

文章编号: 1007-4627(2008)03-0282-05

离子注入对黑松花粉粒和花粉管内 骨架系统的损伤效应*

黄群策¹, 梁秋霞¹, 李国平²

(1 郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052;

2 莆田学院环境与生命科学系, 福建 莆田 351100)

摘要:以黑松花粉粒和花粉管为试验材料,研究了离子注入对细胞骨架系统的损伤效应。研究表明,离子注入会不同程度地破坏花粉管内微管网络的完整性,花粉管形态的异常状态与其微管骨架结构的异常状态密切相关。离子注入对黑松花粉管内的微管骨架系统的正常结构有明显的效应,这种效应的明显程度与离子注入剂量有一定的相关性,即随着离子注入剂量的增加,微管骨架系统受到破坏的程度更加明显。离子注入对黑松花粉管内微丝骨架系统的分布状态有明显的影响,其程度也与离子注入剂量的大小存在一定的相关性。

关键词:黑松;花粉管;细胞骨架系统;离子注入;损伤效应

中图分类号: Q691 **文献标识码:** A

1 引言

细胞骨架(cytoskeleton)是指真核细胞中的蛋白质纤维网架体系,其中包括微管、微丝和中间纤维等。它们不仅在维持细胞形态、保持细胞内部结构的有序性方面起着重要的作用,而且还与细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递、细胞分裂和分化、基因表达等生命活动密切相关。电离辐射对有机体的组织和细胞有比较明显的生物学效应。由于细胞骨架的特异性,研究电离辐射对细胞骨架的作用将有助于揭示辐射生物学效应的机制。

在离子束生物工程研究领域,重离子与生物体的相互作用涉及到相当复杂的生物学效应。有关离子注入后的生物学效应研究,主要侧重于对表现型效应和遗传效应等方面的统计分析,有关离子束注入与细胞骨架系统的相互作用方面的研究资料至今仍然不多^[1-4]。顾月华等^[5]研究了离子注入绿豆种子后,其根尖细胞有丝分裂中微管骨架的异常变化。种子受辐照后,需要一定的时间才能萌发,其根尖细胞结构的变化属于离子注入后所产生的间接生物学效应。

为了观察离子注入对细胞骨架的直接损伤效应,迫切需要一个合适的实验系统。本项研究以裸子植物的花粉粒和花粉管内的骨架系统作为研究对象,研究离子注入对骨架系统的直接损伤作用。通过观察离子注入后对黑松花粉粒、花粉管内微管和微丝骨架的效应,旨在研究离子注入对细胞骨架系统的直接作用效应,探讨离子注入的细胞学效应与细胞骨架系统的关系。

2 材料与方法

黑松(*Pinus thunbergii* Parl.),别名日本黑松(Japanese Black Pine),为松科松属常绿乔木,原产于日本和朝鲜,我国江苏、浙江、安徽和河南等地均有栽培。植物学的研究结果已经证实,在黑松的生殖发育过程中花粉粒是雄配子体,通过其萌发孔可以产生出花粉管,后者的主要功能就是将雄配子送入胚囊内,以便完成受精作用。在2005年4月上旬黑松花粉散发期间,在河南郑州市滨河公园内人工栽培的成熟黑松树上采集刚开始散粉的雄球

* 收稿日期: 2008-01-12; 修改日期: 2008-07-23

* 基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B)

作者简介: 黄群策(1958-),男(汉族),广西全州人,教授,博士生导师,从事离子束生物技术的研究;

E-mail: quncehuang@zzu.edu.cn

花，将其置于室内让其自然干燥 24 h，以便让花粉粒可以从雄球花中散出。随后，将收集到的花粉粒置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。

离子注入试验是在本实验室进口的俄罗斯产 TITAN 离子注入机上进行的。在离子注入前，将待处理的花粉粒均匀地撒布在涂有少量胶水的培养皿表面，将其放入真空小靶室内，试验材料的表面与离子束发射方向垂直。注入的离子为 N^+ 离子，能量为 30 keV，设置 4 种离子剂量，即 0×10^{15} (对照组)， 5×10^{15} ， 7×10^{15} 和 9×10^{15} ions/cm²。离子注入机的工作条件采用正常的参数，即真空度为 5×10^{-2} Pa、采用脉冲注入(频率 25 Hz)方式、束流为 200 mA。

试验中对微管的免疫荧光标记，参考了 Lazzaro 等^[6]在观察 *Picea abies* 花粉粒和花粉管微管骨架时所采用的方法。通过过滤方法收集花粉管，利用 4% 多聚甲醛[PEM 缓冲液配制，pH 为 7.0 (PEM: 50 mmol/l PIPES, 1 mmol/l EGTA, 1 mmol/l MgSO₄)]将其固定 1 h，经 PEM 缓冲液(pH 为 5.0)清洗 3 次后，再用 1% 纤维素酶(Sigma C1184)和 1% 果胶酶(Sigma P2401)(PEM 缓冲液配制，pH 为 5.0)在 35 °C 条件下对花粉管材料酶解 1 h。经过相应缓冲液清洗后，用封闭缓冲液(PBS 缓冲液，含 1% 牛血清白蛋白和 1% Triton X, pH 为 7.5)处理 3 次，然后在 20 °C 条件下利用单克隆 α -微管蛋白(α -tubulin)抗体(北京中杉产品，封闭缓冲液稀释 1:100)处理 16 h，再在 37 °C 条件下利用 FITC 标记的抗小鼠抗体 IgG(北京中杉，封闭缓冲液稀释 1:100)处理 1 h。经过 PBS 缓冲液清洗，用自配抗荧光衰退剂封片。制片过程设置 2 个对照。最后，在 Leica TCS-SP2 型激光扫描共聚焦显微镜(激发波长为 488 nm, FITC 滤镜组合)下对制片材料进行观察鉴定。

在试验中对花粉管微丝进行荧光标记并对其形态上的特异性进行观察鉴定。花粉管经过固定处理的荧光标记方法。通过过滤方法收集花粉管，利用新配制的 4% 多聚甲醛(微丝稳定缓冲液 ASB 配制，ASB 的配方为 100 mM Pipes, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ 和 75 mM KCl, pH 为 6.8)固定 30 min，以相应的缓冲液 ASB 冲洗材料 3 次，每次 10 min，接着利用 0.33 μM 罗丹明-鬼笔碱(Molecular Probes, 美国)(ASB 配制，含 0.1% Triton X-100)

在黑暗条件下染色 1 h。接着利用自配抗荧光衰退剂封片。在 Leica TCS-SP2 型激光扫描共聚焦显微镜(激发波长为 543 nm, TRITC 滤镜组合)下对制片材料进行观察鉴定。

3 结果与分析

3.1 离子注入对黑松花粉管内微管骨架的效应

利用免疫荧光标记法和激光扫描共聚焦显微技术对试验材料的观察鉴定结果表现出一定的特异性。在未经离子注入处理的对照花粉管内，存在着一个完整而密集的微管网络，在花粉粒中微管呈斜向分布或横向分布，在生殖细胞内也具有明显的微管系统，且与花粉管内的微管网络相联系。在花粉粒内的微管通过萌发孔进入伸长的花粉管内，在伸长的花粉管内微管主要呈现出轴向排列状态，微管束有分枝。在分枝之间相连并构成微管网络，此微管网络一直延伸至花粉管顶端，且在花粉管顶端区域的微管网络荧光特别明亮。经过对花粉管顶端区域的微管进行系列扫描，认为在顶端区域荧光特别明亮的部分系为分枝更细和更密集的微管网络。

对离子注入处理组的花粉管进行观察鉴定的结果表明，经过离子注入后会不同程度地破坏花粉管内微管网络的完整性，花粉管形态异常状态与其微管骨架结构的异常状态密切相关。当离子注入剂量为 5×10^{15} ions/cm² 时，其花粉管的形态表现出一定的特异性，其相应的微管结构图像也很特殊(图 1)。可以看出，异常花粉管内的微管网络与正常的

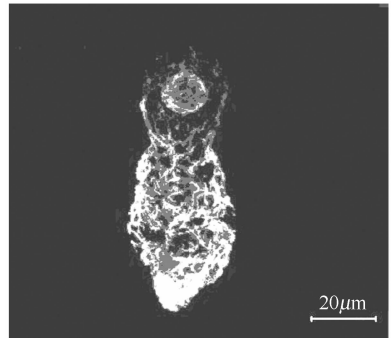


图 1 黑松的花粉粒经过离子注入后，其花粉管的形态表现出一定的特异性

微管网络有比较大的差异，特别是花粉管顶端部分不具有正常的更亮和更浓密的微管网络。当离子注入剂量为 7×10^{15} ions/cm² 时，花粉管内的微管呈

现出聚集状态,没有呈现出长轴向分布的状态,这说明微管的网络结构受到了破坏,其顶端表现出肿胀现象(图 2)。当离子注入剂量为 7×10^{15} ions/cm² 时,有 19.29% 的试验材料发生花粉管顶端肿胀现象,花粉管顶端肿胀现象与其顶端部位的微管网络破坏呈一定的正相关性,其异常微管结构特别明显。当离子注入剂量为 9×10^{15} ions/cm² 时,花粉管的伸长受到显著抑制,花粉管比较短,其内部的微管蛋白总量比较少,微管骨架系统受到的破坏更加严重。由此可见,离子注入对黑松花粉管内的微管骨架系统的正常结构有明显的效应,这种效应的明显程度与离子注入剂量有一定的相关性,即随着离子注入剂量的增加,微管骨架系统受到破坏的程度更加明显。

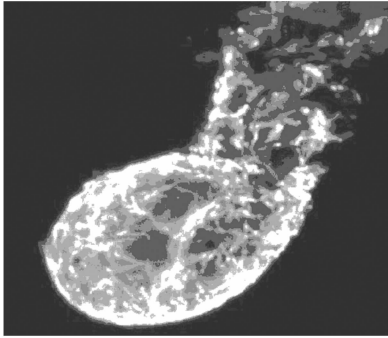


图 2 黑松的花粉粒经过离子注入后,其花粉管顶端表现出肿胀现象

3.2 离子注入对黑松花粉管内微丝骨架的效应

观察结果表明,在未经过离子注入的对照花粉管内具有完整的微丝网络,微丝束自花粉粒内一直延伸致花粉管顶端;微丝束在花粉管内主要沿长轴方向分布并呈现出分枝状态;在花粉管顶端显现出比较强的微丝荧光。通过对花粉管顶端进行系列扫描后所获得的鉴定结果表明,在花粉管顶端部分微丝束不断分枝并构成浓密的微丝网,在花粉粒内的细胞核和花粉管内的生殖细胞表面均有微丝分布。

经过离子注入后,试验材料的微丝网络受到不同程度的破坏(见图 3),并且,离子注入对花粉管内微丝系统的破坏与离子注入对花粉管生长的抑制作用密切相关。观察鉴定结果表明,对照材料的花粉管长度为 $(129.16 \pm 4.53) \mu\text{m}$,经过 3 种离子注入剂量 (5×10^{15} , 7×10^{15} 和 9×10^{15} ions/cm²) 处理的材料,其花粉管长度分别为 (74.6 ± 4.87) ,

(67.86 ± 4.17) 和 $(46.62 \pm 3.30) \mu\text{m}$ 。对试验数据进行 t 检验的结果表明,各个处理组的花粉管长度显著地短于对照组的花粉管长度 ($P < 0.05$)。在各个处理组的花粉管内,微丝网络表现出一定的特异性,其异常类型主要有 3 种。其一是在花粉管顶端部位丧失强的荧光,即花粉管顶端不具有浓密的微丝网络。其二是在花粉管内微丝束聚集成团,堆积于花粉管的中部,而在其余部分仅有一些短束。其三是在花粉管内微丝蛋白的总量显著减少,在花粉管内存在着一些短的微丝束。由此可见,离子注入对黑松花粉管微丝骨架系统的分布状态有明显的影响,这种影响的程度与离子注入剂量的大小存在着一定的相关性。

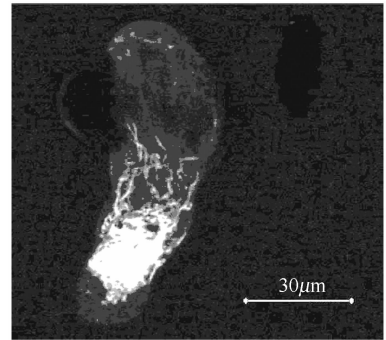


图 3 黑松的花粉粒经过离子注入后,其花粉管顶端的微丝网络丧失

4 讨论

前人的研究结果表明,荷能离子注入生物体后所表现的生物学效应具有局部性、双重性和不易修复性。在具体的试验操作过程中,荷能离子束的注入射程具有可控性、集束性和方向性,在损伤程度比较轻的情况下可以获得比较高的突变率和比较宽的突变谱^[7-9]。然而,前人的研究主要以植物体作为研究材料展开探索性研究,而利用植物单细胞作为试验材料研究离子注入所导致的生物学效应的公开文献并不多见。

我们以黑松花粉粒和花粉管内的细胞骨架系统作为研究材料,研究了离子注入对骨架系统的直接损伤效应。研究结果表明,在黑松正常的花粉粒和花粉管内具有完整的微管和微丝骨架网络,微管和微丝的分布样式基本相同,它们自花粉粒内一直延伸至花粉管顶端,而且,花粉管顶端的微管和微丝

特别浓密。黑松的生殖细胞具有独立的细胞骨架系统,管细胞核表面也具有微管骨架和微丝骨架。黑松花粉粒和花粉管内的细胞骨架系统的结构明显地有别于被子植物的细胞骨架系统的结构。离子注入花粉粒后,在花粉管内细胞骨架系统的结构会受到不同程度的破坏。在花粉管内微管骨架的破坏与离子注入所引起的花粉管形态异常(特别是花粉管顶端肿胀现象)有一定的相关性。由此认为,离子注入引起花粉管(特别是其顶端)微管骨架遭到破坏,从而诱发花粉管形态发生异常,特别是花粉管顶端出现肿胀现象,此现象与秋水仙素所诱发的花粉管形态显著异常现象很相似。花粉管内微丝骨架的破坏与离子注入后抑制花粉管生长密切相关,离子注入引起花粉管内微丝骨架结构的破坏,从而导致花粉管生长迟缓。

我们认为,离子注入对花粉管内骨架系统的破坏效应的两个可能原因值得注意。其一是离子注入引起花粉粒内自由基的积累,自由基可以攻击花粉管微管蛋白和微丝蛋白,从而破坏花粉管内的细胞骨架系统。我们过去的研究表明,在花粉粒内自由基含量随离子注入剂量的提高而增加,这与花粉管内细胞骨架系统结构的损伤程度随注入离子剂量的增加而提高的试验结果相吻合^[10]。其二是离子注入可能会引起花粉管内细胞核的相关基因发生特异性表达。在花粉管伸长过程中,离子注入可能会导致有关的基因发生异常表达,从而会破坏花粉管内的细胞骨架系统。在花粉管生长过程中,微管蛋白或微丝蛋白的合成作用与解聚作用通常会处于一种动态变化状态,花粉管内细胞骨架的维持还与许多相关的微管蛋白或微丝蛋白有密切关系。如果离子注入导致任何相关的微管蛋白或微丝蛋白基因,或相关的微管蛋白或微丝蛋白基因发生突变,都会引起花粉管内(特别是花粉管顶端)骨架网络失去其原有的完整性,从而导致花粉管形态发生异常变化或阻滞花粉管伸长。

本试验的研究结果表明,离子注入会导致花粉管内微管和微丝骨架系统的结构遭到破坏。微管骨

架的损伤与离子注入诱发的花粉管形态异常有关,微丝骨架的损伤与离子注入抑制花粉管生长有关。鉴于细胞骨架系统在植物生长发育中的重要作用,我们认为,细胞骨架系统是注入离子攻击的关键“靶”,细胞骨架系统损伤与许多后续的生物效应有关;离子注入对细胞骨架系统的破坏是离子注入诱发细胞损伤效应的重要机制之一。

参考文献(References):

- [1] Yu Zengliang. Introduction to Ion Beam Biotechnology. New York, USA: Springer Science Business Media, Inc, 2006, 110.
- [2] Huang Qunce. Nuclear Physics Review, 2007, **24**(1): 59 (in Chinese).
(黄群策. 原子核物理评论, 2007, **24**(1): 59.)
- [3] Huang Qunce, Qin Guangyong. Journal of Zhengzhou University, 2003, **35**(4): 31 (in Chinese).
(黄群策, 秦广雍. 郑州大学学报, 2003, **35**(4): 31.)
- [4] Huang Qunce. Journal of Zhengzhou University, 2003, **35**(4): 31 (in Chinese).
(黄群策. 郑州大学学报, 2003, **35**(4): 31.)
- [5] Gu Yuehua. Nuclear Techniques, 2000, **23**(8): 587 (in Chinese).
(顾月华. 核技术, 2000, **23**(8): 587.)
- [6] Lazzaro M D, Donohue J M, Soodavar F M. Protoplasma, 2003, **220**: 201.
- [7] Li Xingling, Wei Zengquan, Li Weijian, *et al.* Nuclear Physics Review, 2001, **18**(2): 125 (in Chinese).
(李兴林, 卫增泉, 李文建等. 原子核物理评论, 2001, **18**(2): 125.)
- [8] Zhou Guangming, Li Yunjian, Wang Jufang, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2001, **19**(4): 289 (in Chinese).
(周光明, 李云建, 王菊芳等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2001, **19**(4): 289.)
- [9] Wei Zengquan, Xie Hongmei, Liang Jianping, *et al.* Nuclear Physics Review, 2003, **20**(1): 38 (in Chinese).
(卫增泉, 颜红梅, 梁剑平等. 原子核物理评论, 2003, **20**(1): 38.)
- [10] Li Guoping, Huang Qunce, Yang Lusheng, *et al.* Plasma Science & Technology, 2006, **8**(5): 618.

Effects on Cytoskeleton System in Pollen Tube of *Pinus thunbergii* Induced by Ion Beam Implantation*

HUANG Qun-ce^{1, 1)}, LIANG Qiu-xia¹, LI Guo-Pin²

(1 *Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;*

2 Department of Environment and Life Science, Putian University, Putian 351100, Fujian, China)

Abstract: The damage of the cytoskeleton system in the pollen and the pollen tube of *Pinus thunbergii* induced by ion beam implantation were researched. The results showed that the disorganization of the microtubules in the pollen tube was produced by N^+ implantation. The abnormal states of the pollen tube in morphology were very correlative with the abnormality of the cytoskeleton system. N^+ implantation was responsible for morphological abnormalities in the pollen tubes. There was a distinct correlation between the damage effects and the ion implantation dose. The add of dose caused more obvious damage effects. Furthermore, the state of the cytoskeleton system in the pollen tube was influenced by the ion implantation. The impact grade depended also on the ion implantation dose.

Key words: *Pinus thunbergii*; pollen tube; cytoskeleton system; ion implantation; damage effect

* Received date: 2 Jan. 2008; Revised date: 23 Jul. 2008

* Foundation item: National Key Projects of China (2001BA302B)

1) E-mail: quncehuang@zzu.edu.cn