

·学科进展·

细胞融合 (Cytomixis) 研究的进展与展望

郑国铝 王新宇 聂秀菀 郭光沁

(兰州大学细胞生物化学研究室,兰州 730000)

[摘要] 简要介绍了细胞融合研究的历史,国内外研究进展,最近获得的一些突破性成果以及未来急需解决的问题。

[关键词] 花粉母细胞,细胞融合,次生胞间连丝,胞质通道,纤维素酶

花粉母细胞(PMCs)间染色质穿壁转移现象最早是由 Kornicke(1901)在春藏红花(*Crocus vernas*)的花粉母细胞中发现的,并认为这种现象可能是由固定液的作用引起的。在这以前不久, Mische(1901)在俯垂葱(*Allium nutans*)的表皮细胞中也看到这种现象,认为是由于制片时受损伤引起。在其后的20年间陆续有不少人在其他植物的PMCs中都看到这一现象,如 Gregory(1905)在香豌豆(*Lathyrus ornatus*), Rosenberg(1909)在还阳参(*Crepis*)和茅膏菜(*Drasera*), Nakao(1911)在黑麦(*Secale cereale*), Fraser(1914)在蚕豆(*Vicia faba*), Yasui(1921)在罂粟(*Papaver*)中均发现这一现象。他们也都认为是不正常现象^[1,2]。但也有不少人做了大量工作后认为是自发的、正常的现象,如 Digby(1909)在旋花百合(*Galtonia candicans*), (1912)在报春花(*Primula Kewensis*)和(1914)还阳参(*Crepis taraxacifolia*)中, West 和 Lechmere(1915)在百合(*Lilium candidum*)中, Gates(1911)在月见草(*Oenothera gigas*)中, Gates 和 Rees(1921)在莴苣(*Lactuca sativa*)中, Gates(1911)在月见草中称这一现象为 Cytomixis, 即细胞融合。他们在这些文章中对细胞融合的过程、起因及其后果作了比较详尽的描述。Gates 还认为这一现象对植物的遗传、生活史和染色体个体性有很重要的意义^[1,2]。

自1900年孟德尔遗传定律被3位科学家同时重新发现以来,到20年代这段时间正是遗传理论盛行的时候。这一理论认为基因是直线排列在染色体上,它的座位是固定不变的,而且这些座位还能从亲

代遗传给子代。这样看来,如果细胞融合是一种正常的活动,就和遗传理论有些抵触了。因此,当日本学者 Sinoto(1922)在蝴蝶花(*Iris japonica*)中观察到细胞融合现象后,也认为它不是自发的,而是由于处于特殊生理状态的细胞核,受一些外界机械损伤,或固定液的作用所致。因此,这种现象的出现是无足轻重的,对植物的遗传、生活史和染色体个体性没有多大重要性^[3]。他的这种观点因为符合于当时盛行的遗传理论,很容易被人们所接受,所以影响很大。在其后几十年间因经常被引用而引起争论。其中以美国威斯康星大学遗传系教授 Cooper 和他的研究生高津(Takats)之间的对立颇具代表性。Cooper 于1952年在美国《自然科学者》杂志上发表了题为“减数分裂开始时 DNA 从毡绒层向小孢子母细胞内转移”的论文,说明他在17种被子植物中观察到染色质样小球从毡绒层细胞的表面转移到小孢子母细胞中^[4]。文章发表后,他很不放心,随后要他的研究生重复了他的工作。研究结果,高津全盘否定了 Cooper 的意见。高津认为核外出现的染色质样小球是固定时和操作过程中引起的人工产物,既非来自毡绒层细胞,也非正常现象^[5]。他的结论代表了细胞融合非正常论者传统的看法。然而,细胞融合现象是自发的,它出现的时期一般是在 PMCs 减数分裂前期 I 偶线期与粗线期之间的凝线期。因此,在观察减数分裂过程时,人们经常会偶然地观察到这种现象。自50—90年代几十年间所发表的有关 Cytomixis 的论文中,有不少就是在偶然的情况下看到

国家自然科学基金资助项目。

本文于1999年4月19日收到。

的。一旦看到这种现象,他们就会查文献,结合当时各种具体的环境和条件,提出自己的看法,结果就出现了2种不同的意见:一部分人认为是正常现象,而另一部分人则认为认为是人工引起的臆象。就这样关于细胞融合的起因问题争论了近一个世纪,一直到现在,还没有取得共识。例如,最近 Falistocco 等人(1995)在观察鸭茅牧草细胞融合后提出这些现象的出现可能决定于遗传机理,而不是由偶然的或环境因素引起的。他还引用了我们1987年的观点,也认为细胞融合与植物物种的进化有关^[6]。可是 de Souza 等人^[7]则认为虽然在不计其数种植物的花粉母细胞内观察到了 Cytomixis,但究其起因迄今尚不清楚,它们在进化上的作用也仅是推测。由此可见,在国际上对细胞融合的研究,长期在起因问题上争论不休,其他方面没有多大进展。

在国内,细胞融合现象首次是由吴素萱教授于1955年报告的^[8]。随后娄成后先生也从原生质的连续性角度开展了这项工作^[9]。同年,郑国锴(1955)在百合花粉母细胞间也发现了这种现象^[10]。

我们一致认为这是一种自发的,正常的生理现象,并且都有实验证据。当时对这种新奇现象的研究,植物生理学界给予了普遍支持和鼓励,而在遗传学界,有不少人持怀疑态度,也有人认为是不正常现象。如有人认为体细胞中出现的核穿壁现象是机械损伤引起的;而另一位则称出现染色质穿壁的花粉母细胞将会退化消失,对植物的变异与进化没有作用,在国内也引起了一场争论。为此,我们又多次重复了高津的实验,得到的结论是:(1)花粉母细胞间染色质穿壁运动是同步的,并且有一定的时期和顺序,它是一种自发的,按一定顺序出现的连续过程;(2)在 PMC 发育的一定时期(凝线期),机械损伤虽然能使细胞融合的频率有所增加,但不是细胞融合出现的主要原因;(3)5种固定液(甲醛、纽科默、纳瓦兴、卡诺和弗累明)对细胞融合的影响是相似的,没有显著的差异。它们对细胞融合的作用不是促进,而是促退^[11]。对是否为退化现象,也作了大量研究,证明染色质穿壁后的花粉母细胞可一直发育到精子的形成(表1)^[12]。

表1 百合花粉母细胞、小孢子和生殖中细胞染色体数目变异及细胞融合的方式和频率分布

细胞融合的方式		染色体数目变异				
		染色体数目	中期 I	中期 II	小孢子	生殖细胞
细胞→细胞	次数 (%)		次数 (%)	次数 (%)	次数 (%)	次数 (%)
1.0→1.0	4 462 (88.6)	12	973 (88.21)	585 (90.56)	381 (86.40)	205 (87.98)
1.0→2.3	390 (7.74)	8—11	92 (8.34)	47 (7.27)	42 (9.52)	20 (8.59)
2.3→1.0	184 (3.66)	13—15	38 (3.45)	14 (2.17)	18 (4.08)	8 (3.43)
总数	536 (100.0)		1 103 (100.00)	646 (100.00)	441 (100.00)	233 (100.00)
X ² -验证		df = 3.1	0.673	4.392	2.269	0.257
P			0.80—0.70	0.20—0.10	0.50—0.30	0.90—0.80

我们在肯定了细胞融合是正常的自发的生理现象之后,又发现核液的运动和收缩蛋白与染色质穿壁运动有密切的关系。我们观察到花粉母细胞在染色质穿壁运动时,细胞因从外界吸收大量水分,使凝线期细胞核的体积大于细线期核的体积。这主要是靠特殊的代谢,即呼吸作用所产生的能量进行的主动吸收。主动吸收与呼吸作用之间的关系,早为许多科学家所证实。为此,我们又研究了全氧和全氮条件、呼吸抑制剂、原生质川流运动促进剂和抑制剂对染色质穿壁运动的影响,提出了一个工作假说:即“核液的川流运动对花粉母细胞间染色质穿壁运动起着直接的推动作用,而原生质中收缩蛋白的主动伸缩运动却是染色质穿壁运动的主要动力,而原生质川流运动和染色质穿壁运动所需要的能源是有氧呼吸后所生成的能,通过 ATP 释放的高能磷酸键

(~P)的形式供给^[13]”。其后我们对这个假说进行了验证,在以百合、蚕豆、黑麦和洋葱为材料的实验中获得了一些直接或间接证据^[14],初步证明这个假说是可信的。在此基础上,对于物种的变异和进化我们也提出了看法^[12,14]。

最近,我们在研究细胞融合道形成机理方面又获得了突破性的成果。细胞融合现象的出现,其中一个关键条件是细胞壁上必须有次生胞间连丝和细胞融合道的形成(两者的区别在于前者的直径小于100 nm,而后者则大于100 nm)。只有细胞融合道出现后,细胞器和核物质才能在细胞间转移。但次生胞间连丝和细胞融合道是如何形成的?是几十年来一直没有解决的问题。1976年在第一届国际胞间连丝会议上, Jones 曾提出次生胞间连丝形成机理的假说,认为胞间连丝可能是由细胞自身合成的

一些水解酶,如纤维素酶、半纤维素酶类降解细胞壁后形成的。但同时又提出了这种酶来自何处,它们是如何到达胞间连丝的问题^[15]。Robarts 等人在一篇有关胞间连丝的综述中特别强调:“到目前为止,仍未能阐明胞间连丝形成所需酶出现的时间和所在的部位^[16]。在其后的几篇综述中也未提及有人做过这方面的工作,仅引用了我们 1987 年发表的一篇文章^[17]。

1984 年我们曾对百合花粉母细胞胞间连丝和胞质通道出现的规律作了电镜观察,发现它们在细线期开始出现,偶线期数量增加,凝线期直径扩大,到粗线期又逐渐减少并堵塞^[18]。随后我们又用电镜铅沉淀法对酸性磷酸酶活性作了细胞化学定位,结果表明次生胞间连丝和胞质通道形成所需的酶可能是由“类溶酶体”小泡或内质网直接分泌的^[19]。1988 年以来,我们继续进行这项研究,目的是进一步阐明这些“类溶酶体”小泡中所含酶的性质,同时确定这些酶出现的时间和部位,以及它们与次生胞间连丝和细胞融合道形成的关系。可惜的是,由于一种化学试剂(羧甲基纤维素)质量不佳,白白浪费了我们 5 年时间。几种国产羧甲基纤维素钠都不能用,做不出结果来。不得已只好从国外订购了这种试剂,才顺利地完成了这项实验。

这项的实验结果表明:我们过去所谓的“类溶酶体”小泡,实际上是由内质网(ER)潴泡膨大出芽后分离而成的 ER-小泡,其中贮存的酶是纤维素酶,它们是由粗面内质网上的核糖体合成后贮存于光面内质网潴泡中。随后移动,向细胞壁靠拢,经胞吐作用,将其中的纤维素酶释放到细胞壁,并使细胞壁局部降解形成胞间连丝和细胞融合道。这样,就解答了几十年来长期悬而未决的问题。细胞融合道一旦形成,这部分组织就成为共质体结构域(Symplastic domain),对植物发育生物学有重要意义。在体细胞中可能会影响植物的生长和分化,而在生殖细胞中对植物后代的遗传和进化也会有很大作用。

上述结果已写成论文(题为“百合花粉母细胞减数分裂早前期 I 中纤维素酶活性的细胞化学定位及其与次生胞间连丝形成的关系”)已在一国际细胞生物学杂志(*Protoplasma*)上发表^[20],并将有关的照片刊登在该杂志的封面上。

虽然,我们的工作已取得了一些成果,但关于起源问题,在国际上尚未取得共识,如果这个问题不解决,其他一些研究成果就没有了基础。早在 30 年代,Buller(1931)在真菌担子菌的核穿壁报告中,就

提出担子菌中的核穿壁是由遗传决定的^[21]。在高等植物中,Omara 也提出细胞融合是由遗传控制的^[22]。最近也有人认为它的起因是遗传机理而不是偶然的环境条件引起的^[6]。但是,是什么基因直接决定和影响这一现象目前仍属未知。最近我们又发现在细胞融合过程中细胞骨架网络和染色体骨架也发现相应的重排^[23]。同时又观察到,染色质穿壁转移到相邻细胞后形成的染色质小球周围被一层膜包围,膜与染色质之间有一个空白区,其中充满核骨架纤维,而在原来的染色质集缩成团的核中也留有很大的空白区,其中同样也有 F-actin 纤维网络^[24]。这样的空白区早在本世纪初就有人观察到过^[1,2],不过因当时电镜尚未出现,其中有网络结构无法看到罢了。

为了阐明收缩蛋白与细胞融合之间的关系,1984 年我们用细胞松弛素 B(cytochalasin, CB)(一种 F-actin 活动专一性抑制剂)处理正在进行染色质穿壁运动的离体花蕾。结果表明,以 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CB 处理 40 h 后,染色质穿壁的频率,由原来(对照)的 67.4% 下降到 12.9%。并且穿壁频率明显地随着 CB 浓度的增加和处理时间的延长而递减。而花粉母细胞中核的位置也不同,经 CB 处理的核仍处于细胞的中央,不出现典型的凝线期^[25]。由此可见,细胞骨架与核骨架中的收缩蛋白,在染色质穿壁运动中起重要的作用。这些研究也说明细胞融合现象的发生可能与编码这种收缩蛋白质的基因的控制有关。为此,我们拟对细胞融合的遗传机理进行研究,包括相关基因的鉴定、克隆和分析。本研究如能达到预期目的,将有助于解决国际上长期争论的起因问题。

参 考 文 献

- [1] Gates R R. Pollen formation in *Oenothera gigas*. *Ann. Bot.*, 1911, **25**: 909—940.
- [2] Gates R R, Rees E M. A cytological study of pollen development in *Lactuca*. *Ann. Bot.*, 1921, **35**:365—398.
- [3] Sinoto Y. On the extrusion of the nuclear substance in *Iris japonica* Thunb. *Tokyo Bot. Mag.*, 1922, **36**:99—110.
- [4] Cooper D C. The transfer of deoxyribonucleic acid from the tapetum to the microsporocytes at the onset of meiosis. *Amer. Naturalist.*, 1952, **36**:219—229.
- [5] Takats S T. Chromatin extrusion and DNA transfer during microsporogenesis. *Chromosoma*, 1959, **10**:430—453.
- [6] Falistocco E N, Tosti N, Falcinelli M. Cytomixis in pollen mother cell of diploid *Dactylis*, one of origin of 2n gametes. *Journal of Heredity*, 1995, **86**:448—453.

- [7] de Souza A M, Pagliarini M S. Cytomixis in *Brassica napus* var *oleifera* and *Brassica campestris* var *oleifera*. *Cytologia*, 1997, **62**:25—29.
- [8] 吴素萱. 细胞核穿壁运动的初步报告. *植物学报*, 1955, **4**(2): 91—100.
- [9] 娄成后. 植物体中原生质的连续性. *植物学报*, 1955, **4**(3):183—222.
- [10] 郑国锷. 百合花粉母细胞中染色质胞间转移及新核形成的过程. *植物学报*, 1955, **4**(3):223—238.
- [11] 郑国锷, 聂秀苑, 杨庆兰等. 小孢子发生过程中花粉母细胞间染色质穿壁转移现象与机械损伤和固定液作用的关系. *植物学报*, 1964, **12**(4): 289—304.
- [12] Zheng G C, Yang Q L, Zheng Y R. The relationship between chromosome mutation and karyotype evolution in Lily. *Caryologia*, 1987, **40**(3):243—259.
- [13] 郑国锷, 聂秀苑, 杨庆兰等. 花粉母细胞中染色质穿壁运动机理的探讨. *植物学报*, 1973, **15**(1):53—63.
- [14] 郑国锷. 从植物进化来看“细胞融合”与染色体畸变. 纪念达尔文逝世一百周年学术讨论会论文选编, 北京: 科学出版社, 1983, 66—67.
- [15] Jones M G K. The origin and development of plasmodesmata In: *Inter-cellular Communication in Plants: Studies on Plasmodesmata*, B E S. eds. Gunning, Robards A W. Berlin: Springer, 1976, 81—105.
- [16] Robards A W, Lucas W J. Plasmodesmata. *Ann. Rev. plant physiol and molecular Biology*, 1990, **41**: 369—420.
- [17] Lucas W J, Ding B, Van Der Shoot C. Plasmodesmata and the supra-cellular nature of plants. *New Phytologist*, 1993, **125**:435—476.
- [18] 聂秀苑, 王以秀, 郑国锷. 百合花粉母细胞间胞间连丝通道的透射和扫描电镜观察. *植物学报*, 1984, **26**(1): 34—37.
- [19] 郑国锷, 聂秀苑, 陈尚文. 花粉母细胞中染色质穿壁前次生胞间连丝形成的研究. *实验生物学报*, 1987, **20**(1):1—5.
- [20] Wang X Y, Guo G Q, Nie X W et al. Cytochemical localization of cellulase activity in pollen mother cells of David lily during meiotic prophase and its of relation to secondary formation of plasmodesmata. *Protoplasma*, 1998, **204**(3—4): 128—138.
- [21] Buller A H R. Researches on Eungi IV. 1931, 217, 234—241. London: Longmans, Green and CO.
- [22] Omara M K. Cytomixis in *Lolium perenne*. *Chromosoma*, 1976, **55**: 267—271.
- [23] 徐涛, 张晓红, 聂秀苑等. 百合花粉母细胞核骨架的超微结构观察. *植物学报*, 1997, **39**(1):11—15.
- [24] 徐涛, 聂秀苑, 郑国锷. 高等植物花粉母细胞中胞质通道、胞质骨架及核骨架与染色质胞间运动的关系. *中国学术期刊文摘科技快报*, 1996, **7**:111—112.
- [25] 王以秀, 聂秀苑, 郑国锷. 胞松素 B 对百合花粉母细胞中染色质穿壁的影响. *植物学通报*, 1984, **2**(4):39—41.

PROGRESSES IN AND PROSPECT OF CYTOMIXIS STUDIES

Zheng Guochang Wang Xinyu Nie Xiuwan Guo Guangqin

(Laboratory of Cell Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract This paper makes a brief introduction to the history, international advancements, important breakthroughs and problems to be urgently resolved on cytomixis investigation.

Key word pollen mother cell, cytomixis, secondary plasmodesma, cytoplasmic channel, cellulase.

·资料·信息·

1999 年度国家自然科学基金项目资助情况

1999 年度国家自然科学基金共批准面上项目 3 496 项, 总经费 47 163.33 万元; 重点项目 95 项, 总经费 8 258 万元; 高技术新概念新构思探索项目 141 项, 总经费 1 918 万元; 高技术新概念新构思探索重点项目 6 项, 总经费 440 万元。同时批准了 2000 年 58 项重点项目的立项计划。

1999 年度科学基金面上项目资助率为 16.6%, 低于 1998 年的 19.0%, 1999 年申请数量比 1998 年增加了 2 000 多项, 面上申请项目达 20 925 项。平均资助强度比 1998 年增加了 9.8%, 由 1998 年的 12.3 万元增加到 13.5 万元。

(宣传处 沈林福 供稿)