

# 第十一章 细胞核

细胞核(nucleus)是真核细胞中由双层单位膜包围核物质形成的多态性结构,是细胞内最大、最重要的细胞器。细胞核为遗传信息储存、DNA 复制和 RNA 转录的场所,是细胞代谢、生长、增殖和分化等生命活动的调控中心。因此,细胞核被称为细胞的“大脑”和“司令部”。

1781 年,Trontana 首先在鱼类细胞中观察到细胞核。1831 年,Brown 观察到植物的细胞核。在原核细胞中,DNA 集中,但无核膜包围,故称拟核(nucleoid)。成熟的植物筛管和哺乳类动物的红细胞则没有细胞核。

细胞核的形态、大小、位置和数目因细胞类型、性质和发育阶段不同而异。大多数细胞的核呈球形或椭圆形。核的大小在不同生物和不同生理状态下有所差异,生长旺盛的细胞(如卵细胞、肿瘤细胞)的核较大,成熟细胞的细胞核最小,高等动物的细胞核直径通常为 5~10 $\mu\text{m}$ 。一个细胞通常只有一个细胞核,但某些细胞如肝细胞、肾小管细胞和软骨细胞有双核,而破骨细胞的核可达数百个。细胞核的位置一般居于细胞中央。

在同一种生物中,由于遗传物质的含量是恒定的,故核的大小也比较恒定。常以核质比(NP)来估算核的大小,NP 值一般为 0.5 左右,分裂期细胞的 NP>0.5,衰老细胞的 NP<0.5。

$$NP = \frac{V_n}{V_c - V_n}$$

式中:V<sub>n</sub>——细胞核的体积;V<sub>c</sub>——细胞的体积。

在细胞周期中,细胞核有两个不同时期,即分裂间期和分裂期。分裂期的细胞核不完整,在分裂间期才能看到细胞核的全貌。在电镜下可以观察到间期核的 4 个组成部分:核膜、染色质、核仁及核基质(图 11-1)。

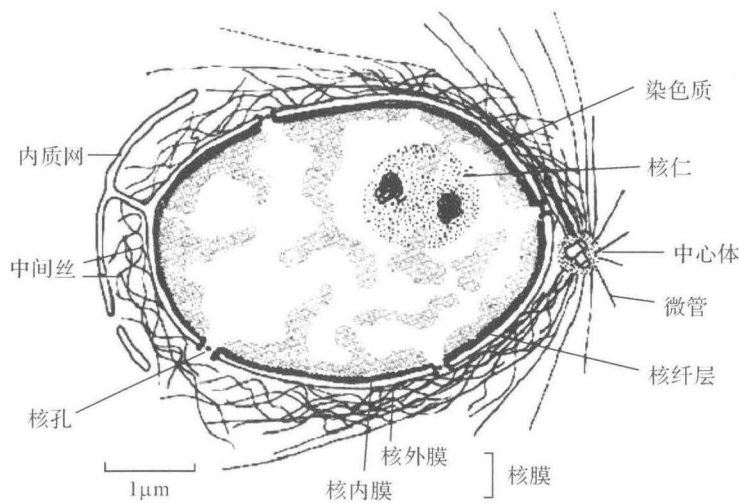


图 11-1 细胞核

## 第一节 核 膜

核膜(nuclear envelope, NE)是整个细胞内膜系统的一部分,是包在细胞核外的双层膜结构。它将 DNA 与细胞质分隔开,形成核内特殊的微环境,保护 DNA 分子免受损伤;使 DNA 的复制和 RNA 的翻译表达在时空上分隔开来;此外,染色体定位于核膜上,有利于解旋、复制、凝缩和平均分配到子核中。核膜还是核、质物质交换的通道。

核膜的电镜结构包括核外膜、核内膜、核周隙、核孔复合体和核纤层。

### 一、核外膜、核内膜与核周隙

核膜由内、外两层单位膜构成,使得细胞核与细胞质分隔开。每层膜的厚度约为7.5nm,靠向细胞质的一层为核外膜(outer nuclear membrane),靠向核质的一层为核内膜(inner nuclear membrane)。内、外膜之间有宽约20~40nm的腔隙,称为核周隙(perinuclear space),与粗面内质网腔相通。核周隙腔内电子密度低,一般不含固定的结构。

核膜的面积常随细胞功能的变化而迅速扩大或缩小。

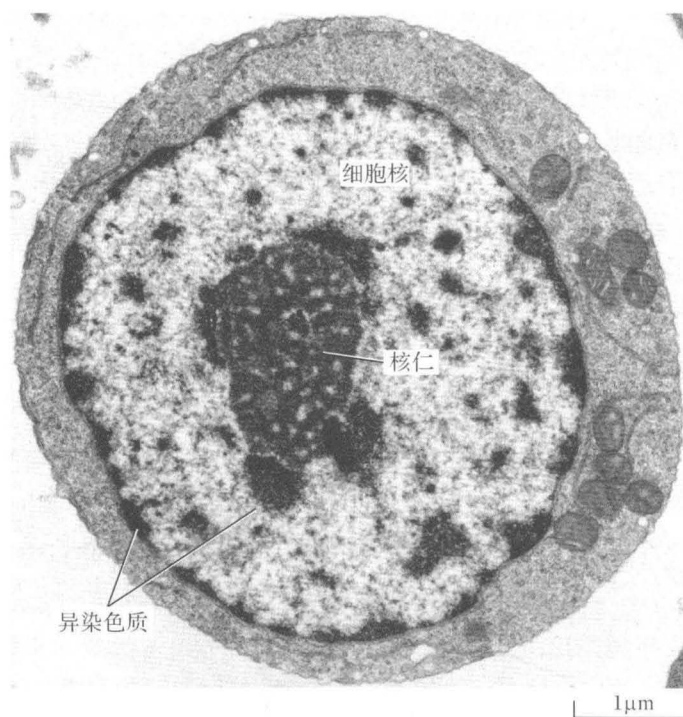


图 11-2 细胞核的电镜照片

核内膜与核外膜在核孔(nuclear pore)的位置互相融合(图 11-2)。核外膜与粗面内质网(rER)相连,其胞质面附着核糖体。因此,可以把外膜与核周隙视为内质网的特化区域。双层核膜结构的优点是两层核膜各自特化,分别与核质或细胞质中的组分发生相互作用,而核周隙则成为它们中间的缓冲区。

## 二、核孔

核孔直径约 70nm,是细胞核与细胞质间物质交流的通道。核孔使核、质两个区间既有分隔又有沟通。细胞核内生成的 mRNPs、tRNA 和核糖体亚基以及细胞质中所合成的所有细胞核所需的蛋白质,都是通过核孔出入细胞核的。

核孔的数目随细胞种类及生理状态的不同而异,转录旺盛的细胞核的核孔数目较多,反之较少。通常  $1\mu\text{m}^2$  核膜上有 10~60 个核孔,约占核表面积的 5%~38%。如蛙卵细胞每个核可有  $3.77 \times 10^7$  个核孔,但其成熟后细胞核仅有 150~300 个核孔。

核孔并非单纯的孔洞,而是一个复杂的盘状结构体系,呈圆形或八角形,称为核孔复合体(nuclear pore complex, NPC)(图 11-3)。核孔复合体的结构似环状,相对分子质量约  $1.25 \times 10^8$ (相当于核糖体的 30 倍)。核孔复合体主要包括以下几个部分:①细胞质环(cytoplasmic ring),位于核孔复合体胞质一侧,环上有 8 条纤维伸向胞质;②核质环(nuclear ring),位于核孔复合体核质一侧,上面伸出 8 条纤维,纤维端部与端环相连,构成笼子状的结构;③转运子(transporter),为核孔中央一个栓状的中央颗粒;④辐(spoke),为核孔边缘伸向核孔中央的突出物。

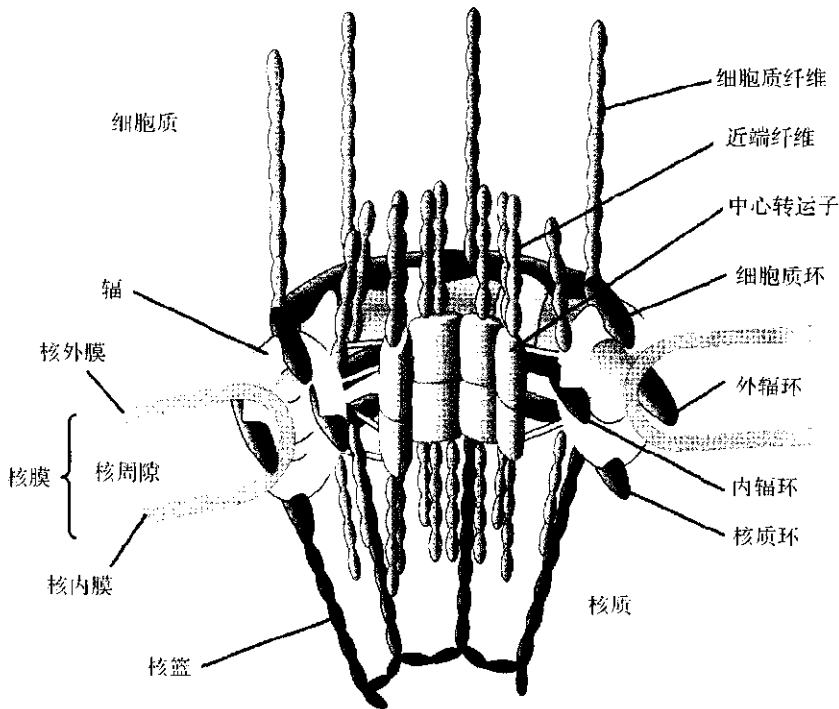


图 11-3 核孔复合体的剖视图

由结构可知,每个核孔复合体由一组排列成八角形的大蛋白质颗粒所组成,中央是含水的通道,允许水溶性物质出入于核与胞质之间。酵母的核孔复合体含 50 多种不同的蛋白质,脊椎动物则有 100 多种蛋白质,通称为核孔蛋白(nucleoporin, NUP)。核孔蛋白可能在经核孔的主动物质运输中发挥作用。另外,有一些称为核运输受体(nuclear-transport receptors)

的蛋白质也在此过程中起作用。

通过核孔的物质运输与信号序列有关。1982年, Laskey 发现核内含量丰富的核质蛋白(nucleoplasm)的 C 端有一个信号序列, 可引导蛋白质进入细胞核, 称为核定位信号(nuclear localization signal, NLS)。NLS 由 4~8 个氨基酸组成, 含有 Pro、Lys 和 Arg。对其连接的蛋白质无特殊要求, 并且完成核输入后不被切除。第一个被确定的 NLS 是病毒 SV40 的 T 抗原, 它在胞质中合成后很快积累在核中。其 NLS 为: Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val, 即使单个氨基酸发生替换突变, 亦将失去作用。

核周蛋白(karyopherin)是一类与核孔选择性运输有关的蛋白家族, 相当于受体蛋白。其中, 输入蛋白(importin)负责将蛋白从细胞质运进细胞核, 输出蛋白(exportin)负责相反方向的运输。通过核孔复合体的转运过程还涉及 Ran 蛋白, Ran 是一种 G 蛋白, 调节“货物”受体复合体的组装和解体, 在细胞核内 Ran-GTP 的含量远高于细胞质。

核质蛋白向细胞核的输入可描述如下: ①蛋白与 NLS 受体, 即输入蛋白  $\alpha/\beta$  二聚体结合; ②“货物”和受体的复合物与 NPC 胞质环上的纤维结合; ③纤维向核弯曲, 转运子构象发生改变, 形成亲水通道, “货物”通过; ④“货物”受体复合物与 Ran-GTP 结合, 复合体解散, 释放出“货物”; ⑤与 Ran-GTP 结合的输入蛋白  $\beta$  输出细胞核, 在胞质中 Ran 结合的 GTP 水解, Ran-GDP 返回细胞核, 重新转换为 Ran-GTP; ⑥输入蛋白  $\alpha$  在核内输出蛋白的帮助下返回细胞质。

对细胞核向细胞质的大分子输出机制了解较少。在大多数情况下, 细胞核内的 RNA 是与蛋白质形成 RNP 复合物转运出细胞核的。RNP 的蛋白质上具有核输出信号(nuclear export signal, NES), 可与细胞内的受体输出蛋白结合, 形成 RNP-输出蛋白-Ran-GTP 复合物, 输出细胞核后, Ran-GTP 水解, 释放出结合的 RNA, Ran-GDP、输出蛋白和 RNP 蛋白返回细胞核。

### 三、核纤层

在真核细胞的核内膜下, 有一层由纤层蛋白组成的纤维状网络结构, 称为核纤层(nuclear lamina)。核纤层与中间丝、核基质相互连接, 形成贯穿于细胞核与细胞质的骨架纤维结构体系。核纤层的厚度在各种细胞中变化较大, 大多数细胞的核纤层很薄, 约 20~80nm。

核纤层由核纤层蛋白(lamin)组成, 相对分子质量为 60000~80000, 包括核纤层蛋白 A、B(B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>)和 C。核纤层蛋白是中间丝蛋白家族的成员, 蛋白 A 和 C 由同一转录单位编码, 经过另路剪接, 成为 2 种不同的核纤层蛋白。蛋白 A 在肽链的 C 末端有一段长 133 个氨基酸残基的序列, 蛋白 C 则缺失。在蛋白 A 和 C 两种多肽的氨基酸序列中, 存在一段长度为 350 个氨基酸残基的序列, 与中间丝蛋白高度保守的  $\alpha$ -螺旋区具有 28% 的同源性。核纤层蛋白与波形蛋白比较, 则在同源岛区域有 70% 的氨基酸残基相同。核纤层蛋白 B 不同于 A 和 C, 具有独立的转录单位。蛋白 B 经过转录后修饰, 多肽链的 C 末端被加上 1 个异戊二烯基团。正是由于这个脂肪酸嵌入了核内膜, 使得核纤层锚定在核膜上。

根据核纤层的结构、位置和生化行为, 推测其功能与核膜、染色质和整个细胞核的构建有关。核纤层与核膜、染色质及核孔复合体在结构上关系密切。核纤层向外与核内膜上的镶嵌蛋白相连, 起到保持核膜外形及固定核孔位置的作用; 向内则与染色质上的特异部位相结合, 为染色质提供专一附着位点。①在细胞周期中, 核纤层参与核膜的裂解和重建。核纤层

蛋白 A、B 和 C 均有亲膜结合作用,而以蛋白 B 与膜的结合能力最强。核内膜上存在核纤层蛋白 B 的受体,介导蛋白 B 与核膜结合;②核纤层是间期染色质的核周锚定位点。核纤层蛋白 A 和 C 具有与染色质结合的位点,有更强的结合染色质的能力。核纤层与染色质的相互作用有助于维持和稳定间期染色质高度有序的结构,对基因表达的调控意义重大。实验还表明,只有染色质而无完整的核膜是不能进行 DNA 复制的;③在参与基因表达的调控方面,核纤层蛋白 B 与核骨架的基质附着区(MAR)序列有特异的亲和力。MAR 序列结合在蛋白 B 上,可为 DNA 与核纤层的相互作用提供有利条件。核纤层蛋白 B 和某些组蛋白的磷酸化参与了某些基因表达的调控,可诱导细胞的分化。

## 第二节 染色质与染色体

1848 年,Hofmeister 从鸭跖草的小孢子母细胞中发现了染色体。1879 年,Flemming 提出了染色质(chromatin)这一术语,用以描述染色后细胞核中强烈着色的细丝状物质。1888 年,Waldeyer 正式命名染色体为“Chromosome”。后来的研究证明,染色质与染色体是同一物质在细胞周期中周期性相互转化的不同形态表现。

染色质是细胞核内能被碱性染料着色的物质,是遗传物质 DNA 的载体,因而是细胞核内最重要的部分。染色质在间期细胞核中伸展、弥散,呈丝网状分布。当细胞进入有丝分裂时,染色质高度折叠、盘曲而凝缩成条状或棒状的特殊形态,称为染色体。

### 一、染色质的化学组成

染色质是由核酸和蛋白质组成的核蛋白复合体,主要成分是 DNA、组蛋白(histone)、非组蛋白(nonhistones)和少量 RNA,比例为 1 : 1 : 0.5~1.5 : 0.05。可见,DNA 与组蛋白的含量比较恒定,非组蛋白的含量变化较大,RNA 含量最少。

#### (一)DNA

DNA 是染色质中贮存遗传信息的生物大分子,是染色质中结构性质稳定、数量恒定的基本成分。不同动、植物染色质中的 DNA 含量有所不同,但 DNA 含量并不随着生物体的复杂性而增加,许多植物细胞的 DNA 量超过人类数倍。真核细胞的 DNA 除了单一序列外,还有重复序列。

#### (二)组蛋白

组蛋白是染色质中富含精氨酸和赖氨酸的碱性蛋白,带正电荷,可与 DNA 紧密结合,对维持染色质结构和功能的完整性起关键作用。组蛋白和 DNA 结合可抑制 DNA 的复制和转录。

组蛋白是真核细胞特有的蛋白质,根据精氨酸和赖氨酸的比例不同分为 5 种:H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>A、H<sub>2</sub>B、H<sub>3</sub> 和 H<sub>4</sub>。H<sub>1</sub> 是可变的接头组蛋白(linker histone),而 H<sub>2</sub>A、H<sub>2</sub>B、H<sub>3</sub> 和 H<sub>4</sub> 属于高度保守的核心组蛋白(core histone),即 H<sub>2</sub>A、H<sub>2</sub>B、H<sub>3</sub> 和 H<sub>4</sub> 组蛋白在进化过程中高度保守,其含量和结构都很稳定,没有明显的种属和组织特异性。

#### (三)非组蛋白

非组蛋白属于酸性蛋白,含有天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸,带负电荷。非组蛋白在细胞内的含量比组蛋白少,但种类繁多,用双向凝胶电泳可得到 500 多种不同组分。其功能各

异,主要是与核酸合成、分解及染色质化学修饰有关的酶类及部分结构蛋白和调节蛋白。一般认为,非组蛋白与组蛋白结合,能特异性地解除组蛋白对 DNA 的抑制作用,促进复制和转录。

#### (四)RNA

染色质中的 RNA 含量很低,不到 DNA 量的 10%。大部分是新合成的各类 RNA 前体,与 DNA 模板有联系。

## 二、染色质的结构及染色体的组装

人体一个细胞中的 DNA 序列约为  $3 \times 10^9$ bp,连接起来可长达 1.74m。这样长的 DNA 分子要在一个直径仅约  $5\mu\text{m}$  的细胞核内保存并行使功能,如何折叠是非常重要的。现在已知染色体的基本结构是核小体(nucleosome),由核小体再进一步压缩,构成更高级的结构(图 11-4)。

#### (一)核小体

核小体由长约 200bp 的 DNA 和 5 种组蛋白组成。其中,组蛋白  $H_2A$ 、 $H_2B$ 、 $H_3$ 、 $H_1$  各 2 分子组成一个八聚体核心(nucleosome core),DNA 在其外表缠绕 1.75 圈( $\sim 146$ bp),形成直径为 10nm 的“珍珠”状核小体。其余 60bp 左右的 DNA 连接相邻的核小体,对核酸内切酶敏感。组蛋白  $H_1$  位于连接 DNA 上。核小体是染色质的基本结构单位,若干核小体重复排列,便形成直径约 10nm 的串珠状纤维。

核小体核心的装配与两种非组蛋白有关:①与  $H_2A$ 、 $H_2B$  结合的核质蛋白;②与  $H_3$  和  $H_1$  结合的  $N_1$  蛋白。它们和 DNA 混合,随着核质蛋白和  $N_1$  蛋白的释放,形成核心粒。

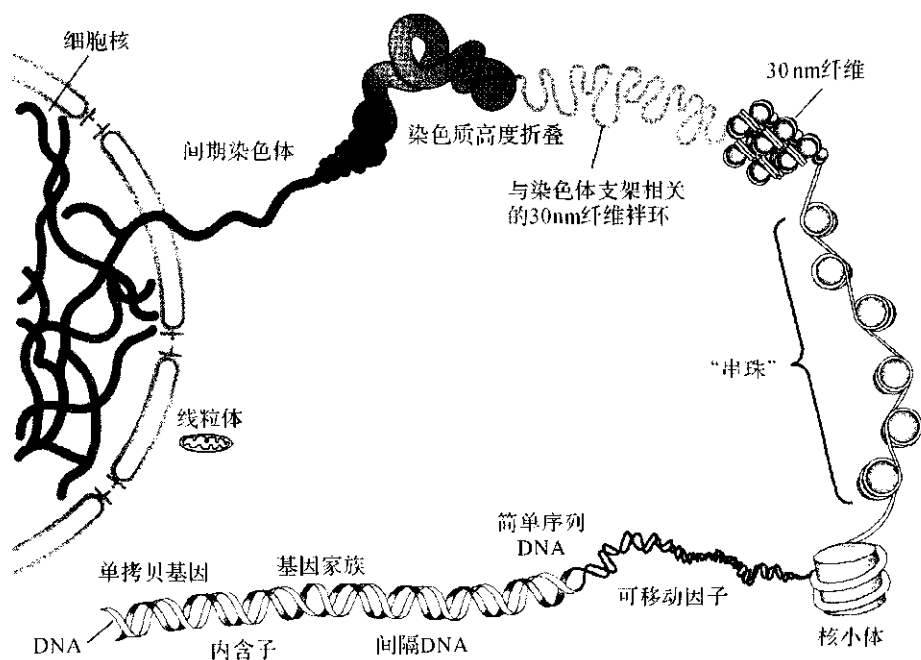


图 11-4 染色体构建的不同层次

## (二)螺线管

电镜下看到的直径 10nm 的串珠状核小体结构,若加入  $Mg^{2+}$ ,则纤丝逐渐变粗,形成直径 30nm 紧密缠绕的螺旋状态,即螺线管(solenoid),即每 6 个核小体绕一圈,形成外径 30nm、内径 10nm、螺距 11nm 的中空管状螺线管。组蛋白  $H_1$  位于中空的螺线管内部,具有成群地与 DNA 结合的特性,是螺线管形成和稳定的关键因素。

## (三)染色体的构建

关于 30nm 的染色质纤维如何进一步压缩形成染色体,自 20 世纪 60 年代以来,科学家们提出了多种模型,其中折叠纤维模型和四级结构模型(又称多级螺旋模型)都在一定程度上解释了染色体的一些复杂现象,但缺乏充足的实验根据。目前,受到人们广泛重视并被接受的是祥环模型(loop model),该模型认为,30nm 的染色质纤维折叠成祥环,祥环沿染色体纵轴由中央向四周放射状伸出,环的基部集中在染色单体的中央,联结在非组蛋白支架上。

1. 染色体支架与祥环结构 如以葡萄糖处理中期染色体,去除组蛋白,在电镜下可观察到由非组蛋白的密集纤维网组成的染色体支架(chromosome scaffold)。组成支架的蛋白种类非常复杂,其中的拓扑异构酶 I (topoisomerase I) 已被鉴定,是中期染色体的一种主要骨架蛋白。锚定在染色体支架上的 DNA 祥环由 30nm 染色质纤维构成。不同祥环的大小可能不同,一般祥环中的 DNA 长度在 30000~100000bp 之间,平均为 63000bp,含 315 个核小体,长约 21 $\mu$ m。一条典型的人染色体可能有 2600 个祥环。

2. 祥环结构进一步组装成染色体 每 18 个祥环以染色体支架为轴心,呈放射状,排列一圈形成微带(miniband),大约 106 个微带沿轴心支架纵向排列便构建成染色单体(chromatid)。因此,微带是染色质的高级结构单位。

## 三、常染色质与异染色质

间期核内的染色质可分为两种类型:处于分散状态、有功能活性(能活跃地进行 DNA 复制和转录)的常染色质(euchromatin);呈凝集状态、转录不活跃或者无功能活性的异染色质(heterochromatin)。常染色质不易着色,多位于核的中部,也往往以祥的形式伸入核仁内;异染色质的螺旋缠绕紧密,着色较深,常分布于间期核的周边,还有一些小块与核仁结合,附着在核仁周围,成为核仁相随染色质的一部分。

异染色质又分为两类,一类是结构异染色质(constitutive heterochromatin),在各种细胞以及细胞周期的不同阶段总是处于致密状态,无转录活性,在染色体上有固定位置,一般为 DNA 重复序列,常见于染色体着丝粒及其周围。另一类为兼性异染色质(facultative heterochromatin),在特定细胞或在一定发育阶段,由常染色质转变而来,原有的基因失去转录活性;如果处于松散状态时,又能转变为常染色质,恢复转录活性。如 X 染色质就是兼性异染色质。

## 四、染色体的形态特征

各种生物的染色体数目和形态各不相同,其数目和形态的变化会影响生物体的功能、形态和遗传的性状。细胞有丝分裂中期的染色体具有稳定的形态结构特征,它由两条姐妹染色单体在着丝粒处相连而成,呈“H”形团块(图 11-5),包括以下几个部分:

### (一) 着丝粒和动粒

着丝粒(centromere)把染色体分成两段(染色体的长臂q和短臂p)。一条染色体通常只有一个着丝粒,在该处,染色体凹陷成为主缢痕(primary constriction)。在主缢痕处两条姐妹染色单体的外侧表层部位具有特殊的结构,称为动粒(kinetochore),是纺锤丝微管的聚合中心之一。

在哺乳动物中,着丝粒由几十万个碱基对组成,包括DNA重复序列、染色体特异序列和非特异序列。基因组DNA经密度梯度离心后,着丝粒DNA在基因组DNA主峰旁形成“卫星”状,称为卫星DNA(satellite DNA)。

着丝粒使染色体在细胞分裂中期连接于纺锤丝上。在细胞分裂后期,微管拉着两条染色单体向细胞两极运动,从而保证了分裂后的两个细胞各得到一份DNA。因此,动粒起着核心作用,控制着微管的装配和染色体的移动。

### (二) 次缢痕

次缢痕(secondary constriction)是某些染色体除主缢痕外的另一处凹陷,染色较浅。次缢痕对于鉴别特定染色体有很大价值,该处的染色质具有缔合核仁的功能,故又称为核仁组织区(nucleolar organizing region, NOR)。

### (三) 随体

某些染色体(如人第13、14、15、21和22号染色体)的短臂末端呈球形或棒状,这一结构称为随体(satellite)。随体通过次缢痕的染色质丝与染色体臂相连,是识别染色体的重要特征。

### (四) 端粒

端粒(telomere)是染色体末端的特化部位,有极性,具有维持染色体结构稳定性的作用。端粒使染色体保持了个体性,染色体之间不会出现端-端融合,也不会端部松散而导致染色体解体。

端粒DNA为一串联重复序列,双链中的一条3'端为富含TG的序列,互补链为富含CA的序列。

染色体端粒的复制是通过端粒酶(telomerase)从延伸后随链亲链开始的。端粒酶由RNA和蛋白质组成,以端粒酶RNA成分中的一段短序列作为模板,不断延长后随链亲链3'端DNA,而延长的后随链亲链又为后随链的合成提供模板,最终使端粒DNA序列3'端突出,形成环状掺入数千碱基对的双螺旋,构成了三链结构。这种结构与特异性端粒蛋白结合,使其结构更加稳定。因此,端粒的构象比端粒DNA序列特征更为重要。

端粒的长度变异很大,取决于端粒酶的活性。体细胞中没有端粒酶的活性,因而体细胞每分裂1次,端粒就缩短一些。随着细胞不断进行分裂,端粒的长度越来越短,当达到临界长度时,细胞染色体便失去稳定性,使细胞不能再进行分裂而进入凋亡。因此,端粒决定了细胞

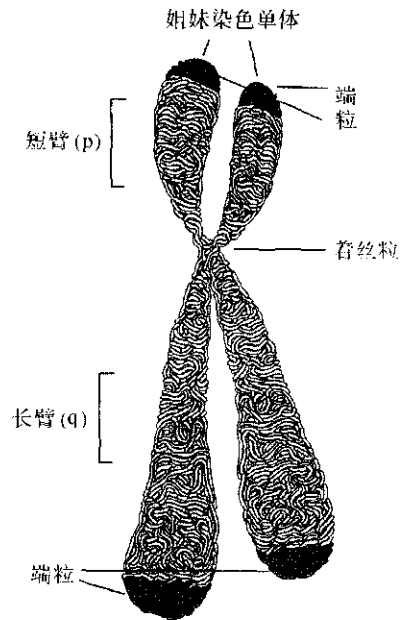


图 11-5 中期染色体的形态

的寿命。生殖细胞不同于体细胞,生殖细胞有端粒酶的活性,其染色体的端粒比体细胞的长出几千个碱基对。然而,恶性肿瘤细胞也有端粒酶的活性,发挥其合成端粒重复序列的功能,以补偿正常的端粒序列丢失,使端粒的重复序列不会达到导致细胞死亡的临界长度,从而获得细胞的“永生性”。这样,恶性肿瘤细胞在体内或体外都能无限制地分裂增殖。

根据染色体的相对大小、着丝粒的位置、臂的长短、次缢痕及随体的有无乃至带型等特征,把某种生物体细胞中的全套染色体(显微照片)按同源染色体配对,依次排列起来,就构成了这一个体的核型(karyotype)(图 11-6)。换言之,核型是光镜下全套染色体的按序排列,用来分析染色体的数目和形态。正常人体细胞为二倍体(2n),有 46 条(23 对)染色体,分为 A~G 七组。第 1~22 对染色体是男女共有的,称为常染色体(autosome),另一对染色体(X, Y)与性别决定有关,称为性染色体(sex chromosome)。男性的正常核型为 46,XY;女性的正常核型为 46,XX。

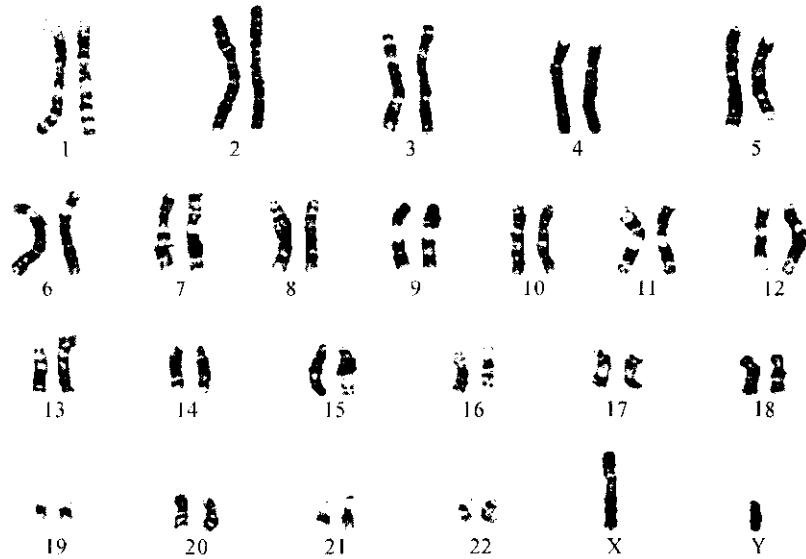


图 11-6 男性体细胞 G 带核型

### 第三节 核仁

核仁(nucleolus)是细胞核内由特定染色体上的核仁组织区缔合形成的结构,是细胞内合成 rRNA、装配核糖体亚基的部位。

#### 一、核仁的形态和化学组成

光镜下,核仁为一强折光性的球状体,其数目和大小依细胞种类及生理状态不同而有很大变化,大多数真核细胞的间期核有 1 个或多个核仁。在蛋白质合成旺盛的细胞中,核仁往往很大或有多,而不具有蛋白质合成能力的细胞则核仁很小,甚至没有核仁。核仁一般位于细胞核的一侧。

有丝分裂时,核仁首先缩小,随着染色体的浓缩,rRNA 合成停止,核仁也就消失了。所以在分裂中期的细胞中看不到核仁。到了分裂末期,rRNA 重新开始合成,核仁又重新出现。

核仁的化学组成是核酸和蛋白质,此外还有少量脂类。其中蛋白质的含量很高,约占核仁干重的 80%,主要是核糖体蛋白、组蛋白和非组蛋白,以及碱性磷酸酶、ATP 酶、RNA 聚合酶等多种酶系。RNA 约占核仁干重的 10%,以 RNP 的形式存在;DNA 约占 8%,主要位于核仁的染色质部分。

## 二、核仁的亚显微结构

核仁呈圆形或椭圆形,外无界膜包围,是由多种组分形成的一种网络结构。电镜下的核仁为裸露无膜、由纤维丝构成的海绵状结构。一般认为,核仁由以下 4 个特征性的基本结构部分组成。

### (一)核仁相随染色质

分为围核仁染色质(perinucleolar chromatin)和核仁内染色质(intranucleolar chromatin)。核仁内染色质是核仁相随染色质的主要部分,具有功能活性,电镜下表现为低电子密度的斑状浅染区,位于核仁的中央。核仁组织区(NOR)是存在于细胞内特定染色体次缢痕处,含有主要 rRNA(18S 和 28S rRNA)基因的一个染色体区段。人类的 rRNA 基因家族(rDNA)位于 5 对染色体(第 13、14、15、21 和 22 号近端着丝粒染色体)的端部,含有 NOR。细胞分裂末期,这 5 对染色体端部先形成 10 个小的核仁,然后很快长大,融合成为 1 个较大的核仁(图 11-7)。

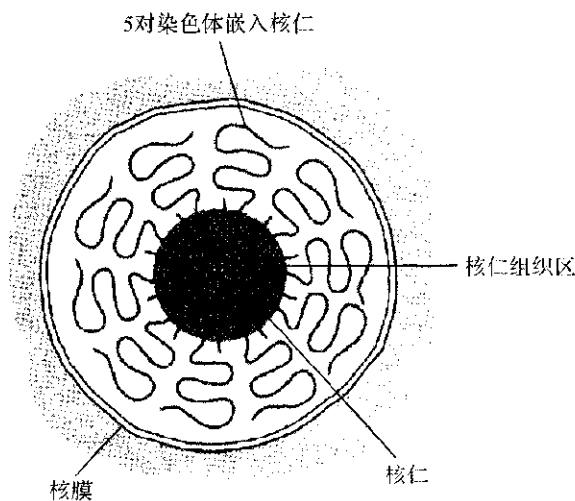


图 11-7 核仁染色质与核仁的形成

### (二)纤维结构

电镜下表现为电子密度致密的部分,呈圆形或半圆形分布在浅染区周围。纤维丝的直径为 5~10nm,长 20~40nm,可被 RNA 酶与蛋白酶消化,说明它们是 RNA 和蛋白质的复合物。由 NOR 转录的 rRNA 与核糖体蛋白构成了核仁的海绵状网架。

### (三)颗粒成分

电镜下表现为高电子密度的颗粒,直径 15~20nm,密布于浅染区及纤维结构的周围。它们的主要成分是 RNA 和蛋白质,可能是核糖体亚基的前体物。

#### (四)核仁基质

核仁基质为无定形的蛋白质性液体物质,电子密度低,是上述三种组分结构的环境。核仁基质与核基质相通,有人认为两者是同一种物质。

### 三、核仁周期

在细胞周期中核仁发生周期性的变化。间期细胞的核仁明显,进入有丝分裂后,随着染色体浓缩,rRNA合成停止,核仁逐渐缩小,最后消失;到了分裂末期开始形成子细胞时,rRNA重新开始合成,核仁又重新出现。可见核仁的周期性变化是与核仁组织区的活动密切相关的。

## 第四节 核基质

核基质(nuclear matrix)是指间期核除核膜、核孔复合体、核纤层、染色质及核仁以外的由纤维蛋白构成的核内网架结构,充满整个核内空间。由于核基质的基本形态与细胞质内的细胞骨架相似,且在结构上有一定的联系,因而又称为核骨架(nuclear skeleton)。

核基质由一些直径3~30nm粗细不等的蛋白纤维和一些颗粒状结构相互联系构成,主要成分是蛋白质,占90%以上。其中包括十多种非组蛋白,相对分子质量为40000~60000,有相当部分是含硫蛋白。此外还含有少量DNA和RNA,RNA和蛋白质结合成RNP复合物,是保持核骨架三维网络的完整性所必需的。

核骨架与细胞骨架的中间丝相联系,起到维持细胞形态结构的作用,也参与核内DNA复制、DNA包装及染色体的构建等一系列核功能活动。

#### 参考文献

1. Antonin W, Matraj IW. Nuclear pore complexes: round the bend? *Nat Cell Biol*, 2005;7(1):10-12.
2. Pante N. Nuclear pore complex structure: unplugged and dynamic pores. *Dev Cell*, 2004;7(6):780-781.
3. Lamond AI, Earnshaw WC. Structure and function in the nucleus. *Science*, 1998;280(5363):547-553.
4. International human genome sequencing consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 2004;431(7011):931-945.
5. Dimitri P, Corradini N, Rossi F, Verni F. The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays*, 2005;27(1):29-31.

(张威宁)

## 专题讲座

## 细胞核内蛋白质动态变化研究进展

在细胞分裂间期,多数真核生物细胞核的大部分体积被染色质和核仁占据,由于核仁外部和染色质之间的区域缺乏基因的存在,近几年越来越受到研究者的关注。有人认为,这一区域为细胞核中大分子物质(如蛋白质、RNA)提供了一个理想的运动平台。后来 Phair 等的试验证明了这一点,他们利用荧光漂白恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)和漂白荧光丢失(flourescence loss in photobleaching, FLIP)术对细胞核中三种蛋白质进行监测,结果发现这些蛋白质在细胞核中确实是运动的,并且以被动扩散的方式进行。此后,研究核蛋白质运动的报道越来越多。迄今为止,还没有人计算出任何一个核蛋白运动的参数,而参数对于了解其运动性质无疑是非常重要的。研究还发现,核内蛋白质的运动速度受到多种因素的影响。例如,组蛋白的乙酰化、磷酸化和细胞核中其他分子的运动,另外,蛋白质在异染色质和常染色质上的运动也不尽相同。探明蛋白质在细胞核中的运动性质并不是研究者的最终目的,重要的是通过研究蛋白质的运动来揭示其对染色质的重塑和基因表达的作用,而这些方面仍待进一步的研究。本文就近几年来核内蛋白质动态变化研究的进展作一综述。

## 一、FRAP 和 FLIP 技术

FRAP 和 FLIP 技术是研究蛋白质在活细胞中运动的两种最重要、最基本的技术,在这两种技术中绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)因其具有独特的优点而被作为标签,指示蛋白质在细胞核中的运动情况。

## (一)绿色荧光蛋白标签

用绿色荧光蛋白标记蛋白质不会显著影响标记蛋白质的性质,也不会影响异源细胞的生理过程,正是由于 GFP 具有这些独特的优点,所以常被用作蛋白质标签。在蛋白质动态变化研究中,常用 GFP 与目的蛋白融合或构建 GFP 嵌合基因使其在细胞中表达,形成嵌合体蛋白,利用 FRAP 和 FLIP 技术的同时借助荧光显微镜可对核内蛋白质的运动进行观察。

## (二)FRAP 和 FLIP 技术

FRAP 可直接在活体细胞中观察到被 GFP 标记的核内蛋白质的运动。在细胞核中选择一个合适的区域用足够强的激光进行光漂白,这种光化学反应可以破坏 GFP 的生色基团,使该点荧光不可逆消失。由于核内蛋白质的运动,用定时显微镜观察该区荧光恢复情况,若有荧光重现,则说明其他区没有漂白的荧光分子移动到了该区,根据恢复时间和恢复率可了解蛋白质在细胞核中的运动情况。而 FLIP 试验则是 FRAP 的一个逆过程,在 FLIP 中选择一个合适的点,每隔一定时间进行激光漂白,如果蛋白质是运动的,那么就会不断有其他区域的同种蛋白质运动到该点而被漂白,该点附近的荧光随着漂白的持续进行而逐渐减弱。目前,FRAP 和 FLIP 已成为研究蛋白质运动必不可少的方法。基于这两种方法,研究者们不仅观察到一些核内蛋白质的动态变化情况,还研究了与蛋白质运动密切相关的细胞核内区

域系统。

## 二、核内蛋白质运动的研究进展

### (一)核内蛋白质是运动的

Phair 等利用 FRAP 和 FLIP 方法研究了活细胞内的 3 种蛋白质,它们分别是核小体结合蛋白(HMG-17)、前体 mRNA 剪切因子(SF-/ASF)和 rRNA 加工蛋白原纤维,涉及到细胞核的三大功能,分别是:转录、前体 mRNA 的剪切和 rRNA 加工,并且它们代表了被观察到的几种蛋白质的最主要运动形式。试验发现,这二种蛋白质在活的细胞核内是运动的。由于它们的 GFP 融合蛋白的运动,荧光漂白后可在 32s 内彻底恢复,恢复速度远远大于组蛋白 GFP-H<sub>2</sub>B 的速度,且荧光恢复率高,几乎可以完全恢复。据初步计算,一个 GFP-HMG-17 分子在 28s 内走大约 5 $\mu$ m 的距离,这个距离基本上是从核心到核膜的距离。相应的 GFP-SF-/ASF 和 GFP-原纤维蛋白从核心到核膜分别是 52s 和 24s。因此,这几种蛋白质在细胞核内是快速运动的,几乎不存在不运动的区域。

异染色质蛋白 1(heterochromatin protein 1,HP1 $\beta$ )是浓缩 DNA 的一个主要成分,定位于异染色质着丝粒簇,在常染色质上也有分布,涉及到基因沉默和着丝粒聚合。它在激活的 T 细胞里快速运动,但在异染色质和常染色质上的运动情况有几点不同,这可从 GFP-HP1 $\beta$  的荧光恢复情况得出。首先,荧光漂白后,异染色质在 150~200s 内可恢复 70% 的荧光,而在常染色质上 90~100s 内大部分荧光都可恢复;其次,荧光半数恢复时间不同,异染色质大约需 50s,而常染色质只需 10s;最后,荧光的恢复率不同,异染色质上有 30% 的荧光不可恢复,而常染色质上只有 10%。这说明了 HP1 $\beta$  在异染色质上的结合强度比常染色质大。

组蛋白 H<sub>1</sub> 也有类似的运动情况。Misteli 等和 Lever 等研究 H<sub>1</sub> 在细胞核内的运动时发现,H<sub>1</sub> 在整个细胞周期中都与染色质结合,它可以在异染色质区和常染色质区间交换而不需要染色质纤维和纤维之间的相互作用。但在 FRAP 试验中,H<sub>1</sub> 在异染色质上的量要比常染色质上的多,说明 H<sub>1</sub> 与异染色质的结合比与常染色质的结合牢固。GFP-H<sub>1</sub> 在活体染色质上的停留时间为 220s 左右,10min 内 H<sub>1</sub>-GFP 在整个细胞核中重新分布,与之相对比,GFP-H<sub>2</sub>B 在 30min 内几乎没有什么变化。H<sub>1</sub> 首先在核质中分布,然后与染色质重新结合,这种结合机制可以通过“stop-and-go”学说来解释:H<sub>1</sub>-GFP 在染色质上停留大约 220s 左右,然后从染色质上解离,在核质中漫游,直到碰到下一个合适的位点并与之结合。与之类似的是 20 世纪 90 年代初提出的“hit-and-run”转录因子动态变化模式。McNally 等应用这种模式描述了糖皮质激素受体在染色质和核质区域间快速交换的过程。

此外,Houtsmuller 等利用 GFP 标记核酸内切酶 ERCC1/XPF 复合物。研究发现,这个复合物在 DNA 损伤前后都是快速运动的,但是当紫外线照射细胞引起 DNA 损伤时,该复合物则表现了短暂的停留,可能是复合物与 DNA 损伤位点结合的缘故。2000 年,Moir 等观察到了核纤层蛋白 A(lamin A)和 B1 在细胞有丝分裂中期和 G<sub>1</sub> 期的动态变化情况。不仅如此,雌激素受体、蛋白酶体和其他几个核仁蛋白在活细胞内的运动情况也曾被报道。

总之,一些核蛋白质在细胞核中是运动的,并且在常染色质和异染色质上有所不同。虽然这种运动相对是快速的,但是与 GFP 蛋白相比却慢得多,可能是因为这些蛋白质和染色质的结合阻碍了它们的自由运动。

## (二) 细胞核内区域与蛋白质的运动

研究某种核蛋白的运动,首先要了解这种蛋白质在核中的定位,细胞核内区域则是这些蛋白质聚集的所在地。在早期研究中,这些区域在显微镜下呈小斑点状(speckle),并且发现斑点具有高度的动态变化,对其附近基因的激活产生特异性的应答,而且一些小的微粒能和它不断地结合和解离。但小斑点本身是稳定的,在观察过程中几乎没有移动位置。

进一步的研究发现,这些斑点实际上是同种蛋白质的集合,类似于细胞质中的膜被系统。1998年,Lamond等曾用“compartment”一词来描述细胞核中被隔开的一类特殊区域。众所周知,在细胞质内存在一些膜被区室系统,如内质网、线粒体和高尔基复合体等,这些膜被区域对蛋白质的分选具有重要的作用。细胞核中的区域与膜被区室所不同的只是它没有膜的包被,仅是一些生物大分子物质的聚集,这些同一区域内的分子具有一致的动态变化性质,因此认为这些分子是同质的,即具有类似的运动性质和作用。例如,在细胞核中有几个不同的区域(原纤维中心、前体 rRNA 剪切因子区域等)已经被鉴别。这些区域本身是一个稳定的结构,在设定的细胞核位置持续较长的时间,不移动位置。但是蛋白质可以和各自的区域迅速地结合和解离,使区域处于持续的动态平衡状态。因此,细胞核内区域系统和蛋白质的运动是密切相关的。

综上所述,在活细胞核内,核蛋白可以持续、快速地和各自的区域结合或者解离,并且蛋白质的运动可以从核质到核仁,不局限于一个特定的细胞核区域。

## (三) 核内蛋白质的运动方式

大分子物质在细胞内转运有两种方式,一是通过载体运输,需消耗能量;二是被动扩散,不需要 ATP,即不依赖于代谢的能量而进行运动。当降低温度时,细胞核的几种蛋白质的运动几乎没有什么变化,因此可以认为,核蛋白质的运动是不依赖于以 ATP 形式存在的代谢能量而进行的,类似的现象也出现于 GFP-HGM-14、Pre-mRNA、SC35、核仁素等核蛋白。Lever 等也发现  $H_1$  的快速运动是个不需要能量的过程,它可能以一种被动扩散的方式进行,不需要载体和消耗能量。但是,这并不能排除一些蛋白质或蛋白质的一部分是通过直接转运、主动运输的机制而进行运动的。例如,糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)在染色质重塑因子 hBRG1 存在时,从浓缩的染色质上脱落下来则是一个需要能量的过程。虽然如此,主动运输对蛋白质的运动来说并不是必需的,因为被动扩散是一个非常有效的转运模式。例如,一个单基因表达的蛋白质在几秒之内可以转遍整个细胞核,甚至大分子复合物在几分钟内也很容易地从细胞核心到核膜。高速运动可以使蛋白质在核质中漫游,直到碰到它们的靶位点并与之结合,这种“浏览”的方式不需要特定的靶信号和信号识别机制,完全是一种随机的运动。此外,这种被动扩散的运动方式也节约了能量。

## (四) 共价修饰对核内蛋白质运动的影响

影响蛋白质在核内运动的因素很多,如蛋白质之间的相互作用,蛋白质和核内其他组分的相互作用,蛋白质和染色质的相互作用,以及染色质的结构、蛋白质的共价修饰。其中共价修饰对蛋白质的影响是研究得比较清楚的。

1. 磷酸化对核内蛋白质的影响 核内蛋白质的运动是不依赖能量的过程,但当细胞和消耗 ATP 的试剂孵育后,组蛋白  $H_1$  在核内的运动发生变化。变化的原因可能是组蛋白  $H_1$  翻译后的修饰或者是一种或多种蛋白质调控了  $H_1$  和染色质的结合。

2. 乙酰化对核蛋白运动的影响 核心组蛋白乙酰化后改变了染色质的结构,从而使染

染色质结构松散,使重塑因子接近 DNA。但核心组蛋白的乙酰化对组蛋白 H<sub>1</sub> 运动的影响尚不清楚。Misteli 等曾用去乙酰化抑制剂(TSA)处理细胞,使 4 种核心组蛋白的乙酰化水平增高,结果表明,H<sub>1</sub>-GFP 的恢复速度明显快于没有处理的细胞,说明在 TSA 处理细胞中 H<sub>1</sub>-GFP 在染色质上的停留时间缩短。这种交换速度的增加不是细胞转录激活的增加,因为当用  $\alpha$ -鹅膏蕈环肽处理时对荧光恢复率没有任何影响。故核心组蛋白的高度乙酰化增加了组蛋白 H<sub>1</sub> 在染色质上的交换率,可能是部分激活的染色质在清除了 H<sub>1</sub> 后,加入了乙酰化的核心组蛋白。在活细胞内,这种结合的动态变化属性是连接组蛋白作为染色质重塑和染色质调节因子的一个重要特征,即组蛋白 H<sub>1</sub> 从染色质上丢失是染色质重塑中的一步。

除了这两种常见的共价修饰外,甲基化对蛋白质的运动也有一些影响。

### 三、核内蛋白质运动的意义

蛋白质在细胞核中的运动是以被动扩散的方式进行的,一个蛋白分子遇到特定的区域或一个结合位点是一个随机的过程。蛋白质在细胞核中动态的性质符合基因表达的随机机制。基因的激活需要染色质的重构和随后的转录因子聚集,这两个过程被蛋白质之间的相互作用或预先聚集的组合元件之间的相互作用所驱动。而形成中间聚集物的形式则被聚集复合物停留时间和每个元件在聚集位点的可能性所影响,聚集点又被蛋白质在细胞核内的运动情况所决定。例如,如果因子在介质中的驻留是不可能的,这个聚集过程将被终止。在染色质重构期间,转录激活子——重构复合物的招募者仅仅和染色质短暂地结合,如果染色质的修饰在激活子停留时间内激活,激活子将解离。例如,HP1 $\beta$  和异染色质与常染色质的动态结合潜在地调节了一些因子进入染色质,这些因子包括核小体修饰转移因子和涉及 DNA 功能的代谢分子。HP1 $\beta$  的高速运动并不能彻底阻止这些因子进入组蛋白的尾部,而是间歇性地允许其他因子进入染色质以调控其重塑。

近来,Cheutin 等研究了 HP1 和染色质的动态结合,这种结合可能对染色质结构的建立和转录抑制的维持起着重要作用。试验证明,异染色质结构稳定的维持涉及到 HP1 和染色质短暂的结合和动态的交换,HP1 的动态变化和染色质浓缩水平有关。

### 四、展望

对于一个蛋白质来说,研究它的运动形式不是最终目的,重要的是通过它的运动性质探讨这种蛋白质对基因的作用,因为蛋白质只有通过运动与其靶位点结合,才能调控基因的转录和蛋白质的合成。因此,研究蛋白质的运动,对于了解细胞核内的组织形式和细胞核的功能,从而研究基因在三维空间的表达调控具有非常重要的意义。运用计算机来分析从活细胞内获得的蛋白质的动力学资料,并对这些资料进行量化,从而获得计算模型,是现在和今后研究蛋白质性质及其功能的一个新途径。

### 参考文献

1. Pederson T. Protein mobility within the nucleus what are the right moves? *Cell*, 2001; 104(5): 635-638.
2. Phair RD, Misteli T. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*. 2000; 404(6778): 604-609.

3. Festenstein R, Pagakis SN, Hiragami K, Lyon D, Verreault A, Sekkali B, Kioussis D. Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary mammalian cells. *Science*, 2003; 299(5607): 719–721.
4. Misteli T, Gunjan A, Hock R, Bustin M, Brown DT. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, 2000; 408(6814): 877–881.
5. Lever MA, Th'ng JP, Sun X, Hendzel MJ. Rapid exchange of histone H1. 1 on chromatin in living human cells. *Nature*, 2000; 408(6814): 873–876.
6. McNally JG, Muller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL. The glucocorticoid receptor; rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science*, 2000; 287(5456): 1262–1265.
7. Houtsmuller AB, Rademakers S, Nigg AL, Hoogstraten D, Hoijmakers JH, Vermeulen W. Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science*, 1999; 284(5416): 958–961.
8. Moir RD, Yoon M, Khuon S, Goldman RD. Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *J Cell Biol*, 2000; 151(6): 1155–1168.
9. Misteli T, Caceres JF, Spector DL. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*, 1997; 387(6632): 523–526.
10. Carmo-Fonseca M. The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation. *Cell*, 2002; 108(4): 513–521.
11. Misteli T. Protein dynamics; implications for nuclear architecture and gene expression. *Science*, 2001; 291(5505): 843–847.
12. Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB, Misteli T. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science*, 2003; 299(5607): 721–725.

(南京农业大学 王爱侠、陈杰、刘红林)

## 第十二章 细胞的物质运输

细胞的物质运输可分为三种不同的范畴,细胞通过细胞膜与其生活环境间的物质交换(细胞运输);细胞与细胞之间的物质交换(转细胞运输);细胞内的物质运输(胞内运输)。细胞的物质转运对于维持细胞的正常生命活动具有非常重要的意义,人类的一些疾病与细胞的物质运输异常有着密切的关系。

### 第一节 细胞内外的物质转运

细胞与其生存的环境之间不断地进行着物质交换,以维持正常的生命活动。细胞膜是细胞与环境之间物质交换的必由之路,细胞膜的结构特点决定了它既是细胞内外环境的屏障,又是有选择性地物质交换的场所。细胞膜对出入细胞的物质具有选择通透性,即有选择地允许或阻止一些物质通过细胞膜,这对保证细胞正常生命活动有重要意义。虽然,细胞内外物质的交换有许多不同的机制,但总的来看,与细胞膜有关的物质运输方式主要有2种:一是小分子和离子的跨膜运输,另一种是大分子和颗粒物质的膜泡运输。

#### 一、离子和小分子物质的运输

细胞膜具有控制离子和小分子物质通过的能力,允许小分子物质通过扩散作用穿过细胞膜,允许水分子通过渗透作用进出细胞质膜。但是,扩散和渗透是两个不同的概念(图12-1)。

扩散(diffusion)是指物质(溶质)沿着浓度梯度从半透性膜相对浓度高的一侧向相对浓度低的一侧移动的过程,通常把这种过程称为简单扩散。

渗透(osmosis)则指水分子以及溶剂通过半透性膜从相对浓度高的一侧向相对浓度低的一侧移动的过程。

细胞质膜的通透性具有以下几个特点(图12-2):

1. 脂溶性越强的分子越容易穿过质膜。非极性物质比极性物质更容易溶于脂质,因而也更容易透过质膜。但水分子例外,它虽难溶于脂,但穿膜速度却很快。

2. 小分子比大分子更容易穿膜。但分子的脂溶性要比其体积大小更为重要,脂溶性高的分子通常比脂溶性低的小分子能更快地穿膜。

3. 不带电荷的分子容易穿膜,同样大小的物质的穿膜速度,电解质比非电解质慢,强电解质比弱电解质慢。电解质慢的原因是离子难溶于脂质,且离子带有水膜,增大了有效体积。

4. 绝大多数离子及亲水性分子的穿膜要依赖于专一的跨膜蛋白。

上述特点说明,膜对物质的通透性是由物质本身性质和膜的结构属性共同决定的,小分