

大麦糊粉层细胞程序化死亡的调控

钟希琼* 陶 均** 李 玲**

(* 佛山科学技术学院农学系 南海 528231 ** 华南师范大学生命科学学院 广州 510631)

摘 要 细胞程序化死亡存在于植物生长发育的各个阶段。本文简要介绍了大麦糊粉层细胞程序化死亡和一些活性因子的调控作用。赤霉素(GA)促进离体大麦糊粉细胞或原生质体的程序化死亡,脱落酸(ABA)拮抗赤霉素的作用; H_2O_2 能使GA处理的糊粉层细胞死亡加快;一氧化氮(NO)延缓糊粉层细胞死亡,起到抗氧化剂作用。

细胞程序化死亡(Programmed cell death, PCD)是一种由特定基因控制的主动的有序的细胞死亡过程。植物体内细胞存活与死亡是由植物自身发育阶段所提供的遗传信息或由邻近细胞和环境提供的信号决定的。PCD是植物发育及对环境应答反应中一种必要的过程。一方面,在某种情况下这些死细胞在植物体中起着重要作用,如维管系统的形成、缺氧条件下根皮层细胞死亡形成通气组织、病原物侵染处局部的细胞死亡,即超敏反应(hypersensitive response, HR)。另一方面,PCD消除那些完成自身使命后对植物体不再有用的细胞,如种子萌发后糊粉层细胞、花粉管生长后花柱引导组织等^[1]。

随着荧光显微技术和末端脱氧核糖核酸转移酶介导的3'-OH末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)技术的应用和发展,植物PCD研究成为新的热点。国外对谷类作物糊粉层PCD的研究多以大麦为材料^[2~9],本文对近年来大麦糊粉层细胞程序化死亡及其调控的研究作一综述。

一、大麦糊粉层的细胞程序化死亡

谷类作物种子发育过程中胚乳分化为淀粉性胚乳和糊粉层,糊粉层细胞有较强生活力,在种子萌发和幼苗形成过程中,糊粉层合成多种水解酶并分泌至淀粉性胚乳中,分解胚乳的贮藏物质,为胚的生长提供营养。在完成分泌作用后,糊粉层细胞渐趋死亡。Wang等^[2]发现正趋于死亡的大麦糊粉层细胞胞质浓缩,经琼脂糖凝胶电泳出现梯状DNA条带(DNA Ladder),TUNEL实验表明死亡细胞的核内富含游离3'-OH的DNA片段,说明糊粉层细胞解体具有PCD特征。

但是,Fath等^[3,4]观察到正趋于死亡的大麦糊粉层细胞中不出现核小体间的DNA断裂、细胞膜反折呈泡状突起、凋亡小体的形成等生化和形态学

特征;而是表现出质膜完整性丧失、并伴随着核酸酶和蛋白酶活力增加和细胞器消失,类似细胞自溶。因而,发生PCD的植物细胞可能会出现既非典型凋亡,也非坏死的形态学和/或生化改变,即非凋亡的程序化细胞死亡的特征。

二、激素和活性氧参与调控糊粉层细胞程序化死亡

活体糊粉层细胞死亡受胚的时空控制,靠近胚的糊粉层细胞最先发生死亡,随着时间延长,远离胚的糊粉层细胞死亡,很可能与胚产生的植物激素GA和ABA相互拮抗有关。Bethke等^[5,6]离体实验结果表明,在含脱落酸(ABA)的培养基中糊粉层原生质体至少能存活3周,而在含赤霉素(GA)的培养基中培养,在4-8天内超过70%的原生质体死亡。目前认为GA促进糊粉层细胞水解酶的分泌并触发PCD,而ABA抑制水解酶的分泌和PCD过程。

在激素调控大麦糊粉层细胞死亡过程中,活性氧(reactive oxygen species, ROS)起着一定作用。糊粉细胞或原生质体用含外源 H_2O_2 的培养基培养,或用UV-A光源照射,细胞内 H_2O_2 大量产生,其结果都表明 H_2O_2 使GA处理的糊粉层细胞快速死亡,但不会引起ABA处理的糊粉层细胞死亡。因而,GA处理的大麦糊粉层对 H_2O_2 更敏感。Fath等^[7,8]认为这种敏感性是ROS清除能力下降的结果。在ROS的代谢过程中,有多种酶参与ROS的清除,主要有超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和过氧化氢酶(CAT)等。GA处理的糊粉层中,编码CAT、APX和SOD的mRNAs丰度下降;酶蛋白含量和活性显著下降,最终导致氧化性损伤,细胞死亡。抗氧化剂丁化羟基甲苯(butylated hydroxy toluene, BHT)可以减慢这

* 通讯联系人。E-mail: hgmzh@21cn.com

种死亡的速率。ABA处理的糊粉层中,编码CAT的mRNA丰度稍有上升,APX和SOD的酶蛋白含量较高,细胞仍然存活。

活性氧是生物体正常代谢的产物。糊粉层细胞缺少叶绿体,活性氧来源于线粒体和过氧化物酶体(乙醛酸循环体)。诱导植物PCD的活性氧主要是过氧化氢(H_2O_2)和超氧化物阴离子($O_2^{\cdot-}$)^[10]。 H_2O_2 是目前研究得较为深入的一个氧化胁迫的刺激子(stimulon),在细胞内存活时间较长,能够迅速通过细胞膜进行长距离扩散和运输,可能是植物体内一种细胞信号传递物质^[11,12]。 H_2O_2 能诱导细胞质 Ca^{2+} 浓度瞬时升高, Ca^{2+} 浓度升高直接激活依赖 Ca^{2+} 的核酸内切酶,使DNA在核小体间连接区域被切断,产生典型DNA断裂片段。GA处理的糊粉层细胞质 Ca^{2+} 浓度升高,而蛋白质磷酸酶抑制剂——冈田酸(okadaic acid, OA)能阻断 Ca^{2+} 通道,抑制由GA诱导产生的糊粉层细胞PCD^[13]。

由此看来,激素或ROS可能是植物PCD的上游信号,在刺激—效应偶联中致使胞质 Ca^{2+} 水平升高,引起下游的一系列反应,最终导致细胞死亡。在各种实验条件下,抗氧化剂和抗氧化酶对PCD的引发都具有抑制作用,但ROS究竟是PCD的引发者还是其中的一个作用因子尚不清楚。

三、一氧化氮在糊粉层细胞程序化死亡中的作用

Beligni等^[9]研究发现一氧化氮(nitric oxide, NO)供体硝普钠(Sodium nitroprusside, SNP)或S-亚硝基-N-乙酰青霉胺(S-nitroso-N-acetyl penicillamine, SNAP)使GA处理的大麦糊粉层PCD过程推迟至少12h,而不抑制GA诱导的 α -淀粉酶的合成和分泌,NO清除剂cPTIO逆转NO供体对细胞生活力的效应,说明这种效应是NO特有的。抗氧化剂BHT对糊粉层细胞生活力的效应类似于NO供体。GA处理的糊粉层中CAT和SOD的mRNA和酶蛋白含量明显降低,NO供体存在时延迟CAT和SOD的丧失。NO可能起到保护细胞免受氧化胁迫的作用。

Pedroso等^[14]发现对分离或培养的大叶落地生根(*Kalanchoe daigremontiana*)和短叶紫杉(*Taxus brevifolia*)细胞进行离心处理(作为一种超重胁迫),胞内NO含量爆发性升高,随后出现核内DNA断裂和细胞程序化死亡。SNP处理也产生相似作用。

用一氧化氮合酶(NOS)抑制剂L-NMMA可以显著降低上述处理过程中的NO产量,以及DNA断裂和细胞PCD程度,表明NO参与了胁迫条件下植物的PCD。据报道,NO能诱导拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[15]和甜橙(*Citrus sinensis*)^[16]悬浮培养物发生PCD。

由于NO在植物细胞中可能有氧化与抗氧化双重作用,关系到NO产生速率和NO与活性氧的相互作用。有人认为NO是致毒还是起保护作用取决于胞内环境。当NO持续产生、浓度较高时,可能促进PCD,对细胞产生毒性。当胞内活性氧浓度较高时,低浓度或生理浓度的NO中断活性氧诱发的链式反应,或通过某种保护基因的表达来抑制PCD,对细胞反而起保护作用^[17,18]。

四、结束语

PCD是一系列导致细胞解体的分子级联活动,受细胞内外多种信号系统的诱导。各种诱导细胞程序化死亡的诱导因子和阻止细胞程序化死亡的存活因子作用于此级联反应的不同环节。激素、活性氧和一氧化氮都在糊粉层细胞程序化死亡中起作用,但它们在级联反应中作用的确切位点和它们之间的相互关系还有待揭示。

于明革等^[19]将植物PCD过程分为三个阶段:决策期、发动期和执行期。在决策期,细胞个体接受胞内外各种信号,并对是否继续存活作出决定。发动期是由激素、ROS、 Ca^{2+} 和水杨酸(Salicylic acid, SA)等信号联合参与的复杂过程。细胞结构解体的过程在执行期完成,这个时期的特征有:典型DNA梯状条带、细胞器有序消失等。有报道指出,NO是植物体内的信号分子之一^[12,20,21],它可能在PCD发动期起作用,与各种信号分子之间进行网络状的“交谈”(cross talk),但NO信号传导和代谢的分子机理仍不清楚^[22],有些实验结果相互矛盾:Delledone等^[23]发现NO能增强内源活性氧诱发的大豆悬浮细胞死亡过程,而Beligni等^[24]研究NO用于马铃薯叶片保绿的实验中发现,NO可抑制一种自由基产生剂——甲基紫精诱导的马铃薯叶片叶绿素的降解,表明NO有中和植物细胞中活性氧自由基的作用。由于细胞信号传导和代谢的复杂性,加之研究中所使用的NO供体的种类和浓度、实验材料和培养体系、检测技术和条件的不一致,都可能得出不同的结论。因此,对于NO对植物的作用及机理有待进一步研究。

植物生长发育各阶段发生的特定的、局部的细胞程序化死亡这种生命现象是物种进化、功能建成和抵御外界伤害所必需的。但为什么植物中的某些细胞死亡时,其周围细胞仍然存活?阐明植物 PCD 的诱发因子、信号传导途径有一定理论意义,如能用于指导农业生产,那么在如何增强植物抗旱、抗病和抗逆境能力等方面将有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 华志明等,1998,生物工程进展,18:32-36.
- [2] Wang, M. et al., 1996, *Plant Mol Biol*, 32:1125-1134.
- [3] Fath, A. et al., 1999, *Plant J*, 20:305-315.
- [4] Fath, A. et al., 2000, *Plant Mol Biol*, 44:255-266.
- [5] Bethke, P. C. et al., 1999, *Plant Cell*, 11:1033-1046.
- [6] Bethke, P. C., Jones, R. L., 2001, *Plant J*, 25:19-29.
- [7] Fath, A. et al., 2001, *Plant Physiol*, 126:156-166.
- [8] Fath, A. et al., 2002, *J Exp Bot*, 53:1273-1282.
- [9] Beligni, M. V. et al., 2002, *Plant Physiol*, 129:1642-1650.
- [10] 林久生、王根轩,2001,植物生理学通讯,37:551-555.
- [11] Mittler, R., 2002, *Trends Plant Sci*, 7:405-410.
- [12] Neill, S. J. et al., 2002, *J Exp Bot*, 53:1237-1247.
- [13] Kuo, A. et al., 1996, *Plant Cell*, 8:259-269.
- [14] Pedroso, M. C. et al., 2000, *J Exp Bot*, 51:1027-1036.
- [15] Clarke, A. et al., 2000, *Plant J*, 24:667-677.
- [16] Saviani, E. E. et al., 2002, *FEBS Lett*, 510:136-140.
- [17] Chung, H. T. et al., 2001, *Biochem Biophys Res Commun*, 282:1075-1079.
- [18] Beligni, M. V., Lamattina, L., 1999, *Trends Plant Sci*, 4:299-300.
- [19] 于明革等,2002,植物生理学通讯,38:493-499.
- [20] Klessig, D. F. et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:8849-8855.
- [21] Orozco-Cardenas, M. L., Ryan, C. A., 2002, *Plant Physiol*, 130:487-493.
- [22] 何奕晶等,2002,植物生理与分子生物学学报,28:325-332.
- [23] Delledone, M. et al., 1998, *Nature*, 394:585-588.
- [24] Beligni, M. V., Lamattina, L., 1999, *Nitric Oxide*, 3:199-208.

研究工作

绿色荧光蛋白与人肾脏 NaDC3 融合基因的构建及其在肾小管上皮细胞中的定位

程根阳 陈香美* 白雪源 冯 哲 刘章锁** 付 博 洪 权

(解放军总医院肾科 全军肾病中心暨重点实验室 北京 100853 **郑州大学第一附属医院肾科 郑州 450052)

摘 要 本文采用 RT-PCR 方法从人的正常肾组织中扩增出 hNaDC3 基因全长 cDNA 序列,采用基因重组技术将 hNaDC3 基因和绿色荧光蛋白基因融合,通过真核表达质粒-脂质体介导,导入 LLC-PK1 细胞系,激光共聚焦显微镜动态观察 GFP-hNaDC3 的定位情况。结果显示 pEGFP-C3 空白质粒转染的 LLC-PK1 细胞表达了 GFP, GFP 在胞内分布以核浆为主,呈均匀致密的细颗粒荧光,胞核染色强,核仁荧光稀少,界线清楚。而 pEGFP-C3-hNaDC3 转染细胞株的绿色荧光蛋白,转染后第 1 天混合分布于细胞浆和细胞膜,以粗颗粒荧光为主,两者界限不清楚,胞浆中可见未染色的圆形空洞,未见胞核染色;第 3 天主要聚集于细胞膜,核周的胞浆中可见粗颗粒荧光物质,胞浆和胞膜界线清楚,胞核亦未见绿色荧光蛋白;第 5 天清晰聚集于细胞膜,细胞膜连接呈网状。因此 hNaDC3 蛋白在细胞质中生成后,定位于细胞膜并稳定表达。

关键词: 人钠/二羧酸协同转运蛋白-3 绿色荧光蛋白 融合基因

人钠/二羧酸协同转运蛋白-3(human Na⁺/dicarboxylate cotransporter 3, hNaDC3)是近年克隆出的一种钠离子依赖性二羧酸跨膜转运蛋白,其基因定位于染色体 20q12-13.1,属于钠/二羧酸协同转运蛋白(Na⁺/dicarboxylate cotransporter, NaDC)家

族,参与琥珀酸、枸橼酸及 α-酮戊二酸等有机阴离子

本文 2002 年 12 月 9 日收到,2003 年 3 月 9 日接受。
国家 973 重点基础研究发展规划资助项目(G2000057000)。
国家自然科学基金创新研究群体项目(30121005)。
国家自然科学基金项目(30270505)。

* 通讯作者。E-mail: xmchen@public.bta.net.cn