

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

梁凤霞 任笑地 丁明孝 孙同天^① 翟中和

(北京大学生物学系, 北京 100871; ① 美国纽约大学医学院皮肤学系)

摘要 应用超薄切片、冰冻蚀刻、细胞选择性抽提结合 DGD 包埋-去包埋及免疫胶体金等多种电子显微镜技术, 显示出小鼠膀胱上皮细胞游离面质膜上由不对称单位膜(AUM)构成的斑区以及细胞中由不对称单位膜构成的梭形泡均与细胞质中的中间纤维体系相连。蛋白质免疫印迹反应进一步证实, 构成不对称单位膜结构的蛋白成分与角蛋白存在某种紧密的结合关系, 从而对前人的推测提出了新的实验证据; 并对膀胱上皮细胞中 AUM 的功能提出了新的解释。

关键词 膀胱上皮细胞 梭形泡 不对称单位膜(AUM) 中间纤维

1959 年, David Robertson 提出了细胞膜结构的单位膜(unit membrane)模型, 其主要根据是在电子显微镜下细胞膜呈现暗-亮-暗 3 层结构, 内、外暗层厚度基本相等, 约为 2 nm, 中间亮层厚约 3.5 nm, 形成厚约 7.5 nm 的对称结构。1965 年, Hicks 以大鼠膀胱上皮细胞为材料, 首先提出了不对称单位膜(asymmetrical unit membrane, 简称 AUM)的概念^[1]。此后许多学者发现 AUM 结构普遍存在于哺乳动物膀胱上皮表层细胞^[2~4]。

AUM 结构主要存在于膀胱上皮表层细胞的游离面质膜以及细胞质内的梭形小泡(fusiform vesicles, 简称 fv)的膜上。电子显微镜下 AUM 结构的外叶(outer leaflet)厚约 8 nm, 内叶(inner leaflet)厚约 4 nm, Hicks 等证明膜外叶的加厚是由于蛋白质的嵌入造成的, 这些膜蛋白形成直径为 12 nm 的六角形结构, 并在质膜上呈类晶格状排列^[3~8], 由于膜蛋白颗粒主要位于膜外叶, 因此产生了 AUM 内外叶明显的不对称性。1990 年, Sun 等证明构成 AUM 的膜蛋白至少包含 3 种主要成分: Uroplakin I (MW 27 ku); Uroplakin II (MW 15 ku 和 Uroplakin III (MW 47 ku)^[7]。冰冻蚀刻表面复型技术显示这些类晶格状排列的膜蛋白组成质膜的斑区(plaque area), 斑区之间称为绞链区(hinge area), 绞链区处的质膜与一般细胞质膜相似, 为对称单位膜(symmetrical unit membrane, 简称 SUM)。大多数哺乳动物如牛、狗、兔、鼠等的膀胱上皮斑区一般占游离面质膜表面积的 70% ~ 75%^[2,8]。虽然人们对 AUM 的结构进行了较深入的研究, 但 20 多年以来, 有关 AUM 的成分及功能的研究一直没有取得进

1993-11-23 收稿, 1994-04-25 收修改稿

* 国家自然科学基金和高等学校博士学科点专项科研基金资助项目

展. 直到 1990 年, Sun 实验室成功地纯化了构成 AUM 的 3 种主要蛋白, 并于 1993 年克隆了组成 AUM 主要蛋白的基因^[9], 才为这一问题的研究提供了可能. 我们与纽约大学 Sun 教授合作, 对 AUM 与角蛋白纤维的关系进行了探索, 发现 AUM 与角蛋白纤维结合紧密, 从而为解释 AUM 的功能提供了新的直接的证据.

1 材料与方法

1.1 材料

Balb-C 小鼠拉断颈椎致死, 取其膀胱. 兔抗牛 AUM 多克隆抗体、抗酸性角蛋白单克隆抗体 AE₁ 和抗碱性角蛋白单克隆抗体 AE₃ 均由美国纽约大学医学院 Sun 教授惠赠.

1.2 方法

1.2.1 超薄切片样品制备 新鲜小鼠膀胱经 2.5% 戊二醛 -Hanks 液固定 1h 后, 0.01mol/L PBS 洗涤, 2% 锇酸后固定, 梯度丙酮脱水, Epon 812 包埋, 切片后用 2% 醋酸双氧铀 - 柠檬酸铅双染色.

1.2.2 细胞骨架选择性抽提及 DGD 包埋 - 去包埋剂超薄切片电子显微镜样品制备 新鲜小鼠膀胱暴露腔面, 0.1mol/L PBS 洗涤后用盖玻片轻轻刮下上皮细胞于 PBS 液中, 离心收集细胞, 继而参考 Fey 等^[10] 及翟中和等^[11] 的方法, 用 0.5% Triton X-100 CSK 溶液悬浮细胞, 处理 5min; 600r/min 离心后, 再用 RSB-Majik 溶液处理沉淀 5min, 再参照 Capco 等的方法^[12]: 细胞骨架用 2.5% 戊二醛固定 30min, 1% 锇酸后固定 30min, 系列乙醇脱水至 100%, 正丁醇过渡, DGD (diethylene glycol distearate, Polysciences 公司产品) 60℃ 浸透包埋. 超薄切片厚度约 100 ~ 150nm, 切片经正丁醇过夜处理溶去包埋剂, 乙醇过渡后, CO₂ 临界点干燥.

1.2.3 抽提后样品的免疫标记 上述 DGD 包埋的样品切片后经正丁醇过夜处理后, 梯度乙醇过渡至水, 按常规免疫电子显微镜样品制备方法, 用兔抗牛 AUM 多克隆抗体及蛋白 A- 胶体金 (直径 10nm, Sigma 公司生产) 进行标记, 再经过梯度乙醇脱水后, CO₂ 临界点干燥. 上述样品均于 JEM-200CX 电子显微镜下观察, 拍摄立体象对时样品台的转角为 18° ~ 20°, 加速电压 200kV.

1.2.4 冰冻蚀刻样品的制备 新鲜小鼠膀胱暴露腔面, 用盖玻片轻轻刮下上皮细胞, 离心收集后分成两份: 一份经 2.5% 戊二醛 -Hanks 液固定; 另一份按照 1.2.2 节所述的步骤经过选择性抽提后亦用戊二醛固定. 上述样品经 PBS 洗涤后浸入 30% 甘油生理盐水中, 然后在液氮中迅速冷冻, 并在 Balzer's BAF-400D 冰冻蚀刻仪上进行冰冻断裂复型.

1.2.5 SDS-PAGE 蛋白质免疫印迹技术 用盖玻片轻轻刮取小鼠膀胱上皮细胞, 离心收集后分成两等份: 一份直接溶于电泳样品溶解液中; 另一份按照 1.2.2 节的步骤进行选择抽提后亦溶于电泳样品溶解液中. 根据 Laemmli 的方法^[13], 分离胶浓度 12.5% 并含 6.3mol/L 尿素, 进行 SDS-PAGE. 电泳后, 按 Towbin 的方法^[14] 进行电转移, 将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 经 3% 牛血清白蛋白封闭后, 分别与兔抗牛 AUM 多克隆抗体、AE₁ 单克隆抗体或 AE₃ 单克隆抗体于 37℃ 作用 3h, 再与生物素化的羊抗兔 IgG 第二抗体反应, 最后用亲和素 (avidin) 偶联的碱性磷酸酶 (AP) 以 BCIP 和 NBT 为底物进行显色.

2 实验结果

2.1 小鼠膀胱上皮表层细胞的超微结构特征

透射电子显微镜下小鼠膀胱上皮细胞一般可分为 3 层,即表层、中间层和基底层。表层细胞直径达 $100 \sim 200\mu\text{m}$,其游离面细胞质膜由扇形的凹陷区与冠状突起区相间排列而成(图版 I-1)。表层细胞最显著的特点是其胞质中含有大量的梭形泡,其长径约 $0.4 \sim 0.8\mu\text{m}$ (图版 I-1 箭号)。高倍下可清楚地观察到游离面质膜扇形区与多数的梭形泡均由 AUM 构成,并且都是在其外叶加厚(图版 I-1a),某些区域可见明显的颗粒状排列,外叶厚约 $7 \sim 9\text{nm}$,内叶厚约 3nm ,AUM 总厚度约 12nm 。游离面质膜的冠状突起区与梭形泡的两端则是由对称单位膜构成的。

2.2 AUM 结构与中间纤维体系相连

细胞选择性抽提与 DGD 包埋-去包埋技术显示膀胱上皮的 3 层细胞均存在发达的中间纤维体系,多数为直径 10nm 的丝,有些集成束(图版 I-2)。在表层细胞的某些区域,中间纤维网架非常致密,结构也非常均一。值得注意的是,在靠近游离面的细胞质中,中间纤维网架上结合了很多膜片样结构(图版 I-2 箭号),其长径约 $0.4 \sim 0.6\mu\text{m}$,与超薄切片中观察到的梭形泡大小相似。膜片样结构在表层细胞中极多,而中间层细胞中较少,其分布也与电子显微镜超薄切片所显示的梭形泡类似,推测这些膜片样结构是梭形泡的 AUM 结构经抽提留存的斑区残余。冰冻蚀刻样品中也显示出上皮细胞中有许多的膜泡结构,其中许多的膜泡都具有排列成类晶格状的直径约 12nm 的蛋白颗粒(图版 II-1a)。经过细胞选择性抽提以后,虽然膜泡形状变得不规则,但类晶格状的斑区结构依然清晰可见(图版 II-1b),由此可以看出经过细胞选择性抽提以后,膜泡不但没有随着细胞中膜体系的崩解而解体,而且仍然具有较完整的形态。用兔抗牛 AUM 多克隆抗体(我们已证实与鼠的 AUM 有免疫特异性很强的交叉反应)及 10nm 胶体金进行免疫标记,经过观察表明,金颗粒特异地结合在这些膜片样结构上(图版 I-2a),不加第一抗体的对照样品呈阴性反应,中间纤维及发达的核骨架纤维也未被标记,说明膜片样结构是由 AUM 蛋白组成的。根据其形态大小推测,膜片样结构为超薄切片显示的梭形泡经过细胞选择性抽提后形成的。

为了进一步证明 AUM 结构与中间纤维的关系,将分离的小鼠膀胱上皮细胞分成两份,其中的一份进行系列抽提,得到中间纤维与膜片样结构;另一份不经任何处理,直接进行 SDS-PAGE,然后用兔抗牛 AUM 多克隆抗体进行蛋白质免疫印迹反应。结果显示小鼠膀胱上皮细胞中有大量的 27ku 和 47ku 的 AUM 特异蛋白成分(图 1 中 1)。与未经抽提的细胞相比,经过抽提的组分中具有几乎等量的 27ku 和 47ku 蛋白(图 1 中 2)。结果进一步证实了与中间纤维紧密相连的膜片样结构含有 AUM 特异的蛋白。

用抗角蛋白的抗体对上述两个组分进行免疫印迹反应的结果表明,在膀胱上皮细胞中存在有丰富的角蛋白成分。 AE_1 检测呈现 4 个明显的条带,分子量位于 $40 \sim 60\text{ku}$ 之间(图 2); AE_3 检测亦可分辨出 4 个条带,其中一条分子量大约为 40ku ,另外 3 条的分子量位于 $50 \sim 70\text{ku}$ 之间(图 3)。比较抽提前后的膀胱上皮细胞样品,其角蛋白的种类与含量都非常一致,说明与 AUM 膜片结合的中间纤维成分主要是角蛋白。即使在经过密度梯度离心纯化的牛的 AUM 膜片中,也含有一定量的碱性角蛋白成分(图 3 中 3),可见, AUM 结构与角蛋

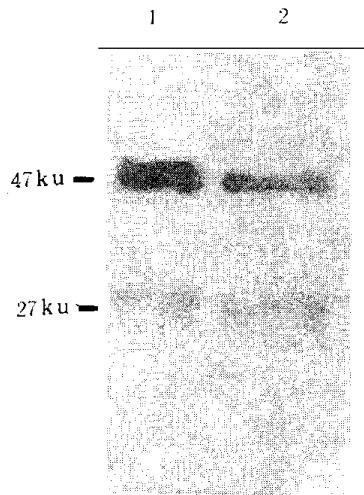


图1 小鼠膀胱上皮细胞经过选择性抽提与未经抽提的样品相比,含有几乎等量的AUM 特异性蛋白(47ku, 27ku 蛋白),说明膜片样结构是与中间纤维相连的
1——小鼠膀胱上皮细胞经过抽提以后,与中间纤维紧密结合的AUM 蛋白成分, 2——未抽提的小鼠膀胱上皮细胞样品含有 AUM 特异蛋白

白纤维的结合是十分紧密的。

在电子显微镜下拍摄的立体象对在 HCF- 反光立体镜下观察,可清楚地显示出 AUM 膜泡结构与细胞骨架的空间关系(图版 II-2a,2b)。虽然梭形泡的端部及脂分子可能均被抽提掉,形状变得不太规则,但 AUM 蛋白膜片仍可形成一个立体的结构。每个膜片样结构上均有五六处至十几处与中间纤维相连(图版 II-2a,2b 箭头)。

根据上述实验说明,膀胱上皮细胞 AUM 结构与中间纤维具有紧密结合关系,而且 AUM 蛋白与中间纤维角蛋白具有特异亲和性,以上事实为我们对 AUM 功能的合理解释提供了新的有意义的证据;同时对膀胱上皮细胞内中间纤维的意义提供了新的线索。

3 讨论

哺乳动物膀胱上皮细胞特别是表层细胞游离面质膜做为对水和离子,特别是对尿液中尿素及其它有毒代谢废物的屏障,具有非常重要的作用。1965 年 Hicks 等人就发现膀胱上皮的结构不同于一般的上皮,其游离面质膜是由不对称单位膜(AUM)构成的^[1],据此,许多学者认为: AUM 结构主要是起通透性屏障的作用^[1,9]。但是, Stachelin 等人经过大量的观察发现,兔、大鼠和小

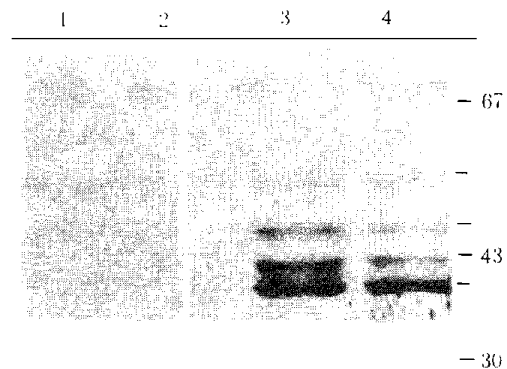


图2 小鼠膀胱上皮细胞经选择性抽提后,与未经抽提的细胞同时进行 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后用 AE₁ 单克隆抗体进行免疫印迹反应,结果可见中间纤维中含有酸性角蛋白成分

1——Hela 细胞(对照 1 阳性反应), 2——纯化的牛的 AUM 蛋白(对照 2 微弱的阳性反应), 3——小鼠膀胱上皮细胞经选择性抽提以后的蛋白组分(实验组), 4——小鼠膀胱上皮细胞未经抽提的组分(对照)

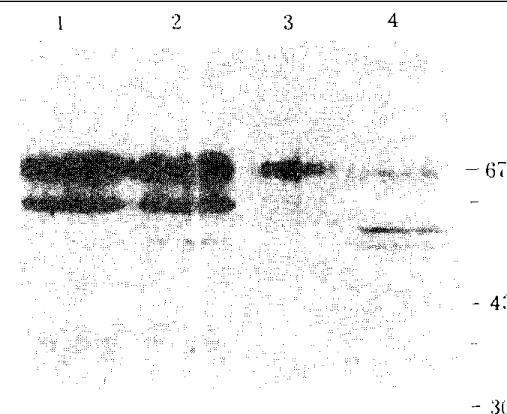


图3 小鼠膀胱上皮细胞经选择性抽提后,与未经抽提的细胞同时进行 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后用 AE₃ 单克隆抗体进行免疫印迹反应,结果可见中间纤维中含有碱性角蛋白成分

1——小鼠膀胱上皮细胞组分(对照), 2——小鼠膀胱上皮细胞经选择性抽提以后的蛋白组分(实验组), 3——纯化的牛的 AUM 蛋白(对照), 67ku 处仍有阳性反应条带,说明 AUM 蛋白与中间纤维确实具有紧密结合关系, 4——Hela 细胞(对照)

鼠等动物膀胱上皮游离面 AUM 结构形成的斑区只占腔面膜表面积的 70% ~ 75%, 而在成年人更少, 约占 5% 左右, 因而不足以解释 AUM 结构是膀胱上皮的通透性屏障. 膀胱作为机体的贮尿器官, 具有很强的伸缩能力, 在尿液充盈时膨胀, 尿液排出后缩小. 这种功能是如何调节的呢? AUM 结构究竟起什么作用呢? 早在 1965 年, Hicks 就以大鼠为材料, 在超薄切片样品中观察到其膀胱表层细胞的细胞骨架纤维有可能与梭形泡相连^[1]; 1972 年, Stachelin 等人以兔为材料, 冰冻蚀刻显示出在表层细胞游离端的细胞质膜面 (PS 面) 有细胞质纤维与斑区相连, 从而推测斑区颗粒可能是作为细胞质纤维的固着位点, 防止膀胱充盈时细胞被胀破, 而绞链区的功能可能是膀胱收缩时膜的内折位点^[2]. Bruce 和 Chlapowski (1978) 根据对兔、大鼠等 6 种动物的研究认为, 大约 85% ~ 94% 的膀胱游离面细胞膜在膀胱膨胀、收缩时以膜泡的形式出入细胞, 以扩大或减小其表面积; 尿液充盈时膀胱的膨胀来自于被动的压力, 即尿所产生的压力^[6]. 但他们的实验均缺乏直接的证据, 所谓细胞质纤维的性质更不清楚.

细胞选择性抽提与 DGD 包埋 - 去包埋技术及抗 AUM 蛋白抗体的制备, 为显示中间纤维与梭形泡的关系提供了重要的实验手段和条件. 我们采用 DGD 包埋 - 去包埋技术显示出小鼠膀胱上皮细胞中存在发达的中间纤维体系, 且表层细胞中有大量的膜片样结构. 冰冻蚀刻技术也显示出经过细胞选择性抽提以后, 细胞中不规则的膜片样结构上仍有典型 AUM 所特有的斑区结构. 用抗 AUM 抗体结合胶体金标记技术也证明, 这些膜片样结构是由 AUM 蛋白构成的. 据此, 我们推测膜片样结构是梭形泡经过抽提后形成的残余结构. 与超薄切片样品中的梭形泡相比, 这些膜片样结构略有缩小, 估计是过去垢剂处理后, 脂分子及一些膜结合蛋白被溶掉而造成形态上的缩小. 立体像对的观察进一步显示出这些膜片样结构与中间纤维相连. 蛋白质免疫印迹反应表明, 经过去垢剂处理以后, AUM 蛋白并没有丧失, 与未经抽提的膀胱上皮细胞相比, 几乎含有同等量的 47ku 与 27ku 蛋白, AUM 的另一种组成成分 15ku 蛋白无法用抗 AUM 抗体检测出来^[7]. 用抗角蛋白抗体检测证实, 存在于上皮细胞中的纤维含有酸性角蛋白和碱性角蛋白两种成分, 即使在纯化的牛的 AUM 膜片中, 也含有一定量的碱性角蛋白成分 (67ku 蛋白), 这进一步说明小鼠膀胱上皮表层细胞中的 AUM 结构与细胞质中的中间纤维体系是紧密相连的.

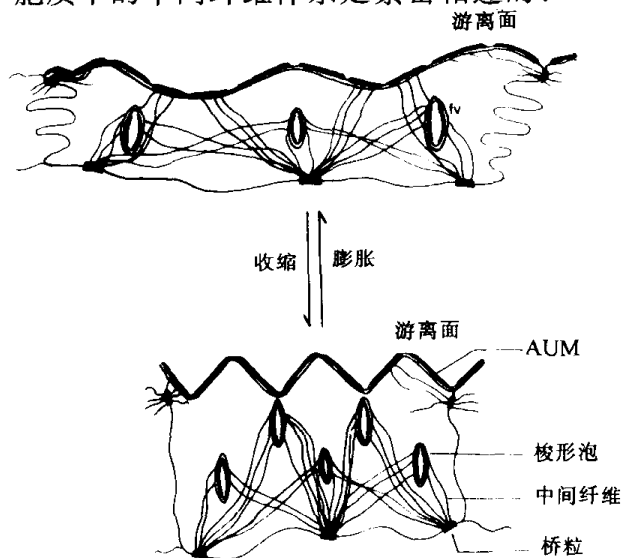


图 4 膀胱上皮细胞中间纤维与不对称单位膜 (AUM) 的特异结合

这些事实有什么生物学意义呢? 结合前人的工作, 我们认为: (1) 众多的与中间纤维相连的梭形泡使表层细胞象多孔的海绵一样, 有良好的柔韧性及回复力, 保证细胞在膀胱胀缩时不至受到损害. (2) 中间纤维的固着作用使大量的梭形泡位置相对有序, 并起着梭形泡向腔面运输的定向作用. (3) 中间纤维的固着可能还起着雨伞的伞骨的作用. 当膀胱的肌肉收缩或舒张时产生的张力带动中间纤维 (相当于雨伞的伞骨) 牵动斑区, 向内收缩形成细胞内的梭形泡; 舒张时则使游离面质膜下的梭形泡与游离面质膜融合以扩大游离面质膜的表面积. 因而斑区做为游离

面中间纤维的固着位点,细胞侧面及底面则通过桥粒结构固着与连系,共同完成上述功能.这种结构可能的作用过程用模式图表示(如图4)

我们的工作不但证实了前人的推测,而且提出了新的实验证据. AUM 结构一般占腔面膜表面积的 70% ~ 75%,不足以说明 AUM 结构是膀胱上皮的通透性屏障.我们倾向于认为, AUM 结构更主要的是作为中间纤维的固着位点,在调节膀胱胀缩时起作用.由于其结构的坚韧,使膀胱表层细胞不至于膨胀时被胀裂.那么, AUM 蛋白成分与中间纤维连接的机理,其结合位点又是如何? 这些问题都有待于进一步的探讨.

参 考 文 献

- 1 Hicks R M. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *J Cell Biol*, 1965, 26: 25 ~ 48
- 2 Steahelin L A, Chlapowski F J, Bonneville M A. Luminal plasma membrane of the urinary bladder, I. Three-dimensional reconstruction from freeze-etch images. *J Cell Biol*, 1972, 53: 73 ~ 91
- 3 Knutton S, Robertson J D. Regular structures in membranes: the luminal plasma membranes of the cow urinary bladder. *J Cell Sci*, 1976, 22: 355 ~ 370
- 4 Severs N J, Warrent R C. Analysis of membranes structure in the transitional epithelium of rat urinary bladder, I The luminal membranes. *J Ultrastruct Res*, 1978, 64: 124 ~ 140
- 5 Hicks R M, Ketterer B. Hexagonal lattice of subunits in the thick luminal membrane of the rat urinary bladder. *Nature (London)*, 1969, 224: 1304 ~ 1305
- 6 Hicks R M, Ketterer B. Isolation of the plasma membrane of the luminal surface of rat bladder lattice of subunits both in negatively stained whole mounts and in sectioned membranes. *J Cell Biol*, 1970, 45: 542 ~ 553
- 7 Wu X R, Manabe M, Yu J *et al.* Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II and III. *J Biol Chem*, 1990, 265: 19170 ~ 19179
- 8 Brisson A, Wade R H. Three-dimensional structure of luminal plasma membrane protein from urinary bladder. *J Mol Biol*, 1983, 166: 21 ~ 36
- 9 Wu X R, Sun T T. Molecular cloning of a 47kD tissue specific and differentiation dependent urothelial cell surface glycoprotein. *J Cell Sci*, 1993, 106: 31 ~ 43
- 10 Fey E G, Wan K M, Pemann S. Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three dimensional organization and protein composition. *J Cell Biol*, 1984, 98: 1973 ~ 1984
- 11 Zhai Z H, Nickerson J A, Krochmalnic G *et al.* Alterations in nuclear matrix structure after adenovirus infection. *J Virol*, 1987, 61: 1007 ~ 1018
- 12 Capco D G, Wan K M, Penman S. A new method for preparing embedment-free section for EM: application to the cytoskeletal framework and other three dimensional network. *J Cell Biol*, 1984, 98: 1878 ~ 1885
- 13 Laemmli U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 1970, 227: 680 ~ 685
- 14 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 4350 ~ 4354
- 15 Hicks R M, Ketterer B, Warren R C. The ultrastructure and chemistry of the luminal plasma membrane of the mammalian urinary bladder: a structure with low permeability to water and ions. *Phil Transactions Royal Soc B*, 1974, 268: 23 ~ 38
- 16 Bruce D M, Chlapowski F J. Morphometric analysis of the translocation of luminal mambrane between cytoplasm and cell surface of transitional epithelial cells during the expansion-contraction cycles of mammalian urinary bladder. *J Cell Biol*, 1978, 77: 685 ~ 697
- 17 Yu J, Wu X R, Lin J H *et al.* Uroplakin I: a 27kD protein associated with the asymmetric unit membrane of mammalian urothelium. *J Cell Biol*, 1990, 111: 1207 ~ 1216