

文章编号: 1007-4627(2010)04-0488-05

植物个体远程辐射信号早期传递过程的研究体系创建^{*}

王婷, 李方华, 徐淑艳, 卞坡[#], 吴跃进, 吴李君

(中国科学院离子束生物工程学重点实验室, 中国科学院技术生物与农业工程研究所, 安徽 合肥 230031)

摘要: 自 2005 年以来, 活体中的远程辐射旁效应逐渐成为辐射生物学的研究热点, 然而其早期信号传递过程的相关研究却鲜见报道, 主要原因是由于早期信号传递过程研究所需的旁区与辐射区的自由分离与组合在动物模型上无法实现。本研究是基于植物个体可以切割和嫁接的特性, 借鉴离体细胞培养基转移方法研究旁效应早期过程的思想, 在植物个体上实现旁区与辐照区的“分离”与“组合”, 构建了一种研究个体远程辐射信号早期传递过程的植物实验体系。具体是以模式植物拟南芥菜转基因系(*AtRAD54 promoter::GUS*)为材料, 同源重组修复相关基因 *AtRAD54* 表达水平为生物学检测终点, 人为地将辐照区的组织(或器官)与旁区部分“分离”或“嫁接”, 通过测定旁区组织(或器官)的 *AtRAD54* 基因表达水平变化, 研究其辐射信号传递的早期过程。该研究体系的创建为活体旁效应早期过程的研究提供了一种可行的研究方法。

关键词: 辐射诱导的活体旁效应; 信号传递; α 辐射; 拟南芥菜; *AtRAD54* 基因

中图分类号: Q947.9 **文献标识码:** A

1 引言

近年来, 辐射诱导的旁效应受到愈来愈多的关注, 已成为辐射生物学领域新的研究热点之一。而当前对辐射旁效应的认识主要是利用离体的单细胞培养体系取得的^[1], Nagasawa 等最先用 α 粒子辐照中国仓鼠卵巢细胞时发现不到 1% 的细胞被 α 粒子击中, 却有 30% 的细胞表现出了姊妹染色单体交换(Sister Chromatid Exchange, 简称 SCE)^[2]。旁观者效应被发现后, 研究人员为了不同的研究目的, 发展了多种单细胞研究体系, 如共培养、混合培养和培养基转移等^[3-6]。利用离体细胞系研究旁效应尽管具有很多优点, 但是离体培养的细胞不具备组织和个体的三维形态和广泛的胞间通讯, 不能完全反映组织和活体的生理特点, 因此近年来多细胞三维组织、器官和活体模型被广泛应用于辐射旁效应的研究。Belyakov 等首次利用体外重建的人体三维组织研究了辐射旁效应信号在组织水平上的转导^[7-10], 随后 Koturbash 等报道了旁效应在活体小

鼠中的存在^[11-13]。杨根等用质子微束定点辐照拟南芥菜种胚的茎尖分生组织(Shoot Apical Meristem, 简称 SAM)细胞, 结果显示其远端未受辐照的根尖分生组织(RAM)的发育分化受到了显著的抑制^[14]。使用低能 Ar^+ 辐照完整的拟南芥菜种子非生长点细胞, 同样导致了未受辐照的茎尖和根尖分生组织的发育和分化抑制(种子萌发速度、主根伸长、根毛密度和侧根发育)^[15]。李方华和刘萍等用低能 α 粒子局部辐照拟南芥菜小苗的根部, 在远端未受辐照的地上部分检测到同源重组频率的增加和 *AtRAD54* 基因表达的上调, 从而进一步在高等植物体中演示了辐射诱导的远程诱变效应^[16, 17]。

辐射旁效应的早期过程是旁效应机理研究中的一个重要部分, 涉及到辐射旁效应损伤信号的产生、维持、传递和响应等方面。在细胞培养体系中, 研究人员以快速实时的 DNA 双链断裂作为检测终点分别在离体细胞体系和三维组织上初步演示了辐射旁效应的早期过程。但是 DNA 链断裂只是一个对辐射损伤的响应终点, 并不能反映辐射损伤信号

* 收稿日期: 2010-02-24; 修改日期: 2010-04-13

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10705029); 中国科学院知识创新工程重点方向项目(KJCX2-YW-No34)

作者简介: 王婷(1985-), 女(汉族), 安徽桐城人, 硕士研究生, 从事植物分子生物学研究;

E-mail: wtdaisy@mail.ustc.edu.cn

通讯联系人: 卞坡, E-mail: bianpo@ipp.ac.cn

的产生、维持和传递等早期过程。要回答这些问题,一个很好的方法是在特定的时间点把受辐照的细胞和未辐照的细胞进行物理“隔离”和重新“组合”。离体细胞培养基转移技术为这种研究提供了可能。Zhang Ying 等利用条件培养基转移技术证实受辐照的细胞在条件培养基中处理至少 1 h 以上才能产生足够的旁效应信号来诱导旁细胞的腺苷酸激酶位点的突变,且这种旁效应信号能够稳定地留存于条件培养基中,大约需 12—24 h 信号才会消失^[18]。目前,辐射远程效应已经在多个活体动物模型上得到演示,但尚未见到活体远程辐射旁效应早期信号传递的相关研究报道,其关键是无法在动物模型中实现辐照部分和旁观者部分之间的“隔离”和“组合”。相对于动物模型,植物细胞具有全能性,割离一些器官和组织对其他部位的生理和发育影响很小,如切除叶子、部分根,甚至重要的分生组织都不会导致剩余部分的死亡和过多的生长发育改变,而且离体的组织器官也很容易培养存活。另外,植物的另一个明显特点是可“嫁接”性,其它个体的组织器官能通过“嫁接”在另一个体上正常地生长发育,也就是说,在植物活体中很容易实现不同组织器官的“分离”和“组合”。因此基于活体水平辐射远程效应在植物上的演示,植物应该是一个研究个体辐射远程旁效应早期过程的理想模型。

本文采用模式植物拟南芥菜作为研究对象,以 *AtRAD54* 基因的表达水平作为辐射远程效应的生物学检测终点,研究植物体“剪切”和“嫁接”处理对辐射损伤信号远距离传递的影响,阐明以此操作研

究个体辐射损伤信号传递早期过程的可行性,并建立相应的研究体系。

2 实验材料和方法

2.1 实验材料和生长条件

(1) 实验材料 拟南芥菜 *AtRAD54P::GUS* 转基因系 15-6 #, 由 Dr. Seiichi Toki (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan)^[19] 惠赠。

(2) 生长条件 消毒的无菌拟南芥菜 15-6 # 种子点播在 GM 培养基上(1% 蔗糖, 0.8% 琼脂, MS 盐), 置于 4 °C 冰箱春化 48 h, 随后放置于光照培养箱竖直培养, 培养条件为温度(22±1)°C; 持续光照, 光强约 5556 lux 100 μMm²/s¹。

2.2 α 粒子辐照实验

α 粒子旋转辐照装置(²⁴¹Am, 活度: 7.4 MBq) 为中国科学院离子束生物工程学重点实验室仪器。萌发 8 d 的幼苗从 GM 培养基上被转移到特制的圆环中, 圆环的直径大约为 45 mm, 底部固定有一层 3.5 μm 的 Mylar 膜, α 粒子到达样品的平均能量为 3.3 MeV, 剂量率 1.09 cGy/s。一层 100 μm 厚的铝箔固定在 Mylar 膜下方屏蔽 α 粒子对样品的辐射, 仅在中央部位留有 7 mm 未被遮挡狭缝, 与辐照窗口的直径相当。将拟南芥菜幼苗轻轻地移到 Mylar 膜上并保证根尖位于辐照窗口上方, 而子叶端被铝箔完全屏蔽(如图 1(a)所示)。另外, 在幼苗地上部分的上方和下方各放置一层湿润的滤纸以阻止辐照过程中小苗水分的流失, 滤纸边缘和铝箔边

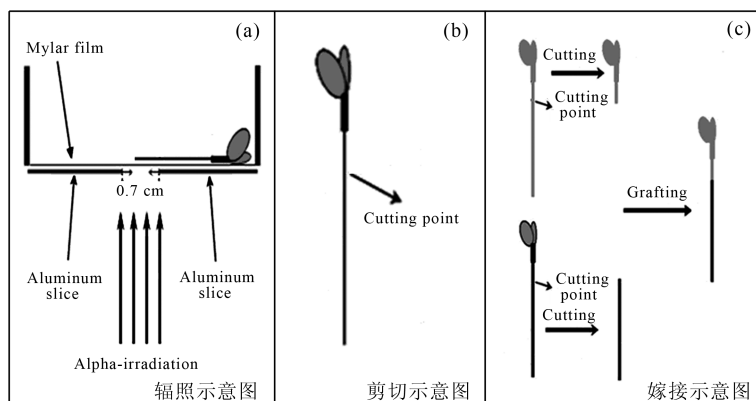


图 1 α 粒子根辐照、根剪切和嫁接处理示意图

(a) α 粒子对拟南芥菜小苗进行辐照处理, (b) 根尖剪切示意图, (c) 根嫁接示意图。

缘齐平。使用 5 Gy α 粒子对根尖部分进行辐照处理后,加入 1 ml 的无菌水到样品环内,以便于小苗从 Mylar 膜上取下。然后将受辐照的拟南芥菜幼苗重新移到 GM 培养基上培养。

2.3 根剪切实验

将拟南芥菜小苗整齐地排列在 GM 培养上,剪根时,剪切位点位于下胚轴以下大约 6 cm,留下少许根部以保证检测前小苗的正常生长,如图 1(b) 所示。剪根后的拟南芥菜小苗地上部分被转移到新的 GM 培养基上,间距为 1 cm。剪根 24 h 后,小苗的根部和下胚轴部分被全部剪除,剩下的部分用作 GUS 酶活性检测,每组设 12 个平行。

2.4 嫁接实验

用锋利的双面刀片沿下胚轴以下大约 6 mm 的根部划开,使其根部和地上部分分开,将断开的根部轻轻用镊子夹起,排列到 GM 培养基上,作为待嫁接的根部,间距为 1 cm;将另一株拟南芥菜小苗沿同样的部位切下,用镊子轻轻夹起其地上部分,摆放到放有断开的待嫁接的根部的 GM 培养基上,并让其末端接在排列好的根部的上端,在 10 倍解剖镜下操作,轻轻用镊子使两个末端紧密连接在一起,如图 1(c) 所示。嫁接 24 h 后,在 10 倍解剖镜下观察,选择连接部位完整的样品的地上植株作为 GUS 蛋白活性检测的对象。

2.5 GUS 活性定量检测与数据统计

将拟南芥菜幼苗的下胚轴和根部移去,剩余部分(真叶、子叶和部分茎)放入到 1.5 ml 的 eppendorf 管中,加入 100 μ l 的 4-MUG 反应液(1 mM 4-MUG, 50 mM sodium phosphate buffer, pH7.0, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% Triton X-100, Sigma), 37 $^{\circ}$ C 水浴 16 h 后,加入 50 μ l 的 Na_2CO_3 溶液(1M)终止反应,每个样品取 100 μ l 反应液加入 96 孔板的酶标板中,酶标仪检测荧光强度(激发光波长 365 nm,发射光波长 455 nm)^[20]。

在本研究中,所有数据均以平均值 \pm 标准差形式给出。群体间差异显著程度利用 Student's t test 计算, $P < 0.01$ 为极显著,在图 2 和图 3 中以“* *”表示。

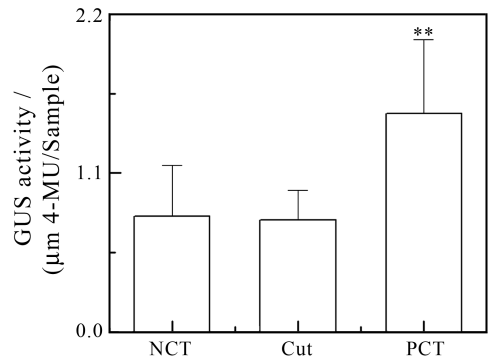


图 2 根的剪切处理能有效阻止辐射损伤信号的根-茎传递
NCT 为对照植株, Cut 为根尖剪切处理的植株, PCT 为根部受到 α 粒子辐照处理的植株。

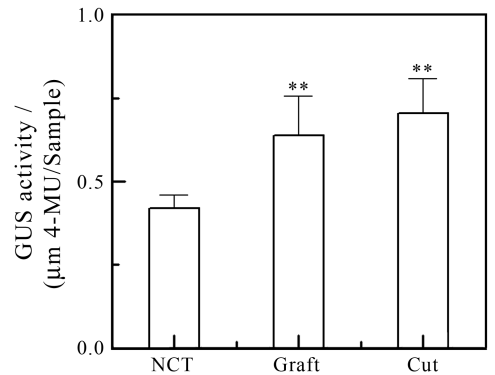


图 3 辐照后根嫁接能够恢复损伤信号根-茎传递
NCT 为对照植株, Graft 为根嫁接处理的植株, PCT 为根部受到 α 粒子辐照处理植株。

3 实验结果

3.1 根剪切以及嫁接对 GUS 基因表达无影响

在本研究中,对拟南芥菜小苗的根进行剪切和嫁接是一项基本的操作,为此首先检测了拟南芥菜根的剪切和嫁接本身是否影响地上植株 *AtRAD54* 基因的表达。结果显示,在检测前对根的剪切(Cut)和嫁接(Graft)处理并不影响地上植株 *AtRAD54* 基因的表达水平,和未作任何处理的对照(NCT)无显著差异(P 值均大于 0.05),如图 4 所示。以上结果表明,操作过程中根的剪切和嫁接处理未对检测终点产生干扰。

3.2 辐照后根的剪切处理可以有效阻止辐射损伤信号的根-茎传递

在确定机械损伤不影响 *AtRAD54* 基因表达后,另一个关键问题是根受辐照部分的剪切处理是否能有效阻止辐射损伤信号的根-茎传递。以 5 Gy

的 α 粒子对拟南芥菜的根尖部分进行辐照后,受辐照的根尖在辐照后立即进行剪切处理,24 h后检测拟南芥菜小苗地上部分 *AtRAD54* 基因表达水平,结果如图 2 所示。剪切后地上植株(Cut)的 *AtRAD54* 基因的表达与未作任何处理的阴性对照(NCT)相比没有明显的差异,而只对小苗进行辐照处理的小苗(PCT)其 *AtRAD54* 基因的表达与NCT相比则有明显的提高。以上结果表明,切根处理可以在可操作的时间尺度内阻止辐射损伤信号的根-茎传递。

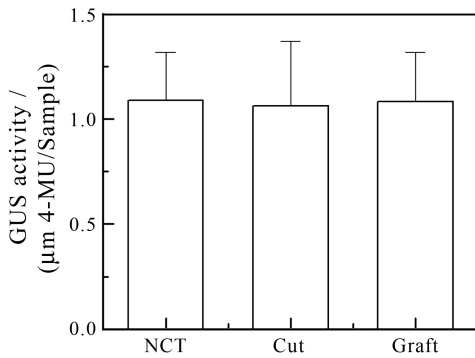


图4 剪根和嫁接处理不影响地上植株 *AtRAD54* 基因的表达水平

NCT为对照,Cut为根尖剪切处理的植株,Graft为嫁接处理的植株。

3.3 根嫁接实验恢复辐射损伤信号的根-茎传递

利用嫁接作为研究植物个体辐射损伤信号早期过程的一个方法,关键在于嫁接能否恢复辐射损伤信号的根-茎传递。在本实验中,对拟南芥菜小苗的根尖部分进行5 Gy的 α 粒子辐射,辐照结束后立刻剪切其受辐照的根部,并立即嫁接上一个新植株的地上部分,24 h后检测地上部分 *GUS* 基因活性。结果如图3所示,根辐照嫁接的小苗地上植株的 *AtRAD54* 基因表达(Graft)与未辐照处理的小苗(NCT)相比有明显的增加,且呈极显著差异($P < 0.01$)而和仅作辐照处理的阳性对照(PCT)相比无显著差异($P > 0.05$)。结果表明,根嫁接处理能够有效恢复辐射损伤信号的根-茎传递。

4 讨论

辐射诱导的旁效应在活体中的研究,特别是其早期过程的研究对于阐明其内在机制和评估辐射治疗风险有更加积极的意义^[21]。本文主要是基于植物个体可以剪切和嫁接的特性以及在已经证明的辐

射远程效应在植物中存在的基础上,创建了一种能够在活体中研究辐射损伤信号早期传递过程的研究体系,阐明了其中可能存在的问题,证明了其在相关研究中的可行性。

该研究体系主要是利用植物可“剪切”和“嫁接”的特性,因此在操作过程中对根的机械损伤是不可避免的。而机械损伤对实验选取的生物学检测终点(*AtRAD54*基因的表达)并没有显著的影响。另外,根尖也是各种激素产生的中心组织器官,切除根时,这些激素的缺失也并未对地上植株的 *AtRAD54* 基因的表达产生影响,一种可能是因为切根和基因表达检测相隔时间较短(24 h),地上植物保持了一定的激素水平,二是 *AtRAD54* 作为DNA链断裂的修复组分之一,对机械损伤信号或者短期的激素水平改变不敏感。

在本研究中,辐射后切根处理可以有效阻断辐射损伤信号的根-茎传递。在 α 粒子辐照装置上,5 Gy的 α 粒子辐照需要大约10 min的时间,说明在这10 min的处理时间内,没有或者没有足以引起地上植株 *AtRAD54* 基因表达上调的损伤信号传递到切割点以上的部分,这使我们可以操作的时间尺度内阻止辐射损伤信号的根-茎传递。另外,在本实验中的根嫁接实验在本质上也不是一种真正意义上的嫁接,因为在实验时段内,在结合的部位并没有形成愈伤组织把根部和地上部分在生理上连接起来。该体系中的嫁接实验是在1%的琼脂糖GM培养基平板上进行的,因此也不能排除在嫁接的界面上辐射损伤信号通过培养基进行传递。

总之,在证明了机械损伤不对远程的 *AtRAD54* 基因表达产生影响,辐照后剪根处理可以有效阻止辐射损伤信号根-茎传递,以及嫁接处理可以恢复辐射损伤信号根-茎传递的基础上,本实验建立的以拟南芥转基因系 *AtRAD54P::GUS* 作为实验材料, *AtRAD54* 基因的表达水平作为检测终点,以短射程 α 粒子为局部辐照源的研究活体辐射损伤信号早期传递过程的研究体系是可行的。

参考文献(References):

- [1] Morgan W F, Sowa M B. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102: 14127.
- [2] Nagasawa H, Little J B. Cancer Res, 1992, 52(22): 6394.

- [3] Lyng F M, Seymour C B, Mothersill C, *et al.* Br J Cancer, 2000, **83**(9): 1223.
- [4] Kashino G, Suzuki K, Matsuda N, *et al.* Mutat Res, 2007, **619**(1-2): 134.
- [5] Azzam E I, De Toledo S M, Spitz D R, *et al.* Cancer Res, 2002, **62**(19): 5436.
- [6] Suzuki M, Zhou H, Geard C R, *et al.* Radiat Res, 2004, **162**(3): 264.
- [7] Belyakov O V, Folkard M, Mothersill C, *et al.* Radiat Prot Dosim, 2002, **99**(1-4): 249.
- [8] Belyakov O V, Folkard M, Mothersill C, *et al.* Br J Cancer, 2003, **88**(5): 767.
- [9] Belyakov O V, Folkard M, Mothersill C, *et al.* Mutat Res, 2006, **597**: 43.
- [10] Belyakov O V, Mitchell S A, Parikh D, *et al.* Proc Natl Acad Sci, 2005, **102**(40): 14203.
- [11] Koturbash I, Rugo R E, Hendrick C A, *et al.* Oncogene, 2006, **25**(31): 4267.
- [12] Koturbash I, Boykoy A, Juarez R R, *et al.* Carcinogenesis, 2007, **28**(8): 1831.
- [13] Koturbash I, Kutanzi K, Hendrickson K, *et al.* Mutat Res, 2008, **642**(1-2): 28.
- [14] Yang G, Wu L J, Chen L Y, *et al.* Radiat Res, 2007, **167**(3): 298.
- [15] Yang G, Mei T, Yuan H, *et al.* Radiat Res, 2008, **170**: 372.
- [16] Li Fanghua, Liu Ping, Wang Ting, *et al.* Radiat Res, 2010, **174**: 228.
- [17] Liu Ping, Li Fanghua, Xu Min, *et al.* Nuclear Physics Review, 2008, **25**(2): 191(in Chinese). (刘萍, 李方华, 徐敏, 等. 原子核物理评论, 2008, **25**(2): 191.)
- [18] Zhang Y, Zhou J, Baldwin J, *et al.* Mutat Res, 2009, **671**: 20.
- [19] Osakabe K, Abe K, Yoshioka T, *et al.* Plant J, 2006, **48**: 827.
- [20] Kirsten Bomblies M B. Quantitative GUS Activity Assay. In: Weigel D, Glazebrook J Eds. Arabidopsis: a Laboratory Manual, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002, 249-252.
- [21] William F M. Radiat Res, 2003, **159**: 581.

Establishment of a Novel Plant Experimental System for Studying early Signaling in Bystander Effect *in vivo*^{*}

WANG Ting, LI Fang-hua, XU Shu-yan, BIAN Po[#], WU Yue-jin, WU Li-jun

(Key laboratory of Ion Beam Bioengineering, Institute of Technical Biology and Agricultural, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: Increasing data have been accumulated for the existence and manifestation of radiation-induced bystander effects (RIBE) in the whole-organism context. However, the early signaling in RIBE *in vivo* has been unclear due to the lack of relevant methodology. In the present study, a novel plant experimental system for studying the early signaling in RIBE *in vivo* was established, in which the expression level of HR-related *AtRAD54* gene was measured as a biological endpoint, and the root cutting and grafting were used to stop and restore the signaling communication from irradiated roots to bystander aerial plants.

Key words: radiation-induced bystander effects *in vivo*; signal transmission; α -irradiation; *Arabidopsis Thaliana*; *AtRAD54* gene

* Received date: 24 Feb. 2010 ; Revised date: 13 Apr. 2010

* Foundation item: National Natural Science Foundation of China(10705029); Knowledge Innovative Project of Chinese Academy of Sciences(KJCX2-YW-No34)

Corresponding author: Bian Po, E-mail: bianpo@ipp.ac.cn