

# 《细胞学讲座》(V)

## 四、细胞周期

韩 甯

(中国科学院动物研究所)

不论是单细胞还是多细胞有机体都需要通过细胞增殖来维持其种族绵延和个体生存。人类也不例外,即使是一个成年人,他亦仍需以大约每秒钟  $20 \times 10^6$  个细胞的速度不断更换新的细胞,而这些形形色色新细胞的出现都是通过细胞分裂后生成的,所以探索有关细胞周期的种种奥秘是生命科学研究中很重要的内容之一。

### 一、细胞周期的概念

体细胞的细胞周期通常是指从细胞一次分裂完成后开始到下一次细胞分裂结束时所经历的过程,其所需要的时间称之为细胞周期时间。严格地说,细胞周期的起始和结束应是在分裂间期的一个点上,这个时间点一般是在间期的早期,在这个点上决定细胞是停止增殖还是进入下一次的细胞分裂。

细胞周期的概念最早是霍华德(Howard)和皮尔克(Pelc)于1951年在研究蚕豆根尖细胞分裂时提出的。在他们用放射性同位素  $^{32}\text{P}$  标记蚕豆根尖细胞的DNA合成时发现,  $^{32}\text{P}$  掺入到DNA的时间是在有丝分裂之前,而且在这两个时相之间还有一个间隔时间。基于这一类研究,便提出了细胞周期的概念用以表达相邻的两次有丝分裂之间细胞所出现的周期性变化,1953年又介绍了细胞周期的四个时相,即将有丝分裂完成到DNA复制之前的时间间隔称为  $G_1$ ( $\text{Gap}_1$ )期;DNA复制时期称S(Synthesis)期;DNA复制完成到有丝分裂开始称为  $G_2$

( $\text{Gap}_2$ )期;整个有丝分裂期称为M(Mitosis)期。M期有时又用D(Division)期来表示。其特征(见图1)。

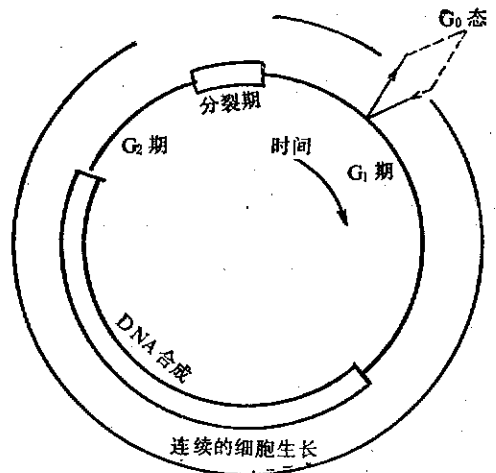


图1 细胞周期的主要特征

1959年夸斯特勒(Quastler)和谢尔曼(Sherman)采用氚标记的胸腺嘧啶核苷( $^3\text{H-TdR}$ )并结合放射自显影术进一步开展有关细胞周期的研究。由于胸腺嘧啶核苷在与细胞接触时具有下述优点:它只特异地参与组成DNA;胸腺嘧啶核苷本身及其降解产物均易为常规固定液所溶解,而DNA在这种情况下则不溶;胸腺嘧啶核苷掺入细胞所需时间很短和氚的能量很低,在生物组织内射程仅为1微米范围所以只能还原出极少数的银颗粒等,从而使标记细胞经放射自显影术处理后定位既明显又准确。方法学上的这一改进极大地促进了细胞周期研究工作的进展,至今仍是常用的研究手

段之一。

按细胞分裂的观点,分裂后的体细胞分为三类:第一类是继续保持分裂能力立即进入第二个周期的细胞,如小肠腺窝上皮细胞等;第二类是细胞生成出来后不再或几乎不再进行分裂的细胞,如神经细胞等;第三类是分裂后处于静止状态的细胞。对于第三类细胞 1963 年拉节瑟(Lajtha)提出了  $G_0$  期的概念用以表达处于既不合成 DNA 也不进行分裂但在刺激原的作用下仍可进入细胞周期的一类细胞。处在  $G_0$  时态的细胞已脱离了细胞周期。大多数细胞类型,退入  $G_0$  期是可逆的,如唾液腺细胞等;也有少数细胞类型则处于不可逆地阻留在  $G_0$  期状态,有人认为神经细胞等就应属于这一类。对于可逆地阻留于  $G_0$  期的细胞类型,后来的研究还指出,细胞被阻留的时间越长,它重新进入细胞周期所需要的恢复时间也越长,而且当它们被阻留相当一段时间以后,甚至连进入细胞周期的可能性也越小。例如离体培养的人胚肺成纤维细胞 WI-38,当它们长满单层出现接触抑制以后,被抑制的时间越长,恢复分裂的所需时间也越长,在分瓶接种细胞后的第五天即刚长满单层后不久,将其解除抑制并用 10% 小牛血清刺激,在刺激后的第 8 小时就起始合成 DNA,而接种后第十八天的细胞经上述同样处理后,则需在刺激后的第 22 小时 DNA 才开始合成。

在发育过程中,单细胞有机体的细胞周期,有时由于主要营养成分的耗竭等环境因素的影响而中断,多细胞有机体中细胞周期的中断则需要更高级的调节过程,然而所有这些因素的活动一般都只能使细胞停止在  $G_1$  期或是  $G_2$  期的一个点上,而不会停止在 S 期和 D 期上。

随着科学研究的进展,对细胞周期的了解也越来越深入。1971 年米奇森(Mitchison)提出了两个细胞周期即生长周期和染色体周期的概念。研究指出这两者的关系很密切,可在抑制任一过程的同时观察到另一过程的变化,如 DNA 合成全部被阻断则细胞生长一段时间后也停下来,相反若细胞缺乏某些营养因素, DNA 合成起始亦可被阻断。1975 年霍尔佛

(Holtzer) 提出了 Quantal cell cycle 的概念。1980 年达赞凯维兹(Darzynkiewicz)等人用流式细胞光度术鉴别出  $G_0$ 、 $G_1$ 、S、和 M 期的细胞后,又提出了细胞周期室的概念。

不同类型的细胞其周期所经历的时间长短亦不相同。大鼠体内淋巴细胞的周期总长约为 12 小时,其中  $G_1$  期约经历 3 小时, S 期约长 8 小时,  $G_2 + M$  的时长约为 1 小时;离体培养人胚肺成纤维细胞 WI-38 的上述各期的历时长分别为 6, 6, 4 和 0.8 小时; Hela 细胞各期时长则分别为 10.5, 10, 4, 和 0.5 小时;至 1975 年止,研究者们已对 71 种组织确定了细胞周期的各期时长。

## 二、细胞周期的同步化

在细胞周期的研究中要测定单个细胞在周期进程中的特性和活性是很困难的,为此需使一大群细胞群体的周期进程同步化。同步系统包括天然发生的和实验诱导发生的二种。海胆卵的最初三分裂是典型的天然同步例子。实验诱导系统又分为选择同步和诱导同步,前者是用物理方法将同一时相的细胞从非同步的群体中分离出来,如用速度沉降法以大小分离细胞,对于某些物种,一定大小等级的细胞在细胞周期中几乎全部都是处在同一位置上;还可借助光学仪器和显微操作技术对特定的细胞个体进行收集;还可以通过利用大多数动物细胞在有丝分裂时多呈圆球状,表面较光滑以及贴壁较间期细胞松散等特点,通过震荡使其脱落而得到一定比例的处于分裂期的细胞。诱导同步是利用控制细胞代谢条件的方法引导细胞进入特定的周期阶段,如用反复热冲击, DNA 合成抑制,氨基酸饥饿以及控制消除接触抑制时间等均可获得相应同步化的细胞,不过用所有这些方法产生的周期同步,维持的时间都很短暂。

## 三、细胞周期的测定

在细胞周期中,  $G_1$ 、S、和  $G_2$  期都是细胞生

长期,只有M是细胞分裂期。分裂期所占的时间比间期短得多。测定细胞周期一般采用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入DNA的放射自显影法,这是一组方法的总原则。 $^3\text{H-TdR}$ 进入机体后,在一系列胸腺嘧啶核苷酸酶的作用下,相继生成一、二、三磷酸胸腺嘧啶核苷,很快掺入DNA并与DNA大分子稳定地接合在一起。 $^3\text{H-TdR}$ 在体内存留的时间很短,大约仅0.5—1小时,此后其浓度下降到可以忽略的程度。在机体注入 $^3\text{H-TdR}$ 后,只有处于S期的细胞才被标记上,这样,随时间之不断向前推移带放射性的细胞可不断前进。标记细胞经过 $G_2$ 期后开始出现标记的分裂细胞,因为当开始时被标记细胞是分布于整个S期,同时每个细胞是在进入S期不同时间被标记的,所以标记细胞向分裂期流入也持续了S期所需要的时间长度。标记分裂百分数峰值出现后将维持一段时间的平坦状态,待到原来处于 $G_1$ 期未被标记的细胞进入分裂期时,标记分裂百分数开始下降,直至当初S期,标记细胞全部脱离M期时数值降为零。接着又开始周期性的循环。这样,标记有丝分裂百分数在设计时间内产生周期的梯型波型,随分裂周期循环一次,这是指细胞群体处于均一状态时的理想情况。在细胞群体中由于个体之间存在着差异,各时相持续时间长短不一致,所以组成细胞群体各时相的参数总是围绕一个平均值的周围呈某种离散。因此,测定时只需在不同时间间隔取材制作自显影标本,追踪标记的有丝分裂相出现的百分数,并以这一百分数为纵坐标,注入 $^3\text{H-TdR}$ 后的取材时间为横坐标作图,绘制出标记有丝分裂相在不同时间间隔上的分布曲线(图2)。再根据曲线即可测知周期中 $G_2$ 、S和整个周期的时长。一部分有丝分裂时间包含在

$tG_2$ 中,有丝分裂时长则可通过公式计算得出。这是一种脉冲标记的测定方法,它还可用于测定离体培养细胞的细胞周期,使用时在加入 $^3\text{H-TdR}$ 后,在不同时间间隔里取出贴附有细胞的小玻片,经洗涤、换液后再加入超过 $^3\text{H-TdR}$ 量100倍的稳定胸腺嘧啶核苷,使成脉冲标记,经放射自显影和染色,追踪有丝分裂百分数的变化情况,测定周期时长。与此相近的方法还有反复或连续标记法,稀释追迹法,双标记法,迁移追迹法等。除此之外还可用测定细胞核DNA含量的办法来进行测定,其中主要包括显微光度术、流式细胞光度术和流式细胞分类术的应用。

对细胞周期各时相长度的表示方法,通常都以T或 $T_c$ 表示整个周期所经历的时间长短,并分别用 $t_{G_1}$ 、 $t_s$ 、 $t_{G_2}$ 和 $t_M$ 表示相应各时相的时长。

#### 四、细胞表面的变化

细胞在通过周期的不同时相时,其表面也发生相应的形态学变化。例如在大鼠细胞中,细胞在由 $G_1$ 期向S期过渡时,细胞的表面突起包括泡、微足和绒毛等均逐渐消失,S期时细胞表面几乎是光滑的,当细胞从S期进入 $G_2$ 期时,微绒毛的数量又不断增加并出现长的微足,有丝分裂时细胞仍大体处在这种情况下。此外,质膜本身还将发生生化上的一些变化。

#### 五、细胞周期中的生化变化

近年研究表明,在周期的各个时相中细胞内发生着复杂的生化变化,特别是分裂间期细胞内的生化活动显得更为重要。 $G_1$ 期生化活动的主要趋向是与准备S期的DNA合成有关。在这一时期中细胞激烈地合成核糖体RNA,信使RNA,转移RNA并由此导致结构蛋白和酶蛋白的合成。 $G_1$ 期的细胞活动如受影响,S期的启动和活动也将受到影响。例如 Ehrlich 腹水癌细胞中有一个对放线菌素D敏感的阶段,放线菌素D会抑制RNA的合成,如果这一步骤

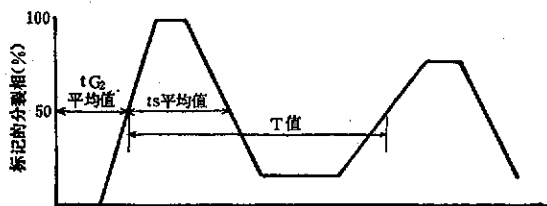


图2 标记分裂指数曲线(小时数)

被抑制,随后的 DNA 合成起始时间也将被推迟;有人报道,在 HeLa 细胞中 DNA 合成开始前一小时生成用于合成组蛋白的信使 RNA,这种 RNA 的缺失也同样导致无法合成 DNA;蛋白质的合成对  $G_1$  期细胞进入 S 期也是不可少的,如果此时将细胞与嘌呤霉素接触 2 小时,则 DNA 合成也将延缓约 2 小时开始。其他生化变化还包括有:在人淋巴细胞系中开始合成免疫球蛋白并一直延续到有丝分裂;在  $G_1$  期即将终了和 S 期的初始阶段细胞中钾含量下降而钠含量上升等。

S 期的活动主要涉及 DNA 合成和与 DNA 有关的组蛋白合成。在 S 期的不同阶段复制的 DNA 其碱基组成有一些差异,在初期阶段出现富含鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)的 DNA,过渡到后期阶段时则出现含有较多腺嘌呤(A)和胸腺

嘧啶(T)的 DNA。从  $G_1$  期后期到 S 期,与 DNA 合成有关的酶的活性都提高,如 DNA 聚合酶,胸腺嘧啶激酶以及脱氧胸苷酸合成酶等。

在  $G_2$  期中, RNA 和蛋白质的合成继续进行,越是接近 M 期合成速率越低,但是如果破坏此合成过程,细胞就不能进入 M 期。有人认为构成纺锤丝微管蛋白在  $G_2$  期合成。

M 期是细胞分裂期,在这一期中 RNA 合成停止,说明基因表达在这一时间不活跃;蛋白质合成速度下降,但其中非组蛋白染色体蛋白仍以与 S 期中相似的速率合成;此期细胞比间期细胞更容易为低剂量的凝集素所凝结,说明在细胞表面上也发生了变化(图 3)。在此期中细胞核结构经过前、中、后、末四个时期以后,细胞核一分为二形成在遗传学上基本等能的两个核,胞质分裂后亲代细胞分裂成两个子代细胞。

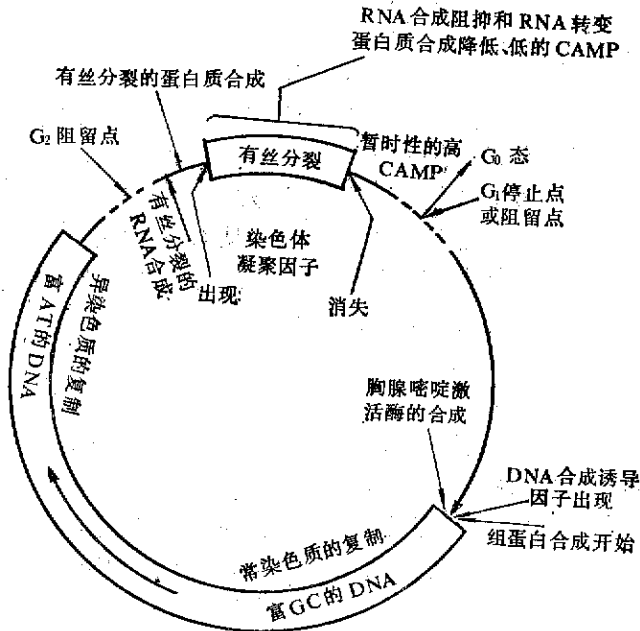


图 3 细胞周期中的基本生化变化图解

## 六、年龄变化对细胞周期的影响

在发育过程中细胞的周期时相长度也有一些差别,例如两栖类动物囊胚期以前的分裂球测不出  $G_1$  期的存在,  $G_2$  期也历时极短有时亦

难以测出,只有在囊胚期的晚期阶段细胞才出现明显的  $G_1$  和  $G_2$  期。小鼠的肾小管区细胞在发育过程中也出现类似的情况。

60 年代以后,由于海弗利克(Hayflick)等人的工作使人们明确地认识到一个正常的二倍体细胞在其整个生存过程中分裂代次是有一定限

制的,也就是说体细胞是有寿限的。细胞经离体培养成株或系后,这些二倍体细胞群体都有一个旺盛分裂的时期,通称II期,而后随分裂代次的增长细胞进入第III期。在III期中细胞由分裂缓慢,周期变长到不再分裂终至死亡脱落。机体内的细胞也同样出现随机体年龄增长细胞增殖能力下降,周期延长的现象。细胞群体从II期进入III期的变化反映了细胞从衰老到死亡的过程,这一研究领域目前已引起越来越多学者的重视和兴趣。进一步研究指出,组成周期的四个时相在周期延长时其表现是不一样的:G<sub>2</sub>期和M期的时间变化不大,受细胞代龄和供体年龄影响的主要是G<sub>1</sub>期和S期的时间长度(见表1)。表1以BDF<sub>1</sub>小白鼠为例说明小白鼠从55日龄成长到1050日龄时整个周期时程从10.1(小时)增长到15.7(小时),而其中的M期时长只摆动在0.7—0.9之间,G<sub>2</sub>时长在0.6—0.9范围中变化,与此相反,S期时长从6.9延长到8.9;G<sub>1</sub>期时长从1.8增长到5.4小时。而且这种变化不是匀速进行的,在小白鼠55—100日龄和675—825日龄之间各有一个突发性的阶段。M期时长虽然没有明显变化,但在其他方面变化还是有的,例如在老年个体中(75—92岁老人)淋巴细胞中染色体紊乱的出现频率要比平均岁数为35岁的青壮年个体高大约5倍。

在研究M期和G<sub>1</sub>期时长时,大量的研究结果还指出:年龄变化主要影响的不是M期时长,而是DNA复制前的一整段时相。此类材料很多,例如在切除不同年龄大白鼠的肝脏后,注射<sup>3</sup>H-TdR并追踪DNA合成高峰出现时间时

表1 日龄变化对BDF<sub>1</sub>小鼠细胞周期时长的影响  
(单位:小时)

日龄	T	t <sub>G<sub>1</sub></sub>	t <sub>S</sub>	t <sub>G<sub>2</sub></sub>	t <sub>M</sub>
55	10.1	1.8	6.9	0.6	0.8
100	13.2	4.8	6.7	0.9	0.8
300	14.1	4.3	8.1	0.8	0.9
675	14.2	4.5	8.2	0.7	0.8
825	15.2	5.4	8.2	0.8	0.8
1050	15.7	5.4	8.9	0.7	0.7

发现,才断奶的大鼠中这时间的出现是在注射<sup>3</sup>H-TdR后的第22小时;同样处理的幼年个体需在第25小时后出现;而1年龄鼠则需在第32小时后才出现高峰时间。相似的结论还可从其他许多实验中见到(见表2)。

表2 年龄对大白鼠唾液腺细胞DNA合成起始和高峰时间的影响

(单位:小时)

细胞来源	刺激后合成DNA的时间	
	起始	高峰
2月龄鼠	18	28
12月龄鼠	24	38

注:刺激原为异丙基肾上腺素。

表2说明大白鼠唾液腺细胞经异丙基肾上腺素刺激后细胞的DNA复制前时相的时长随动物年龄的增长而相应变长。在用其他组织或细胞进行的实验如在切割子宫或乳腺后用雌激素刺激细胞DNA合成;用植物血细胞凝集素(PHA)刺激不同供体淋巴细胞的DNA合成等实验都可以取得年龄变化对周期时长影响的相似结论。DNA复制前时相实际上包括了G<sub>1</sub>期和从G<sub>0</sub>期进入G<sub>1</sub>期所需时间在内的一段时间。衰老对这段时间的影响可能是使细胞从G<sub>1</sub>期退行到G<sub>0</sub>期。

## 七、不同时相细胞的融合

60年代发展起来的细胞融合技术为深入研究细胞周期提供了一条新的途径。研究者们用不同周期时相的细胞进行融合来研究杂交细胞中的DNA合成,有丝分裂同步化,周期时长以及早熟的染色体聚集态等课题。大量事实表明,在由处于G<sub>1</sub>期和S期的Hela细胞所形成的融合细胞中S期细胞核会诱导G<sub>1</sub>期细胞核提前合成DNA,并且S期细胞核的比例越大,诱导G<sub>1</sub>期核的DNA合成就越快。这种剂量效应关系说明,DNA合成的关键依赖于S期细胞的细胞质中诱导因素的浓度。相反,G<sub>1</sub>期细胞核的存在并不抑制S期细胞核的DNA合成。G<sub>2</sub>

期细胞核的存在也不会抑制  $G_1$  期细胞的 DNA 合成活动。在由 S 期核和  $G_2$  期核所组成的多核体中, S 期核继续复制 DNA 但不能诱导  $G_2$  核合成 DNA。同时, 在一个全由  $G_1$  期核组成的多核体中, 不管这些核在融合之前所处的状态, 它们在这一多核体中 DNA 合成几乎是同步的。

研究一个分裂期细胞和一个间期细胞的融合结果也是很有意义的。间期核被诱导提早进入有丝分裂将导致染色体在结构上的许多变化, 这些研究将超出细胞周期本身的研究内容而在非分裂期细胞内显示染色体, 研究间期细胞的染色质分子结构, 分析染色体带谱, 研究外原引起的染色体损害及其修复提供了很有价值的研究途径, 并已展示出广阔的前景。

细胞周期的进程至少部分是取决于基因功能的连续, 其中有一些基因的存在已为突变研究验证过。细胞周期的连续性被认为是基于细胞周期基因组的顺序转录和翻译, 一个已被活化的基因将激活基因组中的下一个基因借此以保持其时间顺序的连贯, 不过迄今为止人们对这一基因组的数量和活动规律仍了解甚少。

在细胞周期四个时相的研究中  $G_1$  期将是研究细胞增殖调控的一个重要着眼点, 因为细胞增殖虽然有时也阻留在  $G_2$  期, 但主要是由  $G_1$  期的中断与否来调节的。

总之, 细胞的增殖和衰亡是生命活动的重要现象, 而细胞的周期性变化又是其中的关键内容, 所以研究、控制、利用细胞的这一特性, 不仅对生物学而且对医学, 农学、畜牧学等都将有重大意义。

## 参 考 文 献

- [1] 叶秀珍 1983 细胞周期与细胞分化。细胞生物学杂志 1983 年专刊, 15。
- [2] 邵伟 1982 细胞周期浅说。细胞生物学杂志(3):, 44—49。
- [3] 薛少白等 1983 细胞周期。细胞生物学杂志 1983 年专刊, 13。
- [4] 陈瑞铭等译 1982 杂种细胞。科学出版社出版。
- [5] 张伟成等译 1980 真核细胞的繁殖。科学出版社出版。
- [6] Baserga, P. L. 1977 Cell division and the cell cycle. Handbook of Biology of Aging, 101—120。
- [7] Yanishevsky, R. M. and G. H. Stein. 1981 Regulation of the cell cycle in Eukaryotic cells. International Review of Cytology, Academic Press Inc. 69: 223—256。