

激光对细胞亚显微结构的作用

生物学系 林月婵*

摘 要

试验用CO₂及N₂激光以不同时间处理水稻种子及洋葱鳞茎的根和芽,观察到激光诱发细胞亚显微结构的广泛变化,并发现细胞质膜、内质网、核糖核蛋白体、线粒体的光效应最大,淀粉体、溶酶体次之,液泡膜的光效应最小。据此讨论了激光对于诱变育种和治疗肿瘤的可能性。试验还测定了两种激光的一些剂量对植物组织的穿透力。

前 言

近十年来,由于激光在生物学、医学和农业上的广泛应用,导致深入进行关于激光对细胞形态结构及生理生化效应的研究。有关的资料国外早已有所报导^[1-8];在国内,关于育种工作,激光对染色体的诱变作用^[9],以及医学上激光对多种酶活性的影响^[10],亦见于文献。此外,关于激光的生物学效应也有若干综述文章^[11-18]。但总的看来,这方面的工作还处在早期阶段,激光对有机体作用的细胞学机理是复杂的,本实验的目的是在前人工作的基础上,通过对细胞亚显微结构的观察,探讨几种激光对细胞中各种结构的影响,为激光在农业上和医学上的应用提供一些理论依据。研究仍在继续进行,本文是第一部分。

材 料 与 方 法

试验采用生产上常用的IR24水稻种子及市售洋葱鳞茎作材料。IR24种子在28℃室内置培养皿中催芽发根,洋葱用水培方法催根。当根长1cm,芽长约0.5cm时进行照射。1977年5月24日上午8时半—11时半照射完毕,将材料放回原处继续培养,至5月25日上午8时半进行固定。照射光源有波长10.6微米的CO₂激光及3371Å的N₂激光。CO₂激光的功率密度为20瓦/cm²,处理时间有1秒和1/3秒。N₂激光的单脉冲峰值功率(空气)为1.0兆瓦,平均功率密度33—44毫瓦/cm²,处理时间有10、15

*电子显微镜技术由本校电镜室协助。

和20分钟。

作电镜观察的材料,处理后用1%锇酸固定4小时,然后经多级酒精脱水,用环氧树脂812包埋,横向切片,厚度650 Å,用醋酸铀——柠檬酸铅双重染色。每个处理有3—5个根尖或芽尖。

观察CO₂激光对组织穿透力的材料用Carnoy's液固定,石蜡包埋,横向切片,厚度为10微米,苏木精——快绿染色,在光学显微镜下检查整个根尖或芽尖的损伤情况。

结果与讨论

本文仅报导CO₂激光处理1/3秒的IR24水稻的根尖细胞和对照细胞,以及N₂激光处理10分钟的洋葱根尖和IR24芽尖细胞与对照材料。其余处理组合,尚未检查完毕,故未能比较不同剂量的激光对细胞的效应。

一、在上述剂量下,N₂激光及CO₂激光均能引起细胞内各种结构的广泛变异。并且这两种激光诱发的变异情况有相类似的地方。现将各种结构的变化分述于下:

1、质膜的变化:对照组细胞的质膜,染色正常,均匀一致,可清楚地见到单位膜的三层结构,照射后的细胞质膜,表现出各种损伤现象,如整个质膜或某些区段变淡,不易染色。这可能由于质膜中的蛋白质及类脂在激光的高温和光化作用下产生变性,难于吸附染料中的重金属离子所致。有些质膜出现许多大小不同的缺口,断裂成念珠状[图1]。这可能由于更剧烈的高温光化作用,使膜物质变性凝结,或由于瞬时高温,使细胞内物质气化产生较大的膨压,将质膜胀破。破坏较严重的质膜,表现出区段性断裂[图2],或完全解体,或与细胞质凝结在一起,形成大小团块,完全失去膜的痕迹。该处有些细胞壁亦被破坏和溶解,在中胶层的地方出现许多小颗粒,可能是因为质膜破裂,引起细胞质外流的结果[图3]。

2、胞基质、内质网和核糖核蛋白体的变化:对照组的细胞、胞基质呈微小颗粒状,均匀分布在细胞质中,内质网多呈双层膜开放管状结构,二膜间的距离较窄,有次序地分布在细胞质中,其上附有许多核糖核蛋白体。经过N₂及CO₂激光处理过的细胞,胞基质变得透明或变性凝结成大小团块[图4]。核糖核蛋白体形态不清,甚至与胞基质、内质网等凝结成小团块。内质网有些断裂成粗颗粒状,有些呈泡状膨大,双层膜的结构消失,其上缺少核糖核蛋白体[图5]。在CO₂处理的组合中,有些细胞在某些部位出现一堆密集的网状结构,其上无核糖核蛋白体,整个胞基质部位显得特别透明,看不到其他细胞器[图6]。形成这种网状结构的原因有待进一步研究。

3、线粒体的变化:对照组的细胞,线粒体呈圆形或椭圆形,内外膜清晰完整,嵴明显,基质呈细微颗粒状。照射后,表现出多种多样的损伤现象,有些线粒体变为不规则的多角形或锯齿状,外膜皱缩[图7],有些基质变淡,空泡化

或变成粗颗粒,其内嗜碱性颗粒增加。推测是在高温光化作用下,改变了膜的通透性所致。损伤严重的线粒体,内外膜部分或全部破裂,嵴亦部分或大部分解体(图8)。

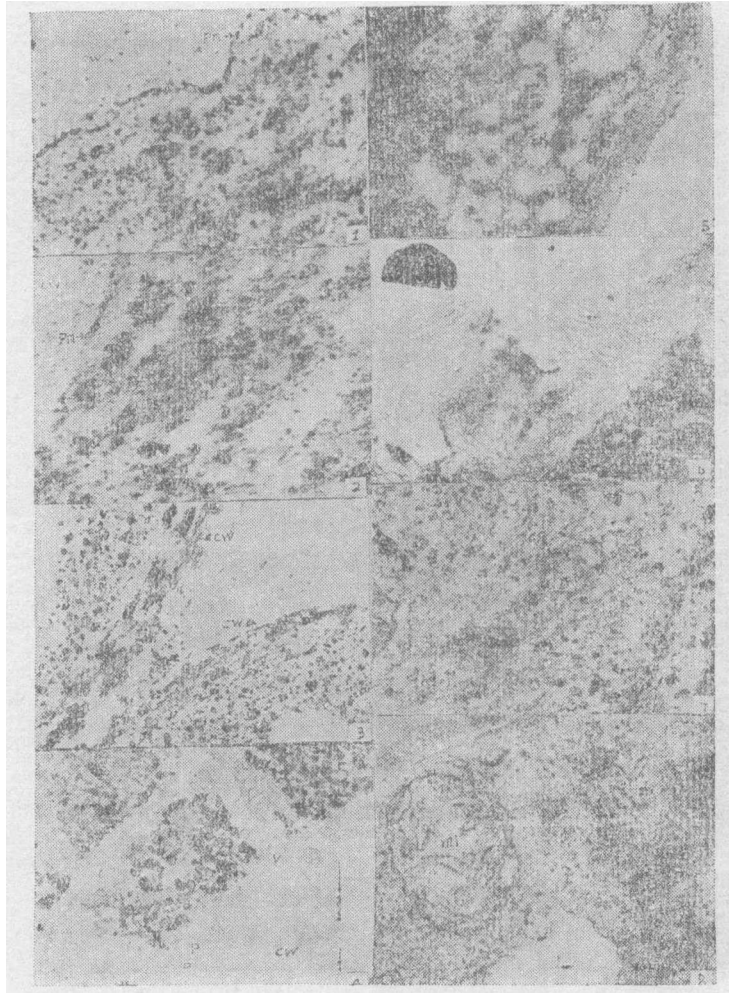
4、质体的变化:对照组的根尖或芽尖细胞的质体主要是造粉体或发育未成熟的前质体,呈圆形或椭圆形,内外膜清晰完整,其内有大小不等的淀粉粒或具有初始的片层结构(图9)。经过 N_2 或 CO_2 激光照射后,有些质体一边内外膜破裂,而另一边尚能清晰地看到膜的结构(图10)。有些初始片层结构有不同程度的破坏,质体的基质变淡或絮结成小颗粒。

5、液泡膜的变化:对照的细胞的液泡为一层界线清晰的单位膜包围着,大多近圆形(图11)。照射后,有些液泡膜还比较完整,而有些则断裂成念珠状(图12)。损伤较严重的,则完全解体而失去液泡膜的痕迹。这种情况可能由于高温引起液泡内液体的沸腾,将膜胀破。

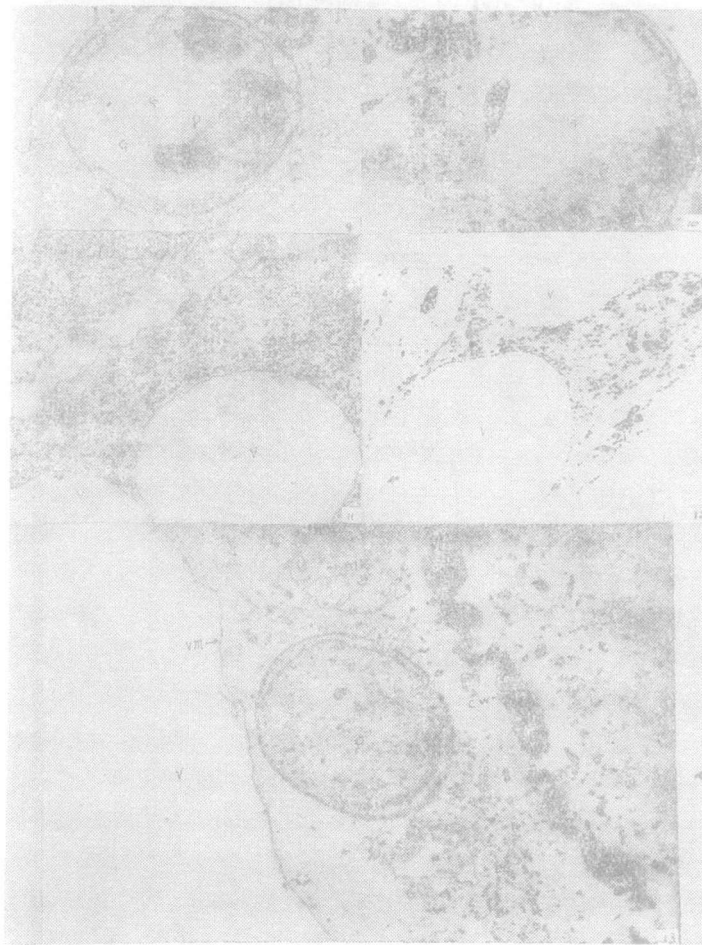
6、溶酶体的变化:对照细胞的溶酶体,外周具有一层清晰的单位膜,内部为均匀小颗粒状结构。照射后,观察到有些膜破裂。

二、细胞在上述激光的剂量作用下,各种结构都会发生不同程度的损伤;但不同细胞器对光的吸收和透过度都不同,光损伤程度也有差别。质膜、内质网、核糖核旦白体和线粒体最易受到破坏,造粉体和溶酶体次之,液泡膜耐辐射性最强。如图13,水稻IR24芽尖细胞在 N_2 激光处理10分钟后,在质膜完全解体,内质网、核糖核旦白体形态消失,线粒体变形,内外膜及嵴被严重破坏的情况下,造粉体的内外膜仅部分破坏,液泡膜则相对完整。这种对激光敏感性的差异可能与细胞器的生理活性有着密切关系。质膜控制着细胞内外物质的交流,与整个细胞的能量代谢和物质代谢密切相关,具有极其复杂和活泼的生理功能;线粒体是细胞代谢和能量代谢的重要场所,是细胞有氧呼吸的中心,具有一系列的酶类和整套电子传递系统;核糖核旦白体是合成旦白质的基地;内质网上附着丰富的酶类,不断地进行着生理生化反应。这些结构都具有较高的生理活性,它们的膜系的主要组分——旦白质和类脂分子中含有较多的活化电子和活泼的不饱和键;这些活化电子和不饱和键能够吸收更多的光能,从而加强光效应。造粉体虽与形成淀粉有关,但生理活性比上述结构低,含有的酶类也比较少,构成质体内外膜的界面脂质的不饱和性也比较低,因而光效应比较弱。液泡是细胞“废物”储存场所,虽具有一定的酶活性,但生理活性比上述各种结构低,液泡膜化学性较稳定,因而光效应最弱,同时,液泡内含有较多的水份,透光率比较大,水的比热又较高,所以对光损伤具较强的耐受力。此外还可能由于别的原因,如膜在结构上的不同特性,各自的吸收光谱不同,而导至各种细胞器对同种激光光效应的差异。

根据上述情况,在实践上可考虑利用各种理化因子,人为地提高细胞中膜系的活性而加强辐射效应。例如发芽的种子,它的细胞生理活性较高,各种膜的光效应比干种子的强,根据这个特点来育种可提高辐射后的诱变效果;又如在医学上,可



1. 水稻IR24芽尖細胞。N₂激光处理10分钟。质膜断裂成念珠狀，細胞质內各种結構均被破坏 ×140,000
2. 水稻IR24芽尖細胞。N₂激光处理10分钟。质膜呈区段性断裂。細胞內各种結構被破坏。 ×108,000
3. 水稻IR24芽尖細胞。N₂激光处理10分钟。质膜与細胞质凝結在一起，形成大小团块，完全失去质膜的痕跡，該处細胞壁亦被破坏溶解。 ×17,000
4. 水稻IR24根尖細胞。CO₂激光处理1/3秒。胞基质变性凝結成大小团块。 ×4,000
5. 水稻IR24根尖細胞。N₂激光处理10分钟。內质网呈泡狀膨大，膜的结构消失。 ×25,000
6. 水稻IR24根尖細胞。CO₂激光处理1/3秒。在細胞的某些部位出現一堆密集的网狀結構，其上无核糖核且白体，整个胞基质变得特別透明，看不到其他細胞器。 ×35,000
7. 水稻IR24芽尖細胞。N₂激光处理10分钟。綫粒体变形，脊內外膜欠清晰。 ×30,000
8. 水稻IR24根尖細胞。N₂激光处理10分钟。左边一个綫粒体，內外膜消失，剩下部分脊。 ×70,000



9. 水稻IR24根尖細胞。未处理的細胞造粉体,内外膜清晰,內有二个淀粉粒。×40,000
10. 水稻IR24芽尖細胞。N₂激光处理10分钟。造粉体一边膜被破坏,另一边較完整。×40,000
11. 水稻IR24根尖細胞。未处理的細胞液泡,單位膜結構清晰。×40,000
12. 水稻IR24根尖細胞。N₂激光处理10分钟。液泡膜断裂成念珠狀。×45,000
13. 水稻IR24芽尖細胞。N₂激光处理10分钟。各种細胞器的损伤程度不同,当质膜完全解体,內质网、核糖核且白体形态消失,綫粒体变性,内外膜及嵴崩解时,質体膜部分缺損。液泡膜相对完整。×34,000

注: Cw 細胞壁 Pm 質膜 mi 綫粒体 ER 內网質 P 質体 G 淀粉粒
V 液泡 Vm 液泡膜

利用肿瘤细胞比一般细胞具有更高的代谢活性,光效应大,从而治疗癌肿。此外还可利用各种细胞器对同种激光具有不同的敏感性这个特点,选择性地破坏某种细胞器而研究它们的生理功能。

三、关于CO₂及N₂激光穿透组织的能力是医学上和育种上有效地应用激光的重要问题之一,在高等动植物诱变育种中,必须通过若干层细胞而照射到与后代胚形成有关的细胞时,才能产生变异的后代,在医疗上要求有不同深度组织的疗效。但各种激光器、各种剂量的穿透力是不同的,特别是紫外激光,波长短,能否穿透多层细胞而作用到靶细胞上,这是个值得探讨的问题。我们初步试验了CO₂及N₂激光对组织的穿透力。

用光学显微镜观察,经CO₂激光照射过的水稻IR24的芽尖和根尖组织,处理时间为1秒及1/3秒的组合中均出现明显的烧伤区,在功率密度为20瓦/cm²辐射1秒时,根尖组织中烧伤面积约为0.2×0.4 mm²,芽尖的烧伤面积亦为0.2×0.4 mm²,烧伤部位的表皮多向外崩裂,在烧伤中心区,中央下陷,细胞可能由于瞬时高温气化或碳化而被彻底破坏,只剩下一个锥形或长椭圆的空腔,在腔的边缘上有黑色碳化组织团块,在中心区的后面,许多细胞可能由于气压的作用而变形,胞质亦变得无色透明,看不到核和细胞器的结构,更内层的细胞仍保持着快绿的染色,细胞形态基本正常,但胞质内凝结着许多粗颗粒。损伤区的范围约为10—15层细胞,在非损伤区的细胞,在光学镜下,相对正常,这是由于激光穿透力所限,作用不到的结果,或者是由于损伤区的瞬时崩裂,吸收了激光的各种能量,而保存了该区细胞的正常结构。对照组各个根尖或芽尖组织,细胞结构及形态正常,细胞层次分明。

在电子显微镜下,观察了N₂激光处理10分钟的水稻芽尖细胞,发现从外边第一层至第三层细胞都有不同程度损伤,第一层最重,胞质普遍出现絮结,线粒体内外膜及嵴多数消失。第三层细胞受害较轻,仅线粒体变形,尚可看到部分内质网。第四层以内的细胞,由于切片不够完整,未能准确观察,有待今后进一步研究。

结 论

一、在上述激光的剂量作用下,可以引起细胞内各种结构产生复杂的不同程度的损伤。据此认为激光用作诱变手段或治疗癌肿是可能的。

二、不同的细胞器光效应是有明显差别的,生理活性高的光效应较强,相反则弱。这种差别估计与细胞器膜系的分子结构特性有关。

三、上述剂量的CO₂激光可穿透10—15层细胞,N₂激光亦可作用到第三层细胞。能否进入到第四层细胞,有待今后进一步研究。

主要参考文献

- [1] M. L. Wolbarht, Laser Application in Medication and Biology, Pleum Press 1971.
- [2] Michael W. Bems, Biological Microirradiation Classical and Laser Souries, 1974.
- [3] D. E. Rounds, Laser Handbook, Vo. 2, Part F, 1863—1887, 1972.
- [4] Goldmen Leon, Applications of the Laser, 1973.
- [5] L. G. Paleg, D. Aspinall, Nature 228, 970—973, 1970.
- [6] Л.Б. Рубин, Успех. Соврем. Биол. 1969 ТОМ 7,(2), 222—244.
- [7] АНСССР Генетика 1972 ТОМ 8,(1), 12—16.
- [8] 何芬德譯, 国外激光1977(2).
- [9] 中山大学生物系遗传学教研室, 激光, 1976,(1).
- [10] 武汉医学院附二医院耳鼻喉科教研室, 武汉医学院学报, 1977, (1), 87—88.
- [11] 广州中山医学院科仪厂医用激光组, 激光, 1977, (3), 54—62.
- [12] 王联治、曾传相, 科学通报, 1977,(2), 68—72.
- [13] 周志康, 物理, 1976, 5, (1), 79.