包括约 20 个成员, 其中大部分在线虫、果蝇和哺乳动物细胞内有同源蛋白。Atg 家族蛋白彼此形成复合物, 在细胞自噬的各个阶段发挥作用。例如丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶 Atg1、13 和 17 负责接收细胞营养状态的信号; Atg6 介导分离膜泡的形成; Atg5、8 和 12 负责介导膜泡的扩展。在细胞的正常状态下, 生长因子如胰岛素浓度正常, 与细胞表面受体结合后, 能够激活磷脂酰肌醇激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K), 进而活化激酶 AKT/PKB, 再通过结节性硬化症相关蛋白 TSC1/2 和 G 蛋白 Rheb 活化蛋白激酶 mTor, mTor 能够抑制 Atg1 的激酶活性, 从而抑制细胞自噬的发生; 当细胞处于营养缺乏等应急状态时, 生长因子浓度下降, mTor 的活性被抑制, 导致 Atg1 的活化, 促进自噬体的形成 (图 16-11)。

细胞自噬是促使细胞存活自我保护机制。一方面, 细胞面临代谢压力如营养或生长因子匮乏, 或处于低氧环境中时, 细胞通过降解自身蛋白大分子或细胞器, 为细胞生存提供原材料或 ATP; 另一方面, 细胞自噬具有自我“清理”功能, 与泛素介导的蛋白降解途径不同, 细胞自噬不仅能够降解错误折叠的蛋白质多聚物, 还能够降解功能失常的整个线粒体、过氧化物酶体、高尔基体等细胞器; 甚至可以清除细胞内的病原体。而一些疾病, 如神经退行性病, 人们原先认为细胞自噬是这些疾病的元凶, 现在实验证明, 敲除 Atg5 和 Atg7 的小鼠均表现出蛋白质聚集导致的神经功能退化。

因此, 细胞自噬很可能是进化过程中形成的一种重要的细胞保护机制。

由于在大量涉及细胞死亡的病理切片中观察到特征性的自噬泡的存在, 细胞自噬导致的细胞死亡曾被认为是与细胞凋亡不同的另一种细胞死亡方式, 被称为“第 II 型细胞程序化死亡”。这一现象在两栖类和昆虫的变态过程中普遍存在, 典型代表是果蝇幼虫变态过程中唾液腺细胞的死亡。在变态过程中, 幼虫的许多细胞通过细胞自噬和凋亡的共同作用被清除, 新的成体结构同时建成。推测产生这一现象的原因是细胞凋亡后需要邻近的吞噬细胞将残余物清除, 而吞噬细胞数量有限, 并且可能受到如基底膜等生理结构的限制, 无法接触到凋亡细胞; 而细胞自噬不需要吞噬细胞的协助就能进行自我消减, 从而大大减少死亡细胞的体积, 因此能够在需要大量细胞死亡的变态过程中发挥作用。关于自噬性细胞死亡的分子机制, 以及其在不同物种发育过程中的保守性现在还不很清楚, 前述营养缺乏导致的细胞自噬的相关信号分子如 Atg1 可能也参与其中。

#### 四、植物细胞与酵母细胞的程序性死亡

包括细胞凋亡在内的程序性细胞死亡机制不仅存在于动物细胞中, 同时也存在于植物和酵母细胞中。

##### (一) 植物细胞的程序性死亡

植物细胞的程序性死亡研究开始较晚, 分子机制还不甚清楚。最早的相关报道发表于 1994 年, 研究者在

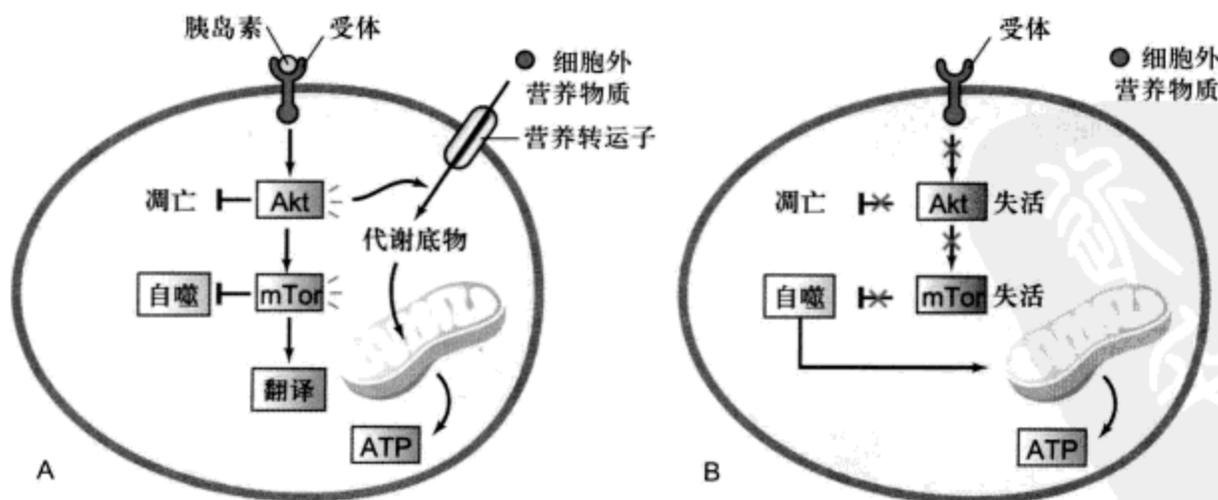


图 16-11 酵母中细胞自噬的信号调控

A. 当营养充足时, 生长因子活化 PI3K/Akt 信号途径及其下游的效应分子, 蛋白激酶 mTor, 促进营养物质的吸收、大分子的合成、ATP 的产生等, 同时抑制细胞自噬。B. 当生长因子缺乏时, PI3K/Akt 信号途径失活, 细胞停止营养物质的吸收, 以及 ATP 的产生; 同时效应分子 mTor 也失活, 解除了对细胞自噬作用的抑制, 细胞通过自噬来产生 ATP。Akt 的失活也能引发细胞凋亡。

拟南芥的超敏反应中发现细胞凋亡现象。之后逐渐有报道证明,程序性细胞死亡在植物中也广泛存在。与动物类似,在正常的植物发育进程,如导管的分化、通气组织的形成、糊粉层的退化、绒毡层细胞的死亡、胚胎发育过程中胚柄的退化、单性植物中花器官的程序性退化等,以及对环境胁迫,如缺氧、高盐等的反应和病原体入侵引发的过敏反应中,均存在细胞程序性死亡过程。其中典型的是木质部管状细胞(tracheary element, TE)的成熟过程。管状细胞是植物体负责运输及机械支持的厚壁组织细胞,成熟时都是死细胞。管状细胞的分化包括细胞伸长、细胞壁增厚、木质化和细胞自溶即程序性死亡过程。另一方面,植物细胞在受某些真菌或细菌感染后会主动、快速的死亡,同时触发体内的防御反应,从而限制了病原体的生长和扩散,这一现象称为超敏反应,也是典型的细胞程序性死亡过程。

与动物细胞凋亡相比,植物细胞程序性死亡的最大差异在于,死亡细胞的残余物被细胞壁固定在原位,不是被周围细胞吞噬,而是被自身液泡中的水解酶消化。在形态方面,植物细胞的程序性死亡过程随诱发机制的不同而有所差异。在超敏反应中,可观察到染色质凝聚,DNA降解为50 kb片段,细胞膜及液泡膜皱缩破裂,质壁分离,末期细胞内含物泄漏到质外体(apoplast)中(图16-12A);而在管状细胞分化的程序性死亡过程中,细胞壁增厚,随着液泡膜的破裂,核DNA被迅速降解,细胞内含物被水解消化,最后只剩下细胞壁(图16-12B)。

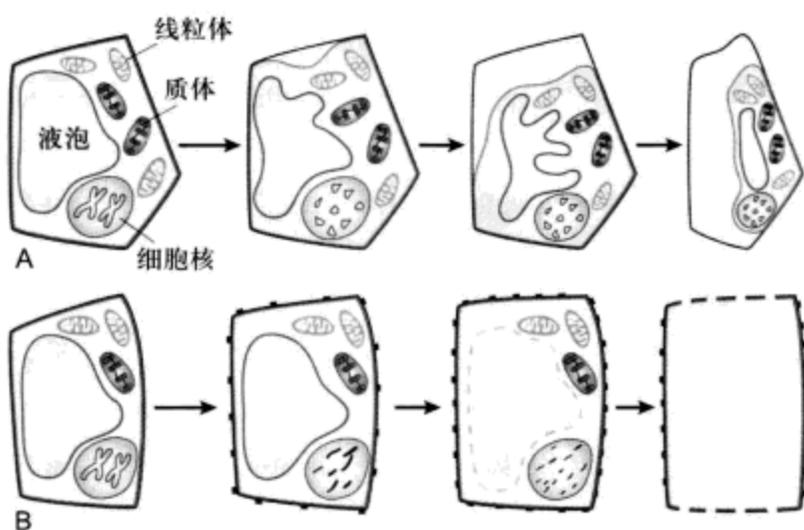


图 16-12 植物细胞程序性死亡的形态学模式图。

A. 在过敏反应中,可观察到染色质凝聚,DNA降解为50 kb片段,细胞膜及液泡膜皱缩破裂,质壁分离,末期细胞内含物泄漏到质外体中。B. 在管状细胞分化的凋亡过程中,细胞壁增厚,随着液泡膜的破裂,核DNA被迅速降解,细胞内含物被水解消化,最后只剩下细胞壁。

能够诱导植物细胞发生程序性死亡的因素有多种,主要包括活性氧和植物激素等。研究发现水杨酸、一氧化氮能够协同促进植物细胞过敏反应中的细胞程序性死亡,以便有效限制入侵病原体的侵染范围。乙烯、赤霉素能够促进细胞程序性死亡,而细胞分裂素和脱落酸则能够抑制。研究还发现植物体内离子浓度平衡的破坏会导致过敏性的细胞程序性死亡,表现在植物细胞质膜上离子通道蛋白的基因突变改变了细胞对过敏反应诱发凋亡的敏感性。同时,发现了一些与植物细胞程序性死亡有关的基因,如管状细胞成熟过程中与DNA断裂有关的DNA酶基因*ZEN1*,参与玉米性别决定过程中的细胞死亡的*Tasselseed2*基因,拟南芥细胞中加速细胞死亡的*acd2*基因等。关于这些基因的作用机制有待于进一步探索。

## (二) 酵母细胞的程序性死亡

酵母作为生物学的模式生物由来已久,在细胞有丝分裂、细胞衰老等基本生命活动的机制阐明过程中扮演了重要角色。之前人们一直认为酵母不发生程序性死亡,因为对于单细胞生物,细胞的“自杀”就等于个体生命的结束,对个体生存是无益的。直到1997年,研究者出乎意料地发现一种酵母突变株*cdc48*具有程序性死亡现象。研究表明,一些药物,如低浓度的双氧水或醋酸,较高浓度的盐或糖,植物抗真菌多肽等能够诱导酵母发生细胞程序性死亡。酵母程序性死亡的形态学特征与动物细胞凋亡类似:DNA发生凝聚、边缘化和断裂,Cyt c从线粒体释放等。不但如此,越来越多的研究表明酵母的细胞程序性死亡机制与动物细胞的凋亡机制有类似之处。在酵母中发现了caspases的类似物Yca1,*yca1*的缺失降低了酵母细胞对凋亡诱导因子的敏感性。在酵母细胞中还发现了哺乳动物细胞中凋亡因子HtrA2/Omi的类似物Nma111(nuclear mediator of apoptosis)。Nma111通常定位于细胞质内,当酵母处于应急状态时,Nma111在核内聚积,引发凋亡。另外研究发现酵母中还存在动物细胞凋亡抑制因子XIAP的同源分子BIR。

多细胞生物细胞凋亡的意义在于牺牲个体细胞来保障细胞群体的利益,作为单细胞生物,酵母程序性死亡的生理意义何在?近来的研究为此提供了线索。实验表明当单倍体的酵母处于交配信息素存在的环境中,而又无法进行接合繁殖时就会发生程序性死亡。推测这种机制有助于促进酵母的接合繁殖,产生在适应性上更有优

势的“杂和体”；另一方面，在自然界中单细胞生物包括酵母往往聚集在一起生活，研究发现在营养匮乏的状态下，酵母集落中“衰老”的酵母会发生程序性死亡，从而使有限的营养供给具有最佳适应性的个体；此外，当不同种酵母为营养源展开“争夺战”时，某些酵母会释放病毒基因编码的毒素，导致其他种属的酵母发生程序性死亡。

与动物细胞凋亡的研究相比，目前植物及酵母细胞的程序性死亡分子机制的研究尚有待深入。通过对拟南芥和酵母的全基因组检索，研究者没有发现动物细胞 caspases 的同源分子。由此推测在程序性死亡机制的演化过程中，植物和真菌细胞中的执行及调节因子与动物细胞发生了结构上的区别。另一方面，实验证明将动物细胞 Bcl-2 家族成员通过转基因的方法在植物细胞中表达后，会对植物细胞的程序性死亡产生效应。说明植物细胞与动物细胞存在结构不同而功能类似的调节因子。例如 Bax 的抑制因子 BI-1 (Bax inhibitor 1)，它是一组在演化过程中高度保守的基因，已发现在不同的真核生物物种包括动物、植物和真菌中均发挥抑制作用。

越来越多的实验证据表明，细胞程序性死亡机制在细胞生命的演化过程中具有共同的起源。而不同物种研究体系的建立，将有助于揭示各种程序性死亡途径之间的复杂关系。

## 第二节 细胞衰老

### 一、细胞衰老的概念及特征

细胞衰老 (cell ageing, cell senescence) 一般的含义是指复制衰老 (replicative senescence, RS)，即体外培养的正常细胞经过有限次数的分裂后，停止生长，细胞形态和生理代谢活动发生显著改变的现象。迄今为止，除了干细胞和大多数肿瘤细胞，来自不同生物、不同年龄供体的原代培养细胞均存在复制衰老现象。

关于复制衰老，即细胞的复制能力是有限的概念在生物学研究史上曾引发广泛争论。早在 1881 年，德国生物学家 August Weismann 就提出：“有机体终究会死亡，因为组织不可能永远能够自我更新，而细胞凭借分裂来增加数量的能力也是有限的。”这一观点后来受

到法国的外科医生，诺贝尔奖获得者 Alexis Carrel 的挑战，以至于一度被研究者们抛弃。Carrel 认为，体外培养的细胞是能够永生不死的，如果它停止增殖是因为培养条件不适宜了。他声称在纽约洛克菲勒研究所里培养的鸡心脏成纤维细胞持续分裂了 34 年。这使得当时人们普遍认为，所有脊椎动物的细胞在体外培养时均能够无限次分裂。但事实上没有人能够重复 Carrel 的工作；有研究者质疑 Carrel 的细胞培养实验，认为培养液中每天添加的鸡胚提取物中可能混有鸡胚细胞。这时候，美国生物学家 Leonard Hayflick 证实人成纤维细胞的复制能力是有限的，首次提出了细胞水平上的“衰老”现象。

1958 年，L. Hayflick 在 Wistar 研究所从事癌细胞的研究，他将癌细胞的提取物加到人的正常胚胎细胞的培养基中，希望看到正常细胞发生癌变。结果非他所愿，细胞不但没有癌变，还停止了生长。起初 Hayflick 相信 Carrel 的理论，认为自己在细胞培养的“技术”上有问题，后来他与 Paul Moorhead 一道精心设计了一系列实验，终于证实 Carrel 的观点是不对的，正常的体外培养细胞只能进行有限次数的分裂。Hayflick 与 Moorhead 将已分裂 40 次的正常男性成纤维细胞与已分裂 10 次的正常女性成纤维细胞混合培养，同时用单独培养的细胞作为对照；当单独培养的细胞停止分裂时，检查混合培养的细胞，发现仅剩下了具有“巴氏小体”标志的女性成纤维细胞。这一实验说明细胞停止分裂是由细胞自身因素决定的，与环境条件无关。Hayflick 同时还注意到了正常细胞具有有限分裂次数，而癌细胞（如 HeLa 细胞）能够在体外无限增殖。这一发现导致了细胞永生概念概念的提出。1961 年，Hayflick 在 *Experimental Cell Research* 上发表了实验结果。1974 年，澳大利亚的生物学家 Macfarlane Burnett 在他的著作《内在变异》(*Intrinsic Mutagenesis*) 中首次将这一发现称为“Hayflick 界限”。

Hayflick 及其后续的研究者们对培养细胞在衰老过程中发生的变化进行了详细的观察，发现了细胞衰老过程形态结构方面的各种变化，如核膜内折 (invagination)，染色质固缩，内质网蛋白质合成量减少，肿胀，细胞内脂褐质积累，细胞间连接减少等变化。

对于体外培养细胞的细胞衰老研究，当前常用的生物学特征有两个：一是生长停滞，细胞停止分裂，并且这种停滞是不可逆的，即使添加生长因子也无济于事；二是衰老相关的  $\beta$ -半乳糖苷酶 (senescence associated

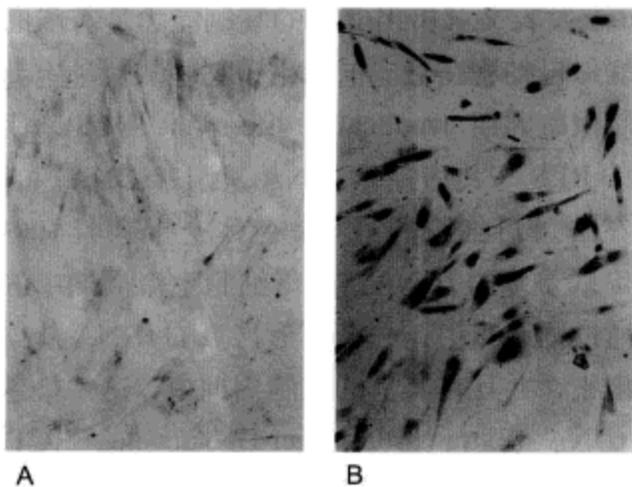


图 16-13 衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶染色区分年轻和衰老的人胚胎成纤维细胞 IMR-90

A. 第 20 代的年轻细胞，细胞体积较小，极少表达衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶。B. 第 55 代的衰老细胞，细胞体积明显增大，表达衰老细胞特征性酸性  $\beta$ -半乳糖苷酶，pH 6.0 时有活性。（陈丹英博士惠赠）

$\beta$ -galactosidase, SA  $\beta$ -gal) 的活化。 $\beta$ -半乳糖苷酶是溶酶体内的水解酶，通常在 pH 4.0 的条件下表现活性，而在衰老细胞中 pH 6.0 条件下即表现出活性。随着培养细胞传代次数的增加，细胞群体中表达衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶的细胞日益增多。将细胞固定后，用 pH 6.0 的  $\beta$ -半乳糖苷酶底物溶液进行染色，就能明显区分年轻和年老的培养细胞（图 16-13）。

## 二、细胞衰老的分子机制

### （一）复制衰老的机制

Hayflick 在研究中发现体外培养的人胚胎细胞的倍增次数是有限的，并且，正常细胞冻存后仍然“记得”之前复制了多少次，继续复制的次数累计与未冻存的细胞一致。这些现象说明细胞具有某种计算复制次数的机制。那么细胞这种“计数”机制究竟是什么呢？

早在 1970 年，研究者就提出了所谓 DNA 的末端复制问题。由于 DNA 聚合酶不能从头合成子链，复制母链 3' 端时，子链 5' 端与之配对的 RNA 引物被切除后会产生末端缺失，使得子链的 5' 端随着复制次数的增加而逐渐缩短。1972 年，苏联的理论生物学家 Alexey Olovnikov 在地铁站中获得灵感，提出随着复制不断缩短的 DNA 末端可能是正常细胞有限分裂的原因。但当时这一想法并未得到研究者的重视。直到 1978 年，Elizabeth Blackburn 发现四膜虫的端粒由 TTGGGG 重复序列构成，而哺乳动物细胞的端粒序列是类似的

TTAGGG，从而使得端粒的长度得以测算。1986 年，研究证实不同组织细胞端粒长度不同，而体外培养细胞的端粒长度随着世代增加确实在不断缩短。这才使得端粒在 Hayflick 界限中发挥功能的说法得到大家的认同。1998 年，研究者获得了端粒的缩短能够导致细胞衰老的直接证据。在人的生殖细胞以及能够无限分裂的癌细胞中存在一种酶称之端粒酶 (telomerase)。它能够以自身含有的 RNA 为模板，逆转录出母链末端的端粒 DNA，从而避免了子链端粒序列的缩短。在正常的体细胞中，端粒酶处于失活状态。将活化的端粒酶导入正常的人成纤维细胞并使其持续表达，结果细胞的端粒不再缩短，而细胞的复制寿命增加了近 5 倍。研究者继而证明抑制端粒酶的活性能够引发癌细胞的衰老。由此端粒被人们看做是细胞的“分子时钟”。

端粒的缩短又是如何引发细胞的复制衰老呢？这与 p53 信号通路有关。p53 是著名的肿瘤抑制因子，通过诱导细胞凋亡或生长停滞，避免细胞因为 DNA 的损伤而发生癌变。DNA 的损伤会诱导 p53 的表达。研究发现端粒的缩短（可视做 DNA 的一种损伤）也会使细胞中的 p53 含量明显增加。因此推测 p53 通过识别失去功能的端粒，继而诱导 p21 的表达，抑制 CDK 的活化，使得 Rb 不能被磷酸化，E2F 处于持续失活状态，细胞不能从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期，最终引发细胞衰老（图 16-14）。实验证明在培养的人成纤维细胞接近衰老时，确实表现出 p53 的活化，推测 p53 可能是一个主要的衰老启动因子，而 p16 的作用可能是维持衰老的状态。

### （二）压力诱导的早熟性衰老

除了细胞内端粒缩短可以诱发的复制衰老 (RS) 以外，许多刺激因素，如过量的氧、乙醇、离子辐射、和丝裂霉素 C (mitomycin C) 等均能够缩短细胞的复制寿命，促进细胞衰老。1999 年，研究者们将这一类型的细胞衰老称为压力诱导的早熟性衰老 (stress-induced premature senescence, SIPS)。研究发现 SIPS 与 RS 的机制类似，均涉及 p53-p21 以及 p16 信号途径。在这一类型的衰老模式中，研究较多的是氧化损伤引起的细胞衰老。

氧化损伤理论是衰老机制的主要理论之一。该理论认为，衰老现象是由生命活动中代谢产生的活性氧成分造成的损伤积累引起的。生物体吸收的氧中有 2%~3% 转变为活性氧成分，包括超氧阴离子、过氧化氢和羟自由基。活性氧成分对生物大分子，如蛋白质、脂质、核

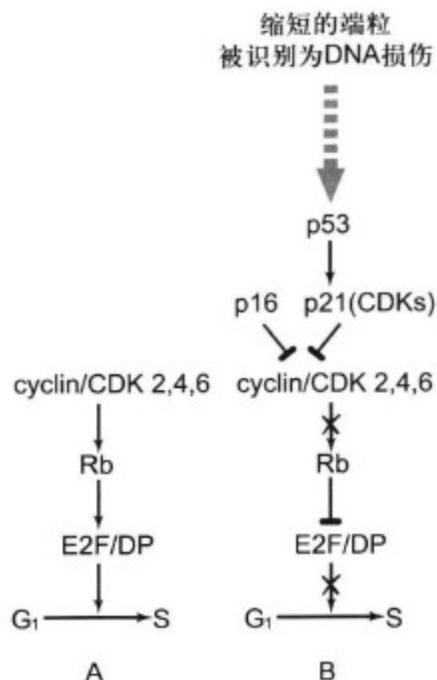


图 16-14 复制衰老的信号途径

A. 正常年轻细胞中, CDK 的活化导致 Rb 蛋白磷酸化, 与转录因子 E2F 分离, 被释放的 E2F 活化下游基因的转录, 促使细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期, 细胞周期正常运行。B. 随着细胞复制, 端粒的缩短会导致细胞内 DNA 修复体系包括 p53 的活化, p53 继而诱导 p21 的表达, p21 使得若干 CDKs, 如 CDK2, 4, 6 等失去活性, 从而阻止 Rb 蛋白的磷酸化, Rb 不能与 E2F 分离, E2F 处于持续失活状态, 不能正常起始 G<sub>1</sub>/S 转换过程中若干关键因子的转录, 导致细胞停滞在 G<sub>1</sub>/S 期, 最终引发细胞衰老。

酸等均有损伤作用, 而且还会使线粒体 DNA 发生特异性的突变。支持氧化损伤理论的证据之一是抗氧化基因的转基因动物实验。过量表达铜/锌超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的转基因果蝇比对照组寿命延长了 34%。在果蝇成体的神经元中表达人的超氧化物歧化酶 1 也能使其寿命延长 40%。

值得注意的是, 氧化损伤理论的证据都来自体细胞绝大多数为终末分化细胞的动物 (如线虫和果蝇)。由于终末分化细胞不能自我更新换代, 它们对活性氧成分的积累损伤更为敏感。相应地, 在哺乳动物器官中可能符合这一机制的细胞是脑、心脏和骨骼肌细胞。而对于持续分裂的细胞, 其衰老机制和氧化损伤之间的关系尚不明了。

### (三) 单细胞生物的衰老

与多细胞生物不同, 单细胞生物的细胞衰老即个体衰老。这方面的研究主要是在芽殖酵母中进行的。这种酵母的分裂是不均等的, 产生一个较大的母细胞和一个较小的子细胞。早在 1959 年, R. K. Mortimer 和 J. R.

Johnston 就发表文章指出酵母的复制能力是有限的。此后就将酵母母细胞在衰老前产生子细胞的数量定义为酵母的复制生命周期 (replicative life span, RLS)。研究发现酵母的 RLS 与其核糖体 rRNA 基因 (rDNA) 的数量有关。在酵母母细胞的第 8 染色体上排列着 100~200 个拷贝串联重复的 rDNA, 在母细胞生命周期中的某些时刻, 通过同源重组, 一个环形拷贝的 rDNA 从染色体上分离出来, 并且在其后的细胞周期中, 这一染色体外的环形 rDNA (extra chromosomal DNA cycle, ERC) 开始复制产生多个拷贝。在酵母出芽繁殖过程中, ERC 几乎都集中在母细胞中, 而不进入子细胞; 于是母细胞中的 ERC 逐代积累, 以致在衰老的母细胞中可达到约 1 000 个拷贝 (图 16-15)。推测 ERC 的积累掠夺了 DNA 正常复制和转录所需的重要物质, 从而抑制了细胞的生长, 使酵母细胞衰老。研究者们进一步发现了调控 ERC 产生的重要基因, 如 *SIR2/3/4*、*SGS1* 均能够抑制酵母染色体上重复 rDNA 的同源重组, 即抑制了 ERC 的产生, 使酵母的 RLS 显著增加。由于单细胞生物研究的便利, 酵母衰老的分子机制研究一直处于整个细胞衰老研究的前沿。已证明一些重要的调控分子如 SIR 在多细胞生物如蠕虫和果蝇中具有类似的“长寿”功能。近年来研究

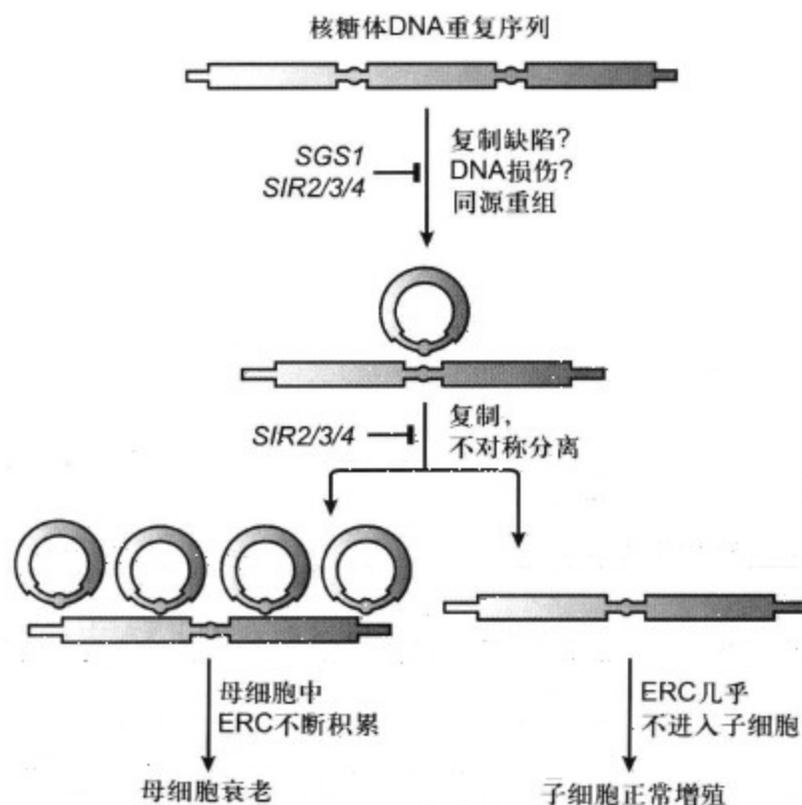


图 16-15 酵母中 ERC 生成示意图

酵母 rDNA 由多拷贝重复序列组成, 同源重组往往发生在相邻重复序列的某一 DNA 损伤点上。*SGS1* 基因和 *SIR* 基因减缓 ERC 积累的速率。

者们发展出了另一种酵母衰老的研究模型：年代生命周期 (chronological life span, CLS), 定义为单个酵母细胞在不复制的状态下能够存活的时间。这一模型能够模拟多细胞生物体内大量的终末分化细胞的衰老过程, 无疑将为细胞衰老乃至个体衰老的机制提供新的线索。

### 三、细胞衰老与个体衰老的关系

对于多细胞生物, 特别是哺乳动物, 现有的细胞衰老模型尚不能解释个体衰老。研究发现, 在人体或其他哺乳动物衰老的过程中, 至少某些器官或组织中的细胞确实发生了变化。但这些变化却各不相同, 难以与体外细胞衰老的特征统一起来。例如, 人体的器官移植表明, 器官受者的存活率与供者的年龄成负相关; 而在小鼠的器官移植过程中却未观察到这一现象。又如, 早老病患者体内细胞在体外培养时的表现也不一致。Werner 综合征患者的细胞较正常细胞分裂得慢, 而 Hutchinson-Gilford 综合征患者的细胞较正常细胞分裂得快。同时, 这两种细胞又都表现出对凋亡诱导因子或“压力”因素更敏感。尽管研究者在动脉硬化、前列腺增生等病理条件下观察到与体外细胞衰老类似的生物学特征, 但多数体外培养细胞中发掘出的衰老标记, 如分裂周期延长, 表达衰老特异基因等均无法在体内的衰老过程中得到验证。对于端粒在细胞衰老过程中的作用, 小鼠与人类细胞得到的结论也不尽相同。某些种属小鼠细胞的染色体端粒在其生命过程中始终保持相当的长度, 没有明显缩短。端粒酶基因敲除的小鼠在其前 5 代并不表现出明显的异常症状, 而此后几代中出现睾丸、皮肤和造血系统

等分裂活跃的器官缺陷, 但导致这些症状的原因也可能是基因敲除后小鼠染色体不正常, 而且这些症状与正常衰老表型有明显不同。

为什么体外培养的细胞与体内细胞的差距如此之大呢? 研究认为, 原因主要是细胞在体外所处的环境与体内有很大不同。比如一般培养条件下, 细胞处于 20% 的氧浓度中, 远远高于生理状况 (3%); 另外体外传代培养细胞需要用胰酶处理细胞, 体内细胞不可能遭遇这一状况。胰酶处理在破坏细胞间连接的同时亦会消化掉细胞表面的受体等分子的胞外部分。此外最大的不同可能在于, 体内细胞处于三维的生理环境中, 而常规进行细胞衰老研究的培养细胞往往仅在二维方向上与其他细胞发生联系。这使得细胞接受的各种信号差别很大, 无疑影响到细胞的行为。鉴于此, 研究者们正在努力开发新型的三维细胞培养方法, 以期更好地模拟体内条件下细胞的生长状况。

另一方面, 研究发现, 若将与 RA 和 SIPS 相关的基因如端粒酶 RNA 组分、*p53*、*p21*、*p16*、*CDK4*、*pRb*、*E2F1* 等敲除或突变后, 小鼠或人并未表现出明显的衰老特征, 而是易发癌症或肿瘤。由此推测体外细胞的衰老机制与细胞的癌化相关。

综上所述, 迄今还未有实验证据表明体外培养细胞的复制衰老或压力诱导的早熟性衰老, 与体内组织或个体的衰老有直接的关联。目前更倾向于将细胞衰老看做是有机体在长期演化过程中形成的防止细胞过度生长或癌化的一种保护机制。体内细胞衰老的机制是什么, 以及如何在体外研究体内的细胞衰老, 这对研究者而言仍然是一个巨大的挑战。

#### ● 思考题 ●

1. 试述细胞凋亡的概念与形态特征, 并指出其与坏死的区别是什么?
2. 对于多细胞生物, 细胞凋亡的生理意义何在?
3. 动物细胞凋亡的基本途径有哪些? 请举例说明。
4. 细胞凋亡受到哪些因素的调控?
5. 什么是“Hayflick界限”?
6. 复制衰老的可能机制是什么?

## ● 参考文献 ●

1. Edinger A L, Thompson C B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004, 16:663-669.
2. Lam E. Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews*, 2004, 5:305-315.
3. Levine B, Kroemrer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132:27-42.
4. Lum J J, Deberardinis R J, Thompson C B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews*, 2005, 6:439-448.
5. Madeo F, Herker E, Wissing S, *et al.* Apoptosis in yeast. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004, 7:655-660.
6. Shay J W, Wright W E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews*, 2005, 1:72-76.
7. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 2001, 15:2 922-2 933.



# 细胞的社会联系

在多细胞生物体内，没有哪个细胞是“孤立”的，它们通过细胞通讯、细胞黏着、细胞连接以及细胞与胞外基质的相互作用，构成复杂的细胞社会。细胞的社会联系体现在细胞与细胞间、细胞与胞外环境甚至机体间的相互作用、相互制约和相互依存。细胞的形态结构、生命活动以及在机体中的位置均受到机体、局部组织、周围细胞以及细胞外信号分子的调节与控制。不言而喻，细胞社会联系在胚胎发育、组织构建等过程中尤为重要。在胚胎发育过程中，胚胎细胞通过细胞社会的联系彼此交流信息，以决定细胞的行为和命运，包括结构与功能分化、位置以及生死抉择等。细胞社会联系是组织建成、维持及修复的最主要保障。神经细胞、免疫细胞以及内分泌细胞通过社会性联系，共同参与并维持机体的稳态平衡。细胞社会联系的破坏往往导致细胞病变甚至死亡。

细胞通讯和信号转导是细胞社会性联系的核心内容，有关知识已在第九章描述，本章重点从细胞连接、细胞黏着和细胞外基质等方面介绍细胞的社会联系。

## 第一节 细胞连接

细胞连接 (cell junction) 是指在细胞质膜的特化区

域，通过膜蛋白、细胞骨架蛋白或者胞外基质形成的细胞与细胞之间、细胞与胞外基质之间的连接结构。细胞连接是细胞社会性的结构基础，是多细胞有机体中相邻细胞之间协同作用的重要组织方式，主要存在于上皮细胞间。根据行使功能的不同，细胞连接可分为3大类：

(1) 封闭连接 (occluding junction) 将相邻上皮细胞的质膜紧密地连接在一起，阻止溶液中的小分子沿细胞间隙从细胞一侧渗透到另一侧。紧密连接是这种连接的典型代表。

(2) 锚定连接 (anchoring junction) 通过细胞膜蛋白及细胞骨架系统将相邻细胞，或细胞与胞外基质间黏着起来。根据直接参与细胞连接的细胞骨架纤维类型的不同，锚定连接又分为与中间丝相关的锚定连接和与肌动蛋白纤维相关的锚定连接。前者包括桥粒和半桥粒；后者主要有黏着带和黏着斑。

(3) 通讯连接 (communicating junction) 介导相邻细胞间的物质转运、化学或电信号的传递，主要包括动物细胞间的间隙连接、神经元之间或神经元与效应细胞之间的化学突触和植物细胞间的胞间连丝。

通过基因敲除、生化分析及酵母双杂交系统等技术可以研究细胞连接的功能，揭示参与细胞连接的相关蛋白等。

### 一、封闭连接

紧密连接 (tight junction) 是封闭连接的主要类型，

一般存在于上皮细胞之间。在光镜下,小肠上皮细胞之间的闭锁堤区域便是紧密连接存在的部位。电镜下,紧密连接处的相邻细胞质膜紧紧地靠在一起,没有间隙。冰冻断裂复型技术显示出它是由围绕在细胞四周的“焊接线”形成。焊接线又称为嵴线,它由成串排列的特殊跨膜蛋白组成。相邻细胞的嵴线相互交联封闭了细胞之间的间隙,其形态结构如图 17-1 所示。

紧密连接有两个主要功能:一是形成渗透屏障,阻止可溶性物质从上皮细胞层一侧通过细胞间隙扩散到另一侧,起封闭作用。如将电子致密物氢氧化镧加入上皮细胞一侧作为示踪物,电镜观察发现这些示踪物不能够通过细胞间形成的紧密连接进入细胞的另一侧。紧密连接不但在上皮细胞间存在,也存在于血管内皮细胞间,特别是在大脑的血管内皮细胞间更为明显。紧密连接的大脑毛细血管内皮细胞形成血脑屏障,阻止离子或水分子等通过血管内皮组织进入大脑,从而保证大脑内环境的稳定性。但血脑屏障的形成也阻止了多种药物从血管进入中枢神经系统。非常有趣的是,尽管离子或水分子等小分子物质不能通过血脑屏障,但免疫细胞却能够顺利通过内皮细胞间的紧密连接。目前认为这可能是因为免疫细胞分泌了信号分子,从而打开紧密连接。这也提示紧密连接形成的渗透屏障是相对的。某些小分子可以通过相邻细胞间的紧密连接,以细胞旁途径(paracellular pathway)从上皮细胞层一侧转运或“渗漏”到另一侧,如小肠上皮和肾小管组织中存在细胞旁

路转运方式。这种转运方式的调节与构成紧密连接的密封蛋白(claudin)组成有关,也与G蛋白-cAMP信号通路的调节有关。一种遗传性低镁血症就涉及 *claudin-16* 基因的变异,导致镁离子不能通过细胞旁路转运方式通过肾小管进入血液,引起抽搐;因 *claudin-14* 基因突变引起的遗传性耳聋也与细胞旁路转运异常有关。

紧密连接的第二个功能是形成上皮细胞膜蛋白与膜脂分子侧向扩散的屏障,从而维持上皮细胞的极性。小肠上皮细胞是极性细胞,有面向肠腔的顶面(apical face)或游离面,以及基底面(basolateral face)。游离面质膜与基底面质膜担负不同的功能,游离面含有大量吸收葡萄糖分子的协同转运载体,完成  $\text{Na}^+$  驱动的葡萄糖同向转运;而基底面含有执行被动运输的葡萄糖转运载体,将葡萄糖转运到细胞外液,从而完成葡萄糖的吸收和转运功能。正是由于紧密连接限制了膜蛋白和膜脂分子的流动性,使得上皮细胞游离面与基底面的膜蛋白以及膜脂分子只能够在各自的膜区域流动,以行使各自不同的功能。因此,紧密连接不仅仅是细胞间的一个机械连接装置,而且还能维持上皮细胞极性,保证细胞正常行使功能。

紧密连接通过相邻细胞膜上的跨膜蛋白形成嵴线而相互作用,从而将两个细胞的质膜紧密地连接在一起。目前从紧密连接的嵴线中至少确定了两类蛋白:一类称为闭合蛋白(occludin),是相对分子质量为  $6 \times 10^4$  的4次跨膜蛋白;另一类称为密封蛋白,也是4次跨膜的蛋白家族(现已鉴定20种以上)。闭合蛋白和密封蛋白形成嵴线的相互作用还依赖于其他蛋白质,如细胞膜的外周蛋白ZO,将嵴线锚定在微丝上。近年发现, *claudin-1* 和闭合蛋白还是丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)入侵细胞所必需的受体,意味着紧密连接很有可能和HCV入侵细胞的过程相关。

## 二、锚定连接

单纯的细胞质膜并不能有效地将机械压力从一个细胞传递到另一个细胞或者胞外基质,因此其承受机械力的强度很低。但当细胞形成组织后,由于细胞间或者细胞与胞外基质间通过锚定连接分散作用力,从而增强细胞承受机械力的能力。锚定连接在机体组织内广泛分布,在那些需要承受机械力的组织内尤其丰富,如心脏、肌肉及上皮组织等。锚定连接由两类蛋白构成。第一类统称细胞内锚蛋白(anchor protein),这类蛋白形

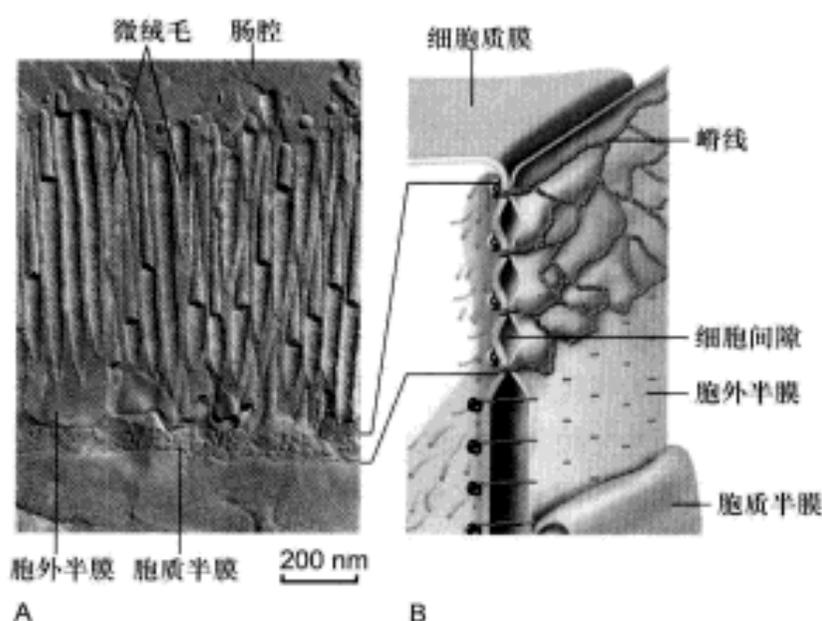


图 17-1 小肠上皮细胞紧密连接结构

A. 小肠上皮细胞紧密连接的冰冻断裂复型电镜照片,示细胞微绒毛和细胞紧密连接区。B. 紧密连接模式图,两个相邻细胞的质膜通过嵴线紧密连接在一起。[A 图由 Bechara Kachar 博士惠赠]

成独特的盘状致密斑（胞质斑），一侧与细胞内的骨架纤维如中间丝或者微丝相连，另一侧与跨膜黏附性蛋白相连。第二类蛋白统称跨膜黏附性蛋白质（adhesion protein），这类蛋白是细胞膜蛋白，一端与胞内锚蛋白相连，另一端与胞外基质蛋白或与相邻细胞特异的跨膜黏附性蛋白质相连。

### （一）与中间丝相连的锚定连接：桥粒与半桥粒

桥粒（desmosome）是连接相邻细胞间的锚定连接方式，最明显的形态特征是细胞内锚蛋白形成独特的盘状致密斑，一侧与细胞内的中间丝相连，另一侧与跨膜黏附性蛋白质相连，在两个细胞之间形成纽扣样结构，将相邻细胞铆接在一起（图 17-2）。胞内锚蛋白包括桥粒斑珠蛋白（plakoglobin）和桥粒斑蛋白（desmoplakin）。跨膜黏附性蛋白质属于钙黏蛋白家族（cadherin family），包括桥粒芯蛋白（desmoglein）和桥粒芯胶黏蛋白（desmocollin）等。细胞内中间丝依据细胞类型不同而种类有异，在上皮细胞主要是角蛋白丝（keratin filament）。

从桥粒结构上看，一个细胞内的中间丝与相邻细胞内的中间丝通过桥粒相互作用，从而将相邻细胞连成一体，增强了细胞抵抗外界压力与张力的机械强度。临床上有一种自身免疫缺陷病——天疱疮（pemphigus），其病因是患者自身抗体结合桥粒跨膜黏附性蛋白质，从而破坏桥粒结构，导致上皮细胞间锚定连接丧失，体液渗漏而产生严重的皮肤水疱病。

半桥粒（hemidesmosome）在形态上与桥粒类似，但功能和化学组成不同。半桥粒是细胞与胞外基质间的连接形式，参与的细胞骨架仍然是中间丝，但其细胞膜上的跨膜黏附性蛋白质是整联蛋白（integrin），与整联

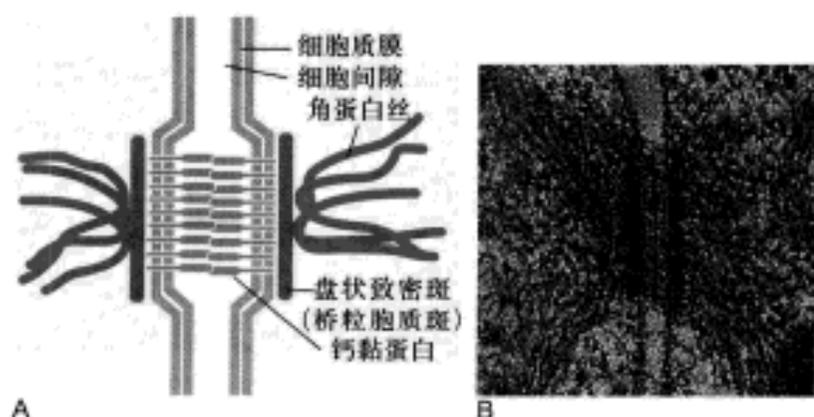


图 17-2 桥粒结构

A. 上皮细胞桥粒结构示意图。B. 小鼠膀胱上皮细胞桥粒电镜图（B 图由梁凤霞博士惠赠）

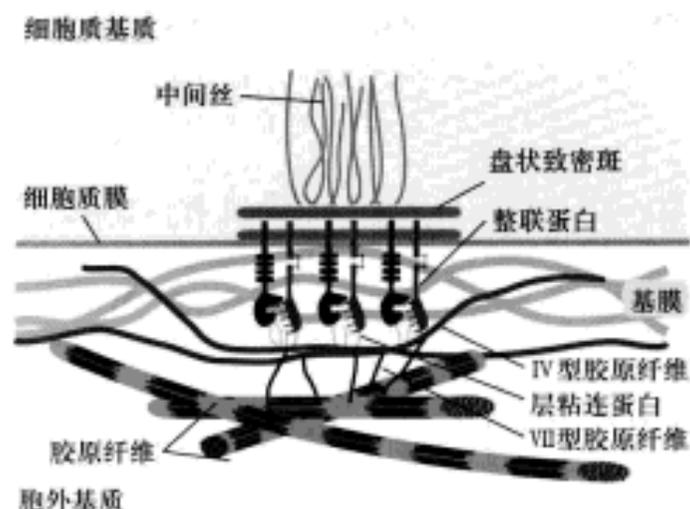


图 17-3 半桥粒结构模式图

蛋白相连的胞外基质是层粘连蛋白。通过半桥粒，上皮细胞可以黏着在基膜上（图 17-3）。

### （二）与肌动蛋白纤维相连的锚定连接：黏着带与黏着斑

黏着带（adhesion belt）位于上皮细胞紧密连接的下方，相邻细胞间形成一个连续的带状结构（图 17-4）。黏着带处的相邻细胞间隙约 30 nm，其间由  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的跨膜黏附性蛋白质（钙黏蛋白）形成胞间横桥相连。细胞内的锚蛋白有连环蛋白（catenin）、纽蛋白（vinculin）及  $\alpha$ -辅肌动蛋白（ $\alpha$ -actinin）等。与黏着带相连的骨架纤维是肌动蛋白纤维。连环蛋白介导钙黏蛋白与微丝的连接。由于平行排列的微丝及其结合的肌球蛋白能够产生相对运动，导致微丝收缩，因此推测在动物胚胎发育形态建成过程中，黏着带能促使上皮细胞层弯曲形成神经管等结构。

黏着斑（focal adhesion）是细胞与胞外基质之间的连接方式，参与的细胞骨架组分是微丝，跨膜黏附性蛋白质是整联蛋白，胞外基质主要是胶原和纤连蛋白，胞内锚蛋白有踝蛋白（talin）、 $\alpha$ -辅肌动蛋白、细丝蛋白和纽蛋白等。这种连接形式在肌肉与肌腱（主要成分是胶原）很常见。体外培养成纤维细胞通过黏着斑黏附在培养皿基质上，微丝终止于黏着斑处，这种结构有助于维持细胞在运动过程中的张力以及影响细胞生长的信号传递（图 17-5）。

## 三、通讯连接

### （一）间隙连接

间隙连接（gap junction）在动物组织细胞间分布非

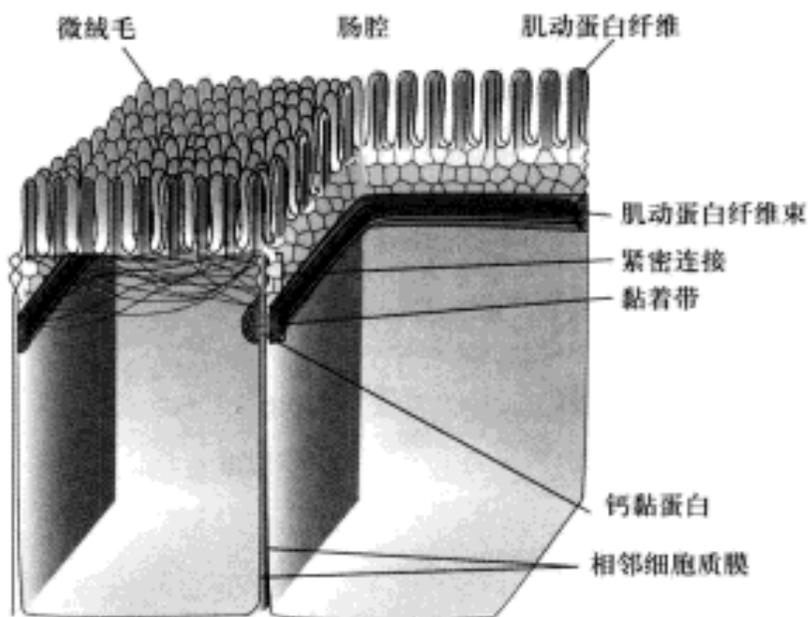


图 17-4 小肠上皮细胞之间黏着带示意图

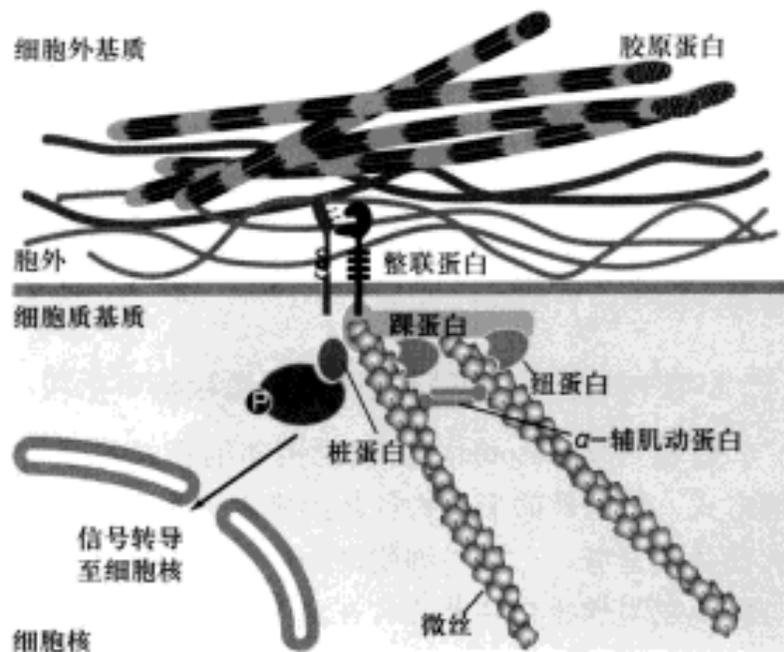


图 17-5 黏着斑结构与功能示意图

常广泛。除骨骼肌细胞及血细胞外，几乎所有的动物组织细胞都利用间隙连接来进行通讯联系。

### 1. 结构与成分

间隙连接的基本结构单位是连接子 (connexon)。每个连接子由 6 个相同或相似的间隙连接蛋白 (connexin) 呈环状排列而成，中央形成一个直径约 1.5 nm 的亲水性通道。相邻细胞质膜上的两个连接子对接便形成完整的间隙连接结构 (图 17-6)。间隙连接处相邻细胞质膜间的间隙为 2-3 nm，因而间隙连接也称缝隙连接。许多间隙连接单位往往集结在一起形成大小不一的片状结构 (图 17-6A)，最大直径可达 0.3 μm，因此通过密度梯度离心技术可将质膜上的间隙连接区域的膜片分离出来。目前已从不同动物或不同组织中分离出 20 余种构成连接子的蛋白，它们属于同一类蛋白质家族，其相对分子质量从  $2.6 \times 10^4$  至  $6.0 \times 10^4$  不等。这类蛋白质较一般蛋白质更能抗去垢剂抽提和蛋白酶的消化，所以比较容易纯化。尽管间隙连接蛋白相对分子质量差异较大，但所有间隙连接蛋白都具有 4 个保守的  $\alpha$  螺旋跨膜区 (图 17-6C)。间隙连接蛋白的一级结构比较保守，其氨基酸序列具有相似的亲水性与疏水性分布。然而不同类型细胞表达不同的间隙连接蛋白，多数细胞表达一种或几种，它们所组装的间隙连接的孔径与调控机制也有所不同。

### 2. 功能

相邻细胞通过间隙连接可以实现代谢偶联或电偶联。通过向细胞内注射不同相对分子质量的染料，证明间隙连接的通道可以允许相对分子质量小于  $1 \times 10^3$

的分子通过，这表明细胞内的小分子，如无机盐离子、糖、氨基酸、核苷酸、维生素、cAMP 和  $IP_3$  等小分子物质能从一个细胞通过间隙连接的通道进入另一个细胞，而蛋白质、核酸、多糖等生物大分子则不能通过。

(1) 间隙连接在代谢偶联中的作用 间隙连接允许通过小分子代谢物和信号分子，以实现细胞间代谢偶联或细胞通讯。代谢偶联现象在体外培养细胞中已得到实验证实，缺乏胸苷激酶的突变细胞株，不能利用胸苷合成 DNA。将突变细胞与含有胸苷激酶的正常细胞共培养，两种细胞相互接触并形成间隙连接，此时向培养液中加入放射性标记的胸苷，结果显示放射性标记的胸苷不仅可掺入到正常细胞的 DNA 中，也可掺入到突变细胞的 DNA 中，表明放射性标记的胸苷进入正常细胞后在胸苷激酶的作用下形成三磷酸胸苷 (TTP)，然后作为 DNA 合成的前体物，通过间隙连接进入突变细胞中参与 DNA 合成。代谢偶联作用在协调细胞群体的生物学功能方面起重要的作用，如当促细胞分泌的激素促胰液素 (secretin) 作用于胰腺腺泡细胞，其基底面质膜上的受体与激素分子结合，激发细胞内作为第二信使的 cAMP 和  $Ca^{2+}$  浓度增高，促使贮存在分泌泡中的胰蛋白酶向胞外释放。cAMP 和  $Ca^{2+}$  都可通过间隙连接从一个细胞进入相邻的细胞中。因此，只要有部分细胞接受信号分子的作用后，便可使所有腺泡细胞同时向外分泌消化酶。

(2) 间隙连接在神经冲动信息传递中的作用 神经元之间或神经元与效应细胞 (如肌细胞) 之间通过突触 (synapse) 完成神经冲动的传导。突触可分为电突触

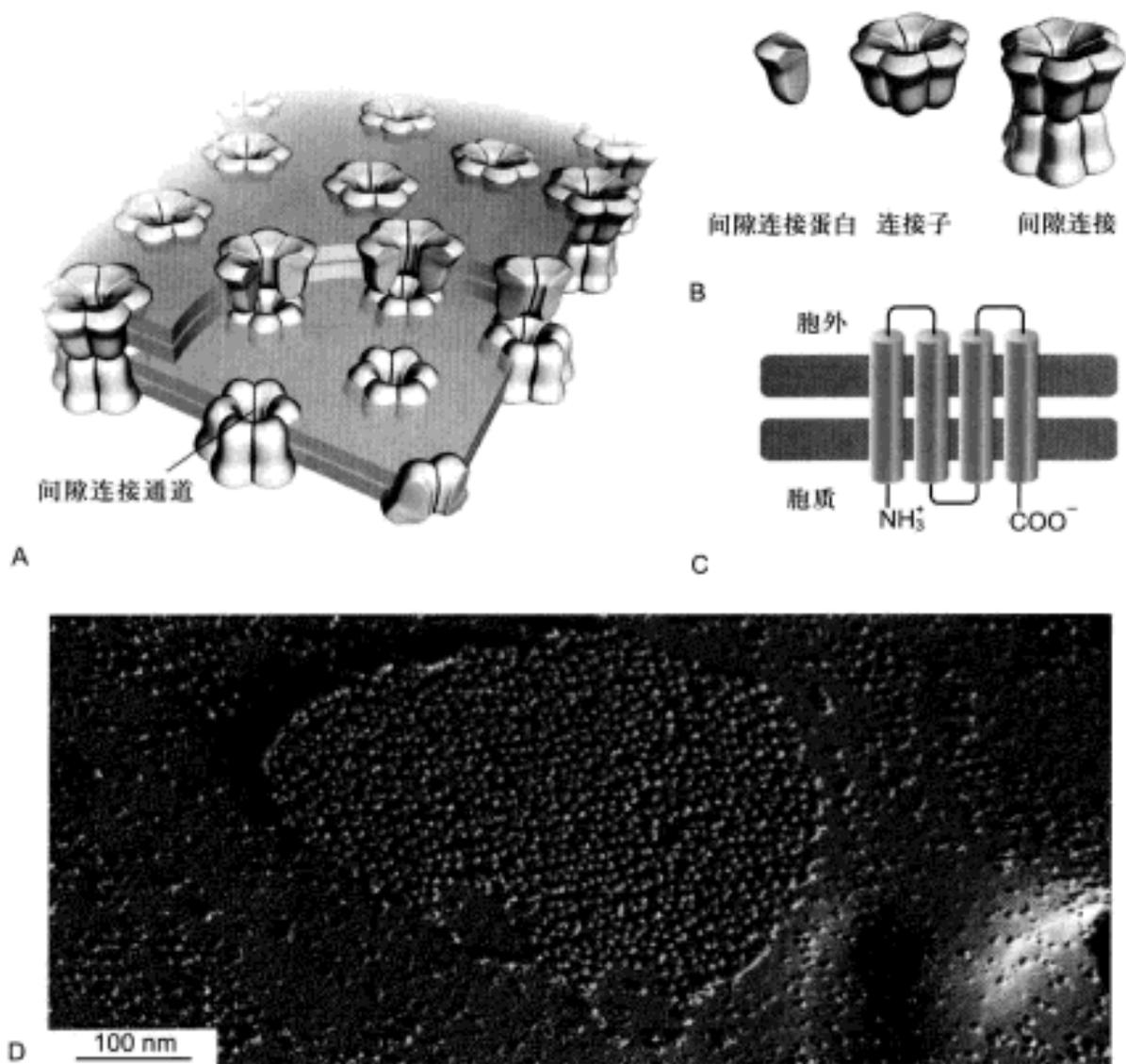


图 17-6 间隙连接

A. 间隙连接结构示意图。B. 间隙连接的蛋白组成。C. 4 次跨膜的间隙连接蛋白结构示意图。D. 豚鼠上皮细胞冷冻蚀刻电镜照片显示间隙连接成片分布区域。(D 图由 Bechara Kachar 博士惠赠)

(electronic synapse) 和化学突触 (chemical synapse) 两种基本类型。电突触是指细胞间形成间隙连接，电冲动可直接通过间隙连接从突触前向突触后传导 (图 17-7)。与化学突触传递信号不同，电突触的间隙连接有利于细胞间的快速通讯，让动作电位 (离子流) 从一个细胞直接通过间隙连接通道迅速传递到另一个细胞。而化学突触传递信号时，神经冲动传递到轴突末端，引起神经递质小泡释放神经递质，然后神经递质作用于突触后细胞，引起新的神经冲动。这种信号传递涉及将电信号转变为化学信号，再将化学信号转变为电信号的过程。而电突触传递信号时是通过间隙连接直接将电信号从一个细胞传递到另一个细胞，相对来讲，信号传递速度快了很多。这对于某些无脊椎动物和鱼类快速准确地逃避反射十分重要，如龙虾在外界刺激后的 15 ms 内即可作出反应。

此外，间隙连接在协调心肌细胞的收缩，保证心脏

正常跳动，协调小肠平滑肌的收缩，控制小肠蠕动等过程中也都能通过电偶联的方式来协调细胞群体行为。

(3) 间隙连接在胚胎早期发育中的作用 间隙连接出现在动物胚胎发育的早期，如在小鼠胚胎 8 细胞阶段，细胞之间普遍建立了电偶联。但是当细胞开始分化后，不同细胞群之间电偶联逐渐消失，说明间隙连接存在于发育与分化的特定阶段的细胞之间。若用抗间隙连接蛋白的抗体注射到 8 细胞蛙胚的某个细胞中，则细胞间的电偶联被选择性地阻断，注射的染料只存留在被注射细胞及其子细胞中，并且使胚胎发育出现明显的缺陷。很可能胚胎发育中细胞间的代谢偶联或电偶联为影响细胞分化的信号物质的传递提供了重要的通路。

有趣的是，除了依赖亲水性通道发挥通讯功能外，最近发现，间隙连接还有黏着特性。在大脑发育过程中，神经元与放射状纤维形成间隙连接而黏着在一起，通过间隙连接蛋白与细胞内的微丝相互作用，介导了神

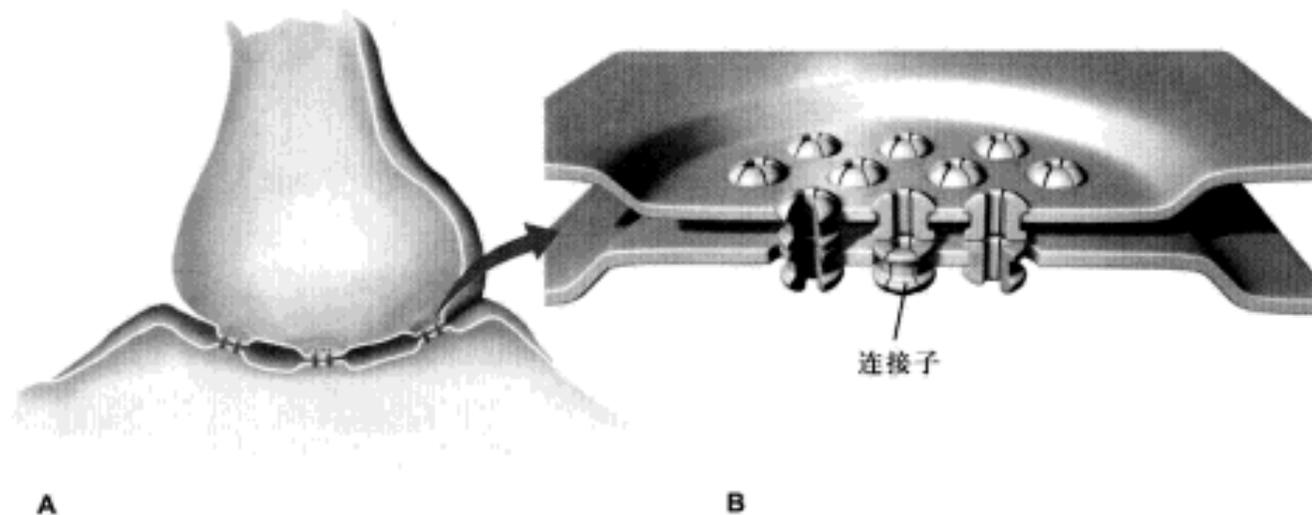


图 17-7 电突触结构示意图

A. 电突触结构示意图。B. 电突触的间隙连接示意图。

神经元沿放射状纤维的迁移。

### 3. 间隙连接通透性的调节

间隙连接允许相对分子质量小于  $1 \times 10^3$  的无机离子及小分子物质通过，但间隙连接的通透性也是可变的，表现在以下两个方面：

(1) 间隙连接对小分子物质的通透能力具有底物选择性。如豚鼠耳蜗支持细胞间的间隙连接对阳离子通透性明显比阴离子大，同样，耳蜗感觉上皮细胞的间隙连接（间隙连接蛋白主要为 Cx26）也表现出对带正电荷的分子通透性大。

(2) 间隙连接通透性受细胞质  $\text{Ca}^{2+}$  浓度和 pH 调节。降低胞质中的 pH 和提高胞质中自由  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度都可以使间隙连接通透性降低。在某些组织中，间隙连接的通透性还受两侧电压梯度的调控及细胞外化学信号的调控。这些现象表明，间隙连接通道是一种动态结构，其构象可发生可逆性变化。电压和 pH 对间隙连接通透性调节的意义尚不清楚。 $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高关闭了间隙连接的通道，至少可阻止细胞高浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  进入相邻细胞而影响其正常细胞代谢活动。

间隙连接通透性还受胞外化学信号的调节，有助于细胞间的代谢偶联。例如，当胰高血糖素用于肝细胞时，使肝细胞内 cAMP 水平增高，cAMP 激活了依赖于 cAMP 的蛋白激酶，蛋白激酶又使间隙连接蛋白磷酸化，导致其构象发生改变，从而使间隙连接通透性增加，这样 cAMP 就可以迅速从一个细胞扩散到周围的肝细胞，最终使肝细胞共同对胰高血糖素的刺激作出应答反应。

## (二) 胞间连丝

植物细胞具有坚韧的细胞壁，因此相邻细胞的质膜无法形成像动物细胞间的紧密连接和间隙连接，也不需要形成锚定连接，但植物细胞间仍然需要通讯。除极少数特化的细胞外，高等植物细胞之间通过胞间连丝 (plasmodesma) 相互连接，完成细胞间的通讯联络。胞间连丝穿越细胞壁，由相邻细胞的细胞质膜共同组成直径为 20~40 nm 的管状结构，中央是由光面内质网延伸形成的链样管 (desmotubule)。在链样管与管状质膜之间是由细胞液构成的环孔 (图 17-8)。环孔两端狭窄，可能用以调节细胞间的物质交换。胞间连丝可在植物细胞胞质分裂中细胞板形成后期产生，也可在非姐妹细胞之间形成，而且还可以通过修饰改变它的结构和运输功能。

胞间连丝形成了物质从一个细胞进入另一个细胞的通路，所以在植物细胞的物质运输和信号传递中起着非常重要的作用。例如，在分泌旺盛的细胞中，胞间连丝的数目可达  $15 \text{ 个}/\mu\text{m}^2$ ，而一般细胞中约为  $1 \text{ 个}/\mu\text{m}^2$ 。同间隙连接一样，可用荧光染料扩散实验和脉冲电流传导实验来研究胞间连丝的通讯功能。向一个细胞中注入荧光染料则染料迅速扩散到相邻的细胞内，同样，向某个细胞加上一定大小的脉冲电流，在相邻细胞中则可检测到脉冲电流的存在，检测到的脉冲电流强度减小的程度与细胞间的胞间连丝数量有关。

胞间连丝介导的细胞间的物质运输也是有选择性的，并且是可以调节的。显微注射荧光染料标记的多

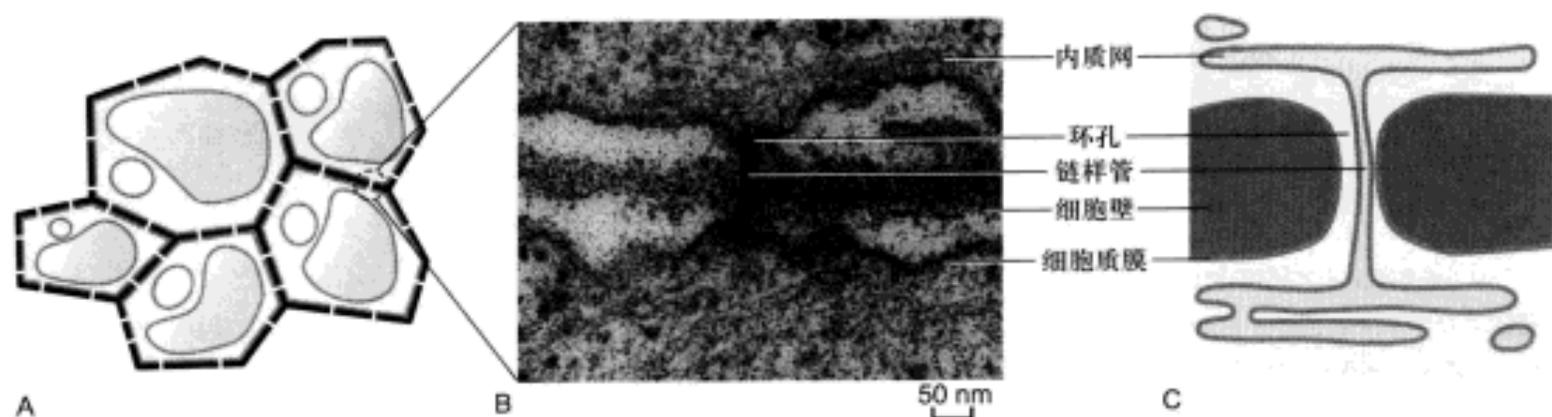


图 17-8 胞间连丝

A. 植物细胞之间形成众多胞间连丝。B. 马铃薯细胞胞间连丝电镜照片。C. 胞间连丝的结构示意图。(B 图由袁明博士惠赠)

肽实验表明，正常情况下，胞间连丝可以允许相对分子质量小于  $1 \times 10^3$  的分子自由通过。但是，在有些组织的细胞之间即使是很小的分子也不能通过胞间连丝，其调节机制至今并不十分清楚。很多植物病毒编码一种特殊的运动蛋白，大多相对分子质量在  $3 \times 10^4$  左右，可以使胞间连丝的通透性增大，进而使病毒蛋白和核酸通过胞间连丝感染相邻的细胞。例如烟草花叶病毒可通过其自身的 p30 运动蛋白调节胞间连丝孔径，使病毒粒子从一个细胞进入另一个细胞，p30 蛋白缺陷突变株不能完成对植株的感染，而在有 p30 蛋白少量表达的转基因植株中，突变株病毒又可以恢复感染。实验表明，某些细胞蛋白与核酸等生物大分子均可通过胞间连丝进入相邻细胞，因此植物细胞胞间连丝在协调其基因表达与生理功能中起重要的作用。绿色荧光蛋白标记技术发现，在烟草叶肉组织的发育过程中，早期细胞间的胞间连丝可允许相对分子质量为  $5 \times 10^4$  的蛋白通过，而在成熟细胞中，胞间连丝呈分枝状，只能允许通过相对分子质量为  $0.4 \times 10^3$  的物质，显示在发育过程中，胞间连丝结构的改变可以调节植物细胞间的物质运输。

### (三) 化学突触

化学突触是存在于可兴奋细胞之间的细胞连接方式，它通过释放神经递质来传导神经冲动并因此而得名。在信息传递中，有一个将电信号转化为化学信号，再将化学信号转化为电信号的过程，因此表现出动作电位在传递中的延迟现象。化学突触是相对电突触而言的，相关知识参见生理学有关内容。

## 第二节 细胞黏着及其分子基础

同种类型细胞间的彼此黏着是许多组织结构的基本特征。实验表明，细胞可以特异性识别某些细胞的表面，并与其选择性地相互作用而忽视另一些细胞。如将发育中的鸡胚或两栖类胚胎组织取出并解离制备成单细胞悬液，然后将不同来源的细胞混合以研究在培养条件下细胞重新聚集的情况。结果发现，两种不同器官来源的细胞最初聚集形成混合的细胞团块，经过一段时间后，同一器官来源的细胞相互识别、黏着，最后从混合团块中自行分选出来。这就是同类细胞的识别与黏着(图 17-9)。同种组织类型细胞的黏着甚至超越种的界限，如鼠肝细胞倾向于与鸡肝细胞黏着，而不与鼠肾细胞黏着。在发育过程中，细胞间的识别、黏着、分离以及迁移对胚胎发育及形态建成具有重要作用。无论是受精，还是胚泡植入、形态发生、器官形成或成体结构与功能的维持，都离不开细胞识别与黏着。在胚胎发育过程中，具有相同表面特性的细胞通过特异性识别并黏着在一起形成 3 个不同胚层：内胚层、中胚层和外胚层。在器官形成过程中，同样通过细胞识别与黏着使具有相同表面特性的细胞聚集在一起形成组织和器官。

细胞识别与黏着的分子基础是细胞表面的细胞黏着分子 (cell adhesion molecule, CAM)。细胞黏着分子都是整合膜蛋白，介导细胞与细胞间的黏着或细胞与细胞外基质间的黏着，目前已在高等动物发现很多种细胞黏着分子。这些分子通过 3 种方式介导细胞识别与黏

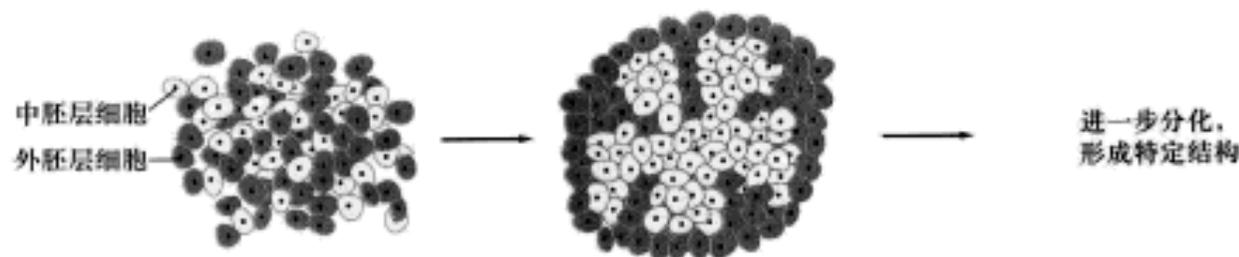


图 17-9 细胞识别与细胞黏着试验示意图

将两栖动物早期胚胎的外胚层和中胚层细胞解离为单细胞并混合在一起，起初细胞形成一个混合的聚合体，然后从其他类型细胞中分选出来。外胚层细胞移动到聚合体的外表面，中胚层细胞移动到聚合体的内部，这些正是它们在胚胎中所占据的位置。

着：相邻细胞表面的同种黏着分子间的识别与黏着（同亲型结合）；相邻细胞表面的不同黏着分子间的相互识别与黏着（异亲型结合）；相邻细胞表面的同种黏着分子借助其他衔接分子的相互识别与黏着（衔接分子依赖性结合）。根据其结构与功能特性，细胞黏着分子分为 4 大类：钙黏蛋白、选择素、整联蛋白及免疫球蛋白超家族。细胞黏着分子多数需要依赖  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  才起作用，这些分子介导的细胞识别与黏着还能在细胞骨架的参与下，形成细胞连接，如桥粒、半桥粒、黏着带以及黏着斑等结构（表 17-1）。

## 一、钙黏蛋白

钙黏蛋白 (cadherin) 是一种同亲型结合、 $\text{Ca}^{2+}$  依

赖的细胞黏着糖蛋白，对胚胎发育中的细胞识别、迁移和组织分化以及成体组织器官构成具有主要作用。最先发现的钙黏蛋白常根据其发现的组织类型命名，如上皮组织中的钙黏蛋白称 E-钙黏蛋白，神经组织的钙黏蛋白称 N-钙黏蛋白，胎盘及表皮细胞的 P-钙黏蛋白。表 17-2 列出了钙黏蛋白家族部分成员及其分布。这些钙黏蛋白又称为典型钙黏蛋白，具有细胞黏着和信号转导功能，其胞内或胞外结构域在序列组成上高度相似。而非典型钙黏蛋白在序列组成上差异较大，主要功能是介导细胞黏着，包括分布于大脑的原钙黏蛋白 (protocadherin) 以及形成桥粒连接的桥粒芯蛋白和桥粒芯胶黏蛋白。目前已在人类中发现了约 200 种钙黏蛋白成员。

典型钙黏蛋白胞外部分形成 5 个重复结构域 (cadherin

表 17-1 细胞表面主要的黏着分子家族

细胞黏着分子家族	主要成员	$\text{Ca}^{2+}$ 或 $\text{Mg}^{2+}$ 依赖性	胞内骨架成分	参与细胞连接类型
钙黏蛋白	E、N、P-钙黏蛋白 桥粒-钙黏蛋白	+ +	肌动蛋白丝 中间丝	黏着带 桥粒
选择素	P-选择素	+		-
免疫球蛋白类	N-细胞黏着分子	-		-
血细胞整联蛋白	$\alpha_1\beta_2$	+	肌动蛋白丝	-
整联蛋白	约 20 多种类型 $\alpha_v\beta$	+ +	肌动蛋白丝 中间丝	黏着斑 半桥粒

表 17-2 钙黏蛋白家族部分成员

名称	主要分布	参与细胞连接类型	在小鼠中失活后的表型
E-钙黏蛋白	上皮细胞	黏着连接	胚泡细胞不能聚集在一起，死于胚泡时期
N-钙黏蛋白	神经、心脏、骨骼肌及成纤维细胞	黏着连接、化学突触	因心脏缺陷而死于胚胎时期
P-钙黏蛋白	胎盘、表皮	黏着连接	异常乳腺发育
VE-钙黏蛋白	内皮细胞	黏着连接	血管异常发育（因为内皮细胞凋亡）

repeat), 非典型钙黏蛋白胞外部分一般有 4~5 个重复结构域, 个别甚至高达 30 个重复结构域。每个重复结构域类似一个刚性结构, 它们之间是具有一定韧性的铰链区域, 铰链区是  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点。有模型认为, 钙黏蛋白胞外 (N 端) 最后一个重复结构域形成一个把手样结构和口袋状结构, 当  $\text{Ca}^{2+}$  结合在重复结构域之间的铰链区域后, 赋予了整个钙黏蛋白胞外部分的刚性, 使得一个细胞钙黏蛋白的把手样结构和另一个细胞钙黏蛋白的口袋状结构彼此“嵌合”在一起, 从而实现  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性的细胞黏着。而去除  $\text{Ca}^{2+}$  后, 钙黏蛋白铰链区变得松软, 胞外部分刚性随之变小, 同时, N 端构象发生改变, 钙黏蛋白彼此间的嵌合力降低 (图 17-10)。因此, 阳离子螯合剂 EDTA 能破坏  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  依赖性的细胞黏着。钙黏蛋白胞内结构域为微丝或中间丝提供了锚定位点, 它们之间的相互连接是非直接性的, 依赖连环蛋白等衔接。

钙黏蛋白介导高度选择性的细胞识别与黏着。通过调控钙黏蛋白的种类与数量能影响细胞间的黏着与迁移, 从而影响组织分化。如外胚层发育成神经管时, 神经管细胞停止表达 E-钙黏蛋白转而表达 N-钙黏蛋白, 而当神经嵴细胞从神经管迁移出来时, 神经嵴细胞则很少表达 N-钙黏蛋白, 转而主要表达钙黏蛋白-7。E-钙黏蛋白是哺乳动物发育过程中第一个表达的钙黏蛋白, 当小鼠发育进入 8 细胞胚胎时期, E-钙黏蛋白的表达将松散联系的分裂球细胞变成紧密黏合的细胞。若用 E-钙黏蛋白的抗体处理胚胎细胞, 则会阻止分裂球细胞间的紧密黏合。如果 E-钙黏蛋白突变, 将会导致胚胎细胞的分离和死亡。

上皮细胞转型为间质细胞或间质细胞转型为上皮细胞是一个受控的可逆过程, 称之上皮-间质转型 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 其分子机制是 E-钙黏蛋白的表达与否。表达 E-钙黏蛋白后, 分散的间质细胞会聚集在一起形成上皮组织; 不表达 E-钙黏蛋白的上皮细胞则改变其命运, 从上皮组织迁移出来形成游离的间质细胞。E-钙黏蛋白的表达既受启动子区甲基化影响, 又受多种转录调控因子如 Snail、Slug、Twist 等的负调控而起抑制作用。这种上皮-间质转型是细胞转分化的一种方式, 在胚胎发育、器官的细胞更新和再生, 以及某些多能干细胞的分化等过程中均发挥重要的生理作用。我们知道, 大多数肿瘤起源于上皮组织, 当肿瘤细胞逃逸原发上皮组织而入侵其他组织时, 就成为恶性肿瘤。上皮组织获得浸润和转移能力是细胞癌变的关键特征, 所以癌细胞演进与 EMT 有关。此外, 医学上脏器纤维化病变也与 EMT 有关, 例如与肾纤维化病变直接相关的肾间质成纤维细胞绝大多数由肾上皮细胞经 EMT 而来。

## 二、选择素

20 世纪 60 年代, 人们发现从外周淋巴结中分离出来的淋巴细胞经过放射性标记后注射到体内, 这些淋巴细胞会回到它们最初衍生出来的位点, 这种现象称为“淋巴细胞归巢” (lymphocyte homing)。之后又发现这种归巢现象能在体外进行研究, 让淋巴细胞黏附到淋巴器官组织的冰冻切片上。在实验条件下, 淋巴细胞会选择性地黏附在外周淋巴结小静脉的内皮上。淋巴细胞与

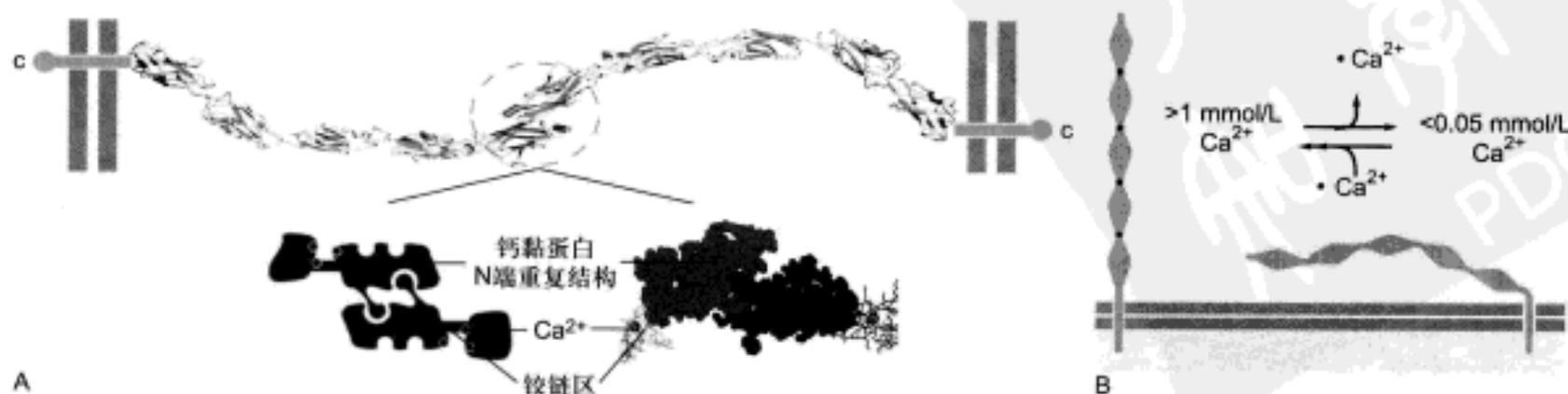


图 17-10 钙黏蛋白结构及功能

A. 典型钙黏蛋白胞外肽链形成 5 个重复结构域,  $\text{Ca}^{2+}$  结合在重复结构域之间的铰链区域, 赋予钙黏蛋白刚性特性。钙黏蛋白 N 端最后一个重复结构域形成把手样结构和口袋状结构, 同亲型结合时, 把手样结构和口袋状结构彼此嵌合在一起, 形成细胞黏着。B.  $\text{Ca}^{2+}$  对钙黏蛋白胞外部分刚性的影响, 低浓度 ( $<0.05 \text{ mmol/L}$ )  $\text{Ca}^{2+}$  导致钙黏蛋白胞外部分的刚性丧失。

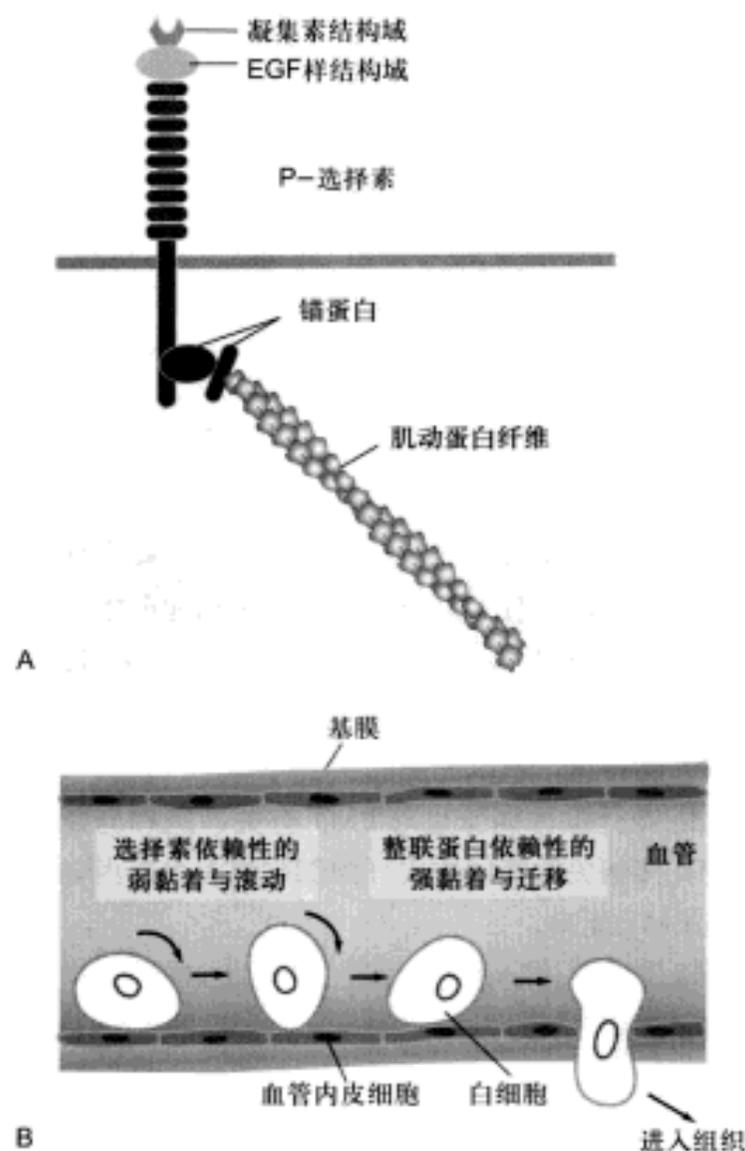


图 17-11 选择素的结构及功能示意图

A. P-选择素结构。B. 选择素及整联蛋白介导的细胞黏着，帮助白细胞从血液进入组织。

小静脉的结合可以被抗体阻断，这些抗体与淋巴细胞表面上特异的糖蛋白结合，这种糖蛋白后来被称为L-选择素 (L-selectin)。

选择素 (selectin) 是一类异亲型结合、 $Ca^{2+}$  依赖性的细胞黏着分子，能与特异糖基识别并结合。除了L-选择素外，还有位于血小板和内皮细胞上的P-选择素以及位于内皮细胞上的E-选择素。选择素是跨膜蛋白，其胞外部分具有高度保守并能识别其他细胞表面特异性寡糖链的凝集素 (lectin) 结构域 (图 17-11A)。选择素主要参与白细胞与血管内皮细胞之间的识别与黏着，帮助白细胞经血流进入炎症部位。在炎症病灶部位，血管内皮细胞表达选择素，被白细胞识别 (依靠自身寡糖链)。由于选择素与白细胞表面糖脂或糖蛋白的特异糖侧链亲和力较小，加上血流速度的影响，白细胞在血管中黏着—分离，再黏着—再分离，呈现滚动式运动，直到活化自身整联蛋白后，最终才与血管内皮细胞较强地

结合在一起，并于相邻的血管内皮细胞间内皮间隙进入组织 (图 17-11B)。白细胞就是以这种机制富集到炎症发生的部位。

### 三、免疫球蛋白超家族

免疫球蛋白超家族 (IgSF) 指分子结构中具有与免疫球蛋白类似结构域的细胞黏着分子超家族。其中有的介导同亲型细胞黏着，有的介导异亲型细胞黏着，但免疫球蛋白超家族成员介导的黏着都不依赖于  $Ca^{2+}$ ，其中了解最多的是神经细胞黏着分子 (neural cell adhesion molecule, NCAM)，它在神经组织细胞间的黏着中起主要作用。不同的 NCAM 由单一基因编码，但由于其 mRNA 拼接不同和糖基化各异而产生 20 余种不同的 NCAM。分析发现，所有神经细胞黏着分子的胞外部分都有 5 个免疫球蛋白样的结构域 (Ig-like domain)，如图 17-12 所示。

大多数 IgSF 细胞黏着分子介导淋巴细胞和免疫应答所需要的细胞 (如巨噬细胞、淋巴细胞和靶细胞) 之间的黏着。但是，一些 IgSF 成员如 VCAM (血管细胞黏着因子)、NCAM 和 L1 介导非免疫细胞的黏着，在神经系统发育中有重要作用。因此，L1 基因的突变会产生破坏性的后果。典型的病例是新生婴儿患有致死性的脑积水。L1 缺失病患者的尸体解剖发现，他们常常失去两条大的神经管道，一条往返于脑的两半球之间，另一条往返于脑和脊髓之间。这两条神经管道的缺失，表明 L1 参与胚胎神经系统中轴突的生长。

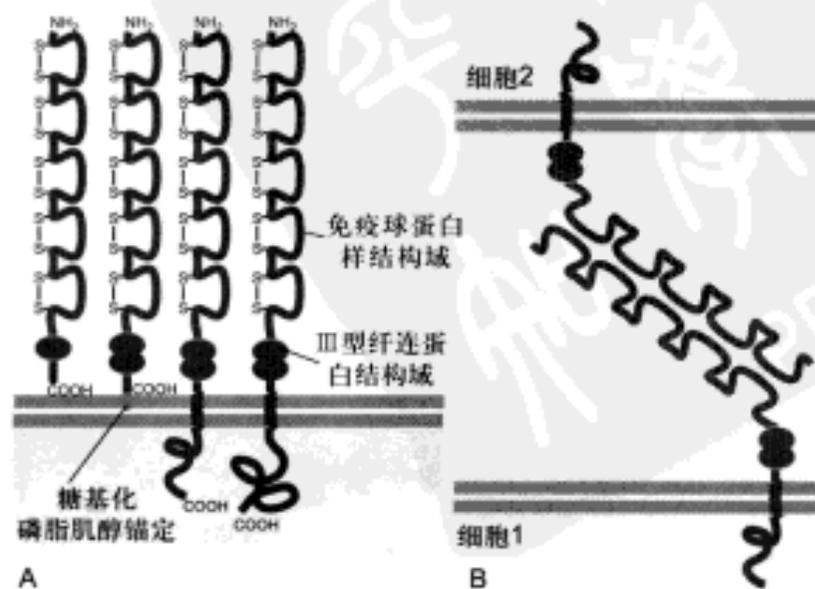


图 17-12 神经细胞黏着分子的结构示意图

A. 4 种神经细胞黏着分子免疫球蛋白样结构域，每个结构域在 loop 末端形成二硫键。B. 同亲型结合模型。

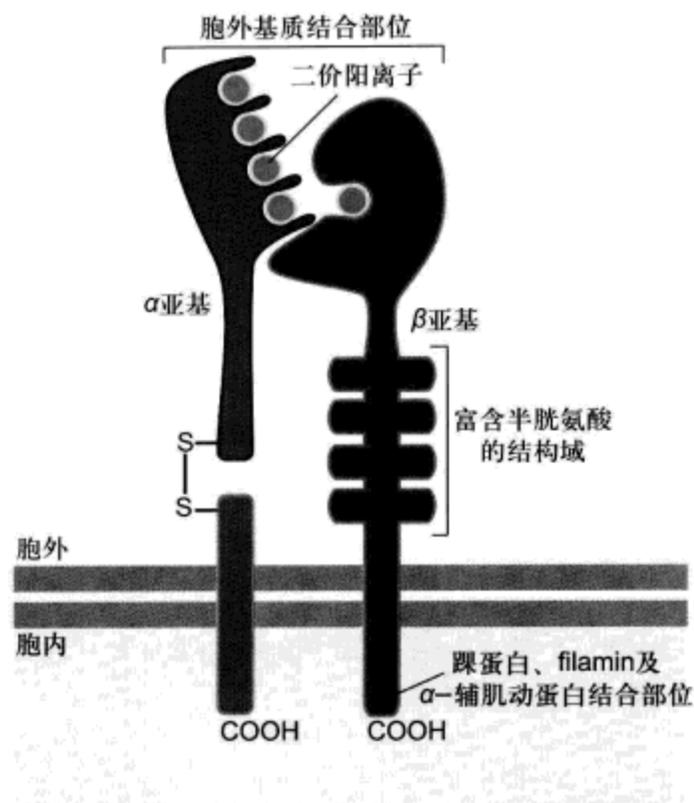


图 17-13 整联蛋白分子结构示意图

整联蛋白是由  $\alpha$ 、 $\beta$  两个亚基形成跨膜异二聚体， $\alpha$ 、 $\beta$  两个亚基均具有较大的胞外配体结合区、单跨膜区和较小的可结合细胞骨架及信号分子的胞内区，其中含  $\beta 1$  亚基的各种整联蛋白是多种胞外基质成分的受体。

#### 四、整联蛋白

整联蛋白 (integrin) 普遍存在于脊椎动物细胞表面，属于异亲型结合、 $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  依赖性的细胞黏着分子，主要介导细胞与胞外基质间的黏着。整联蛋白由  $\alpha$ 、 $\beta$  两个亚基形成跨膜异二聚体 (图 17-13)。目前至少已鉴定出人有 24 种不同的  $\alpha$  亚基和 9 种不同的  $\beta$  亚基，可与胞外基质配体结合，有时也与其他细胞表面配体结合 (表 17-3)。

整联蛋白通过与胞内骨架蛋白的相互作用介导细

表 17-3 整联蛋白主要类型

整联蛋白	主要配体	分布
$\alpha_5\beta_1$	纤连蛋白	广泛
$\alpha_6\beta_1$	层粘连蛋白	广泛
$\alpha_7\beta_1$	层粘连蛋白	肌细胞
$\alpha_v\beta_2$	IgSF	白细胞
$\alpha_2\beta_3$	纤维蛋白原	血小板
$\alpha_9\beta_4$	层粘连蛋白	上皮细胞间的半桥粒

胞与胞外基质的黏着。如图 17-5 所示，大多数整联蛋白  $\beta$  亚基的胞内部分通过踝蛋白、 $\alpha$ -辅肌动蛋白、细丝蛋白、纽蛋白等与细胞内的肌动蛋白纤维相互作用，而胞外部分则通过自身结构域与纤连蛋白、层粘连蛋白等含有 Arg-Gly-Asp (RGD) 三肽序列的胞外基质成分结合，介导细胞与胞外基质的黏着。整联蛋白介导细胞与胞外基质黏着的典型结构有黏着斑和半桥粒。因此，如果细胞在含有 RGD 序列的合成肽的培养基中培养，由于合成肽的 RGD 序列与纤连蛋白中的 RGD 序列竞争性地结合在细胞表面的整联蛋白上，阻断细胞与纤连蛋白的结合，导致细胞不能贴壁、生长。据估计大约半数的整联蛋白含有结合 RGD 的结构域。RGD 序列的发现开辟了以受体-配体相互作用为基础的新的治疗手段。在病变的动脉中，血栓的形成会阻断血液流向器官，是造成心脏病发作或中风的病因之一。血凝块的形成始于血小板的凝聚，而血小板的凝聚需要血小板特异的整联蛋白  $\alpha_{IIb}\beta_3$  与含 RGD 序列的可溶性血液蛋白 (如纤维蛋白原, fibrinogen) 的相互作用，后者作为衔接蛋白把血小板聚集在一起。动物试验表明，含 RGD 序列的肽可竞争性地阻止血小板整联蛋白与纤维蛋白原等结合，从而预防血凝块的形成。针对  $\alpha_{IIb}\beta_3$  整联蛋白的特异性抗体可防止接受高风险血管外科手术病人的血栓形成。

尽管特定的胞外基质蛋白可与多个不同的整联蛋白结合，一种整联蛋白也可与多个不同配体相结合，但不少整联蛋白表现出各自独特的功能，如  $\alpha_8$  基因敲除小鼠表现为肾缺陷， $\alpha_4$  基因敲除小鼠表现为心脏缺陷， $\alpha_5$  基因敲除小鼠表现为血管缺陷。

近年来，有关整联蛋白介导的信号传递研究取得了不少进展。整联蛋白参与的信号传递方向有“由内向外” (inside out) 及“由外向内” (outside in) 两种形式。研究发现，血小板及白细胞的整联蛋白往往以无活性的形式存在于细胞表面。当细胞内信号传递启动后，如  $\text{PIP}_2$  激活踝蛋白，引起踝蛋白与整联蛋白  $\beta$  链的结合能力增强，导致整联蛋白胞外构象的改变而增强与其他胞外配体的结合能力，最后介导细胞黏着。这种由细胞内部信号传递的启动而调节细胞表面整联蛋白活性的方式称为“由内向外”的信号转导。例如，血液凝固过程中，血小板结合于受损血管或被其他可溶性信号分子作用后引起细胞内信号的传递，诱导血小板膜上的  $\alpha_{IIb}\beta_3$  整联蛋白构象发生改变而被激活。活化的整联蛋白与血液凝固蛋白——纤维蛋白原结合后导致血小板彼此粘连在一起形成血凝块。

整联蛋白还可作为受体介导信号从细胞外环境到细胞内的转导,这种方式称为“由外向内”的信号转导。整联蛋白参与的这种信号转导现象最先发现于对肿瘤细胞的研究。大多数正常细胞必须附着在胞外基质上才能生长,如果细胞不能贴附在胞外基质上就会停止分裂直至死亡,这种现象叫做锚定依赖性生长。然而,肿瘤细胞在不与胞外基质牢固附着的情况下仍然会继续生长。正常贴壁细胞在悬浮培养时死亡是因为它们的整联蛋白不能与胞外基质配体相互作用,致使无法向细胞内传递“救生信号”,而当细胞恶变时,它们的存活不再依赖于整联蛋白与配体的结合。现在知道,这种整联蛋白介导的“由外向内”的典型信号转导通路依赖细胞内酪氨酸激酶——黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)。一旦与配体结合,整联蛋白就会快速与肌动蛋白骨架产生联系,并聚集在一起形成黏着斑。在黏着斑形成部位,还有结构蛋白如纽蛋白、踝蛋白及 $\alpha$ -辅肌动蛋白。此时,FAK借助踝蛋白等结构蛋白被募集到黏着斑部位,并相互磷酸化使彼此特异的酪氨酸带上磷酸基团,为细胞内酪氨酸激酶 Src 家族成员提供停泊位点。Src 又使 FAK 其他酪氨酸带上磷酸基团,为胞内多种信号传递蛋白提供停泊位点,同时,Src 激酶还活化黏着斑部位的其他蛋白(参见图 17-5)。通过这种方式,信号不断向细胞内进行传递,调节细胞增殖、生长、生存、凋亡等重要生命活动。

整联蛋白与传统的信号受体通过多种协同方式刺激细胞产生广泛的应答。如整联蛋白与生长因子受体共同作用,调节细胞生长、增殖。这种依赖细胞附着在胞外基质上才能生存、增殖的生物学意义可能确保细胞定位于适当的位置。

### 第三节 细胞外基质

多细胞生物体的组成除细胞之外,还包括由细胞分泌的蛋白质和多糖所构成的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。细胞外基质在结缔组织含量最为丰富,主要由成纤维细胞(fibroblast)所分泌形成复杂的网络结构,占据结缔组织的大部分胞外空间(图 17-14)。

胞外基质的分子类型、不同组分的含量和组装形式

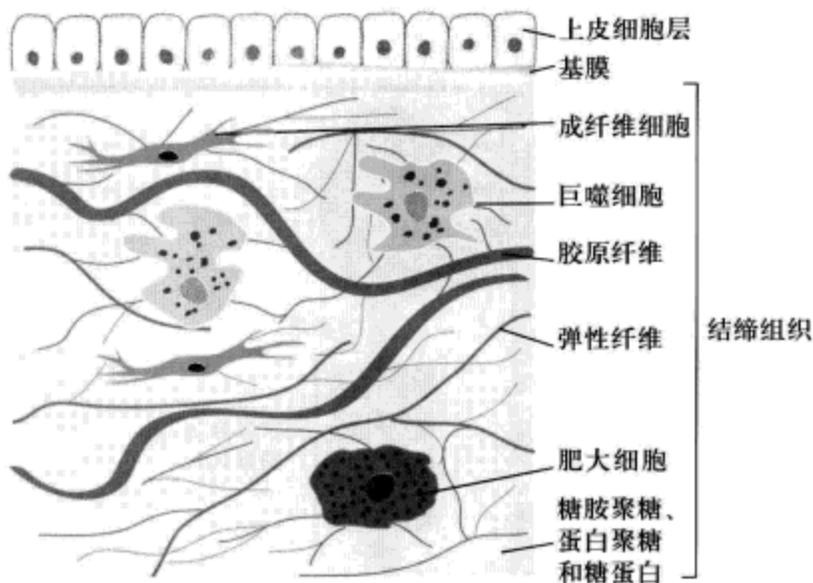


图 17-14 结缔组织示意图

上皮组织下的结缔组织由多种细胞和胞外基质成分构成,细胞主要是分泌胞外基质的成纤维细胞。

具有组织器官特异性,并与组织器官的发育阶段及功能状态相适应。各种结缔组织的胞外基质变化多样,如骨这种胞外基质表现为刚硬,以确保其支撑等作用;软骨具有一定的韧性;而角膜中胞外基质是透明而柔软;肌腱和韧带中的胞外基质组装成绳索状,具有高度抗张强度;在上皮层和结缔组织间的胞外基质特化为基膜。尽管如此多样,但根据其组成成分的功能进行划分,动物细胞的胞外基质成分主要有 3 种类型:① 结构蛋白,包括胶原和弹性蛋白,分别赋予胞外基质强度和韧性;② 蛋白聚糖,由蛋白质和多糖共价形成,具有高度亲水性,从而赋予胞外基质抗压的能力;③ 粘连糖蛋白,包括纤连蛋白和层粘连蛋白,有助于细胞粘连到胞外基质上。

动物组织的构建既是多细胞相互作用的结果,也是细胞与胞外基质相互作用、相辅相成的结果。胞外基质不仅为组织的构建提供了支撑框架,还对与其接触的细胞的存活、发育、迁移、增殖、形态以及其他功能产生重要的调控作用。很多编码胞外基质成分的基因或某些胞外基质受体基因突变后,可导致多种疾病甚至肿瘤的发生,因此对胞外基质功能的研究越来越成为人们关注的焦点。

#### 一、胶原

##### (一) 结构与类型

胶原(collagen)是胞外基质最基本的成分之一,也是动物体内含量最丰富的蛋白质,占人体蛋白质总

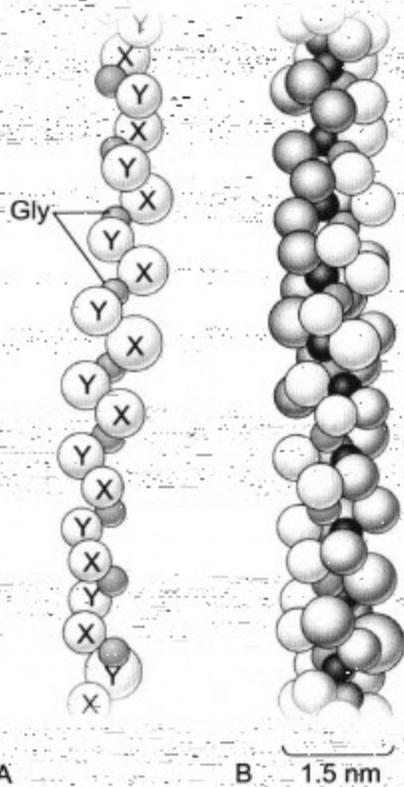


图 17-15 典型的胶原分子结构

A. 一条胶原  $\alpha$  链, 呈左手螺旋, 具有 Gly-X-Y 三肽重复序列特征。B. 胶原分子模式图, 由 3 条  $\alpha$  链螺旋盘绕形成。

量的 25% 以上。典型的胶原分子呈纤维状。胶原纤维的基本结构单位是原胶原 (tropocollagen)。原胶原由 3 条  $\alpha$  链多肽盘绕而成 3 股螺旋结构, 长 300 nm, 直径 1.5 nm。不同的  $\alpha$  链由不同的基因编码, 目前已发现人基因组中有 42 个编码基因。 $\alpha$  链的氨基酸组成及排列独特, 甘氨酸含量占 1/3, 脯氨酸及羟脯氨酸约占 1/4。 $\alpha$  链的一级结构具有 Gly-X-Y 三肽重复序列, 其中 X 常为脯氨酸 (Pro); Y 常为羟脯氨酸 (Hypro) 或羟赖氨酸 (Hyls), 其典型结构如图 17-15 所示。这种三肽

重复序列有利于形成 3 股螺旋胶原分子, 也有助于胶原纤维高级结构的形成, 因此, 其氨基酸残基突变, 尤其是 Lys 残基的突变往往导致 3 股螺旋形成障碍。

值得一提的是, 并非所有类型的胶原都由相同的  $\alpha$  链螺旋盘绕形成, 如 I、IV、V、IX 型胶原由两种或 3 种  $\alpha$  链螺旋形成, 而 II、III、VII、XII、XVII 和 XVIII 型胶原仅由一种  $\alpha$  链形成。目前已发现的人胶原类型多达 27 种, 几种常见的胶原类型及其组织分布如表 17-4。

## (二) 合成与装配

与大多数分泌蛋白的合成、修饰类似, 胶原的合成与组装始于内质网, 并在高尔基体中进行修饰, 最后在细胞外组装成胶原纤维。每一条胶原肽链以前  $\alpha$  链 (pro- $\alpha$  chain) 的形式在 rER 膜结合的核糖体上合成。前  $\alpha$  链不仅含有内质网信号肽, 而且在其 N 端以及 C 端还含有前肽 (propeptide) 序列。N 端前肽约 150 个氨基酸残基, 而 C 端前肽约 250 个氨基酸残基。前  $\alpha$  链进入 rER 腔后信号肽被切除, 其脯氨酸、赖氨酸被羟基化形成羟脯氨酸和羟赖氨酸, 有些羟赖氨酸还被糖基化。然后, 带有前肽的 3 条前  $\alpha$  链在 ER 腔内装配形成 3 股螺旋的前胶原分子 (procollagen), 通过高尔基体分泌到细胞外, 在两种  $Zn^{2+}$  依赖性的前胶原 N-蛋白酶和前胶原 C-蛋白酶作用下, 分别切去 N 端前肽及 C 端前肽, 成为胶原分子 (collagen molecule)。切除前肽的胶原分子以 1/4 交替平行排列的方式自我装配形成直径 10~30 nm 的胶原原纤维 (collagen fibril), 胶原原纤维进一步聚合成 500~3 000 nm 的胶原纤维 (图 17-16)。

在上述合成、加工与装配过程中, 脯氨酸和赖氨酸

表 17-4 胶原的类型及其特性

类型	多聚体形式	组织分布	突变表型
I	纤维	皮肤、肌腱、骨、韧带、角膜等	严重的骨缺陷和断裂
II	纤维	软骨、脊索、人眼玻璃体	软骨缺陷、矮小症状
III	纤维	皮肤、血管、体内器官	皮肤易损、关节松软、血管易破
V	纤维 (结合 I 型胶原)	与 I 型胶原共分布	皮肤易损、关节松软、血管易破
XI	纤维 (结合 II 型胶原)	与 II 型胶原共分布	近视、失明
IX	与 II 型胶原侧面结合	软骨	骨关节炎
IV	片层状 (形成网络)	基膜	血管球形肾炎、耳聋
VII	锚定纤维	复层鳞状上皮	皮肤起疱
XVII	非纤维状	半桥粒	皮肤起疱
XVIII	非纤维状	基膜	近视、视网膜脱离、脑积水

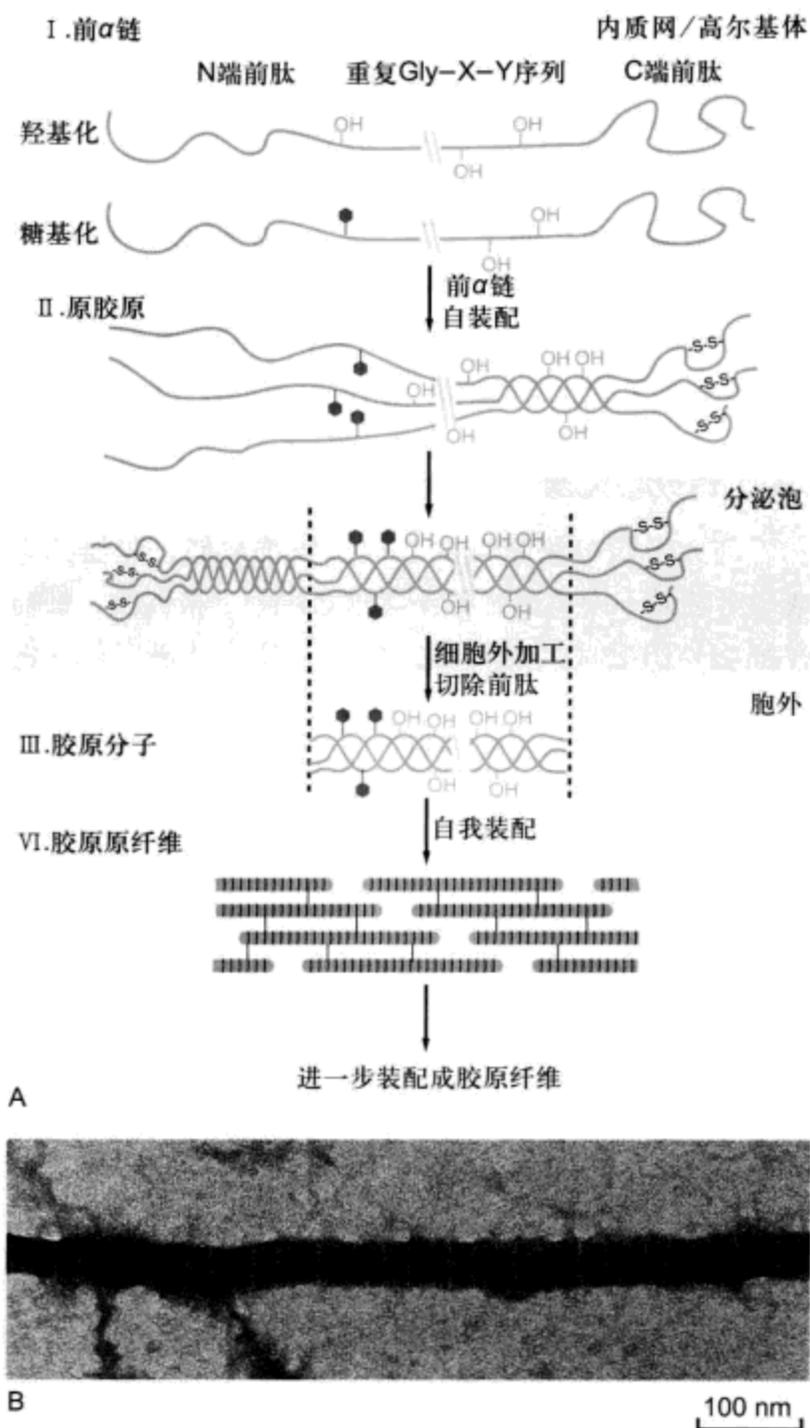


图 17-16 胶原合成与装配

A. 胶原纤维的合成与装配过程。B. 小鼠胶原纤维负染电镜照片。  
(B 图由梁凤霞博士惠赠)

残基的羟基化有助于羟基间形成氢键，以稳定胶原 3 股螺旋结构。缺少维生素 C (抗坏血酸) 时，脯氨酸的羟基化受到影响，从而引起坏血病。这是由于未羟基化的前  $\alpha$  链不能形成稳定的 3 股螺旋结构而很快在细胞中被降解，结果导致胞外基质中胶原的不断丢失而引起血管脆性增加、牙齿松脱以及创伤不能修复。此外，前  $\alpha$  链的前肽不仅有助于形成 3 股螺旋结构，而且阻止了细胞内形成胶原原纤维，因此，前胶原分泌到细胞外后才被切除前肽，这对胶原原纤维的正常组装是必需的。在 Ehlers-Danlos 综合征中，由于缺乏一种切除前肽的酶，导致胶原不能正常组装为高度有序的纤维而出现皮肤和

血管脆弱、皮肤弹性过强等症状。

胶原纤维的强度还可通过胶原分子间以及胶原分子内赖氨酸残基之间形成共价键而得到极大增强。在跟腱部位，这种共价键特别丰富，因此跟腱具有极强的抗张能力。

### (三) 胶原的空间排布形式

同一组织中常含有几种不同类型的胶原，但常以某一种类型为主。在不同组织中，胶原组装成不同的纤维形式，以适应特定功能的需要，最显著的是在骨和角膜中，胶原纤维分层排布，同一层的胶原彼此平行，而相邻两层的纤维彼此垂直，形成夹层板样的结构，使组织具有牢固、不易变形的特性。

胶原纤维的大小和空间排布形式在不同结缔组织中存在巨大差异，这至少与两方面因素有关：一是细胞分泌的胞外基质中一些纤维结合胶原 (fibril-associated collagen)，如 IX 型和 XII 型胶原，前者结合在 II 型胶原表面，后者结合在 I 型胶原表面，介导胶原分子间或者胶原与其他胞外基质大分子间的相互作用，从而影响胶原的排布形式；二是分泌胶原的细胞对胶原在胞外基质中排布的影响。如成纤维细胞，通过对分泌的胶原进行“梳理”，从而影响胶原纤维大小、强度以及空间排布形式。

### (四) 功能

胶原在胞外基质中含量最高，刚性及抗张力强度最大，构成细胞外基质的骨架结构。细胞外基质中的其他组分通过与胶原结合形成结构与功能的复合体。胶原纤维具有很强的抗张能力，特别是 I 型胶原。胶原纤维束构成肌腱，连接肌肉和骨骼。单位横截面的 I 型胶原抗张能力比铁还强。当 I 型胶原发生突变后，常导致成骨缺陷病 (osteogenesis imperfecta)，患者很容易发生骨折。

## 二、弹性蛋白

弹性蛋白 (elastin) 是弹性纤维的主要成分。弹性纤维主要存在于脉管壁及肺组织，也少量存在于皮肤、肌腱及疏松结缔组织中。弹性纤维与胶原纤维共同存在，分别赋予组织弹性及抗张性。弹性蛋白是高度疏水的非糖基化蛋白，约含 750 个氨基酸残基。它的氨基酸组成像胶原一样富含甘氨酸和脯氨酸，但很少含羟脯氨酸，不含羟赖氨酸，没有 Gly-X-Y 序列。弹性蛋白在

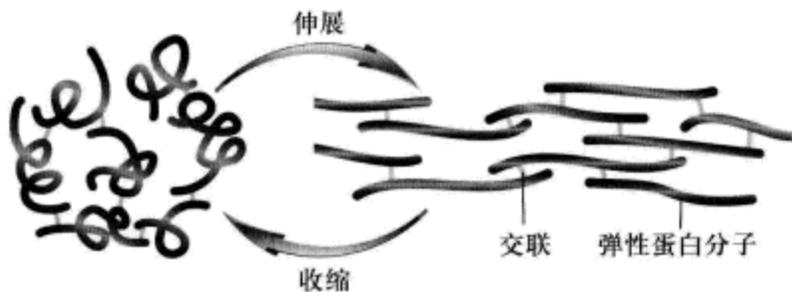


图 17-17 弹性蛋白伸展及收缩示意图

弹性蛋白分子通过共价键相互连接在一起形成卷曲的网状结构，从而可以随意的伸展及回缩。

组成上主要由两种不同类型的区域交替排列而成：疏水区域，赋予分子弹性；富含丙氨酸和赖氨酸的 $\alpha$ 螺旋区域，有助于相邻分子形成交联。正因为如此，弹性蛋白才具有两个明显的特征：① 构象呈无规则卷曲状态；② 通过 Lys 残基相互交连成网状结构（图 17-17）。

胶原和弹性蛋白的重要性在年老个体中表现得更为明显。随着年龄的增长，胶原的交联度越来越大，而韧性却越来越低；弹性蛋白也从皮肤等组织中逐渐丧失。结果，老年人关节灵活性降低，皮肤起皱，弹性降低。

### 三、糖胺聚糖和蛋白聚糖

#### (一) 糖胺聚糖

糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 是由重复的二糖单位构成的不分支的长链多糖，其二糖单位之一是氨基己糖 (*N*-乙酰氨基葡萄糖或 *N*-乙酰氨基半乳糖)，故又称氨基聚糖，另一个是糖醛酸。由于其糖基通常带有硫酸基团或羧基，因此糖胺聚糖带有大量负电荷 (图 17-18)。根据糖、糖基连接类型和硫酸基团的数量与位置，糖胺聚糖可分为透明质酸 (hyaluronan)、硫酸软骨素 (chondroitin sulfate)、硫酸皮肤素 (dermatan sulfate)、硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate) 以及硫酸角质素 (keratan sulfate) 等 4 类。

由于高度亲水性的糖胺聚糖带有大量负电荷，因而能够吸引大量的阳离子 (如  $\text{Na}^+$ )，这些阳离子再结合大量水分子。结果，糖胺聚糖就像海绵一样吸水产生膨压，赋予胞外基质抗压的能力。尽管结缔组织中的糖胺聚糖含量很少，但由于它们能形成多孔的水合胶体，体积增大数倍，糖胺聚糖填充了胞外基质的大部分空间，为组织提供了机械支撑作用。一种严重的硫酸皮肤素合成缺陷遗传病显示，患者身材矮小，外貌早熟，其皮肤、关节、肌肉和骨等都不正常。

透明质酸是一种重要的糖胺聚糖，是增殖细胞和迁

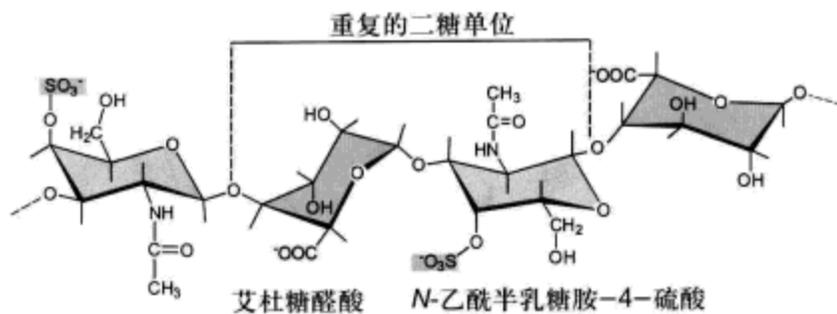


图 17-18 糖胺聚糖结构示意图

移细胞的胞外基质主要成分，在早期胚胎中含量特别丰富。与其他糖胺聚糖相比，透明质酸不被硫酸化，而且通常不与任何核心蛋白 (core protein) 共价连接。

与其他糖胺聚糖一样，透明质酸分子表面含有大量亲水的羧基基团，吸引阳离子，结合大量水分子，形成水合胶体。因此在胞外基质中，透明质酸向外产生膨压，赋予结缔组织抗压能力。此外，透明质酸形成的水合空间有利于细胞保持彼此分离，使细胞易于运动迁移和增殖。一旦细胞迁移停止或增殖够数，便由透明质酸酶 (hyaluronidase) 将其降解。透明质酸还是关节液体的一种重要成分，起到润滑关节的作用。透明质酸的许多作用都不是独立完成的，还依赖于与其他蛋白质及蛋白聚糖的相互作用。

#### (二) 蛋白聚糖

蛋白聚糖 (proteoglycan) 位于结缔组织、细胞外基质及许多细胞表面，由糖胺聚糖 (除透明质酸外) 与核心蛋白的丝氨酸残基共价连接形成的大分子 (图 17-19)，其含糖量可达 90%~95%。一个核心蛋白上可连接数百个不同的糖胺聚糖形成蛋白聚糖。蛋白聚糖的核心蛋白在 ER 上合成，其与多糖链结合的糖基化过程发生在高尔基复合体中，首先是一个特异的连接四糖 (link tetrasaccharide) 与核心蛋白的丝氨酸残基共价结合，然后每次由糖基转移酶 (glycosyl-transferase) 将糖

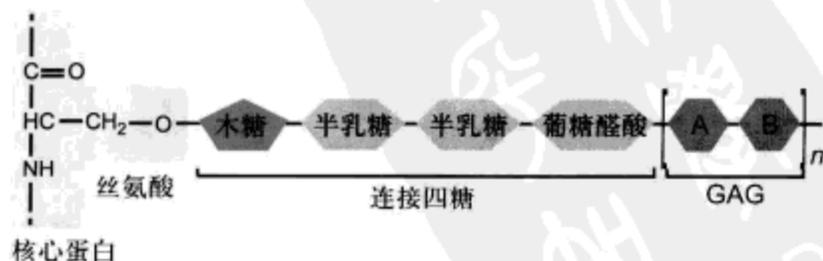


图 17-19 蛋白聚糖结构示意图

蛋白聚糖由糖胺聚糖 (GAG) 与核心蛋白的丝氨酸残基共价连接形成，其中糖胺聚糖通过一个连接四糖与核心蛋白相连。

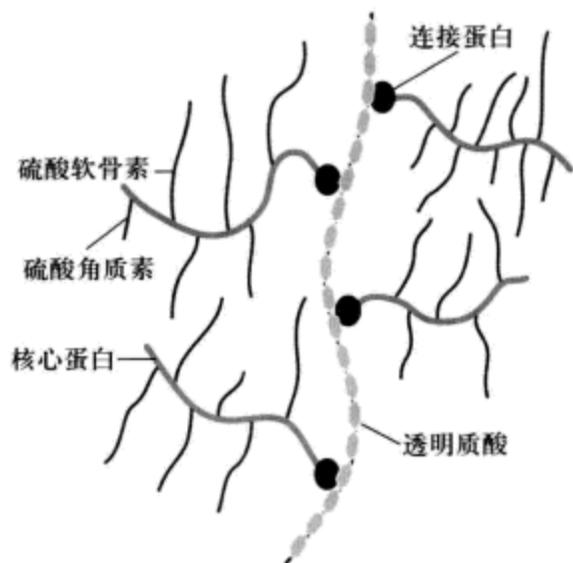


图 17-20 蛋白聚糖复合体结构示意图  
蛋白聚糖通过连接蛋白与透明质酸结合在一起。

胺聚糖一个个地添加到四糖末端 (图 17-19)。

在很多组织中, 蛋白聚糖以单分子形式存在。但在软骨中, 大量蛋白聚糖借助连接蛋白 (linker protein) 以非共价键的形式与透明质酸结合形成很大的复合体 (图 17-20)。每个复合体相对分子质量高达数百万, 长达几个微米。蛋白聚糖的一个显著特点是多态性, 可以含有不同的核心蛋白以及长度和成分不同的多糖链。这些蛋白聚糖赋予软骨凝胶样特性和抗变形能力。此外, 蛋白聚糖可与成纤维细胞生长因子 (FGF)、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 等多种生长因子结合, 有利于激素分子与细胞表面受体结合, 有效完成信号转导。

并非所有蛋白聚糖都形成巨大的聚合物, 如基膜中的蛋白聚糖, 由一个相对分子质量  $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^5$  的核心蛋白和连接的几个硫酸肝素链构成。这种蛋白聚糖与 IV 型胶原结合, 构成基膜的结构组分。还有个别蛋白聚糖并不被分泌到细胞外, 而是通过自身核心蛋白插入到脂双层中或者通过核心蛋白与糖基化磷脂酰肌醇相连而成为质膜的整合成分, 充当其他受体的辅助受体, 在信号转导以及信号分子活性与分布的调节等方面发挥重要作用。

#### 四、纤连蛋白和层粘连蛋白

胞外基质中有多种非胶原蛋白, 这些蛋白具有多个结构域, 提供了胞外基质中其他大分子和细胞表面受体的特异性结合位点, 从而帮助细胞粘连在胞外基质上。其结构与功能了解最多的是纤连蛋白与层粘连蛋白。

#### (一) 纤连蛋白

纤连蛋白 (fibronectin, FN) 是高相对分子质量糖蛋白, 含糖 4.5%~9.5%, 由两个亚基通过 C 端形成的二硫键交联形成, 每个亚基的相对分子质量为  $2.2 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ , 整个分子呈 V 形 (图 17-21)。

纤连蛋白一般由两个相似的亚基组成, 每个亚基都是同一基因的表达产物, 只是转录后差别剪接而产生不同的 mRNA。用低浓度蛋白酶从纤连蛋白各个结构域间的特异位点切断后, 就可确定每个结构域的结合活性。分析发现, 纤连蛋白的每个亚基有数个结构域。这些结构域有的能识别并结合胞外基质组分, 如能结合 I、II 及 IV 型胶原、肝素及凝血蛋白——血纤维蛋白 (fibrin), 有的能识别并结合细胞表面受体 (图 17-21)。这些与细胞表面受体结合的结构域中含有 RGD 三肽序列。如果将人工合成的含有 RGD 三肽序列的短肽偶联在固体物表面, 则细胞很容易附着上去。

纤连蛋白的细胞表面受体是整联蛋白家族成员, 受体的胞外功能域有与 RGD 三肽序列高亲和性的结合部位, 因此纤连蛋白具有介导细胞黏着的功能。纯化的纤连蛋白可增强细胞间黏着及细胞与胞外基质的黏着。

纤连蛋白有助于维持细胞形态。纤连蛋白能结合细胞表面受体和胶原等胞外基质, 因此纤连蛋白就像一个分子“桥”, 将细胞锚定在胞外基质上。这种锚定作用可以通过实验加以说明, 如将细胞培养在有纤连蛋白



图 17-21 纤连蛋白二聚体结构示意图

两个亚基在 C 端通过两个二硫键连接在一起形成二聚体, 每个亚基折叠后形成 5~6 个结构域, 每个结构域能够结合特异的分子或者细胞。

的表面上,细胞很容易就贴壁生长,形态变得扁平,而且细胞内的肌动蛋白纤维的排列形式与胞外纤连蛋白的排列形式类似,由此认为肌动蛋白纤维的定向与组织形式对细胞形态及其维持具有明显的决定作用。研究还发现,很多种癌细胞不能合成纤连蛋白,不但丧失了正常的细胞形态,还脱离胞外基质。如果为这些癌细胞提供纤连蛋白,则细胞形态和结合胞外基质的能力都可以恢复到正常水平。这说明纤连蛋白可能涉及细胞癌变与迁移过程。

纤连蛋白还促进细胞迁移。一个典型的例子是两栖类胚胎发生早期神经嵴细胞的迁移。在神经管形成时,神经嵴细胞从神经管的背侧迁移到胚胎各个区域,分化成神经节、色素细胞等不同类型的细胞。显微注射抗纤连蛋白受体的抗体或含 RGD 序列的短肽,可以阻断细胞与纤连蛋白的结合,从而阻止细胞的迁移,形成异常胚胎。

此外,纤连蛋白还有助于血液凝固和创伤修复。血浆纤连蛋白(plasma fibronectin)是在血液中存在的一种可溶性的纤连蛋白。在血凝块形成过程中,血浆纤连蛋白能结合血纤维蛋白,并促进血小板附着于血纤维蛋白上。纤连蛋白还指引巨噬细胞和其他免疫细胞迁移到受损部位,促进创伤修复。

## (二) 层粘连蛋白

层粘连蛋白(laminin, LN)是另外一种粘连蛋白,不像纤连蛋白那样分布广泛,层粘连蛋白主要分布于各种动物胚胎及成体组织的基膜。层粘连蛋白是高相对分子质量糖蛋白( $8.2 \times 10^5$ ),不仅其含糖量很高(占25%~30%),而且糖链结构也最为复杂,层粘连蛋白通过二硫键将一条 $\alpha$ 链( $4 \times 10^5$ )、一条 $\beta$ 链( $2.2 \times 10^5$ )及 $\gamma$ 链( $2.1 \times 10^5$ )连在一起,分子外形似“十”字形,3条短臂各由3条肽链的N端序列构成(图17-22)。如纤连蛋白一样,层粘连蛋白也有多个不同的结构域,可与IV型胶原、肝素等胞外基质组分结合,还可通过自身的RGD三肽序列与细胞质膜上的整联蛋白结合。因此,层粘连蛋白也是分子“桥”,将细胞锚定在基膜上。

## 五、基膜与细胞外被

### (一) 基膜

基膜(basal lamina, basement membrane)是一种

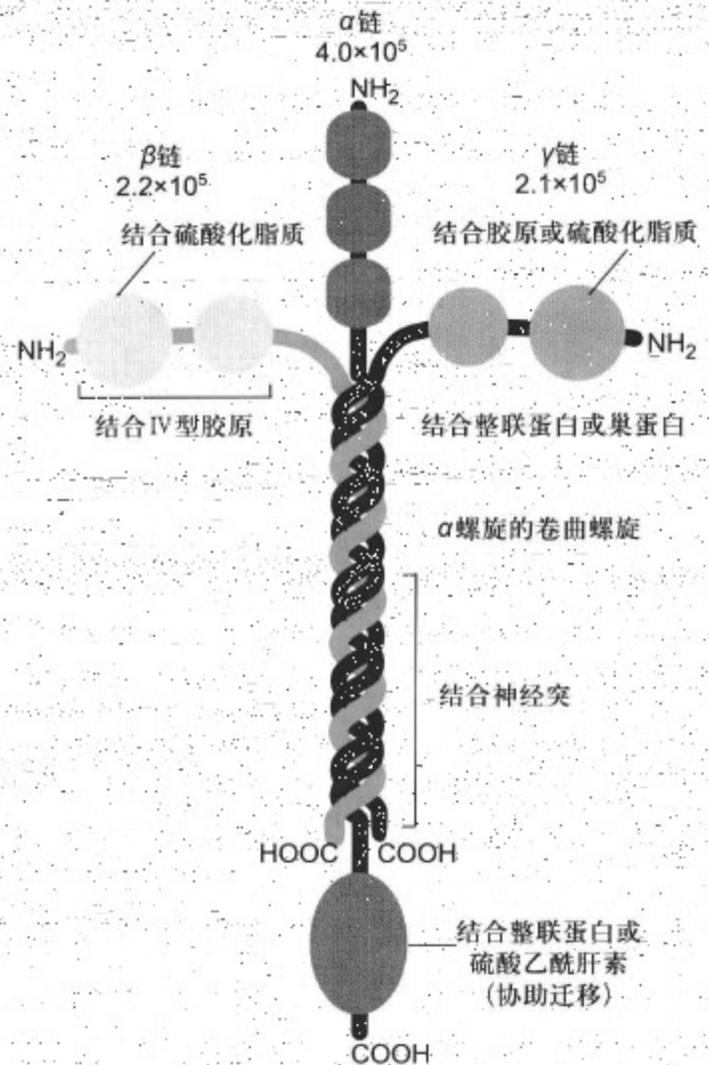


图 17-22 层粘连蛋白分子结构示意图

特化的胞外基质结构,通常位于上皮层的基底面,厚40~120 nm,将上皮细胞与结缔组织分开。此外,在肌细胞和脂肪细胞表面、血管内皮细胞下面、施万细胞(Schwann cell)的表面也有基膜(图17-23)。

基膜主要成分为IV型胶原、层粘连蛋白、巢蛋白(nidogen)以及基膜蛋白聚糖等。层粘连蛋白在基膜中发挥了重要作用,因为层粘连蛋白具有多个不同的功能结构域,既能与IV型胶原结合,也能与细胞表面受体结合,从而将细胞与基膜紧密结合在一起。

基膜不仅对组织起结构支撑作用,同时还具有调节分子通透性以及作为细胞运动的选择性通透屏障。如在肾中,基膜作为一种过滤装置,可允许小分子从血液进入尿液,而阻止血液中蛋白质进入尿液。在表皮细胞层下的基膜可阻止结缔组织中的细胞进入表皮,而允许参与免疫作用的白细胞进入。此外,基膜还能决定细胞的形态与极性,影响细胞代谢,促进细胞存活、增殖、分化甚至迁移,在组织再生中也发挥了重要作用。

### (二) 细胞外被

细胞外被(cell coat)又称糖萼(glycocalyx),指

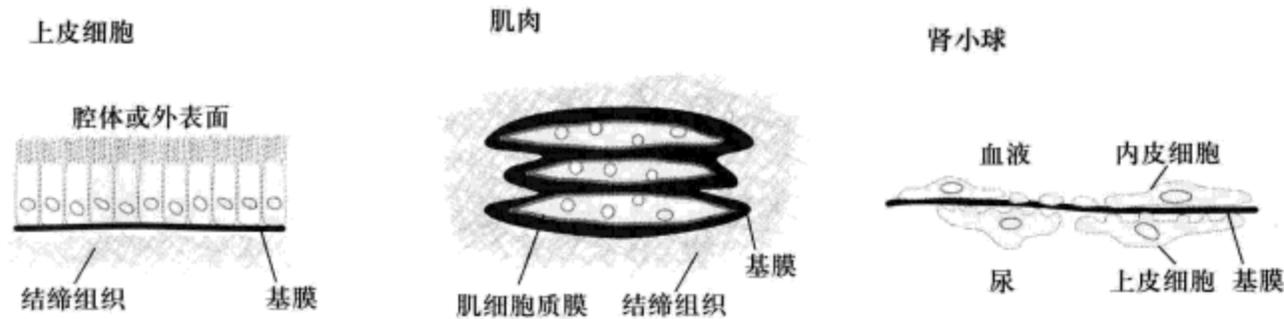


图 17-23 基膜的 3 种组织形式

细胞质膜外表面覆盖的一层黏多糖物质 (图 17-24A)。几乎所有的整合膜蛋白及某些膜脂分子都与糖链分子共价相连形成糖蛋白和糖脂, 这些突出于细胞表面的糖链分子就形成了糖萼 (图 17-24B)。所以, 细胞外被是细胞质膜的正常结构组分, 它与胞外基质在空间分布、成分及功能等方面都不一样。细胞外被不仅对细胞膜起保护作用, 而且在细胞识别中起重要作用。

## 六、植物细胞壁

动物细胞具有不同组织形式的胞外基质, 而对植物、真菌、藻类和原核细胞而言, 其胞外基质不但与动物细胞胞外基质在成分上不同, 而且组织形式也不一样。植物、真菌、藻类和原核细胞的胞外基质形成不同类型的细胞壁 (cell wall)。植物细胞坚韧的细胞壁赋予细胞强度, 保护细胞免受机械损伤以及病原体感染。此外, 细胞壁还发挥渗透屏障作用, 小分子物质, 如水、离子、单糖、氨基酸等都能顺利通过细胞壁, 而相对分

子质量高于  $2 \times 10^4$  的蛋白质则很难通过细胞壁。正因为细胞壁对物质通透的渗透屏障性, 在植物细胞间起信号作用的激素的相对分子质量都小于  $1 \times 10^3$ 。

### (一) 细胞壁的化学组成与结构

植物细胞壁与动物细胞胞外基质的来源一样, 也是由细胞分泌的。植物细胞壁由大分子构成, 主要成分是多糖, 包括纤维素、半纤维素、果胶质等。

#### 1. 纤维素

纤维素 (cellulose) 是由葡萄糖分子以  $\beta$  (1→4) 糖苷键连接起来的线性多聚体分子。纤维素分子集聚成束, 形成长的微原纤维 (microfibre), 微原纤维的走向受细胞质中微管网架的影响。纤维素分子为细胞壁提供了抗张强度。

#### 2. 半纤维素

半纤维素 (hemicellulose) 是由木糖、半乳糖和葡萄糖等组成的高度分支的多糖, 通过氢键与纤维素微原纤维连接。半纤维素的分支有助于将微原纤维彼此连接

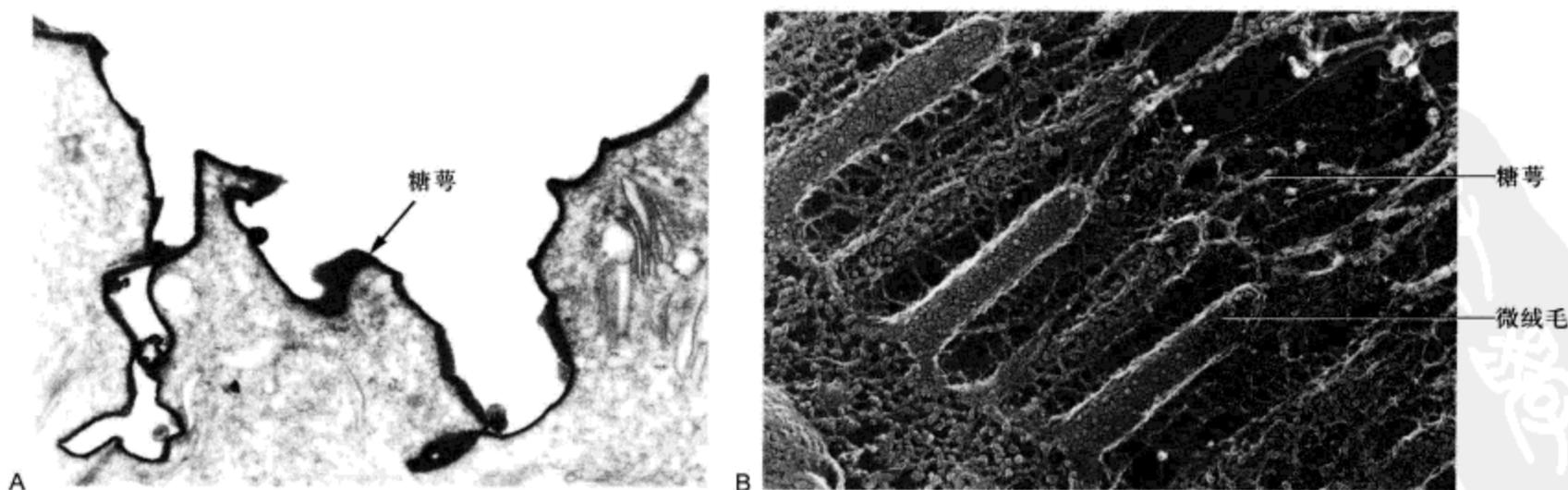


图 17-24 细胞外被

A. 小鼠膀胱上皮细胞表面的糖萼, 钉红染色的电镜超薄切片。B. 蛙小肠上皮细胞表面突出的与膜脂及膜蛋白共价连接的糖萼 (糖链分子)。(A 图由梁凤霞博士和丁明孝提供; B 图由 Bechara Kachar 博士惠赠)

或介导微原纤维与其他基质成分（例如果胶质）连接。果胶质像透明质酸一样，含有大量携带负电荷的糖基，如半乳糖醛酸等。果胶质结合诸如  $\text{Ca}^{2+}$  等阳离子，被高度水化，可形成凝胶，常用于食品加工。果胶质与半纤维素横向连接，参与细胞壁复杂网架的形成。

### 3. 伸展蛋白

伸展蛋白 (extensin) 是由大约 300 个氨基酸残基组成的糖蛋白，在原生生物细胞壁中含量可多达 15%。伸展蛋白含有大量羟脯氨酸残基，其肽链长度的一半是 Ser-Hyp-Hyp-Hyp 四肽序列的重复。大多羟脯氨酸含有 3~4 个阿拉伯糖残基的寡糖链，丝氨酸连接有半乳糖，糖的总量约占 65%。

### 4. 木质素

木质素 (lignin) 是由酚残基形成的水不溶性多聚体。次生细胞壁形成时，木质素开始合成，并以共价键与细胞壁多糖交联，大大增加了细胞壁强度与抗降解力。

## (二) 初生细胞壁与次生细胞壁

植物细胞有两种细胞壁，即初生细胞壁 (primary cell wall) 和次生细胞壁 (secondary cell wall) (图 17-25)。二者是在不同阶段由细胞分泌而成。

植物细胞壁最先形成的是中间层 (middle lamella) (图 17-25)，主要成分为果胶 (pectin)。果胶是相邻细胞壁所共有的，起到将相邻细胞壁粘连在一起的作用。

分泌合成的第二个区域是初生细胞壁。初生细胞壁是在细胞生长期合成的，由纤维素、半纤维素、果胶和糖蛋白等组成。初生细胞壁可看成为凝胶样基质，纤维素埋于其中。

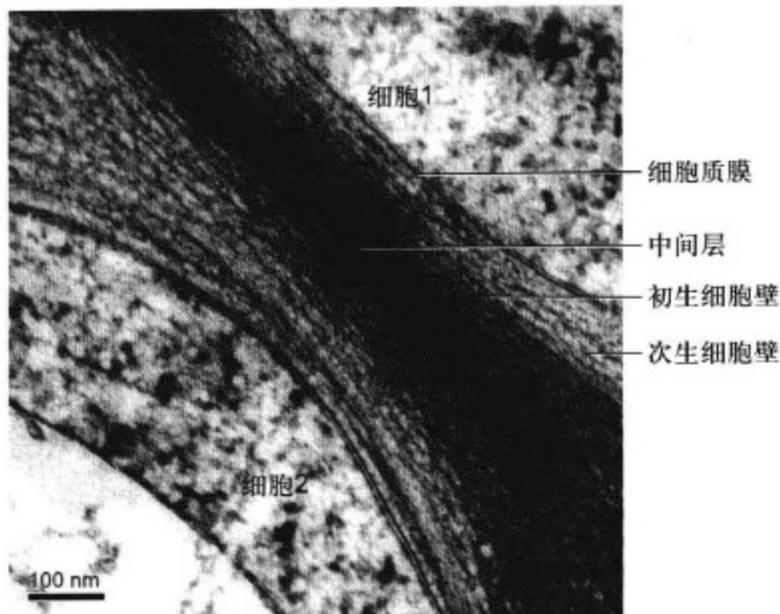


图 17-25 拟南芥初生细胞壁、次生细胞壁与中间层 (祝建博士惠赠)

当细胞停止生长后，多数细胞会分泌合成次生细胞壁。次生细胞壁与初生细胞壁相比，往往还含有木质素，但基本不含有果胶。这使得次生细胞壁非常坚硬。

细胞壁中某些寡糖成分可作为信号物质，当外界病原体入侵时，真菌或植物细胞壁中的多糖水解产生特定的寡糖组分，它们可诱导编码植物抗毒素合成酶的基因表达，产生植物抗毒素 (phytoalexin) 杀死病原体。有证据显示，细胞壁多糖中的某些寡糖片段可以作为细胞生长和发育的信号物质。在植物细胞壁中，也发现类似动物细胞的蛋白聚糖，如阿拉伯半乳聚糖蛋白 (arabinogalactan protein)，其广泛分布且含量丰富。它在植物组织发育、细胞增殖及胚胎发生中所涉及的细胞间信号转导和细胞与胞外基质的相互作用相关。

## ● 思考题 ●

1. 细胞通过哪些方式产生社会联系？细胞社会联系有何生物学意义？
2. 细胞连接有哪几种类型，各有什么功能？
3. 细胞黏着分子与胞外基质成分有哪些，分别有什么功能？

## ● 参考文献 ●

1. Boggon T J, Murray J, Chappuis-Flament S, *et al.* C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*, 2002, 296: 1 308-1 313.
2. Elias L A B, Wang D D, Kriegstein K R. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*, 2007, 448 (23): 901-908.
3. Gallant N D, Michael K E, García A J. Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, Integrin binding, and focal adhesion assembly. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 4 329-4 340.
4. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada K M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 793-805.
5. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55: 1 531-1 546.
6. Green K J, Gaudy C A. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Na Rev Mol Cell Bio*, 2000, 1:208-216.
7. Ploss A, Evans M J, Gaysinskaya V A, *et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, 2009, 457: 882-886.



年份	获奖人	奖项	获奖者研究领域
2010	Robert G. Edwards	P/M	体外受精技术和试管婴儿技术
2009	Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz, Ada E. Yonath	P/M Chemistry	端粒和端粒酶在保护染色体结构完整中的作用 对核糖体结构与功能的研究
2008	Harald zur Hausen Françoise Barré-Sinoussi, Luc Montagnier Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien	P/M Chemistry	发现乳头瘤病毒导致宫颈癌 发现人类免疫缺陷病毒 HIV 绿色荧光蛋白 (GFP) 的发现和应
2007	Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans, Oliver Smithies	P/M	发明利用胚胎干细胞在小鼠中进行特异的基因修饰 (即基因敲除技术)
2006	Andrew Z. Fire, Craig C. Mello Roger D. Kornberg	P/M Chemistry	RNA 干扰——双链 RNA 能够沉默基因表达 真核生物转录的分子基础
2005	Barry J. Marshall, J. Robin Warren	P/M	发现幽门螺旋菌 ( <i>Helicobacter pylori</i> ) 及其在胃肠道疾病中的作用
2004	Richard Axel, Linda B. Buck Aaron Ciechanover, Avram Hershko, Irwin Rose	P/M Chemistry	发现气味分子受体和嗅觉系统的组成 发现泛素介导的蛋白质降解途径
2003	Peter Agre Roderick MacKinnon	Chemistry	发现水通道 离子通道的结构和功能
2002	Sydney Brenner, H. Robert Horvitz, John E. Sulston John B. Fenn, Koichi Tanaka Kurt Wüthrich	P/M Chemistry	器官发育的遗传基础和细胞的程序化死亡 质谱法测定生物大分子 核磁共振法测定生物大分子在溶液中的结构
2001	Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt, Paul M. Nurse	P/M	发现细胞周期的关键调控因子
2000	Arvid Carlsson, Paul Greengard, Eric R. Kandel	P/M	神经系统的信号转导
1999	Günter Blobel	P/M	蛋白质固有的信号控制及其在细胞内的转移与定位
1998	Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, Ferid Murad	P/M	NO 是体内重要的信号分子
1997	Stanley B. Prusiner Jens C. Skou Paul D. Boyer, John E. Walker	P/M Chemistry	发现朊病毒 Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPase ATP 合成机制
1996	Rolf M. Zinkernagel, Peter C. Doherty	P/M	免疫系统对病毒感染细胞的识别
1995	Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard, Eric F. Wieschaus	P/M	胚胎发育的基因调控
1994	Alfred Gilman, Martin Rodbell	P/M	G 蛋白的结构与功能
1993	Richard J. Roberts, Phillip A. Sharp Kary B. Mullis Michael Smith	P/M Chemistry	断裂基因和 RNA 合成 多聚酶链反应 (PCR) 点突变 (SDM)
1992	Edmond H. Fischer, Edwin G. Krebs	P/M	磷酸化与去磷酸化对酶活性的影响
1991	Erwin Neher, Bert Sakmann	P/M	膜片夹测定膜离子流量
1989	J. Michael Bishop, Harold E. Varmus Thomas R. Cech, Sidney Altman	P/M Chemistry	导致恶性转变的胞内基因 具有催化能力的 RNA
1988	Johann Deisenhofer, Robert Huber, Hartmut Michel	Chemistry	细菌光合作用反应中心

年份	获奖人	奖项	获奖者研究领域
1987	Susumu Tonegawa	P/M	基因重排导致抗体的多样性
1986	Rita Levi-Montalcini, Tanley Cohen	P/M	神经生长因子
1985	Michael S. Brown, Joseph L. Goldstein	P/M	胆固醇代谢调节与胞吞作用的关系
1984	George Köhler, César Milstein Niels K. Jerne	P/M	单克隆抗体 抗体形成
1983	Barbara McClintock	P/M	基因组中的可动遗传因子
1982	Aaron Klug	Chemistry	核酸蛋白复合物的结构
1980	Paul Berg Walter Gilbert, Frederick Sanger Baruj Benveniste, Jean Dausset, George D. Snell	Chemistry P/M	重组 DNA 技术 DNA 测序技术 主要组织相容性复合物
1978	Werner Arber, Daniel Nathans, Hamilton Smith Peter Mitchell	P/M Chemistry	限制性内切酶技术 氧化磷酸化的化学渗透学说
1976	D. Carleton Gajdusek, Baruch S. Blumberg	P/M	蛋白粒子类疾病
1975	David Baltimore, Renato Dulbecco, Howard M. Temin	P/M	反转录酶与反转录病毒活性
1974	Albert Claude, Christian de Duve, George E. Palade	P/M	细胞内部组分的结构与功能
1972	Gerald M. Edelman, Rodney R. Porter Christian B. Anfinsen	P/M Chemistry	免疫球蛋白结构 蛋白质一级结构与四级结构的关系
1971	Earl W. Sutherland	P/M	激素作用机制及其与 cAMP 的关系
1970	Bernard Katz, Ulf S. von Euler, Julius Axelrod Luis F. Leloir	P/M Chemistry	神经冲动的扩大及传递 糖核苷在糖类合成中的作用
1969	Max Delbrück, Alfred D. Hershey, Salvador E. Luria	P/M	病毒的遗传结构
1968	H. Gobind Khorana, Marshall W. Nirenberg, Robert W. Holley	P/M	遗传密码 tRNA 的结构
1966	Peyton Rous Charles Brenton Huggins	P/M	致癌病毒 前列腺癌的激素治疗
1965	François Jacob, André M. Lwoff, Jacques L. Monod	P/M	细菌操纵子及其信使 RNA
1964	Dorothy C. Hodgkin	Chemistry	有机复合物分子的结构
1963	John C. Eccles, Alan L. Hodgkin, Andrew F. Huxley	P/M	神经膜电位的离子作用机制
1962	Francis H. C. Crick, James D. Watson, Maurice H. F. Wilkins John C. Kendrew, Max F. Perutz	P/M Chemistry	DNA 的三维结构 球蛋白的三维结构
1961	Melvin Calvin	Chemistry	光合作用中 CO <sub>2</sub> 同化作用的生化机制
1960	F. Mac Burnet, Peter B. Medawar	P/M	抗体形成过程中克隆选择理论
1959	Arthur Kornberg, Severo Ochoa	P/M	DNA 与 RNA 的合成
1958	George W. Beadle, Edward L. Tatum Joshua Lederberg Frederick Sanger	P/M Chemistry	基因决定蛋白质 遗传重组 蛋白质一级结构

P/M, Physiology or Medicine Prize (生理学或医学奖)。

## B

巴氏小体 242  
 斑马鱼 49  
 半桥粒 363  
 半纤维素 378  
 伴肌动蛋白 205  
 包被膜泡 81  
 胞间连丝 366  
 胞膜窗 67, 82  
 胞膜窗依赖的胞吞作用 80  
 胞内体 81, 119  
 胞吐作用 79, 83, 119  
 胞吞作用 79  
 胞饮作用 79  
 胞质动力蛋白 213  
 胞质分裂 281, 289  
 胞质分裂环 200  
 胞质环 230  
 胞质溶胶 113  
 被动扩散 231  
 被动运输 71  
 必需基因 235  
 鞭毛 217  
 鞭毛内运输 219  
 表观基因组 252  
 表观遗传 251  
 表观遗传标记 252  
 表观遗传记忆 252  
 病毒 23  
 波形蛋白 223  
 捕鱼笼 230

## C

层粘连蛋白 377  
 差速离心 39  
 长散在元件 235  
 常染色质 241

超薄切片技术 35  
 超螺旋管 240  
 巢蛋白 222  
 成对规则基因 339  
 成核蛋白 197  
 成核反应 195  
 成体干细胞 322, 323  
 程序性细胞死亡 341  
 重编程 321  
 重复基因 235  
 初级卵母细胞 333  
 初生细胞壁 380  
 穿孔蛋白 350  
 传代细胞 42  
 次级精母细胞 333  
 次级卵母细胞 333  
 次生细胞壁 379  
 粗肌丝 201

## D

大肠杆菌 49  
 大型胞饮作用 80  
 单分子技术 45  
 单克隆抗体技术 44  
 单位膜模型 54  
 单位线 240  
 胆固醇 57, 62, 66  
 蛋白激酶 A 186  
 蛋白激酶 B 179  
 蛋白聚糖 129, 375  
 蛋白酶体 115  
 蛋白质去磷酸化 161  
 蛋白质分选 138  
 蛋白质磷酸化 115, 161  
 蛋白质模式结合域 161  
 蛋白质芯片 52  
 蛋白质组 51  
 蛋白质组学技术 51

灯刷染色体 257  
 低温电子显微镜技术 38, 264  
 第二信使 160, 161, 167, 169  
 电化学梯度 70  
 电镜三维重构技术 37  
 电突触 365  
 电压门通道 70  
 电子传递复合物 93  
 电子传递链 92, 154  
 电子显微镜 34  
 凋亡复合体 349  
 凋亡小体 342  
 顶体反应 333  
 动力蛋白 201  
 动力蛋白臂 217  
 动力蛋白激活蛋白 216  
 动力学不稳定性 208  
 动粒 253, 285  
 动粒微管 221  
 动态不稳定性 208  
 端粒 254, 357  
 端粒 DNA 序列 255  
 端粒酶 357  
 短散在元件 235  
 多核糖体 154, 266  
 多能干细胞 323  
 多线染色体 257  
 多药抗性 77  
 躲避响应 95

## E

二联管 207  
 二联体微管 218  
 二硫键异构酶 121  
 二酰甘油 160

## F

发动蛋白 81

发育 327  
 反转录病毒 28  
 泛素化 115, 116  
 泛素化依赖途径 306  
 放大效应 164  
 放射辐 218  
 放射自显影技术 48  
 非必需基因 235  
 非编码 RNA 252  
 非活性染色质 242  
 非网格蛋白 / 胞膜窗依赖的胞吞作用 80  
 非细胞系统 139  
 非组蛋白 237  
 分子伴侣 142  
 分子开关 160  
 福尔根反应 7, 40  
 负染色技术 36  
 复制衰老 356

## G

钙调蛋白 174  
 钙调蛋白激酶 174  
 钙火花 173  
 钙黏蛋白 368  
 干细胞 251, 321, 322  
 甘油磷脂 56  
 高度重复 DNA 序列 236  
 高尔基体 125, 126, 127, 130, 145  
 高分辨率场发射扫描电镜技术 229  
 革兰氏阳性菌 14  
 革兰氏阴性菌 14  
 隔离子 248  
 共翻译转运途径 141  
 共进化的 107  
 古核细胞 12, 17  
 古细菌 17

- 管家基因 319  
 光合磷酸化 102  
 光驱动泵 73  
 光系统 154  
 光学显微镜 30  
 鬼笔环肽 196  
 果胶 379  
 果蝇 49  
 过氧化物酶体 135, 136, 145
- H**
- 合子 333  
 核被膜 227, 228  
 核定位信号 182, 232  
 核定位序列 232  
 核基质 260  
 核壳体 24  
 核孔蛋白 230  
 核孔复合体 154, 228, 229  
 核酶 266  
 核膜 154  
 核仁 154, 227, 258  
 核仁组织区 254  
 核输出信号 233  
 核糖体 117, 118, 262  
 核体 227, 260  
 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 99  
 核纤层 154, 225, 227  
 核纤层蛋白 222, 233  
 核纤层蛋白 B 受体 228  
 核小体 238  
 核型 256  
 核型模式图 256  
 核质冲突 107  
 核质蛋白 232  
 核质互作 107  
 核质环 230  
 红细胞 65  
 后翻译转运 140  
 后期 287  
 后期促进因子复合体 288, 306  
 后生生物 327  
 滑动模型 205  
 化学突触 156, 365, 367  
 坏死 341  
 恢复技术 63  
 活性染色质 242
- J**
- 肌动蛋白 194  
 肌动蛋白单体 196
- 肌动蛋白丝 194  
 肌钙蛋白 203  
 肌节 203  
 肌球蛋白 201  
 肌球蛋白纤维 205  
 肌肉收缩 205  
 肌纤维 203  
 肌营养不良蛋白 205  
 肌原纤维 203  
 积聚响应 95  
 基粒 99  
 基粒类囊体 99  
 基膜 377  
 基体 211  
 基因敲除 51  
 基因重排 327  
 基因转录 235  
 基因组 235  
 基因组稳定性 244  
 基因组印记 250  
 基质类囊体 99  
 基质小管 96  
 激光扫描共焦显微镜 33  
 激活结构域 249  
 极体 333  
 极微管 220  
 加帽蛋白 197  
 甲基化 115, 243  
 间隙连接 363  
 兼性异染色质 241  
 减数分裂 276  
 简单扩散 70  
 交联蛋白 198, 201  
 胶原 372  
 胶原原纤维 373  
 胶质丝酸性蛋白 222  
 角蛋白 223  
 窖蛋白 82  
 酵母 49  
 酵母的复制生命周期 358  
 酵母双杂交系统 46  
 接触依赖性通讯 157, 158  
 结蛋白 222  
 解毒作用 122  
 紧密连接 361  
 精原细胞 333  
 决定 326  
 决定子 324
- K**
- 颗粒酶介导的细胞凋亡 350  
 可调节性分泌 128
- 孔蛋白 69  
 跨膜转运 141  
 跨细胞转运 82  
 快速冷冻深度蚀刻电镜技术 204
- L**
- 蓝藻 13, 16  
 类病毒 24  
 类囊体 98, 144  
 类囊体膜 144  
 冷冻蚀刻技术 36  
 离子通道 69  
 离子通道偶联受体 159  
 连接蛋白 218  
 联会 294  
 联会复合体 294  
 亮氨酸拉链 250  
 裂隙基因 339  
 临界浓度 195  
 磷酸化 133, 243  
 磷脂交换蛋白 119  
 磷脂酰肌醇 3 激酶 179  
 磷脂转位蛋白 119  
 流动镶嵌模型 54  
 流式细胞术 41  
 硫酸化 130  
 卵原细胞 333  
 螺旋-转角-螺旋 250
- M**
- 马达蛋白 201  
 马达结构域 213  
 锚定连接 362  
 酶联受体 159  
 门控转运 141  
 密度梯度离心 39  
 免疫标记 62  
 免疫电镜技术 41  
 免疫球蛋白超家族 370  
 免疫荧光技术 40  
 膜电位 78  
 膜骨架 65  
 膜受体 82  
 膜泡运输 141, 145, 146  
 末期 289  
 母中心粒 219  
 木质素 379
- N**
- 内分泌 156  
 内共生起源 106  
 内膜系统 112, 117
- 内胚层 333  
 内吞作用 191  
 内细胞团 323, 333  
 内在膜蛋白 59  
 内质网 117, 118, 145  
 内质网应激 122  
 囊膜 24  
 囊胚 333  
 拟南芥 50  
 黏着斑 363  
 黏着斑激酶 372  
 黏着带 363  
 鸟苷酸交换因子 160  
 凝溶胶蛋白 197  
 纽蛋白 203  
 诺考达唑 209
- P**
- 袪环结构域 240  
 旁侧抑制 336  
 旁分泌 156  
 胚层 333  
 胚胎干细胞 322, 323  
 胚胎生殖嵴干细胞 323  
 胚胎诱导 325  
 胚胎种质细胞 331  
 配体门通道 70  
 皮层反应 333  
 片状伪足 199  
 葡萄糖转运蛋白 71
- Q**
- 起始 caspases 346  
 前胶原 373  
 前期 281  
 前纤维蛋白 197  
 前中期 283  
 羟基化 122  
 桥粒 363  
 鞘磷脂 66  
 亲核蛋白 232  
 秋水仙素 209  
 驱动蛋白 118, 201, 213  
 驱动蛋白超家族 213  
 去分化 321  
 去垢剂 61  
 去磷酸化 115  
 去乙酰化 240
- R**
- 染色单体 253  
 染色体 253

- 染色质 227, 234  
 染色质复制 244  
 染色质修复 245  
 染色质重塑 252  
 染色中心 241  
 热休克蛋白 116  
 溶酶体 127, 131, 132, 133, 134, 135  
 朊病毒 24
- S**
- 三联管 207  
 三联体微管 209, 218  
 扫描电镜 38  
 扫描隧道显微镜 38  
 色谱分离技术 52  
 上皮-间质转型 369  
 上游激活序列 246  
 伸展蛋白 379  
 神经板 334  
 神经沟 334  
 神经管 334  
 神经丝蛋白 222  
 生物膜 2  
 生物膜的不对称性 63  
 生物信息学 52  
 生殖嵴 328, 329, 330, 331, 332  
 生殖细胞 327  
 视黄酸 331  
 受体 158  
 受体介导的胞吞作用 81  
 受体酪氨酸激酶 176  
 受体脱敏 191  
 受体下调 161, 191  
 衰老 341  
 衰老相关的 $\beta$ -半乳糖苷酶 356  
 双向凝胶电泳 52  
 水孔蛋白 69  
 丝束蛋白绒毛蛋白 198  
 丝状伪足 199  
 死亡诱导信号复合物 348  
 随体 254
- T**
- 踏车行为 196, 207  
 弹性蛋白 374  
 糖胺聚糖 375  
 糖基化 115, 120, 128, 129  
 糖脂 66  
 特异转录因子 249  
 体节极性基因 339  
 调整型发育 339
- 通道蛋白 68  
 通用转录因子 249  
 同亲型结合 368  
 同性活化 346  
 同源重 235  
 透明质酸 375  
 吞噬体 79  
 吞噬作用 79
- W**
- 外胚层 333  
 外在膜蛋白 59  
 外周蛋白 222  
 外周膜蛋白 59  
 网格蛋白 81  
 网格蛋白/接头蛋白包被膜泡 150, 151  
 网格蛋白依赖的胞吞作用 80  
 网络化 164  
 微干涉显微镜 32  
 微管 193, 206, 284  
 微管成束蛋白 222  
 微管蛋白 206  
 微管结合蛋白 211  
 微管结合结构域 212  
 微管组织中心 209  
 微粒体 117  
 微绒毛 200, 201  
 微丝 193  
 微丝束 198  
 微卫星 DNA 236  
 伪足 80, 199  
 卫星 DNA 236  
 位置花斑效应 248  
 位置效应 325  
 物理感受器 220
- X**
- 细胞壁 14, 23, 378  
 细胞程序性死亡 133  
 细胞凋亡 341, 342, 344  
 细胞凋亡的内源途径 349  
 细胞分化 3, 318  
 细胞工程 4, 43  
 细胞骨架 3, 193  
 细胞核 3, 227  
 细胞化学 7  
 细胞坏死 352  
 细胞连接 361  
 细胞内区室化 112, 117  
 细胞培养 42  
 细胞迁移 199
- 细胞全能性 321  
 细胞融合 44, 62  
 细胞色素 c 349  
 细胞生理学 7  
 细胞生物学 1  
 细胞识别与黏着 367  
 细胞衰老 4, 356  
 细胞死亡 4, 341  
 细胞松弛素 196  
 细胞外被 377  
 细胞外基质 372  
 细胞信号转导 2  
 细胞学说 5  
 细胞遗传学 7  
 细胞因子 181, 183  
 细胞因子受体 182  
 细胞增殖 3  
 细胞质动力蛋白 216  
 细胞质骨架 114  
 细胞质基质 113, 114, 154  
 细胞质膜 54  
 细胞周期 273  
 细胞周期依赖的蛋白激酶复合物 276  
 细胞自噬 353  
 细肌丝 204  
 细菌 13, 14, 15, 16  
 细丝蛋白 198  
 纤连蛋白 376  
 纤毛 217  
 纤维素 378  
 纤维状肌动蛋白 194  
 酰基化 115, 121  
 衔接分子依赖性结合 368  
 显微操作技术 45  
 线虫 49  
 线粒体 85, 142  
 线粒体病 94  
 线粒体分裂 87  
 线粒体分裂环 88  
 线粒体分裂装置 88  
 线粒体基质 142  
 线粒体嵴 90  
 线粒体膜间隙 144  
 线粒体融合 86  
 线粒体融合素 86  
 线粒体融合装置 88  
 腺苷酸环化酶 169  
 相差显微镜 31  
 镶嵌型发育 339  
 小鼠 50  
 小卫星 DNA 236
- 效应 caspases 346  
 协同转运蛋白 73  
 协助扩散 71  
 锌指 250  
 信号分子 158, 165, 185  
 信号假说 138  
 信号识别颗粒 139  
 信号肽 138, 139  
 信号通路 161, 170, 173, 179, 183, 187  
 信号网络系统 190  
 信号转导 159  
 星体微管 220  
 性别决定 330  
 胸腺素 $\beta_4$  196  
 序列特异性 DNA 结合蛋白 237  
 选择素 370  
 血影 65
- Y**
- 氧化磷酸化 92  
 氧化损伤理论 357  
 叶绿体 95, 144, 145  
 叶绿体定位 95  
 叶绿体分化 96  
 叶绿体分裂 97  
 叶绿体分裂环 98  
 叶绿体分裂装置 97  
 叶绿体基质 144  
 衣壳 24  
 乙酰化 243  
 异亲型结合 368  
 异染色质 241  
 异形胞 17  
 异性活化 346  
 印记 247  
 应力激活通道 70  
 应力纤维 199  
 荧光共振能量转移 47  
 荧光漂白恢复技术 45  
 荧光显微镜 32  
 有丝分裂 276, 281  
 诱导多能干细胞 322  
 原肠胚 333  
 原代细胞 42  
 原钙黏蛋白 368  
 原核生物 12  
 原核细胞 12, 13, 21, 22  
 原肌球蛋白 200, 203  
 原肌球蛋白调节蛋白 197  
 原基 327  
 原胶原 373

- 原生物 327  
原位杂交 41
- Z**
- 载体蛋白 68  
再生 321  
再生医学 3, 323  
早胞内体 81  
早熟染色体凝集 299  
增强子 249  
真核细胞 12, 21, 22  
整合膜蛋白 59  
整合作用 164  
整联蛋白 188, 371  
支原体 13  
脂筏 66  
脂筏模型 55  
脂锚定膜蛋白 59  
脂质体 58  
质谱 52  
中间层 379  
中间丝 193, 221  
中膜体 15  
中胚层 334  
中期 286  
中心粒 209, 283  
中心粒外周物质 209  
中心体 209, 284, 285  
中央鞘 218  
终末分化 322  
肿瘤细胞 251  
肿瘤抑制基因 313  
周期蛋白 302  
周期蛋白依赖性蛋白激酶 303  
轴丝动力蛋白 216  
轴丝微管 207  
主导基因 320  
主动运输 73, 231  
转分化 321  
转化生长因子  $\beta$  180  
转录偶联的修复 235  
转录抑制因子 249  
转录因子 249  
转运蛋白 77  
着丝粒 253, 285  
着丝粒 DNA 序列 255  
紫杉醇 209
- 自分泌 156  
自噬体 353  
自噬性细胞死亡 341, 353  
自主复制 DNA 序列 255  
组成型分泌 128  
组成型异染色质 241  
组蛋白 237  
组蛋白八聚体 239  
组蛋白密码子 252  
组蛋白去乙酰化酶 246  
组蛋白乙酰化酶 246  
组蛋白乙酰转移酶 246  
组蛋白异型体 252  
组合调控 320  
组织特异性基因 319  
左右体轴 220  
左右体轴形成障碍 220
- ABC 超家族 77  
ABO 血型抗原 64  
Apaf-1 349  
AQP1 72  
ARF 149, 152  
Arp2/3 复合物 197  
Atg 354  
ATP 合酶 90  
ATP 驱动泵 73  
A 位点 264  
A 型 DNA 236  
Bcl-2 349  
BMP 330, 331, 332, 337, 338  
B 型 DNA 236  
 $Ca^{2+}$  泵 75  
 $Ca^{2+}$  通道 173  
CAF-1 242  
cAMP 167, 171  
CapZ 197  
caspases 345  
caspases 非依赖性的细胞凋亡 350  
caspases 依赖性的细胞凋亡 345  
CDK 276  
cGMP 165, 168  
COP I 包被膜泡 149  
COP II 包被膜泡 148  
Cyp26b1 332, 333  
C- 驱动蛋白 214  
Delta-Notch 信号途径 336  
DNA 复制 235  
DNA 甲基化 242, 250  
DNA 结合结构域 249  
DNA 修复 235  
dynamamin 类蛋白 87  
ERS 122, 124, 125  
E- 钙黏蛋白 368  
E 位点 265  
FGF 335  
F 型质子泵 76  
 $G_1$  期 274, 275  
 $G_2$  期 274, 276  
gp210 230  
G 蛋白 166, 171  
G 蛋白偶联受体 159, 166, 169, 170, 171, 172  
 $H^+$  泵 76  
H2A · H2B 异二聚体 239  
H3 · H4 四聚体 239  
Hayflick 界限 356  
Hedgehog 185, 336  
HMG 蛋白 243, 247  
IFT 颗粒 219  
int 183  
IP3 173, 189  
JAK-STAT 182  
M6P 133, 134, 135  
MAP2 212  
MAPK 179, 183  
MPF 299  
M 期 274  
M-驱动蛋白 214  
 $Na^+-K^+$  泵 74  
NF- $\kappa$ B 186, 187  
Notch 187  
Notch 受体 187  
N-钙黏蛋白 368  
N-连接的糖基化 120, 121, 129  
N-驱动蛋白 214  
O-连接的糖基化 120, 129  
 $p34^{cdc2}$  301  
 $p53$  313, 357  
 $p53$  依赖性细胞凋亡过程 352  
p62 230  
PGC 330, 331, 332  
PI3K 179  
PI3K-PKB 180  
PKA 191  
PKC 175, 191  
P- 钙黏蛋白 368  
P 位点 264  
RA 331, 332, 333, 335, 337, 338  
Rab 152  
Ran GTP 酶 229  
Ran-GDP 233  
Ran-GTP 233  
Ras 蛋白 177, 178  
RGD 序列 371  
RNA 编辑 107  
RNA 干扰 50  
RNA 世界 270  
RTK 176, 177, 178, 182, 189  
Sar1 147, 152  
SDS 61  
SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 65  
SH2 结构域 182, 188  
Shh 337, 338  
Smad 181  
SMAD 330  
somatic cell 327  
Sonic hedgehog (Shh) 336  
Sox9 329  
SRY 327, 329  
S 期 274, 275  
tau 212  
TDF 328  
TGF- $\beta$  180, 181  
TGF- $\beta$ -Smad 181, 183  
Triton X-100 61  
V 型质子泵 76  
Wnt 183, 336  
Wnt-1 183  
Wnt- $\beta$ -catenin 185  
X 染色体失活 247  
Z 盘 203  
Z 型 DNA 236  
 $\alpha$ -辅肌动蛋白 200, 203  
 $\beta$ -catenin 185, 334  
II 型肌球蛋白 202

[General Information]

info:本信息由Onlyown终结版生成

图书名:细胞生物学

SS:13030429

页码:386

本书总页数:397

BookUrl:<http://book.szdnnet.org.cn/views/specific/2929/bookDetail.jsp?dxNumber=000008332619&d=87805DAFAF95D2BDEDD467EDA94FB5DD&fenlei=1507#ctop>

Str:/img45/7C16B0B8A5B940EC311EFADA8165997A6FF861CE1FB646199AC9DC6C4B839F930AD72B7BFCC5AD9D8FDC89BC2E39D0D014EC25443925CF668160F0F0CD784BA3E314EBC2E7BFFD4897A5FC125B5AD56E0EF12206A059DD19560FF8898ED55B3EFAAA6CE313C7F44064ABB3ABEA76780410B1/b13/

封面  
书名  
版权  
前言  
目录

## 第一章 绪论

### 第一节 细胞生物学研究的内容与现状

- 一、现代生命科学中的一门重要的基础前沿学科
- 二、细胞生物学的主要研究内容

### 第二节 细胞学与细胞生物学发展简史

- 一、细胞的发现
- 二、细胞学说的建立及其意义
- 三、细胞学的经典时期
- 四、实验细胞学与细胞学的分支及其发展
- 五、细胞生物学学科的形成与发展

思考题

参考文献

## 第二章 细胞的统一性与多样性

### 第一节 细胞的基本特征

- 一、细胞是生命活动的基本单位
- 二、细胞的基本共性

### 第二节 原核细胞与古核细胞

- 一、原核细胞
- 二、最小最简单的细胞——支原体
- 三、原核细胞的两个代表类群——细菌和蓝藻
- 四、古核细胞（古细菌）

### 第三节 真核细胞

- 一、真核细胞的基本结构体系
- 二、细胞的大小及其影响因素
- 三、原核细胞与真核细胞的比较
- 四、植物细胞与动物细胞的比较

### 第四节 非细胞形态的生命体——病毒

- 一、病毒的基本知识
- 二、病毒在细胞内增殖
- 三、病毒与细胞在起源与进化中的关系

思考题

参考文献

## 第三章 细胞生物学研究方法

### 第一节 细胞形态结构的观察方法

- 一、光学显微镜
- 二、电子显微镜
- 三、扫描隧道显微镜

### 第二节 细胞及其组分的分析方法

- 一、用超离心技术分离细胞组分
- 二、细胞成分的细胞化学显示方法
- 三、特异蛋白抗原的定位与定性
- 四、细胞内特异核酸的定位与定性
- 五、定量细胞化学分析与细胞分选技术

### 第三节 细胞培养与细胞工程

- 一、细胞培养
- 二、细胞工程
- 第四节 细胞及生物大分子的动态变化
  - 一、荧光漂白恢复技术
  - 二、单分子技术与细胞生命活动的研究
  - 三、酵母双杂交技术
  - 四、荧光共振能量转移技术
  - 五、放射自显影技术
- 第五节 模式生物与功能基因组的研究
  - 一、细胞生物学研究常用的模式生物
  - 二、突变体制备技术
  - 三、蛋白质组学技术

思考题

参考文献

- 第四章 细胞质膜
  - 第一节 细胞质膜的结构模型与基本成分
    - 一、细胞质膜的结构模型
    - 二、膜脂
    - 三、膜蛋白
  - 第二节 细胞质膜的基本特征与功能
    - 一、膜的流动性
    - 二、膜的不对称性
    - 三、细胞质膜相关的膜骨架
    - 四、细胞质膜的基本功能

思考题

参考文献

- 第五章 物质的跨膜运输
  - 第一节 膜转运蛋白与小分子物质的跨膜运输
    - 一、脂双层的不透性和膜转运蛋白
    - 二、小分子物质的跨膜运输类型
  - 第二节 A T P 驱动泵与主动运输
    - 一、P 型泵
    - 二、V 型质子泵和 F 型质子泵
    - 三、A B C 超家族
    - 四、离子跨膜转运与膜电位
  - 第三节 胞吞作用与胞吐作用
    - 一、胞吞作用的类型
    - 二、胞吞作用与细胞信号转导
    - 三、胞吐作用

思考题

参考文献

- 第六章 线粒体和叶绿体
  - 第一节 线粒体与氧化磷酸化
    - 一、线粒体的基本形态及动态特征
    - 二、线粒体的超微结构
    - 三、氧化磷酸化
    - 四、线粒体与疾病
  - 第二节 叶绿体与光合作用
    - 一、叶绿体的基本形态及动态特征

二、叶绿体的超微结构

三、光合作用

第三节 线粒体和叶绿体的半自主性及其起源

一、线粒体和叶绿体的半自主性

二、线粒体和叶绿体的起源

思考题

参考文献

图片版权说明

第七章 细胞质基质与内膜系统

第一节 细胞质基质及其功能

一、细胞质基质的含义

二、细胞质基质的功能

第二节 细胞内膜系统及其功能

一、内质网

二、高尔基体

三、溶酶体

四、过氧化物酶体

思考题

参考文献

第八章 蛋白质分选与膜泡运输

第一节 细胞内蛋白质的分选

一、信号假说与蛋白质分选信号

二、蛋白质分选转运的基本途径与类型

三、蛋白质向线粒体、叶绿体和过氧化物酶体的分选

第二节 细胞内膜泡运输

一、膜泡运输概观

二、COP 包被膜泡的装配与运输

三、COP 包被膜泡的装配与运输

四、网格蛋白 / 接头蛋白包被膜泡的装配与运输

五、转运膜泡与靶膜的锚定和融合

六、细胞结构体系的组装

思考题

参考文献

第九章 细胞信号转导

第一节 细胞信号转导概述

一、细胞通讯

二、信号分子与受体

三、信号转导系统及其特性

第二节 细胞内受体介导的信号传递

一、细胞内核受体及其对基因表达的调节

二、NO作为气体信号分子进入靶细胞直接与酶结合

第三节 G蛋白偶联受体介导的信号转导

一、G蛋白偶联受体的结构与激活

二、G蛋白偶联受体所介导的细胞信号通路

第四节 酶联受体介导的信号转导

一、受体酪氨酸激酶及R T K - R a s 蛋白信号通路

二、P I 3 K - P K B ( A k t ) 信号通路

三、T G F - 受体及其T G F - - S m a d 信号通路

四、细胞质因子受体与J A K - S T A T 信号通路

## 第五节 其他细胞表面受体介导的信号通路

- 一、Wnt - catenin 信号通路
- 二、Hedgehog 受体介导的信号通路
- 三、NF- $\kappa$ B 信号通路
- 四、Notch 信号通路
- 五、细胞表面整联蛋白介导的信号转导

## 第六节 细胞信号转导的整合与控制

- 一、细胞的应答反应特征
- 二、蛋白激酶的网络整合信息
- 三、信号的控制：受体的脱敏与下调

## 思考题

## 参考文献

## 第十章 细胞骨架

### 第一节 微丝与细胞运动

- 一、微丝的组成及其组装
- 二、微丝网络结构的调节与细胞运动
- 三、肌球蛋白：依赖于微丝的分子马达
- 四、肌细胞的收缩运动

### 第二节 微管及其功能

- 一、微管的结构组成与极性
- 二、微管的组装和去组装
- 三、微管组织中心
- 四、微管的动力学性质
- 五、微管结合蛋白对微管网络结构的调节
- 六、微管对细胞结构的组织作用
- 七、细胞内依赖于微管的物质运输
- 八、纤毛和鞭毛的结构与功能
- 九、纺锤体和染色体运动

### 第三节 中间丝

- 一、中间丝的主要类型和组成成分
- 二、中间丝的组装与表达
- 三、中间丝与其他细胞结构的联系

## 思考题

## 参考文献

## 第十一章 细胞核与染色质

### 第一节 核被膜

- 一、核膜
- 二、核孔复合体
- 三、核纤层

### 第二节 染色质

- 一、染色质 DNA
- 二、染色质蛋白
- 三、核小体
- 四、染色质组装
- 五、染色质类型

### 第三节 染色质的复制与表达

- 一、染色质的复制与修复
- 二、染色质的激活与失活
- 三、染色质与基因表达调控

#### 四、染色质与表观遗传

##### 第四节 染色体

- 一、染色体的形态结构
- 二、染色体的功能元件
- 三、染色体带型
- 四、特殊染色体

##### 第五节 核仁与核体

- 一、核仁的结构
- 二、核仁的功能
- 三、核仁的动态周期变化
- 四、核体

##### 第六节 核基质

##### 思考题

##### 参考文献

#### 第十二章 核糖体

##### 第一节 核糖体的类型与结构

- 一、核糖体的基本类型与化学组成
- 二、核糖体的结构
- 三、核糖体蛋白质与 rRNA 的功能

##### 第二节 多核糖体与蛋白质的合成

- 一、多核糖体
- 二、蛋白质的合成
- 三、核糖体与RNA世界

##### 思考题

##### 参考文献

#### 第十三章 细胞周期与细胞分裂

##### 第一节 细胞周期

- 一、细胞周期概述
- 二、细胞周期中各不同时相及其主要事件
- 三、细胞周期同步化
- 四、特殊的细胞周期

##### 第二节 细胞分裂

- 一、有丝分裂
- 二、减数分裂

##### 思考题

##### 参考文献

#### 第十四章 细胞增殖调控与癌细胞

##### 第一节 细胞增殖调控

- 一、MPF的发现及其作用
- 二、p34cdc2激酶的发现及其与MPF的关系
- 三、周期蛋白
- 四、CDK和CDK抑制因子
- 五、细胞周期运转调控
- 六、其他因素在细胞周期调控中的作用

##### 第二节 癌细胞

- 一、癌细胞的基本特征
- 二、癌基因与抑癌基因
- 三、肿瘤的发生是基因突变逐渐积累的结果
- 四、肿瘤干细胞

思考题

参考文献

## 第十五章 细胞分化与胚胎发育

### 第一节 细胞分化

- 一、细胞分化的基本概念
- 二、细胞的全能性与多能干细胞
- 三、影响细胞分化的因素

### 第二节 胚胎发育中的细胞分化

- 一、生殖细胞的分化
- 二、早期胚胎发育过程中的细胞分化
- 三、果蝇胚胎早期发育中的细胞分化

思考题

参考文献

## 第十六章 细胞死亡与细胞衰老

### 第一节 细胞死亡

- 一、细胞凋亡
- 二、细胞坏死
- 三、自噬性细胞死亡
- 四、植物细胞与酵母细胞的程序性死亡

### 第二节 细胞衰老

- 一、细胞衰老的概念及特征
- 二、细胞衰老的分子机制
- 三、细胞衰老与个体衰老的关系

思考题

参考文献

## 第十七章 细胞的社会联系

### 第一节 细胞连接

- 一、封闭连接
- 二、锚定连接
- 三、通讯连接

### 第二节 细胞黏着及其分子基础

- 一、钙黏蛋白
- 二、选择素
- 三、免疫球蛋白超家族
- 四、整联蛋白

### 第三节 细胞外基质

- 一、胶原
- 二、弹性蛋白
- 三、糖胺聚糖和蛋白聚糖
- 四、纤连蛋白和层粘连蛋白
- 五、基膜与细胞外被
- 六、植物细胞壁

思考题

参考文献

附录 细胞生物学相关领域诺贝尔奖获奖情况

索引