

镉胁迫引起烟草悬浮细胞程序性死亡

支立峰¹, 余涛², 朱英国², 李阳生²

(1. 湖北师范学院生物系, 湖北黄石 435002; 2. 武汉大学生命科学学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 镉胁迫会造成烟草悬浮细胞大规模死亡。通过 TUNEL 技术和琼脂糖凝胶电泳技术的检测发现, 这种细胞死亡伴随有典型的 DNA“梯形带”出现, 表明这种由 Cd 胁迫引起的细胞死亡是一种程序性死亡。受胁迫细胞氧化性增强及细胞中丙二醛(MDA)水平升高, 说明 Cd 胁迫时会在细胞中造成大量活性氧(ROS), 暗示烟草细胞的程序性死亡可能与 ROS 有关。

关键词: 烟草; 悬浮培养细胞; 细胞程序性死亡(PCD); Cd 胁迫; 活性氧(ROS)

中图分类号: Q942.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)05-0403-05

Programmed Cell Death of Tobacco Suspension Cultures Induced by Cd

ZHI Li-Feng¹, YU Tao², ZHU Ying-Guo², LI Yang-Sheng²

(1. Department of Biology, Hubei Normal University, Huangshi, Hubei 435002, China;

2. Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Heavy metals can occur the large-scale cell death of tobacco suspension cultures. TUNEL study and genomic DNA gel electrophoresis showed that this kind of cell death was accompanied by PCD-specific DNA ladder. This result supports that cell death caused by Cd is a kind of programmed cell death (PCD). We have also found that the oxidative and the malondialdehyde (MDA) levels of the stressed cells were enhanced in PCD process, this phenomenon shows that the reactive oxygen species (ROS) in the stressed cell was increased. This suggests that the PCD of tobacco cells are tightly linked to the ROS.

Key words: Tobacco; Suspension cells; Programmed cell death (PCD); Cd stress; Reactive oxygen species (ROS)

细胞程序性死亡(PCD, 或称细胞凋亡)是指细胞在其内环境保持稳定的情况下, 由基因控制的细胞自主的有序死亡^[1], 它不同于一般的细胞坏死。染色质浓缩、胞质收缩、核 DNA 被切割成核小体倍性大小的 DNA 片段以及凋亡小体的产生等是 PCD 的典型细胞学和生化特征^[2]。利用这些指标可以将 PCD 与一般细胞坏死区分开来。对 PCD 的认识和研究最初是受到两栖动物变态现象的启发。因此, 动物发育过程及遭受不利环境胁迫所引发的各种 PCD 现象被人们广泛关注和研究。与动物细胞相比, 对植物细胞 PCD 的研究只是最近十几年的事情。科学家们已经在植物的许多生命现象, 如落叶、花败、病原菌入侵以及不利环境胁迫等中观察到与动物细胞 PCD 相似的一些典型特征^[3~6]。但对这些过程的遗传性基础仍不是很清楚。在动物中已经阐明线粒体在细胞凋亡中起着决定性作用。细胞色素 c(Cyto-c)的释放、半胱氨酸蛋白酶(caspases)的

激活、胞浆 Ca²⁺浓度的升高、ATP 产量的下降以及过量活性氧(ROS)的产生等生化事件都说明了线粒体在 PCD 中的中心作用^[7~9]。近来对植物 PCD 的生化与分子生物学研究, 发现植物线粒体在环境和发育信号发起细胞死亡的过程中也起决定性作用^[10]。最近在植物线粒体膜间隙中发现了一个与 PCD 过程相关的 DNase^[11]。许多报道也揭示了过量 ROS 与植物 PCD 之间的密切关系^[12~14]。

近年来工业、矿业生产中制造的大量重金属被释放到环境中, 镉(Cd)是其中之一。Cd 胁迫成了各种生物所面临的一种新的挑战。植物和藻类细胞虽然可以耐受一定量的 Cd 胁迫, 但如果环境中 Cd 浓度太高也会造成它们的大量死亡^[15]。在分子水平, 镉能够影响巯基(-SH)和金属螯合键的形成和分离、蛋白质二级结构和细胞内氧化还原状态的改变, 以及影响植物对其生长所必须的金属元素的吸收、转移和代谢^[16]。另外, 在生物体内镉能使在氧

化还原或电子转移过程中发挥重要作用的金属蛋白发生毒化,致使自由基增多,导致蛋白质、脂类及其它生物分子发生非特异性破坏^[17]。但对于镉胁迫引起植物细胞死亡的机制依然不明。本研究以遭受 Cd 胁迫的烟草悬浮培养细胞为材料,阐明了烟草细胞受 Cd 胁迫后的死亡是典型的 PCD,并且初步证明 Cd 胁迫造成烟草细胞 PCD 的更深层次原因可能是由 Cd 胁迫产生的 ROS。

1 材料和方法

1.1 烟草悬浮细胞系的建立

将培养的烟草(*Nicotiana tabacum* cv. SRI.)无菌苗下胚轴切段,用酒精清洗 20 min,接种入 MS 固体培养基上,诱导胚性愈伤组织。取生长旺盛的胚性愈伤组织 2~3 g,转移到盛有 20 mL AA 液体培养基(pH 5.8,附加蔗糖 30 g/L, 2,4-D 2 mg/L, 激动素 0.2 mg/L, 赤霉素 0.1 mg/L)的 100 mL 三角瓶中,在回旋式摇床上进行振荡,摇床转速为 120~140 r/min,温度为(25±1)℃,黑暗培养。悬浮培养初期每隔 3 d 继代换液一次。45 d 后,吸取 10 mL 悬浮细胞转入含 40 mL 新鲜培养基的 250 mL 三角瓶中,每隔 7 d 继代换液一次。由此得到分散均匀、细胞细小的胚性悬浮细胞系。

1.2 镉(Cd)胁迫处理及细胞生长情况测定

在 40 mL 新鲜培养基中预先加入 50~100 μmol/L 重金属 Cd,121℃灭菌 25 min,然后将正常培养 7 d 后的烟草胚性悬浮细胞转入此培养基中进行胁迫处理,然后观察悬浮细胞的生长状况以及测定细胞生长量。

细胞生长量的测定参照 Sager 等^[18]的方法来计算。

1.3 丙二醛(MDA)检测

细胞中 MDA 的检测采用 Hodges 等^[19]的方法。取 1 L 匀质培养物,经 800 g 离心 5 min,收集细胞,用 25 mL 80% 乙醇萃取。取 1 mL 萃取物加入到含有 1 mL 20% (W/V) 三氯乙酸(TCA)、0.01% 丁基化羟基甲苯和 0.65% 硫代巴比妥酸(+TBA 溶液)的试管中,用力振荡使溶液充分混合,95℃ 加热 25 min,冷却,3 000 g 离心 10 min,取上清液,分别测其在 440、532 和 600 nm 的吸收值。MDA 浓度的计算公式参照文献[19]。

1.4 谷胱甘肽(GSH)和还原型谷胱甘肽(GSSG)的测定

细胞抽提物中 GSH 和 GSSG 的测定采用 An-

derson^[20]的方法:取 1 L 匀质培养物,经 800 g 离心 5 min,收集细胞,用液氮冻融,每克鲜重加入 5 体积 5% 5-碘基水杨酸。冻融过程重复 3 次以彻底破裂细胞,20 000 g 离心 10 min,去除细胞碎片,溶液中的非蛋白硫醇(thiol)水平用分光光度计进行检测,以含有 GSH 的 Ellman 试剂(Sigma 公司)做参照。用 2 μmol/L 2-乙烯基吡啶衍生 60 min 后可以测定 GSSG 的水平。样品中总 GSH 水平减去氧化态 GSSG 水平可以得到还原态 GSH 水平。

1.5 TUNEL 检测

取对数生长期的正常培养和胁迫处理的烟草细胞(约 5×10⁶ 个/mL),细胞爬片,用 4% (W/V) 多聚甲醛溶液于室温固定 30 min, PBS 缓冲液洗 2 次,每次 5 min。立即滴加 TdT 酶缓冲液,室温放置 5 min,后随即滴加 50 μL TdT 酶反应液(TdT 酶和 FITC 标记的 12-dUTP 分别为 5 μL 和 45 μL, Promega),置湿盒中于 37℃ 孵育 1 h, PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min。再滴加新鲜配置的 0.05% DAB/H₂O₂ 溶液,室温显色 5~10 min(镜下控制显色时间),用蒸馏水洗 4 次,前 3 次每次 1 min,最后 1 次 5 min。最后用苏木素复染 5 min,二甲苯透明 2 次,每次 1 min,中性树胶封固。Olympus 荧光显微镜观察并照相。

1.6 DNA 分离和琼脂糖凝胶电泳检测

DNA 的提取按 CTAB 法进行。将悬浮细胞倒入 48 mL 离心管中,800 g 离心 5 min。在液氮中迅速研磨成均匀的粉末,之后把粉末倒入含有 2.5 mL 预热 CTAB 缓冲液的离心管中进行 DNA 提取。将得到的 DNA 沉淀溶解于 200 μL TE 缓冲液中,加入 5 μL RNase(10 mg/mL),37℃ 保温 30 min。上述实验操作除 RNA 消化外,其余步骤均在冰盒中进行。

取 10 μL/道 DNA 加样,1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,滴加 0.1 μg/mL EB 染色,用凝胶成像系统观察并记录。

2 结果

2.1 Cd 的胁迫处理可引起烟草悬浮细胞大量死亡

正常培养的烟草胚性悬浮细胞颜色呈黄色,很鲜艳。而当将它们转入含有 100 μmol/L Cd 的培养液中进行培养后,细胞就会大量死亡,到第 7 d 时,培养物呈黑褐色。取培养 3 d 的烟草细胞测其生长量(见图 1),经 100 μmol/L Cd 胁迫处理的培养物,其细胞含量较初始接种量不升反降;而未用 Cd 胁迫的对照组培养物,其细胞较初始接种量增加了近 80%,

较处理组细胞高一倍多。这表明毒性重金属 Cd 的胁迫处理可引起烟草悬浮细胞的大规模死亡。

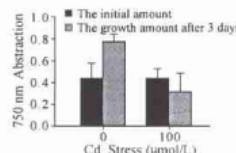
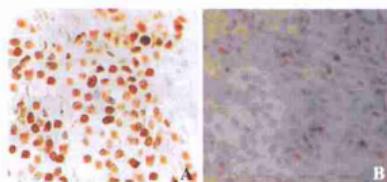


图 1 正常和胁迫培养烟草细胞生长量测定结果

Fig. 1 The growth amount of tobacco cell under normal and stressed cultivate

2.2 TUNEL 检测和 DNA 片段化

Cd 的胁迫如果引起烟草细胞的程序性死亡,那么一个很重要的标志就是核 DNA 的片段化。因此我们采用 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术 (TUNEL) 和琼脂糖凝胶电泳技术对培养 3 d 的正常细胞和胁迫细胞进行检测。TUNEL 技术是利用脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 将异硫氰荧光素 (FITC) 标记的 12-dUTP 连接到 DNA 片段的粘性 3'-OH 末端。当细胞发生程序性死亡时,染色体 DNA 会发生断裂而产生大量的粘性 3'-OH 末端,从而可以被标记(见图 2:A),而正常的或增殖细胞由于 DNA 的完整性通常不能被标记(见图 2:B)。



A. 受胁迫烟草细胞; B. 正常培养细胞
A. The stressed cell; B. Normal cultivated cell

图 2 TUNEL 技术检测 DNA 断裂情况

Fig. 2 The DNA fragment measured by TUNEL

琼脂糖凝胶电泳技术也是检测 DNA 片段化的方法,与 TUNEL 一起可以进一步确定细胞程序性死亡。因为细胞程序性死亡时,在内源性核酸内切酶的作用下,染色体 DNA 在核小体间被切割成 180 ~ 200 bp 整数倍的单或寡核苷酸片段,在电泳时会表现为特征性的 DNA “梯形带”(DNA Ladder)。基于此,我们提取了培养 3 d 的正常细胞与胁迫细胞的基因组总 DNA,然后做琼脂糖凝胶电泳。结果如图 3 所示,在经 Cd 胁迫处理的细胞中出现了 PCD 特

征性的 DNA “梯形带”,其中最小的片段与核小体 DNA 的大小接近($\geq 180 \text{ bp}$)。而正常培养细胞中未检测到这种现象。



M. Marker; 1 - 2. 正常培养细胞; 3 - 5. 分别为 50, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ Cd 胁迫处理细胞

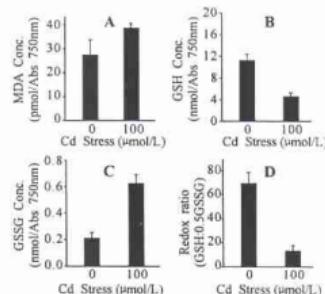
M. Marker; 1 - 2. Normal cultivated cell; 3 - 5. Stressed cell separately 50, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ Cd

图 3 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 The agarose gel electrophoresis of tobacco DNA

2.3 受胁迫细胞中 GSH 水平降低、MDA 水平升高

为了进一步弄清镉胁迫引起细胞程序性死亡的可能机制,我们对培养 3 d 的正常细胞和胁迫细胞的 GSH 水平及 GSH/GSSG 比率进行了检测。当细胞受毒性镉胁迫时,细胞内 GSSG 的水平较正常培养细胞增加了 3 倍(见图 4:C)。同时细胞中还原型和氧化型 GSH 比(GSH: 0.5GSSG)较正常细胞明显下降 4 倍(如图 4:D)。这些数据说明,受胁迫细胞胞质的还原性要强于正常细胞。



A. 细胞 MDA 含量比较; B. 细胞 GSH 含量比较; C. 细胞 GSSG 含量比较; D. 细胞还原/氧化比(GSH: 0.5GSSG)的比较

A. Comparison of MDA concentrate; B. Comparison of GSH concentrate; C. Comparison of GSSG concentrate; D. Comparison of GSH: 0.5GSSG

图 4 正常培养和胁迫处理细胞的 MDA 含量和细胞氧化还原状态(GSH: 0.5GSSG)

Fig. 4 The MDA concentrate and GSH: 0.5GSSG of normal and stressed cell

受胁迫细胞中 GSSG 水平增加,说明在毒性镉的影响下,细胞中产生了很多氧化物质。已有的研究证实镉的确能够破坏正常电子转移过程而引起细胞中 ROS 水平的增加。因此我们推测受胁迫细胞

中产生的氧化物质很可能为 ROS。为此,我们对正常细胞和胁迫细胞的丙二醛(MDA)水平进行了检测。MDA 是脂类受 ROS 过氧化反应后的产物,MDA 水平可以反映细胞中 ROS 的状况。当用 100 μmol/L 毒性镉处理后,受胁迫细胞中 MDA 水平较正常细胞提高近 70%。这反映了受 Cd 胁迫后,会造成烟草细胞中 ROS 的大量增加,ROS 的增加使得细胞质氧化性增强(图 4:A)。

3 讨论

烟草悬浮细胞受 Cd 胁迫后会发生大规模死亡。对受胁迫细胞进行 TUNEL 检测,观察到大量阳性结果(图 2:A)。细胞总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果表明,这种细胞死亡伴随有明显的 DNA“梯形带”(图 3)出现,同时受胁迫细胞氧化还原状态发生很大逆转(图 4:D)。这些现象充分说明由重金属镉胁迫引起的大规模细胞死亡是一种 PCD。

在动物细胞 PCD 的研究中发现,线粒体膜电势的功能失调会导致细胞 ATP 产量的下降,引发 ROS 的增加,又进而导致细胞的 PCD^[21,22]。这暗示细胞程序性死亡与内源性 ROS 增加造成的伤害有紧密联系^[12]。在植物和动物细胞中,ROS 是一种很重要的信号分子^[23]。在动物细胞中许多证据都已表明,ROS 是直接或间接引发细胞凋亡的因素^[24,25]。近来,也有研究报道 ROS 在植物细胞的 PCD 过程中发挥重要作用^[12,10]。ROS 被看作是超敏反应、干旱冷害胁迫及衰老过程中植物细胞死亡的关键介质。植物对病原菌的超敏反应就是由于 ROS 的增加激活了防御系统,同时也引起了植物细胞的 PCD。而且深入的研究表明,如果细胞清除 ROS 毒害的能力降低,那么在超敏反应过程中由病原菌所致的 PCD 就会加强^[13]。在我们的研究中发现,镉的胁迫造成了细胞内氧化性增强、还原性降低(即 GSH:0.5GSSG 降低),而通过对细胞中 MDA 的检测,证实造成细胞氧化性增强的原因是由于细胞内 ROS 的大量产生。这暗示 ROS 很可能是 Cd 胁迫引起细胞凋亡的直接原因。

综上所述,我们首次揭示了 Cd 胁迫引起烟草细胞的大量死亡是一种 PCD,而不是细胞坏死;而主导烟草细胞 PCD 的很可能不是 Cd 元素本身,而是由 Cd 胁迫细胞中产生的大量 ROS。至于 ROS 是通过什么样的信号途径引发 PCD 过程,这个信号途径与动物细胞中的信号途径是否一致,这些问题有待进一步研究。

参考文献:

- [1] deJong A J, Elena T Y, Veneta M K, Ernst J W. A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells [J]. *Planta*, 2002, **214**: 537–545.
- [2] McCabe P F, Leaver C J. Programmed cell death in cell culture [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, **44**: 359–368.
- [3] Richberg M H, Aviv D H, Dangl J L. Dead cells do tell tales [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, **1**: 480–485.
- [4] Levine A, Pennell R I, Alvarez M E, Palmer R, Lamb C. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response [J]. *Curr Biol*, 1996, **6**: 427–437.
- [5] Beers E. Programmed cell death during plant growth and development [J]. *Cell Death and Differentiation*, 1997, **4**: 649–661.
- [6] Lam E, Pontier D, Pozo O. Die and live: programmed cell death in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, **2**: 502–507.
- [7] Cohen G, Farooqui R, Kesler N. Parkinson disease: a new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow [J]. *PNAS*, 1997, **94**: 4890–4894.
- [8] Green D R, Reed J C. Mitochondrial and apoptosis [J]. *Science*, 1998, **281**: 1309–1312.
- [9] Eason J R, Ryan D J, Pinkney T T, O'Donoghue E M. Programmed cell death during flower senescence: isolation and characterization of cysteine proteinases from *Sandersonia aurantiaca* [J]. *Plant Biol*, 2002, **29**: 1055–1064.
- [10] Jones A. Does the plant mitochondria integrate cellular stress and regulate programmed cell death? [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, **5**: 225–230.
- [11] Balk J, Chew S K, Leaver C J, McCabe P F. The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death [J]. *Plant J*, 2003, **34**: 573–583.
- [12] Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1999, **57**: 231–245.
- [13] Mittler R, Her E H, Orvar B L, Camp W, Wilkens H, Inze D, Ellis BE. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection [J]. *PNAS*, 1999, **96**: 14165–14170.
- [14] Fath A, Bethke P C, Jones R L. Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone [J]. *Plant Physiol*, 2001, **126**: 156–166.
- [15] di Toppi L S, Gabbielli R. Response to cadmium in higher plants [J]. *Environ Exp Bot*, 1999, **41**: 105–130.
- [16] Sandalio L M, Dalurzo H C, Gómez M, Romero-Puertas M C, del Río L A. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants [J]. *J Exp Bot*, 2001, **52**: 2115–2126.
- [17] Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold D L, Polle A. Cadmium-induced changes in antioxidative system, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots [J]. *Plant Physiol*, 2001, **127**: 887–898.

- [18] Sager R, Granick S. Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1953, **56**:831–838.
- [19] Hodges D M, DeLong J M, Forney C F, Prange R K. Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds [J]. *Planta*, 1999, **207**:604–611.
- [20] Anderson M E. Tissue glutathione [A]. In: Greenwald R A ed. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* [C]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985. 317–323.
- [21] Bergman P, Edqvist J, Farbos I, Climelius K. Malesterile tobacco displays abnormal mitochondrial atp1 transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, **42**: 531–544.
- [22] Tiwari B S, Belenghi B, Levine A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death [J]. *Plant Physiol*, 2002, **128**:1271–1281.
- [23] Cimino F, Esposito F, Ammendola R, Russo T. Gene regulation by reactive oxygen species [J]. *Current Topics in Cellular Regulation*, 1997, **35**:123–148.
- [24] Saraffian T A, Bredeisen D E. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? [J]. *Free Radical Res*, 1994, **21**:1–8.
- [25] Herrera B, Alvarez A M, Sanchez A. Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondria-dependent apoptosis induced by transforming growth factor β in fetal hepatocytes [J]. *FASEB J*, 2001, **15**:741–751.

《世界科学技术——中医药现代化》2007年征稿征订启事

《世界科学技术——中医药现代化》是一本反映我国中医药现代化理论和实践的最新科学研究成果、探索多学科理论和技术在中医药领域的现代应用、为本领域前沿科学工作者提供学术研讨平台、为相关企业提供新技术资源的专业性学术期刊,2005年获得科技部中国科技核心期刊认证,同时被中国科技论文统计源期刊、《中文科技期刊数据库》、CAJ-CD、CNKI、CMCC等收录。

主要内容:前沿科学发展和交叉学科探索,国家中药现代化国际化科技目标、战略和政策,最新的技术成果和进展,国际规范与世界科技动向,新思路新方法,中国传统药物研究现状、成果、优势和发展趋势等。

杂志以营造创新氛围,孕育优秀科学家和杰出科学成就为根本任务,注重中医药学科与其它自然科学学科在研究思路方面的衔接与结合,是汇聚新兴交叉学科和创新思路的理想讲台。

本刊为双月刊,ISSN 1003-1898, CN11-1733/N

邮发代号:2-534,每期定价25元,全年定价150元

地址:北京市海淀区中关村东路55号 中科院基础园思源楼5层,邮编:100080

电话:010-62616352, 62652762(Fax)

网址:<http://www.wst.ac.cn>, E-mail:wst@casipm.ac.cn