

SO₂ 诱导拟南芥气孔保卫细胞致死效应研究

吴 婷, 仪慧兰, 金晓弟

(山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006)

摘 要:以拟南芥叶片下表皮为材料,研究了 SO₂ 体内衍生物——亚硫酸钠和亚硫酸氢钠混合液(3:1, mmol·L⁻¹/mmol·L⁻¹)对气孔保卫细胞的致死作用。结果表明,浓度 0.5~4.5 mmol·L⁻¹ 的 SO₂ 衍生物处理表皮 3 h 可引起保卫细胞死亡,细胞死亡率呈浓度依赖性增高。抗坏血酸(AsA)或过氧化氢酶(CAT)与 SO₂ 衍生物共同作用时,保卫细胞死亡率显著降低。Ca²⁺螯合剂乙二醇双四乙酸(EGTA)或 Ca²⁺通道抑制剂 LaCl₃ 与 SO₂ 衍生物共同作用时,保卫细胞死亡率亦显著降低。研究发现,一定浓度的 SO₂ 可诱导拟南芥保卫细胞死亡,胁迫可能通过诱导活性氧、激活质膜钙通道,造成胞外 Ca²⁺内流,引发细胞死亡。

关键词:拟南芥;SO₂;细胞死亡;活性氧;Ca²⁺

中图分类号:X503.233 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)09-1795-05

SO₂ Induces Guard Cells Death in *Arabidopsis thaliana*

WU Ting, YI Hui-lan, JIN Xiao-di

(School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The effects of SO₂ derivatives on guard cells death were investigated in model plant *Arabidopsis thaliana*. The isolated epidermal strips were treated with various chemicals under white light for 3 h, stained with FDA, and examined with a fluorescence microscope. Randomly selected views on the tested epidermal strips were monitored to determine the number of viable cells and the total number of scored cells. SO₂ derivatives, a mixture of sodium sulfite and sodium bisulfite (3:1, mmol·L⁻¹/mmol·L⁻¹), significantly induced cell death at concentrations from 0.5 to 4.5 mmol·L⁻¹. However, the percentage of the cell death decreased when the strips exposed to SO₂ derivatives combined with ascorbic acid (AsA, 0.1, 1.0 mmol·L⁻¹) or catalase (CAT, 200 U·mL⁻¹). The cell death percentage also decreased after the strips exposure to SO₂ derivatives combined with EGTA (Ca²⁺ chelator, 0.1, 1.0 mmol·L⁻¹) or LaCl₃ (Ca²⁺ channel blocker, 0.1 mmol·L⁻¹). The results of the present study indicated that SO₂ caused cell death in *A. thaliana* via reactive oxygen species (ROS) production. ROS activated plasma membrane Ca²⁺ channels, led to Ca²⁺ influx and an increase of intracellular Ca²⁺ level, and induced finally cell death.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; SO₂; cell death; ROS; Ca²⁺

SO₂ 作为常见的全球性大气污染物,对生物的危害主要是通过其进入生物体内产生的代谢物——亚硫酸钠与亚硫酸氢钠对组织、细胞和生物大分子的作用而实现的。高浓度 SO₂ 能够造成植物叶片失绿或坏死,影响光合作用和呼吸过程,从而影响植物的生长发育^[1]。SO₂ 及其体内衍生物还能抑制细胞分裂,

诱发遗传损伤,使根尖中具有微核、染色体畸变的细胞数明显增加,出现细胞固缩和死亡^[1-2]。SO₂ 胁迫能引起植物组织活性氧增加^[3-4],诱导抗氧化酶基因和防护基因的表达^[4]。但是高浓度活性氧(ROS)能引起蛋白质、核酸、膜脂等生物大分子结构损伤、功能异常,导致细胞生理活动紊乱,且能有效地引发细胞死亡或凋亡^[5]。

研究发现,ROS 可激活细胞质膜钙通道,引起胞内 Ca²⁺增加,继而介导细胞死亡^[6-7]。SO₂ 衍生物能改变大鼠神经元细胞膜上的 Ca²⁺通道特性,增大胞内的 Ca²⁺浓度,诱导细胞死亡^[8],但在 SO₂ 诱导植物细胞死亡过程中是否存在类似过程尚不清楚。

收稿日期:2009-01-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470318, 30870454);山西省留学回国基金项目(200603)

作者简介:吴 婷(1983—),女,山西运城人,在读硕士,主要从事环境毒理学方面的研究。E-mail: wuting1983415@yahoo.cn

通讯作者:仪慧兰 E-mail: yihuilan@yahoo.com.cn

近年来,气孔保卫细胞已成为研究植物细胞接受刺激并作出反应的良好模式系统^[9]。本文根据 SO₂ 进入生物体后以它的衍生物——亚硫酸钠与亚硫酸氢钠(3:1, mmol·L⁻¹/mmol·L⁻¹)^[10] 的形式对细胞产生危害作用的事实,研究 SO₂ 诱发的拟南芥气孔保卫细胞致死效应及其途径,为揭示 SO₂ 毒性作用的分子机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 植株培养

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) 为 Columbia 生态型(Col-0),播种于泥炭藓、蛭石、珍珠岩按 1:1:1 混合的基质中,4℃ 春化 2 d 后置于人工气候箱内培养,光照强度≥3 000 lx,光/暗周期为 16 h/8 h,培养温度 22℃,相对湿度约 70%。

1.2 表皮条的剥离

幼苗长至 4~6 周时取第 3 层平展叶片(第 5 和第 6 片叶),蒸馏水洗涤后,用直镊撕取叶片下表皮,毛刷刷去叶肉细胞,置于表皮缓冲液(50 mmol·L⁻¹ KCl、10 mmol·L⁻¹ MES, pH 6.10)中。

1.3 药物处理

将剥离好的表皮条置于含有不同药物的表皮缓冲液中,于 23℃ 光照(0.2~0.3 mmol·m⁻²·s⁻¹) 3 h 后取出表皮条。SO₂ 衍生物处理组采用浓度为 0.5、1.5、2.5、3.5、4.5 mmol·L⁻¹ (以 Na₂SO₃ 浓度计)的 Na₂SO₃-NaHSO₃ 混合液(3:1, mmol·L⁻¹/mmol·L⁻¹);缓解组分别采用 0.1 和 1.0 mmol·L⁻¹ 的抗坏血酸(AsA)、200 U·mL⁻¹ 的过氧化氢酶(CAT)、0.1 和 1.0 mmol·L⁻¹ 乙二醇双四乙酸(EGTA)及 0.1 mmol·L⁻¹ 的 LaCl₃ 与 2.0、3.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 衍生物共同作用。

1.4 气孔保卫细胞死亡检测

采用 Larkin 描述的细胞活性检测方法^[11]略作改进,取不同药物处理 3 h 的表皮条,去离子水冲洗 2~3 次,在 0.1 mg·mL⁻¹ 的 FDA 丙酮溶液中黑暗染色 5 min 后,置于荧光显微镜下观察,具有绿色荧光的为活性保卫细胞,无绿色荧光的为死细胞。每处理至少重复 3 次,每次至少观察 100 个气孔。细胞死亡率(%)=死细胞数/总的细胞数×100%。

1.5 统计分析

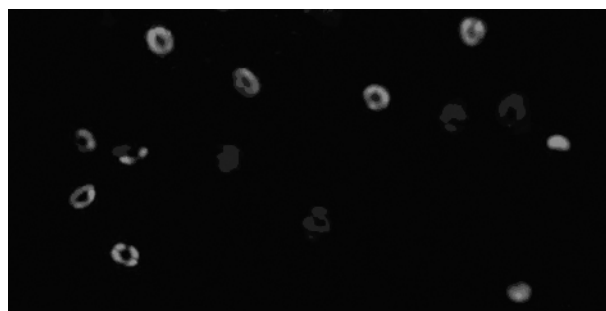
计算每组 3 个重复实验的平均值和标准差, *F* 检验后,采用 Duncan 方法比较分析不同处理组与对照组之间的差异显著性,缓解组的差异显著性以 SO₂ 组作为对照来比较(*表示 *P*<0.05,差异显著;**表示

P<0.01,差异极显著)。

2 结果与分析

2.1 SO₂ 衍生物诱导拟南芥气孔保卫细胞死亡

经 SO₂ 衍生物处理和 FDA 染色后(图 1),对照组保卫细胞发亮绿色荧光,表明细胞膜完整且具有良好的活性;SO₂ 处理组部分保卫细胞无亮绿色荧光,表明胞内非特异性脂酶不能将 FDA 水解成为极性荧光素分子,细胞活性丧失,部分处理组细胞具有弱亮绿色荧光,即胞内非特异性脂酶活性降低,不能很好地将 FDA 水解成为极性荧光素分子。由此可见,SO₂ 衍生物处理能导致细胞活性下降和死亡。



高活性细胞荧光较亮,细胞活性下降荧光减弱,死细胞无荧光。

Guard cells having high viability show strong green fluorescence.

Guard cells having low viability show weak green fluorescence.

Dead guard cells show non-fluorescence.

图 1 FDA 染色的拟南芥保卫细胞

Figure 1 *Arabidopsis* guard cells stained with FDA

细胞死亡检测结果(图 2)表明,一定浓度的 SO₂ 衍生物处理可诱发拟南芥气孔保卫细胞死亡,细胞死亡率呈浓度依赖性增高。SO₂ 衍生物浓度在 0.5~2.5 mmol·L⁻¹ 范围时,处理组细胞死亡率显著高于对照;

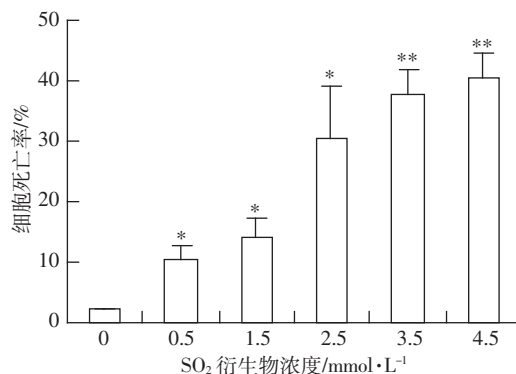


图 2 SO₂ 衍生物对拟南芥气孔保卫细胞的致死效应
Figure 2 Effects of SO₂ derivatives on guard cells death in *Arabidopsis*

SO₂ 衍生物浓度高于 2.5 mmol·L⁻¹ 时, 细胞死亡率极显著增高。

2.2 抗氧化剂 AsA 与 CAT 对 SO₂ 致细胞死亡效应的影响

抗氧化剂 AsA 和 CAT 与 SO₂ 衍生物共同作用时保卫细胞死亡率显著降低(图 3)。SO₂ 衍生物(2.0、3.0 mmol·L⁻¹)单独处理组细胞死亡率极显著升高, 分别为 30.58% 和 36.74%。浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 和 1.0 mmol·L⁻¹ 的 AsA 能显著降低 SO₂ 诱导的细胞死亡, 使 2.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 组的死亡率分别降低 54% 和 21.56%, 3.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 组的死亡率分别降低 50.80% 和 44.89%。其中浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 的 AsA 对 SO₂ 诱导的细胞死亡抑制作用更明显。

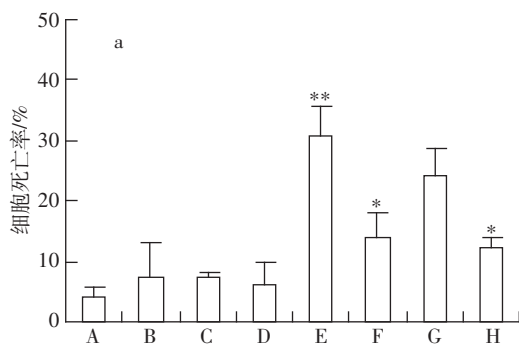
CAT 与 SO₂ 衍生物共同作用后, 保卫细胞死亡率

显著低于 SO₂ 组。加入 200 U·mL⁻¹ 的 CAT 后 2.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 组的死亡率降低 59.20%, 3.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 组的死亡率降低 72.77%。

2.3 Ca²⁺螯合剂 EGTA 与 Ca²⁺通道抑制剂 LaCl₃ 对 SO₂ 致细胞死亡效应的影响

图 4 表明, Ca²⁺螯合剂 EGTA 和 Ca²⁺通道抑制剂 LaCl₃ 与 SO₂ 衍生物共同作用时保卫细胞死亡率显著降低。浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 和 1.0 mmol·L⁻¹ 的 EGTA 减少了 SO₂ 衍生物诱导的保卫细胞死亡, 使 2.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 组细胞死亡率分别降低 71.54% 和 12.67%; 3.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 组死亡率分别降低 72.19% 和 63.82%。其中 0.1 mmol·L⁻¹ 的 EGTA 对 SO₂ 诱导的细胞死亡抑制作用更为明显。

LaCl₃ 与 SO₂ 衍生物共同作用后, 细胞死亡率显



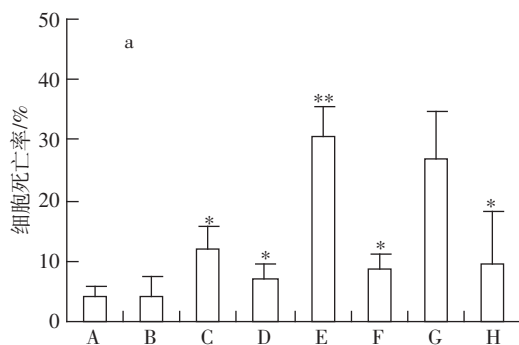
A: control; B: 0.1 mmol·L⁻¹ AsA; C: 1.0 mmol·L⁻¹ AsA; D: 200 U·mL⁻¹ CAT; E: SO₂ derivatives; F: SO₂ derivatives + 0.1 mmol·L⁻¹ AsA; G: SO₂ derivatives + 1.0 mmol·L⁻¹ AsA; H: SO₂ derivatives + CAT

图 a: 2.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 衍生物; 图 b: 3.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 衍生物

Figure a: 2.0 mmol·L⁻¹ SO₂ derivatives; Figure b: 3.0 mmol·L⁻¹ SO₂ derivatives

图 3 抗氧化剂 AsA 和 CAT 对 SO₂ 致细胞死亡效应的影响

Figure 3 Effect of antioxidant AsA and CAT on cell death induced by SO₂ derivatives in *Arabidopsis*



A: control; B: 0.1 mmol·L⁻¹ EGTA; C: 1.0 mmol·L⁻¹ EGTA; D: 0.1 mmol·L⁻¹ LaCl₃; E: SO₂ derivatives; F: SO₂ derivatives + 0.1 mmol·L⁻¹ EGTA; G: SO₂ derivatives + 1.0 mmol·L⁻¹ EGTA; H: SO₂ derivatives + LaCl₃

图 a: 2.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 衍生物; 图 b: 3.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 衍生物

Figure a: 2.0 mmol·L⁻¹ SO₂ derivatives; Figure b: 3.0 mmol·L⁻¹ SO₂ derivatives

图 4 Ca²⁺螯合剂(EGTA)与 Ca²⁺通道抑制剂(LaCl₃)对 SO₂ 致细胞死亡效应的影响

Figure 4 Effect of EGTA and LaCl₃ on cell death induced by SO₂ derivatives in *Arabidopsis*

著降低。加入 0.1 mmol·L⁻¹ 的 LaCl₃ 后 2.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 组的细胞死亡率降低 60.09%, 3.0 mmol·L⁻¹ SO₂ 组的死亡率降低 65.59%。

3 讨论

SO₂ 作为一种具有遗传毒性的环境诱变剂,可导致植物根尖细胞遗传损伤,引发细胞死亡^[1]。Pfan^[2] 等认为高浓度 SO₂ 伤害是由 SO₃²⁻和自由基引起的^[12]。当 SO₂ 进入植物细胞后,溶于细胞液形成 HSO₃⁻和 SO₃²⁻,SO₃²⁻被氧化成 SO₄²⁻,同时产生大量活性氧(ROS),如超氧阴离子(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、羟基自由基(·OH)等^[13],导致细胞氧化胁迫。我们前期研究表明,SO₂ 能引起拟南芥细胞内 O₂⁻产率提高、H₂O₂ 含量增高,胁迫期间细胞具有较高的活性氧生成率^[4]。植物气孔保卫细胞不同于其他表皮细胞,它们含有叶绿体,可进行光反应,释放氧,形成 NADPH,为气孔运动提供能量,其活性氧含量呈诱导性增高^[14]。

AsA 和 CAT 两种抗氧化剂能通过不同的途径清除细胞内积累的活性氧,减轻氧化胁迫。AsA 是一种非酶促小分子抗氧化剂,主要通过抗坏血酸过氧化物酶(APX)的催化作用与 H₂O₂ 反应,将 H₂O₂ 还原为 H₂O,从而降低植物细胞的 H₂O₂ 含量^[15],还能与谷胱甘肽、抗氧化酶一起清除 O₂⁻、单线态氧和 ·OH^[16];CAT 作为 H₂O₂ 的专一清除剂,可催化 H₂O₂ 转变为 H₂O 和 O₂^[17]。本实验中高浓度 SO₂ 衍生物长时间胁迫拟南芥表皮时,诱导保卫细胞 ROS 增加,过量的 ROS 不能被细胞自身抗氧化系统清除,引发细胞死亡;当 AsA 和 CAT 与 SO₂ 衍生物共同作用时,增强了细胞对 ROS 的清除能力,细胞死亡率显著降低。由此可见,SO₂ 衍生物致细胞死亡与胁迫诱导的活性氧增加有关。

逆境胁迫能引起胞内 Ca²⁺浓度的升高,高水平的 Ca²⁺可导致细胞死亡,胞外 Ca²⁺内流在诱导细胞死亡过程中起重要作用^[18-19]。研究表明,在悬浮培养的植物细胞体系中,加入 Ca²⁺螯合剂 EGTA 可有效地抑制镉诱导的细胞死亡^[7],Ca²⁺通道抑制剂 LaCl₃ 可显著抑制铝诱导的细胞死亡^[20]。本文用 EGTA 螯合胞外 Ca²⁺以减少胞外 Ca²⁺的内流,或用 LaCl₃ 抑制质膜钙通道阻滞胞外 Ca²⁺内流,减少 SO₂ 胁迫诱发的胞内 Ca²⁺升高,使细胞死亡率显著降低,表明在 SO₂ 诱导的细胞死亡过程中,Ca²⁺发挥了重要作用,胞外 Ca²⁺内流是胞内 Ca²⁺浓度增大的重要来源。在本实验中,EGTA 和 LaCl₃ 与 SO₂ 衍生物共同作用后,没能完全抑制 SO₂

诱导的细胞死亡,可能是 ROS 诱发胞内 Ca²⁺释放,使胞内 Ca²⁺水平升高,继而介导细胞死亡。

参考文献:

- [1] 仪慧兰, 姜 林. SO₂ 水合物诱发蚕豆(*Vicia faba*)根尖细胞染色体畸变效应[J]. 生态学报, 2007, 27(6): 2318-2324.
YI Hui-lan, JIANG Lin. Chromosomal aberrations induced by sulfur dioxide hydrates in *Vicia faba* root tips[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(6): 2318-2324.
- [2] 仪慧兰, 李红孩, 孟紫强. SO₂ 体内衍生物诱发蚕豆根尖细胞微核[J]. 生态学报, 2004, 24(2): 368-371.
YI Hui-lan, LI Hong-hai, MENG Zi-qiang. Micronucleus induced by the derivatives of sulfur dioxide in *Vicia faba* root tips[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(2): 368-371.
- [3] 郝 林, 张惠文, 徐 昕, 等. 二氧化硫对小麦的氧化胁迫及其某些信号分子的调节[J]. 应用生态学报, 2005, 16(6): 1038-1042.
HAO Lin, ZHANG Hui-wen, XU Xi, et al. SO₂-caused oxidative stress and modulation of some signal molecules in wheat[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(6): 1038-1042.
- [4] 仪慧兰, 李利红, 仪 民. 二氧化硫胁迫导致拟南芥防御基因表达改变[J]. 生态学报, 2009, 29(4): 1682-1687.
YI Hui-lan, LI Li-hong, YI Min. Expression of Arabidopsis defense-related genes in response to sulfur dioxide fumigation[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(4): 1682-1687.
- [5] Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1999, 57: 231-245.
- [6] Mori I C, Schroeder J I. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction[J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 702-708.
- [7] Iakimova E T, Woltering E J, Kapchina-Toteva V M, et al. Cadmium toxicity in cultured tomato cells -role of ethylene, proteases and oxidative stress in cell death signaling[J]. *Cell Biology International*, 2008, 32: 1521-1529.
- [8] 杜正清, 孟紫强. 二氧化硫衍生物和铅对大鼠神经元膜离子通道损伤研究[D]. 太原: 山西大学环境科学与工程研究中心, 2005: 1-106.
DU Zheng-qing, MENG Zi-qiang. Effects of SO₂ derivatives and lead on ion channel currents in acutely isolated rat neurons[D]. Taiyuan: Research center of Environmental Science and Engineering, Shanxi University 2005: 1-106.
- [9] 曹更生, 宋纯鹏. 气孔保卫细胞信号转导途径[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(3): 219-225.
CAO Geng-sheng, SONG Chun-peng. Signal transduction pathways in stomatal guard cells[J]. *Plant Physiology Communications*, 1997, 33(3): 219-225.
- [10] Shapiro R. Genetic effects of bisulfite (sulfur dioxide) [J]. *Mutation Research*, 1977, 38: 149-176.
- [11] Larkin P J. Purification and viability determinations of plant proto-plasts[J]. *Planta*, 1976, 128: 213-216.

- [12] Pfan H, Martinoia E, Lange O L, et al. Flux of SO_2 into leaf cells and cellular acidification by SO_2 [J]. *Plant Physiology*, 1987, 85:928-933.
- [13] 钱永常, 余叔文. SO_2 对植物的氧化作用和植物的抗氧化作用[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(5):326-331.
QIAN Yong-chang, YU Shu-wen. Oxidation of sulfur dioxide on plants and anti-oxidation of plants[J]. *Plant Physiology Communications*, 1991, 27(5):326-331.
- [14] 苗雨晨, 宋纯鹏, 董发才. ABA 诱导蚕豆气孔保卫细胞 H_2O_2 的产生[J]. 植物生理学报, 2000, 26(1):53-58.
MIAO Yu-chen, SONG Chun-peng, DONG Fa-cai. ABA-induced hydrogen peroxide generation in guard cells of *Vicia faba*[J]. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 2000, 26(1):53-58.
- [15] Smirnoff N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants[J]. *Annals of Botany*, 1996, 78:661-669.
- [16] Huang C H, He W L, Guo J K, et al. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis mutant*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(422):3041-3049.
- [17] 程艳丽, 宋纯鹏. 植物细胞 H_2O_2 的信号转导途径[J]. 中国科学 C 辑 生命科学, 2005, 35(6):480-489.
CHENG Yan-li, SONG Chun-peng. H_2O_2 signal transduction pathways in plant cell[J]. *Science in china Ser C, Life Sciences*, 2005, 35(6):480-489.
- [18] Errakhi R, Dauphin A, Meimoun P, et al. An early Ca^{2+} influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(15):4259-4270.
- [19] Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, et al. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells[J]. *Plant cell*, 2002, 14(10):2627-2642.
- [20] Yakimova E T, Kapchina-Toteva V M, Woltering E J. Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164:702-708.

关于召开“第三届全国农业环境科学学术研讨会 暨中国农业生态环境保护协会六届二次 会员代表大会”的通知

各有关单位、专家及会员代表:

“第三届全国农业环境科学学术研讨会暨中国农业生态环境保护协会六届二次会员代表大会”将于 2009 年 10 月 23 至 26 日在天津召开。大会将围绕我国农业环境科学各个领域的最新研究成果和实践经验进行交流,会议采取大会主题报告与专题研讨相结合的方式进行,届时将邀请本领域部分院士及知名专家出席会议并作主题报告。会员代表大会将审议协会有关事项。

一、会议主办单位

中国农业生态环境保护协会
农业部环境保护科研监测所

二、会议时间与地点

2009 年 10 月 23 日至 26 日 天津财富豪为酒店

三、联系方式

协会秘书处、《农业环境科学学报》编辑部

地址:天津南开区复康路 31 号

电话:022-23006209 022-23674336

邮箱: caep@vip.163.com

联系人:李无双(13702119778) 潘淑君(13920028209)

详情请见 <http://www.aes.org.cn>

邮编:300191

传真:022-23006209