

DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-3142. 2013. 05. 016

陈慧泽, 韩榕. 增强 UV-B 辐射对小麦叶肉细胞核内 F-actin 的影响 [J]. 广西植物, 2013, 33 (5): 674-678

Chen HZ, Han R. Influence of enhanced UV-B radiation on F-actin of wheat mesophyll nucleus [J]. Guihaia, 2013, 33 (5): 674-678

增强 UV-B 辐射对小麦叶肉细胞核内 F-actin 的影响

陈慧泽, 韩榕*

(山西师范大学 生命科学学院, 山西 临汾 041004)

摘要: 以增强紫外线 B (UV-B) 处理的小麦幼苗叶肉细胞核为材料, 以异硫氰酸荧光素标记鬼笔环肽 (FITC-Ph) 荧光标记后, 利用流式细胞仪以及激光共聚焦显微镜, 对核内肌动蛋白丝 (F-actin) 进行研究。结果表明: 小麦细胞核内确实存在 F-actin; 以 FITC-Ph 标记后用流式细胞仪检测显示, 以 $10.08 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ 增强的 UV-B 处理后的小麦叶片细胞核内 F-actin 的含量升高; 激光共聚焦技术显示细胞核内 F-actin 的分布, 发现小麦叶肉细胞核核仁处 F-actin 含量较高。推测可能是增强 UV-B 辐射导致细胞质内 F-actin 骨架断裂进入细胞核。究其具体作用还待进一步研究, 该研究推测其与“分束分裂”有关。

关键词: 增强 UV-B; 小麦; 原生质体; 细胞核内 F-actin;

中图分类号: Q942. 4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142 (2013) 05-0674-05

Influence of enhanced UV-B radiation on F-actin of wheat mesophyll nucleus

CHEN Hui-Ze, HAN Rong*

(College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China)

Abstract: Nuclei which were treated after enhanced UV-B radiation were taken as materials in this research. The nucleus actin of wheat mesophyll was researched by fluorescent with FITC-ph and flow cytometry. The results showed that F-actin truly existed in the wheat mesophyll nucleus, which increased in its content after treated with the enhanced UV-B radiation. The FITC-ph fluorescent labeling displayed that the distribution and the content of the nucleus F-actin. We found that F-actin in the nucleolar was higher than the other areas in the wheat mesophyll nucleus. We speculated these were closely with “partition-bundle division”.

Key words: enhanced UV-B radiation; wheat; protoplast; nucleus F-actin

大气臭氧层减薄造成太阳光中到达地面的 UV-B (280~320 nm) 辐射的增强。增强的 UV-B 辐射直接影响生物的生活和生存, 导致许多动植物在形态结构、生理代谢、遗传特性和生长周期等方面发生改变, 进而对人类构成威胁 (韩榕, 2002)。一些理化因子能引起植物染色体畸变和细胞分裂的异常。王晶等 (2009) 研究表明, UV-B 辐射延缓了拟南芥根尖细胞 G1/S 期的转变。韩榕等

(2002) 在细胞水平的研究中, 首次发现增强 UV-B 辐射会引起细胞发生异常有丝分裂现象, 并将其称为“两极分束分裂”。Lenart *et al.* (2005) 研究表明, 细胞核内的肌动蛋白丝涉及染色体的凝集及细胞分裂过程。Koszul *et al.* (2008) 的研究也表明了细胞核内肌动蛋白参与了细胞周期的活动。细胞核内染色体的集缩包装、DNA 转录成 RNA 和 RNA 向细胞质的运输等生命过程可能都需要收

收稿日期: 2012-11-05 修回日期: 2013-01-27

基金项目: 国家自然科学基金 (30671061); 山西省自然科学基金 (200811059)

作者简介: 陈慧泽 (1986-), 男, 山西临汾人, 在读博士, 主要从事于植物细胞骨架方面的研究, (E-mail) michael3m@163.com。

* 通讯作者: 韩榕, 博士, 教授, 主要从事于环境与植物的研究, (E-mail) hanrong@dns.sxnu.edu.cn。

缩蛋白的参加。人们推测肌动蛋白在细胞核中的存在是起着马达分子的作用, 参与染色体的集缩包装和 RNA 的转录和运输 (金萍, 2001)。

近年来, 许多研究者相继报道肌动蛋白是细胞核骨架的一种重要的组成成分 (李璟等, 2001; 王华等, 2001), Nickola *et al.* (1997) 利用免疫胶体金技术和放射免疫检测技术观察到核内存在肌动蛋白, 而且核内肌动蛋白与核骨架 DNA 紧密结合。Kosta & Umberto (1993) 利用胶体金技术结合共聚焦显微镜观察, 发现在 CD-1 鼠背根神经节的神元元和 PC12 细胞核中含有肌动蛋白。在整个核质中核肌动蛋白大量聚集在核仁外周, 通过免疫荧光技术可见在核仁周边聚集的是 F-actin。另有研究表明 snRNP 与肌动蛋白间的关系比未分化细胞中的更为紧密。他们推测核内肌动蛋白能够捕获新转录的 RNA, 参与新转录的 RNA 的转运。同时, 作者认为 snRNP 与核内肌动蛋白共同参与新转录的 RNA 的转运, 两者的关系是一个动态变化的过程 (陈婷等, 2001)。这些研究结果都表明了核内肌动蛋白参与了细胞一系列的活动。

本研究以小麦叶肉细胞原生质体中分离的细胞核为材料, 通过研究正常对照组和增强 UV-B 辐射处理组细胞核内 F-actin 的含量及荧光分布的变化, 为进一步揭示“分束分裂”现象, 阐明细胞分裂的生物学机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

晋麦 8 号 (*Triticum aestivum*), 由山西省农科院小麦研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 种子的萌发 选取籽粒饱满, 大小均一的小麦种子, 5% 次氯酸钠消毒 30 min, 清水漂洗, 培养于盛有湿滤纸的培养皿内, 25 °C 培养, 每皿 50 粒, 每组 3 次重复。

1.2.2 处理设置 实验共设对照 (CK) 和 UV-B (B) 两组处理。处理程序见表 1。

1.2.3 UV-B 辐射处理 UV-B 发生用 UV-B 灯 (南京华强), 将其垂直悬于培养皿的上方, 通过调整 UV-B 灯与植物培养皿之间的距离来控制并同时测量 UV-B 辐射的强度。剂量采用 $10.08 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$, 相当于臭氧下降 20%、UV-B 增强 40% 的强度 (RAF=2.0)。

表 1 各处理组的设置及处理程序
Table 1 Establishment and treatment procedure of different groups

处理组 Treatment	光照 (h) Light	增强 UV-B 辐射 (h) Enhanced UV-B radiation	暗培养 (h) Dark culture
CK	8	—	16
B	8	8	16

1.2.4 小麦叶肉细胞原生质体的制备 参考刘炜等 (2001) 的方法略加修改, 制得的原生质体常温静置备用。具体步骤: 取 5 日龄小麦幼苗第一片真叶, 蒸馏水冲洗干净, 以标准液浸湿叶片平铺于洁净的玻璃板上, 用双面刀片迅速将其切成 1~2 mm 小细条, 置于酶解液中在 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 中暗解 3.5 h。材料与酶解液之比为 1:10 (W/V)。酶解液组成为 1.4% 纤维素酶 R-10 (Cellulase R-10, Japan), 0.15% 果胶酶 Y-23 (99% Japan) 溶于标准液 (5 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mmol/L 甘露醇, 0.5 mmol/L KH_2PO_4 , 2 mmol/L MgSO_4 , 3 mmol/L 2-氮吗啉乙烷磺酸 (MES, Sigma), 调 pH 至 5.6 配置而成。

1.2.5 原生质体活力的鉴定 以终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 FDA (荧光素二乙酸酯) 室温处理原生质体 10 min, 在激光共聚焦扫描显微镜下镜检, 鉴定原生质体的生活力。

1.2.6 细胞核的提取 细胞核的提取以提取到的小麦叶肉细胞原生质体为材料, 经 CSK 缓冲液 [100 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L EGTA (pH 8.0), 10 mmol/L PIPES (pH 6.8), 300 mmol/L sucrose, 1.2 mmol/L PMSF, 20 mmol/L DTT] 破裂细胞膜, 再经不连续的蔗糖密度梯度离心法 (日立 CP80MX 离心机) 收集纯化细胞核。

1.2.7 细胞核的 DAPI 及 FITC-Ph 双重荧光标记 参考翟菁如等 (2010) 的方法, 略加优化, 先将纯化后的细胞核与 FITC-Ph 37 °C 处理 1 h 后, 以 PBS (pH 7.4) 冲洗 2 次, 后加入 DAPI 标记液, 37 °C 暗孵育 15 min 后进行观察。

1.2.8 流式细胞仪检测样品处理 将纯化的细胞核与 FITC-Ph 37 °C 孵育 1 h, 以 OTTO I 缓冲液 (0.1 mol/L 柠檬酸, 0.5% 吐温-20) 稀释, 各处理组加 50 μl FITC-Ph, 37 °C 避光孵育 1 h 后, 轻微摇匀, 上机检测。

1.2.9 图象的观察及处理 采用激光共聚焦扫描显微镜 (Olympus FV1000) 观察, 图象采集选用 512×512 像素, 图象的后期排版用 Photoshop CS5 软件。

2 结果与分析

2.1 原生质体活力的检测

酶解产生的原生质体为表面十分光滑的球状体(图版 I: 1)。对原生质体活力的鉴定采用荧光指示剂 FDA 标记法, 结果发现, 在 488 nm 激发下, 酶解后 10 h 大部分原生质体仍显示绿色荧光, 表明原生质体保持了很高的活性(图版 I: 2), 可以进行后续试验。

2.2 提取到的细胞核

以蔗糖密度梯度离心法提取到大量完整的细胞核。用 DAPI 染色后在共聚焦下观察到细胞核圆润, 杂质较少(图版 I: 3-6 分别显示了在共聚焦显微镜下观察到的 DAPI 单通道图像及透射 DIC 图像)。

2.3 流式细胞仪检测

以 FITC-Ph 标记后的细胞核经纯化后, 用 OTTO I 缓冲液稀释后, 上流式细胞仪检测。设定检测的细胞总数为 30 000 个, 检测结果如图版 I: 17、18。

表 2 流式细胞仪检测不同处理组细胞核荧光强度
Table 2 Different treatment groups by flow cytometry nucleus fluorescence intensity

分组 Groups	设定区域 ($10^1 \sim 10^3$) 细胞核百分比 (%) Percentage of nucleus area	平均荧光强度 Mean fluorescence intensity
CK	77.19	59.5
B	77.21	71.74

在 $10^1 \sim 10^3$ 的区域内, CK 组与 B 组细胞核数量约占总细胞核的 77%, 但 CK 组平均荧光强度为 59.5, 明显低于 B 组的平均荧光强度。表明相同数量的细胞核经增强 UV-B 辐射处理后, 其内的 F-actin 含量升高。

2.4 细胞核内 F-actin 的荧光标记

以 DAPI 和 FITC-Ph 对细胞核进行双重荧光标记, 细胞核内大范围显示绿色荧光, 且核仁处较亮, 表明细胞核内 F-actin 分布较广, 核仁处含量相对较高(图版 I: 7-14)。以 Olympus FV 软件分析得到, B 组小麦叶肉细胞核内绿色荧光强度较 CK 组强(图版 I: 15、16)。通过对标记得到的图像进行单位面积光积分分析(表 3)可知, 增强 UV-B 辐射处理组小麦细胞核内聚合态的肌动蛋白丝含量高, 与流式细胞仪检测结果一致。

表 3 不同处理组细胞核进行荧光标记后, 第二通道(特异显示 F-actin) 图像的单位面积光积分量
Table 3 The integration of the pure area of CHS2 (especially show the F-actin) after different treatment groups were given fluorescent labeling

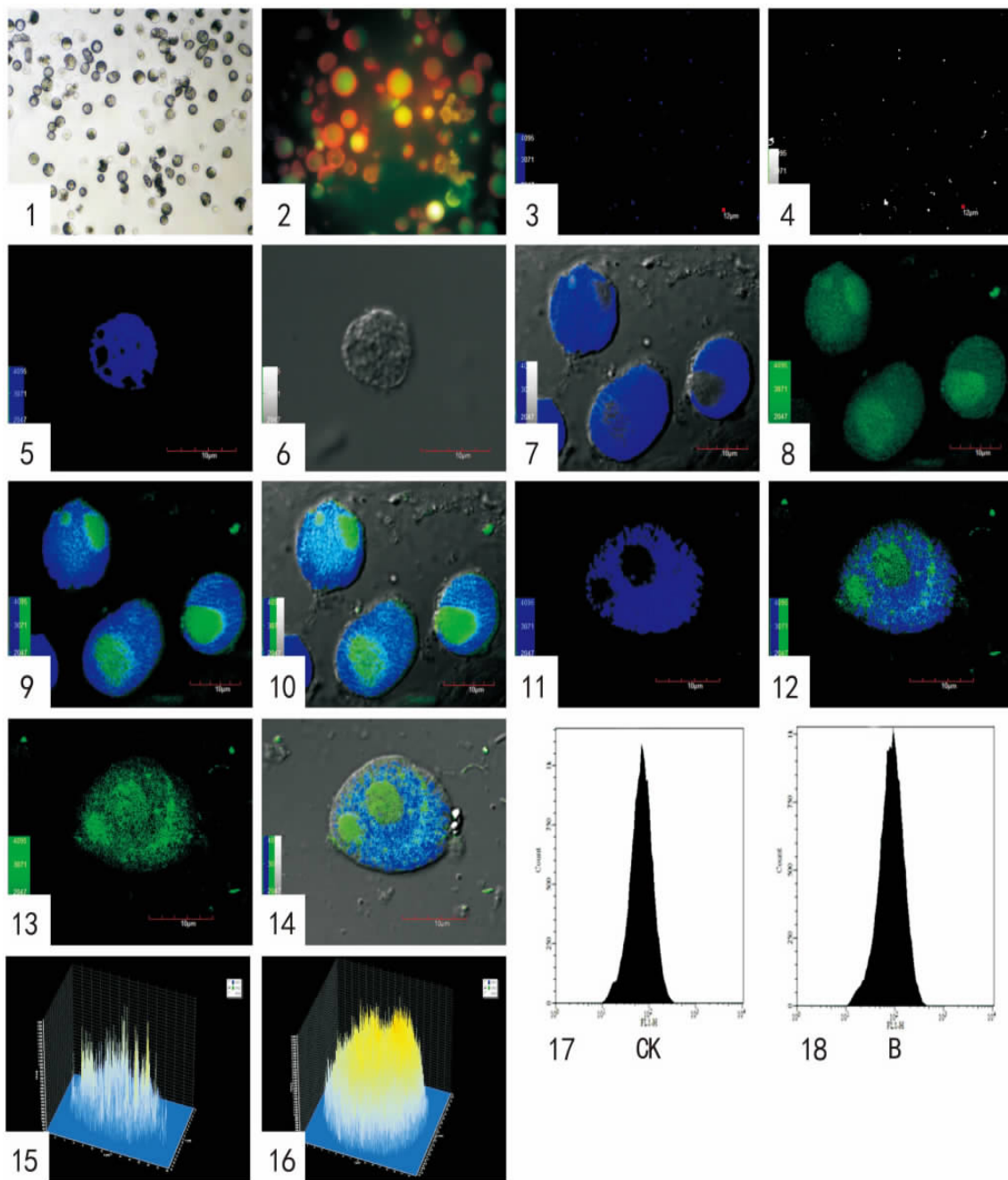
分组 Groups	通道 2 的范围 CHS2 range	通道 2 的荧光强度 CHS2 integration	平均荧光强度 Integration/Range
CK	3983.00	25662381.00	6442.978
B	1639.00	14025500.00	8557.352

3 结论与讨论

韩榕(2002)首次发现增强 UV-B 辐射后的小麦体细胞内存在“分束分裂”的现象, 并对此进行了多方位的研究。有关细胞核内肌动蛋白的研究近年来取得了很大进展, 证明肌动蛋白在细胞核内发挥了重要作用(郭爱华等, 2010; 张娟等, 2008)。

本研究结果显示, 经增强 UV-B 辐射处理后的小麦叶肉细胞核内 F-actin 含量升高, 推测聚合态的肌动蛋白纤丝作为一种动力蛋白, 可能参与了染色质凝缩及染色体移动的过程。韩榕等(2002)的研究表明, 在出现“分束分裂”的细胞中, 细胞能够把染色体拉向两极, 说明纺锤体没有受到破坏。Lenart *et al.* (2005) 的研究表明, 在核膜破裂的瞬间, 核区肌动蛋白浓度显著增大, 且核内单体的肌动蛋白在核内已经聚集为具有收缩功能的丝状结构。陈颖等(2003)报道, 在网球花有丝分裂的过程中, 肌动蛋白丝将纺锤丝和染色体包裹在其内。结合本研究, 我们推测, 在染色质凝缩成染色体的过程中, 肌动蛋白在核区广泛聚集, 将染色质包裹后进入细胞分裂周期。由于受到增强 UV-B 辐射的影响, 细胞质内肌动蛋白丝断裂后进入细胞核, 核区 F-actin 含量升高, 可能将凝缩的染色体“分团”包裹。这种作用可能会使细胞逃过周期检验点的检查而进入到分裂后期, 这可能是造成“分束分裂”的原因之一。

本研究还发现, 增强 UV-B 辐射处理的小麦叶肉细胞的细胞核通常具有多个核仁。通过对细胞核进行 DAPI 和 ph-FITC 双重标记, 用激光共聚焦采集图像发现, 细胞核仁处绿色荧光较强, 由于 phFITC 是 F 型肌动蛋白的特异性标记物, 说明核仁处存在浓度较高的聚合态的肌动蛋白丝。翁朝红等通过银染法表明大黄鱼的倍性和核仁具有良好的对应关系。结合本研究推测, 多核仁现象是不是“分



图版 I 1. 酶解法制的小麦叶肉细胞的原生质体 (bar=30 μm); 2. 以 FDA 染色法检测原生质体活力 (bar=30 μm); 3, 4. 通过密度梯度离心得到的小麦叶肉细胞细胞核 (3 所示以 DAPI 标记的细胞核; 4 显示细胞核在透射 DIC 通道下所成的图像) (bar=12 μm); 5, 6. 单个细胞核所成的像 (5 显示以 DAPI 标记的单个细胞核在 CLSM 下成的像, bar=10 μm ; 6 显示单个细胞核在透射 DIC 通道下成的像, bar=10 μm); 7-10. 以 DAPI 和 ph-FITC 双重标记的正常 CK 组的细胞核 (图像分别为在以下通道所成的像: DAPI 通道、ph-FITC 通道、DAPI+ph-FITC 通道、DAPI+ph-FITC+透射 DIC 通道) (bar=10 μm); 11-14. 以 DAPI 和 ph-FITC 双重标记的 UV-B 处理组的细胞核 (图像分别为在以下通道所成的像: DAPI 通道、ph-FITC 通道、DAPI+ph-FITC 通道、DAPI+ph-FITC+透射 DIC 通道) (bar=10 μm); 15-16. 不同处理组细胞核内 F-actin 含量 (15 显示的是 CK 组; 16 显示的是 B 组); 17-18. 不同处理组细胞核经流式细胞仪检测得到的结果 (17 为 CK 组; 18 为 B 组; 横轴表示荧光强度, 纵轴表示细胞核数量)。

Plate I 1. Wheat mesophyll protoplasts were obtained by enzymatic method (bar=30 μm); 2. Testing the protoplast viability by FDA staining (bar=30 μm); 3, 4. Wheat diachyma cell nuclei obtained by density gradient centrifugation (3 shows nucleus labeled by DAPI; 4 shows nucleus image under the DIC channel) (bar=12 μm); 5, 6. Images of single nucleus (5 shows nucleus labeled by DAPI, bar=10 μm ; 6 shows the single nucleus image under the DIC channel, bar=10 μm); 7-10. Nuclei of Group CK were doubly labeled by DAPI and ph-FITC (images from the separately channel: channel of DAPI, channel of ph-FITC, channel of DAPI+ph-FITC, channel of DAPI+ph-FITC+DIC) (bar=10 μm); 11-14. Nuclei of Group B were doubly labeled by DAPI and ph-FITC (images from the separately channel: channel of DAPI, channel of ph-FITC, channel of DAPI+ph-FITC, channel of DAPI+ph-FITC+DIC) (bar=10 μm); 15-16. Contents of F-actin in different groups (15 shows Group CK; 16 shows Group B). 17-18. Different treatment groups by flow cytometry nucleus fluorescence intensity (17 shows Group CK; 18 shows Group B; the horizontal axis indicates the fluorescence intensity of the vertical axis shows the number of nuclei).

束分裂”现象的一种早前期表现形式？这些都需要引起重视，进行进一步的研究与探讨。

致谢 感谢韩榕教授的指导，感谢山西师范大学分子细胞研究室提供的便利条件。

参考文献：

- 金萍. 2001. 细胞核肌动蛋白的分子特性及肌动蛋白在细胞内动态分布的研究 [D]. 长春：东北师范大学
- 韩榕. 2002. He-Ne 激光对小麦增强 UV-B 辐射损伤的修复效应及机理 [D]. 西安：西北大学
- Chen T (陈婷), Huang BQ (黄百渠). 2001. The progress in the research of the nuclear actin (核内肌动蛋白的研究进展) [J]. *J Northeast Norm Univ* (东北师大学报), **33** (3): 96-100
- Chen Y (陈颖), Wang G (王刚). 2003. Actin in higher plants (高等植物体内的肌动蛋白) [J]. *Bull Biol* (生物学通报), **38** (1): 13-15
- Guo AH (郭爱华), Gao LM (高丽美), Li YF (李永锋), et al. 2010. Influence of enhanced ultraviolet-B radiation on microtubule cytoskeleton in wheat root-tip cells (增强紫外线 B 辐射对小麦根尖细胞微管骨架的影响) [J]. *Chin J Cell Biol* (中国细胞生物学学报), **32** (2): 256-260
- Guo AH (郭爱华), Gao LM (高丽美), Li YF (李永锋), et al. 2010. Influence on microtubule in wheat mesophyll cell exposed to enhanced ultraviolet-B radiation and He-Ne laser irradiation (增强 UV-B 辐射和 He-Ne 激光对小麦原生质体微管骨架的影响) [J]. *Guihaia* (广西植物), **30** (2): 280-285
- Han R (韩榕), Wang XL (王勋陵), Yue M (岳明). 2002. Effects of the enhanced UV-B radiation on the body cell mitosis of the wheat (增强 UV-B 辐射对小麦体细胞分裂的影响) [J]. *Acta Gen Sin* (遗传学报), **29** (6): 537-541
- Kosta M, Umberto DB. 1993. Cytochemical localization of actin and myosin aggregates in interphase nuclei in situ [J]. *Mol Cell Biochem*, **209**: 189-199
- Kozsul R, Kim KP, Prentiss M, et al. 2008. Meiotic chromosomes move by linkage to dynamic actin cables with transduction of force through the nuclear envelope [J]. *Cell*, **133**: 1188-1201
- Lenart P, Bacher CP, Daigle N, et al. 2005. A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes [J]. *Nature*, **436**: 812-818
- Li J (李璟), Wen BG (温博贵), Wu JY (吴健谊), et al. 2001. Actin is a component of the nuclear matrices of rat hepatocytes (肌动蛋白是大鼠肝细胞核基质的组分之一) [J]. *J Shantou Univ Med Coll* (汕头大学医学院学报), **14** (1): 13-16
- Liu W (刘炜), Sun DL (孙德兰), Wang H (王红), et al. 2001. Influence of low temperature on spatial-temporal changes of Ca²⁺ in winter or spring wheat (低温处理对冬、春小麦细胞 Ca²⁺ 时空变化的影响) [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **43** (12): 1218-1223
- Nickola IV, Maja II, Aanna AU, et al. 1997. Association of actin with DNA and nuclear matrix from Guerin ascites tumour cells [J]. *Acta Bot Sin*, **39**: 691-696
- Weng CH (翁朝红), Wang ZY (王志勇), Cai MY (蔡明夷), et al. 2009. Observation on silver-staining nucleoli in different ploidy of large yellow croakers (*Pseudosciaena crocea* Richardson) (不同倍性大黄鱼核仁数目银染观察) [J]. *Acta Oceanol Sin* (海洋学报), **31** (6): 136-141
- Wang H (王华), Xing M (邢苗). 2001. Actin is located in the nucleus and nuclear matrix of HeLa cells (HeLa 细胞核和核骨架含有肌动蛋白) [J]. *Acta Gen Sin* (遗传学报), **28** (3): 211-216
- Wang J (王晶), Jiang L (蒋磊), Wang Y (王艳), et al. 2009. UV-Binduced G1/S arrest in *Arabidopsis* root tips (UV-B 辐射对拟南芥细胞周期 G1/S 期转变的影响) [J]. *Chin Bull Bot* (植物学报), **44** (4): 426-433
- Zhang J (张娟), Han R (韩榕). 2008. The influence of He-Ne laser irradiation on the damage of cell chromosome in wheat by enhanced UV-B radiation (He-Ne 激光对增强 UV-B 辐射小麦细胞染色体损伤的影响) [J]. *J Shanxi Norm Univ: Nat Sci Edit* (山西师范大学学报·自然科学版), **22** (2): 66-70
- 展 [J]. *Trop Agric Sci* (热带农业科学), **29** (3): 44-50
- Zhao CM (赵春梅), Cao JH (曹建华), Jiang JS (蒋菊生), et al. 2008. Nutrient accumulation, distribution and biology cycle of rubber plantation (橡胶人工林养分积累、分配与生物循环) [J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), **24** (10): 467-470
- Zhao CM (赵春梅), Jiang JS (蒋菊生), Cao JH (曹建华). 2009. The Nitrogen cycling model of rubber plantation ecosystem (橡胶人工林生态系统 N 素循环模型) [J]. *For Resour Manag* (林业资源管理), (3): 66-70
- Zhou WJ (周卫军), Wang KR (王凯荣), Zhang GY (张光远). 2003. The fertilization that is combined with organic and inorganic impacts on the soil's N supply and the crop's production of the rice paddy of red soil (有机无机结合施肥对红壤稻田土壤 N 素供应和水稻生产的影响) [J]. *Ecol Sci* (生态学报), **23** (5): 912-917
- Zhou ZH (周志华), Xiao HY (肖化云), Liu CQ (刘丛强). 2004. Research status and advances of biogeochemical cycling nitrogen in soils (土壤 N 素生物地球化学循环的研究现状与进展) [J]. *Earth and Environ* (地球与环境), **32** (3-4): 21-26
- Zhou ZZ (周再知), Zheng HS (郑海水), Yin GT (尹光天), et al. 1995. Biomass equations for rubber tree in Southern China (橡胶树生物量估测的数学模型) [J]. *For Res* (林业科学研究), **8** (6): 624-629

(上接第 639 页 Continue from page 639)