

确,从分子水平认识 AFP 与膜的相互作用,将是以后研究的热点。

低温和超低温保存技术在医学以及近年来蓬勃发展的动植物生物工程具有重要的实用价值,简化冻存程序和改善冻存效果已日显重要。本文所评述的内容,丰富了低温生物学的理论和应用研究。

文中所使用的抗冻蛋白,有直接提取的,有固相合成的,也有重组 DNA 技术生产的。其在人工低温和超低温保存中使用效果的复杂性,也向我们预示了靠转移 AFP 基因来提高动植物抗冻性的研究也将是复杂的,会有颇多曲折的。当然,引起后者复杂性的因素远远不止这一方面。

参 考 文 献

- [1] Duman JG, Olsen TM. 1993, *Cryobiology*, 30: 322—328.
- [2] 费云标等, 1994, 植物学报, 36 (8): 649—650.
- [3] 王君晖等, 1994, 园艺学报, 21 (3): 277—282.
- [4] Rubinsky B, Arav A, Mattioli M et al., 1990, *Biochim. Biophys. Acta.*, 173: 1369—1374.
- [5] Rubinsky B, Arav A, Fletcher GL, 1991 *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 180: 566—571.
- [6] Taylor L, Stringer K, Black JB et al., 1993, *Cryobiology*, 30: 557—571.
- [7] Lee CY, Rubinsky B, Fletcher GL., 1992, *Cryo-letter*, 13: 59—66.
- [8] Rubinsky B, DeVries AL., PCT/US 91/00351.
- [9] Rubinsky B, Mattioli M, Arav A et al 1992, *Am. J. Physiol.*, 262: R 542—545.
- [10] Payne SR, Oliver FE, Upreti GC., 1994, *Cryobiology*, 31: 180—184.
- [11] Carpenter JE, Hansen TN., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 8953—8957.
- [12] Arav A, Ramsbottom G, Baguisi A et al., 1993, *Cryobiology*, 30: 621—622.
- [13] Rubinsky B, Arav A, DeVries AL., 1992, *Cryobiology*, 29: 69—79.
- [14] Rubinsky B, Arav A, DeVries AL., 1991, *Cryo-letter*, 12: 93—106.
- [15] Pegg DE., 1992, *Cryobiology*, 29: 774.
- [16] Bronshteyn VL, Steponkus PL., 1992, *Cryobiology*, 29: 782.
- [17] Hansen TN, Carpenter JF., 1992, *Cryobiology*, 29: 730.
- [18] Sutton RL, Pegg DE., 1992, *Cryobiology*, 29: 781.
- [19] Sandford D, Young OA, Wilson P., 1992, *Cryobiology*, 29: 730.
- [20] Wang T, Zhu Q, Yang X., 1994, *Cryobiology*, 31: 185—192.
- [21] Hinch DR, DeVries AL, Schmitt JM. 1993, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1146: 258—264.
- [22] Hansen TN, Smith RM., 1993, *Cryobiology*, 30: 646.

电场对生物细胞的作用及其实际应用

马志章 蒋承浚

(杭州大学生命科学学院 310012)

电场对细胞作用的研究是细胞生物物理学传统领域之一。近年来由于引入了新的技术和方法,使电场在生物与医学的实际应用方面开辟了广阔的途径。在所应用的电场中,无论是高电压强脉冲或是弱的交变电场电脉冲都能对生物细胞的活动产生作用,并伴随许多后续的影响(见表1)

表1 电场对细胞的一般作用^[1]

	强的单脉冲 E>0.5 kv/cm		弱的交变电场 E<10mv/cm
	细胞壁	细胞膜	细胞代谢
电场作用对象 电场发生的作用 后续作用	电损伤	电穿孔	电刺激
	物质释放		生物高分子合成
	细胞融合和掺合		酶活化
	转染 转化 插入		膜通透性 细胞增殖

Dean Astumian 等^[2]曾从近期文献中总结了有关符号名词,并解释了它们的含义:

电穿孔(electroporation)——在细胞脂双层中形成孔

电损伤(electrolesion)——在细胞壁中形成损伤

电掺合(electroincorporation)——把物质从溶液中掺进细胞

电转移构象(electrotransconformation)——膜蛋白的构象变化

电释放(electrorelease)——电穿孔或电损伤后细胞成分的释放

电插入(electroinsertion)——将蛋白分子插入细胞膜

电转染(electrotransfection)——遗传物质(DNA、RNA、噬菌体等)掺入细胞

电转化(electrotransformation)——电转染后新的基因插入细胞基因组

电融合(electrofusion)——接触细胞间的融合

电刺激(electrostimulation)——由电脉冲产生细胞通道增强和遗传与代谢过程的改变

本文就电损伤、电穿孔、电融合和电刺激等电场作用对细胞产生的影响,在基础研究和实际应用方面作一简要的评述。

1. 细胞的电损伤和它们的修复速度

用高能电脉冲处理微生物和植物细胞,使细胞壁和原生质膜破坏和开放,导致了细胞死亡和成分的释放或修复^[3,4]。细胞自修复能力是很强的,修复的时间过程可以从染料或者一种抗菌物质在电脉冲后不同时间内通过损伤部分而透入的情况来测量。这一过程比电穿孔以后膜孔的关闭需要更多的时间(约几分钟)。

曾有报道^[5],酿酒酵母对单个电脉冲的作用静止期比对数期更稳定,但在抗菌素 pHF(perhydrohexafung)存在下,显著地增加了毁灭的速度,如果在脉冲前加入 pHF,当电脉冲作用时,PHF 能通过缺损的细胞壁透入,菌落成活数降为 40%;但当脉冲作用 3 分钟后再加入 pHF,此时细胞壁已被修复,PHF 不能透入,因而也不能毁灭细胞,菌落成活数增至 100%。所以利用一种物质(譬如不能透入完整

细胞壁或膜的抗菌素)在电脉冲前后加入,观察其透入细胞或破坏细胞与时间的相关性来研究细胞壁的修复和孔的关闭过程是十分有用的。

2. 电穿孔、电转染与电转化:

外加短时强的电脉冲能增加细胞膜的通透性,这是由于电脉冲造成了细胞膜上形成微孔所致,这一现象称为电穿孔,这是细胞生物学研究中常用的技术。尽管电穿孔已有广泛的应用,但膜通透性的分子机理至今尚不清楚,一般的观点是通透性位于细胞表面的一定区域,它是由于膜结构受瞬态骚扰而引起的。

电穿孔的一个重要应用是增强基因物质的摄取使之进入原生质,甚至完整的植物和微生物细胞均可应用。这种电转染是在原核生物蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的原生质体上首次完成的^[6],实验在含有 40% PEG 的培养液中用三次电脉冲(5 μ s-25 kv/cm)进行。带有卡那霉素抗性的供体质粒 DNA PUB 110 是一种苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的突变体,在含有 100 μ g/ml 卡那霉素的琼脂上筛选含有质粒 DNA PUB 110 的转化细胞,发现当场强增加到 14 kv/cm 以上时,转化频率 $TF = 1.1 \times 10^{-3}$,对照 $TF = 1.3 \times 10^{-4}$,转化细胞增加了 10 倍。另外, Müller 等^[7]也曾报道,采用 $E = 9$ kv/cm (300—500 μ s) 的单个脉冲,可以得到带有质粒 pSM 752 的完整的乳酸链球菌(*Streptococcus lactis* MG 1363)转化细胞。

现代癌症治疗的方法之一为化学疗法,其副作用往往很大,并且肿瘤细胞常常不能很快地吸收药物,因此很多研究工作者开展了如何直接增加肿瘤细胞对药物的摄入而减少化疗药物的剂量的研究^[8],其中电通透与化疗联用法(electrochemotherapy 简称 ECT)是一种行之有效的办法。R. Heller 等^[9]将长有黑色素瘤的 C₅₇BL/6 小鼠,给以化疗药物——争光霉素(0.25 u)和电脉冲(1.5 kv/cm 99 μ s)后肿瘤明显地缩小,57%的小鼠肿瘤已测量不到,这种联合使用的方法比只给化疗药物或只给电脉

冲的方法为好,进一步研究联合使用的规律性(最适电场强度和最小有效剂量等)和机制是很有必要的,这会有助于今后扩展到临床上的使用。

用物理方法或化学试剂修饰法往往可以对细胞电穿孔造成影响。G. S. Nanda 等^[10]观察到,红细胞用 EDTA(乙二胺四乙基钠)处理后对电脉冲变得不敏感了,表明 EDTA 对红细胞具有保护作用。他们还报道, N-乙基马来酰亚胺和 D-氯汞苯甲酸处理人红细胞后,显著地改变了红细胞的电响应,表明了红细胞膜蛋白受氧化修饰,使膜组分变化,因而改变了细胞对外电场要求的量级。

电穿孔技术也能用于电插入目的,即将外源蛋白分子插入细胞膜。例如将 CD₄ 受体插入红细胞膜上,不仅可以延长受体的循环生活期,而且提供了一种治疗爱滋病的新思路^[11]。此外,电穿孔技术也可将蛋白质分子导入细胞,例如,将肿瘤天门冬酰胺合成酶的单克隆抗体导入鼠淋巴细胞和人成纤维细胞 HT-5 中,细胞成活率达 80—90%,而且其中活细胞结合了抗体。

3. 电融合

电融合技术在 70 年代末已开始建立, Senda 首次提供了植物原生质体电融合的形态证据^[12]。电融合是在电场作用下使细胞膜上产生小孔,从而使两个或几个互相靠近的细胞融合在一起,此法具有简单、快速、高效、残留毒性小等特点,它成为细胞生物学、体细胞遗传学等研究中一种新的研究手段。

电融合能使细胞杂交,人造某些新的细胞。应用细胞融合技术建立分泌特异单克隆抗体的杂交瘤细胞株已经成为一种稳定、高效的手段。我国汪和陆等已建立了 6 种近 40 株鼠淋巴细胞杂交瘤细胞株^[13],其它许多实验室也在开展此项工作。对不同大小的细胞有不同的适宜的电融合参数,例如融合较大的癌细胞比融合较小的脾脏细胞所需要的脉冲电场强度为低, Berg 等^[14]试用三次高电脉冲预处理脾脏

细胞,然后在低脉冲强度下与骨髓瘤细胞融合,结果获得了较高的杂交细胞产量。从小鼠骨髓瘤细胞和脾脏细胞产生杂交细胞的数量发现,电融合方法(4.5kv/cm 5 μs)约为经典的用 PEG 方法融合的 10 倍。

细胞电融合技术也广泛应用于植物和微生物的原生质体融合,如酵母原生质体的电融合,已经发现酿酒酵母不同菌种所需电场强度差别很大(2.5 kv/cm、3.75 kv/cm、10 kv/cm 不等),用合适的电场强度进行电融合可以得到比单用 PEG 多几百倍的融合稳定菌落。此外,枯草杆菌、青霉菌、木霉菌等菌的原生质体电融合均已报道。植物原生质体的电融合可在相对低的电场脉冲下引发,这取决于原生质体的直径和它们之间的接触层。

温度、电导等参数能影响融合产率,不同的膜活性物质吸附或包裹在脂双层中也能影响融合产率。如色氨酸、血清球蛋白、环糊精、吐温-80、PEG 等存在下能增加融合产率,所以脉冲能量可以减小;而蓝色葡聚糖、EDTA、道诺霉素和氯化钙等能减少融合产率。F. Hoffmann 等^[15]对分离的植物原生质体成功地应用了化学融合和电融合联合使用的方法进行原生质体融合,用化学佐剂预处理原生质体,无需洗去这些佐剂(融合增进剂),直接加到培养介质中,然后给以电脉冲。这种联用方法降低了所用的电场强度,减少电融合的破坏性,同时又维持高的融合率。有效的化学佐剂有溶血卵磷脂氯化物(LLCC)、四级淀粉(QS)、二聚乙醇硬脂酸酰胺(DSA),二聚乙醇硬脂酰胺氯化物(DSC)和聚乙烯醇等膜表面活性剂,他们认为,这些化学佐剂可能是中和了原生质膜上的电荷或通过氢键作用引起凝聚,以致促进了融合。

K. Augsten 等^[16]曾介绍巨噬细胞电融合工作。在低脉冲(5 kv/cm 17 μs)条件下,腹腔巨噬细胞的表面出现深的凹口,细胞之间连接处有一厚的绳索样物出现,当使用 7.5 kv/cm 的电脉冲时,细胞表面看起来像鹅卵石;在

表 2 电刺激在生物过程中的应用^[17]

(1) 合成	
在大鼠胚胎肾细胞中的 DNA 合成	(用 ³ H-胸苷掺入测定)
在昆虫 X 染色体中的 mRNA 合成(转录)	(用 ³ H-尿苷掺入测定)
在大鼠皮肤细胞中的蛋白质合成	(用标记的氨基酸测定)
在大肠杆菌中 ATP 合成	
(2) 酶激活	
在脑细胞中的鸟氨酸羧化酶	(增加了多胺产生)
在黑色素瘤细胞中酪氨酸酶	(增加黑色素)
(3) 膜转输	
人红细胞	(增加 Na ⁺ 释放)
鸡骨细胞	(增加 Ca ²⁺ 摄取)
(4) 增殖	
鸡神经细胞	(增强神经外生长)
人淋巴细胞	(增强分裂)

12 kv/cm 处理后, 可见到孔或空洞。为了跟踪细胞膜受体随着场强的增加而重新分配的现象, 可以把经过脉冲处理的细胞用 Con-A (伴刀豆蛋白 A) 1 mg/ml 孵育 20 分钟, 固定在 0.25% 戊二醛中 2 小时, 用 Au₅₀-mannan 处理 30 分钟, 用乙醇洗涤、干燥, 并直接用扫描电镜观察, 可检测到一种高密度的受体, 这是由于细胞表面的不均匀电荷分配所造成, 这种染色技术可以显示受体在细胞膜表面的移动。

4. 细胞与组织的电刺激:

应用弱的交变电场(诱导电流在 mv 范围内)可以影响细胞的代谢过程、细胞的基因表达、酶的活化和膜转输, 大多通过第二信使(如 Ca²⁺, C-AMP、ATP、肌醇三磷酸等)而实现。表 2 列举了电刺激在生物过程中的几种应用。

电场可粗分为高压脉冲(>0.2 kv/cm)和周期弱脉冲(WPP<0.2 v/cm), 它们在生物高分子的极化和离子置换中有相似的作用, 在两种情况下膜的通透性都增强了, 但有不同的机理: 用高压脉冲, 主要是电穿孔后发生大分子掺入; 用周期弱脉冲, 主要是由蛋白质通道的扩展而促进离子交换, 当然它也能产生高压脉冲所引起的电穿孔和电融合, 反过来, 高压脉冲技术也可刺激细胞代谢过程, 如 ATP 的合成等, 两种技术不能截然区分。

目前将电场应用于细胞的技术正在进一步发展, 如用快的连续(弱)双极脉冲代替一个强脉冲; 在流动悬浮体中大幅度连续融合; 融合细胞从没有融合的细胞本体中有效分离; 降低场强来增加融合细胞的成活性以及用视频技术和荧光染料观察融合过程等等。预期今后在遗传学、生物技术、医学、生态学等方面将会有更多的应用。

参 考 文 献

- [1] Berg. H., 1992, *Bioelectrochem and Bioenergetics*, 27: 89.
- [2] Astumian, D., 1991, *Bioelectrochem and Bioenergetics*, 25: 455.
- [3] Bauer, E. et al., 1989, *Stud. Biophys.*, 130: 189.
- [4] Jacob, H. E. et al., 1980, *Microbiol.*, 21: 225.
- [5] Jacob, H. E. et al., 1979, *Proc. 19th Hungarian Ann. Meet. Biochem. Budapest.*, p 69.
- [6] Shivarova, N. et al., 1983, *Stud. Biophys.*, 23: 595.
- [7] Müller, U et al., 1989, *Stud. Biophys.*, 130: 183.
- [8] Langer, R., 1990, *Science*, 249: 1527.
- [9] Heller, R. et al., 1995, *Bioelectrochem. and Bioenergetics*, 36: 83.
- [10] Nanda, G. et al., 1994, *Bioelectrochem. and Bioenergetics*, 34: 189.
- [11] Senda, M. et al., 1979, *Plant Cell Physiol.*, 20: 1441.
- [13] 汪和陸等, 1994, *生物化学与生物物理进展*, 21: 322.

[14] Berg, D. et al., 1983, *Stud. Biophys.*, 94: 101.

[15] Hoffmann, F. et al., 1994, *Bioelectrochem. Bioenergetics.*, 34.

[16] Augsten, K. et al., 1987, *Stud. Biophys.*, 119: 105.

[17] Berg, H., 1989, *Stud. Biophys.*, 130: 219.

植物细胞红光信号转导研究进展

马力耕 孙大业

(河北师范大学生物系 石家庄 050016)

光作为重要的环境信号,对植物的生长发育起着广泛的调节作用。它的作用方式是光首先被植物细胞中的受体接受,然后通过信号转导形成胞内第二信使,并通过各信使系统的级联传递,最后调节细胞的生理生化反应和遗传性状的表达。植物细胞中负责接受红光信号的光敏分子是光敏色素。目前已知光敏色素参与调控的信号转导是植物细胞信号转导研究进展最快速的部分,所以有必要对这部分内容做专门的介绍。

一、G-蛋白

在动物细胞中,质膜上的受体通过G-蛋白(GTP结合蛋白)与其效应因子如腺苷酸环化酶、磷脂酶C和离子通道^[1]等相偶联,所以G-蛋白在跨膜信号转导中发挥着非常重要的作用。Gilman和Rodbell也因他们在G-蛋白及细胞信号转导方面出色的研究工作获得了1994年诺贝尔生理学医学奖。在植物细胞中,Hasunuma等^[2]首先发现GTP γ S能与浮萍(*Lemna*)膜提取物中的某种蛋白结合,红光和远红光均能抑制GTP与上述蛋白结合,暗示G-蛋白可能参与了红光调节的反应,但令人不解的是红光和远红光在抑制GTP与蛋白结合方面具有相同的效果;随后Bossen等^[3]发现G-蛋白抑制剂GDP β S可以抑制红光诱导的小麦原生质体膨大,而G-蛋白激活剂GTP γ S可以在暗中模拟红光的效果诱导原生质体膨大,Romero等^[4]以黄化燕麦幼苗为材料发

现红光(5 min)可以促进GTP与幼苗蛋白提取物的结合,而红光后立即照射远红光(5 min)可以完全逆转红光的效果;以后他们又进一步证实G-蛋白激活剂霍乱毒素(*Cholera toxin*)可以模拟红光的效果在暗中诱导光自氧的大豆悬浮培养细胞中*cab*基因的表达^[5];Clark等^[6]则进一步证实了上述结果,发现红光(2 min)促进GTP与豌豆核膜的结合,随后用远红光(4 min)处理可逆转红光的效果;最近Neuhaus等^[7]利用显微注射的手段发现向蕃茄光敏色素突变体细胞中注入G-蛋白激活剂霍乱毒素,GTP γ S(30—100 μ mol/L)或GMP-PNP[鸟苷酰(β - γ -亚氨基)三磷酸, 50—100 μ mol/L]可引起受光敏色素调控的*cab-gus*报告基因的表达和花色素苷的合成,而向细胞中注入G-蛋白的抑制剂百日咳毒素(*Pertussis toxin*)或GDP β S(1 μ mol/L)则可抑制上述基因的表达;在随后的研究中他们进一步发现向细胞中注入霍乱毒素或GTP γ S(50 μ mol/L)还可以引起*chs-gus*和*fnr-gus*报告基因的表达^[8]。上述大量工作的结果表明G-蛋白确实参与了光敏色素调节反应中光信号的转导,并且由于百日咳毒素可以抑制光敏色素调节的*cab-gus*报告基因的表达^[7],说明参与这一信号转导过程的G-蛋白为异三聚体G-蛋白而非小G-蛋白。然而最近Sommer和Song^[9]从黄化的燕麦幼苗中分离纯化了一种小分子量(24 kd)的G-蛋白,Clark等^[8]也发现被光活化的光敏色素可以明显促进结合在豌豆核膜上的小G-蛋白结合GTP的