

激素对植物培养细胞生长分化的调节作用*

王 熊

(中国科学院上海植物生理研究所)

细胞分化是发育生物学中重要问题之一。要探索植物整个生命活动过程中的变化及生长、发育的规律,就必需了解与细胞分化和形态发生有关的一些物质如激素的作用及核酸、蛋白质代谢的变化。用整体植物做材料,由于这一系统的复杂性往往不易取得明确结果,因此用植物培养细胞做为研究系统有很多优点。

近二十年来,植物组织和细胞培养的研究已取得了不少进展^[1]。培养的植物细胞在形态建成方面具有可塑性,它可以经过细胞分裂和分化形成不同类型的组织、器官和胚胎;特别重要的是可以再生成完整植株。激素在分化中的作用,在很多情况下与其促进细胞分裂有关,同时也影响随后的分化方向;而分化只有在分裂的基础上才能实现。但是,激素对分化的作用究竟是直接影响,还是通过细胞分裂引起的间接影响,有时难以区分。但有的试验证明,可以把对细胞分裂的影响和对分化的影响区别开来。细胞分裂素就表现了双重作用,即既提供了决定分化所需的特殊刺激因素,又启动了分化所需的细胞分裂。

激素对培养细胞生长的调节作用

细胞分裂素是促进细胞分裂的植物激素。Miller等人^[2]首先分离出一种能促进细胞分裂的物质,经鉴定是6-咪唑氨基嘌呤,并命名为激动素。随后从各种植物材料中又分离出能刺激细胞分裂的其他一些物质。这些生长调节物质通常归称为细胞分裂素类。一般认为生长素类物质促使细胞伸长,而细胞分裂素类物质促

进细胞分裂。细胞分裂素对培养细胞的作用是能诱导组织或细胞的脱分化,使生长着的细胞群继续保持有丝分裂能力,从而能进行继代培养。玉米素对大豆细胞生长有明显的促进作用,在 10^{-9} 至 $10^{-6}M$ 浓度范围内呈正比关系。将生长的大豆细胞转入无玉米素的培养基上约48小时细胞分裂完全停止,如果在第三天给以玉米素,大约16小时后又出现有丝分裂,24小时左右达到高峰。这里可明显地看到它有促进细胞分裂的作用,并导致了细胞增殖生长。

细胞分裂素通常难以或不能启动DNA合成,但能促进已复制DNA的那些细胞的分裂。Jouanneau在需要细胞分裂素的烟草细胞悬浮培养中,用细胞分裂素间歇处理的方法成功地使细胞同步分裂。以后他又用抑制DNA合成的物质处理细胞,结果并不影响在这系统中由于细胞分裂素所引起的有丝分裂第一次同步波峰出现的时间和大小。甚至就一个细胞周期来说,除去培养基中激动素,并不降低 $[^3H]$ 标记的胸苷掺入细胞核DNA的量^[3]。因此被细胞分裂素所调节的活动是在 G_2 期。

细胞分裂素对细胞分裂的调节作用

细胞分裂素诱导细胞增殖与促进多核糖体形成有关。静止期的细胞中富含细胞质核糖体,主要是单核糖体。当将静止期细胞转入含细胞分裂素的培养基培养24小时后,多核糖体增加4—6倍。在玉米素促进大豆细胞生长的线性浓

* 本文请梁海曼教授校阅,谨此致谢。

参 考 文 献

[1] A. Kubotsu and M. Ueda., 1980 *J. Ele-*

ctron Microsc., 29(1):45-53.

[2] V. Mizvira, G. Takahashi, et al., 1978
J. Electron Microsc., 27(1):65-66.

度范围内(10^{-9} — $10^{-6}M$), 用不同浓度玉米素处理大豆培养细胞3小时后, 细胞仍处于静止期, 其体内多核糖体的形成与细胞分裂素浓度呈正相关。多核糖体含量的增加发生在大豆细胞生长的增殖期以前。细胞内多核糖体含量达到高水平时细胞就分裂, 反之就不分裂。如果把细胞转接到缺细胞分裂素的培养基上, 就不能分裂, 多核糖体含量也不能达到高水平。因此可认为细胞分裂素引起细胞分裂是由于促进了多核糖体形成。

培养细胞由静止状态转入生长状态时, 在分裂前, 多核糖体水平和蛋白质合成速度急剧增加。在 G_2 期如果蛋白质合成受到抑制, 也会妨碍以后的细胞分裂。在烟草悬浮培养细胞中, 用抑制蛋白质合成的物质(5-甲基色氨酸)处理, 对细胞分裂素所引起的同步有丝分裂有明显的阻遏效应。由于细胞分裂素引起与细胞分裂有关的蛋白质合成, 因而促进了细胞分裂。如Tepfer等人^[4]将悬浮培养的静止期大豆细胞转入含细胞分裂素的培养基中, 一定时间后将其放在 $[^{35}S]$ 的蛋氨酸中。凝胶电泳放射自显术的试验结果证明, 细胞分裂素促使蛋白质组分发生质的变化: 至少有4个多肽链形成是由细胞分裂素启动的, 另外有一个多肽链的合成受阻遏。这些变化在处理24小时内出现, 其中有些变化在细胞转入后3小时就能观察出来。有丝分裂在激素处理16小时后才开始出现, 说明这种变化发生在有丝分裂以前。

细胞分裂素处理后最初3小时内总RNA和含多聚腺苷酸的RNA的合成没有变化。但细胞中多核糖体/单核糖体的比值约增高3倍。Muren等人用抑制转录过程的放线菌素D或5-氟尿核苷处理, 在无细胞分裂素的培养细胞中抑制其含多聚腺苷酸RNA的合成, 并引起多核糖体/单核糖体比值下降。但是同样浓度的抑制物并未阻遏由于细胞分裂素刺激后开始3小时内所引起的多核糖体形成的增加; 因此细胞分裂素很可能由于在翻译水平调节蛋白质合成, 从而影响了多核糖体的形成。

细胞分裂素所引起的多核糖体形成的作用可从三方面解释, (1) 如果引起非专一的核糖体的集聚, 那就可能是一种臆象, (2) 影响了多肽链的“起始”、“延长”或“中止”速率的变化, 因此使mRNA上核糖体的间隔距离减小。(3) 影响了细胞质里有功能的mRNA量。为探索这问题, Tepfer等人应用了双标记同位素方法及蔗糖密度梯度离心技术, 结果表明细胞分裂素所引起的多核糖体形成不仅代表蛋白质合成的潜能增强, 而且蛋白质合成率确实增加了。用 3H 亮氨酸标记初生态的多肽链的方法测定了经玉米素处理3小时和未经处理的细胞中多核糖体的蛋白质合成能力。结果在这二组处理中参入到单核糖体梯度区的亮氨酸量都不显著; 但在多核糖体梯度区经细胞分裂素处理过的细胞显示 $[^3H]$ 亮氨酸参入初生态链的比值对照大二倍。另外, 玉米素促进多核糖体的形成是由于其刺激作用调动了细胞质中已经形成的单核糖体向多核糖体移动(图1), 因此可以排除臆象的可能性。从二组培养细胞核糖体大小分析结果并未观察到多肽链起始、延长或中止的速率有明显的差异, 从而间接地证明了

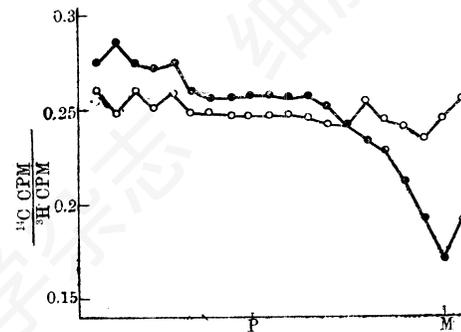


图1 玉米素处理后标记单核糖体向多核糖体移动

- $^{14}C/^{3}H$ 比值, 玉米素处理后核糖体脉冲值比的变化。
- ^{14}C ——玉米素处理的核糖体脉冲值。
- ^{3}H ——对照核糖体的脉冲值。
- $^{14}C/^{3}H$ 比值, 未经玉米素处理的二组细胞中多核糖体梯度区的 $^{14}C/^{3}H$ 比值
- P——多核糖体峰。
- M——单核糖体峰。

对多肽链的起始、延长和释放速率无明显影响。用双标记同位素方法及蔗糖密度梯度离心技术直接测定的结果也表明在这两组处理的细胞中,多肽链的起始、延长和释放的速率相同,细胞分裂素促进多肽链形成是由于激活了细胞质中 mRNA。在无细胞分裂素处理的细胞中已转录的 mRNA,以潜存的无翻译功能的形式存在;当细胞分裂素作用后,刺激了这些已存在的 mRNA 的活化,从细胞质中转移到核糖体形成多核糖体, Fosket 等人^[5]认为细胞分裂素对潜存的 mRNA 的活化是专一性的;促使对细胞分裂所必须的蛋白质合成的遗传信息表达。已观察到在细胞分裂以前由于细胞分裂素的作用蛋白质组分确有变化。

激素对细胞分化的作用

外源植物激素能诱导愈伤组织形成管胞,形成层、维管结点和分生结节,由分生结节发育成根原基或芽原基。Wetmore 等人发现 IAA 加蔗糖能诱导愈伤组织分化木质部和韧皮部,蔗糖含量能调节木质部和韧皮部的比例。离体培养的豌豆根皮层薄壁组织是研究激素对细胞分化调节作用的良好实验系统,该组织在整体中细胞有丝分裂处于静止状态,大部分细胞是二倍体,无管状分子(Tracheary element)。当切段培养在细胞分裂素加生长素的培养基上,第五到第七天就出现管状分子,Shininger 等人观察到根皮层细胞分化率随细胞分裂素的浓度增加而增加,同时看到在细胞分裂素中培养 3 天,能促进细胞分裂,但并不形成管状分子,核内 DNA 含量向高倍性水平变动。在培养 32—36 小时后,细胞分裂素刺激 DNA 合成能力加强;至少需培养 6 天才能形成管状分子,由此推断,细胞分裂素对管状分子形成和细胞复制有不同影响。能诱导细胞分裂,但不能伴随管状分子的形成,管状分子的形成一般伴随发生或预先发生细胞复制。应用 ³H 标记的胸腺嘧啶结合放射自显术表明:在第 7 天时 有 96% 具核的管状分子被 ³H 胸腺嘧啶标记,

管状分子是由合成 DNA 的细胞分化而来。Shininger^[6]用 DNA 合成抑制剂 FudR (5-氟脱氧尿嘧啶核苷)处理根皮层薄壁组织,10⁻⁶ M FudR 抑制细胞复制和管状分子的形成,如处理的同时又加入 10⁻⁴ M 胸腺嘧啶核苷(TdR),通常这两个反应都能顺利进行。如果在 FudR 抑制后再加入 TdR,则能恢复 FudR 的抑制作用。由木质部分化的时间进程发现,如果在培养后第三天即 DNA 合成的高峰后加入 FudR,木质部不受影响,如果在 DNA 合成时加入,则表现出明显的抑制作用。这说明在木质部的分化中,细胞分裂是在细胞分化的“决定”阶段所必需。激素激活静止细胞转变为 DNA 复制状态,在激活 DNA 重新合成以前,先发生 RNA 和蛋白质代谢的变化。外植体培养在含有生长素和细胞分裂素的培养基上 9—12 小时促进 RNA 合成速度,单独用生长素培养时未见到 RNA 合成速度有明显增加,激素对 RNA 比对 DNA 的刺激作用提前发生 24—36 小时;这期间在细胞形态上也发生变化,如核与核仁的变化^[7]。Short 等人观察到激动素处理后 15 分钟促进多核糖体集聚。Shininger 提到激动素促进豌豆根皮层薄壁组织蛋白质合成。

激素在植物组织培养中诱导分裂和分化的具体运用

器官或胚胎发生——植物细胞的全能性。为了使分离的植物组织或细胞经培养后再生成完整植株,必须首先养活离体组织或细胞,然后再诱导其分化,形成完整植株。当分离植物的组织或细胞进行培养时,给以一定的养分和激素,则已经停止分裂的细胞又重新开始分裂,增殖生长,并逐渐失去其原有的分化能力,形成愈伤组织。由于植物种类及所取部位的不同,诱导其形成愈伤组织所需的激素浓度与组合均有不同。双子叶植物一般采用生长素/激动素比例高的配方,但单子叶植物的细胞增殖比双子叶植物要求较高的生长素浓度,而对细胞分裂素无明显反应。少数植物在诱导愈伤组织时,除

生长素与激动素外，还需其它植物激素的相互作用。当愈伤组织转到合适的条件培养时，组织又可再分化，形成维管组织，分生结节，进而通过器官分化或胚胎发生途径再生完整植株。自五十年代发现了激动素，提出芽和根的形成受培养基中生长素和激动素之间相互作用、相互调节的观点，激素控制器官形成这一模式在很多种植物的组织培养中已得到验证。一般说来，提高细胞分裂素浓度利于长芽，增加生长素浓度利于长根。Steward 等人^[8]和 Reinert 等人^[9]分别用胡萝卜细胞培养揭示了体细胞胚胎形成的规律，从而使细胞全能性的概念得到科学的论证。Halperin^[10]和 Fujimura 等^[11]在胡萝卜悬浮培养过程中研究了各种生长调节物对胚胎发生的影响。植物组织或细胞的生长和分化与激素的关系可归纳如图 2、3 所示。由分生结节分化形成根和芽包括两个阶段，第一阶段形成一般原基，第二阶段(器官形成阶段)决定器官类型，根原基与芽原基在组织学上难以分辨，在这阶段中决定器官类型依赖于环境中的激素水平(外源激素与内源激

素的相互作用；而内源激素受光、温度、培养基中氮含量和其它营养因素的影响)以及遗传因子等影响。培养基成分及不同激素的相互作用都会影响类胚体发生的途径。

器官或胚胎形成过程中的生化变化

由于植物激素在细胞分化和形态建成中的明显作用，已促使不少研究者致力于研究激素所引起的一些早期的生理生化变化，但由于在培养中分化的细胞或分生组织细胞仅占很少一部分，分化过程同步性亦较差，这给进行较精密的生化分析带来了困难。在这方面所得的一些资料中，不少很可能是伴随着器官形成过程的次生效应，而并非其原初反应。在烟草愈伤组织芽分化之前有明显地积累淀粉的过程，抑制芽形成的 GA₃ 浓度同样亦抑制愈伤组织中淀粉的积累，积累的淀粉在随后形成器官的过程中又被利用。一般而言，形态上的分化总是伴随有生理生化上变化，近年来一些研究工作者已观察到在组织培养中随器官或胚状体的形成，一些酶的活性及同功酶的谱带均发生一定的变化并出现一些特异的低分子量的可溶性蛋白，这也势必在核酸和蛋白质的代谢上得到反映。

Matsumoto 等^[12]研究了胡萝卜悬浮培养细胞胚胎发生过程中染色质模板活性的变化。发现形成胚的培养物，其染色质模板活性要高于无胚发生的对照培养物，同样，在形成胚的细胞内，非组蛋白物质恢复组蛋白抑制 RNA 合成的活性也较对照高，联系 Gregor 等^[13]观察到在这二种培养细胞中非组蛋白蛋白质电泳图谱有不同，似乎可以说明在胚发生过程中，非组蛋白蛋白质的改变与对组蛋白抑制的 RNA 合成的恢复作用是一致的。即较高的模板活性可能由于较高的非组蛋白蛋白质活性引起的。比较了生长的和胚分化的野胡萝卜组织中 DNA、RNA 和蛋白质含量以后，发现 2,4-D 的存在使 RNA/DNA 和蛋白质/DNA 比值增加，说明 2,4-D 提高 RNA 和蛋白质的含量

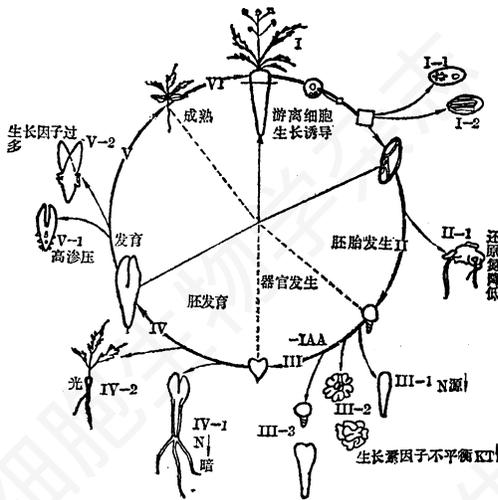


图 2 胡萝卜类胚体分化途径

- III、要求：N源供给丰富，平衡。生长素和细胞分裂素浓度降低、发育正常、形成心形胚
- IV、要求：N源↑、渗透压↑、除去生长素和细胞分裂素。

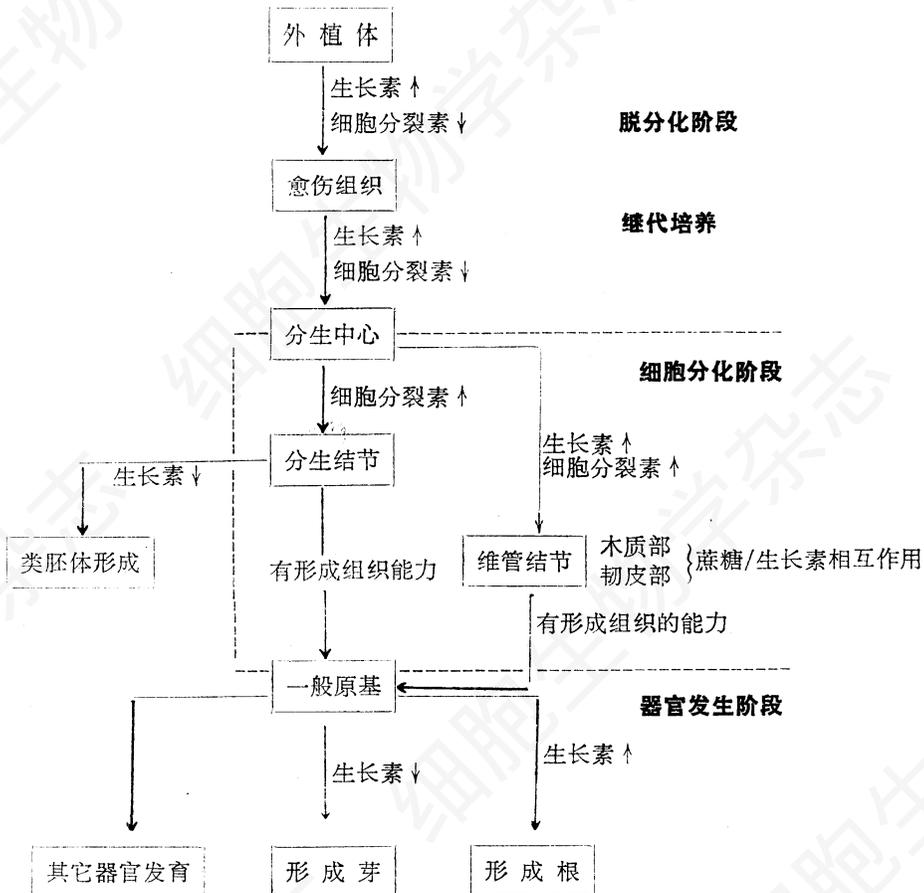


图3 植物组织或细胞生长和分化与激素的关系
(↑和↓分别表示外原激素水平的高与低)

[14], Komamine 等人 [15] 研究了胚发生过程中核酸代谢的变化, 发现在有胚状体发生的细胞中 DNA 合成速度二倍于对照细胞, ^3H -尿嘧啶电泳的结果证实, 与对照相比, 胚发生细胞中 rRNA 的转化较快, tRNA 较慢, mRNA 合成速度较高。

植物激素在分化中有明显的调节作用, 它与跟细胞分化有关的一些过程, 如细胞生长, 细胞分裂等也密切相关。由于激素的双重作用, 即对细胞分裂与分化都有作用, 因此关于激素对分化的作用机制仍然不清。由于植物激素对于细胞中核酸和蛋白质的代谢, 酶的诱导等过程有着深刻的影响, 已使不少研究者相信激素在分化中的作用可能即通过在转录或翻译水平上的调节作用而影响基因的表达, 然而至今对

于植物激素在分化中的作用了解依然很少。现在的问题是要寻找种种代谢变化的内在联系以及激素的最初作用部位。分化是一个十分复杂的生物现象。对于细胞分化的研究, 关键的问题仍然是细胞究竟是如何决定其发育命运的? 在这过程中, 外界因素以及激素等是如何起作用的? 基因的顺序活化又是如何发生的? 为了阐明这些问题, 需要研究与此有关的大分子物质(核酸、蛋白质等)合成的调节作用。

参 考 文 献

- [1] 罗士韦, 1978, 植物生理学报, 4(1):91-112.
- [2] Miller, C. O., 1965, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 54:1052-1058.
- [3] Jouanneau, J.P, and N. Taudeau de Ma-

- rsad, 1973, *Exp. Cell Res.*, 77:167-174.
- [4] Tepfer, D. A. and Fosket, D. E., 1978, *Developmental Biology*, 62:486-497.
- [5] Fosket, D. E. and D. A. Tepfer, 1978, *In Vitro*, 14:63-75.
- [6] Shininger, T. L., 1975, *Dev. Biol.*, 45:137-150.
- [7] Shininger, T. L., 1978, *In Vitro*, 14:31-50.
- [8] Steward, F. C., Hapes, M. O. and Meers, K., 1958, *Am. J. Bot.*, 45:705-708.
- [9] Reinert, J., 1959, *Planta*, 53:318-333.
- [10] Halperin, W., 1966, *Am. J. Bot.*, 53:443-453.
- [11] Fujimura, F., and Komamine, A., 1975, *Plant Sci. Lett.*, 5:359-364.
- [12] Matsumoto, H., Gregor, D. & Reinert, J., 1975, *Phytochem.*, 14:41-47.
- [13] Gregor, D., Reinert, J. & Matsumoto, H., 1974, *Plant Cell Physiol.*, 15:875-881.
- [14] Verma, D. C. & Dougall, D. K., 1978, *In Vitro*, 14:183-191.
- [15] A. Komamine, T., Morigaki and Tatsuhiro Fujimura, 1978, Metabolism in synchronous growth and differentiation in plant tissue and cell cultures. in "Frontiers of Plant Tissue Culture 1978" Ed. by Trevor, A. Thorpe. University of Calgary, p. 159-168.

不均一核糖核酸及其在肿瘤细胞中的研究*

孙 谨

(辽宁省肿瘤研究所)

HnRNA 即不均一核糖核酸,系真核生物的核 RNA 成分之一,因分子量不均一而得名。它约占核 RNA 的 30% 左右,碱基比例与 DNA 相似。它是真核细胞基因的一级转录体,是遗传信息由核向胞质,由核酸向蛋白质传递中的主要中间体,它一部分加工成 mRNA,因此是 mRNA 的前体,大部分(70—90%)于核内降解。

结构特征

HnRNA 的平均长度(13000 个核苷酸)约为 mRNA 的 5—10 倍。新转录的 HnRNA 在链增长完成前,便在 5' 端加上一段与其后加工过程无关的甲基化帽结构, m^7GpppN_mN'' , 其抗酶解能力增强。

10—40% HnRNA 在核内转录后立即在分子 3' 端进行多聚腺苷化并完成于加工之前。Poly(A) 顺序部分运送到胞质,部分在核内降解。Poly(A) 顺序对 HnRNA 加工成 mRNA 并输送至胞质有决定作用。HnRNA 加成 Poly(A) 后即形成利于加工的结构。腺病毒 HnRNA 加成 Poly(A) 后即开始加工,未加成

Poly(A) 的则迅速降解。但非造血组织珠蛋白 HnRNA 的加工似乎与多聚腺苷化无关。

HnRNA 转录自基因组的重复和非重复顺序。哺乳类及海胆 HnRNA 分子中约 10—30% 是来自重复顺序。用部分碱水解和 Poly(dT) 纤维素亲和层析确定,与 3' 端 Poly(A) 相连接的主要是单一顺序,5' 端主要是重复顺序。大鼠腹水细胞 HnRNA 的 80% 是重复和单一顺序交替排列,其中 28% 由长 200 个核苷酸的重复顺序与长 1200 个核苷酸的非重复顺序交替间插,另 43% 交替间插的重复与非重复顺序各长 200 及 9800 个核苷酸。Hela 细胞 HnRNA 3' 端有一段非重复顺序与 Poly(A) 片段邻近,其长度与细胞 mRNA 的平均长度相似。海胆胚胎 HnRNA 由 300 与 800 个核苷酸的重复与非重复顺序交替组成。基因无性繁殖技术揭示,编码 mRNA 顺序的结构基因被非密码插入顺序所隔开。小鼠 β -珠蛋白 mRNA 前体中的结

* 本文系作者在中国科学院上海细胞生物学研究所基因三组进修时撰写,承蒙导师张玉砚教授指导修改,谨致谢意。