

·成果简介·

# 核骨架-核纤层-中间纤维体系的研究

翟中和

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

[关键词] 核骨架(核基质), 核纤层, 植物中间纤维, 染色体骨架, 核仁骨架

近10多年, 细胞生物学科学工作者证实, 在细胞核内除染色质、核仁、核膜与核孔复合体等外, 还存在一种网络结构体系, 称为核骨架(nuclear skeleton)或核基质(nuclear matrix), 它在调节DNA复制与基因表达等重要细胞生命活动方面起重要作用。核纤层(nuclear lamina)是位于细胞内层核膜下由纤维蛋白构成的片层, 由1—4种多肽装配成直径10 nm纤维丝然后网织成核纤层。核纤层与细胞分裂、细胞分化、核被膜与染色质(体)的构建以及细胞核组装等重要生命现象的关系极为密切。核骨架与核纤层结构与功能的研究是近十年细胞生物学的热点, 有很多根本性的问题需要研究。中间纤维虽然在60年代中期就在高等动物细胞中被发现, 并已积累了较丰富的试验资料, 但它的功能还未被真正阐明。在植物细胞与低等生物细胞中是否存在中间纤维还是一个没有解决的问题。

“核骨架-核纤层-中间纤维体系的研究”是在1989年立项并经专家组论证通过的项目, 由国家自然科学基金委员会生命科学部主任基金资助, 按重大项目管理。虽然本项目是从1990年1月才开始启动, 但实际是北京大学细胞生物学研究室在1987—1990年承担的“细胞骨架(包括核骨架)与病毒复制的关系研究”的自然科学基金课题的延伸与提高。本项目研究过程中取得如下成果。

## 1 核骨架-核纤层-中间纤维体系结构与成分的基础性研究

以HeLa细胞与BHK21细胞两种不同类型细胞为基本模式, 系统地研究了其核骨架、核纤层与中间纤维的结构、成分及其相互关系<sup>[1-4]</sup>, 同时还对网织红细胞、小鼠胚胎干细胞与PtK2细胞等各种不同分化类型细胞的核骨架、核纤层与中间纤维结构与成分进行了比较研究<sup>[5-7]</sup>。上述细胞的核骨架体系构建与中间纤维成分虽有所不同, 但明确地提出了核骨架-核纤层-中间纤维是贯穿在细胞核与质的结构上相互联系的, 并具有相似物理化学稳定性的统一网络体系。

## 2 原始真核细胞(甲藻)染色体骨架、核骨架的证实

在染色体内是否存在非组蛋白骨架体系, 一直有争论。我们与中国科学院昆明动物研究所合作, 以甲藻的染色体(被认为是最原始的染色体)为材料, 经过较长期的技术与方法学

本文于1996年8月12日收到。

的摸索,首次证实这种原始的染色体结构中存在着一个精细的染色体骨架网络,纤维直径约10 nm,基本由非组蛋白组成,但成分很复杂<sup>[8]</sup>。此外,还首次证实原始真核细胞核中存在着精细致密的核骨架网络<sup>[9]</sup>。上述结果为真核细胞核与染色体的起源与进化提供了新的重要资料,并说明核骨架,染色体骨架的起源,与真核和染色体的起源可能是同步的。

### 3 植物细胞中间纤维的首次证实及植物角蛋白的发现

高等动物细胞中间纤维是在60年代中期被发现的,在长达30年的时间里,细胞生物学家未能证明植物细胞中是否存在类似动物细胞的中间纤维。我们对植物细胞中间纤维及其蛋白成分的系统研究,取得如下创新性结果:

(1)先后在10多种高等植物的不同组织细胞内均发现有10 nm直径的中间纤维构成精细的网络体系<sup>[10-15]</sup>,这在国际上未见报道。

(2)首次证明高等植物中间纤维的主要成分是角蛋白,与动物细胞角蛋白抗体有明显交互免疫反应,并证实每种植物细胞中间纤维中至少含有4种不同分子量的角蛋白,分为碱性角蛋白(64 kD,58 kD,52 kD)与酸性角蛋白(50 kD)两类,没有明显的种与组织特异性<sup>[14,15]</sup>。

(3)将植物中间纤维的角蛋白成分成功地在体外进行了重新组装,人工组装的中间纤维直径为10 nm,其成分为角蛋白(64 kD,58 kD,52 kD,50 kD)<sup>[14,15]</sup>。用扫描隧道显微镜(STM)与高分辨电镜对植物中间纤维的装配过程进行分析,可观察到角蛋白分子的二聚体和四聚体,推测由8个四聚体呈半交错组成中间纤维单丝<sup>[16]</sup>。对植物细胞中间纤维体外组装条件做了分析,最适的pH值为8.0,  $Mg^{2+}$ 有助于装配; $Ca^{2+}$ 能去组装<sup>[17]</sup>。

(4)用动物角蛋白基因cDNA为探针进行点杂交试验表明,在高等植物细胞的基因组中有动物角蛋白cDNA的同源序列<sup>[18]</sup>。用Northern杂交证明,在植物细胞转录的mRNA中确有能与动物细胞角蛋白cDNA呈阳性反应的片段。

### 4 植物细胞核纤层的证实

植物细胞中是否存在核纤层也是一个不清楚的问题,过去未见有明确报道。我们的研究首次提出,植物细胞存在核纤层形态学与核纤层蛋白成分的证据<sup>[19]</sup>。继而,又用多方面技术与方法证明,在高等植物中确实存在植物核纤层,其蛋白成分能与动物核纤层抗体呈免疫反应,存在Lamin蛋白,分子量为84 kD<sup>[20]</sup>。

### 5 单细胞原生生物细胞中存在中间纤维与核纤层的证据

在单细胞生物或更原始的生物中是否存在中间纤维与核纤层,仅有一些零星的推测性报道,我们的工作对中间纤维与核纤层的起源提出一些新的设想。

(1)发现原始真核细胞寇氏隐甲藻细胞中已存在类角蛋白中间纤维,直径为10 nm,主要成分分为类角蛋白(67 kD),并可在体外重组装为直径10 nm纤维。甲藻基因组DNA中含有3.5 kb片段,与动物角蛋白cDNA有同源序列<sup>[21,9]</sup>。但从形态学与免疫反应说明,甲藻中尚无核纤层存在的迹象<sup>[9]</sup>,这对中间纤维与核纤层的起源无疑提供了很有意义的资料。

(2)证明衣藻中存在明显的中间纤维与核纤层网络,中间纤维主要成分也是角蛋白(90 kD),核纤层蛋白的分子量高达101 kD<sup>[22]</sup>。很有意义的是,衣藻鞭毛的基底是由中间纤维编

织的笼状结构与动物角蛋白抗体呈阳性反应<sup>[23]</sup>,证明衣藻淀粉核中存在角蛋白中间纤维网络<sup>[24]</sup>。这些结果均未见前人报道。

(3) 证明在四膜虫细胞中有核纤层。对四膜虫核纤层蛋白进行分离纯化,有两种分子量(66 kD与70 kD),对49 kD蛋白来源提出了分析<sup>[25]</sup>。对核纤层蛋白在四膜虫细胞分裂过程中的动态与分布的进一步分析认为,核纤层对参与细胞分裂有重要作用<sup>[26]</sup>。

## 6 核仁骨架的研究

对 HeLa 细胞的核仁进行分离纯化和选择性抽提,观察到有一个稳定的精细网络结构,其主要成分为3种非组蛋白组成,与核骨架的成分明显不同,而且在体外可以重组装成纤维<sup>[27]</sup>。这些结果说明,核仁骨架并非核骨架纤维在核仁内的延伸,而可能是一个独立的骨架体系。

## 7 核骨架、中间纤维体系与病毒 DNA 复制、其因表达、病毒装配关系的研究

(1) 证实新合成的腺病毒 DNA 特异地结合在核骨架上,腺病毒 DNA 是在核骨架上合成的<sup>[28,29]</sup>。

(2) 证实腺病毒 DNA 的转录活性与核骨架密切相关,病毒早基因转录 E1a, E1b 活跃转录时,紧密结合在核骨架上,此时不转录的晚基因却不与核骨架结合,证明活性基因转录是在核骨架上进行的<sup>[30]</sup>。

(3) 测定了腺病毒6个基因 E1a, E1b, E2, L1, L2 和 L3 转录的 hnRNA,证明 Pre mRNA 均结合在核骨架上,从而证明病毒 mRNA 的加工与核骨架关系密切<sup>[31]</sup>。

(4) 清晰地显示出腺病毒的装配是以核骨架网络为支架,证明病毒工厂内有一个精细的网络结构<sup>[1,32]</sup>。

(5) 证明痘苗病毒的装配是以中间纤维为支架,痘病毒工厂内有一个精细的网络体系<sup>[33]</sup>,病毒 DNA 与 RNA 的合成与中间纤维关系十分密切<sup>[34]</sup>。

(6) 证明辛德毕斯病毒 nsP2 在胞质合成后进入核与核骨架结合,为解释 nsP2 的功能提供了有意义的资料<sup>[35]</sup>。

## 8 证实染色体天然末端端粒与核骨架有特异的结合

染色体天然末端端粒 DNA 富集于核骨架上,端粒 DNA 与 Lamina 及某些核骨架蛋白具有特异的亲合性<sup>[36-38]</sup>,为说明核骨架、Lamina 与染色体(质)的空间结构布局的关系提供了重要的实验依据。更有意义的是,染色体骨架蛋白却与端粒 DNA 无任何亲和结合关系<sup>[39]</sup>,从而更深一步揭示了一个现象;四膜虫大核的 rDNA 的端粒 DNA 与核纤层结合,5'端非转录区与核骨架蛋白有亲和结合关系,而3'端与结构基因转录区却处于游离状态。这些对目前热门的 MAR(与核骨架结合的 DNA 序列)研究提供了新的依据<sup>[40]</sup>。

## 9 核骨架、核纤层与非细胞体系核重建(细胞核体外装配)的关系

为了在较深层次研究核骨架与核纤层在核功能中的作用,我们建立了非细胞体系核重建的实验模式<sup>[41-44]</sup>,并在重建核中首次显示出精细的核骨架体系,说明核骨架是核装配不可

缺少的重要结构<sup>[42,45]</sup>。继续用抗 lamin A 的单抗加入核重建体系，发现正常核重建过程被破坏，说明核纤层在核重建中起重要作用<sup>[46]</sup>，并分析用去膜精子诱导爪蟾卵提取物重建核纤层成分中有 lamin II 与 I，这对前人工作有新的补充<sup>[47]</sup>。

## 10 核纤层、核仁骨架与中间纤维的体外装配研究

细胞骨架装配是大分子装配成细胞基本结构体系的理想模式，我们在核纤层蛋白装配研究方面取得很有意义的结果。首先，我们纯化了鼠肝细胞 lamin A, B, C，应用 STM 对 lamin 分子组装为核纤层纤维的过程进行研究，提出了由二聚体→四聚体→核纤层纤维（32 分子组成）的装配模式，认为并不存在前人所谓的八聚体的过程<sup>[48,49]</sup>。核仁骨架装配与中间纤维装配研究也取得进展。

## 11 核骨架与中间纤维在细胞分裂与细胞分化过程中的作用研究

(1) 研究 HeLa 细胞有丝分裂过程中 280 kD 核骨架蛋白的动态变化，取得有意义的结果<sup>[50]</sup>。

(2) 证明膀胱上皮细胞分化过程中，不对称单位膜的功能与中间纤维关系极为密切，不对称单位膜蛋白与中间纤维有特异亲和性<sup>[51]</sup>，提出了解释不对称单位膜功能的新证据。

## 12 神经丝（神经细胞中间纤维）的分子生物学研究

我们与东京大学合作开展神经细胞骨架的分子生物学研究，在神经丝（NF）蛋白编码基因表达与神经丝形态构建的机理方面取得一些突破性结果。神经丝含有三种蛋白（NF-L, NF-M 与 NF-H），首先用 NF-L 基因在 sf9 细胞（缺乏中间纤维）表达，可以组装成 10 nm 直径的神经丝，但神经丝的空间排布很混乱<sup>[52]</sup>，当 NF-M 与 NF-L 基因一起在 sf9 细胞表达时，神经丝呈有规则的平行排布<sup>[53]</sup>，从而说明 NF-L 蛋白是形成神经丝的基质蛋白，而 NF-M 对神经丝空间有序排布起决定作用。NF-H 蛋白的功能正在进一步探讨。

## 13 一系列重要技术与方法的建立

在本项目研究中，除采用引进国外的一些技术外，更重要的是我们自行建立与发展了一系列具有创新性的技术，对提高我们的研究水平与取得创新性成果起到相当关键的作用，如：首次建立显示植物中间纤维体系的技术<sup>[13,15]</sup>，并摸索出一套植物中间纤维体外装配的技术与条件；首次应用免疫胶体金技术对核骨架-核纤层-中间纤维标记定性<sup>[3,54]</sup>；电镜原位分子杂交技术的建立及其在研究核酸与核骨架关系中的应用<sup>[55,56]</sup>；应用电镜能量损失谱成像原理与技术直观显示核酸与核骨架、核纤层的亲和结合关系<sup>[36,37]</sup>；应用 STM 技术观察核纤层与中间纤维的装配过程<sup>[47,48]</sup>；应用选择性抽提法与 SEM 配合观察核骨架、核纤层与中间纤维三者的结构关系<sup>[57]</sup>。

本项目在总体上达到了国际上同类工作的先进水平，个别子课题处在国际领先水平。课题前期工作获得国家自然科学三等奖、国家教委科技进步奖一等奖及何梁何利科技进步奖等各级奖励 9 项，先后在国内与国际学术刊物发表论文 60 多篇，在国际重要学术会议被邀请做专题报告达 10 多次，并先后培养博士研究生 10 名、博士后 3 名、硕士研究生 19 名。

研究课题所发表的主要论文, 据不完全统计, 在国外已被引用达数百次(不包括自引), 其中发表在《中国科学》(B) 31卷第1期第28—38页(1988)题为“痘苗病毒的装配与中间纤维关系”一文, 根据中国科技文献所发表的正式统计资料(《生命科学》第9卷第5期1997年10月)在中国生命科学论文被国际引用数列为第二名。由于本课题的发展与深入, 已延伸出几个很有前景的新方向, 如非细胞体系核装配与核骨架的关系, 植物细胞中间纤维与核纤层的证实及其装配的分子基础研究等, 可望取得新的更高水平的成果。

### 参 考 文 献

- [1] Zhai Zhonghe, Wang Xiao, Qian Xueyun. Nuclear matrix-intermediate filaments system and its alteration in adenovirus infected HeLa cell. *Cell Biology Int. Reports*, 1988, **12**(2):99—108.
- [2] 吴冬兰, 翟中和. BHK-21 细胞的中间纤维-Lamina-核骨架体系的研究. *实验生物学报*, 1990, **23**(1):71—81.
- [3] Jiao Renjie, Wu Donglan, Zhang Bo et al. Immunogold labelling of the intermediate filament-lamina-nuclear matrix system in HeLa and BHK-21 cells. *J. Electron Microsc. Tech.*, 1990, **18**:126—134.
- [4] 吴冬兰, 焦仁杰, 翟中和. BHK-21 细胞的中间纤维. *电子显微学报*, 1990, **9**(2):1—6.
- [5] 董茂庆, 陈联松, 张宇生等. 鸡和小鼠具核红细胞的中间纤维-核纤层-核骨架体系. *解剖学报*, 1990, **21**(4):399—403.
- [6] 高健刚, 韩贻仁, 焦仁杰等. 小鼠胚胎干细胞(ES-M13)核骨架-核纤层-中间纤维结构体系的研究. *实验生物学报*, 1994, **27**(4):463—476.
- [7] 焦仁杰, 杨蕾, 丘殷庆等. PtK2 细胞核骨架-核纤层-中间纤维的研究. *实验生物学报*, 1996, (印刷中).
- [8] 蔡树涛, 翟中和, 曾丛梅等. 一种原始真核细胞寇氏隐甲藻染色体骨架的证实. *中国科学(B)*, 1991, **21**:1279—1283.
- [9] 蔡树涛, 曾丛梅, 李靖炎等. 寇氏隐甲藻的核骨架与中间纤维. *实验生物学报*, 1991, **24**(1):33—44.
- [10] 苏非, 顾伟, 翟中和. 植物类角蛋白中间纤维. *电子显微学报*, 1988, **7**:3.
- [11] 苏非, 顾伟, 翟中和. 植物叶肉细胞的类角蛋白中间纤维. *中国科学(B)*, 1990, **20**:267—270.
- [12] Su Fei, Gu Wei, Zhai Zhonghe, The keratin intermediate filament-like system in maize protoplasts. *Cell Research*, 1990, (1):11—16.
- [13] 邢力, 黄锦花, 杨澄. 植物根尖细胞的类角蛋白中间纤维. *科学通报*, 1991, (8):623—626.
- [14] 杨澄, 邢力, 翟中和. 植物中间纤维及其在体外重装配. *中国科学(B)*, 1992, **22**:1052—1057.
- [15] Yang C, Xin L, Zhai Z. Intermediate filaments in higher plant cells and their assembly in a cell-free system. *Protoplasma*, 1992, **171**(1—2):44—54.
- [16] Yang C, Min G, Luo Z et al. STM study on assembly of plant intermediate filaments. *Protoplasma* 1995, **188**:128—132.
- [17] 程立红, 翟中和. 不同条件对植物中间纤维外装配的影响. *实验生物学报*, 1994, **27**(3):371—373.
- [18] 吴冬兰, 翟中和. 植物细胞类角蛋白及其与动物细胞角蛋白 cDNA 的同源序列. *实验生物学报*, 1991, **24**:215—221.
- [19] 汪健, 焦仁杰, 蔡树涛等. 植物细胞中存在 Lamina(核纤层)的实验依据. *科学通报*, 1992, **37**:1990—1993.
- [20] 汪健, 翟中和. 植物细胞核纤层的证实. *中国科学*, 1996, (印刷中).
- [21] 李岫芬, 蔡树涛, 翟中和. 寇氏隐甲藻中存在中间纤维的证据. *科学通报*, 1992, **37**(23):2178—2181.
- [22] 范彬, 李荫葵, 翟中和. 衣藻(*Chlamydomonas* sp)中间纤维及核纤层存在的证实. *实验生物学报*, 1994, **27**(1):131—135.
- [23] 范彬, 李荫葵, 翟中和. 衣藻基体(basal body)中存在类中间纤维构成的笼状结构. *科学通报*, 1994, **39**(4):359—361.
- [24] 范彬, 李荫葵, 翟中和. 衣藻淀粉核中存在类角蛋白中间纤维网架. *植物学报*, 1994, **36**(7):518—521.
- [25] 陈彬, 蔡树涛, 翟中和. 四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)核纤层的研究. *实验生物学报*, 1994, **27**(2):153—168.
- [26] Chen Bin, Zhai Zhonghe. Dynamics of *Tetrahymena* macronuclear lamina during cell division. *Cell Research* 1994, **4**(2):173—182.
- [27] 焦仁杰, 陈建明, 朱小健等. HeLa 细胞的核仁骨架. *科学通报*, 1994, **39**(5):455—457.
- [28] 陈枫, 徐刘中, 丁明孝, 翟中和. 新合成的腺病毒 DNA 是结合在宿主细胞核骨架上. *实验生物学报*, 1990, **23**(2):227—232.
- [29] Jiao R, Yu W, Ding M et al. Localization of adenovirus DNA by in situ hybridization electron microscopy. *Microsc. Res. Tech.*, 1992, **21**:23—31.

- [30] 翟中和,陈枫. 腺病毒 DNA 的转录活性与宿主细胞核骨架的关系,中国科学,1988,18:1052—1058.
- [31] 翟中和. 腺病毒 mRNA 的修饰与 DNA 的转录活性与核骨架的关系,全国第三届病毒生化会议论文集(烟台),1987,5—6.
- [32] Zhai Zhonghe, Penman S. Alteration in nuclear matrix structural after adenovirus infection. J. Virology, 1987, 61(4):1007—1018.
- [33] 翟中和, Penman S. 痘苗病毒的装配与中间纤维的关系. 中国科学(B), 1987, 17:1076—1084.
- [34] 于文斗,于勤,丁明孝,翟中和. 痘苗病毒的复制与中间纤维的关系. 实验生物学报,1993,26(3):239—247.
- [35] Wang X Z, Ding M X. Nuclear localization of Sindbis virus nonstructural protein nsP2. Cell Res., 1993,3:27—37.
- [36] 汪国顺,潘惟钧,翟中和. 染色体端粒 DNA 与核骨架的结合关系. 实验生物学报,1992,25:185—189.
- [37] 汪国顺,罗文捷,潘惟钧等. HeLa 细胞染色体端粒 DNA 与核骨架的特异性结合. 中国科学,1993,23(7):756—758.
- [38] 汪国顺,罗文捷,丁明孝,翟中和. HeLa 细胞染色体端粒的定位与核骨架—Lamina 的关系. 科学通报,1993,38(8):723—729.
- [39] 朱泉,罗文捷,翟中和. 核基质和染色体骨架与端粒 DNA 和 C-Ras 基因关系的研究. 科学通报,1994,39(14):1328—1331.
- [40] 罗文捷,焦仁杰,翟中和. 四膜虫大核 rDNA 与核骨架的关系. 科学通报,1995,40(18):1711—1716.
- [41] 蔡树涛,张博,青婧等. 利用非洲爪蟾卵的提取物与 Lambda DNA 进行核重构实验. 科学通报,1990,35(16):1261—1264.
- [42] 张传茂,翟中和. 利用腺病毒 DNA 诱导非细胞体系核重构. 实验生物学报,1991,24:287—291.
- [43] 张博,陈英,翟中和. 植物 DNA 能诱导非洲爪蟾卵提取物实现体外核装配. 中国科学,1995,25(6):623—630.
- [44] 曲健,张传茂,翟中和. 利用非洲爪蟾精子染色质和卵提取物在体外重建细胞核. 动物学报,1995,41(2):196—200.
- [45] 蔡树涛,翟中和. 体外组装的细胞核的核骨架. 科学通报,1993,38:1123—1126.
- [46] Cai Shuto, Zhang Bo, Zhai Zhonghe. Cell-free nuclear reconstitution and display of nuclear matrix lamina in assembled nuclei. Proceedings of the First Congress for APOCB, Shanghai, 1990.
- [47] Qu Jian, Zhang Chuanmao, Zhai Zhonghe. Observation of nuclei assembled around demembranated sperm nuclei and analysis of their lamina components. Cell Research, 1994, 4(2):163—172.
- [48] 闵光伟,佟向军,陈彬等. 核纤层蛋白体外装配的研究. 科学通报,1995,40(12):1129—1130.
- [49] Min G, Tong X, Ding M et al. Scanning tunneling microscopic and electron microscopic investigation of the in vitro assembly of lamine. Cell Res., 1996, (印刷中)。
- [50] 蔡树涛,翟中和. HeLa 细胞有丝分裂过程中 280kD 核骨架蛋白的变化. 科学通报,1994,39(11):1039—1041.
- [51] 梁凤霞,任笑地,丁明孝等. 膀胱上皮细胞 AUM 结构与中间纤维特异结合——解释 AUM 功能的新证据. 中国科学,1995,25(4):406—411.
- [52] 陈建国,中川辉良,广川信隆等. NF-L 蛋白在 s9 细胞内表达能单独形成中间纤维样结构. 科学通报,1995,40(16):1504—1507.
- [53] 陈建国,中川辉良,广川信隆等. NF-M 蛋白的功能分析. 科学通报,1995,41(3):262—266.
- [54] 焦仁杰,吴冬兰,张博等. 应用免疫胶体金技术对核骨架-Lamina-中间纤维体系标记定性. 电子显微学报,1990,9(4):1—8.
- [55] 焦仁杰,于文斗,丁明孝等. 应用电镜原位分子杂交技术对腺病毒 DNA 在宿主细胞内进行定位. 电子显微学报,1992,11:81—87.
- [56] 焦仁杰,于文斗,丁明孝等. 电镜原位分子杂交技术的建立及其在研究核骨架与核酸的关系中的应用. 中国科协首届青年学术年会论文集,理科分册,1992,385—388.
- [57] 苏菲,王晓,翟中和. 核骨架-中间纤维体系的扫描电镜观察. 电子显微学报,1988,7(1):5—11.

## NUCLEAR MATRIX-LAMINA-INTERMEDIATE FILAMENT SYSTEM

Zhai Zhonghe

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

**Key words** nuclear matrix, nuclear lamina, plant intermediate filaments, chromosome scaffold, nuclear skeleton