

牛脊髓神经丝的体外组装与结构^{*}

佟向军 陈建国 刘 洁 庞世瑾 翟中和^{**}

(北京大学生命科学学院, 北京 100871; 中国科学院物理研究所真空物理实验室, 北京 100080)

摘要 利用差速离心法从牛脊髓中分离神经丝, 在电镜下观察了其形态; 应用扫描隧道显微镜 (STM) 研究了它的结构, 发现神经丝具有长短 2 种侧臂, 二者相间排列, 相邻长侧臂或相邻短侧臂的间距都是 20 ~ 22 nm; 由此推测神经丝内部存在 3/4 分子交错; 还研究了神经丝蛋白的体外组装, 以胶体金标记的方法证明, 中等分子量与高分子量的神经丝蛋白, 都能同低分子量的神经丝蛋白共同装配成 10 nm 的纤维; 同时发现, 中等分子量与高分子量的神经丝蛋白能够组装成一种较细的纤维, 不同于中间纤维。

关键词 神经丝 STM 侧臂 结构 装配 胶体金

神经丝是中间纤维的一种重要类型, 特异地在神经细胞内表达, 并在轴突内相互平行排列成束^[1]。哺乳动物的神经丝由 3 种蛋白组成: 低分子量神经丝蛋白, 简称 NF-L, 分子量为 68 ku; 中等分子量神经丝蛋白, 简称 NF-M, 分子量为 160 ku; 高分子量神经丝蛋白, 简称 NF-H, 分子量为 200 ku^[2,3]。神经丝是由这 3 种蛋白组装成的异多聚体。序列分析表明, 神经丝蛋白与其他中间纤维蛋白一样, 由 α -螺旋的杆状区, 非螺旋的氨基末端和非螺旋的羧基末端三部分构成。NF-M 和 NF-H 的羧基末端较长, 因而其分子量较大。用较温和的方法提取神经丝, 金属投影法显示它是一个试管刷状结构: 主体是核心纤维 (core filament), 核心纤维上每 22 nm 左右垂直向外发出 2 ~ 4 根丝状突起——侧臂 (side arms)^[4]。有证据表明, 侧臂是由 NF-M 和 NF-H 的羧基末端形成的^[5]。

同其他中间纤维一样, 神经丝具有体外自组装能力。NF-L 能在体外装配成 10 nm 的纤维^[6], NF-M 或 NF-H 单独存在时不能组装, 但它们都能与 NF-L 共组装成神经丝^[4]。3 种蛋白如何组装成神经丝是一个复杂的问题, 至今也没有完全搞清楚。

我们从牛脊髓中分离出神经丝, 纯化了神经丝蛋白, 系统地研究了神经丝的体外组装; 应用免疫胶体金标记技术, 直观地证明 NF-M 和 NF-H 可以同 NF-L 共同组装成 10 nm 的纤维。利用扫描隧道显微镜 (scanning tunneling microscope, 简称 STM), 我们研究了天然神经丝的结构, 发现神经丝存在长短 2 种侧臂。在此基础上, 我们提出神经丝结构的一个新设想。

1998-03-03 收稿, 1998-06-30 收修改稿

^{*} 国家教委博士点基金资助项目

^{**} 联系人

1 材料与方法

1.1 神经丝的分离

神经丝从成年牛的胸段脊髓中提取。新鲜的牛脊髓取自北京清真食品公司屠宰场,处死后 2 h 内取材,材料置于冰盒运回。去除脊膜后,加入等体积的 PEM 缓冲液(100 mmol/L Pipes, pH 6.8, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L PMSF), 4 下用搅拌式匀浆器匀浆,匀浆物以 $28\ 000 \times g$ 离心 50 min(2)。取上清,加入 20% (体积比)的甘油后,在 37 温育 30~40 min,然后在室温下以 $150\ 000 \times g$ 离心 90 min,弃上清,沉淀即为粗分离的神经丝^[4],供进一步纯化以及电镜和 STM 观察用。

1.2 神经丝蛋白的纯化

粗提的神经丝用缓冲液 A(10 mmol/L $NaH_2PO_4 \cdot Na_2HPO_4$, pH 7.5, 1 mmol/L EGTA, 6 mol/L Urea, 0.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF) 溶解后,以 $18\ 000 \times g$ 离心 30 min,除去不溶物,上清液用 DEAE-纤维素(DE-52)柱分离,以 NaCl 分步洗脱,NaCl 的浓度分别为 50, 100, 150, 200, 250 和 300 mmol/L,收集 260 nm 处有紫外吸收的组分,SDS-PAGE 电泳检查。

1.3 神经丝蛋白的体外组装

分别取纯化的 NF-L, NF-M 和 NF-H,将蛋白浓度调至 0.2 mg/mL,置于 37 的组装透析液(PEM, 0.15 mol/L NaCl, 2 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF)中,透析过夜;再分别取 NF-L 与 NF-M(质量比为 2:1), NF-L 与 NF-H(质量比为 2:1)和 NF-M 与 NF-H(质量比为 1:1),于相同的条件下装配。

1.4 电镜样品的制备

1.4.1 负染色 将样品(约 0.2 mg/mL)滴加于经过亲水处理的喷碳铜网上。吸附 1 min 后,吸去样品,水洗 1 次,再加 2% 的醋酸双氧铀,染色 15~20 s,吸去染液,置铜网盒中自然干燥。

1.4.2 胶体金标记 样品滴加于经亲水处理的喷碳膜铜网上,吸附 1 min 后,倾去多余液体。用双蒸水洗后,加 5% 牛血清清蛋白(BSA)(溶于 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液, pH 7.4),于 37 封闭 15 min;然后吸去 BSA 溶液,加第 1 级抗体(NF-L + NF-M 组装的纤维,加 NF-M 的单克隆抗体 以下简称单抗;NF-L + NF-H 组装的纤维,加 NF-H 的单抗,抗体 1:10 稀释),于 37 下温育 1 h。而后吸去抗体溶液,用 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.4,加 0.15 mol/L 的 NaCl)洗 3 次,每次 10 min。再用 BSA 封闭 15 min 后,加第 2 级抗体(5 nm 胶体金偶连羊抗鼠 IgG),37 下温育 1 h 后,依前述方法漂洗。洗后,依 1.4.1 的方法进行负染色,观察。

1.4.3 金属投影 样品稀释至 0.1 mg/mL,加入 50% (体积比)甘油;用特制的喷雾器将样品喷洒于新剥离的云母片表面,云母片置于 Balzers BAF 301 中真空干燥后,以 6 的角度喷铂 2.5 nm,再垂直喷碳;复型膜在水中漂离,置于无方华膜的铜网上观察。

1.5 STM 观察

将从牛脊髓分离而得的神经丝稀释至 0.1 mg/mL,取 50 μ L 溶液滴于新解理的 HOPG (highly oriented pyrolytic graphite, 高取向解理石墨)表面,静置 5 min。倾去多余液体,室温下干燥。样品置于 CSPMF-930a 型 STM(中国科学院化学研究所研制) 下观察,成像采用恒流模式。

1.6 电泳

采用 SDS-PAGE 电泳,胶浓度为 7.5%。胶板用考马斯亮蓝 R-250 染色。

2 结果

2.1 天然神经丝的形态与结构

从牛脊髓分离而得的神经丝主要由 3 种蛋白组成(图 1(a)),分子量最大的是 NF-H,中间是 NF-M,最下面的深条带是 NF-L,其他杂蛋白的含量极少。图 1(b)是金属投影法所显示的神经丝的形态,在神经丝的主干外周,可观察到许多垂直发出的细丝,细丝之间的间距约为 20 nm,这就是侧臂结构。核心纤维上也有 15~20 nm 的周期性结构存在,这可能是甘油结合于侧臂基部形成的。负染色结构表明,神经丝是典型的中间纤维(图 1(c)),纤维长达数微米,直径 10~11 nm。图中观察不到侧臂结构,可能是由于负染色过程中,侧臂发生收缩,附着于核心纤维^[4]。

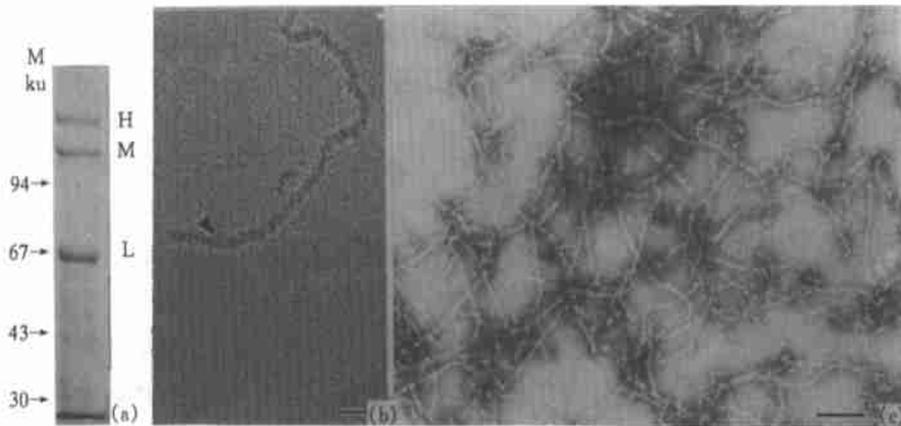


图 1 天然神经丝的组成与形态

(a) SDS-PAGE 电泳显示神经丝蛋白由 3 个主要的蛋白条带组成,分别为 NF-H、NF-M 和 NF-L; (b) 金属投影法显示神经丝的形态,由核心纤维(大箭头所示)和侧臂(小箭头所示)组成; (c) 负染色法显示,神经丝是典型的中间纤维(标尺 = 50 nm)

为进一步研究神经丝的精微结构,我们采用了 STM 技术。图 2 是 STM 的观察结果。图中显示出 3 条纤维,每条纤维都是由一支主干以及从主干发出的突起组成,突起沿纤维主干周期性排列。从这些特征,我们可以断定,所观察到的纤维是神经丝,周期性排列的突起代表侧臂结构。由于在自然干燥过程中,神经丝的侧臂会收缩,所以我们所观察到的神经丝侧臂都较短,而且末端几乎相互融合到一起。侧臂沿核心纤维规则排列,间距为 10~11 nm,为金属投影法所示间距的一半;2 条很接近的纤维之间,还存在一些较长的侧臂(箭号所示),它们之间的距离恰为 20~22 nm。纤维的外侧和另 1 条纤维上均未发现长侧臂,说明长侧臂的出现可能是由于 1 条纤维的突起附着到相邻的另 1 条纤维上,从而部分避免了干燥过程中的收缩。长侧臂之间,经常能观察到短侧臂收缩后的痕迹(图 2,小箭头所示)它们呈不明显的小突起,可能因为这些短臂的末端没有同长臂末端结合,所以收缩得更厉害。

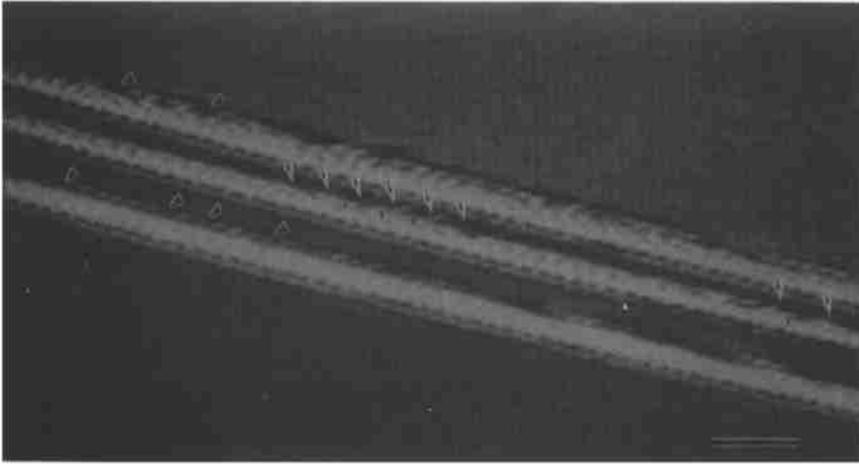


图 2 神经丝的 STM 图像

可见 3 条平行排列的纤维,纤维两侧有周期性排列的(突起)侧臂,间距 10~11 nm;箭号示长侧臂,大箭头示成像弱或消失的短侧臂,小箭头示长侧臂间的短侧臂(标尺=50 nm)

我们注意到,在短的侧臂中,其成像的信号强弱也有变化,在某些区域表现出强弱相间的现象,有时甚至弱信号消失,使短臂间距离也变成 20~22 nm(图 2,大箭头所示)。信号强弱反应出样品表面高低不同:信号强,则样品较高,即侧臂收缩后形成的“结”较大,说明侧臂较长;信号弱或无,说明侧臂较短。需要说明的是,长短侧臂在收缩过程中会相互缠绕在一起,从而使成像信号的强弱难以分辨,所以这种强弱相间的现象只在某些区域可以观察到。

以上结果说明,神经丝核心纤维外周存在长短不同的两类侧。相邻长侧臂的间距为 20~22 nm,与金属投影法测得结果一致;长侧臂之间存在短侧臂,它们相间排列,所以相邻侧臂之间的距离成为 10~11 nm,这是金属投影法或以前所用的任何其他方法从未发现过的。

2.2 3 种神经丝蛋白体外组装的性质

通过 DE-52 离子交换层析,可将神经丝的 3 种成分纯化(图 3(a)),NF-H 和 NF-M 能够完全分开,NFL 中会混有极少量 NF-M,但因其量比 NFL 少得多,所以不会影响 NFL 的组装。NFL 在组装缓冲液中透析,很容易形成长纤维(图 3(b)),纤维直径为 10~11 nm,与天然神经丝十分相似。只是其表面平滑,无结状结构。NF-M 也能形成一些直径 10~12 nm 的纤维(图 3(c)),但纤维量少,而且短得多。同时有许多无规则的结构和大量短杆状、球状结构存在,说明大部分蛋白没有装配成 10 nm 的纤维。就是说,NF-M 虽有一些自组装能力,但远不如 NFL 强。NF-H 则只能形成杆状或球状结构,无法装配成中间纤维(图 3(d))。

NFL 与 NF-M(图 4(a))或 NFL 与 NF-H(图 4(b))共同装配,能形成直径 10 nm 的纤维,这种纤维比 NFL 装配成的纤维要短一些,但比 NF-M 形成的纤维长得多。除了纤维结构外,图中还可以观察到许多短的不规则丝状片段,推测是尚未装配成纤维的神经丝蛋白的多聚体。这个结果表明,NF-M 或 NF-H 存在时,神经丝的装配速度会变慢,而且也不如 NFL 单独存在时装配得完全。图 4(b)中短片段比图 4(a)多得多,说明 NF-H 更不容易装配到纤维中,这也证明它的装配能力比 NF-M 更差。

为证实 NF-M 和 NF-H 确实参与了组装,我们采用了胶体金标记-负染色技术. 用 NF-M 的单抗与 NF-L/NF-M 组装的纤维反应,发现胶体金颗粒标记到 10 nm 的纤维上(图 4(c));用 NF-H 的单抗标记 NF-L/NF-H 形成的纤维,也得到了同样的结果(图 4(d)). 这说明 NF-M 和 NF-H 参与了纤维的装配. 图中还可以观察到游离的成簇胶体金颗粒(箭头所示),推测它们是标记在图 4(a)和(b)所示的短片段上. 由于这些片段装配不完全,抗原位点暴露较多,因而结合的胶体金较多. 我们注意到,胶体金颗粒在纤维末端和装配较松散的部位标记量较大,这也是由于这些部位抗原决定簇暴露充分的原因. 在装配完全的纤维表面,大部分抗原决定簇被掩盖,所以标记的胶体金较少.

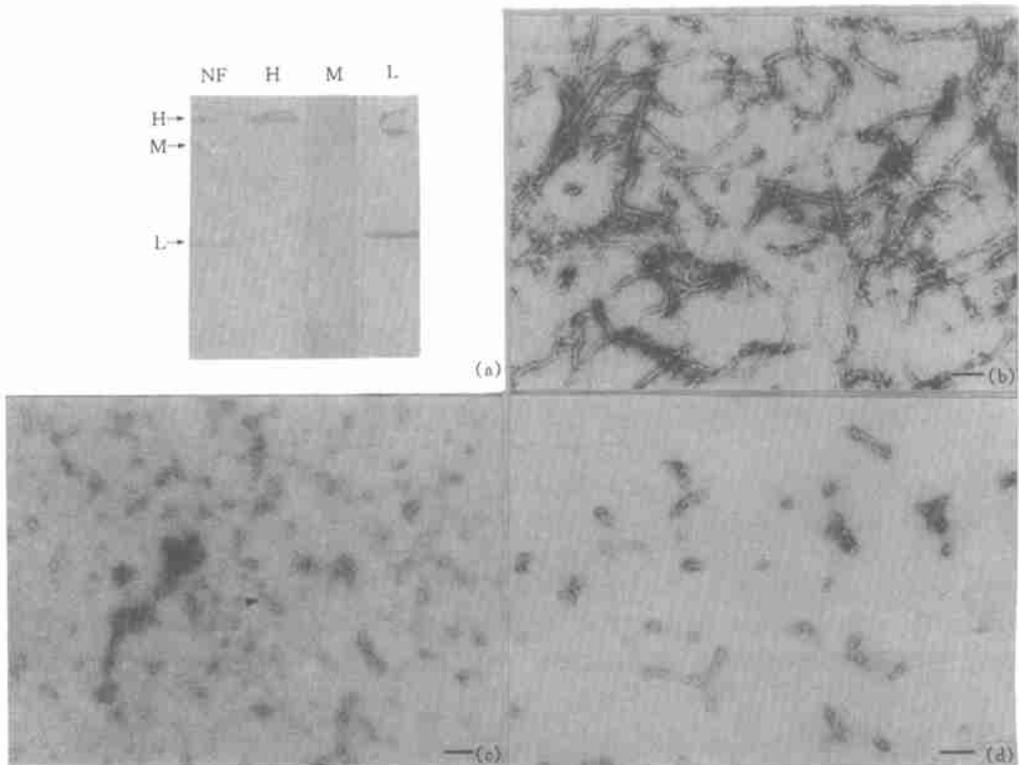


图 3 神经丝蛋白的体外组装

- (a) DE-52 离子交换层析分离纯化的神经丝蛋白; (b) NF-L 在体外自组装成典型的中间纤维; (c) NF-M 组装出一些短纤维(箭头所示),大部分呈球状或无规则聚集; (d) NF-H 形成无规则的杆状或球状结构(标尺 = 50 nm)

NF-M 和 NF-H 都能与 NF-L 共组装成 10 nm 的纤维,而它们自身是难以装配的. 但当二者同时存在时,可以形成长纤维(图 5). 这些纤维比较弯曲,有时像线团一样缠绕在一起,纤维的直径为 5 ~ 7 nm,这些特征都与中间纤维有较大区别.

3 讨论

3.1 天然神经丝的结构

天然神经丝是由 NF-L, NF-M 和 NF-H 3 种蛋白组装而成的. NF-L 本身以及它同 NF-M 或

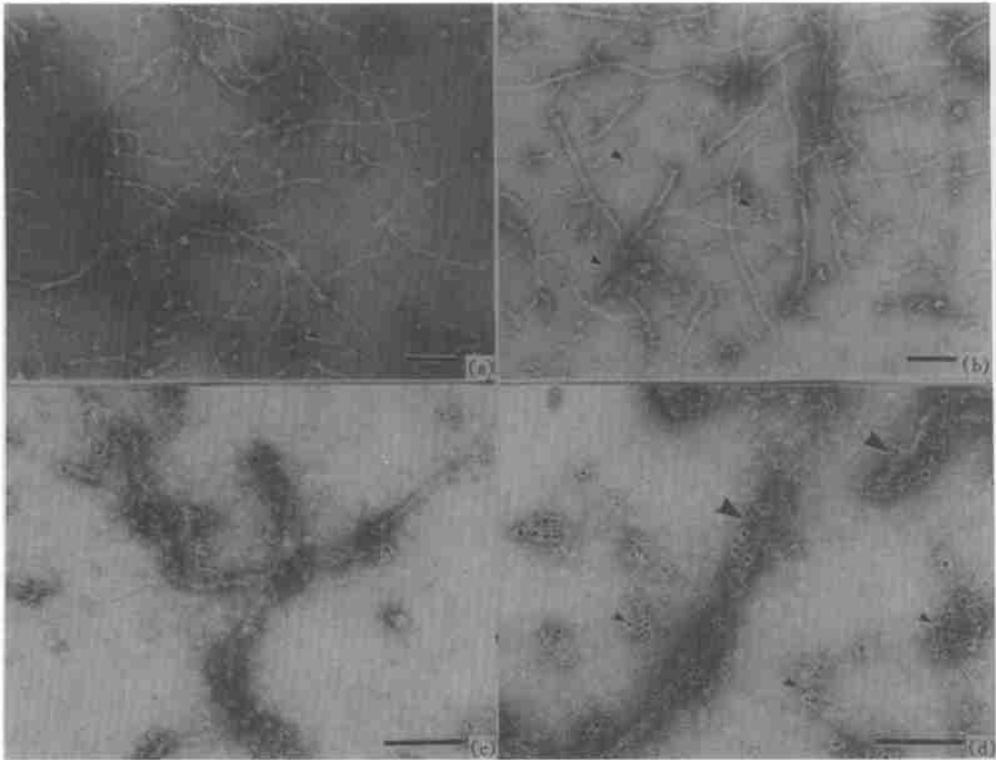


图 4 神经丝蛋白的共组装

(a) NF-L 和 NF-M 组装成 10 nm 的神经丝,有少量未装配起来的短片段(箭头所示);(b) NF-L 和 NF-H 共组装为 10 nm 直径的神经丝,有很多短片段存在(箭头所示);(c) 胶体金标记由 NF-L 和 NF-M 组装的纤维;(d) 胶体金标记由 NF-L 和 NF-H 组装成的纤维,装配不完全的短纤维上标记量大(大箭头所示),成簇的胶体金颗粒(小箭头所示)可能标记图 4(b) 所示的短片段或 NF-H 的聚集簇(如图 3(d) 所示)(标尺 = 50 nm)

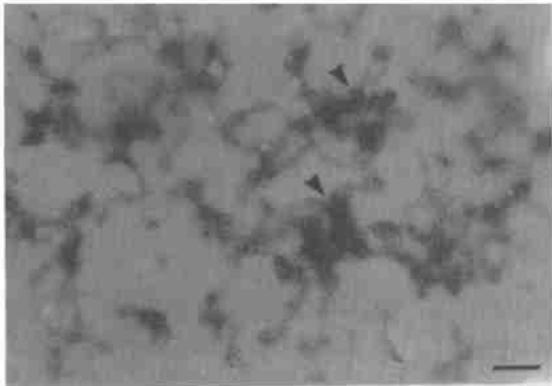


图 5 NF-M 和 NF-H 在体外组装成直径 5~7nm 的长纤维
纤维有时缠绕在一起(箭头所示)(标尺 = 50 nm)

NF-H 一起都能组装成 10 nm 的纤维,NF-M 和 NF-H 自身不能有效装配,但二者在一起时,却能进行一定程度的装配。所有这些都说明,神经丝的组装及其结构是比较复杂的。对 NF-L 体外组装的研究表明,组装的第 1 步是单体以相互平行对齐的方式形成二聚体,再经过四聚体、八聚体,由八聚体首尾相连成亚丝,4 根亚丝缠绕成 10 nm 的纤维。组装过程中有半分子交错出现,从而形成 20~22 nm 的周期结构,这种结构在 NF-L 组装成的纤维束中可以观察到^[7]。半分子交错发生在哪一步,人们的观点并不一致。有人认为,2 个二聚体以反平行且半分子交错的方式形成四聚体,有人认为半分子交错发生在八聚体之间^[7,8]。天然神经丝,因其组成的复杂,对其结构特

征知之甚少。它的结构是否与 NFL 单独组装成的神经丝相同,目前还无从知晓。

我们的研究显示,从牛脊髓分离得到的天然神经丝,除了具有以前为人们所熟知的长侧臂外,还存在一类短侧臂,长短 2 种侧臂相间排列。以前的研究已证实,长侧臂是由 NF-H 或 NF-M 的羧基端形成。那么短侧臂呢?用金属投影法观察 NFL 组装成的纤维,无长侧臂存在,但有时会发现有很短的侧臂^[5],说明 NFL 的羧基端也能形成侧臂,因为这种侧臂很短,常常在投影过程中被掩盖。由此我们推测,STM 下所观察到的短侧臂是由 NFL 的羧基端形成的。短侧臂间距为 20~22 nm,恰为神经丝蛋白杆状区长度(约 48 nm 左右)的一半,这表明,在装配过程中,NFL 的杆状区之间发生了半分子交错,这与传统观点是一致的。长侧臂之间距离为 20~22 nm,与金属投影法所得结果相同,说明 NF-M 或 NF-H 的杆状区之间发生了半分子交错。相邻长短侧臂之间的距离为 10~11 nm,相当于杆状区长度的 1/4,这提示我们,在天然神经丝中,NFL 与 NF-M 或 NF-H 的杆状区之间可能存在 3/4 分子交错。

中间纤维装配的基本元件是二聚体。NFL 本身可以形成二聚体,还能与 NF-M 或 NF-H 形成异二聚体,后两者不能形成二聚体,这样神经丝蛋白的二聚体就有 3 种:L/L,L/M,L/H^[9]。3/4 分子交错是发生在 L/L 与 L/M 或 L/H 之间,还是发生在由它们组成的四聚体之间,目前尚无法确定。可以肯定的是,完全由 NFL 形成的同二聚体或四聚体之间发生半分子交错,含有 NF-M 或 NF-H 的异二聚体或四聚体之间也发生半分子交错,而同二聚体或四聚体与异二聚体或四聚体之间则发生 3/4 分子交错(图 6)。

3.2 3 种蛋白的体外自组装能力

体外自组装是中间纤维蛋白的一大特征。NFL 能够很容易地装配成 10 nm 的纤维,纤维长且规则;NF-M 只能形成很少的短纤维,大部分以无规则的聚集状态存在;NF-H 基本上不能装配成中间纤维形态。这说明 NFL 具有很强的自组装能力,NF-M 很差,NF-H 更差。NFL 虽然能和 NF-M 或 NF-H 共同组装,但共组装的速度明显低于 NFL 的自组装,且组装进行得不够完全。也就是说,M 和 H 会延缓神经丝的装配过程。研究证明,NFL 和 NF-H 装配能力差异的原因不在于 NF-H 的羧基端,而在于杆状区^[1],我们的工作也证明,NF-M 难以组装的原因也在于其杆状区与 NFL 不同(文章另发)。杆状区是中间纤维蛋白侧向结合的区域,侧向结合是中间纤维蛋白装配的基础。NFL 蛋白的杆状区能够相互结合,也可以和 NF-M 或 NF-H 的杆状区结合,而 M 和 H 不具备这种能力^[9]。L 与 M 或 H 的结合能力可能不如 L 间的结合能力强,所以造成装配进程延缓;它们的结合方式也可能不同,导致异二(或四)聚体之间发生 3/4 交错,不同于 NFL 单独组装时只发生 1/2 分子交错的情况。

NF-M 和 NF-H 共同组装时,可以形成长纤维。虽然这种纤维在形态上不同于中间纤维,但结果仍然表明,NF-M + NF-H 具有一定的组装能力,这就说明,2 种蛋白的杆状区能够相互以

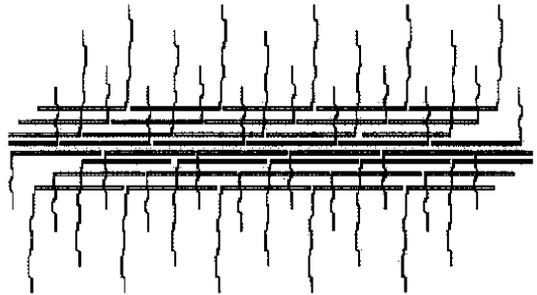


图 6 天然神经丝的结构设想示意图

方框示二聚体或四聚体,长线示 NF-M 或 NF-H 的 C 末端,短线示 NFL 的 C 末端。长线方框示包含 NF-M 或 NF-H 的二聚体或四聚体,短线方框示只由 NFL 形成的二或四聚体

某种形式侧向结合。这一结果很出乎我们的预料,更进一步说明神经丝装配的复杂性。在个体发育过程中,NF-L 和 NF-M 先于 NF-H 表达,并共组装成纤维网络。NF-H 表达后,以某种目前尚不清楚的方式加入这个网络中,形成成熟的神经丝^[10,11]。NF-H 的杆状区与 NF-L 或 NF-M 的杆状区能够相互结合,对它组装到业已存在的神经丝网络中,可能起重要作用。

神经丝与轴突的成熟、神经冲动传递以及一些神经系统疾病(如早老性痴呆,运动神经元退化性疾病)都有直接关系,因此它的结构与装配是一个重要的研究课题。由于其本身组成的复杂性,人们对这方面的知识还了解得很不够。我们应用电镜和 STM 技术,结合生化方法,对神经丝的结构和装配进行了较系统的研究,发现了一些新现象,并提出了一些新观点,这必将有助于这个问题的最终解决。

参 考 文 献

- 1 Lee M K, Xu Z, Wong P C, et al. Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol*, 1993, 122: 1 337 ~ 1 350
- 2 Liem R K H, Yen S H, Salomon G D, et al. Intermediate filaments in nervous tissues. *J Cell Biol*, 1978, 79: 637 ~ 645
- 3 Scott D, Smith K E, O Bhen B J, et al. Characterization of mammalian neurofilament triplet proteins. *J Biol Chem*, 1985, 260(19): 10 736 ~ 10 747
- 4 Hisanaga S, Hirokawa N. Structure of the peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J Mol Biol*, 1988, 202: 297 ~ 305
- 5 Mulligan L, Balin B J, Lee V M Y, et al. Antibody labeling of bovine neurofilaments: implication on the structure of neurofilament sidearms. *J Stru Biol*, 1991, 106: 145 ~ 160
- 6 Troncoso J C, March J L, haner M, et al. Effect of aluminum and other multivalent cations on neurofilaments in vitro: an electron microscopic study. *J Stru Biol*, 1990, 103: 2 ~ 12
- 7 Heins S P, Wang S, Muller K, et al. The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and net work formation. *J Cell Biol*, 1993, 123: 1 517 ~ 1 533
- 8 Hisanaga S, Ikai A, Hirokawa N. Molecular architecture of the neurofilament I: subunit arrangement of neurofilament L protein in the intermediate-sized filament. *J Mol Biol*, 1990, 211: 857 ~ 869
- 9 Carpenter D A, Ip W. Neurofilament triplet protein interactions: evidence for the preferred formation of NF-L containing dimers and a putative function for the end domains. *J Cell Sci*, 1996, 109: 2 493 ~ 2 498
- 10 Hoffman P N, Cleveland D W, Griffin J W, et al. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 3 472 ~ 3 476
- 11 Hollenbeck P J. The transport and assembly of axonal cytoskeleton. *J Cell Biol*, 1989, 108: 223 ~ 227