

Cis platin 去似织毛虫 *Histriculus similis* 小核的研究^{*}

刘星吟, 陈 琳, 金立培

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 用 4 种浓度的 cis platin (顺式二胺二氯铂) 处理似织毛虫的 G₁ 期细胞, 共建立无小核细胞系 7 个。所有被处理的细胞都要经历一个生长抑制期, 无小核细胞的获得率与 cis platin 的浓度和处理时间有密切的关系。所有失去小核的细胞核, 约 70% 的细胞的大核形态和数目异常。结果表明: 似织毛虫的小核对于保持大核形态和数目的稳定性发挥着明显的作用。

关键词: cis platin; 似织毛虫; 大核; 小核; 体功能

中图分类号: Q343 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 06-0060-04

在真核生物系统演化中, 纤毛虫是很特别的一支, 其细胞具有大核和小核。传统观点认为, 小核专司生殖, 大核专司营养^[1]。然而, 近年不少研究发现, 小核仍保留着担当某种 (某些) 体功能的角色, 体功能是指小核在纤毛虫的代谢、生长、发育及形态建造等过程发挥某种 (某些) 作用或影响。并且纤毛虫的种类不同, 其失去小核后, 体功能的表现形式也不完全一样^[2-10]。为了评估纤毛虫小核体功能的普遍性, 并与物理方法—显微切割去小核作比较, 我们利用化学方法—顺式二胺二氯铂 (cis platin) 处理似织毛虫 *Histriculus similis* 去小核^[3], 对失去小核的细胞系进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 细胞和培养

似织毛虫 *Histriculus similis* 于 2002 年 3 月采集于中山大学实验鱼池, 从分离所得多个细胞的混合培养中发现有性接合生殖。本研究用细胞系为一接合后体的克隆后代, 是最年轻的细胞系。细胞培养的方法与以前报道相同^[3] 当培养细胞进入指数生长期, 随机挑选分裂后期细胞。经过 3~6 min 后, 这些细胞完成二分裂, 所形成的仔细胞即为 G₁ 期细胞。

1.2 化学去小核

顺式二胺二氯铂 (cis platin) 能阻止小核 DNA 的复制, 且 G₁ 期小核的敏感性明显高于 S 期, 而大核 DNA 的复制不受影响^[11]。按其原理与方法, 我们将 cis platin 配成 1 500 μg/mL 原液, 然后用培养液稀

释成 16, 24, 30, 45 μg/mL 4 种质量浓度, 分别处理 G₁ 期细胞 (30 只/组), 处理时间 12~56 h。处理后, 用培养液将细胞清洗 3 次并转移至 4 cm 培养皿里作单细胞培养, 分别记录其每天的生长情况。当每个培养群体达 15 个以上细胞时, 取 1~2 个细胞进行无小核体鉴定。

1.3 无小核体的鉴定与形态观察

以醋酸乳酸地衣红临时染色鉴定小核的有无, 以蛋白银染色制片作细胞形态结构的比较观察^[9]。

2 结 果

2.1 正常细胞的形态特征

正常似织毛虫在 25 °C 恒温培养条件下, 细胞生长旺盛, 活体大小为 (80~120) μm × (30~60) μm, 长椭圆形。额、腹、横棘毛呈典型的 8, 5, 5 式排列。缘棘毛左右各一列, 在细胞末端汇合。2 枚大核, 呈球形。2 枚小核, 位于细胞左侧紧靠大核的位置 (图 1: 1, 3)。

2.2 处理浓度、时间对细胞的影响及去小核的效果

所有被 cis platin 处理期间的细胞, 细胞收缩成圆形。游动减缓, 处理后将细胞转移到新鲜培养液培养, 细胞并不马上开始分裂, 而是经历了一段抑制时间才开始分裂, 而有的细胞系在这段时间并不发生分裂而是走向死亡。处理时间和剂量与受抑制的程度成正相关 (表 1)。从表 1 可以看出, 高剂量 45 μg/mL 虽然对细胞作用的时间最短 (12 h), 但其影响却是致命的。这些细胞经过 15 d 后, 无一只发生分裂而全部死亡。存活时间最短的为 3 d, 最长时

* 收稿日期: 2003-01-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970089)

作者简介: 刘星吟 (1976 年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 金立培; E-mail: ls67@zsu.edu.cn

间为 15 d。16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量最低, 由于对细胞作用的时间延长 (56 h), 细胞分裂同样受到抑制而全部在 14 d 内相继死亡。存活时间最短的为 3 d, 最长时间为 14 d。在分 4 种浓度处理的共 120 个细胞中, 筛选

建立无小核细胞系 7 个。其中以浓度 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、处理时间 48 h 去小核最有效, 无小核细胞获得率为 25% (表 1)。与此同时, 经 *cis* platin 处理但仍保留小核的细胞系用作对照观察。

表 1 *cis* platin 对细胞分裂抑制的影响及无小核系获得率¹⁾
Tab. 1 The frequency of amiconucleates (Am) and effect of division by *cis* platin treating G_1 cells

试验细胞株系	<i>c</i> (<i>cis</i> platin) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	处理时间 h	样本数	分裂抑制时间/d			所有样本数的 最终命运统计	成活细 胞系	无小核 细胞系	成活率 %	无小核细胞 系获得率/%
				min	ave	max					
121	16.67	56	28	—	—	—	都不分裂, 3~7 d 内死亡 15 只, 8~10 d 内死亡 11 只, 11~14 d 内死亡 2 只	0	0	0	0
122	24.00	48	28	3	6	11	3~6 d 内死亡 10 只, 4 只繁殖成系, 7~10 d 内死亡 12 只, 2 只繁殖成系。11 d 内死亡 1 只, 1 只繁殖成系	7	6	25	21.43
123	30.00	24	26	3	5.4	12	3~6 d 内死亡 12 只, 1 只繁殖成系, 7~11 d 内死亡 8 只, 1 只繁殖成系。12 d 内死亡 4 只	2	1	7.69	3.85
124	45.00	12	25	—	—	—	都不分裂, 3~6 d 内死亡 10 只, 7~10 d 内死亡 11 只, 11~15 d 内死亡 3 只	0	0	0	0

1) 本表统计数均来自活体观察;
样本数指 30 只/组经 *cis* platin 处理后转移到新鲜培养液的细胞数目。由于在处理过程和转移过程中细胞死亡, 因此每组都比处理前的样本数 30 只要少;
分裂抑制时间, 是指细胞被 *cis* platin 处理后转移到新鲜培养液培养的第一天到细胞发生第一次分裂之间所间隔的天数;
无小核细胞系获得率是指最后鉴定为无小核细胞系数与样本数的百分比。

2.3 无小核细胞的形态变化

在所有无小核系中, 28%(48/171) 的细胞大核形态由圆形变成长椭圆形(图 1: 6, 7)。70%(93/171) 以上细胞的大核数目或形态结构显著异常: 其中靠近口围带翻领部(AZM lapel region) 的前大核变化最明显, 有的拉长呈长椭圆形, 有的为长条形, 有的呈豆芽状(图 1: 2, 5—11); 有的两枚大核均呈现为葫芦状(图 1: 9)。大核数目不稳定, 常出现 1~3 枚大核的情况(图 1: 10, 11)。但细胞的 AZM 结构未见明显异常, 无小膜缺损现象, 细胞的纤毛图式也未发生改变。作为对照, 在被观察过的 180 个正常细胞(图 1: 1, 3) 和处理后仍保留小核的细胞(图 1: 1, 3, 4) 中, 均未发现大核畸形及数目不定的现象。

3 讨 论

利用 *cis* platin 处理 G_1 期似织毛虫细胞, 能专一地抑制小核 DNA 的合成, 使部分分裂仔细胞失去小核, 因此是获得无小核细胞的又一有效途径。 *cis* - platin 作为一种 DNA 交联剂, 为什么小核对其特别敏

感而大核却不受影响, 很可能与腹毛类纤毛虫大核的上述结构特点密切相关, 一是大核基因组由许多基因大小的 DNA 片断组成, 分子量较小, 损伤后容易被修复; 二是同一个大核基因有多个拷贝, 其中部分拷贝受到损伤而失去的功能仍可以由另一些未受损伤的相同基因拷贝来完成。

细胞生长、分裂受抑制的程度与 *cis* platin 的浓度和处理时间的长短密切相关。低剂量(16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、长时间(56 h) 处理和高剂量(45 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、短时间(12 h) 处理, 对细胞的伤害是不可逆转的, 所有被处理细胞均不可避免地死亡; 相反, 用较低剂量(24 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和较短时间(48 h) 进行处理, 其细胞成活率和去小核率均较高, 且二者基本接近。因此, 为了提高无小核细胞的获得率, 可考虑选择较低的作用剂量和较短的处理时间。

化学方法与显微切割方法相比, 主要优点是可操作性强, 不须要进行严格的显微操作训练, 尤其适合于那些小核与大核距离较近, 小核数目较多且分布不规则, 或者细胞个体较小的纤毛虫的去小核。另一方

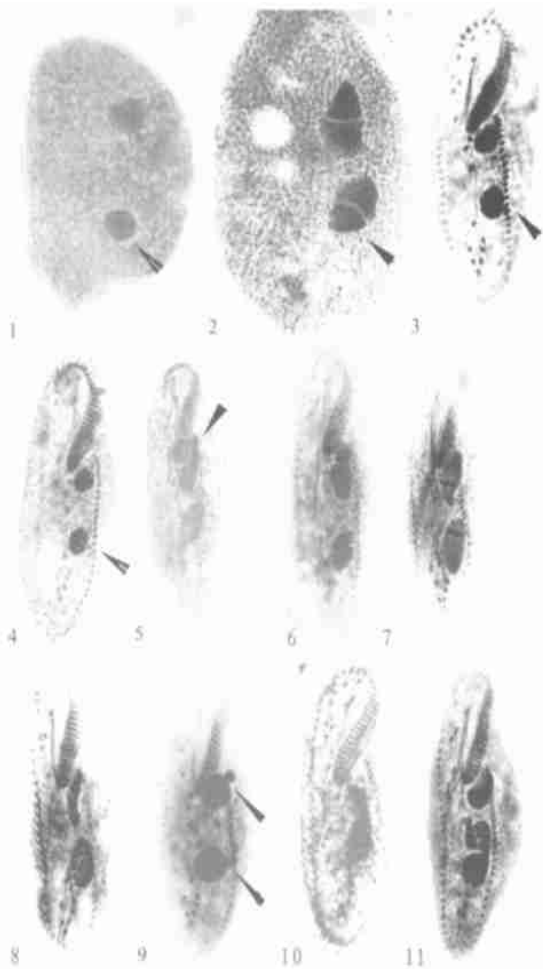


图 1 似织毛虫 *cis*-platin 处理前后大核的形态变化

Fig. 1 The diversification in Morpha and quantity

of macronucleus of *Histriculus similis* after *cis*-platin treatment

1: 地衣红染色, 显示正常细胞的大核和小核(箭头); 2: 地衣红染色, 示无小核细胞的大核及其改组带(箭头); 3: 蛋白银染色显示正常细胞核结构, 二枚大核呈圆形, 箭头所指为小核; 4: 化学处理后有 小核的细胞核结构, 大核呈圆形, 箭头所指处为小核; 5: 无小核细胞中靠近口围带的大核畸形尖凸(箭头); 6—7: 无小核细胞中, 两枚大核呈不规则的椭圆形; 8: 无小核细胞中, 靠近口围带的大核呈长条形; 9: 无小核细胞中, 两枚大核都出现葫芦状畸形(箭头); 10: 无小核细胞中, 仅一枚畸形大核; 11: 无小核细胞中, 出现 3 枚畸形大核。

面, 受 *cis* platin 处理的细胞要经历一个较长时间的抑制期才能恢复正常的生长与分裂, 且受抑时间(3 ~ 15 d)明显长于显微切割后细胞再生的时间(1 ~ 7 d)^[11]。由此看来, *cis* platin 处理对细胞的伤害比显微切割更为严重。然而, 无论用何方法去小核, 由于同时设处

理后同样受到伤害但仍保留小核的细胞作对照观察, 故可以排除无小核细胞的形态结构变化是因为细胞受到损伤所引起的可能性。

大核的形态和数目异常是无小核似织毛虫细胞的基本特征, 说明小核在维持大核形态结构和数目方面发挥明显作用。这一变化与富丽尖毛虫失去小核后的情况很相似^[9], 与无小核瘦尾虫^[4]和无小核念珠伪角毛虫^[10]的大核变化亦有部分相似之处, 但与冠突伪尾柱虫^[8]和魏氏拟尾柱虫^[6]丧失小核后的变化情况完全不同。6 种腹毛目纤毛虫无小核细胞的基本特征及其各自的分类地位综合于表 1, 从比较中我们可以看到: 纤毛虫小核体功能的表现形式因不同物种而异, 但亲缘关系相近或者形态发生模式相近的物种具有相似的表现形式。

参考文献:

[1] PRESCOTT D M. Genome gymnastics: unique modes of DNA evolution and processing in ciliates [J]. Nature Reviews Genetics, 2000, 1: 191—198.

[2] JIN L P, NG S F. The somatic function of the gem nucleus in *Pseudostyela cristata*: asexual reproduction and stomatogenesis[J]. J Protozool, 1989, 36: 315—326.

[3] NG S F. The somatic function of the micronucleus of ciliated protozoa[J]. Progress In Protistology, 1986, 1: 215—286.

[4] JIN L P, LIU X Y. Micronuclear effect on structural stability of oral Apparatus in *Uroleptus paxisi* [J]. Jap J protozoology (support), 2002, 35: 41.

[5] 金立培. 冠突伪尾柱虫无小核体的人工获得与快速筛选[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1993, 32(2): 106—110.

[6] 金立培, 刘小意. 魏氏拟尾柱虫小核体功能的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(5): 120—122.

[7] 李洪超, 史新柏. 多节核棘尾虫无小核系虫体的初步研究[J]. 动物学研究, 1993, 14(1): 91—92.

[8] 金立培, 金华中. 冠突伪尾柱虫小核对胞口结构稳定性的影响[J]. 动物学报, 2002, 48(2): 272—276.

[9] 金立培, 金华中. 尖毛虫小核体功能的研究//中国原生动物学学会第十一次学术讨论会论文摘要汇编[C]. 2001: 87.

[10] 刘小意, 金立培. 念珠伪角毛虫小核体功能初步研究[J]. 动物学研究, 2002, 23(3): 258—260.

[11] GRS D D, CMS D. Action of *cis*-dichloridiammineplatinum (II) on *stylonychia mytilus* (ciliata protozoa): (I). Differential sensitivity of micronuclei & macronucleus [J]. Indian J Experimental Bi, 1982, 20: 499—506.

Studies on the Production of Amicronucleate Lines of
Histriculus similes by *Cis* platin Treatment

LIU Xing yin, CHENG Lin, JIN Li pei

(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: To search into the somatic function of the micronucleus of the ciliated protozoan *Histriculus similes*, all amicronucleates were generated with treatment of *cis* dichlorodiammineplatinum (II) (*cis* platin), a DNA cross linking agent, which has differential effect on the micro and macronucleus of *Histriculus similes*. For the reason that micronuclei in the G₁ phase are more sensitive to *cis* platin than those in the S phase, all treated normal cells were synchronized G₁ cells, which underwent a growth suppression phase before recovery to divide. Compared to the cell lines reserved micronuclei after treatment with *cis* platin and normal cell lines, about 70% (93/171) of cells in the amicronucleate cell lines possessed abnormal macronuclei in number and/or in shape: there were over two oval macronuclei instead two round ones; the macronuclei often exhibited various irregular appearances, such as rod like, bud like, contorted, and otherwise, which suggested that micronucleus play an essential role in retaining the stability of morpha and quantity of macronucleus in *Histriculus similes*.

Key words: *cis* platin; *Histriculus similes*; macronucleus; micronucleus; somatic function

(上接第 59 页)

Seasonal Cycles of Ovarian Development and
Serum Sex Steroid Levels of Female Grouper *Epinephelus coioides*

ZHAO Hui hong¹, LIU Xiao chun¹, LIUFU Yong zhong², Wang Yun xin², LIN Hao ran¹

(1. Institute of Aquatic Economic Animals and Key Laboratory of Guangdong Province For Aquatic Economic Animals, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangdong Daya Bay Fishery Development Center, Huizhou, 516081, China)

Abstract: The female gonadal development and levels of sex steroid of the protogynous *Epinephelus coioides* in the Daya bay of Guangdong province were studied. The oocyte development were divided into six phases: ①oogonia, ②oocyte with follicular epithelium consisting of a single layer of follicle cells, ③oocyte with adipose vesicle and yolk, ④ oocyte filled with yolk, ⑤ oocyte with migratory nucleus, ⑥ degeneration of oocyte. Based on the largest transverse section area occupied by different phase of oocytes, the development of gonad could be divided into six stages. The serum levels of oestradiol 17β (E₂) and testosterone (T) of mature females were measured seasonally by radioimmunoassay. Mean E₂ levels in females were higher in spawning season of May and June then in all other months; Mean T levels were also highest in May and June. The gonadosomatic index (GSI) was higher in spawning season; it was consistent with the change of serum sex steroid levels.

Key words: epinepheinae; ovarain development; oestradiol 17β; testosterone