

- [16] Sekerka, V. 1977b *Acta. Fac. Rer. Natur. Univ. Comeniana, Physiol. Plant* (Bratislava) 13: 43—47.
- [17] Singh, B. D. 1976a *Nucleus* (Calcutta) 19: 74—79.
- [18] Ogihara, Y. 1981 *Theor. Appl. Genet.* 60: 353—363.
- [19] Jha, T. B. et al. 1982 *Plant Sci. Lett.* 24: 219—224.
- [20] Novak, F. J. 1981 *Cytologia* 46: 371—380.
- [21] 孙敬三等, 1981, *植物学报*, 23: 262—265.
- [22] Vasil, I. K. 1980 *Int. Rev. Cytol., Suppl.* 11A, 195—217.
- [23] 胡含, 1978, *遗传学报*, 5: 23—30.
- [24] Ruiz, M. L. et al. 1982 *Protoplasma* 111: 83—86.
- [25] Singh, B. D. 1976b *Caryologia* 29: 447—455.
- [26] Singh, M. R. 1982 *Cytologia* 47: 419—426.
- [27] Singh, B. D. 1975 *Can. J. Genet. Cytol.* 17: 109—116.
- [28] Ashmore, S. E. 1981 *Proc. Int. Bot. Congr.* 13: 276.

## 培养的哺乳动物细胞的辐射生物学

赵季英

(中国科学院生物物理研究所)

近年来, 细胞培养的方法在细胞学、生理学和生化学等方面已开展了大量工作, 特别是结合辐照, 利用同位素标记, 研究体外培养细胞的核酸和蛋白的变化, 更使细胞培养方法独树一帜。在辐射生物学领域内, 由于辐射损伤是多方面的(如分裂延缓、DNA 链断裂、碱基损伤、染色体畸变等), 而且不同辐照源及不同剂量对细胞的损伤效应又各不相同。因此, 整体水平的研究远不能解释辐射细胞学和辐射分子生物学中出现的诸多问题。而利用离体培养的细胞进行研究, 可以排除体内的各种因素的干扰, 对细胞增殖和因辐照引起的分裂延缓之间的关系以及不同环境条件下的细胞辐射敏感性的变化作出较为合理的解释, 而且还能为辐射所致的核酸—蛋白的变化(如 DNA 合成和蛋白合成关系、核酸—蛋白交联、核酸的转录活性等)提供实验依据, 有助于进一步分析辐射损伤的机理。

在离体, 一般都惯用细胞增殖, 生长抑制和克隆形成作为细胞辐射损伤的标志, 结合细胞生化学的测定, 反映辐射损伤的生物学效应。因此, 本文首先谈及细胞增殖与辐射引起的分裂延缓关系, 进而对不同培养条件下细胞辐射敏感性的问题略作粗浅讨论。

### 一、细胞周期与辐射效应

细胞分裂的整个过程受到一定基因的控制, 细胞周期的各个时期( $G_1$ , S,  $G_2$ 和M期)都有一定的时限, 以中国仓鼠卵巢成纤维细胞为例, 每代时间为 13 小时左右<sup>[1]</sup>, 其中  $G_1 = 4$  小时,  $S = 7$  小时,  $G_2 = 15$  小时,  $M = 0.7$  小时。经 X-线,  $\gamma$ -线或疏密不同的离子辐照会使细胞周期的各个时相发生变化, 引起 S 期和分裂期的延缓, 特别是 S 期的延缓。任何引起染色体畸变的辐照都会抑制局部 DNA 的复制, 结果产生有缺陷的子细胞, 最后引起细胞的死亡<sup>[2]</sup>。

研究哺乳动物细胞周期的方法很多, 这里只简单地介绍四种:

1、显微镜直观非同步的或同步的细胞, 能测定辐照的细胞进入有丝分裂的时间与对照细胞进行比较<sup>[1,3,4]</sup>。尽管这种方法能精确地测定延缓, 但只能限制在一定时间内追踪有限的细胞。

2、重复计数悬液培养或单层培养的细胞。这种方法能分析大量细胞。但是, 非有丝分裂细胞的本底往往干涉了有丝分裂细胞的计数使结果有波动<sup>[1]</sup>。

3、流动式细胞荧光束。根据细胞内 DNA

的量来分析不同细胞周期的细胞的比例<sup>[1,2]</sup>。

4、有丝分裂选择的方法来分析细胞周期<sup>[5,6,7]</sup>。利用培养的细胞在有丝分裂时变圆,贴壁力减弱的特性,通过水平向振动很易脱落下来,收集脱落下来的有丝分裂的细胞,记录有丝分裂的速度。此法可对较宽范围的剂量引起的分裂延缓的时间作定量的分析,可克服上述三种方法的缺点<sup>[1]</sup>。

辐照引起哺乳动物细胞的变化与辐照时细胞的周期有一定的依赖关系,尤其进入S期的延缓与辐照剂量密切相关<sup>[8]</sup>。例如同步在有丝分裂的中国仓鼠卵巢成纤维细胞对X-线引起的杀伤比G<sub>1</sub>期、早S期或晚S期的细胞都敏感,如用存活的子细胞来表达在有丝分裂的细胞内的辐射损伤,辐照以后的第一代晚S期到第二代的G<sub>1</sub>期时,存活的细胞能完全恢复累积的亚致死损伤,而有丝分裂细胞至少受到两种辐射损伤,即致死的和亚致死的损伤,而且随着辐照剂量的增加有丝分裂延缓也增加。根据Brent<sup>[9]</sup>的实验,在S期辐照的细胞的DNA合成速度减少,而且在下一个周期内的DNA合成速度比有丝分裂期辐照的细胞大大地减慢。为了进一步阐明在M期同步化以后,存活细胞进入第二个周期的S期的情况,用<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷加到温育12小时的形成克隆的培养液中,处理30分钟倒掉有放射性的溶液,用正常的溶液洗细胞,然后继续培养6天,形成克隆,计数克隆,结果看到在有丝分裂期辐照以后25小时,标记的细胞的接种率是未标记细胞的10%,这意味着存活的细胞已进入S期,而且已逐步被标记上了<sup>[10]</sup>。

同样地,对细胞增殖也做了实验,辐照同步在M期的细胞和同步在S期的细胞,对照组在15小时左右达到两倍的细胞数,而照射组在17小时才达到两倍的细胞数,在20—45小时之间照射组的细胞增殖明显下降。我们用1,000rad <sup>60</sup>Co- $\gamma$ 线分别辐照G<sub>1</sub>期及S期的中国仓鼠的卵巢成纤维细胞,在辐照后不同时间,

用<sup>3</sup>HTdR标记,看到无论在G<sub>1</sub>期辐照还是在S期辐照的细胞内,<sup>3</sup>HTdR的参入都大大减少了。两者的差异仅是S期辐照的细胞内DNA合成抑制更甚,这点与Dewey<sup>[10]</sup>的S期辐照的细胞延缓较长的观点相一致。

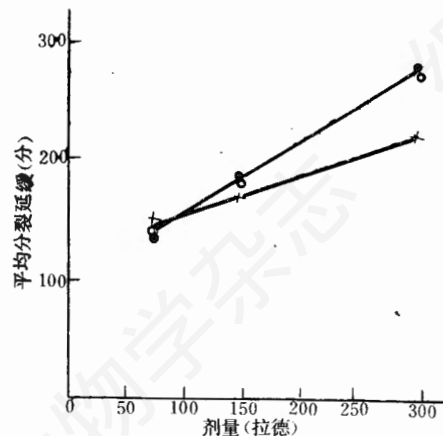


图1 CHO-二倍体、CHO-四倍体、CHO-卵巢癌三株细胞,辐射引起分裂延缓的比较

- CHO-二倍体
- CHO-四倍体
- ×—× CHO-卵巢癌细胞[引自1]

另外, B.F.Kiner et al.<sup>[1]</sup>对CHO-二倍体、CHO-四倍体和卵巢癌细胞株分别进行辐照,测定这三株细胞因辐照引起的平均分裂延缓情况(图1)。他认为CHO-二倍体和CHO-四倍体的分裂延缓的敏感性没有明显差异(分别为 $62 \pm 2$ 和 $61 \pm 1$ 分/Gy),这个结果并不奇怪,因为BudR参入DNA不改变辐照引起分裂延缓的敏感性,卵巢癌细胞的延缓系数是 $39 \pm 4$ 分/Gy,因此染色体多倍化似乎也不影响辐射引起分裂延缓的敏感性,故推测一定另有与癌发生细胞有关的某些代谢的或细胞表面的改变,增加了分裂延缓的敏感性。

## 二、不同培养条件对辐射细胞的影响

许多研究者都认为辐射引起的细胞生物学效应与辐照时细胞所处的时期有依赖关系。尤其对同步的CHO细胞来讲,辐照对细胞周期的每个时期的延缓都有相同的敏感性。但也有人认为只有进入S期的延缓与剂量有关。为了

阐明这些相互矛盾的结果, D. B. Leeper et al. [11]测定了不同培养条件下辐射的细胞周期延缓的情况, 他用振动的方法获得同步在有丝分裂期的细胞, 在有丝分裂后一小时(早 G<sub>1</sub>期), 用 600 拉德 X- 线辐照中国仓鼠卵巢成纤维细胞, 辐照后立刻把瓶壁上的细胞用胰酶消化下来, 然后再接种到另一个培养瓶壁上或悬液培养中, 在悬液培养内生长的细胞在第一小时内仍回复悬液培养或接种到培养瓶壁上或单层培养。分析四种培养条件下细胞的生长情况(图 2)。

如在 G<sub>1</sub> 期时用 600 拉德 X- 线辐照, 则所有四种培养条件下进入 S 期和进入分裂期都延缓。尽管在这四种培养条件内, 对细胞周期的延缓都有很大影响, 但在这种培养条件下, S 期延缓和分裂期延缓之比均保持在一个非常接近于 0.28 的恒定值(见表)。也就是说在每种培养条件下, 分裂期延缓比 S 期延缓大四倍左右。故分裂延缓不能用 DNA 合成的延缓来计算。而且细胞一定延缓在通往 S 期和累积在 G<sub>2</sub> 期, 这些结果表明当 CHO 细胞单层培养或悬液培

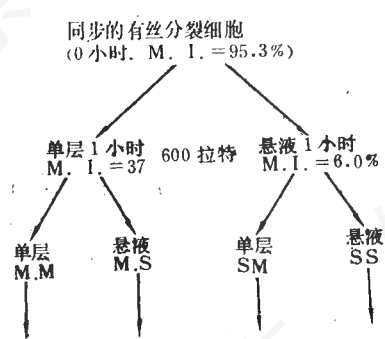


图 2 同步的中国仓鼠卵巢成纤维细胞的有丝分裂期细胞经 X- 线辐照后, 在四种不同培养条件下培养的图解

- (1) 单层培养→X- 线照射→单层培养
- (2) 单层培养→X- 线照射→悬液培养
- (3) 悬液培养→X- 线照射→悬液培养
- (4) 悬液培养→X- 线照射→单层培养 [引自 11]

养时, 辐射引起的分裂延缓都比进入 DNA 合成的延缓要长。为要测定逐步进入 S 期的情况, 用 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶(0.5 微居里/毫升)标记细胞, 发现培养条件对细胞进入 S 期的速度是有一定影响的。当最优条件是单层培养时, 在接种以后 5.7 小时细胞进入 DNA 合成期。而最优条件是悬液培养时, 在接种以后 8 小时细胞才进

表: 辐射引起周期延缓和 S 期延缓对分裂延缓的比例 [引自 11]

测定项目	延迟的时间 (小时)					
	SS	SM	MS	MM	M	
DNA 合成	1.2	0.9	1.4	0.4	0.9	平均 = 0.9
分裂	4.0	2.9	4.1	1.6	3.2	平均 = 3.2
比例	0.30	0.31	0.27	0.25	0.28	平均 = 0.28

入 DNA 合成期。

C. P. Roaphorst et al. [12] 1979 年指出胰酶化以后细胞是处在一种不正常的生理状态下, 所以当把用 0.1% 胰酶处理以后的细胞在 37℃ 温育不同时间, 再进行辐照, 细胞的辐射敏感性有明显不同, 发现在胰酶化以后温育 7.5 小时再辐照的细胞最敏感, 剂量加大时存活率下降。1000 拉德 X- 线辐照, 温育 2 小时和 7 小时的培

养存活率相差 3.5 倍。说明胰酶化以后种植的时间愈长存活率就愈接近对照组。在胰酶化以后 3.5 小时左右, X- 线辐照的存活曲线与对照相等。因此说, 细胞的辐射敏感性还取决于在胰酶化和种植以后细胞被照射的时间。另外, 胰酶化还会引起细胞局部同步化, 胰酶化以后的时间愈长同步化的细胞累积也愈多。

### 三、培养细胞的过热效应与辐射敏感

#### 性的关系

哺乳动物细胞温度稍有增高只几分钟,就会大大减低细胞的代谢能力,并引起细胞死亡,尤其S期的细胞(以中国仓鼠卵巢成纤维细胞为例)对温度非常敏感<sup>[13]</sup>,这与X-线或γ-线的效应完全相反。哺乳动物细胞过热时产生蛋白的变性,尤其有丝分裂细胞内纺锤体蛋白的变性似乎是最典型的,而X-线辐照主要是使DNA降解产生DNA损伤,两者有本质上的区别。超过37℃热处理也可引起染色体畸变。S期加热,染色体畸变频率比G<sub>1</sub>期或有丝分裂期加热的畸变频率高。在42.5℃加热的中国仓鼠卵巢成纤维细胞再给以X-线照射会增加非组蛋白对DNA的结合和减少DNA链断裂的再联合的速度。例如当细胞在45.5℃中温育17分钟,非组蛋白对DNA的结合比例就增加(图3)<sup>[14]</sup>。如在X-线辐照前热处理过的细胞在37℃中培养12小时,则非组蛋白对DNA结合比例就恢复正常,但DNA链断裂的再联合的速度减少和细胞辐射敏感性的增加仍保持不变。在12小时以后细胞辐射敏感性开始减少,48小时以后细胞辐射敏感性和DNA链断裂的再联合速度都回复到正常,因此推测DNA链断裂的再联合速度可能与DNA结构的变化有关。只有当温度撤消后,与DNA结合的蛋白回复正常状态时才能恢复DNA的结构。特别值得提到的是温度在42℃以上就会改变哺乳动物细胞的非组蛋白对DNA的结合,而且这种变化会干涉DNA的复制机制<sup>[14]</sup>,主要有下述两种干涉:(1)修复酶可被直接灭活;(2)变性蛋白能减少修复酶进入DNA底物或使它变为一个不合适的模板。撤消过热,蛋白的改变也会逆转过来。

由于过热破坏了细胞的平衡,就一定会发生许多生化的和代谢的改变,而且超过细胞的标准温度还会改变染色质的状态,恢复正常温度就能恢复染色体蛋白的原来状态。故假设电

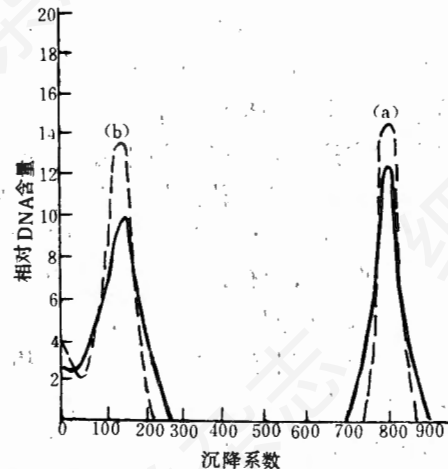


图3 单独过热以后或与X-线辐照混合处理以后指数生长的中国仓鼠卵巢细胞的DNA<sup>14</sup>C的沉降系数

- (a)——未处理过的细胞  
 ----- 45.5℃过热17分钟的细胞  
 (b)——没过热处理单给于1,000 rad X-线辐照  
 ----- 过热45.5℃17分钟后立即1,000 rad X-线辐照<sup>[14]</sup>

离辐照的细胞的存活率与DNA损伤修复有关,而且X-辐照的细胞的胸腺嘧啶损伤是由于染色质结构改变所致,而不是酶的变性引起的。故X-线加过热的潜在在分子水平上可以用两种不同的定量方法表达:(1)在42.5℃以下,DNA的损伤是随着温度的增加而变化的。(2)超过42.5℃实际上与酶的过程发生相互干涉。

45.5℃处理的细胞进入有丝分裂的时间比37℃的对照组延缓11小时。如在分裂期加热,则有丝分裂约延缓32小时,甚至更长,或根本不进入分裂。特别有趣的是在下一个有丝分裂期时往往引起90%的细胞成四倍体。因此说有丝分裂期热处理主要是影响胞质分裂的完成。

总之电离辐射引起细胞损伤是一个非常复杂的过程,迄今为止还没有人能全面地解释辐照引起的分裂延缓和染色体多倍体与细胞辐射敏感性之间的关系,尤其S期是转录最活跃的时期,辐照后细胞内非组蛋白的特定调控功能的改变以及DNA与组蛋白合成关系的变化都是有待进一步研究的课题。已知DNA和

RNA 都是遗传信息的携带者,染色质蛋白是否也能作为遗传物质看待呢?这是一个值得重视的研究方向。因为在抗辐射的细胞的核和染色质内含有大量高分子量的非组蛋白,而在辐照敏感的细胞内这种高分子量的非组蛋白的量就相对的减少。假设染色体结构的稳定受这些非组蛋白控制,辐照敏感的细胞内,由于这种特殊的非组蛋白的量很低,染色质的骨架就相对地不稳定,因此辐照后极易崩解,导致细胞死亡,显然组蛋白和非组蛋白对染色体结构功能有决定性的作用,尤其非组蛋白对特异性遗传信息的转录起着重要的作用。如果将来我们能通过辐照灭活先天性不正常的基因,然后把新的非组蛋白引入细胞有可能纠正基因转录方向的错误,为辐射分子生物学开辟新的研究领域。值得提醒的是虽然细胞培养方法能精确地研究辐照细胞内 DNA 和蛋白的各种变化,但因培养条件也是影响细胞辐射效应的一个主要因素,因此在分析射线对细胞的直接损伤作用的同时还必须考虑到细胞所在环境因素对细胞辐射效应的干涉,才能得出比较准确的结论。

### 参 考 文 献

[1] B. F. Kimer, D. B. Leeper, and M. H. Schneiderman, 1981, *Radiat. Res.* 85:270—

280.

- [2] H. Schlag, and C. L. Huhle, 1981, *Int. J. Radiat. Biol.* 40:75—85.
- [3] D. B. Leeper, M. H. Schneiderman, and W. C. Dewey, 1973, *Radiat. Res.* 53:326—337.
- [4] J. S. Bedford, and J. B. Mitchell, 1977, *Radiat. Res.* 70:173—186.
- [5] M. H. Schneiderman, W. C. Dewey, D. B. Leeper, and H. Nagasawa, 1972, *Exp. Cell Res.* 74:430—438.
- [6] D. P. Highfield, and W. C. Dewey, 1975, *Methods Cell Biol.* 9:85—101.
- [7] W. C. Dewey, and D. P. Highfield, 1976, *Radiat. Res.* 65:511—528.
- [8] W. A. Nagle, and R. M. Humphrey, 1973, *Int. J. Radiat. Biol.* 23:611—625.
- [9] T. P. Brent, J. A. Bulter, and A. R. Craithorn, 1966, *Nature*, London, 210:393—394.
- [10] W. C. Dewey, and S. M. Robinette, 1969, *Int. J. Radiat. Biol.* 16:495—500.
- [11] D. B. Leeper, M. H. Schneiderman, and W. C. Dewey, 1972, *Int. J. Radiat. Biol.* 21:191—196.
- [12] C. P. Roaphorst, S. A. Saporato, M. L. Freeman, and W. C. Dewey, 1979, *Int. J. Radiat. Biol.* 35:193—197.
- [13] W. C. Dewey, A. Westra, M. H. Miller, and H. Nagasawa, 1971, *Int. J. Radiat. Biol.* 20:505—520.
- [14] E. P. Clark, W. C. Dewey, and J. T. Lett, 1981, *Int. J. Radiat. Biol.* 85:302—313.

## 禾谷类植物的细胞培养和体细胞胚胎发生

王大元

(中国农业科学院柑桔研究所)

应用组织培养技术于农作物的改良已引起广泛注意,并取得了很大进展<sup>[1]</sup>。从组织、细胞或原生质体再生植株是应用此技术的一个重要前提。虽然双子叶植物的细胞培养已取得很大进展,但对单子叶植物,尤其是具有重要农业价值的禾谷类植物 (*Graminaceae*),几年前还认为由组织培养再生植株是相当困难的。至于从禾谷类植物的原生质体再生植株直到目前

都被认为非常困难。Potrykus就培养条件、植物的种和原生质体的来源做了80,000余种不同处理<sup>[2]</sup>,未能从禾本科植物的原生质体培养获得持续的细胞分裂和产生愈伤组织。Cocking<sup>[3]</sup>认为,用禾本科植物的叶片进行组织培养,很难获得愈伤组织。近几年的研究表明,

本文是1982年12月在杭州举行的中国细胞生物学会组织和细胞培养专题讨论会的学术报告之一。