

原生动物纤毛虫皮层细胞骨架的研究进展

赵柳 张莹 顾福康*

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要:总结了应用显微和亚显微技术、生化去膜和扫描电镜术、免疫荧光显微术等显示的原生动物纤毛虫皮层细胞骨架的基本结构,以及皮层细胞骨架结构组分中 α - β -和 γ -微管蛋白、表质蛋白和联结蛋白、中心蛋白等的功能特征,并分析了未来研究的基本趋势。

关键词:原生动物;纤毛虫;皮层细胞骨架

中图分类号:Q959 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)05-114-05

Cortical Cytoskeleton in Ciliates

ZHAO Liu ZHANG Ying GU Fu-Kang

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The cortical cytoskeleton of ciliates has been revealed by light microscopy, electron microscopy, biochemical de-membrane technique and immunofluorescent staining. The functions of the cortical components, including α - β - and γ -tubulin, epiplasmin, articulon and centrins etc., are discussed, and the research trend is proposed as well.

Key words: Protozoa; Ciliate; Cortical cytoskeleton

在原生动物纤毛虫中,细胞皮层是与多种结构成分联系的一种镶嵌式构造,包括表膜、表膜下纤维系统和其他多种结构,例如:纤毛(或鞭毛)及其联系的纤维结构、表膜泡、各种脊结构、表膜下微管结构,还有皮层线粒体和其他有关细胞器等等。原生动物皮层细胞骨架的研究,从皮层结构模式及形态发生的描述开始,近些年来逐渐集中到皮层细胞骨架整体性的结构、皮层形态发生决定及其在细胞生命活动中的重要性的探索,目前不仅在显微和亚显微水平,并在分子水平上已积累了较多的资料。

1 皮层细胞骨架结构

1.1 早期研究 许多原生动物具有极其复杂的皮层结构,搞清楚其皮层细胞骨架的形态,对于深入揭示真核细胞的结构模式具有重要意义。在皮层细胞骨架的研究中, Jurand 等利用银浸法和透射电镜术的观察结果,构建了双小

核草履虫(*Paramecium aurelia*)皮层三维结构图^[1]。Grim 应用透射电镜术和蛋白银染色方法,显示了阔口游仆虫(*Euplotes eurystomus*)的表膜下微管和施氏腹柱虫(*Gastrostyla steinii*)的棘毛基部骨架,并构建了其棘毛基部骨架的三维图像^[2,3]; Matsusaka 等以透射电镜术的结果为基础,构建了苔藓织毛虫(*Histiculus muscorum*)一根棘毛基部骨架为单元的三维图^[4]。所述的这些在显微和亚显微水平的工作,为纤毛虫皮层细胞骨架的进一步研究奠定了基础。

1.2 应用生化去膜技术和扫描电镜术显示的纤毛虫皮层细胞骨架 Grim 等成功地应用生化去膜技术和扫描电镜术相结合的方法显示了

基金项目 国家自然科学基金(No.30470201);

* 通讯联系人, E-mail: fkgu@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 赵柳,男,博士研究生,研究方向:动物细胞与分子生物学。

收稿日期:2005-03-14, 修回日期:2005-07-19

游仆虫表膜下纤维层、口皮层纤维和纤毛器水平的纤维骨架等立体结构,将纤毛虫皮层细胞骨架的形态观察从二维水平发展到三维水平^[5];Williams 等应用改进的生化去膜技术提取四膜虫(*Tetrahymena*)口区纤维骨架,取得了较理想的结果^[6,7];顾福康等应用 Williams 改进的生化去膜技术进一步获得了游仆虫腹面皮层口围带托架、波动膜托架以及额腹横棘毛区表膜下和背面表膜下纤维层的结构^[8];庞延斌等应用同样方法获得了镰游仆虫(*Euplotes harpa*)和有肋楯纤虫(*Aspidisca costata*)的部分纤毛器骨架和非纤毛器骨架的局部形态,并描绘了毛基体托架的模式图^[9]。但是,上述的研究仅局限在少数纤毛虫的皮层某一部位或是某些纤毛器的局部骨架上,多年来尚无新的进展。

为从细胞局部结构和细胞整体水平深入了解纤毛虫皮层细胞骨架的立体构型,顾福康等继续应用改进的生化去膜方法对镰游仆虫(*Euplotes harpa*)腹面皮层细胞骨架做了深入的观察,详细描述了处于毛基体和毛基体下水位的口围带、口侧膜、额腹横棘毛骨架,以及口围带小膜托架、口侧膜托架、额腹横棘毛托架的主要附属纤维和非纤毛区表膜下皮层骨架的立体图形,对构建纤毛虫皮层细胞骨架的三维图形,提供了较详细的和接近纤毛器整体水平的资料^[10]。所得结果表明,纤毛器托架附属纤维可能与细胞内各种纤毛器间的联系以及包括纤毛器运动在内的整个细胞运动的协调有关;朱慧等进一步显示了小游仆虫(*Euplotes gracilis*)皮层细胞骨架中由非纤毛区皮层骨架、纤毛器骨架及其附属纤维等构成的三维结构网架,其中各类细胞骨架以纤维为基本成分组成纤维网、纤维层、纤维束和纤维薄片等不同形态单元。并据结果认为,游仆虫表面形成区域化结构,可能与细胞表面各部分的联系及其细胞和环境的相互作用有关,纤毛器骨架中各个纤毛器的毛基体复合结构可能对纤毛器托架和骨架附属纤维等起到微管组织中心的作用^[11]。

1.3 用免疫学方法及荧光显微术显示的纤毛虫皮层微管骨架 近年来已开始应用直接免疫

荧光标记方法和间接免疫荧光标记等方法显示纤毛虫微管骨架。Arregui 等利用 β -微管蛋白抗体标记和鞣酸-透射电镜术,在 *Euplotes focardii* 中,显示左侧表膜下纤维被一个复杂的微管系统增强和副小膜中存在一个发达的微管网络^[12]。此后,Arregui 等将已在哺乳动物微管骨架研究中成功应用的 FLUTAX 引入到纤毛虫骨架研究中来,显示了几种纤毛虫的表膜下纤维系统^[13]。与以往的蛋白银染色方法相比,该方法步骤简单,操作简便,并且效果良好;梁爱华等应用 γ -微管蛋白抗体标记八肋游仆虫(*Euplotes octocarinatus*)结果显示荧光标记出现在纤毛、棘毛基部,即基体的部位^[14];田沁等利用 α -、 β -微管蛋白抗体标记包囊游仆虫(*E. encysticus*)其中所有纤毛器包括纤毛杆及其基体都显示荧光,其腹面可见强荧光标记的口围带基体和短纤毛杆,被标记的还有位于腹面的口侧膜和额腹横棘毛和尾棘毛,以及侧面呈点状排列的背触毛基体^[15]。上述研究,已经开始将纤毛虫皮层细胞骨架的研究聚焦在微管及其微管组分的水平。

2 皮层细胞骨架结构组分

2.1 α - β -微管蛋白 目前在原生动中已经发现多种微管蛋白,其中 α - β -微管蛋白构成微管蛋白异二聚体,是微管的基本成分。但大多数纤毛虫只含有少量 α - β -微管蛋白的基因,或其中许多只有 1 套编码 α - β -微管蛋白的基因^[16,17];在鞭毛虫中,只有一条编码 α -微管蛋白的基因 ATT1 2 条编码 β -微管蛋白的基因 BTU1 和 BTU2^[18]。虽然编码微管蛋白的基因少,但是微管蛋白的种类却很多,例如四膜虫中已经发现有 5 种 α -微管蛋白和 3 种 β -微管蛋白^[19],目前已知的微管蛋白翻译后修饰有 C 末端酪氨酸切除(α -微管蛋白)、乙酰化(α -微管蛋白)、磷酸化(α -、 β -微管蛋白)、谷氨酰化(α -、 β -微管蛋白)、甘氨酸化(α -、 β -微管蛋白)^[20]。鞭毛虫中大多数鞭毛的 α -微管蛋白发生乙酰化。利用经特殊修饰的抗体定位细胞中的 α -微管蛋白乙酰化、谷氨酰化和甘氨酸化的分布,发现鞭毛虫

中这 3 种修饰的定位与草履虫中的相似^[21~23]。 α -微管蛋白乙酰化分布最广泛,但在细胞质微管中不存在;谷氨酰化存在于鞭毛及其基体、纺锤体和其他细胞质微管;甘氨酰化只存在于纤毛和纤毛后微管^[22,23]。

2.2 γ -微管蛋白 γ -微管蛋白是细胞内微管组织中心的主要成分,对微管的集结(Nucleation)有直接作用,是起始 α - β -微管蛋白异二聚体装配成微管多聚体所必需的。 γ -微管蛋白存在于游仆虫的所有基体,在有些分裂间期及有丝分裂期小核内以及部分大核内存在。梁爱华利用 PCR 技术从八肋游仆虫 DNA 中扩增出 γ -微管蛋白基因并对其核苷酸序列进行了分析^[14],并在八肋游仆虫和厚形游仆虫(*E. crassus*)中都发现了 2 条编码 γ -微管蛋白的基因(γ -tub1 和 γ -tub2)。这 2 条基因都是由 3 个外显子、2 个内含子和 2 个末端非编码序列组成,并且都编码 462 个氨基酸的多肽。他们有 76% 的核苷酸序列相似,86% 的氨基酸序列相似,其他生物的 γ -微管蛋白编码基因也有 61% ~ 92% 的序列同源。但是这 2 条基因的序列、密码子、转录起始位点和 PolyA 位点都不同,其中 γ -tub2 包含 2 组 UGA 密码子,而 γ -tub1 没有 UGA 密码子;另外, γ -tub1 含有 3 个转录起始位点和 2 个 PolyA,而 γ -tub2 只有 1 个转录起始位点和 1 个 PolyA^[24]。

2.3 表质蛋白和联结蛋白 表质(epiplasm)是原生动物的皮层中又一种独特的结构,对细胞皮层的模式形成和细胞形状的维持有重要作用。在四膜虫中,表膜的主要蛋白有 EpiA、EpiB 和 EpiC^[25],其中 EpiC 分布最广,利用基因敲除技术,发现其对细胞形状的维持和皮层的发育有重要作用^[26]。在鞭毛虫中,表质的主要成分是表质蛋白(epiplasmin);在伪小胸虫(*Pseudomicrothorax*)中,表质的主要成分联结蛋白(articulin)是一种新发现的骨架蛋白,在细胞皮层内广泛存在^[27]。利用分子生物学方法亲和纯化,选出适合的多克隆抗体,用于确认联结蛋白和表质蛋白抗原决定部位的特征,并发现联结蛋白和表质蛋白对原生物细胞膜骨架的组

装都有作用。四膜虫和伪小胸虫的表质连续地贯穿整个皮层,鞭毛虫的表质则是不连续的,由网格状纤维联系。游仆虫拥有一层位于质膜下的连续结构,他维持细胞的形状和硬度。Kloetzel 等发现皮层‘表膜泡板’(alveolar plates)的主要成分为 α - β - γ -plateins,这 3 种蛋白具有联结蛋白的特性,其中含有一段突出的 12 个氨基酸串连重复的区域,富含缬氨酸和脯氨酸,另外还有一段较短的重复区域。每个 platein 序列的 N 末端都存在一个疏水肽。利用免疫荧光电镜术,将抗 platein 的抗体作为探针,揭示在形态发生过程中新的表膜泡板比亲代模糊,在 plate 装配时,plates 以易溶的形式存在^[28]。

2.4 中心蛋白 中心蛋白是普遍存在于生物体中的钙结合蛋白,这些钙结合蛋白与中心体或基体紧密连接^[29]。在细胞内,除了作为中心体的主要成分,与细胞分裂有关外,还与形成细胞骨架网格结构有关。Lemullois 等研究了中心蛋白的分布和行为,在魏氏拟伪柱虫(*Paraurostyla weissei*)中,利用特殊的抗体和一维、二维电泳,发现 21 ku 和 24 ku 两种中心蛋白。通过免疫荧光分析,发现这 2 种蛋白在间期细胞和形态发生中呈现非重叠定位,定位在与口部基体相连的纤维状网格结构。在形态发生中,21 ku 中心蛋白定位于基体,而 24 ku 中心蛋白定位于小根纤维,并与基体紧密连接。在纤毛虫中,不溶的中心蛋白和类中心蛋白可以装配成多聚体,构建收缩的细胞骨架网络结构^[30]。

3 研究展望

在纤毛虫皮层细胞骨架的研究中,目前对于皮层整体结构和同一纤毛器骨架及不同纤毛器骨架在不同水平的形态的研究还不多,而且研究对象也只局限在游仆虫等几种纤毛虫,看来很有必要对更多的纤毛虫的皮层骨架进行研究分析,为构建整体水平的纤毛虫皮层细胞骨架的三维图形提供更多的资料。

在纤毛虫细胞周期中,皮层结构都要按照原有的模式经历一个复制的过程,其中一个重要特征就是大量的基体要进行复制和组装,但

是由于基体装配过程极其复杂,并且对于基体进行提取和生化分析非常困难,目前对调控基体装配的分子机制还知之甚少。揭示基体组装的分子机制,对揭示皮层模式在细胞周期中的复制、重建和调控等问题有重要意义。

随着原生动动物纤毛虫中皮层骨架蛋白的不断发现,利用基因敲除、基因沉默、免疫荧光等技术,进行结构、功能和细胞定位的研究,从而更深入地探索皮层分化和皮层模式形式的机理,是很有必要的。

参 考 文 献

- [1] Jurand A, Selman G G. The anatomy of *Paramecium aurelia*. New York: Macmillan Mac St Martin Press, 1969.
- [2] Grim J N. Ultrastructure of pellicular and ciliary structures of *Euplotes eurytomus*. *J Protozool*, 1967, **14**: 625 ~ 633.
- [3] Grim J N. Fine structure of the surface and infraciliature of *Gastrostyla steinii*. *J Protozool*, 1972, **19**: 113 ~ 126.
- [4] Matsusaka T, Nakamura T, Nagata K. Ultrastructure, disintegration and formation of a cirrus in the vegetative, encysting and excysting ciliate, *Histiculus muscorum*. *J Electron Microsc*, 1984, **33**: 217 ~ 229.
- [5] Grim J N. Subpellicular microtubules of *Euplotes eurytomus*: their geometry relative to cell form, surface contours and ciliary organelles. *J Cell Sci*, 1982, **56**: 471 ~ 484.
- [6] Williams N E, Bakowska J. Scanning electron microscopy of cytoskeleton elements in the oral apparatus of *Tetrahymena*. *J Protozool*, 1982, **29**: 382 ~ 389.
- [7] Williams N E. The nature and organization of filaments in the oral apparatus of *Tetrahymena*. *J Protozool*, 1986, **33**: 352 ~ 358.
- [8] 顾福康, 张作人. 一种游仆虫皮层纤维结构的扫描电镜研究. *动物学研究*, 1991, **12**(4): 337 ~ 341.
- [9] 庞延斌, 傅振幸, 任鸿林. 镰游仆虫 *Euplotes harpa* 的皮层细胞骨架构造. *华东师范大学学报*, 1992 (神经生物学和原生动生物学专辑): 46 ~ 60.
- [10] 顾福康, 邹士法, 李艺松等. 镰游仆虫皮层细胞骨架的扫描电镜观察. *动物学报*, 2003, **49**(4): 513 ~ 521.
- [11] 朱慧, 邹士法, 李艺松等. 用非离子去垢剂抽提获得的小游仆虫皮层细胞骨架的构形. *动物学研究*, 2004, **25**(5): 422 ~ 428.
- [12] Arregui L, Serrano S, Guinea A. Microtubular elements of the Marine Antarctic Ciliate *Euplotes focardii*. *Arch Protistenkd*, 1994, **144**: 357 ~ 364.
- [13] Arregui L, Munoz-Fontela C, Serrano S, et al. Direct visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliated protozoa with a fluorescent taxoid. *J Eukaryot Microbiol*, 2002, **49**: 312 ~ 318.
- [14] 梁爱华. 八肋游仆虫 γ -微管蛋白及其基因的研究. *水生生物学报*, 1998, **12**(4): 325 ~ 329.
- [15] 田沁, 张莉, 隋淑光等. 休眠期和营养期包囊游仆虫的纤毛器骨架及其微管蛋白. *动物学研究*, 2002, **23**(5): 405 ~ 408.
- [16] Gaertig J, Thatcher T H, McGrath K E, et al. Perspectives on tubulin isotype function and evolution based on the observations that *Tetrahymena thermophila* microtubules contain a single α - and β -tubulin. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1993, **25**: 243 ~ 253.
- [17] Silflow C D. Why do tubulin gene families lack diversity in flagellate/ciliate protists? *Protoplasma*, 1991, **164**: 9 ~ 11.
- [18] McGrath K E, Yu S M, Heruth D P, et al. Regulation and evolution of the single alpha-tubulin gene of the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Cell Motil Cyt*, 1994, **27**: 272 ~ 283.
- [19] Gaertig J, Cruz M A, Bowen J, et al. Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *J Cell Biol*, 1995, **129**: 301 ~ 310.
- [20] MacRae T H. Tubulin post-translational modifications enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem*, 1997, **244**: 265 ~ 278.
- [21] Adoutte A, Delgado P, Fleury A, et al. Microtubule diversity in ciliated cells: evidence for its generation by post-translational modification in the axonemes of *Paramecium* and quail oviduct cells. *Biol Cell*, 1991, **71**: 227 ~ 245.
- [22] Callen A M, Adoutte A, Andrew J M, et al. Isolation and characterization of libraries of monoclonal antibodies directed against various forms of tubulin in *Paramecium*. *Biol Cell*, 1994, **81**: 95 ~ 119.
- [23] Levilliers N, Fleury A, Hill A M. Monoclonal and polyclonal antibodies detect a new type of post-translational modification of axonemal tubulin. *J Cell Sci*, 1995, **108**: 3 013 ~ 3 028.
- [24] Tan M, Heckmann K. The two γ -tubulin-encoding genes of the ciliate *Euplotes crassus* differ in their sequence, codon usage, transcription initiation sites and poly(A) addition sites. *Gene*, 1998, **210**(1): 53 ~ 60.
- [25] Honts J E, Williams N E. Novel cytoskeleton proteins in the cortex of *Tetrahymena*. *J Eukaryot Microbiol*, 2003, **50**: 9 ~ 14.
- [26] Norman E W. The Epiplasm gene EPC1 influence cell shape and cortical pattern in *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol*, 2004, **51**(2): 201 ~ 206.
- [27] Huttenlauch I, Peck R K, Plessmann U, et al. Characterization

- of two articulins ,the major epiplasmic proteins comprising the membrane skeleton of the ciliate *Pseudomicrothorax*. *J Cell Sci* ,1998 ,**111** :1 909 ~ 1 919.
- [28] Kloetzel J A ,Baroin-Tourancheau A ,Cristina M ,*et al* . Cytoskeletal proteins with N-terminal signal peptides :plateins in the ciliate *Euplotes* define a new family of articulins. *J Cell Sci* , 2002 ,**116** :1 291 ~ 1 303.
- [29] Klotz C ,Garreau de Loubresse N ,Ruiz F ,*et al* . Genetic evidence for a role of centrin-associated proteins in the organization and dynamics of the infraciliary lattice in *Paramecium*. *Cell Mot Cyt* ,1997 ,**38** :172 ~ 186.
- [30] Lemullois M ,Fryd-Versavel G ,Fleury-Aubusson A. Localization of Centrins in the Hypotrich Ciliate *Paraurostyal weissei*. *Protist* 2004 ,**155**(3) 331 ~ 346.