

UV-B 诱导的酵母凋亡现象及调节机制的作用

赵华* 伍丹

(天津科技大学生物工程学院 教育部工业微生物重点实验室 天津 300457)

摘要: 研究UV-B诱导的酵母凋亡现象及调节机制的作用。通过高密度细胞培养, UV-B能够抑制酵母细胞生长和诱导细胞凋亡。然而, 将UV-B已照射 96 h活酵母细胞重新进行UV-B照射时发现, 培养 12 d照射过细胞的存活率仍有 10% ($P<0.05$), 而未照射细胞已经基本死亡。同时, 经 0.01 mol/L和 0.1 mol/L H_2O_2 处理, UV-B照射 24 h活细胞的存活率分别是对照的 3.0 倍和 5.2 倍; 而经 30 min和 60 min 55°C热处理, UV-B照射 24 h活细胞的存活率分别是对照的 3.5 倍和 9.0 倍。

关键词: UV-B, 酵母细胞, 细胞凋亡, 凋亡调节机制

UV-B Irradiation Regulates Apoptosis in Yeast

ZHAO Hua* WU Dan

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Mechanisms of UV-B-induced apoptotic regulation in yeast *Saccharomyces cerevisiae* were studied. The results showed that UV-B irradiation indeed inhibited the growth of yeast cells as well as induced extensive apoptosis during 96 h experiment period. However, survival of 96 h irradiated cells remained 10% while most control cells finally dead after re-growth under UV-B irradiation for 12 d. And by exposed to 0.01 mol/L or 0.1 mol/L H_2O_2 for 30 min, survival rate of 24 h irradiated cells were 3.0-fold or 3.2-fold than control, respectively. By to heat shock for 30 min or 60 min, survival rate of 24 h irradiated cells were 3.5-fold or 9.0-fold than control, respectively.

Keywords: UV-B irradiation, Yeast cells, Apoptosis, Apoptotic regulation

近年来, 人们已经成功建立起酵母细胞的凋亡调节机制^[1]。但是, 细胞凋亡对单细胞生物的积极作用仍然很模糊。细胞凋亡(Apoptosis)是指细胞在一定的生理或病理条件下, 受内在遗传机制的控制自动结束生命的过程。而细胞程序性死亡(Programmed cell death, PCD)是指生物在发育过程中对一定生理刺激的反应性死亡, 它需要一定基因表达, 被认为是机体稳态维持和DNA损伤的细胞清除的重要调节机制^[2]。紫外线波长范围为 200 nm~400 nm, 按波

长大小分为 3 种: UV-A, 其波长范围为 320 nm~400 nm; UV-B, 其波长范围在 280 nm~320 nm之间; UV-C, 波长小于 280 nm。其中由于臭氧层变薄而到达地面的UV辐射, 主要是UV-B辐射的增强, 研究者研究紫外线主要是UV-B对各种微生物的影响^[3]。近期, UV-B开始广泛的被人们用来作为研究细胞凋亡的“刺激物”^[4]。UV-B能够诱导人类细胞发生凋亡现象, 由于酵母细胞和人类细胞的高度同源性, 因此选择UV-B作为外源性因素进行研究。

* 通讯作者: Tel: 86-22-60601369; 信箱: zhaohua@tust.edu.cn
收稿日期: 2008-10-19; 接受日期: 2009-01-08

目前,已经在电子和荧光显微镜下观察到了紫外线照射后酵母细胞产生的细胞凋亡现象^[5]。凋亡现象包括细胞收缩、染色质浓缩、DNA和染色体碎片、质膜起泡、以及形成凋亡小体等。也有研究证明了紫外线照射后酵母细胞内核酸含量增加等典型凋亡现象^[3]。本文主要研究酵母细胞在UV-B照射下,细胞凋亡调节机制使细胞获得的选择性优势^[1]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:本实验室保存的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株,编号为ZW-1。

1.1.2 酵母培养基:葡萄糖 40 g, 酵母膏 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 蒸馏水定容至 1 L, 1×10⁵ Pa灭菌 20 min, pH 5.0。参照文献^[3]用柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液配制培养基,柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液每L含有柠檬酸 7.354 g, 柠檬酸三钠 19.11 g。

1.1.3 YEPD培养基(g/L):蛋白胨 2%, 酵母膏 1%, 葡萄糖 2%, 1×10⁵ Pa灭菌 20 min, pH 6.0。

1.2 紫外照射实验

1.2.1 活性干酵母活化方法:活性干酵母接入 100 mL 培养基中, 30°C~32°C 活化 30 min。

1.2.2 照射实验:将活化后的酵母菌液转接于烧杯中, 置于紫外培养箱(含 15 W 312 nm 紫外灯一只, 照射距离 0.5 m)进行紫外伤害培养 96 h, 培养条件为温度 28°C~30°C、摇床转速 50 r/min~60 r/min。细胞数采用血球计数法或板活菌计数法。实验重复 3 次, 取平均值作为结果。

1.2.3 细胞凋亡证实实验:1) DAPI 荧光染色: 收集照射 0~96 h 后酵母细胞, PBS 缓冲液洗涤 3 次后固定细胞, DAPI 染色 15 min 后加抗荧光淬灭剂封片观察^[1]。2) DNA Ladder 实验: 参照分子克隆实验指南方法, 并根据实际情况做适当的修改^[6]。

1.3 活酵母细胞抗性实验

1.3.1 活细胞收集:UV-B 照射 24 h、48 h 和 96 h 培养液与正常培养 24 h 细胞培养液(对照) 4000 r/min 离心 15 min, 用 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.8, 含 0.0001 mol/L EDTA)洗涤数次后, 将湿酵母泥重悬于生理盐水中, 制备成菌悬液, 活细胞浓度为 1×10⁹ 个/mL。

1.3.2 UV-B 抗性实验:取 UV-B 照射 96 h 后活细

胞重新进行 UV-B 照射, 照射时间根据实验需要而定。

1.3.3 H₂O₂^[7]和热冲击^[7]抗性实验:分别对菌悬液进行以下处理: 0.01 mol/L 和 0.1 mol/L H₂O₂处理 30 min; 55°C 热冲击处理(Heat shock) 30 min 和 60 min。处理后细胞液用生理盐水梯度稀释到适宜浓度, 采用 YEPD 培养基, 30°C 培养 3 d~5 d 后, 根据平板上细胞数计算存活率, 实验重复 3 次, 取平均值作为实验结果。

2 结果

2.1 UV-B 照射对酵母细胞生长的影响

1×10⁷个/mL 和 1×10⁹个/mL 的酵母细胞在 UV-B 灯下照射培养 96 h, UV-B 照射对酵母细胞生长的影响情况见图 1。

由图 1 可知, 低密度培养时(1×10⁷个/mL), UV-B 照射的酵母细胞初始生长速度较快, 但照射培养后期却呈现出明显的下降趋势, 且细胞数低于未照射细胞。高密度培养时(1×10⁹个/mL), UV-B 照射的酵母细胞初期由于 UV-B 的损伤和营养物质有

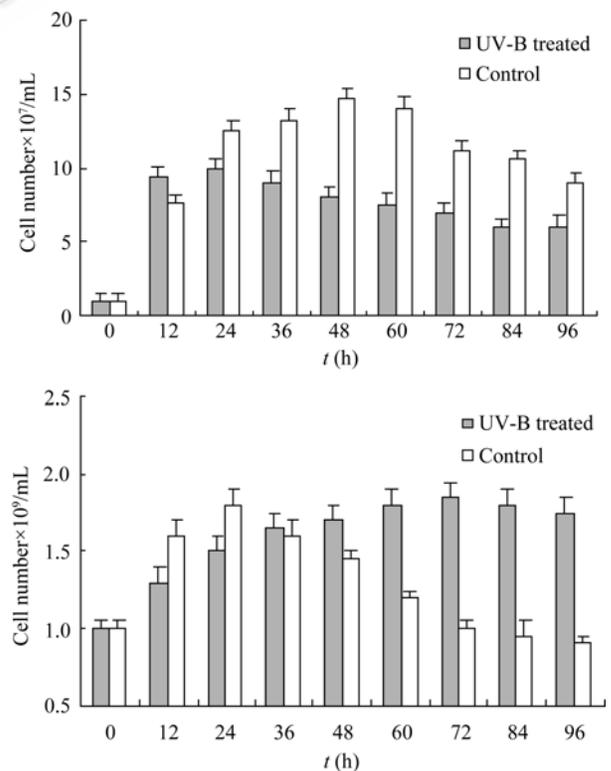


图 1 UV-B 照射对不同浓度酵母细胞生长的影响

Fig. 1 Effects of different cell density on growth of yeast cells during 96 h UV-B irradiation

限, 生长速度与未照射细胞相比较慢, 也较低密度培养时晚进入稳定期 (约为 24 h)。进入稳定期后细胞停止了细胞分裂和自我繁殖^[8]。在后期未照射细胞发生细胞自溶现象, 同一时期下照射的酵母细胞虽然也存在部分自溶现象, 但实验发现一些受损伤的细胞在失去繁殖能力后仍然能够产生代谢变化, 代谢变化包括合成抗氧化保护性物质等, 这也解释了照射后期酵母细胞保持稳定状态的原因。酵母细胞的这种现象与对数期生长的多细胞生物, 特别是与人类细胞非常相似, 因此选取浓度为 1×10^9 个/mL 酵母细胞进行单细胞凋亡研究。

2.2 UV-B 照射诱导酵母细胞凋亡

UV-B 诱导的细胞凋亡是导致酵母细胞在 UV-B 培养下死亡的原因之一。DAPI 染色后, 经 UV-B 照射处理的酵母细胞呈现出典型的细胞凋亡现象, 且随着 UV-B 照射时间的延长而加剧(图 2)。24 h 时, 酵母细胞形态大小开始出现差异, 细胞核染色质凝聚, 边缘形成新月状。48 h 后, 20% 以上的酵母细胞逐渐表现出类似现象, 核膜崩溃及细胞溶解形成凝聚的凋亡小体。UV-B 照射 24 h 后, DNA 琼脂糖凝胶电泳(图 3, 泳道 3)出现典型的 DNA Ladder, 再次表明其发生了凋亡现象。通过观察 UV-B 照射酵母细胞的存活率(图 4), 照射 96 h 后细胞的存活率比未照射细胞低 16% ($P < 0.05$)。

2.3 UV-B 照射后酵母细胞抗性实验

2.3.1 UV-B 照射后酵母细胞对 UV-B 再照射的抗性实验:

细胞凋亡调节机制是通过清除凋亡和老化的细胞, 使存活的细胞获得再生长的能力。收集 UV-B 照射 96 h 后活细胞, 取未照射细胞作为对照, 重新进行 UV-B 照射的结果见图 5。细胞存活率低于 1%

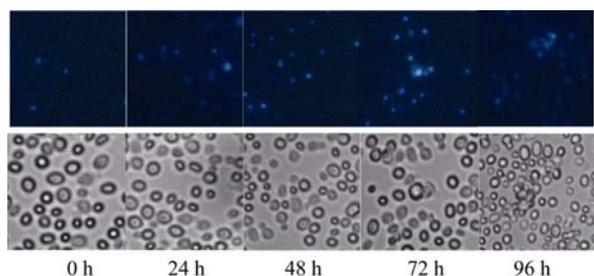


图 2 DAPI 法证明 UV-B 照射 96 h 内诱导的细胞凋亡
Fig. 2 UV-B-induced apoptosis in yeast cells were detected by DAPI stain during 96 h UV-B irradiation

注: 上排: 荧光显微镜观察; 下排: 普通光学显微镜观察。
Note: Top: Fluorescence microscopy; Bottom: Phase contrast microscopy of the same cells.

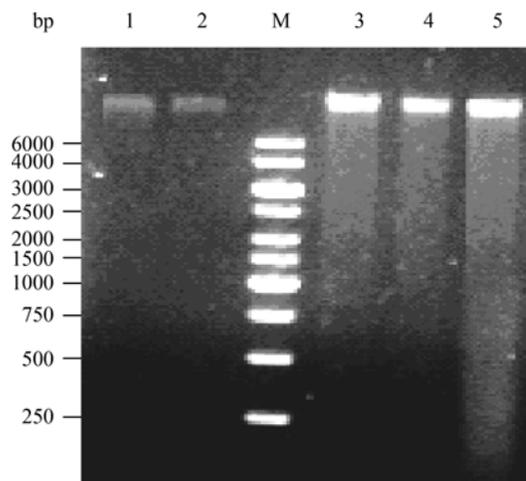


图 3 酵母 DNA Ladder

Fig. 3 Yeast cell DNA Ladder

注: 1-5: 对照、紫外线照射 0 h、24 h、48 h、72 h; M: DNA marker。
Note: 1-5: Control, 0 h, 24 h, 48 h, 72 h of UV-B irradiation; M: DNA marker.

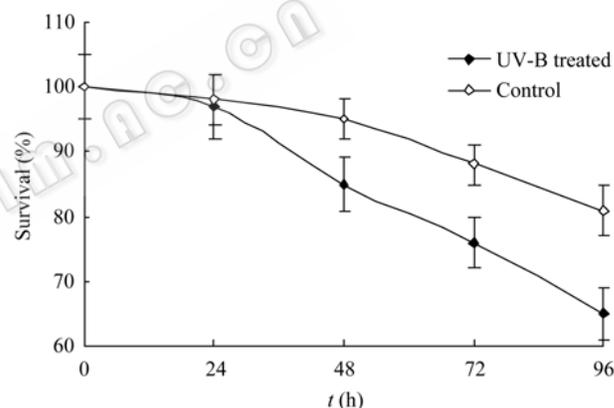


图 4 UV-B 照射 96 h 内酵母细胞的存活率

Fig. 4 Survival of yeast cells during 96 h UV-B irradiation

时停止照射。图 5 中可以看出, UV-B 照射过的酵母细胞存活时间更长, 8 d 后 UV-B 照射过酵母细胞的存活率比未照射细胞同期高 17% ($P < 0.05$), 12 d 后照射过细胞的存活率仍有 10%, 而未照射细胞已经基本死亡。

细胞凋亡调节机制中, ROS 在细胞凋亡中起到了非常重要的调节作用^[8]。UV-B 诱导产生的 ROS 通过损伤细胞内蛋白质、磷脂和核酸等, 最终导致细胞死亡。有研究报道称, 酵母细胞在外界刺激下能够建立起良好的 ROS 解毒机制, 修复 ROS 带来的氧化损伤^[11,12]。UV-B 照射后活细胞内抗氧化物质的水平显著提高。例如, SOD 和 CAT 等抗氧化酶保护性的下降, 降低了 ROS 水平; 海藻糖和葡聚糖等小

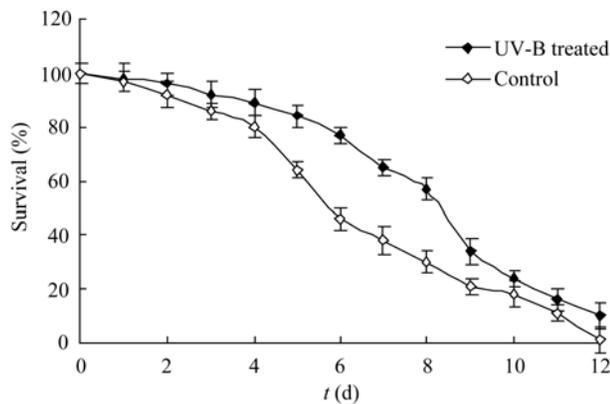


图 5 UV-B 照射存活酵母细胞在 UV-B 重新照射下的存活率

Fig. 5 Survival of irradiated yeast cells after re-growth under UV-B irradiation

分子 ROS 清除物质的含量也在 UV-B 照射过程中得到不同程度的提高^[7]。其中酵母细胞葡聚糖细胞壁能够保护酵母细胞在照射过程中不受伤害, 细胞形态与正常细胞大小一致, 使细胞经历细胞凋亡。

2.3.2 UV-B 照射后酵母细胞交叉抗性实验: 交叉抗性指一种压力下使细胞趋向抵抗另一种或多种压力的现象。已知酵母细胞能够抵抗热冲击、渗透压力、冷冻等压力, 且各种压力相互联合^[12]。为了进一步研究酵母细胞在 UV-B 诱导的细胞凋亡调节下获得的选择性优势^[1], 将 UV-B 照射 24 h 和 48 h 的活细胞暴露在过氧化氢和热冲击下, 观察细胞获得的交叉抗性 (Cross-tolerance)。由图 6 中可见, 经 0.01 mol/L 和 0.1 mol/L H_2O_2 处理, UV-B 照射 24 h 的活细胞的存活率是对照的 3 倍和 5.2 倍; 而经 30 min 和 60 min $55^\circ C$ 热处理, UV-B 照射 24 h 的活细胞的存活率是对照的 3.5 倍和 9 倍。并且活细胞的 H_2O_2 和热抗性随着 UV-B 照射时间的延长增强。

3 结论

1) 通过高密度细胞培养 (1×10^9 个/mL), UV-B 能够抑制酵母细胞生长和诱导细胞凋亡: 照射 96 h 后酵母细胞的存活率比未照射酵母细胞低 16% ($P < 0.05$); 通过采用 DAPI 染色和 DNA Ladder 2 种方法证明了典型的细胞凋亡现象的发生。

2) UV-B 照射 96 h 后活的酵母细胞重新进行 UV-B 照射时发现 12 d 后存活率仍有 10%, 而未照射细胞已经基本死亡。同时, 经 0.01 mol/L 和 0.1 mol/L H_2O_2 处理, UV-B 照射 24 h 的活细胞的存

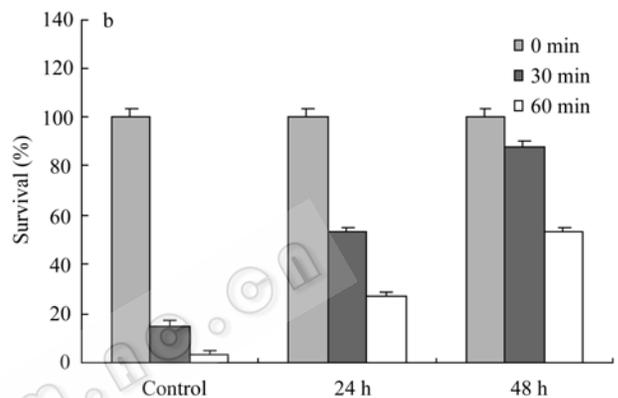
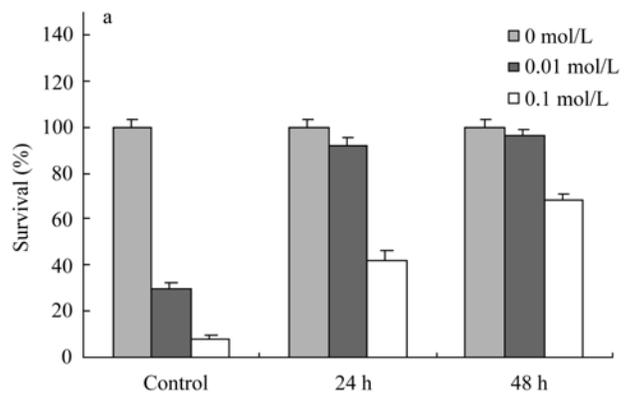


图 6 UV-B 照射后酵母细胞的交叉抗性

Fig. 6 Cross-resistance to irradiated yeast cells

注: a: H_2O_2 抗性; b: 热冲击抗性。

Note: a: Cross-resistance of H_2O_2 to irradiated yeast cells; b: Cross-resistance of heat shock to irradiated yeast cells.

活率分别是对照的 3.0 倍和 5.2 倍; 而经 30 min 和 60 min $55^\circ C$ 热处理, UV-B 照射 24 h 的活细胞的存活率分别是对照的 3.5 倍和 9.0 倍。这说明早期的细胞凋亡确实为长期的细胞生长提供了良好的基础。

由此推论, UV-B 诱导的细胞凋亡赋予了酵母细胞选择性优势, 通过细胞凋亡调节机制, 存活的细胞获得了再生长的能力, 同时提高了抵抗其他外界压力的能力。

参考文献

- [1] Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, *et al.* Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 2004, **164**(4): 501–507.
- [2] 严 慧, 邓丹琪. 紫外线照射表皮细胞后凋亡机制的研究进展. *环境与职业医学*, 2008, **25**(3): 322–325.
- [3] 赵 华, 郭建辉. UV-B 照射对酵母菌生长的影响. *天津科技大学学报*, 2005, **20**(1): 5–8.

- [4] Zhang B, Spandau DF, Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UVB-irradiation-induced apoptosis. *Journal of Virology*, 2002, **76**(1): 220–231.
- [5] Carratore RD, Croce CD, Simili Mar, *et al.* Cell cycle and morphological alterations as indicative of apoptosis promoted by UV irradiation in *S. cerevisiae*. *Mutation Research*, 2002, **513**: 183–191.
- [6] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1996, pp.25–26.
- [7] Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, *et al.* Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in Yeast. *Science*, 2001, **292**(4): 288–290.
- [8] Bitterman KJ, Medvedik O, Sinclair DA. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, **67**(3): 376–399.
- [9] Büttner S, Eisenberg T, Herker E, *et al.* Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *The Journal of Cell Biology*, 2006, **175**(4): 521–525.
- [10] Liang Q, Zhou B. Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. *Mol cell*, 2007, **18**: 4741–4749.
- [11] Madeo F, Frohlich E, Ligr M, *et al.* Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 1999, **145**(4): 757–767.
- [12] Lewis JG, Learmonth RP, Attfield PV, *et al.* Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1997, **18**: 30–36.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内,研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏),大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“*et al.*”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰,成子强,史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p.4.

[4] 董志扬,张树政,方宣钧,等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华璐等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2009-00-00 ; 接受日期: 2009-00-00

(下转 p.852)