

- [23] Naggover A K, et al., 1995, *Cytometry*, 256.
- [24] Strein T G, et al., 1992, *Anal. Chem.*, 64:1368-1374.
- [25] Wightman R M, et al., 1991, *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 88:10754-10758.
- [26] Chow H R, et al., 1992, *Nature*, 356:60-62.
- [27] Chien J B, et al., 1990, *J Neurochem*, 54:633-638.
- [28] Lau Y Y, et al., 1993, *Microchem J*, 47:307-316.
- [29] Quandt F N, 1994, *Methods in Neurosci.*, 19:3-20.
- [30] Steven Chu, 1991, *Science*, 253(8):861-866.
- [31] Steven M. Block, 1992, *Nature*, 360(12):493-495.
- [32] Michael J. Saxton, 1994, *Biophysical Journal*, 67(11):2110-2119.
- [33] Michael J. Saxton, 1997, *Biophysical Journal*, 72(4):1744-1753.
- [34] Michael J. Saxton, 1995, *Biophysical Journal*, 69(8):389-398.
- [35] Michael J. Saxton, 1993, *Biophysical Journal*, 64(6):1766-1780.

肝细胞培养方法研究进展

陈慧梅 廖红高 静

(南京大学医学院 南京 210093)

肝细胞分离、培养是一种研究肝脏和肝细胞的良好方法。虽然离体培养的肝细胞没有完整机体所存在的神经体液调节作用的影响,却可利用控制其外环境的理化因素实现稳定条件下药物和其他作用的观察及监测,从而用于多方面的研究:肝细胞和其他细胞之间的作用;肝细胞对外界刺激的反应、药物对细胞的作用、细胞内产物的分泌;细胞内胞质的活动和胞质与胞核之间的流动等。事实上肝细胞培养是简化、分析肝细胞功能的有效方法之一,已广泛应用于病毒学、免疫学、细胞毒理实验、临床医学及生物技术等各方面^[1]。

60年代初, Hillis 等人成功地培养了人胚胎肝细胞。30多年来,肝细胞培养技术已由外植块培养发展到单一细胞成分培养、由短期培养到现在的长期培养。本文就肝细胞分离及培养技术的发展、演变、特点和面临的问题作一综述。

一、肝细胞分离方法

1. 机械分离法

(1) 直接剪切法 1961年, Hillis 等最早进行了人胚肝细胞培养^[2]。将手术取得的肝组织切成小块,直接置于简单培养液中即可。此方法操作简单,成本低,所分离的细胞膜上的蛋白质成分性质不易改变。但外植块上长出的上皮细胞时间长,各部分间不均一,获得的肝细胞数量也有限。成纤维细胞也会迅速增殖,在其增殖与分化的过程中,与肝实质细胞形态相似,不易区分,从而难以观察肝细胞的数目和生长、分化程度。此外,未分化的细胞在培养过程中其分化及功能的获得与正常肝细胞有一定差

异,因而此法显得比较局限^[3]。Watanabe, Alexander 等也进行了类似的培养,在细胞呼吸作用研究及形态观察方面有一定进展。

(2) 剪切消化法 此法将肝脏直接分离置于冷的培养基中,剪碎,加入溶解的酶(多为胰酶或胶原酶)破坏肝细胞间的连接,再经震荡、沉淀,最后在上清液中得到游离的肝细胞悬液^[4]。此法操作简单,在成年肝与胎肝中均有采用,仅在酶的浓度和消化时间上有细微的差别。一些实验室采用该法,用于肝细胞功能和对外界的反应等少部分研究,但有许多不足之处。若采用成年鼠肝脏:由于成年的肝组织连接多而紧密,分离困难,刀剪的机械损伤,使得细小组织块周围的肝细胞多受损,不易成活;消化时,中心的细胞未分离,周边的常消化过分而被破坏。若用胚肝培养时,又有细胞未分化的缺点,成纤维细胞大量增生。此外,细胞多呈团块,混有大量血细胞,故不常采用。

2. 门静脉灌流消化法

分离肝细胞的关键是破坏细胞之间的紧密连接,以获得实质细胞。Howard 等首创用胶原酶和透明质酸酶共同灌流肝脏,提高了分离的肝细胞的存活率。以后,又发现胶原酶也可消化、分解大白鼠胎肝以及人胚肝^[5]。此法不断被改进及应用,将分离的肝细胞存活率提高到了80%。

1971年, Williams 等建立了用胶原酶、EDTA 联合灌流分散肝细胞的方法。许多学者也随后进行了研究, Segalen 首先将 EDTA 先灌流过肝脏,后用胶原酶分离肝连接,形成了经典的门静脉二步灌流法^[6];现在,各种肝脏灌流的基本方法多为:先从门

静脉用无钙、含氧前期缓冲液,冲出血细胞和钙离子,再换含蛋白水解酶的溶液至组织软化即可^[7]。近来文献表明,肝灌流的途径除了门静脉外,还有经胆道、腹主动脉等多种途径。此法分离、获得的肝细胞几乎为纯的肝实质细胞,不仅数量多,而且保留了肝细胞的各种功能。并且,细胞的形态易于观察,单一性较好,便于各种处理和观察。还有活性高,容易培养的优点,作为肝细胞培养的经典方法,被广泛用于肝毒性物质的筛选,肝脏的各项功能的测定与调节,以及护肝药的活性鉴定和机理分析,肝炎病毒的感染和转导等多方面。但由于操作环节多,技术要求高,所费的时间长,故易污染。加强严格的无菌操作,在培养基中加入抗生素,可减少污染的可能。

3. 肝细胞亚群的分离技术

肝细胞各类亚群在肝脏结构和功能的维持上有着不同的作用,在研究中需要将其分离分别培养以研究各自的功用。

(1) 离心分离法 根据不同肝细胞亚群之间的形态、大小和密度的不同而将各自分离,其包括简单的速度沉析到复杂的多种密度梯度离心法。其中Friedman等介绍的不连续密度梯度离心法提高了细胞的产量和纯度,是简单有效的实验方法^[8]。

(2) 选择性黏附分离法 利用细胞选择性的黏附到固体表面(如组织培养皿)上的特性,从而分离特殊的肝脏细胞。桔否氏细胞首先黏附到固体表面,可有效地将其从内皮细胞和其他肝脏细胞相中分离。此方法简单、方便、成本低^[9]。

(3) 双相水聚合物提取法 由两种水溶性聚合物(最常用的是葡聚糖和聚乙二醇)按一定比例混合,形成等渗压的双相液体系统,根据电荷密度、疏水性和免疫性能的不同而选择性进入不同的液相,从而将不同肝细胞分离。但此法得到的细胞活性较低^[10]。

(4) 选择性细胞毒分离法 通常利用蛋白水解酶如链霉菌蛋白酶、胰蛋白酶和内毒素等引起肝细胞选择性溶解,从而使肝实质细胞与非实质细胞分离^[11]。

(5) 利用仪器鉴别法 荧光激活细胞分类仪可以将荧光标记的细胞通过流式细胞技术检测分离出来,可以用于肝脏不同亚群的定性和纯度分析。FFE(free-flow electrophoresis)能通过细胞的细微差异如细胞表面微小的电荷差别,鉴别不同的细胞亚群,还可以区分完整的活细胞与死亡的细胞、细胞核和细胞碎片。但均因细胞产量相对低,时间长,并且

设备昂贵,实际应用较少。

二、肝细胞培养方法

1. 铺板胶质培养

最初,Hillis等人将获得的细胞或组织块,直接置于铺着鼠尾胶的转筒内培养。后经发展,在小牛血清或鼠尾胶、多聚赖氨酸包被,直径60mm培养皿以及24孔培养板上直接接种^[12]。90年代,又出现了夹层培养的方法,即在24小时后的细胞悬液的上方再铺加一层胶质物质,称之为三明治培养^[13]。还有人在筒状的胶柱体上培养。在基质研究上研制出一种基质膜凝胶提取物,称基质凝胶,它是小鼠的Engelbreth-Holm-Swarm肉瘤的尿素提取物,含有胶原、层粘连蛋白、肝素硫酸糖蛋白,可促进肝细胞基因的高水平表达。从而为肝细胞的均衡、贴壁良好的生长提供了条件。

2. 培养基培养

培养基中各成分的发展及其作用的研究与应用更是日新月异。60年代,Hillis仅在简单的血清、PBS和少许抗生素中培养。后研究表明:血清的浓度与成纤维细胞的生长呈正比,而增加葡萄糖,提高渗透压则抑制其生长,但对肝实质细胞损伤亦较大。目前,研究者形成共识:在低钙,低血清的培养基添加适当刺激因子(如:表皮生长因子EGF、肝细胞生长因子HGF^[14]、霍乱毒素、牛脑垂体提取液、转铁蛋白以及唾液酸糖蛋白、白蛋白^[15]等)可促进肝细胞较好的生长及功能的获得,其机理尚未完全明了。还有人证实胰岛素及胰高血糖素可提高离体肝细胞的存活率,适量的氢化可的松则显著缩减成纤维细胞的生长。近年已发现,二甲亚砜(DMSO)可提高肝细胞的特异性基因表达,戊巴比妥及甲双吡丙酮亦有类似作用。

培养基本身则多采用标准配方,批量生产的商品,如1640培养液,DMEM培养液。特别是781培养液(无菌收集48-72小时的人胚肺纤维细胞株单层的培养液)可有效地抑制成纤维细胞的生长^[12,16]。

三、肝细胞的长期培养

上述常用的原代培养仅能在1-2周内维持肝细胞的形态与功能,后便逐渐退化死亡,从而肝细胞培养的应用受到限制。随着肝细胞培养技术的迅速发展,在长期肝细胞培养方面作了许多研究。在许多方面有较好的应用:如乙型肝炎发病机理的研究

证实周围血淋巴细胞对自体培养肝细胞有毒性作用;评价某些物质与化疗药物对肝细胞的作用效果;还有人进行了黄曲霉素 B1、溴苯等肝毒素对肝细胞的毒性和致癌作用的研究^[17]。

1. 共培养体系

共培养体系即是两种细胞(可以来自同一组织,亦可以来自不同的组织)混合,共同培养,从而使其中一种细胞的形态与功能稳定表达,并维持较长的时间^[18]。在长时间的摸索中, Morin 与 Normand 将其应用于肝细胞的培养中,建立并发展了由肝窦状内皮增殖的细胞和肝细胞共同组成的培养系统。

共培养的作用机理尚不十分清楚,目前的研究主要涉及以下几个方面:

1) 细胞与细胞之间的接触、作用,引起胞质膜的直接接触并产生细胞外基质(ECM)其含有间质胶原、纤连蛋白、蛋白多糖及层粘连蛋白等成分,从而模拟了与体内相似的微环境,维持肝细胞的立体构形及促进肝细胞的功能。

2) 肝细胞呈立方多边形,肝非实质细胞的存在可维持与体内相似的三维立体状态下的细胞间相互作用。

此外,肝非实质细胞还可分泌刺激肝细胞增殖的细胞因子。在培养基成分与细胞外胶质成分改进的研究前已详细介绍,许多成果已被用于长期的肝细胞培养^[19]。

2. 悬浮培养

原有的原代肝细胞培养多为基底膜基质培养,在此基础上发展为悬浮培养,可高密度培养。其用于肝细胞的长期培养,取得了较好的效果。悬浮培养常用的方法有以下几种:

1) 微囊肝细胞 将肝细胞包裹在藻酸盐-多聚赖氨酸-藻酸盐(APA)的微囊膜内,该膜及营养物质及细胞合成产物通过,而不让大分子如抗体通过,从而起到支持和营养作用。

2) 微载体黏附培养 分离的肝细胞可黏附到经胶原被覆的聚糖载体称 Cytodex 3 或 Biosilon 微载体上进行培养,微载体可为肝细胞提供立体支撑作用。

3) 球形聚集培养 可根据肝细胞相互聚集的特性,在肝细胞分离后采用一定方法,如使用阳性电荷培养瓶(皿)、聚羟乙基异丁烯酸被覆或激素定量培养液、旋转培养等,促进肝细胞聚集,并防止其贴壁,从而形成球形体后进行培养^[20]。

四、几类肝细胞系

由于肝细胞组织分化程度高,体外几乎不发生增殖分裂,故其传代培养极为困难。目前研究仅建立了几类细胞系,其稳定性和机理的研究尚不理想,介绍如下:

1. 人胎儿肝细胞培养建立的细胞系

日本学者 Katsuts 等从正常引产胎儿获得肝细胞,采用改良 DMEM 培养基成功建立人胎儿细胞系 Hui-1,用此细胞系培养的上清液治疗大鼠急性肝衰竭,存活率可达 75%。

2. 长期培养转化获得的传代细胞系

此类细胞可保留一部分人肝细胞原有的特异性功能,同时其生物学特性发生显著变化。如 Chang 细胞保持了合成白蛋白、抗-ADH 等功能,但不能生成米氏常数乙醛脱氢酶;受乙醇作用,可生成大量胶原,故常用于肝纤维化的研究^[21]。

3. 混合培养后获得的细胞系

如 Roberts 等采用强化培养液,将大鼠表皮细胞与人正常肝细胞进行混合培养,建立了 HHO1、HHO2、HHO9、HH254 系传代细胞。Paolini 等将放射致死的非黏附人单核细胞系与动物肝细胞混合培养,建立了啮齿类传代肝细胞培养方法。但此协同效应的机理尚不清楚。

4. 肝肿瘤细胞来源的传代肝细胞

早在 1960 年,陈瑞铭教授就从手术标本中获得了可以不断繁殖、传代的细胞系,后又从多孔细胞杂交中筛选出可分泌人抗人肝癌单克隆抗体的小鼠杂交瘤,并应用与基础理论研究。最近美国 Hepatic 公司从人肝母细胞瘤分离一种 C3A 细胞系,能合成人的白蛋白、凝血因子、尿素及糖原等^[22]。

5. 病毒转染所致传代肝细胞

如近年 Miyazaki 等采用猿猴病毒 40 将 T-抗原基因及耐新霉素基因转入人胎肝细胞,形成 OUMS-22 耐新霉素传代细胞。

五、肝细胞培养的技术困难及前景

目前,肝细胞培养的研究已取得了很大进展,已陆续建立了许多肝细胞系,其可用于各种不同目的,包括肝细胞的脂质、蛋白质和糖的合成、代谢过程及酶功能,以及肝细胞膜及细胞连接、理化及生物因素对细胞的影响。例如,可以利用培养肝细胞制成缺氧、缺糖模型来模拟体内肝缺血状态,还可以利用培养肝细胞制成癌变模型来研究制癌因子及癌的防治。

长期培养主要应用于慢性肝炎(如与乙型肝炎病毒感染相关的肝病)、肝硬化及肝癌的发病机制探讨。利用体外肝细胞 HBV 培养系统,可研究 HBV 感染、复制、肝炎发病机理特别是慢性化、重型化机理、肝细胞癌变机理、抗病毒疗效及疫苗的提取等研究。

但上述培养肝细胞在技术及应用上仍存在以下问题:

1) 如何提高肝细胞的存活率,并使细胞的各种功能趋于完整与一致。

2) 进一步探讨肝细胞体外生长的适宜条件,使原代培养中的肝细胞不失去原有功能,并保持对各种激素的反应。

3) 继续寻求解决肝组织中成纤维细胞、Kupffer 细胞、贮脂细胞等优先增殖,从而取代分化程度高增殖功能低的肝细胞的满意方法。

4) 人类肝细胞经长期培养或传代培养,虽仍具有正常肝细胞的某些功能,但其特异功能常与肝细胞不同,在应用中易出现不良反应,如从病毒转染所制肝细胞株或从癌肿组织转化而来的肝细胞用到人体常引起感染及癌变的危险。

总之,经过近 40 年的努力,肝细胞分离和培养技术已经得到了较大的发展,为研究肝脏疾病机理以及治疗药物的筛选提供了材料和技术支持,特别是占世界病例 1/3 - 1/2 的三大肝脏疾病:肝炎、肝硬化和肝癌。但至今各种方法,哪怕是经典的两步灌流法都各有其不足,使研究的深入仍有一定的障碍,这也正是我们努力前进的方向。

摘要

离体肝细胞的培养可以简化分析肝细胞功能,为肝脏的生理、病理以及药理的研究提供材料。特别是近年来的长期肝细胞培养技术使离体肝细胞较

成功地再现了肝脏的功能、形态以及对刺激的反应能力,为进一步的研究提供了条件。离体肝细胞的培养涉及到肝细胞的分离、纯化和培养液的成分等多方面。本文就国内外肝细胞分离、培养的各种方法的创立、发展、成熟及其应用作一综述。

参 考 文 献

- [1] 邓晓宾等,2000,肝脏,5(3):148 - 152.
- [2] Hillis. W. D. et al. ,1962, *Exp. Cell Re*, 26:9 - 36.
- [3] 龚建平,1999,世界华人消化杂志,7(5):417 - 419.
- [4] Kainghn. M. E. et al. ,1973, *Tissue Cul-Me Appl*, 9: 54 - 59.
- [5] Howard. R. B. ,1967, *J. Cell Biol*, 35:675 - 684.
- [6] Seglen. P. O. 1972, *Exp. Cell. Res*, 74:450 - 455.
- [7] Liddle. C. et al. ,1998, *J. Gastrornter ol Hepatol*, 13:855 - 857.
- [8] Friendman. S. L. et al. ,1989, *J. Hepatol*, 9:59 - 62.
- [9] Ikejima. K. et al. ,1998, *Am. J. Physiol*, 274:G669 - 676.
- [10] Morin. O. et al. ,1984, *J. cell Physiol*, 119:327 - 334.
- [11] Alpini. G. et al. ,1989, *Gstroenterology*, 97:1248 - 1260.
- [12] 裴许芳等,1996,细胞生物学杂志,20(2):178 - 185.
- [13] Musal. A. I. et al. ,1993, *Hepatology* 18:198 - 201.
- [14] 王培勇等,1996,细胞生物学杂志,18(1):96 - 98.
- [15] Akalke. T. ,1993, *Gastroenterol JPN*, 28:45 - 56.
- [16] Christiane. et al. ,1983, *Exp. Cell Re*, 143:47 - 54.
- [17] 郭延军等,1998, *Chin. J. Clini. Hepatol*, 14(3):138 - 140.
- [18] 纪徐准等,1992,中西医结合肝病杂志,2(3):48 - 50.
- [19] Nyberg. S. L. et al. ,1992, *Crit Care Med*, 20:1157 - 1163.
- [20] Roberts. E. A. ,1994, *Hepatology*, 19:1390 - 1401.
- [21] Kelly. J. H. et al. ,1994, *ASAIO Trans*, 40:83 - 87.
- [22] Miyazaki. M. et al. ,1993, *Exp. Cell Res*, 206:27 - 32.

钙(Ca²⁺)在植物抗寒中的作用

简令成 王 红**

(中国科学院植物研究所 北京 100093)

近些年来, Ca²⁺ 的生理功能无论在人类和动物细胞中,或者在植物细胞中都有着广泛的研究,它的重要作用愈来愈吸引着研究者的兴趣。大量的研究结果揭示, Ca²⁺ 作为细胞的第二信使在植物的生长发育以及植物对环境的反应与适应中有着极其重

要的作用^[1-4]。关于植物的抗寒机理已有长期的、

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39870371, No. 60005003)。

** 通讯联系人。

诸多方面的研究^[5,6]。大量的研究结果为人们认识植物的抗寒性提供了丰富的知识;然而,其中观测到的许多变化仅仅是与抗寒性的发展平行相关,有关植物对低温信号的初始反应及其相继发生的生理生化过程则知之不多。 Ca^{2+} 功能研究中所揭示的一些事实为植物抗寒机理的进一步研究提供了很好的启示。于是近些年来,一些植物抗寒机理研究的专家们也相继开展了“ Ca^{2+} 在植物抗寒中作用”的探讨。本文是对这方面的一些研究结果的一个简要综述,包括我们自己在近十年内所获得的一些初步结果。

一、不同抗寒性植物细胞内 Ca^{2+} 稳态平衡的区别

Ca^{2+} 行使第二信使的功能是通过细胞内 Ca^{2+} 水平的升降来实现的^[1,2]。非激发状态下的植物细胞质和细胞核通常是处在低浓度 Ca^{2+} 的稳态平衡(Homeostasis)^[2-4]。已知许多刺激,包括生物的和非生物的,例如风、机械压力、低温、高温、光照、干旱脱水、盐胁迫、缺氧胁迫和病原菌等都能引起 Ca^{2+} 进入植物细胞^[2,3,4,7]。许多测试结果已经揭示,这种 Ca^{2+} 流入的速度及其在细胞内的动态,随着植物种类的不同而有很大区别。关于低温引起的 Ca^{2+} 流入,无论是室内的人工低温处理,或是野外的自然低温作用,不同抗寒性植物细胞内 Ca^{2+} 动态的差异已经被观测到^[2-4,7-11]。这种 Ca^{2+} 动态的差异是由于不同抗寒性植物对低温有着不同反应。植物对低温的反应分为两大类群:一类是冷敏感植物(Chilling-sensitive plants),或称不抗寒植物;另一类是对冷不敏感植物(Chilling-insensitive plants),或称抗寒植物。前者原产于热带和亚热带地区,它们的生命活动需要较高的温度,故又称喜温植物,一般在零上 10°C 或 12°C 以下的非冰冻低温即可引起生命活动的伤害。后者生长于温带地区,它们对低温都有一定的抵抗能力,但在不同种类植物之间有差异,而且,同一种植物的抗寒力是随着一年中季节性的温度变化而变化,在夏天的温暖生长季节里,这类植物的抗寒能力也不高,一般只能抵抗 -3°C - -5°C 的低温;随着秋末冬初低温的降临,它们的抗寒能力迅速提高;到寒冬,一般可达到 -20°C - -40°C 的抗冻力,一些木本植物,例如杨树,将它们此时的枝条投入 -196°C 的超低温液氮中,化冻后仍能存活;当春天来临时,这类植物的抗寒力又降低。简言之,与冷

敏感植物相反,一定的低温是这类植物抗寒力发展所必需的外界条件和诱发因子^[5,12];在实验室里,将这类植物通过低温处理即可获得较高的抗冻力,例如冬小麦和冬黑麦经 2°C 低温处理 20 天以后,即可分别获得 -15°C 和 -20°C 的抗冻性。由于不同抗寒性植物对低温反应有着固有的遗传上的巨大区别,所以,作为感应低温的 Ca^{2+} 信使在不同抗寒性植物细胞内的动态,自然就会有明显的差异。下面分别叙述冷敏感植物和抗寒植物在低温条件下细胞内 Ca^{2+} 动态的细节。

1. 冷胁迫引起冷敏感植物细胞的 Ca^{2+} 流入在延续的低温下不撤退,结果导致 Ca^{2+} 毒害。Minor-sky 最先阐述了低温引起冷敏感植物细胞的 Ca^{2+} 流入及其导致的伤害作用^[8]。近 10 年来,我们先后研究了多种冷敏感植物,如水稻、黄瓜、玉米等在冷胁迫(Chilling-stress)下,细胞内 Ca^{2+} 水平的变化和细胞结构受伤害的现象。这些研究结果表明,当这些冷敏感植物的幼苗或培养细胞遭到 $2-4^{\circ}\text{C}$ 低温胁迫时,在 30min 内即可观察到 Ca^{2+} 迅速地进入细胞质和细胞核,到 3h,细胞溶质和细胞核内的 Ca^{2+} 浓度达到很高的水平,在继续的低温胁迫中,至 3 天,5 天或 10 天,细胞内的 Ca^{2+} 水平继续呈现高水平,没有降低的趋势。在此过程中,质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性显著降低,甚至完全失活,说明冷敏感植物在低温胁迫中,细胞内的 Ca^{2+} 浓度不能恢复到低水平的稳定平衡(Homeostasis)。在冷胁迫一天以后,即可观察到高浓度 Ca^{2+} 造成的毒害现象;细胞质和细胞核的结构遭到破坏^[4,13-15]。

其他的许多报道也揭示高浓度 Ca^{2+} 对细胞的毒害作用,例如:(a)冷胁迫或应用 Ca^{2+} 离子载体 A23187 处理细胞,引起 Ca^{2+} 流入,可导致细胞质流动的停止^[16]。(b)通过低温处理或向细胞内注入 Ca^{2+} 和 CaM(钙调素)会引起微管的去组装^[17-19]。(c)低温引起的内质网和高尔基体空泡化,以及同心圆内质网的聚集,可能与其细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高相关^[20]。(d)低温引起的高浓度 Ca^{2+} 可与磷酸盐形成磷酸钙沉淀,从而对呼吸起抑制作用^[1]。(e)这种高浓度 Ca^{2+} 还会抑制卡尔文循环中几种关键酶的活性,并相继引起 NADP⁺ 水平的降低→活性氧增加→膜结构破坏^[21,22]。(f)高浓度 Ca^{2+} 还可以刺激多种水解酶的活性,例如核酸内切酶^[23] 和磷脂酶^[24],从而导致核内染色质断片化和膜的破坏。我们观察到的冷敏感植物玉米细胞在 3 天冷胁迫后,核内染色质和膜结构严重被破坏,即可能是低温引

起细胞内高浓度 Ca^{2+} 活化了核酸内切酶和磷脂酶相继变化的结果^[4,15]。

由于这些伤害性变化都是在低温迅速引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高后相继发生的结果,所以,这种低温引起的 Ca^{2+} 浓度升高被认为是“冷敏感植物对低温信号的初始反应”;也是“低温对冷敏感植物损伤作用的信号传递者”。

2. 低温引起抗寒植物的 Ca^{2+} 流入是短暂性的,诱发抗寒植物进入抗寒锻炼(Cold-acclimation)。Erlanson and Jensen 报道,将抗寒的冬小麦幼苗的根浸入放射性标记的 Ca^{2+} ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) 溶液中,置于 2°C 低温下,结果观察到大量的放射性 Ca^{2+} 短暂地进入根细胞内,以及幼苗抗寒性的提高^[25]。Monroy 等观测到,抗寒的苜蓿悬浮培养细胞和分离的原生质体在 4°C 低温处理下,在 15–20min 内, Ca^{2+} 即迅速进入细胞溶质,30min 以后降低,随后测试到抗冻基因的表达和抗寒力的提高。他们用 Ca^{2+} 的螯合剂 EGTA 和 BAPTA 或 Ca^{2+} 通道的阻断剂 La^{3+} 处理这些培养细胞和原生质体,结果表明,这些处理既抑制了细胞内 Ca^{2+} 水平的升高,也同时抑制了抗冻基因的表达和抗寒力的提高。这些作者还在 25°C 非抗寒锻炼条件下,用 Ca^{2+} 通道促活剂 Bay K8644 或 Ca^{2+} 离子载体 A23187 处理悬浮培养细胞或分离原生质体,引发 Ca^{2+} 的进入,其结果也能导致抗冻基因表达和抗寒力的提高。因此,这些作者们得出结论: Ca^{2+} 进入细胞是低温作用于植物细胞的信号传递者,是引发植物抗寒锻炼、抗寒基因表达和抗寒力提高所必需的^[10,11]。

Knight et al. 还发现,抗冷的拟南芥(*Arabidopsis*) 在 4°C 低温的冷处理中,用 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 和 Ca^{2+} 通道阻断剂 La^{3+} 处理,只能部分地抑制细胞溶质 Ca^{2+} 浓度的升高和抗寒基因 Kin1 的表达。他们的试验揭示,低温引起的细胞溶质 Ca^{2+} 水平的升高,除主要来源于细胞外 Ca^{2+} 库(细胞壁和细胞间隙)外,还有部分的是来源于细胞内的 Ca^{2+} 库:液泡^[26]。

近些年来,我们在冷敏感植物和抗冷植物 Ca^{2+} 动态的比较研究中观察到^[4,15],这些植物的幼苗或细胞在 4°C 低温处理中,经焦锑酸钾沉淀的细胞化学技术显示的 Ca^{2+} 沉淀,不仅在细胞质中迅速增加,而且在细胞核内迅速增加。前面已经谈到,冷敏感植物玉米细胞在持续的低温胁迫中,细胞内增加的 Ca^{2+} 浓度不降低,结果造成 Ca^{2+} 毒害。然而,抗冷植物冬小麦和小偃麦却不同,它们的幼苗或细胞

在 4°C 低温处理中,在 30min–3h,细胞质和细胞核中的 Ca^{2+} 浓度迅速升高,此后则降低,到 12h 和 24h,又恢复到冷处理前的低水平。在低温处理 5 天后,无论是冬小麦幼苗或小偃麦细胞的抗冻性,均已从 -3°C 提高到 -7°C ,显示它们在低温诱发细胞内 Ca^{2+} 短暂性的增加后,已进入抗寒锻炼。

为了阐述冷敏感植物玉米和抗冷植物冬小麦和小偃麦细胞在 4°C 低温处理过程中不同的 Ca^{2+} 动态的机理,我们通过电镜细胞化学观察了质膜钙泵 Ca^{2+} -ATPase 活性的变化,其结果揭示,冷敏感的玉米细胞在 4°C 低温处理 12h 后,其质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性显著降低,甚至完全失活,以致其细胞内增加的 Ca^{2+} 离子不能被泵回细胞外,不能恢复细胞内低水平的 Ca^{2+} 平衡,结果造成 Ca^{2+} 毒害。然而,抗冷性的冬小麦和小偃麦细胞在低温处理过程中,其质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性不仅不降低,甚至有所提高,特别是核膜上呈现很高的 Ca^{2+} -ATPase 活性,显示 Ca^{2+} -ATPase 没有受到低温的伤害。这样,在低温引起 Ca^{2+} 进入细胞后,细胞内的高浓度 Ca^{2+} 又反馈性的激活 Ca^{2+} -ATPase,于是增加的 Ca^{2+} 离子又被泵回到细胞外,恢复细胞内低水平的 Ca^{2+} 稳定平衡^[4,15]。这些结果说明,对抗冷植物说来, Ca^{2+} 的流入不会导致 Ca^{2+} 毒害;细胞内 Ca^{2+} 水平短暂性的提高起到了传递低温信号的作用,相继引发一系列的生理生化过程的变化,使植物进入抗寒锻炼。

二、钙与抗寒特性的形成

已有不少实验证据揭示和证实,有些抗寒特性的形成与 Ca^{2+} 有密切的关系,例如:细胞膜系统的稳定性是植物抗寒力发展最重要特性^[27]。已知 Ca^{2+} 对膜的稳定性起重要作用, Ca^{2+} 作为磷脂的磷酸根和蛋白质羧基间连接的桥梁使膜结构变得更为牢固^[28]。用含有 Ca^{2+} 成分的抗寒剂 CR-4 对水稻和黄瓜进行浸种处理,在萌发后的幼苗细胞内,特别是质膜内侧观察到较多的 Ca^{2+} 分布;同时观测到低温逆境中(1°C)质膜的离子渗漏比对照低,质膜的功能性蛋白 5'-核苷酸酶和 Mg^{2+} -ATPase 活性,以及膜的流动性都比对照的高^[27,29]。还有实验证据指出,用 Ca^{2+} 溶液(30mmol/L CaCl_2)处理水稻种子后,幼苗叶片中结合态钙含量增加;同时抗氧化剂的谷胱甘肽和抗坏血酸的含量增加,以及清除活性氧的超氧歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶的活性提高;并且,热稳定蛋白质的含量也增加。这些都对膜系统在低温逆境中的稳定性起着保护作用^[30]。低

温引起细胞内 Ca^{2+} 增加,导致脯氨酸积累也有许多报道^[31,32]。已知脯氨酸不仅是渗透调节物质,也是保护膜的重要因素^[33]。

细胞壁的坚固性是植物抗冻性的另一个重要特性,它是防止胞外冰冻脱水引起细胞塌陷损伤的一个重要因素^[34]。因此,植物在人工低温锻炼,或越冬抗寒锻炼过程中,细胞壁加厚并木质化^[34],从而提高细胞壁的坚固性。一些研究结果揭示, Ca^{2+} 是细胞壁加厚和木质化的调节者。Eklund 等(1990, 1991)报道, Ca^{2+} 离子浓度影响细胞壁成分的合成,低的细胞质 Ca^{2+} 浓度降低细胞壁内木质素和非纤维素多糖的沉积;高的细胞质 Ca^{2+} 浓度则增加非纤维素多糖和木质素的合成及其在细胞壁中的沉积^[35,36]。 Ca^{2+} 能刺激植物细胞分泌过氧化物酶到细胞壁中,并提高其活性^[37,38]。通过这种过氧化物酶的催化作用,使参入细胞壁中的一种糖蛋白——伸展蛋白(extensins)形成异二酪氨酸双酚酯桥,导致伸展蛋白分子间以及伸展蛋白与多糖分子间的连接,从而加强细胞壁的牢固性^[39]。Jian 等观察到,杨树和桑树在秋季和冬初的短日照和低温诱导的休眠和抗寒力发展过程中,细胞内 Ca^{2+} 浓度显著增加,并且持续达3个月之久(从8月中旬至12月中旬)^[3,40]。在这期间,与分泌活动有关的“质膜外—钙 ATP 酶”(PM ecto- Ca^{2+} -ATPase)被活化^[41]。与此同时,细胞壁不断加厚,并提高木质化程度。该作者们推论,这是由于短日照和低温引起细胞内 Ca^{2+} 水平的提高,激发了细胞壁多糖和木质素的合成与分泌,结果导致细胞壁的加厚与木质化,提高细胞壁的坚固性,以抵抗寒冬时期的冰冻伤害^[3,40,41]。

已有证据指出,细胞间通道(胞间连丝)的开放与关闭对植物抗寒锻炼起重要作用^[42]。 Ca^{2+} 是直接参与胞间连丝颈部口径大小的调节者^[43]。通过显微技术向细胞内注入 Ca^{2+} 结合的荧光染料(Ca^{2+} -BAPTA),结果显示,在细胞含有高浓度 Ca^{2+} 的条件下,抑制了荧光染料经过胞间连丝在细胞间的扩散;而在对照细胞中(只注入荧光染料,没有结合 Ca^{2+}),则荧光染料可以通过胞间连丝从一个细胞扩散到另一个细胞^[44,45]。冬季里的巨型轮藻由于细胞内有着较高的 Ca^{2+} 水平,细胞间交通受阻,生长停止,处于休眠;到春季,细胞内 Ca^{2+} 浓度降低,胞间通道畅通,生长恢复。用含有 Ca^{2+} 载体 A23187 的溶液培育,或通过显微技术直接注入 Ca^{2+} 溶液,提高春天轮藻细胞的 Ca^{2+} 浓度,其细胞间交通又反回到冬季时期的状态^[46]。Jian 等通过

细胞超微结构观察,进一步证实 Ca^{2+} 与胞间连丝结构变化的关系^[47]。杨树在短日照诱导的休眠和抗寒力提高过程中,当细胞内 Ca^{2+} 含量明显升高时,连接胞间连丝的内质网(ER)发生收缩,中断了与胞间连丝的联系,胞间连丝孔口周围的质膜相互融合,封闭了孔道口。或者,由于高浓度 Ca^{2+} 引起细胞壁加厚,使胞间连丝孔道受挤压而缩小,甚至完全封闭^[3]。新近,Holdaway-clarke 等(2000)报道,通过冷处理、 Ca^{2+} 载体溶液培育及显微注射,提高细胞质 Ca^{2+} 浓度,结果引起胞间连丝孔道迅速关闭^[48]。细胞质的高 Ca^{2+} 水平也刺激胼胝质的合成及其在胞间连丝孔口的沉积,从而封闭胞间连丝孔^[49,50]。显然地,胞间连丝的中断,破坏了植物共质体的整体性,阻碍了物质运输和信息传递,导致生长停止,进入休眠,提高对寒冷的适应能力。

三、钙与基因表达

在动物细胞方面, Ca^{2+} 在调节基因表达中的作用已有不少明确的例证。它的调节作用主要表现在转录和转译水平上,例如 Ca^{2+} 诱导催乳素(prolactin)和伸长因子2(elongation factor-2)基因的表达,即分别表现在转录水平上^[51]和转译水平上^[52]的调节。在植物方面, Ca^{2+} 诱导和调节基因表达的例证也在日益增加。Lam 等(1989)报道,通过细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高,可诱导叶绿素 a 和 b 束缚蛋白转录体 mRNA 的增加^[53]。如前所述,低温引起的 Ca^{2+} 流入诱发了苜蓿、拟南芥和冬小麦冷适应基因的表达和抗冻性的提高^[10,11,25,54]。拟南芥某些受低温调节的基因,如 CRT/DRE 控制的 Cor6.6 和 Kin1 的完全表达,也必须依赖于细胞内 Ca^{2+} 水平的提高^[26,55]。 Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA 或 Ca^{2+} 通道阻断剂 La^{3+} 抑制了低温诱导的 Ca^{2+} 输入,也同时减弱了冷适应基因 Cas15 和 Cas18 基因的表达,并降低苜蓿的抗冻能力。而应用 Ca^{2+} 离子载体 A23187 和 Ca^{2+} 通道促活剂 Bay K8644 促进细胞的 Ca^{2+} 流入,则在 25℃ 的非低温条件下,也能诱导抗冻基因 Cas15 和 Cas18 基因的表达^[11]。低温刺激不仅导致 Ca^{2+} 进入细胞质,而且迅速和大量地进入细胞核^[3,4,15],也显示 Ca^{2+} 的流入与核基因表达的密切关系。

至于 Ca^{2+} 进入细胞后,信号如何传递,目前还知之不多,但已有一些启示性证据。业已知道, Ca^{2+} 可以直接或通过钙调蛋白(CaM)激活多种蛋白激酶^[56]。Monroy 等揭示, Ca^{2+} 对低温信号的传递过

程可能与蛋白磷酸化有关。他们的试验指出,在低温诱导苜蓿 Cas15 基因的表达中,一种 15kD 蛋白的磷酸化水平比低温处理前提高 10 多倍;另一方面,当行使蛋白磷酸化的蛋白激酶受抑制剂 Staurosporine 抑制时,抗冻基因的表达水平也强烈地受到抑制^[10,11,57]。他们试验还揭示,在 25℃ 非低温条件下,应用 Ca^{2+} 离子载体和 Ca^{2+} 通道促活剂促进细胞的 Ca^{2+} 流入,引起蛋白磷酸酶(PP2A)活性的降低,或者,应用抑制剂 Okadaic acid 抑制 PP2A 的活性,也能诱发抗冻基因 Cas15 的表达^[11,57]。还有一些研究揭示低温活化某些蛋白激酶的证据。Jonak 等(1996)报道,苜蓿的一种分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein Kinase)在低温作用 10 分钟即被活化,其转录体水平迅速增加^[58]。在低温的作用下,苜蓿和拟南芥中的钙依赖蛋白激酶(CD-PKs)的转录体水平也升高^[11,55]。在拟南芥中,一种编码 S6 核糖体蛋白激酶的基因和一种编码 MAP 激酶的基因在低温刺激中同时被诱导^[59]。

综合以上这些资料,似可作出这样的推论:低温引起 Ca^{2+} 输入,导致细胞内 Ca^{2+} 水平短暂时升高,从而抑制了蛋白磷酸酶 2A 的活性,并同时激活了一些有关的蛋白激酶,使某些蛋白质磷酸化,进而诱导冷适应基因(或称抗冻基因)的表达,进入抗寒锻炼,发展各种抗寒特性。

摘 要

Ca^{2+} 作为植物细胞的第二信使对不同抗寒性植物起着不同的作用。冷敏感植物在冷胁迫下引起的 Ca^{2+} 流入不撤退,结果细胞内高浓度 Ca^{2+} 导致冷敏感植物的 Ca^{2+} 毒害。抗寒植物在冷胁迫中引起的细胞内 Ca^{2+} 水平的升高是短暂性的,它们在完成信使作用后即撤退。这种短暂性的高浓度 Ca^{2+} 可能通过激活某些有关的蛋白激酶,使某些相应的蛋白质磷酸化,从而诱发抗冻基因表达,使植物进入抗寒锻炼,发展各种抗寒特性。 Ca^{2+} 对抗寒特性的形成,除通过诱发抗冻基因表达发展抗寒特性外, Ca^{2+} 也可能对某些抗寒特性的形成直接起作用,如 Ca^{2+} 对膜结构的稳定作用,刺激木质素和非纤维素多糖的合成及其在细胞壁内的沉积,以及直接调节胞间连丝孔道的开放与关闭等。

参 考 文 献

- [1] Hepler, P. K., Wayne, R. O., 1985, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**:397-439.
- [2] Bush, D. S., 1995, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **46**:95-122.
- [3] Jian, L. C. et al., 1997, *J. Exp. Bot.* **48**:1195-1207.
- [4] Jian, L. C. et al., 1999, *Plant Cell Physiol.* **40**:1061-1071.
- [5] Levitt J. 1980, *Responses of Plants to Environmental Stresses*. Vol. 1: Chilling. Freezing High Temperature Stress. Academic Press, New York.
- [6] 简令成, 1990, *细胞生物学进展*, **2**:296-320.
- [7] Knight, H., 2000, *Intern. Rev. Cytol.* **195**:269-324.
- [8] Minorsky, P. V., 1985, *Plant Cell environ.* **8**:75-94.
- [9] Knight, M. R. et al., 1991, *Nature*, **352**:524-526.
- [10] Monroy, A. F. et al., 1993, *Plant Physiol.* **102**:1227-1235.
- [11] Monroy, A. F., and Dhindsa, R. S., 1995, *Plant. Cell*, **7**:321-332.
- [12] 简令成, 1986, *植物的寒害与抗寒性*, 黑龙江科学技术出版社, 哈尔滨.
- [13] 王 红等, 1994, *植物学报*, **36**:587-591.
- [14] 张 红等, 1994, *实验生物学报*, **27**:419-422.
- [15] 简令成等, 2000, *植物学报*, **42**:358-366.
- [16] Woods, C. M. et al., 1984, *Protoplasma*, **121**:17-24.
- [17] Mita, T., Shibaoka, H., 1984, *Protoplasma*, **119**:100-109.
- [18] Cyr, R. J., 1991, *Cell Sci.* **100**:311-317.
- [19] Bokros, C. L. et al., 1996, *Plant Cell Environ.* **19**:539-548.
- [20] Belitser, N. V., Zaalishvili, G. V. 1983, *Protoplasma*, **115**:222-227.
- [21] Charles, S. A., Halliwell, B., 1980, *Biochem. J.* **188**:775-779.
- [22] Wolosiuk, S. M. et al., 1982, *FEBS Letters*, **140**:31-35.
- [23] Mittler, R., Lam, E., 1995, *Plant Cell*. **7**:1951-1962.
- [24] Leshem, Y. Y. et al., 1984, *Plant Physiol.* **75**:329-335.
- [25] Erlandson, A. G. I., Jensen, P., 1989, *Physiol. Plant.* **75**:114-120.
- [26] Knight, H. et al., 1996, *Plant Cell*, **8**:489-503.
- [27] 简令成等, 1994, *植物学通报*, **11**(特刊):1-22.
- [28] Steponkus, P. L., 1984, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**:543-584.
- [29] 张 红等, 1994, *植物学通报*, **11**(特刊):154-162.
- [30] 李美如等, 1996, *植物生理学报*, **22**:379-384.
- [31] Bhattacharjee, A. K., 1995, *Geobios.* **22**:203-207.
- [32] De, B. et al., 1996, *Indian J. Plant Physiol.* **1**:32-35.
- [33] Verbruggen, N., 1993, *Plant Physiol.* **103**:771-781.
- [34] Rajashekar, C. B., Lafta, A., 1996, *Plant Physiol.* **111**:605-612.
- [35] Eklund, L., Eliasson, L., 1990, *J. exp. Bot.* **41**:863-

- 867.
- [36] Eklund, L., 1991, *J. exp. Bot.* **42**:785-789.
- [37] Penner, R., Neher, E., 1988, *J. exp. Bot.* **139**: 329-345.
- [38] 尤程等, 1997, 植物生理学报, **23**:199-203.
- [39] Wilson, L. G., Fry, J. C., 1986, *Plant Cell Environ.* **9**: 239-260.
- [40] Jian, L. C. et al., 2000, *Tree Physiol.* **20**:623-628.
- [41] Jian, L. C. et al., 2000, *Cell Research*, **10**:103-114.
- [42] 简令成、孙龙华, 1992, 植物学集刊, **6**:157-162.
- [43] Lucas, W. J. et al., 1993, *New Phytologist.* **125**: 435-476.
- [44] Tucker, E. B., 1988, *Planta*, **174**:358-363.
- [45] Tucker, E. B., 1990, *Planta*, **182**:34-38.
- [46] Shepherd, V. A., Goodwin, P. B., 1992, *Plant Cell Environ.* **15**:137-150.
- [47] 简令成等, 2000, 植物学报, **42**:803-810.
- [48] Holdaway-Clarke, T. L. et al., 2000, *Planta*, **210**: 329-335.
- [49] Cleland, R. E. et al., 1994, *Protoplasma*, **178**:81-85.
- [50] Rinne, P. L. H., Van der Schoot, C., 1998, *Development*, **125**:1477-1485.
- [51] Bandyopandhyay, S. K., Bancroft, C., 1989, *J. Biol. Chem.* **264**:14216-14224.
- [52] Nygard, O. N. A., 1991, *J. Biol. Chem.* **266**: 16425-16437.
- [53] Lam, E. et al., 1989, *Mol. Cell Biol.* **9**:4819-4831.
- [54] Kurkela, S., Borg-Franck, M. 1992, *Plant Mol. Biol.* **19**: 689-92.
- [55] Tahtiharju, S., et al., 1997, *Planta*, **203**:442-447.
- [56] Roberts, D. M., Harmon, A. C., 1992, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**:375-414.
- [57] Monroy, A. F. et al., 1998, *Plant J.* **13**:653-660.
- [58] Jonak, C. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 11274-11279.
- [59] Mizoguchi, T. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:765-769.

异硫代氰酸盐的抗癌机理及其相关研究

汪 俏 梅
(浙江大学园艺系 杭州 310029)

Steffen Abel
(University of California, Davis, 95616)

癌症可以通过很多天然和合成的化合物来预防,这些化合物一般称为化学预防剂^[1]。很多化学预防剂来源于植物,通常为人类膳食中的非营养成分,因而被称为植物化学物质。通过植物化学物质进行癌症的化学预防是最有潜力的癌症预防手段^[2]。蔬菜和水果包含一大类具有抗癌作用的植物化学物质,如丙烯基硫化物,酚酸,多酚,异黄酮和异硫代氰酸盐(isothiocyanates,简称ITCs)等,其中异硫代氰酸盐是一类重要的植物化学物质,近年来的研究发现异硫代氰酸盐以阻遏和抑制因子发挥抗癌作用,这些研究不仅深化了人们对抗癌作用机理和癌症的化学预防的认识,在癌症的预防、治疗以及功能食品的设计上显示了广阔的应用前景,同时推动了旨在提高蔬菜作物中的抗癌成分及其生物利用率的一系列相关研究,并为作物育种提出了新的目标和策略。

一、异硫代氰酸盐与化学致癌作用的抑制

1. 植物中的芥子油苷-葡萄糖硫苷酶系统与异

硫代氰酸盐的产生

天然的异硫代氰酸盐由芥子油苷(glucosinolates)在葡萄糖硫苷酶(myrosinase)的作用下降解产生。在完整植物中,芥子油苷定位于细胞的液泡中,相对较为稳定,而葡萄糖硫苷酶则定位于特定的蛋白体中,在正常情况下,两者是分离的,但当组织和细胞受到损伤时,葡萄糖硫苷酶就会从它贮藏的组织中被释放出来,并很快把芥子油苷水解,脱去葡萄糖和硫酸,并在不同条件下通过非酶化重组反应,形成几种不同的降解产物,一般在pH2-5,且亚铁离子存在的情况下形成乙腈;在pH>8的情况下形成硫代氰酸盐;而在pH5-8的范围内,即中性环境下则易形成异硫代氰酸盐。其中异硫代氰酸盐是芥子油苷降解的最主要产物^[3,4],异硫代氰酸盐的功能基团为-N=C=S,包含一个具高度亲电性的中央碳原子,这一碳原子在温和的条件下能很快与以O-,S-或N-为中央的亲核基团反应^[5]。异硫代氰酸盐侧链上的R基团来源于不同种类的氨基酸(如甲硫氨酸,苯丙氨酸和色氨酸等),据此可将其分为脂肪类,芳香类和吡啶类^[6]。

2. 异硫代氰酸盐与化学致癌作用的抑制