

K⁺ 诱导的洋葱细胞凋亡研究

赵锦慧, 古红梅

(周口师范学院 生命科学与农学院, 河南 周口 466001)

摘 要:以洋葱为试材,采用显微观察法,研究了不同浓度的 K⁺ 在不同处理时间下对洋葱鳞茎内表皮细胞凋亡的影响。结果表明:不同浓度的 K⁺ 处理洋葱鳞茎内表皮 1 h 后出现细胞凋亡现象,随着 K⁺ 浓度的升高及处理时间的延长,细胞凋亡现象更明显,细胞凋亡率及细胞内丙二醛含量均上升。

关键词:K⁺; 洋葱鳞茎; 细胞凋亡; 丙二醛含量

中图分类号:Q 942 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)03-0103-03

细胞凋亡现象最初是在动物细胞中发现的,目前对动物细胞凋亡的机制已经了解比较清楚。而对植物细胞凋亡的研究开始较晚,虽然有关植物细胞凋亡的研究时有报道^[1-6],但对其机制了解仍不深入,对植物细胞凋亡发生过程的描述及生理变化研究也较少。现通过观察 K⁺ 不同处理浓度与处理时间组合下洋葱鳞茎内表皮细胞凋亡的形态学表现、统计细胞凋亡率、测定丙二醛含量,探索 K⁺ 对细胞凋亡的诱导作用,并为探索植物细胞的凋亡机制提供新的途径与方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料隔年洋葱购于周口市农贸市场。

1.2 试验方法

1.2.1 洋葱的复苏培养 取隔年洋葱,剥去外皮,剪掉老根,室温下置于盛有清水的烧杯中培养,每天换水,当露出幼嫩的白根,表明洋葱已经复苏。

1.2.2 试验处理设置及细胞形态特征观察 取经过复苏培养的洋葱,切取 0.5 cm² 的内表皮若干。分别用 0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L 的 K⁺ (KCl) 处理内表皮 1 h 和 7 h 后,取出放于标记好的烧杯中,再经改良苯酚品红染

色后,压片观察。以 0 mol/L K⁺ 处理为正对照,取正对照中一部分内表皮放入烧杯内,加水煮沸 10 min,使细胞呈坏死态为负对照,各处理均设置 3 个重复。光学显微镜下比较凋亡细胞与正常细胞(正对照)、坏死细胞(负对照)在形态学上的异同,对细胞形态特征拍照,并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%) = 凋亡细胞数/视野中观察的细胞总数 × 100。

1.3 项目测定

采用硫代巴比妥酸法^[7]测定细胞中丙二醛(MDA)含量,试验设置 3 个重复。

1.4 数据分析

采用 Excel 2007 作图,应用 SPSS 16.0 统计软件分析数据,采用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 对照细胞形态特征观察

由图 1 可知,正对照细胞轮廓分明,细胞膜完整,染色均匀,细胞质均匀透明,细胞核呈球形,细胞结构完整(图 1A);负对照细胞轮廓消失,细胞之间的界限不存在,细胞膜、细胞壁完全裂解,细胞核形状发生明显变化,细胞不能保持结构的完整(图 1B)。

2.2 不同浓度 K⁺ 处理 1 h 后细胞形态特征观察

由图 2 可知,细胞发生不同程度的质壁分离,细胞质内出现碎末状或块状物质,细胞膜皱缩,部分细胞核不完整,并且出现空泡,细胞背景不干净。

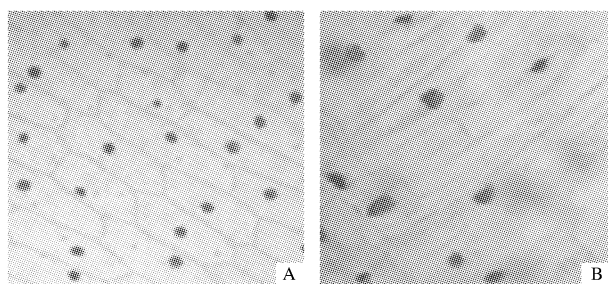
第一作者简介:赵锦慧(1979-),女,硕士,讲师,研究方向为生物技术及植物逆境生理。E-mail:zhaojinhui2005@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(41271280)。

收稿日期:2015-09-22

Abstract: Taking four related species, including *R. pulchrum*, *R. hybrida*, *R. alutaceum* and *R. molle* (Blume) G. Don as materials, cross-species amplification of polymorphic SSR markers developed from *R. simsii* were carried out by PCR method. The results showed that seven markers could successfully amplify in these four related species, which would be useful to investigate species phylogeny, population genetic diversity, differentiation potential of *Rhododendron* species.

Keywords: *Rhododendron*; cross-species amplification; polymorphic; simple sequence repeat



注:A,正对照;B,负对照。

Note:A,Positive control;B,Negative control.

图1 对照细胞形态特征(40×10)

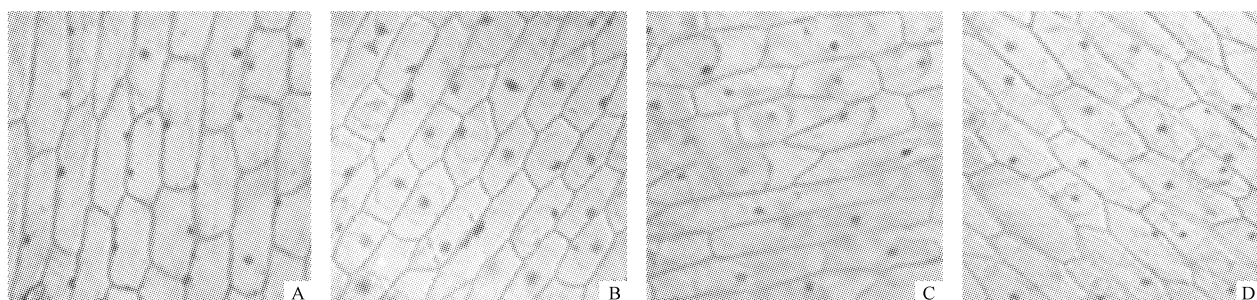
Fig.1 Cell morphological characteristics of the control(40×10)

2.3 不同浓度 K^+ 处理 7 h 后细胞形态特征观察

由图 3 可知,细胞质壁严重分离,细胞质内出现的碎末状或块状物质增多,细胞核发生裂解,边缘模糊,而且泡状结构也更明显,细胞轮廓也发生了不同程度的改变,细胞背景极不干净。

2.4 不同处理下细胞凋亡率统计分析

不同浓度的 K^+ 处理 1 h 和 7 h 后,细胞凋亡率统计分析结果见图 4。图 4 显示, K^+ 处理浓度和处理时间与细胞凋亡率均成正比,各处理间差异达到显著水平。这说明细胞凋亡率受 K^+ 处理浓度和处理时间的双重影响。

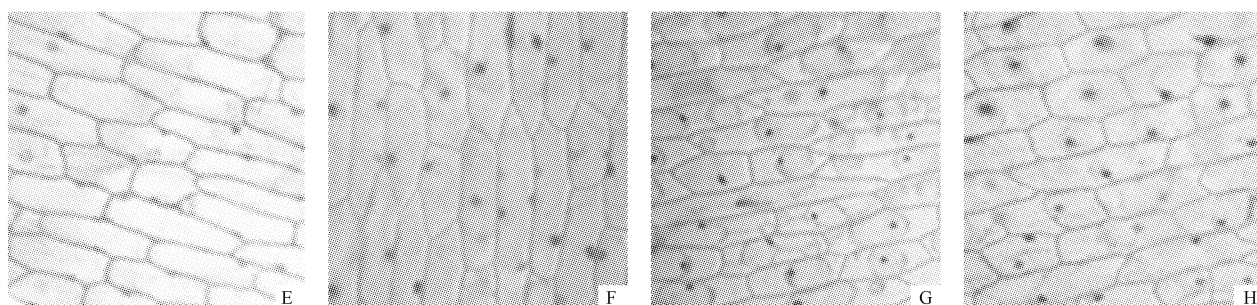


注:A,0.2 mol/L K^+ 处理;B,0.4 mol/L K^+ 处理;C,0.6 mol/L K^+ 处理;D,0.8 mol/L K^+ 处理。

Note:A,Treated by 0.2 mol/L K^+ ;B,Treated by 0.4 mol/L K^+ ;C,Treated by 0.6 mol/L K^+ ;D,Treated by 0.8 mol/L K^+ .

图2 K^+ 处理 1 h 后细胞形态特征(40×10)

Fig.2 Morphological characteristics of cells treated 1 hour by K^+ (40×10)



注:E,0.2 mol/L K^+ 处理;F,0.4 mol/L K^+ 处理;G,0.6 mol/L K^+ 处理;H,0.8 mol/L K^+ 处理。

Note:E,Treated by 0.2 mol/L K^+ ;F,Treated by 0.4 mol/L K^+ ;G,Treated by 0.6 mol/L K^+ ;H,Treated by 0.8 mol/L K^+ .

图3 K^+ 处理 7 h 后细胞形态特征(40×10)

Fig.3 Morphological characteristics of cells treated 7 hours by K^+ (40×10)

2.5 不同处理下细胞中丙二醛(MDA)含量变化及分析

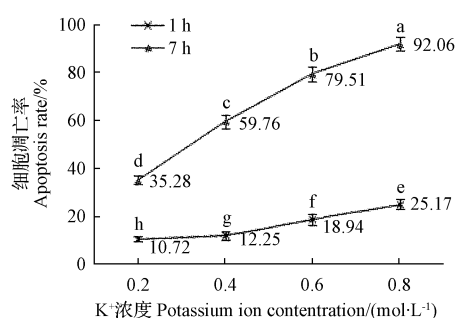
不同浓度的 K^+ 处理 1 h 和 7 h 后,细胞中 MDA 含量及统计分析结果见图 5。图 5 显示,正对照细胞中 MDA 含量均低于 K^+ 处理组, K^+ 处理 7 h 时,各处理浓度间差异显著, K^+ 处理 1 h 时,各处理浓度间差异不明显,这说明 MDA 的产生更容易受 K^+ 处理时间的影响。

3 讨论

试验结果表明,正对照细胞形态正常,轮廓清晰,结

构完整;负对照细胞轮廓消失,不能保持细胞的完整形态; K^+ 处理下细胞出现不同程度的质壁分离,细胞轮廓发生不同程度的变化,细胞核、细胞质、细胞膜等细胞结构也发生不同程度的变化。随着 K^+ 处理浓度的增加和处理时间的延长,细胞凋亡率和内表皮细胞中 MDA 含量均上升。

K^+ 除了参与神经肌肉特定细胞中信号传导引起的兴奋传递外,还具有维持内环境生态平衡的重要作用。 K^+ 之所以可以诱导细胞凋亡,可能因为 K^+ 能刺激线粒

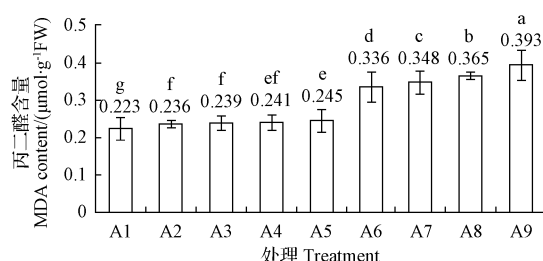


注:图上不同字母表示差异达 0.05 显著水平(Duncan 法),下同。

Note: Values with different letters were significantly different between treatments at 0.05 level according to Duncan test. The same below.

图 4 细胞凋亡率统计分析

Fig. 4 Statistical analysis results of cell apoptosis rate



注:A1,正对照;A2,0.2 mol/L K⁺处理 1 h;A3,0.4 mol/L K⁺处理 1 h;A4,0.6 mol/L K⁺处理 1 h;A5,0.8 mol/L K⁺处理 1 h;A6,0.2 mol/L K⁺处理 7 h;A7,0.4 mol/L K⁺处理 7 h;A8,0.6 mol/L K⁺处理 7 h;A9,0.8 mol/L K⁺处理 7 h。

Note: A1, Positive control; A2, Treated 1 h by 0.2 mol/L K⁺; A3, Treated 1 h by 0.4 mol/L K⁺; A4, Treated 1 h by 0.6 mol/L K⁺; A5, Treated 1 h by 0.8 mol/L K⁺; A6, Treated 7 h by 0.2 mol/L K⁺; A7, Treated 7 h by 0.4 mol/L K⁺; A8, Treated 7 h by 0.6 mol/L K⁺; A9, Treated 7 h by 0.8 mol/L K⁺.

图 5 丙二醛含量及统计

Fig. 5 MDA content and statistical analysis results

体外膜上的受体,使线粒体膜通透性改变,线粒体膜通透性的增强可以导致凋亡诱导因子及细胞色素 C 等促凋亡物质的释放,从而加快细胞凋亡。也可能因为膜质

过氧化物如 MDA 会破坏胞膜上 Ca²⁺ 与 K⁺ 的相对平衡状态,造成胞膜上的 Ca²⁺ 被 K⁺ 替换掉,从而引起 Ca²⁺ 由胞内向胞外流动,最终导致胞膜透性增强,使胞内的某些凋亡诱导因子被释放,进而加快细胞凋亡^[8]。

植物细胞具有细胞壁、液泡和叶绿体,而动物细胞缺少这些结构,这些特有的结构不仅在细胞凋亡中起到关键的作用,而且使得植物细胞具有与动物细胞不同的凋亡特征。该试验结果显示,洋葱内表皮细胞凋亡中很难观察到凋亡小体,这与罗琦等^[6]及潘建伟等^[9]研究结果相似。

该试验仅对 K⁺ 处理下洋葱内表皮细胞形态特征、细胞凋亡率及细胞中生理变化进行了分析,关于洋葱内表皮细胞发生凋亡时,有哪些酶和蛋白质参与并且它们之间是如何联系的有待进一步研究。

参考文献

- [1] KOUKALOVA B, KOVARIK A, FAJKUS J, et al. Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress[J]. FEBS Lett, 1997, 414: 289-292.
- [2] WALKER P R, SIKORSKA M. New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis[J]. Biochem Cell Biol, 1997, 75: 287-299.
- [3] LEVINE A, PENNELL R I, ALVAREZ M E, et al. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response[J]. Curr Biol, 1996(4): 427-437.
- [4] XU Y, HANSON M R. Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in *Petunia* [J]. Plant Physiol, 2000, 122: 1323-1333.
- [5] DANON A, GALLOIS P. UV-C induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana* [J]. FEBS Lett, 1998, 437: 131-136.
- [6] 罗琦, 王建华. 金属离子在细胞凋亡中的调控作用[J]. 重庆大学学报, 2013, 36(8): 97-100.
- [7] 刘萍, 李明军. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 150-152.
- [8] 肖军, 高杰. 高等植物细胞凋亡的诱因及生物学意义[J]. 山东农业大学学报, 2008, 39(1): 125-128.
- [9] 潘建伟, 陈虹, 顾青. 环境胁迫诱导的植物细胞程序性死亡[J]. 遗传, 2012, 34(3): 385-388.

Study on Apoptosis of Onion Induced by Potassium Ion

ZHAO Jinhui, GU Hongmei

(College of Life Science and Agronomy, Zhoukou Normal University, Zhoukou, Henan 466001)

Abstract: Taking onion bulb as material, the effect of different concentration of potassium ion under different processing time on apoptosis in intraepidermal cells of onion bulb were studied by microscopy observation. The results showed that apoptosis generated in intraepidermal cells of onion bulb only after 1 hour by different concentration of potassium ion, with increased concentration and prolonged processing time of potassium ion, apoptosis phenomenon was more obvious, apoptosis rate and MDA content all went up.

Keywords: potassium ion; onion bulb; apoptosis; MDA content