热激诱导烟草悬浮细胞的凋亡

陈浩明 颜长辉 姜晓芳 夏慧莉 朱海珍 吴逸 戴尧仁*

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084. * 联系人)

摘要 烟草细胞经 48 °C 处理 4 h 再正常培养可出现典型的细胞凋亡的变化. DNA 梯状条带检测结果显示, 48 °C 处理 4 h 的样品, 其基因组 DNA 被降解形成明显的 DNA 梯状条带, 表明热激诱发了 DNA 的核小体间的断裂, 从而表现出典型的凋亡细胞的生化特征, 而同样温度处理 2 和 9 h 的样品虽然仍可观察到 DNA 梯状条带, 但远不如处理 4 h 的清晰. 对处理 4 h 的样品进行核 DNA 断裂的原位检测, 多数细胞显示极强的 TUNEL 阳性, 表明其细胞核内有很严重的 DNA 断裂. 利用 DAPI 荧光染色也观察到细胞质收缩、染色质凝聚和细胞核解体等凋亡细胞的形态学变化.

关键词 细胞凋亡 DNA 梯状条带 TUNEL 烟草细胞

1972 年 Kerr 等人^[1]首先提出细胞凋亡 (Apoptosis) 的概念, 即在一定的生理或病理条件下, 细胞受内在遗传机制的控制, 自动结束生命的过程. 细胞凋亡的典型特征是细胞质收缩, 染色质固缩并分布在核膜周边, 随之核染色体降解, 出现凋亡小体. 细胞凋亡在机体的发育和维持自稳平衡中发挥极其重要的作用, 目前在动物系统中研究得比较充分. 同时, 已有研究表明, 植物中也存在细胞凋亡^[2, 3].

细胞凋亡是由基因决定的, 正常的发育过程往往伴随着细胞凋亡, 此外它还可被许多因子诱导, 如辐射、细胞毒素、某些化学物质以及热激等. 关于热激诱导动物细胞凋亡已有许多报道, 如热激可使 T 细胞、成纤维细胞、淋巴细胞以及神经细胞凋亡^[4, 5]. Zhu 等人^[6]报道 44 °C 下 30 或 60 min 的热激诱导可使鼠乳腺癌细胞 FM3A 凋亡, 且发现蛋白酶抑制剂能促进这种诱导作用. Vogel 等人^[7]报道对离体培养 15 d 的原代神经细胞进行热激处理 (45 °C, 30 min) 可使其产生典型的凋亡形态变化和生理生化变化. 近年来热激诱导植物细胞凋亡也开始有研究, Wang 等人^[8]用热激处理 (42 °C, 4 h) 西红柿原生质体可使其核 DNA 在琼脂糖凝胶电泳上形成梯状断裂, 但该文未对此进行深入探讨^[8]. 本工作中, 我们对烟草细胞进行热激处理, 检测其 DNA 的核小体间降解, 并采用末端脱氧核糖核酸转移酶 (TdT) 介导的 3'-OH 末端标记 (TUNEL) 法测定核 DNA 的降解, 结合使用 DAPI 荧光染色法, 观察细胞核的形态变化. 结果表明, 48 °C 处理 4 h, 可诱导烟草细胞的凋亡.

1 材料与方法

烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 悬浮细胞 (品种为 BY-2, 诱导愈伤的外植体为子叶) 接种于 MS 基本培养基 (添加 0.6 mg/L 2, 4-D), 在 26 °C, 120 r/min 下振荡培养, 每 7 d 传代 1 次.

台盼蓝 (trypan blue) 染色法分析热激对烟草悬浮细胞死亡率的影响. 将含有对数生长期的烟草悬浮细胞培养瓶置恒温水浴振荡器上, 设置水浴温度为 48 °C, 转速 120 r/min, 热激诱导时间分别为 2 h, 4 h, 9 h (每个处理 3 个重复), 然后再在 26 °C 条件下培养, 以 26 °C 下培养的未处理细胞作对照, 定时取样, 用 0.5 % 台盼蓝染色 1 min, 光学显微镜下观察 (死细胞被染成蓝色, 活细胞不被染色), 随机选取若干个视野, 统计活细胞数和死细胞数, 计算死亡率.

细胞凋亡的检测按如下方法进行. DNA 梯状条带分析法检测核 DNA 断裂情况, 烟草细胞总 DNA 的提取参照 Mittler 等人^[9]的方法进行, 将约 10 μg 提取的总 DNA 加入 1.4% 琼脂糖凝胶(含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙锭), 电泳缓冲液为 $0.5 \times \text{TBE}$, 恒压 100 V 下电泳 3 h, 于紫外观测仪上观察结果. 用 TUNEL 法进行核 DNA 断裂的原位检测, 操作步骤按宝灵曼公司 TUNEL 试剂盒的标准程序进行, 反应结束后在荧光显微镜下观察结果. DAPI 染色观察细胞核的形态学特征, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 染色后置荧光显微镜下对对照细胞和热激诱导细胞的核进行观察.

2 实验结果

2.1 DNA 梯状条带分析的结果

琼脂糖凝胶电泳分析对照组和热激处理后再正常培养 48 h 的烟草细胞基因组 DNA, 结果如图 1 所示, 正常细胞总 DNA 为 1 条完整的带, 而热激处理 4 h 的细胞, 其总 DNA 被降解产生 180~200 bp 整数倍的断裂, 形成明显的 DNA 梯状条带, 而处理 2 和 9 h 的样品虽然仍可观察到 DNA 梯状条带, 但远不如处理 4 h 的清晰. 这表明烟草悬浮细胞受热激诱导后内源性核酸内切酶被激活, 位于核小体间连接区的 DNA 链在核酸内切酶的作用下断裂, 表现为琼脂糖电泳上的 DNA 梯状条带. DNA 梯状条带分析已成为检测细胞凋亡的最重要的生化指标之一. 以上结果表明 3 种剂量的热激都能使一定比例的细胞发生凋亡, 其中 2 和 9 h 的热激剂量诱导效果较差, 而 4 h 热激处理后烟草细胞的凋亡率很高.

2.2 TUNEL 检测结果

48 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h 的烟草细胞再正常培养 48 h, 取样进行 TUNEL 反应, 荧光观测显示, 热激处理细胞中 TUNEL 阳性率很高, 且相当一部分细胞核发出较强的黄绿色荧光(图 2(b)), 而正常细胞仅有微弱的细胞壁自发荧光(图 2(a)). TUNEL 反应可特异性检测凋亡细胞核内 DNA 的 3'-OH 断裂, 已成为检测细胞凋亡的另一重要指标. 本文结果表明烟草细胞受热激后其基因组 DNA 产生较多的 3'-OH 断裂.

2.3 细胞的形态学观察

经过热激处理的细胞与对照细胞相比, 发生很严重的质壁分离, 可见热激能导致细胞质固缩, 这与动物细胞凋亡过程中细胞质的形态学变化类似. 细胞核的形态变化是细胞凋亡的重要特征. TUNEL 反应结束后用 DAPI 双染观察核形态, 可以观察到热激诱导的细胞核发生染色质凝聚、细胞核解体的现象. 由于实验中使用的细胞并非处于同步化状态, 它们在生理学和形态学上并不是均一的, 当受到热激处理时, 它们的反应不会完全相同, 因而我们观察到处于凋亡不同阶段的细胞核形态(见本期封面). 有的细胞处于凋亡早期, 染色质凝集, DAPI 染色下细胞核内出现一些小的发亮颗粒(封面_2), 有些细胞中染色质凝集进一步加剧, 核内发亮颗粒增大并向核边缘靠拢(凋亡中期, 封面_3), 另一些处于凋亡晚期的细胞, 可观察到核结构解体, 核物质扩散到细胞质中(封面_4). 封面_1 为正常细胞核形态. 从图中可见热激后的细胞发生质壁分离.

图 1 热激处理后的烟草细胞 DNA 的琼脂糖凝胶电泳分析
1——DNA 分子量标准 (λ Hind III-EcoIv),
2——对照细胞, 3——处理 2 h 的细胞, 4——处理 4 h 的细胞, 5——处理 9 h 的细胞

图2 热激处理后的烟草细胞核 DNA 断裂的原位检测
(a) 对照细胞 TUNEL 检测结果; (b) 热激处理(48 °C, 4 h) 细胞 TUNEL 检测结果

2.4 热激对烟草细胞死亡率的影响

烟草细胞热激处理前死亡率(台盼蓝染色)为7.3%,处理后统计死亡率如图3所示,48 °C诱导2 h的细胞,热激后立即计数,其死亡率为14.6%,再在正常条件下培养48 h死亡率上升为58.3%;而热激处理9 h的细胞,处理后立即计数其死亡率高达89.9%,正常培养后略有上升,48 h后全部死亡;处理4 h的细胞,处理刚结束时的死亡率为45.8%,以后随着培养时间的延长而增加,48 h时增加到79.1%。可见48 °C热激对烟草细胞死亡率的影响因处理剂量而异,较长时间(9 h)的处理,绝大多数细胞死亡发生在处理过程中,与之相反较短时间(2 h)的处理,细胞死亡多数发生在处理后的正常培养过程中,而且死亡率维持在一个相对低的水平,中等长度时间(4 h)的处理,处理时和正常培养过程中细胞都会发生较多数目的死亡。

图3 热激处理对烟草细胞死亡率的影响
□48 °C热激 2 h, ▨48 °C热激 4 h, ■48 °C热激 9 h,

3 讨论

细胞凋亡和坏死是细胞死亡的两种形式。坏死是严重的理化因子或病变引起的被动死亡。而细胞凋亡是主动的受基因调控的程序化反应。两者在形态学和生化水平有较大差异。其中DNA的特异性降解是细胞凋亡的最重要的特征之一,已有几种技术被用于细胞凋亡过程中DNA断裂的检测,如TUNEL, DNA梯状条带和彗星电泳分析^[3]。本研究的目的是建立凋亡的诱导体系,因此只有将细胞凋亡和坏死区分开,才能确定不同诱导条件下细胞的死亡形

式并找到合适的凋亡诱导条件.

研究中我们用热激处理烟草悬浮细胞. DNA 梯状条带显示烟草细胞在热激作用下产生典型的DNA核小体间断裂. TUNEL检测表明,发生的DNA断裂为特异性的3'-OH断裂. DAPI染色显示热激处理后烟草的细胞发生细胞质固缩,细胞核中发生染色质凝聚、核解体等凋亡特征. 以上结果从不同角度充分证明48℃热激4h能诱导烟草悬浮细胞凋亡.

研究表明,高剂量的热激诱导(48℃,9h)虽然能使细胞全部死亡,但DNA梯状条带分析表明,其中凋亡细胞的比例很低,绝大部分细胞表现为坏死,这和McCabe等人^[2]在培养的胡萝卜细胞中观察到的高剂量热激引起坏死的结果相一致. 中等剂量的热激处理(48℃,4h)能很好地诱导凋亡. 较低剂量(48℃,2h)的诱导只能使小部分细胞进入凋亡途径. 本文所用的热激温度48℃,是参照文献而定的. Wang等人^[8]发现42℃处理2h可使55%西红柿原生质体死亡;McCabe等人^[2]报道55℃处理10min后,90%的胡萝卜悬浮细胞死亡. 本研究表明,48℃处理4h,烟草悬浮细胞的死亡率适中,而且大部分细胞表现出凋亡特征. 此外我们也尝试过44℃和52℃的热激处理,只要选择适宜的处理时间,也可诱导烟草悬浮细胞凋亡(另文发表).

目前关于热激诱导细胞凋亡的机制,主要有两种观点:其一,许多证据表明热激诱导的变性蛋白和新生的未折叠的蛋白是有毒的,若不能及时折叠就会发生凝聚,最终导致细胞死亡^[10];其二,探讨热激蛋白(HSP)对热激诱导凋亡的抑制作用,这方面研究较多的是Hsp70和Hsp27^[11,12]. 本研究用热激诱导烟草悬浮细胞凋亡,成功地建立了凋亡诱导模型,为进一步研究打下基础.

参 考 文 献

- 1 Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Bri J Cancer*, 1972, 26: 239~ 257
- 2 McCabe P F, Levine A, Meijer P J, et al. A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low density. *Plant J*, 1997, 12(2): 267~ 280
- 3 姜晓芳, 朱海珍, 周 军, 等. 彗星电泳法在植物原生质体凋亡检测中的应用. *植物学报*. 1998, 40(10): 928~ 932
- 4 Poccia F, Peselli P, Vendetti S, et al. Heat shock protein expression on the membrane of T_cell undergoing apoptosis. *Immunology*, 1996, 88: 6~ 12
- 5 Li W X, Chen C H, Ling C C, et al. Apoptosis in heat induced cell killing ——the protective role of hsp 70 and the sensitization effect of the σ myc gene. *Radiate Res*, 1996, 324~ 330
- 6 Zhu W G, Aramaki R, Cai Y, et al. Promotion of heat-induced apoptosis in Fm3A cells by protease inhibitors. *Biochem Bioph Res Co*, 1996, 225(3): 924~ 931
- 7 Vogel P, Dux E, Wiessner C. Evidence of apoptosis in primary neuronal cultures after heat-shock. *Brain Res*, 1997, 764(1-2): 205~ 213
- 8 Wang H, Juan L, Richard M B, et al. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell*, 1996, 8: 375~ 391
- 9 Mitter R, Lam E. Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced on hypersensitive response cell death. *Plant Cell*, 1995, 7: 1 951~ 1 962
- 10 Harm H K. Thermotolerance in mammalian cells protein denaturation and aggregation, and stress proteins. *J Cell Sci*, 1993, <https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-2-196>

104: 11~ 17

- 11 Mosser D D, Caron A W, Bourget L, et al. Role of the human heat-shock-protein Hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(9): 5 317~ 5 327
- 12 Mehlen P, Mehlen A, Godet J, et al. Hsp27 as a switch between differentiation and apoptosis in murine embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 1997, 272(50): 31 657~ 31 665

(1998-07-21 收稿, 1998-11-27 收修改稿)

皮纳图博火山喷发物在南极点 雪层内的记录及其意义

Jihong Cole-Dai Ellen Mosley-Thompson 秦大河^④

(Bryd Polar Research Center, The Ohio State University, Ohio, 43210. Columbus, U. S. A. ;

④中国科学院兰州冰川冻土研究所冰芯与寒区环境开放研究实验室, 兰州 730000)

摘要 1991年6月菲律宾皮纳图博火山喷发, 导致大气圈火山灰气溶胶含量激增, 连同1991年8月智利哈德森火山喷发释放的火山灰一道, 导致自1991年12月起南极点降水中 SO_4^{2-} 开始增加. 激光雷达同时也观测到富含火山微尘气团的到达. 雪样中火山微粒的电镜分析结果, 以及据物质平衡观测值估算的年代等表明, 1994年12月在南极点0.1~0.9 m雪层中可将2次火山喷发事件区别开来, 估算出南极点处皮纳图博火山和哈德森火山 SO_4^{2-} 的净通量分别为 (10.9 ± 1.1) 和 $(3.2 \pm 1.1) \text{ kg} \cdot \text{km}^{-2}$. 南半球中、高纬度地区的火山喷发在南极雪冰中的信号大于低纬地区火山的影响, 这一方法可用来推算冰芯记录的古火山活动的量级和规模.

关键词 皮纳图博 火山喷发 冰芯记录 南极

火山喷发向大气圈输入大量气体物质和火山灰, 气体的主要成分是 SO_2 , 可在几周内氧化形成 SO_4^{2-} , 并形成以此为核心的气溶胶微粒. 气溶胶在大气圈内传输、分布并滞留一段时间, 影响大气圈的光辐射通量, 因此在一定程度上影响了地球气候^[1]. 1991年6月开始喷发的菲律宾皮纳图博火山($15^\circ 08' \text{ N}$, $120^\circ 21' \text{ E}$)系本世纪最剧烈的火山喷发活动之一, 卫星监测估算约20 Mt SO_2 被喷入平流层^[2], 在20~30 km高度内形成微粒层, 并在不足1个月就向两极扩散, 到1992年年中已覆盖地球表面^[3, 4]. 南极麦克默多站和阿蒙森-斯科特站的激光雷达也观测到火山灰物质的抵达^[5, 6]. 由于大规模火山喷发物可使地球大气圈内硫化物含量剧增, 并持续数月或数年之久, 导致极地降水中 SO_4^{2-} 浓度增加^[7], 因此, 南极冰盖浅层雪内和冰芯内 SO_4^{2-} 含量的高峰值, 可作为评估现代火山和古火山的活动规律及其对气候影响的主要识别标志. 本文通过对南极点附近冰盖表层2 m雪内的冰川化学分析研究, 旨在捕捉皮纳图博火山活动记录, 并与过去百年来大规模火山喷发特征进行对比, 估算它们对大气圈环境质量的影响.