

盘基网柄菌细胞发育过程中尿囊酸酶的亚细胞定位

孙进楚 侯连生*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 利用胶体金免疫电镜技术, 观察了盘基网柄菌细胞分化与凋亡过程中胞内尿囊酸酶的位置变化。结果表明, 在细胞聚集期细胞产生的尿囊酸酶主要分布于线粒体及周围细胞质内。到了细胞丘时期, 尿囊酸酶只特异地存在于发生内自噬的线粒体内, 且仅局限于线粒体因内自噬产生的空泡区域, 这些发生线粒体内自噬的细胞将分化成前孢子细胞。随着前孢子细胞分化的进行, 尿囊酸酶颗粒在细胞内分布逐渐减少, 在靠近质膜处的空泡内还能观察到一些酶颗粒; 而另一些细胞内, 几乎所有的胞器内都能观察到酶颗粒, 一直延续至柄细胞形成。从中可以看到尿囊酸酶在将发育成孢子细胞和柄细胞两种类型细胞内的分布位置明显不同, 结果提示了尿囊酸酶蛋白与盘基网柄菌细胞分化和凋亡调控途径有密切关系。

关键词 盘基网柄菌; 尿囊酸酶; 细胞分化与凋亡; 胶体金

变形虫盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*) 隶属于原生动物门网柱超纲^[1], 具有6条染色体^[2], 以细菌为食^[3]。营养丰富的条件下, 为单细胞变形虫并以二分裂方式繁殖生长; 在营养缺乏的条件下, 进入多细胞发育阶段。发育周期约24 h, 整个发育过程可分为4个阶段: 细胞聚集(aggregation)、细胞丘(mound)、蛞蝓体(slug)和子实体(fruiting body)。

尿囊酸酶(allantoicase)作为嘌呤代谢中一种重要的酶, 在鱼类、两栖类和微生物中, 嘌呤经代谢形成的尿酸水解为尿囊酸后, 在尿囊酸酶的催化下生成脲基乙醇酸和尿素, 前者最终水解为氨气、二氧化碳和乙醛酸^[4]。而在灵长类、鸟类以及爬行类中, 因尿酸可以直接排出体外, 似乎不需尿囊酸酶, 但不少学者在人^[5]、小鼠^[6]和大鼠^[7]中成功克隆了尿囊酸酶的基因。本实验室运用DDRT-PCR方法从发育14 h的盘基网柄菌野生型细胞KAx-3与突变型细胞AK127中筛选出一差异表达片段, 通过同源序列比对, 发现该片段为尿囊酸酶基因, 表明在盘基网柄菌中也存在尿囊酸酶基因^[8]。对尿囊酸酶基因克隆表达^[9]、RNA干扰载体构建^[10]发现转染RNA干扰载体的细胞不能完成整个发育过程, 表明尿囊酸酶蛋白在盘基网柄菌细胞分化的信号调控过程扮演着某种角色^[10]。有报道认为, 氨可能通过抑制诱导分化因子来调控盘基网柄菌细胞的分化^[11]。所以, 尿囊酸酶可能通过催化氨的生成以作为盘基网柄菌细胞发育调控信号途径中一种重要蛋白分子, 但是其具体

的调控机制还不是很清楚。本实验运用胶体金免疫电镜技术对尿囊酸酶在盘基网柄菌发育过程中的表达量和分布位置进行了研究, 以期弄清尿囊酸酶蛋白在盘基网柄菌各个发育阶段胞内的表达量及其位置变化, 进一步认识尿囊酸酶在介导盘基网柄菌细胞粘连的信号通路系统中的作用, 并为探索尿囊酸酶在细胞发育中的作用提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

盘基网柄菌野生型细胞株KAx-3由多伦多大学医学院生化实验室Dr. Siu惠赠。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养和收集 将盘基网柄菌细胞KAx-3培养于琼脂平板上, 用好氧性克雷伯氏细菌(*Klebsiella aerogenes*)喂养(Sussman, 1987)。收集对数期的细胞, 用预冷的PB缓冲液(pH6.4)漂洗3次, 弃上清, 最后将细胞团悬浮在PDF缓冲液中, 制成浓度为 2×10^8 个/mL的细胞悬液, 取500 μ L均匀地铺在2%的琼脂板上, 成直径为4 cm的圆, 先置于湿盒中, 再将湿盒整体置于24 $^{\circ}$ C恒温培养箱中发育。分别收集发育到0 h、8 h、12 h、16 h、20 h的细胞, PDF缓冲液洗涤, 离心, 弃上清。

收稿日期: 2011-04-02 接受日期: 2011-04-26

国家自然科学基金(No.30970316, No.30670266)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

1.2.2 胶体金免疫电镜观察 将收集的细胞以4%多聚甲醛+0.5%戊二醛混合液(PG固定液)4℃下固定2 h, 0.1 mol/L PBS清洗3次, 乙醇梯度脱水, Epon812树脂包埋、聚合、超薄切片捞于金网上。将载有切片的金网竖直固定于蜡板上, 1% H₂O₂蚀刻50 min, ddH₂O漂洗3次; 1% BSA-0.01 mol/L PBS (pH7.4)室温封阻90 min, 45 min换液1次; 一抗血清(利用本实验室克隆的尿囊酸酶基因, 诱导表达并纯化该蛋白, 制备出的尿囊酸酶多克隆抗体; 1:500, 以1% BSA-0.01 mol/L PBS稀释)室温孵育90 min, 45 min换液1次; 1% BSA-0.01 mol/L PBS (pH7.4)漂洗4次; 1% BSA-0.02 mol/L TBS(pH8.2)漂洗4次; 12 nm胶体金标记羊抗兔(1:20, 1% BSA-0.02 mol/L TBS稀释)室温孵育90 min, 45 min换液1次; 1% BSA-0.02 mol/L TBS (pH8.2)漂洗4次; ddH₂O漂洗4次; 醋酸铀染色; JEM100CX II 透射电镜下观察并拍照, 阴性对照组以1% BSA-0.01 mol/L PBS代替一抗, 其余步骤与实验组相同。

2 结果

2.1 对数期细胞

对数期细胞内结合的金颗粒较少, 且主要分布于食物泡内, 线粒体内亦可见到个别金颗粒分布, 胞质及其它细胞器内则没有观察到金颗粒(图版I-1)。

2.2 聚集期细胞

随着这一时期细胞内圆形线粒体的密集分布, 线粒体内结合的胶体金颗粒也较对数期增多, 且2~3颗聚集在一起, 其附近的胞质内也分散着一部分标记的金颗粒(图版I-3)。此外, 细胞内食物泡减少并逐渐被溶酶体融合分解形成次级溶酶体, 少量金颗粒结合在泡内(图版I-4)。胞内的其它区域仍未观察到金颗粒的分布。

2.3 细胞丘时期

这一时期细胞变化的主要特征是一些线粒体内靠近外膜处出现空泡, 并逐步扩大使内外膜间形成明显的间隙, 上面定位着一些胶体金颗粒(图版I-6), 随着间隙扩大, 线粒体内的嵴结构逐渐模糊, 而那些没有被破坏的线粒体内则很少有胶体金颗粒存在(图版I-7)。

2.4 蛻蛹体时期

此阶段的盘基网柄菌已分化成前孢子细胞和前柄细胞, 胞内的胶体金颗粒数量在这一时期都到

达了顶峰, 且许多金颗粒聚集在一起, 定位在特定的区域或胞器内。前孢子和前柄细胞不仅在细胞内超微结构上存在着差异, 金颗粒在细胞内的分布也有很大的区别。

2.4.1 前孢子细胞 前孢子细胞内仍存在一些完整的线粒体, 胞内的空泡更加透明, 体积也大大缩小, 这些小泡聚拢在一定的区域, 上面聚集着大量的胶体金颗粒(图版I-9)。与之相反, 线粒体内却尚未观察到金颗粒(图版I-10)。

2.4.2 前柄细胞 前柄细胞内的线粒体逐步被自噬泡吞噬, 这些自噬泡占据着胞内大块区域, 有些自噬泡相互融合形成大的空泡, 内含未消化完全的细胞器。在尚未被吞噬的线粒体和自噬泡膜上, 大量金颗粒聚集在一起(图版II-2)。与前孢子细胞不同的是, 胶体金颗粒几乎分布于细胞内所有的区域, 内质网及细胞内新形成的髓样结构等细胞器内也能见到分散成单个的金颗粒(图版II-3、图版II-4), 在细胞质靠近质膜处也出现了金颗粒标记(图版II-5)。

2.5 子实体时期

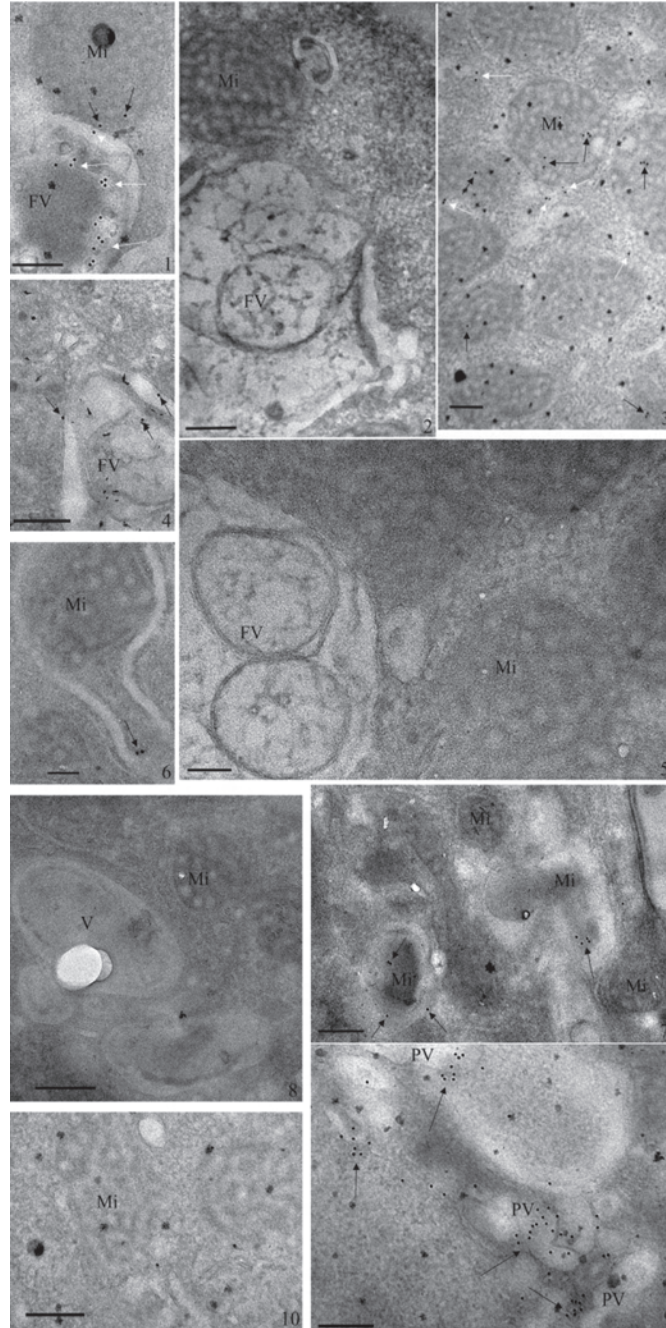
2.5.1 孢子细胞 在孢子细胞的形成过程中胞内的细胞器已大大减少, 细胞内仅剩下部分线粒体, 胶体金颗粒的数量远不如上一时期多, 仅能观察到少量金颗粒分散于细胞质内, 且都没有定位在线粒体内(图版II-7)。

2.5.2 柄细胞 柄细胞的凋亡过程中线粒体逐步被自噬泡吞噬殆尽, 这一时期的线粒体较小, 且多靠近质膜及自噬泡, 胶体金颗粒分散成单个地定位于这些线粒体中。但在靠近细胞膜处的某些部位却能观察到一个大的空泡, 这种泡靠近质膜一侧的膜几乎与质膜融合, 并向细胞外侧凸起, 一些金颗粒定位在泡内残留的线粒体及边缘处, 与细胞内部形成鲜明对比(图版II-8)。同时, 胞质内也观察到一些金颗粒(图版II-10)。

在以1% BSA-0.01 mol/L PBS代替一抗血清的对照组实验的电镜图片上(图版I-2、图版I-5、图版I-8、图版II-1、图版II-6、图版II-9、图版II-11), 均未见到胶体金颗粒分布, 为阴性反应。

3 讨论

对于尿囊酸酶的亚细胞定位的研究可以追溯至1969年, Visentin等^[12]研究了美洲蛙肝脏内嘌呤代谢酶的分布, 认为尿囊酸酶同其它几种催化尿酸转

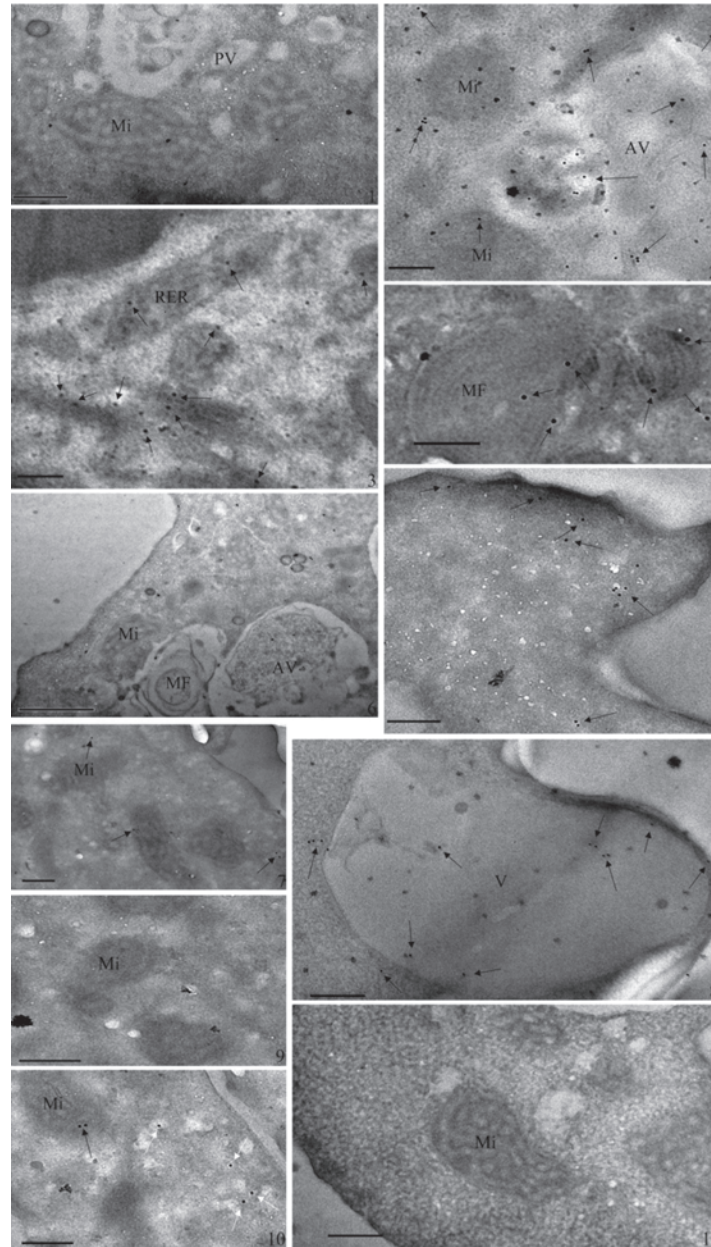


1: 对数期细胞, 金颗粒主要分布于食物泡内(空心箭头), 线粒体内亦可见到个别金颗粒分布(箭头)。Mi: 线粒体; FV: 食物泡; 3: 聚集期细胞, 金颗粒分布在线粒体内, 且两三颗聚集在一起(箭头), 线粒体附近的细胞质内也能观察到一些金颗粒(空心箭头); 4: 聚集期细胞内食物泡内分布有少量金颗粒(箭头); 6: 细胞丘时期细胞的线粒体内外膜形成空隙, 上定位有胶体金颗粒(箭头); 7: 细胞丘时期细胞内发生内自噬的线粒体内分布着胶体金颗粒(箭头), 完整的线粒体则没有金颗粒分布; 9: 前孢子细胞内的小泡(PV)聚拢在一定的区域, 上面聚集着大量的胶体金颗粒(箭头)。PV: 前孢子细胞空泡; 10: 前孢子细胞内的线粒体上观察不到胶体金颗粒分布。图版I-2, 图版I-5, 图版I-8分别为对数期、聚集期细胞丘期的阴性对照图片, 没有观察到金颗粒。标尺=200 nm。

1: the logarithmic-phase cell. Gold particles are mainly distributed in food vacuole(hollow arrow), and a few in mitochondrion(arrow). Mi: mitochondrion; FV: food vacuole; 2: during cells aggregation, most gold particles are observed in mitochondria in the form of two or three particles gathering(arrow), even in cytoplasm around them(hollow arrow); 3: several gold particles are located in the food vacuole of the aggregation-phase cell(arrow); 6: cell mound stage. Gold particles are found in vacuoles content of crista (arrow). V: vacuole; 7: in the mound stage, colloidal gold particles are distributed in the vacuoles (arrow), while very few in mitochondria; 9: inside the pre-spore cell, colloidal gold gather in prespore vacuoles, which showing an aggregated distribution (arrow). PV: pre-spore vacuole; 10: no gold particle is observed in myelin figure of the pre-spore cell. Plate I-2, Plate I-5, Plate I-8 are control of logarithmic-phase, aggregation, mound cell, respectively. The bar is 200 nm.

图版I 盘基网柄菌细胞分化与凋亡中尿囊酸酶的定位

Plate I Subcellular localization of allantoicase in *Dictyostelium discoideum* cells during differentiation and apoptosis



2: 前柄细胞线粒体逐步被自噬泡(AV)吞噬, 在线粒体和自噬泡上, 金颗粒聚集在一起(箭头)。AV:自噬泡; 3: 前柄细胞内的内质网(RER)中也分布了不少胶体金颗粒(箭头)。RER:糙面内质网; 4: 前柄细胞内髓样结构(MF)中也分布了少量的金颗粒(箭头)。MF:髓样结构; 5: 前柄细胞靠近细胞膜处的胞质内也观察到了胶体金颗粒(箭头); 7: 孢子细胞内的金颗粒较少, 分散于细胞质内(箭头); 8: 柄细胞胞质靠近细胞膜处出现了空泡(V), 一些金颗粒定位在泡内及边缘处(箭头); 10: 柄细胞内线粒体较小, 且多靠近质膜, 胶体金颗粒分散成单个地定位于这些线粒体(箭头)及周围胞质(空心箭头)中。标尺=200 nm。

图版II-1、图版II-6、图版II-9、图版II-11分别为前孢子细胞、前柄细胞、孢子细胞、柄细胞的阴性对照图片, 没有观察到金颗粒。

2: in the pre-stalk cell, the mitochondria are slowly phagocytosed by autophagic vacuole, considerable amount of particles are localized in both of them (arrow). AV: autophagic vacuole; 3: a number of particles are distributed in the rough endoplasmic reticulum of the pre-stalk cell (arrow). RER: rough endoplasmic reticulum; 4: a few particles are observed in myelin figure of the pre-stalk cell (arrow). MF: myelin figure; 5: in the pre-stalk cell, a certain amount of particles are found in the cytoplasm near the plasma membrane (arrow); 7: spore cell. A few gold particles are distributed in cytoplasm (arrow); 8: stalk cell, gold particles are localized inside and around newly formed vacuole close to plasma membrane (arrow); 10: stalk cell. The mitochondria are smaller and decreased, most of them close to plasma membrane, several gold particles are inside them (arrow) and the cytoplasm (hollow arrow). The bar is 200 nm.

Plate II-1, Plate II-6, Plate II-9, Plate II-11 are control of pre-spore cell, pre-stalk cell, spore cell, stalk cell, respectively.

图版II 盘基网柄菌细胞分化与凋亡中尿囊酸酶的定位

Plate II Subcellular localization of allantoicase in *Dictyostelium discoideum* cells during differentiation and apoptosis

化为尿素的酶一样,只存在于过氧化物酶体内。后来,Noguchi等^[13]认为它定位在鱼的肝脏细胞过氧化物酶体的膜上。而Yeldandi等^[14]却认为蛙的肝脏及肾脏细胞内尿囊酸酶定位在了细胞质中,Vigetti等^[15]和Wang等^[16]分别推测非洲爪蟾和文昌鱼体内的尿囊酸酶很有可能位于胞质内。Hayashi等^[4,17]对13种鱼体内尿囊酸酶的研究中认为在鱼的肝脏细胞内它定位在过氧化物酶体的基质内或膜的外表面,但在两栖动物细胞内尿囊酸酶的一个亚单位与尿囊素酶形成复合物并且可能定位于线粒体内,这一点与Usuda等^[18]定位牛蛙肾脏内的尿囊素酶时所得的结论一致。本实验中盘基网柄菌内的尿囊酸酶最先产生于线粒体中,这与前人对两栖类动物研究所得的结论相符,而后随着发育的进行,这些尿囊酸酶可能逐渐进入胞内其它位置。

实验结果表明,尿囊酸酶在多细胞发育前期表达量较少,特别是在细胞发育初期,细胞内的尿囊酸酶表达量较少。本实验在发育初期细胞中发现尿囊酸酶大多存在于食物泡内。Lee等^[19-20]从一些细菌和真菌中克隆出尿囊酸酶基因,证明细菌等微生物内亦有可能存在尿囊酸酶的表达。实验室条件下盘基网柄菌主要以细菌为食,因而发育初期的细胞内分布着大量富含细菌的食物泡,因此推测这些尿囊酸酶很有可能是盘基网柄菌所吞噬的克雷伯氏菌表达的产物,随着细胞发育进行,细胞内再无食物泡形成,原有的食物泡又都被溶酶体分解消化,结果细胞内的尿囊酸酶数量就大大减少。

在细胞分化前尿囊酸酶的位置主要和线粒体相互关联,在对数期线粒体内就有少量的尿囊酸酶,聚集后胞内的线粒体更加发达,线粒体内的尿囊酸酶愈加丰富。但问题是尿囊酸酶基因位于盘基网柄菌细胞3号染色体,转录后为何要转运至线粒体?有研究发现细胞丘时期细胞内线粒体开始出现了自噬现象,并认为与发育细胞分化有关^[21],本实验结果也发现从细胞丘时期起,细胞内线粒体发生内自噬现象,令人惊讶的是尿囊酸酶金颗粒出现于线粒体内自噬区域,并且特异性的分布于出现内自噬的线粒体内。随着发育进行到蛞蝓体时期,细胞明显分化成前孢子和前柄细胞,两种细胞内的胞器凋亡剧烈进行,此时细胞内的尿囊酸酶的量也迅猛增加,前孢子细胞的空泡,前柄细胞的自噬泡及线粒体,这些凋亡的胞器内及其边缘都分布着大量的尿囊酸酶,

直到子实体形成,细胞凋亡进入尾声,尿囊酸酶才逐渐减少。这些都说明了尿囊酸酶在细胞内的位置变化都与细胞的发育及分化进程密切相关,两种细胞的尿囊酸酶分布情况虽然各异,但发生凋亡的胞器及部位都出现尿囊酸酶增加的现象,因此推测尿囊酸酶蛋白可能参与了盘基网柄菌细胞分化和凋亡的调控,而这些尿囊酸酶基因的表达很有可能是细胞发育调控信号转导通路中的重要一环。

值得指出的是在多细胞发育后期,孢子细胞内除线粒体凋亡形成的空泡外,剩余的线粒体内没有尿囊酸酶的存在,与之相比,柄细胞在其形成过程中无论是已经被破坏的还是尚且完整的线粒体,都分布着尿囊酸酶,直至最后细胞凋亡完毕。因此可以判断,在细胞分化过程中,尿囊酸酶存在于将消亡或将被自噬泡吞噬的胞器内。这一点正好与本实验室过去的研究结果和其他学者的研究结果^[18]相吻合。此外,细胞分化到最后,柄细胞内线粒体还含有尿囊酸酶,而孢子细胞内则没有这一现象,细胞内的胞器凋亡可能已趋于结束,这从另一方面说明了尿囊酸酶在两种细胞内的分布位置差异与它们的分化差异存在一定相关性。

参考文献 (References)

- 1 宋微波译. 原生动物学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007: 159-60.
- 2 侯连生, 华燕, 马宁莎, 韩轶. 盘基网柄菌发育中的细胞粘附分子及其信号转导. 生命科学 2004; 16(4): 221-5.
- 3 彭建涛, 施佳乐, 谭宁, 侯连生. 盘基网柄菌中分化诱导因子信号与细胞命运决定. 细胞生物学杂志 2006; 28: 183-7.
- 4 Hayashi S, Fujiwara S, Noguchi T. Evolution of urate degrading enzymes in animal peroxisomes. Cell Biochem Biophys 2000; 32: 123-9.
- 5 Vigetti D, Monetti C, Acquati F, Tarameli R, Bernardini G. Human allantoicase gene: cDNA cloning, genomic organization and chromosome localization. Gene 2000; 256(1-2): 253-60.
- 6 Vigetti D, Monetti C, Bernardini G. Molecular cloning of mouse allantoicase cDNA. Biochim Biophys Acta 2001; 1519(1/2): 117-21.
- 7 Vigetti D, Binelli G, Monetti C, Prati M, Bernardini G, Gornati R. Selective pressure on the allantoicase gene during vertebrate evolution. J Mol Evol 2003; 57(6): 650-8.
- 8 马宁莎. gp150蛋白对盘基网柄菌多细胞发育基因表达的影响. 华东师范大学硕士学位论文 2005.
- 9 陈能星, 魏晓静, 刘伟, 侯连生. 盘基网柄菌allC的克隆、表达和多克隆抗体的制备. 华东师范大学学报(自然科学版) 2010; 4: 77-84.
- 10 刘伟, 张树任, 陈能星, 侯连生. 盘基网柄菌尿囊酸酶基因

- RNA干扰载体的构建及干扰效果鉴定. 细胞生物学杂志 2009; 31(3): 395-400.
- 11 Feit IN, Medynski EJ, Rothrock MJ. Ammonia differentially suppresses the cAMP chemotaxis of anterior-like cells and prestalk cells in *Dictyostelium discoideum*. J Biosci 2001; 26(2): 157-66.
- 12 Visentin LP, Allen JM. Allantoinase: Association with amphibian hepatic peroxisomes. Science 1969; 163(874): 1463-4.
- 13 Noguchi T, Takada Y, Fujiwara S. Degradation of uric acid to urea and glyoxylate in peroxisomes. J Biol Chem 1979; 254: 5272-5.
- 14 Yeldandi AV, Chu R, Pan J, Zhu Y, Usuda N. Peroxisomal purine metabolism. Ann N Y Acad Sci 1996; 804: 165-75.
- 15 Vigetti D, Monetti C, Pollegioni L, Taramelli R, Bernardini G. *Xenopus* allantoinase: Molecular cloning, enzymatic activity and developmental expression. Arch Biochem Biophys 2000; 379(1): 90-6.
- 16 Wang Y, Zhang S, Liu Z, Li H, Wang L. Amphioxus allantoinase: Molecular cloning, expression and enzymatic activity. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2005; 141(2): 237-43.
- 17 Hayashi S, Fujiwara S, Noguchi T. Degradation of uric acid in fish liver peroxisomes. J Biol 1989; 264: 3211-5.
- 18 Usuda N, Hayashi S, Fujiwara S, Noguchi T, Nagata T, Rao MS, et al. Uric acid degrading enzymes, urate oxidase and allantoinase, are associated with different subcellular organelles in frog liver and kidney. J Cell Sci 1994; 107: 1073-81.
- 19 Lee FJ, Moss J. Cloning of a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a protein Homologous to allantoinase of *Neurospora crassa*. Yeast 1991; 7(9): 993-5.
- 20 Lee H, Fu YH, Marzluf GA. Nucleotide sequence and DNA recognition elements of alc, the structural gene which encodes allantoinase, a purine catabolic enzyme of *Neurospora crassa*. Biochemistry 1990; 29(37): 8779-87.
- 21 谭 宁, 施佳乐, 彭建涛, 侯连生. 盘基网柄菌细胞分化和凋亡的形态特征. 动物学报 2006; 52(3): 603-11.

Subcellular Localization of Allantoinase in *Dictyostelium discoideum* Cells During Differentiation and Apoptosis

Sun Jinchu, Hou Liansheng*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract By means of colloidal gold immunoelectron microscopy technique, changes of intracellular allantoinase distribution in *Dictyostelium discoideum* cells during differentiation and apoptosis were investigated. Our result showed that allantoinase was mainly observed in the mitochondria and the cytoplasm surrounding them during aggregation stage. At mound stage, the allantoinase inside the cells which will form pre-spore cells, was located in the vacuoles inside the mitochondria undergoing endoautophagic apoptosis. As the pre-spore cells differentiating, the allantoinase decreased and occurred in new vacuoles near the plasma membrane. While almost all organelles in other cells contained allantoinase, until stalk cell formed. This result showed that the two types of cells which will differentiate into spore cells and stalk cells, have different intracellular location of allantoinase, and suggests the allantoinase relates closely to the regulation of cell differentiation and apoptosis.

Key words *Dictyostelium discoideum*; allantoinase; differentiation and apoptosis; colloidal gold

Received: April 2, 2011 Accepted: April 26, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30970316, No.30670266)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn