

讲座

生物膜的动态结构和功能

——从二维到三维

二、细胞内吞作用及膜融合和膜分裂

1. 细胞内吞作用

内吞作用 (Endocytosis), 特别是受体中介的内吞作用是一种很重要的细胞学过程。细胞由此从体液中摄入低密度脂蛋白 (LDL)、铁传递蛋白等营养物质; 同时也对诸如胰岛素、表皮生长因子 (EGF)、趋化蛋白、免疫球蛋白等产生细胞学反应; 体液中的无唾液酸糖蛋白 (ASGP)、甘露糖-6-磷酸糖蛋白等靠内吞作用很快被清除; 病毒 (流感病毒、Semliki 森林病毒、水泡性口膜炎病毒等) 及毒素 (白喉毒素等) 也是靠内吞作用产生生物学效应。

受体中介的内吞作用大致可区分如下几个阶段: (1) 细胞膜表面存在一些特殊的区域——被膜穴。LDL 受体、无唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 等未与相应的配体结合时亦都聚集在被膜穴处; EGF 受体则在未结合配体时均匀分布在膜上, 当和 EGF 结合后, 复合物在膜上扩散运动, 不久也都聚集在被膜穴处。结合配体的被膜穴内凹, 从质膜上断裂形成被膜囊泡 (Coated Vesicles)。冰冻断裂电镜研究表明, 被膜穴处的膜内粒子比其余质膜处多, 且这些粒子的直径也较非被膜穴处的大 20%。现已确认这是一些称为包涵素的独特蛋白质。包涵素分子以三聚体方式在被膜穴的内表面彼此结合。三聚体由三条重链 (180kd) 及三条轻链 (35kd) 组成, 在被膜穴处还可能有一些辅助蛋白。图 1 是被膜囊泡的模式图^[1], 囊泡表面的包涵素分子结合成笼状结构, 它由 12 个五角体和 8 个六角体组成。(2) 在细胞内, 被膜囊泡很快 (约数分钟) 脱去被膜, 形成表面光滑的

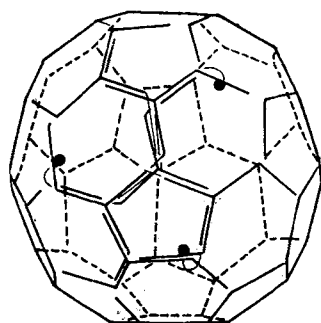


图 1 被膜囊泡的被膜结构

内含体 (Endosome)。被膜脱除的机制还不清楚, 可能受“脱被膜 ATPase”的中介^[2]。(3) 内含体很快酸化, 即其内环境的 pH 从 7 降到 5 左右。这是内含体膜上 H^+ -ATPase 作用的缘故, 这些质子泵利用水解 ATP 的能量将细胞溶质中的 H^+ 泵入内含体内。内含体的酸化是内吞作用中极为重要的一个环节。其作用之一是引起配体和受体结合的解离。如 ASGP-ASGPR 结合与 pH 依存关系的实验表明, 若将 pH 7 时的结合量定为 100%, 则 pH 5 时约 80% 的 ASGP-ASGPR 被解离。据推测, 解离过程可能是酸性化引起受体构象变化所致。若配体是被膜病毒 (Enveloped Viruses), 则酸性化引起病毒被膜和内含体膜的融合, 导致病毒基因组进入细胞溶质 (见继篇)。(4) 内含体中, 配体和膜上受体进一步分离使二者分别集中于两侧, 随之发生膜分裂, 即形成分别带受体及配体的囊泡。该过程的机制目前尚不清楚。(5) 带配体的囊泡再和初级溶酶体融合成次级溶酶体, 配体被酶水解, 如 LDL 降解后从中释放出

胆固醇以供细胞的需要。而带受体的囊泡最后和质膜融合,受体被重新装配入质膜、在膜上扩散、复又进入被膜穴、再次进行上述循环,这叫受体再循环(Receptor Recycling)。这种再循环的速率很快,可用同位素标记实验估算。如,大鼠肝细胞表面约结合 250,000 个 ASGP 分子

(饱和状态),而每个细胞 1 小时内在循环的配体数约 6,000,000 个,因而每个受体分子约 2.5 分钟循环一次。每个受体分子能再循环约几百次。可以想像若受体分子只被使用一次,则效率上太不经济。以上诸阶段的关系参见图 2。

2. 膜融合和分裂

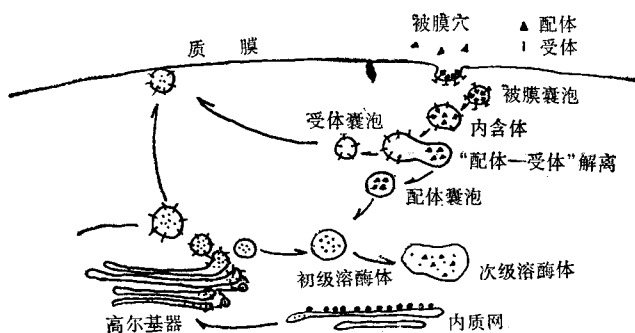


图 2 细胞内吞作用及分选

细胞内物质的运输、加工、代谢等过程中,膜的融合和分裂是经常发生的。以内吞作用为例,被膜穴变为被膜囊泡就是一个膜融合过程,此时被膜穴颈部的邻近双分子层质膜融合,致使封闭的囊泡从质膜上断裂下来。若配体是被膜病毒,则内含体酸性化后发生病毒被膜和内含体膜的融合。受体和配体在内含体内被解离后,膜发生分裂,形成带受体的囊泡和带配体的囊泡。配体在溶酶体中被酶水解也首先使带配体的囊泡和初级溶酶体融合。最后,受体再循环的一个环节亦是由于受体囊泡和质膜的融合。

粗糙型内质网膜上新蛋白质分子(分泌蛋白、膜蛋白)合成后是如何定向运输到不同的靶处呢?这是个相当复杂的问题,但在整个过程中经常发生膜的融合和膜的分裂。首先,内质网膜出芽(Budding)到形成运输囊泡就是一个膜分裂过程。进入高尔基器后,从顺(Cis)面依次通过各个高尔基器小池完成各种修饰、加工,最后从反(Trans)面输出。最近美国学者 Rothman 等^[3]的实验表明这是一连串的膜融合、膜分裂的过程:来自内质网膜的运输囊泡和高尔基器的顺面融合→高尔基器一个小池的边缘

膨大部位囊泡化、膜分裂、释放出囊泡→该囊泡运输过程中再和下一个高尔基小池融合→融合后的高尔基器小池膜再出芽、膜分裂、释放出囊泡,如此重复,直至从高尔基器的反面释放出囊泡。最后这些包入或嵌入经过加工的蛋白质的囊泡若和质膜融合,则内包的分泌蛋白分泌出细胞外(如胰凝乳蛋白酶、免疫球蛋白等),若是嵌入囊泡膜的蛋白质则变为质膜上的膜蛋白。因此,无论是细胞外营养物质、病毒等的内吞过程或细胞向外分泌物质的过程,都包括一连串的膜融合和膜分裂。

为了搞清膜融合的过程及其机制,必须建立相应的测量法。目前,主要有二种测定膜融合的方法。一种是基于内容物相混的方法。例如, Papahadjopoulos 等^[4]采用的“Tb-DPA(吡啶二羧酸)”方法。当 Tb^{3+} 和 DPA 相互作用时,形成一种能发荧光的 $Tb(DPA)_3^{3-}$ 复合物。荧光产生于螯合物中配体向金属离子的内部能量转换。用近于 DPA 吸收峰的 276nm 波长激发,545nm 处测量 Tb 的荧光。Tb 本身的荧光强度很低,但和 DPA 作用后提高 10^4 倍。分析膜融合时,在一种囊泡中包入 $TbCl_3$, 另一种包入 DPA,一旦发生二种囊泡膜融合, Tb^{3+} 即

和 DPA 混和, 此时可记录到荧光强度的时间变化曲线。此法检测的灵敏度很高。但有二个缺点: 内容物是小分子, 故易从膜内向外泄漏; PS 等带负电的脂质会和 Tb^{3+} 产生静电相互作用, 造成对膜的修饰, 即改变了膜的特性。另外, 分析生物膜融合现象时很难将 Tb^{3+} 引入到生物膜囊泡中。不过这种方法对人工膜很适用, 特别是对 PC 等的脂质体。若二种内容物分别为 RNA(DNA) 及 RNase(DNase), 则测定水解的核苷酸产物同样能检测膜的融合, 此时特别适用于研究病毒和细胞的融合。第二种方法是基于膜组分的融合。大西俊一等十多年前首次采用自旋标记物定量研究膜融合的动力学过程^[7]。方法是, 先合成在脂肪酰链上有氮氧自由基的 PC 自旋标记分子, 记作 PC*。制备 PC* 或 PC*-PC 的脂质体, 膜上高浓度自旋标记后由于自旋状态之间的快速交换, 产生自旋间交换相互作用的哈密顿量, 导致 ESR 谱线加宽及中央峰高下降。但一旦和无标记物的囊泡融合, 由于 PC* 在融合膜上的快速扩散, 自旋浓度被稀释, 因而 ESR 谱线中央峰高逐渐变强。根据谱线峰值的时间变化曲线, 便能追踪融合的动力学过程。如研究 HVJ 和红细胞 (RBC) 膜的融合时, 先将 PC* 囊泡和 HVJ 在 37°C 温育, 脂质交换的结果使部分 PC* 转移到病毒被膜上。实验中, 约使 HVJ 膜脂质上带 10% 浓度的 PC*, 此时 HVJ* 的 ESR 谱线峰值较低。一旦 HVJ* 和 RBC 在 37°C 作用时, 随着时间的推移, ESR 谱线中央峰高逐渐增大, 这表明自旋标记分子从 HVJ* 膜上扩散到了 RBC 膜上。因 RBC 膜脂量远比病毒的多, 所以自旋标记分子的浓度被极大地稀释, 减弱了来自旋间的相互作用, 导致 ESR 谱线的很大变化(图 3), 谱线的中央峰高可增加 7—8 倍。大西俊一等主要采用此法对病毒和细胞膜的融合进行了详细的研究(见续篇)。但此法也有其缺点: PC* 分子可能不经过膜融合而从一个囊泡膜上转移到另一个囊泡膜上。他们认为, 因为合成的 PC* 和膜脂组分 PC 甚相似, 可以不必考虑膜间的转移。最近, 也有人用类似

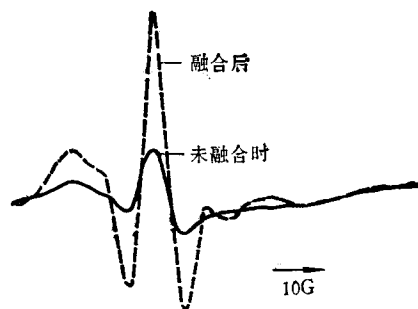


图 3 HVJ* 和 RBC 膜融合时 ESR 谱线的变化

的方法将高浓度的荧光探针嵌入一种囊泡的膜中, 由于浓度猝灭效应, 荧光强度很弱; 而如果和另一种无荧光探针分子的囊泡膜相融合, 荧光探针分子浓度被稀释, 从而大大增强了荧光强度。

3. 识别和分选

图 2 所示的内吞作用过程中, 设想内含体膜分裂后带受体的囊泡不是趋向质膜并与之融合, 而是和溶酶体融合; 同时, 带配体的囊泡最后却和质膜融合。那么, 配体经内吞作用进入细胞后又被无效地排出细胞, 膜上受体数量亦不断减少, 不久细胞即告死亡。内质网中合成的溶酶体酶也一定通过高尔基器最后运输到溶酶体中。质膜中不同部位(如顶面、基底面、紧密联结等)的膜蛋白往往有其特殊性, 这些膜蛋白质经合成后也绝不会被输送到其他部位去。内质网膜本身的蛋白质(如细胞色素 b_5)在合成后不会运输出去, 高尔基器的膜蛋白质也只会停留在高尔基器膜上。这些都说明细胞内物质的运输具有方向性, 这涉及到识别和分选 (Sorting) 的问题, 这是近几年很受瞩目的研究课题。

目前, 有关识别和分选的机制还不清楚, 许多人考虑是否蛋白质上存在特殊的“信号”。关于被膜穴上为什么能聚集受体, 研究得较为详尽。美国的 Goldstein 和 Brown, 因研究高胆固醇血 (Hypercholesterolemia) 遗传性疾病的发生机制, 前年获得诺贝尔奖。他们认为该病是一种 LDL 受体突变的疾病^[6]。有一些病人完全缺乏 LDL 受体, 所以 LDL 不能结合到被膜穴, 因而不能被内吞进入细胞, 也就不可能

借助溶酶体水解而释放出胆固醇为细胞所用,结果血浆中胆固醇量异常增多。另一些病人具有 LDL 受体,但不能聚集到被膜穴,结果只有极少量的 LDL 被内吞。为什么这种突变型的受体不能聚集呢?最近,他们成功地克隆了这些突变细胞的 DNA,分析了核苷酸顺序,结果发现它们在受体蛋白的一级结构上和正常的有些不同。这说明受体的一部分具有能在被膜穴上进行聚集的信号。可以设想,被膜穴上受体分子的聚集是由于受体分子和包涵素分子或被膜穴的其它辅助蛋白有高亲和性相互作用。以上仅是一个例子,还很难得出普遍性的结论。许多人把病毒蛋白在宿主细胞内的运输作为模型研究分选机制,因为宿主细胞中本无病毒蛋白,追踪它们在细胞内合成、运输和分选的途径比较容易,加上病毒基因组的分析也很方便,再则也易于形成各种突变型。IFV 感染极性细胞(上皮细胞等)后,在内质网膜上合成的 IFV 的一种膜蛋白质 HA(血凝素)最后在宿主细胞质膜顶面和复制出的 RNA 一起装配、出芽,产生新的病毒。水泡性口膜炎病毒感染时,病毒的 G 膜蛋白在宿主细胞质膜的基底面上装配 RNA,复制出新的病毒。有人做了一个相当有趣的实验:利用基因杂交技术,将编码 HA 的 RNA 和编码 G 蛋白的 RNA 杂交,形成 N 末端为 HA, C 末端为 G 蛋白的杂交 RNA、或反之 N 末端为 G 蛋白, C 末端为 HA 的杂交 RNA,然后感染细胞。这时,实验发现,合成后的蛋白质在宿主细胞内既不朝顶面也不朝基底面运输,而只是停留在内质网上。所以,问题变得更为复杂。大西俊一的一位研究生最近在西德利用各种突变诱变剂进行病毒点突变的研究,探讨膜蛋白质一级结构上一个位置的突变对细胞内分选过程的影响。初步结果发现,囊泡膜蛋白质靠囊泡内侧片段上氨基酸的突变会影响囊泡在细胞内的分选。但究竟囊泡内侧的蛋白质部分是如何给出分选信号的,一个可行的工作设想是:各膜内侧蛋白质片段之间的相互作用会改变膜外侧蛋白质分子间的排列,某种聚合状态可能成为导致定向运输的特定信号。这

是一个相当有意义的工作,估计在五年内能得出答案。

为进一步深入研究细胞内物质运输的分选机制,大西俊一等最近发展了一种提取特异性内含体的独特方法^[7]。因为只有得到大量的特异性内含体,才能对其膜蛋白质等成份、结构作深入的研究,以便探讨它和分选的关系。一般采用蔗糖密度梯度离心法分离溶酶体,方法较简单。先将细胞匀浆,因溶酶体与其他各种膜囊泡相比,比重较大,因而易于离心分离。但匀浆液中各种内含体、细胞内其它囊泡及内质网、高尔基器、质膜等所形成的囊泡在比重上没有大的差异,因此很难用离心法分开。为此,大西俊一等采用了一种称为“高磁场梯度分离技术”的新方法。模式实验中将铁微粒(立方晶体,大小约 $0.01-0.02\mu\text{m}$)先吸附牛血清白蛋白(BSA),再接上 ASGP,这样的系统经超声分散后能长时期稳定,分散相当好(无 BSA 时则很快聚合)。铁微粒必须足够小才能进入被膜穴($0.1 \sim 0.2\mu\text{m}$)。将上述“配体-铁微粒”灌流入大鼠肝中后,铁微粒即被内吞进入到内含体中。然后让细胞匀浆液通过高磁场强度($20,000\text{G}$)处的样品腔,腔中充填微细的不锈钢管(直径 $50\mu\text{m}$)。后者的作用一方面能形成高磁场梯度,另方面能在表面吸附带铁微粒的囊泡。此时,不含铁微粒的其他囊泡则流过样品腔被去除。电镜观察表明,分离所得的囊泡中大多数含有铁微粒。若控制实验条件(见续篇),让内吞配体只进入内含体而不输至溶酶体,则所得的囊泡可以认为是 ASGP 靶向的内含体;若使内吞配体都进入溶酶体,则得到的是 ASGP 靶向的溶酶体。这可借助测试囊泡是否有溶酶体内特有的一些酶的活性而加以鉴别区分。本方法所得的“特异性”囊泡仅是对实验中所用配体(上例中为 ASGP)有结合的特异性。改变实验条件,可以分别获得表征被膜穴处质膜特性的囊泡(内吞起始时刻)、内含体、溶酶体等。然后可用电泳等分离技术显示各种囊泡膜蛋白质的成份,寻找它们之间的差别。已得到一些初步

(下转第 28 页)

述 (Manzoli, F. A. 等, 1972, 1974, 1976, 1978)。在磷脂与 DNA 的相互作用的过程中, 磷脂分子中的极性部分可能直接与 DNA 分子中的磷酸基团相互结合, 而这种结合可能有利于 DNA 的解链而促进 DNA 的复制。也有可能磷脂通过与核组蛋白相互作用而解除核组蛋白对基因的抑制, 从而提高 DNA 模板活力。事实上, 这点已有不少研究证明, 例如用带不同电荷的磷脂制备脂质体包装病毒 DNA 其感染力有显著差别 (Willan 等 1983)^[12], 用 PC 和 Cho 按一定比例制备大单层脂质体包装极微染色体感染猴肾细胞, 其结果几乎不形成空斑, 若用 PS 代替 PC, 结果感染力大大提高 (约 20 倍), 由此提示, 由 PS 所制备的脂质体由于带有负电荷, 使有利于与带正电荷的组蛋白结合, 从而解除组蛋白对基因的抑制而促进 DNA 的复制。以上事实说明, 磷脂能从提高 DNA 聚合酶活性和提高 DNA 模板活力两条途径来提高基因组活性。也有研究指出^[18], 哺乳动物细胞的染色质中磷脂含量并非恒定, 随细胞周期的不同时期而有规律的变化。处在活性状态的染色质中的磷脂含量要比处在抑制状态的要高。这一事实同样也证明磷脂在基因活动中起着调节作用。至于何种磷脂或那几种磷脂能最佳地提高基因组活性, 将此问题研究清楚是十分有价值的, 因为用这种或这几种磷脂和其他物质按一定比例配合, 制备大单层脂质体包装遗传物质, 特别是真核遗传物质, 使其与

真核细胞相互作用, 这样, 既能提高运载基因的效率, 又能活化基因。

综上所述, 脂染色体载体转移基因技术和现有其他载体转移基因技术相比, 确有其独特的优点, 但它毕竟是建立不久, 方法尚有待进一步完善, 机理也有待更深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Mukherjee, A. B., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 1361, 1978.
- [2] Schaefer-Ridder, M., et al.: *Science*, **215**, 166, 1982.
- [3] Lavelle, D., et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **215**, 486, 1982.
- [4] Lurguin, P. F., et al.: *Plant Science Letters*, **25**, 1933, 1982.
- [5] Radford, A., et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **184**, 576, 1981.
- [6] McBride, O. W., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 1258, 1973.
- [7] McBride, O. W., et al.: *In Vitro*, **12**, 777, 1977.
- [8] Spardidos, D. A., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **74**, 4380, 1977.
- [9] Forge, A., et al.: *J. Membr. Biol.*, **41**, 249, 1978.
- [10] Pagano, R. E., et al.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **7**: 435—68, 1978.
- [11] Fraley, R., et al.: *Biochemistry*, **20**, 6978, 1981.
- [12] Willian, B., et al.: *J. Gen. Virol.*, **64**, 911, 1983.
- [13] Von Bertalanffy, L., et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, **4**, 481, 1956.
- [14] Armstrong, J. A.: *Exp. Cell Res.*, **11**, 640, 1956.
- [15] Spurlock, B. O., et al.: *J. Cell Biol.*, **17**, 203, 1963.
- [16] Wickner, W., et al.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 6244, 1974.
- [17] Novello, F., et al.: *J. Biochem.*, **24**, 325, 1975.
- [18] Capitani, G.: *Mol. Cell Biochem.*, **27**, 135, 1979.
- [19] 曾治义、易健华: 《武汉大学学报》, 1984 年, 1 期, 123 页。

[本文于 1986 年 7 月 15 日收到]

(上接第 36 页)

结果, 如某种囊泡膜上出现新的蛋白质成份, 现正在作更细致的确认。其中采用的一种分析方法是针对某些特异组分的蛋白质, 制备其单克隆抗体, 然后观察这种抗体作用后是否会引起细胞内物质运输方向的改变。但本法只能追踪含配体囊泡的细胞内过程。当内含体中配体-受体分离后, 对含受体的囊泡就无能为力了。显然, 这些研究工作的难度很大, 但可以期待随着研究工作的深入开展, 将大大有助于我们对细胞内物质定向运输机制的了解。

(张志鸿、刘宏志 整理)

参 考 文 献

- [1] Kirchhausen, T. and Harrison, S. C.: *J. Cell Biol.*, **99**, 1725, 1984.
- [2] Schlossman, D. M. et al.: *J. Cell Biol.*, **99**, 723, 1984.
- [3] Dunphy, W. G. and Rothman, J. E.: *Cell*, **42**, 13, 1985.
- [4] Wilschut, J. et al.: *Biochemistry*, **19**, 6011, 1980.
- [5] Maeda, T. et al.: *Biochemistry*, **14**, 3736, 1975.
- [6] Goldstein, J. L. et al.: *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**, 1, 1985.
- [7] Sato, S. B. et al.: *J. Cell Biol.*, Submitted.