

$3 \times 10^{-15} \text{W}$ 。此实验装置用于测量林蛙卵表面凝集素受体在卵割前和卵割时的运动^[13]。

参 考 文 献

- [1] Peter, R. J., J. Peter, K. H. Tews, and W. Bahr, 1974. *Biochim. Biophys. Acta* 367: 282—294.
- [2] Koppel, D. E., D. Axelrod, J. Schlessinger, E. Elson, and W. W. Webb, 1976. *Biophys. J.* 16: 1315—1329.
- [3] Smith, B. A., and H. M. McConnell, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 2759—2763.
- [4] Koppel, D.E., 1979. *Biophys. J.* 28: 281—291.
- [5] 张孔华, 孙伟利, 张伯新。1982。细胞生物学杂志, (3): 36—40。
- [6] 孙伟利。1982, 实验生物学报, 15: 209—218。
- [7] Axelrod, D., D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W. W. Webb, 1976. *Biophys. J.* 16: 1055—1069.
- [8] Barisas, B. G., 1980. *Biophys. J.* 29: 545—548.
- [9] Schlessing, J., E. L. Elson, W. W. Webb, I. Yahara, U. Rutishauser, and G. M. Edelman, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 1110—1114.
- [10] 清水慶昭, 稻場文男。1973。分光研究, 22: 195—214。
- [11] 藤目智。1974。生物物理14: 9—24。
- [12] Jacobson, K., E. S. Wu, and G. Poste, 1976. *Biochim. Biophys. Acta.* 433: 215.
- [13] 顾国彦, 张孔华, 徐成汤。1983。实验生物学报, 16: 467—476。

* 本文承蒙顾国彦先生指导, 特此致谢。

基础知识

外源环核苷酸与植物细胞分裂、分化的关系

张 述 祖

(北京师范大学生物系)

环核苷酸的细胞生物学意义

近年来大量研究工作表明, 环腺苷酸(c-AMP)与环鸟苷酸(c-GMP)分别是调节控制细胞分化和分裂的物质。1957年 Sutherland 首先发现 c-AMP 的生理效应, 随之 Sutherland 和 Rall 分离与鉴定了该化合物为 3', 5' 环腺苷酸, 并阐明其有激素第二信使的功能。

近几年的研究表明, c-AMP 的作用远远超过动物激素及神经递质第二信使的作用范围, 而具有广泛的生理效应。这些效应大多是通过酶的影响, 经由两种途径来实现的。一方面是对酶活性的影响。在高等动物中, c-AMP 通过激活“蛋白激酶”, 进而催化糖原磷酸化酶、糖原合成酶、脂酶等的磷酸化来调节这些酶的活性。另一方面是通过调节控制基因的表达,

进一步影响某些酶的形成。

通过下列反应生成 c-AMP:



催化这一反应的腺苷环化酶, 存在于一切动物、微生物及某些植物细胞的质膜上。氟化钠能促进它的活性; 四氧嘧啶可抑制其活性。

c-AMP 在机体内经下列反应分解:



催化这一反应的磷酸二酯酶可被甲基黄嘌呤类化合物(如咖啡因、茶碱等)所抑制; 胰岛素等能促进它的活性。细胞内 c-AMP 的水平决定于腺苷环化酶和磷酸二酯酶的活性大小, 也就是决定于 c-AMP 生成和分解之间的相互关系。

Burk 在 1968 年首次报道了 c-AMP 在细胞分裂中的抑制效应。以后的大量工作表明了 c-AMP 对细胞分化的影响。在组织培养中加入外源 c-AMP 可促使某些动物细胞的分化, 而抑制其分裂。例如加入 c-AMP 后, 常可诱导培养的神经母细胞瘤的细胞形成神经原。在 c-AMP 的作用下, 可使组蛋白激酶的催化部分与调节部分分开, 组蛋白激酶因之被激活, 使 ATP 末端磷酸根与组蛋白结合, 从而使磷酸化的组蛋白与 DNA 分离。脱离组蛋白抑制的 DNA 部分可转录 mRNA, 再形成细胞分化所需要的酶, 促使细胞分化。

1963 年, Price 从大鼠尿中分离出 c-GMP。c-GMP 是 c-AMP 的拮抗物, 在细胞内的浓度通常为 c-AMP 的 1/10—1/50。提高 c-GMP 的水平, 可以抑制细胞分化, 促进细胞分裂。c-GMP 存在于多种组织的细胞中, 位于质膜、内质网、高尔基体等细胞器上。这两种环核苷酸的发现及其细胞生物学效应的逐步阐明, 是现代生物学的一大成就。

植物细胞中的环核苷酸

在微生物及植物方面, 细菌、粘菌、真菌、藻类、苔藓植物等的内源环核苷酸及有关酶的作用, 已有大量肯定的报道。在研究过的很多种细菌中, 正和高等动物相似, 广泛地存在着 c-AMP 及 c-GMP 和有关的酶(环化酶、磷酸二酯酶), 但有个别细菌例外, 缺乏 c-AMP 和有关的酶。在粘菌中工作较深入的有盘基网柄菌 (*Dictyostellum discoideum*), 它已成为研究细胞分化和其它某些细胞生物学问题的实验模型。最早研究网柄菌变形体的族聚现象, 随后又确定这种现象是由于每 300—2000 个细胞中有一个细胞产生 c-AMP 的缘故。因为 c-AMP 影响一些酶的产生, 起了分化的启动作用。以后曾研究过它们不同发育时期的 c-AMP 和 c-GMP 水平的变化, 及其环化酶、磷酸二酯酶的消长情况等。在真菌中, 也有鬼伞菌属、假丝酵母菌属、须霉菌属等具有环核苷酸的报道

(Cohen 等)。藻类的林氏念珠藻、衣藻等也含有 c-AMP。苔藓植物, 葫芦藓原丝体的分化与内源 c-AMP 的关系的研究工作中, Spiess 等人发现, 甲基黄嘌呤有抑制葫芦藓的磷酸二酯酶的作用, 从而提高了内源 c-AMP 的含量。所有这些工作尚未见到相反的意见。

种子植物中的环核苷酸含量较低, 不易测到, 但 Amrhein 等曾对测定方法提出意见。因此在种子植物细胞内有无环核苷酸的问题存在着争论。已有很多科学工作者用不同的方法, 在一些种子植物细胞中发现 c-AMP, 例如每克(鲜重)大麦糊粉层中含 c-AMP 1 pmole(每 mg 蛋白质中含 0.04 pmole); 每克燕麦胚芽鞘中含 c-AMP 7—11 pmoles; 每克鳄梨属 (*Avocado*) 幼叶中含 c-AMP 9,600 pmoles。Hanabusa 等在 1981 年测定 180 种中草药中 c-AMP 的含量, 发现中国及日本大枣 c-AMP 含量比鳄梨高 10 倍。他使用的方法是很谨慎的, 并反复证明了方法的可靠性。Raymond 所测的含量也不低, 例如每克胡萝卜含 c-AMP 161 pmoles。有人认为在种子植物的某个发育时期有 c-AMP。例如 Brown、Wellburn、Miller、Lundeen、Alvaroz、Drlica、Giannattasio、Niles、Mascarenhas、Sachar、Srivastava、Polya 等先后在燕麦、大麦、烟草髓细胞、蚕豆正常细胞和肿瘤细胞、燕麦胚芽鞘、鹰嘴豆属幼苗、小麦胚、胡萝卜髓、槭、莴苣幼苗、白菜等植物体内发现 c-AMP。1978 年 Brown 又改进了提取方法。比较研究了菜豆的 c-AMP。同时 Giannattasio 等研究种子植物的腺苷环化酶。Niles 等研究了种子植物的 c-AMP 磷酸二酯酶, 它广泛地存在于大麦种子、豌豆幼苗、大豆愈伤组织、马铃薯块茎、胡萝卜根和菜豆苗中。Haddox 等又在大豆根尖发现了 c-GMP。从以上报道可以看出, 种子植物中可能存在 c-AMP、c-GMP 及有关的酶。如果继续改进测定方法、改进组织化学方法, 再配合离体培养中使用有关酶的激活剂、抑制剂, 并以附加外源环核苷酸进行比较研究, 将有可能逐步加深对种子植物内源环核苷酸的认识。

外源环核苷酸对植物细胞分裂、 分化的影响

外源环核苷酸对植物细胞分裂、分化的影响已有不少报道(Mizuno等)。微生物及低等植物中、在网柄菌属,控制分化的物质之一是c-AMP的腺苷环化酶。腺苷环化酶活性提高时,c-AMP增加,细胞分化能力就可提高。对藻类的分化,外源c-AMP也起促进作用。

在悬浮培养的高等植物葫芦藓,Handa等报道了外源c-AMP对原丝体向茎原丝分化的影响,以及对原丝体形成的影响。在无激素的条件下,在0、10、50、500 μ M的外源c-AMP的影响下,绿色原丝体形成的百分率分别为94、97、96、96。葫芦藓有内源c-AMP及c-AMP磷酸二酯酶,后者可为甲基黄嘌呤所抑制,因而要提高c-AMP的浓度。

种子植物中菜豆幼苗的c-AMP磷酸二酯酶也可作为抑制剂(咖啡因、茶碱)所抑制。Enderess对马齿苋属愈伤组织用外源c-GMP处理,能影响磷酸二酯酶的活性,显示c-GMP拮抗c-AMP的作用。

我们曾在白菜花器官及烟草花药培养中,使用了外源c-AMP及c-AMP环化酶激活剂(NaF)、抑制剂(四氧嘧啶)、磷酸二酯酶的抑

制剂(咖啡因)以了解环核苷酸对植物细胞分裂、分化(包括脱分化和再分化)可能存在的影。在外源c-AMP的影响下,可抑制白菜花药内的细胞分裂,抑制愈伤组织形成(表1);在1mg/l的外源c-AMP时,抑制烟草花药愈伤组织形成的百分率(表2)。在外源c-AMP存在时,白菜花丝及雌蕊愈伤组织形成百分率均较对照为低(表1)。在一定浓度范围内,外源c-AMP可能抑制细胞分裂,有降低愈伤组织形成的趋势。

我们应用不同抑制剂、激活剂,希望能间接说明花药中有无内源c-AMP。在15及30mM的四氧嘧啶的影响下,白菜花药愈伤组织较多。在15mM四氧嘧啶时,白菜的雌蕊及花丝愈伤组织均较多。在30mM四氧嘧啶时,白菜雌蕊愈伤组织的形成率可达到70%,烟草花药愈伤组织比对照组高6倍。四氧嘧啶可能抑制腺苷环化酶,降低c-AMP的形成。低水平c-AMP一方面可能引起细胞脱分化,另一方面可能增加细胞分裂,因此,可引起愈伤组织增多。

为了说明c-AMP能否掺入细胞,我们在实验中曾发现 ^3H -c-AMP可以掺入到白菜小孢子的现象。Wiedmaier也报告过同位素标记的c-AMP可以掺入到植物细胞中。同时,为了说明c-AMP腺苷环化酶在植物体内的存在,

表1 c-AMP对白菜花器官培养的影响(5月22日接种,17天后观察及统计)

处 理	花药愈伤组织%	花丝愈伤组织%	雌蕊愈伤组织%	花冠愈伤组织%
对 照	0.4	11	34	80
c-AMP1mg/l	0	2.2	9.7	90
c-AMP3.3mg/l	0	2.4	14	70

表2 c-AMP对烟草花药培养的影响(接种后五周,20个花药离散液随机取样,分成10片计数的平均值)

处 理	2到多细胞	胚状体	愈伤组织	成苗数	大异形细胞	备 注
对 照	35.9	30.1	7.8	131	219.8	苗基部均有愈伤组织
c-AMP1mg/l	20.5	11.1	0.1	63	405.3	苗基部愈伤组织很少,有大量细胞质较浓,直径比正常小孢子大几倍至十几倍的大细胞。

Al-Azzawi 曾进行玉米及豌豆根尖的腺苷环化酶的组织化学定位。我们在腺苷环化酶组织化学染色反应中,也观察到在白菜花药毡绒层细胞有这种酶的反应活性。

外源 c-GMP 在适宜浓度下可以促进细胞分裂。作者等在番茄果肉悬浮细胞培养中曾观察到外源 c-GMP 有增加核分裂的趋势,其中以 0.5mg/l 效果为最好(出现二核、三核、四核、五核、六核现象)。

1982 年波兰科学家又进行了小麦的环核苷酸磷酸二酯酶的组织化学定位。其他科学家使用了 GCMS 方法无可争辩的从高等植物中提取出 c-AMP。看来使我们承认,细胞分裂和分化的调控物质在动、植物界存在统一性的时期是愈来愈临近了。

参 考 文 献

- [1] 张述祖等。1980。北京师大学报(自然科学版), 3—4: 131—136。
- [2] Rall, T. W., Sutherland, E. W. and Berth, J. 1957, *J. Biol. chem.* 224: 463.
- [3] Sutherland, E. W. and Rall, T. W., 1960: *Pharmacol. Rev.* 12: 265.
- [4] Burk, R. P.: 1968, *Nature (London)*, 210: 1272.
- [5] Amrhein, N., 1977, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 123.
- [6] Rohmsdof, H. J. and Gerisch, G., 1978: *Cell Differ.* 7: 249.
- [7] Mullens, J. A., 1978, *Differ.* 10: 171.
- [8] Coher, R. J., 1978, *Plant Sci. Lett.* 13: 315.
- [9] Hanabusa, 1981, *Plante medica.* 42: 380.
- [10] Johri, M. M., 1978, *Frontiers of Plant Tissue Cal.*: 27.
- [11] Brown, E. G., Jalal, A. N. et al., 1979, *Phylochem. (Oxf.)* 18: 9.
- [12] Haddox, M. K., Stephenson, J. H. and Goldberg, N. D., 1974, *Fed. proc.* 33: 522.
- [13] Banerji, S. and Jouri, M. M., 1978, *Proc. Cell Biol. Conf. Univ. of Delhi.*, Jan. 9—11 Abst. No. 52.
- [14] Rudolf, E., 1979, *Phytochem. (Oxf.)* 18: 15.
- [15] Mizuno, K., Komamine, A., 1978, *Botan. Mag. (Tokyo)* 91 (1025): 213.
- [16] Lance, E. S., Romeo, D. P., 1977, *Amer. J. Bot.* 64: 1170.
- [17] Wiedmaier, J., Kull, U., 1976, *Naturwissenschaften* 63: 147.
- [18] Al-Azzawi, M. J., Hall, J. L., 1976, *Plant Sci. Lett.* 6: 285.
- [19] M. Bartkiewicz. H. Sierakowska. 1982, *Planta.* 155: 204—211.

资料

会 讯

北京于一九八三年成立了组织培养专业分组,进行学术交流活动二次,现综合报道如下:学术交流以专题报告为主,其中何申介绍了1973年以来建立的动物和人类的细胞株,张鸿卿报告了“细胞培养的支原体的结构和检查”,李申德报告的“培养细胞转化的研究”,引起了与会者很大的兴趣。会上还报告了无血清的细

胞培养、人类基因图和单克隆抗体方面的工作。

大家一致认为,这种活动对北京的组织培养工作起了一定的推动作用,希望能继续坚持下去。计划今年以建立细胞株所需指标为题讨论有关的问题,以促进细胞培养工作的开展。

(徐新来供稿)