

## 猪动脉内皮细胞胞膜小窝的电子断层三维结构分析\*

孙书锋\*\* 张凯\*\* 徐伟 王刚 陈建军 孙飞\*\*\*

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** 利用电子断层三维重构技术对猪动脉内皮细胞 (porcine aorta endothelial cell, PAE cell) 胞膜小窝的三维结构进行了初步研究, 发现胞膜小窝在细胞膜表面呈不均匀分布并在局部形成聚集, 胞膜小窝膜内外表面都由宽度约 14~16 nm 的条纹状结构所环绕, 推测该条纹状结构主要由小窝蛋白和胆固醇构成, 狭窄的胞膜小窝颈部区域存在高密度的丝状结构. 三维结构显示胞膜小窝与纤维丝体网络(推测为微管网络)相互作用, 暗示了细胞内吞可能的运输途径.

**关键词** 猪动脉内皮细胞 (PAE cell), 胞膜小窝, 三维结构, 电子断层术

学科分类号 Q2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00693

胞膜小窝(caveolae)是由 Palade<sup>[1]</sup>和 Yamada<sup>[2]</sup>于 20 世纪 50 年代发现并开始研究的. 胞膜小窝是细胞膜特殊的功能区, 位于细胞质膜表面, 细胞膜内陷形成烧瓶状或倒  $\Omega$  状, 颈部狭窄, 直径 50~100 nm, 具有由小窝蛋白(caveolin)和胆固醇等构成的膜覆层(caveolar coats)<sup>[3]</sup>, 而非网格蛋白(clathrin)包被<sup>[4]</sup>的囊泡状结构. 胞膜小窝在成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和脂肪细胞中含量丰富, 白细胞和神经细胞中基本没有<sup>[5,6]</sup>.

胞膜小窝的功能涉及许多重要的细胞生命活动, 例如信号传导、细胞内吞、肿瘤生成等, 在平滑肌细胞中参与形成 T-管以及钙调肌肉收缩过程<sup>[5]</sup>. 另外, 有研究发现胞膜小窝及其小窝蛋白(caveolin)还与肿瘤细胞转化转移相关<sup>[7,8]</sup>. 内吞作用是胞膜小窝的重要功能. 一系列细胞活动, 包括营养物质摄入、生长因子水平调节、细胞膜动态平衡的维持、突触传递, 甚至某些病原体入侵等都是通过胞膜小窝介导的内吞作用进行的<sup>[9]</sup>.

一个有趣的发现是, 胞膜小窝存在一个具有条纹状结构的覆层(caveolar coats), 其主要组分是一种 22 ku 的蛋白质——小窝蛋白(caveolin), 同时富含胆固醇等<sup>[3]</sup>. 目前发现有 3 种小窝蛋白, 即小窝蛋白 -1(caveolin-1, CAV1)、小窝蛋白 -2(caveolin-2, CAV2)和小窝蛋白 -3(caveolin-3, CAV3). CAV1 和 CAV2 在胞膜小窝丰富的非肌肉细胞中存在, CAV3 则存在于骨骼肌细胞和一些平滑肌细胞中<sup>[10]</sup>, 有证据证明这 3 种小窝蛋白具有基本类似的

结构, 它们的 N 端和 C 端都伸出在细胞质内, 中间疏水性的 102~134 位氨基酸残基形成发夹形结构嵌入在细胞膜内<sup>[11]</sup>.

迄今众多关于胞膜小窝的结构和功能的研究资料绝大多数是通过生化和分子生物学手段获得的. 而利用常规透射电镜技术观察胞膜小窝超微结构所获得的信息基本是关于其二维投影结构的简单描述. 为了准确认识和理解胞膜小窝的结构和功能, 对胞膜小窝的三维结构进行研究是非常必要的.

电子断层三维重构技术(electron tomography, ET)是近年来快速发展起来的研究细胞、细胞器和生物大分子集合体(assembly)纳米分辨率三维结构的前沿技术<sup>[12]</sup>, 是联接细胞生物学和结构分子生物学研究的重要手段. 其原理是通过透射电子显微镜收集样品的系列倾转二维投影像, 经过三维重构计算得到细胞器或大分子集合体等样品的纳米分辨率三维结构.

我们以培养的猪动脉内皮细胞(porcine aorta endothelial cell, PAE cell)为实验对象, 利用超薄切片电子断层三维重构技术对胞膜小窝的三维结构进行了初步分析.

\* 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-R-126).

\*\* 共同第一作者.

\*\*\* 通讯联系人.

Tel/Fax: 010-64888582, E-mail: feisun@ibp.ac.cn

收稿日期: 2008-10-10, 接受日期: 2008-12-26

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系.** 本项研究所用细胞系为培养的猪动脉内皮细胞.

**1.1.2 实验仪器和器材.** 倒置荧光显微镜(Olympus 公司), CO<sub>2</sub> 培养箱(Hera 公司), 离心机(Sorvall 公司), DP70 摄像头(PCO 公司), 超薄切片机 EM UC6 (Leica 公司), 200 kV 透射电子显微镜 Tecnai20(FEI 公司), UltraScan 1000 CCD 采像系统 (Gatan 公司), 细胞培养皿(Corning 公司).

### 1.1.3 主要试剂.

HAM-F12 培养基(添加有 1 mmol/L L- 谷氨酰胺, 经 0.2 μm 滤膜过滤), 标准胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Hyclone 公司), 胰蛋白酶, 二甲基亚砷(DMSO)(专用于细胞培养)(Amresco 公司), 兔抗 Caveolin-1(BD Transduction Laboratories), FITC 标记羊抗兔二抗(Fluka 公司).

环氧树脂 Epon812, 甲基内次甲基磷苯二酸酐(methylnadic anhydride, MNA)(Roth 公司), 十二烷基琥珀酸酐(dodeceny succinic anhydride, DDSA, 和光纯药工业株式会社), 三(二甲胺基甲基)苯酚(2, 4, 6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol, DMP-30, Serva 公司).

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养与收集.

将冷冻保存在液氮中的 PAE 细胞在 37℃ 解冻, 用 F12 培养基反复吸吹均匀, 分散到 100 mm 培养皿中. 胎牛血清 56℃ 灭活 30 min, 按终浓度 10% 的比例补加到 F12 培养基中. 细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养. 每 2 天半量换液. 细胞培养至 90% 汇合度时, 无血清培养基饥饿 12 h, 收集细胞.

将细胞培养液吸出, 0.1 mol/L pH7.2 的 PBS (后面用的 PBS 与此相同, 除非特殊说明)漂洗 3 次, 5 mmol/L EGTA-5 mmol/L EDTA PBS 4℃ 孵育 15 min, 移去细胞分离液, 用 F12 培养基吹散获得细胞悬液, 500 g 离心 5 min, 去掉上清, 加入 1 ml

2.5%戊二醛 PBS 固定液, 吹散, 4℃ 保存.

**1.2.2 免疫荧光标记.** 将培养的贴壁细胞用 PBS 冲洗 2~3 次, 1%多聚甲醛室温固定 10 min, PBS 冲洗 3 次, 含 5% BSA 的 PBS 作为封闭液孵育标本 20 min, 兔抗 Caveolin-1 用含 1%BSA 的 PBS 以 1:100 稀释后, 4℃ 孵育标本 24 h, 细胞用封闭液洗涤 3 次, FITC- 标记的羊抗兔 IgG 经含 1%BSA 的 PBS 以 1:40 稀释, 室温孵育 45 min, PBS 洗 2 次每次 15 min, 在激发波长 495 nm 荧光显微镜下检测.

**1.2.3 超薄切片制备.** 细胞超薄切片制备采用常规的超薄切片技术, 细胞经 2.5%戊二醛固定及 1% OsO<sub>4</sub> 后固定, 梯度乙醇脱水, Epon812 环氧树脂包埋. 用 Leica EM UC6 切片机进行包埋样品的超薄切片, 切片厚度为 50~80 nm, 而用于电子断层三维重构实验的切片厚度为 200 nm, 切片用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色.

**1.2.4 胶体金制备.** 用于基准点(fiducial marker)方法进行图像精确匹配的胶体金颗粒, 采用 HAuCl<sub>4</sub> 柠檬酸钠还原法制备, 透射电镜检测颗粒尺寸为 10 nm 左右.

#### 1.2.5 数据收集.

利用透射电子显微镜, 在 200 kV 加速电压, 放大倍率 25 000×下, 观察厚度约为 200 nm 的 PAE 细胞切片, 找到胞膜小窝富集区域, 在样品台倾转角从 -54° ~ +57° 区间, 每增加 1° 倾斜角收集一幅照片, 共 112 张(表 1, A1). 为收集双轴数据, 在第一组倾斜系列照片收集完成后, 取出样品杆, 将切片载网在 *x-y* 平面(垂直于电子束的平面)内旋转 90°, 再送入电镜, 在样品台倾转角 -60° ~ +58° 区间, 每增加 1° 收集一幅照片, 收集第二组倾斜系列照片, 共计 119 张(表 1, A2).

为了利用基准点(fiducial marker)方法进行图像间精确匹配, 将胶体金稀释并超声处理后, 加入到切片两面, 其浓度调节到使得每幅图像上含有胶体金颗粒 20 个左右, 并对其进行双轴倾转的数据收集, 倾转角度分别为 -57° ~ +57° (表 1, B1) 与 -60° ~ +54° (表 1, B2), 其余参数同上.

**Table 1 Data collection and calculated geometry parameters of each section**

Data set	Original tilt	Tilt angle offset	Pitch angle	Thickness	z-shift
A1	-54°~+57°	-3.3°	11.7°	176.3 nm	1.8 nm
A2	-60°~+58°	13.4°	13.6°	175.4 nm	4.0 nm
B1	-57°~+57°	0.5°	1.1°	169.7 nm	11.7 nm
B2	-60°~+54°	6.5°	-1.4°	169.7 nm	9.1 nm

**1.2.6 图像处理与三维像重构.** 图像处理与三维像重构工作主要应用 IMOD 软件包<sup>[13]</sup>(Colorado 大学 Boulder 实验室, <http://bio3d.colorado.edu/imod/>)进行. 具体过程为: a. 二维图像的预处理. 断层成像直接得到的原始文件为 TIFF 格式, 我们利用 em2em 程序<sup>[14]</sup>将图像转换为电镜三维重构通用的 MRC 格式, 同时利用 boxer 程序(eman<sup>[15]</sup>软件包中)测量出图像中每个像素代表的真实距离为 0.408 nm. 非胶体金标记的第二组数据(表 1, A2)的第 115~119 张图像质量较差, 在重构时被剔除. 重构前用 ccderaser 程序(IMOD 软件包中)对射线损伤和污染点进行了自动擦除. b. 二维投影图的匹配及归一化. 对于非胶体金标记的图像, 我们应用 IMOD 软件中相关函数法进行图像匹配, 对于有胶体金标记的图像, 我们先利用相关函数粗匹配, 后利用胶体金进行精细匹配. c. 样品空间几何参数的确定. 利用对局部数据进行快速的背投影的方法, 我们确定了试验样品与背景的边界以及样品在成像时真实的几何参数——倾角补偿(tilt angle offset)、旋转轴倾斜角(pitch angle)、切片厚度(thickness)和旋转中心的偏移量(z-shift)(表 1). d. 三维重构. 利用 IMOD 软件, 对实验数据进行加权背投影(weighted back projection, WBP)三维重构. 重构时的滤波参数为 cutoff=0.5, falloff=0.05. e. 双轴重构数据的合并. 将双轴旋转收集的数据, 对其分别重构后进行匹配并在傅立叶空间合并. f. 重构数据的除噪. 收集到的电子断层数据在傅里叶空间中存在信息缺失, 导致其重构结果在实空间中表现为各向异性. 我们利用 IMOD 软件包中的 nad\_eeed\_3d 程序对重构数据进行各向异性扩散除噪(anisotropic diffusion filtering)处理, 迭代 60 次, 迭代步长为 0.2, 参数  $K=2$ . g. 三维图像的显示. 通过 Chimera 软件<sup>[16]</sup>对

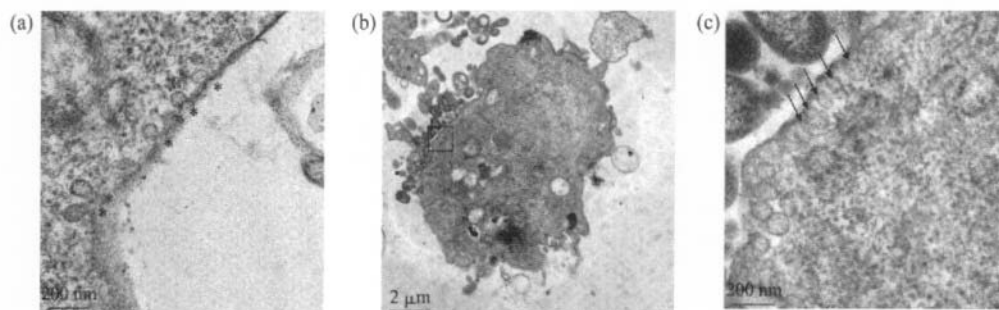
局部密度进行显示和渲染, 同时利用 IMOD 软件绘制了重构数据的三维模型.

## 2 结果和讨论

### 2.1 胞膜小窝的超微形态学观察

利用倒置显微镜观察, 发现 PAE 细胞生长状况良好, 细胞伸长呈纤维状. 抗 Caveolin-1 免疫荧光标记显示, 细胞表面有众多小窝蛋白聚集区(荧光照片没有在正文里显示), 意味该处可能存在胞膜小窝. 细胞表面一般存在网格蛋白包被小窝(clathrin-coated vesicle)和胞膜小窝两种内陷, 尺寸接近, 但前者的包被膜厚度( $(21 \pm 2)$  nm)显著大于后者( $\sim 9$  nm)<sup>[17]</sup>, 也就是说, 胞膜小窝覆膜的厚度和细胞膜相差无几, 因此从超微结构形态方面能比较容易区分出胞膜小窝(图 1a). 大量的电镜观察表明, 通常使用的 EDTA-胰蛋白酶使细胞快速脱壁, 但所收集的细胞收缩成圆形, 胞膜形成众多突起, 部分膜结构被破坏, 很难找到胞膜小窝. 当用戊二醛原位固定后, 使用细胞铲刮取收集的细胞基本上保持了贴壁时的形态, 但细胞铲刮对细胞膜有机械损伤, 虽能找到胞膜小窝, 但数量较少. 利用 EDTA-EGTA 收集的细胞, 形态结构保存较好(图 1b), 没有明显的损伤, 可以在细胞外膜表面细胞质侧观察到密集存在的胞膜小窝(图 1a, 图 1c).

在培养的 PAE 细胞表面, 胞膜小窝呈不均匀分布, 在局部密集(图 1b). 有研究发现, 在成纤维细胞中胞膜小窝趋向于聚集在细胞的迁移边(migrating edge)附近, 并与应力纤维(stress fibers)平行<sup>[3]</sup>. 然而我们没有发现培养的 PAE 细胞表面上的胞膜小窝聚集区的分布规律. Tamai 等<sup>[18]</sup>(2005 年)认为大于单个胞膜小窝体积的一些细菌也可以通过胞膜小窝进入细胞内部, 推测这可能涉及到胞膜小



**Fig. 1** Electron micrographs of sections of plastic embedded PAE cell

(a) Caveolae (marked by asterisk) can be clearly seen from the ultra-thin section with thickness  $\sim 80$  nm. (b) Low magnification electron micrograph of the PAE cell section with thickness  $\sim 200$  nm (bar=2  $\mu$ m). (c) High magnification electron micrograph of the selected PAE cell area which is marked by rectangle from (b). Caveolae are marked by arrows (bar =200 nm).

窝间的融合,因而与胞膜小窝的密集存在有关,但这还需要进一步验证.我们通过三维重构得到的模

型清楚地显示了在聚集区中胞膜小窝的分布及它们之间的空间关系(图 2).

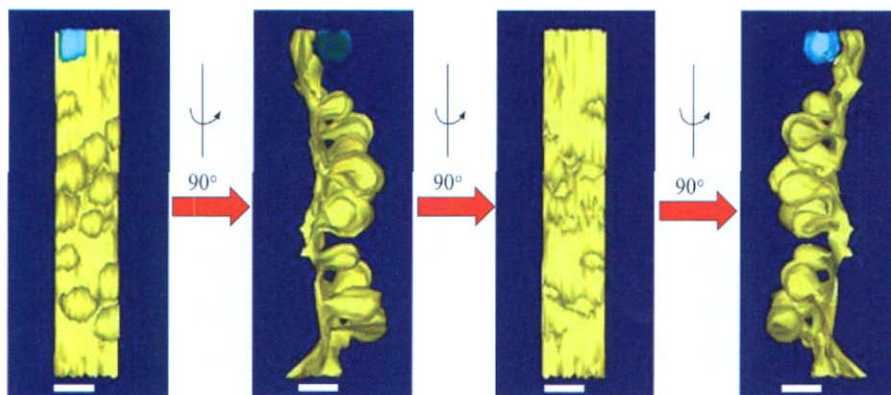


Fig. 2 3D-structure model of caveolar cluster

Three-dimensional model of caveolae cluster around PAE cell surface is shown from different angular views. One caveolae separated from the membrane is colored by cyan (bar =100 nm).

在超薄切片中观察到典型的胞膜小窝形态为具有狭窄的颈部和向细胞外开口的烧瓶状囊泡.通过对较多数量的胞膜小窝的测量和统计,培养的PAE细胞表面上胞膜小窝的尺寸为长轴( $100 \pm 13$ ) nm,短轴( $69 \pm 10$ ) nm.

## 2.2 双轴数据收集、图像匹配及断层图获得

通过双轴方法对厚度约为200 nm的PAE细胞切片收集了2组系列倾斜图像.利用IMOD软件包进行图像匹配和三维像重构,并获得电子断层图(图3a).从每一个厚度为8 nm的断层图清晰显示了不同断面的胞膜小窝的形态结构,并显示了一个断面到另一个断面结构的变化趋势.

影响电子断层三维重构质量和分辨率的重要因素之一是数据采集的完整性.由于电镜样品台的限制,数据收集时样品倾斜角度不可能达到 $\pm 90^\circ$ ,一般可达 $\pm 70^\circ$ 左右.当使用单轴倾斜法收集数据时,由于部分高角度倾斜的数据无法收集,缺少部分结构信息,在傅立叶空间中就形成所谓的信息缺失楔(missing wedge)(图4a).这导致重构后的数据产生各向异性,降低了三维像重构的分辨率.特别是由于我们使用的是非电子断层技术专用的样品杆,样品最大倾角仅达到约 $\pm 60^\circ$ ,这种信息缺失就更为严重.为此,我们采用了双倾斜轴,即在两个相互垂直的轴上收集系列倾斜图像数据,可以在一定程度上补偿这种信息缺失(图4b).

## 2.3 胞膜小窝的三维结构分析

图3显示了胞膜小窝的三维重构结果.我们对获得的胞膜小窝三维结构进行分析发现,在重构的胞膜小窝的数字断层切片(图3a)中可见胞膜小窝膜

两侧都存在一定间隔排列的高密度斑点(图3b).在膜两侧的高密度点近似相互对称排列.利用chimera软件将分离的单个胞膜小窝三维地显示,结果可见胞膜小窝膜表面存在由沟和嵴相间构成的条纹状结构环绕在胞膜小窝外周(图3d),粗略测量嵴的宽度约14~16 nm.胞膜小窝膜内表面也有基本类似的条纹状结构(图3e).在胞膜小窝断层图的颈部位区域存在一个密度较高的区域,其中可以看到微弱的丝状结构(图3c),这意味着胞膜小窝的颈部区域可能具有不同于胞膜小窝主体部分的结构.在胞膜小窝的三维结构显示中,颈部区域膜表面条纹状结构较胞膜小窝主体部分密集(图3d).

Rothberg等<sup>[3]</sup>(1992年)用快速冷冻深度蚀刻电镜技术,显示了在胞膜小窝内膜表面存在4~6条沟嵴相间的条纹状胞膜小窝覆层结构(caveolar coat),这些条纹呈现多种形态——弧形、环形、螺旋形或平行点阵状排列,在我们的工作中测量了这些条纹结构中嵴的宽度约为15 nm.这意味这些条纹结构与我们的三维重构的胞膜小窝结构中环绕胞膜小窝外周的条纹状结构可能是同一结构.所不同的是,Rothberg等所显示的是二维图像,无法准确揭示胞膜小窝膜中条纹状结构的分布.而我们的胞膜小窝三维结构所显示的这种条纹可能呈螺旋状环绕胞膜小窝分布(图3d).研究表明,构成胞膜小窝条纹状覆层结构的主要成分是22 ku的小窝蛋白-1(caveolin-1)以及胆固醇、鞘磷脂(sphingomyelin)和鞘糖脂(glycosphingolipids)等<sup>[3,19]</sup>.小窝蛋白-1其N端和C端均在细胞质内,中间第102~134位氨基酸残基为疏水区插入到膜内<sup>[11,20,21]</sup>,其功能涉及

细胞内吞、胆固醇运输、信号传导和肿瘤生成等多种细胞生命活动<sup>[5]</sup>。因此，很有可能这种由小窝蛋白形成的螺旋状环的条纹状结构与细胞膜特化区形成、胞膜小窝囊泡状形态维持以及细胞内吞等密切相关。同时，我们还发现，胞膜小窝的内表面也存在类似的条纹状结构(图 3e)，我们还未见到任何文献有此相关报道。从形态看，这些条纹状结构与外表面所见非常相似，至于这两者是否具有相同化学组成和功能，需要进一步采用多种方法证明。

在胞膜小窝的颈部区域(图 3c)可以观察到与细胞外膜表面平行的微弱条纹状结构，而颈部的细胞膜附近则存在高密度突起。此外，仔细辨别也可以发现，该区域存在环绕的条纹状结构(图 3d, e)，不同的是，相对于胞膜小窝主体区域，这里的条纹状结构更为密集。胞膜小窝颈部区的结构关系到细胞膜内陷的形成，外来物的内吞以及内陷小泡的脱落等细胞功能。免疫电镜表明，颈部区域的小窝蛋

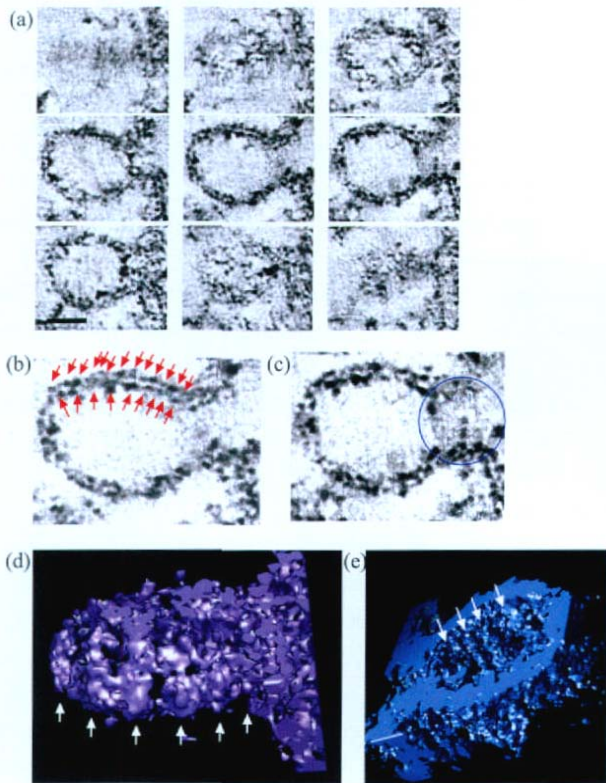


Fig. 3 3D-reconstructed structure of one caveolae

(a) Serial tomographic slices of one whole caveolae along z axis (slice thickness=8 nm, bar=50 nm). (b) The fifth slice in (a). High density sites (red arrows) can be seen spaced evenly on both membrane sides. (c) The sixth slice in (a). High density region with filament structural feature can be found in the caveolar neck area (blue circle). (d) and (e) One surface-rendered caveolae (d) with volume size 130 nm×100 nm×80 nm and its half (e). The striated structures with a width of 14 ~ 16 nm around caveolae are marked by white arrows.

白 -1 分布与其他区域无显著差异<sup>[3,22]</sup>，暗示胞膜小窝颈部区密集的条纹状结构和高密度突起不完全是由小窝蛋白 -1 构成，我们推测，细胞膜骨架可能参与了该结构的形成，要进一步从结构上阐明这个问题，需要高分辨率的三维重构图以及高分辨率免疫标记技术来研究。

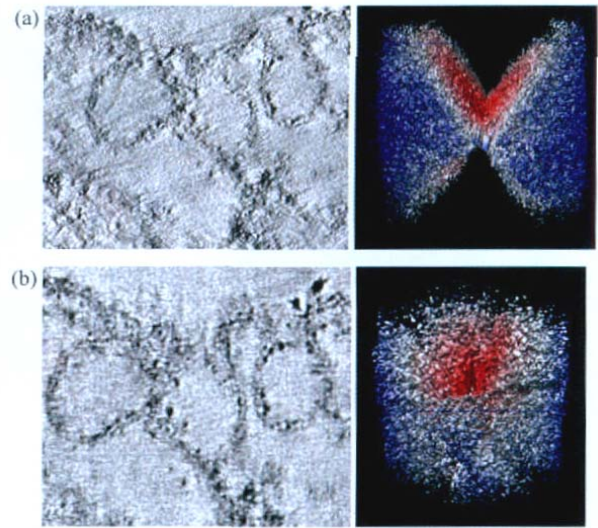


Fig. 4 Reconstruction comparison between single tilt and dual tilt in real space and Fourier space

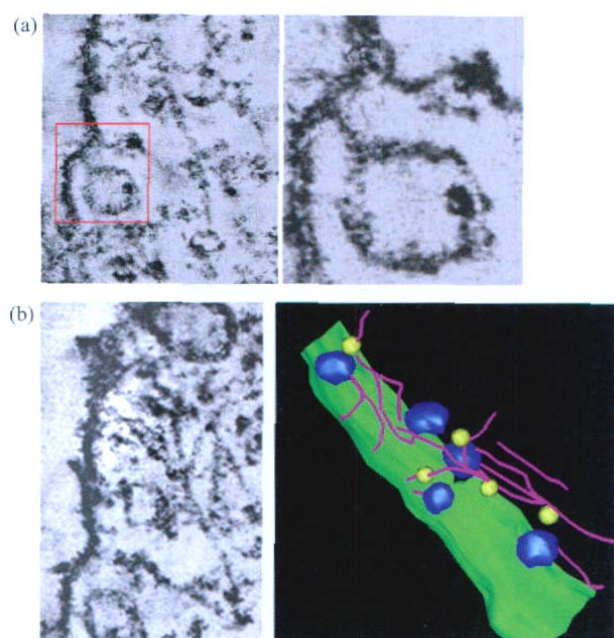
(a) and (b) One slice of tomogram (left) reconstructed from single tilt (a) or dual tilt (b) data set and its 3D Fourier transform (right).

#### 2.4 胞膜小窝与细胞骨架的空间关系

我们在重构的断层图中发现细胞质中有直径 20 nm 左右的纤维状结构，认为是一种细胞骨架。细胞骨架有三种类型：中间纤维，微丝和微管，中间纤维的直径在 10 nm 左右，微丝的直径在 5 ~ 7 nm，而微管则较粗，其直径在 20 nm 以上，因此，我们推测这种纤维状的结构是一种细胞骨架——微管(图 5a)。这些骨架将胞膜小窝、细胞膜、细胞内的囊膜状细胞器连接在一起。在某些区域，还发现了依附于微管旁的较小型的囊泡(图 5a)。我们基于三维重构的结果，使用 IMOD 软件绘制出了该区域的三维结构模型(图 5b)。这个模型清晰地显示出细胞膜(绿色)、胞膜小窝(蓝色)、细胞骨架网络(紫红色)以及较小型囊泡(黄色)之间紧密相连的关系。

一些研究表明，细胞内吞后的胞膜小窝膜在细胞质内可能存在多种运输方式。细胞质膜内化后形成的内陷小泡可以 RAB5- 非依赖方式与预先存在于细胞质中的富含小窝蛋白 -1 的膜小窝小体

(caveosome)融合,转运至内质网<sup>[20,23]</sup>.也有研究者认为,内陷小泡可以通过 RAB5- 依赖方式与早期内体(early endosome)融合运送至高尔基体<sup>[21]</sup>. Mundy 等<sup>[24]</sup>则认为细胞膜上的胞膜小窝通过微管,以 cavicle 的形式进行运输.无论如何,可以肯定的是胞膜小窝的内吞、信号转导以及物质运输等重要功能都与细胞骨架系统密切相关.我们通过胞膜小窝的三维结构分析直接证实了胞膜小窝与微管之间的结构联系(图 5).那些小型囊泡有可能与细胞内吞后胞膜小窝在细胞质内运输有关,这需要进一步的实验证实.



**Fig. 5 Interaction between caveolae and the membrane skeleton or cytoskeleton**

(a) One 10 nm thick tomographic slice shows caveolae are connected with cell membrane by microtubule and several small vesicles are observed attached to microtubules. The area marked by red rectangle is magnified in the right. (b) Left: Another 10nm thick tomographic slice shows caveolae with some small vesicles are linked through a potential microtubule network. Right: 3D model for the interaction between caveolae and cytoskeleton network. Plasma membrane is colored green, caveolae blue, small vesicles yellow and the potential microtubule network purple.

电子断层三维成像技术是解析细胞、细胞器、超分子复合体三维结构的强有力的工具,在细胞分子生物学研究领域有极大的应用潜力<sup>[25]</sup>.本项目通过对猪动脉内皮细胞胞膜小窝的研究,在我国首次建立了超薄切片电子断层三维重构技术,初步解析

了胞膜小窝的三维结构.我们发现了许多关于胞膜小窝的结构与功能关系的有趣问题,这些问题的回答需要更高分辨率的电子断层三维成像研究和高分辨率的免疫电镜研究.

在我们完稿之后,Richter 等<sup>[26]</sup>发表了关于胞膜小窝的三维重构的文章,他们的工作与本研究类似,但关于胞膜小窝内外两侧均存在条纹状结构的描述与本研究有差别.

致谢 感谢本实验室孙磊、苏瑞钢在生物电镜样品制备方面给予的帮助,感谢达琦在细胞培养和处理方面的宝贵意见.

### 参 考 文 献

- 1 Palade G E. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys*, 1953, **24**:1424~1436
- 2 Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*, 1955, **1**(5): 445~458
- 3 Rothberg K G, Heuser J E, Donzell W C, *et al.* Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 1992, **68**(4): 673~682
- 4 Stan R V. Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1746**(3): 334~348
- 5 Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, **1**: 31~41
- 6 Pelkmans L, Marino Z. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*, 2005, **436**: 128~133
- 7 Koleske A J, Baltimore D, Lisanti M P. Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(5): 1381~1385
- 8 Lee S W, Reimer C L, Oh P, *et al.* Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene*, 1998, **16**(11): 1391~1397
- 9 Pelkmans L, Fava E, Grabner H, *et al.* Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature*, 2005, **436**(7047): 78~86
- 10 Tang Z, Scherer P E, Okamoto T, *et al.* Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem*, 1996, **271**(4): 2255~2261
- 11 Glenney J R, Jr, Soppet D. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma-membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous-sarcoma-virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(21): 10517~10521
- 12 Lučić V, Förster F, Baumeister W. Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu Rev Biochem*, 2005, **74**: 833~865
- 13 Kremer J R, Mastronarde D N, McIntosh J R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol*, 1996, **116**(1): 71~76
- 14 van Heel M, Harauz G, Orlova E V, *et al.* A new generation of the

- IMAGIC image processing system. *J Struct Biol*, 1996, **116** (1): 17~24
- 15 Ludtke S J, Baldwin P R, Chiu W. EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol*, 1999, **128**(1): 82~97
- 16 Pettersen E F, Goddard T D, Huang C C, *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 2004, **25**(13):1605~1612
- 17 Vigers G P A, Crowther R A, Pearse B M F. Three-dimensional structure of clathrin cages in ice. *The EMBO J*, 1986, **5**(3): 529~534
- 18 Tamai R, Asai Y, Ogawa T. Requirement for intercellular adhesion molecule 1 and caveolae in invasion of human oral epithelial cells by porphyromonas gingivalis. *Infect. Immun*, 2005, **73**(10): 6290~6298
- 19 Scherer P E, Lewis R Y, Volonte D, *et al.* Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolin1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex *in vivo*. *J Biol Chem*, 1997, **272**(46): 29337~29346
- 20 Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Science*, 2005, **118** (6): 1099~1102
- 21 Parton R G, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, **8**(3): 185~194
- 22 Westermann M, Steiniger F, Richter W. Belt-like localisation of caveolin in deep caveolae and its re-distribution after cholesterol depletion. *Histochem Cell Biol*, 2005, **123**(6): 613~620
- 23 Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis *via* caveolae. *Traffic*, 2002, **3**(5): 311~320
- 24 Mundy D L, Machleidt T, Ying Y S, *et al.* Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 2002, **115**(22): 4327~4339
- 25 Nickell S, Kofler C, Leis A P, *et al.* A visual approach to proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, **7**(3): 225~230
- 26 Richter T, Floetenmeyer M, Ferguson C, *et al.* High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveolar-cytoskeleton interactions. *Traffic*, 2008, **9**(6): 893~909

### 3D Structural Investigation of Caveolae From Porcine Aorta Endothelial Cell by Electron Tomography\*

SUN Shufeng\*\*, ZHANG Kai\*\*, XU Wei, WANG Gang, CHEN Jian-Jun, SUN Fei\*\*\*

(National Key Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** A preliminary 3D structural analysis of caveolae from porcine aorta endothelial (PAE) cell has been done by electron tomography. Caveolae of PAE cell were distributed irregularly around the cell surface and aggregated locally to form cluster. The striated structure with a width of 14~16 nm around the caveolae can be seen at the inner or external side of the membrane, and more concentrated striations were found at the narrow neck. A three-dimensional structural model based on tomographic reconstruction shows that caveolae interact with potent microtubule network, suggesting a possible caveolae traffic path in the cell during endocytosis.

**Key words** porcine aorta endothelial cell, caveolae, 3D structure, electron tomography

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00693

\*This work was supported by grant from The Important Direction Project for Knowledge Innovation by The Chinese Academy of Sciences (KSCX2-YW-R-126).

\*\*These authors contributed to this work equally.

\*\*\*Corresponding author.

Tel/Fax: 86-10-64888582, E-mail: feisun@ibp.ac.cn

Received: October 10, 2008 Accepted: December 26, 2008