

拉曼光谱技术研究铝胁迫下的土生隐球酵母细胞凋亡

李金金¹ 卢明倩¹ 张晶晶¹ 黄庶识² 陈丽梅¹ 年洪娟¹

(¹ 昆明理工大学生物工程技术研究中心, 云南 昆明 650500)
(² 广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530007)

摘要 运用激光镊子拉曼光谱技术(LTRS)研究铝胁迫下土生隐球酵母细胞和线粒体拉曼光谱变化。细胞和线粒体中与核酸、蛋白质和脂类相关的特征峰强度随着铝处理浓度和处理时间的增加而逐渐降低,表明细胞凋亡过程中细胞和线粒体内的核酸、蛋白质和脂类生物大分子逐渐减少。线粒体内与细胞色素 c(Cyt c)相关的特征峰强度随铝处理浓度增大和处理时间的延长而显著降低,说明线粒体中的细胞色素 c 释放到线粒体外。线粒体的呼吸峰随着铝浓度的增加和处理时间的延长而降低,说明线粒体的活性不断减弱,能量代谢受阻。因此,拉曼光谱实时监测了铝胁迫细胞凋亡的动态过程及其线粒体的生理生化变化过程,并且揭示了铝诱导土生隐球酵母凋亡过程中线粒体内细胞色素 c 的释放行为,这些结果有助于了解酸性土壤中铝对生物的毒害机理。

关键词 光谱学;土生隐球酵母;铝胁迫;细胞凋亡;线粒体;细胞色素 c

中图分类号 Q937 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201441.1115002

Cell Apoptosis in Yeast under Aluminum Stress Analyzed by Laser Raman Spectroscopy

Li Jinjin¹ Lu Mingqian¹ Zhang Jingjing¹ Huang Shushi² Chen Limei¹ Nian Hongjuan¹

(¹ Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China)
(² Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract Laser Raman spectroscopy (LTRS) is used to monitor the Raman spectroscopic changes of *Cryptococcus humicola* cells and mitochondria stressed by aluminum (Al). The results show that the characteristic Raman peaks of *C. humicola* cells and mitochondria are significantly decreased with the increase of aluminum concentration and treatment time, the intensity of Raman peaks associated to nucleic acid, protein and lipid respectively exhibits significant decreasing tendency with the extension of treatment time, indicating that the content of nucleic acid, protein and lipid in the cells and mitochondria is reduced during the apoptosis process. The intensity of characteristic peaks related to cytochrome c (Cyt c) in mitochondria significantly decreases with the increase of aluminum concentration and treatment time, suggesting that the yeast mitochondrial membrane rupture leads to Cyt c release into outer of mitochondria. With the increase of aluminum concentration and treatment time, the respiratory peak is observed to decrease gradually, indicating that the mitochondrial activity becomes weaker, energy metabolism has been hampered. LTRS is used for real-time monitoring of the dynamic process of cell apoptosis and physiological and biochemical changes of *in vitro* mitochondria under aluminum stress, and revealing the release behavior of Cyt c during the apoptosis process of *C. humicola* cells induced by aluminum. The results help understand the biological mechanism of aluminum toxicity in acidic soils on organisms.

Key words spectroscopy; *Cryptococcus humicola*; aluminum stress; cell apoptosis; mitochondria; cytochrome c

OCIS codes 300.6450; 170.1420; 140.3550

收稿日期: 2014-07-08; 收到修改稿日期: 2014-07-27

基金项目: 国家自然科学基金(31160020)

作者简介: 李金金(1988—),男,硕士研究生,主要从事微生物逆境基因工程方面的研究。E-mail: 175786017@qq.com

导师简介: 年洪娟(1974—),女,博士,副教授,主要从事微生物逆境生物学方面的研究。

E-mail: hjnian@163.com(通信联系人)

1 引言

铝是地壳中含量最丰富的金属元素,约占地壳总质量的7%,通常它在土壤中主要以无毒的固定态硅酸盐或氧化物的形式存在。在pH低于4.5的酸性土壤中,铝主要以 Al^{3+} 形态存在,这一形态被认为是生物毒性最强的形态^[1]。随着工业的发展,我国酸雨污染呈加速上升趋势。酸雨降低了土壤的pH值,导致有毒性的铝逐渐释放出来,严重影响农作物的生长和产量,因此备受学者的关注。

铝对细胞的毒害途径之一是诱导细胞凋亡,细胞凋亡是生物体内绝大多数细胞在一定发育阶段由基因调控的、自主的、有序的死亡过程,它对组织进化、器官发育和机体自身稳定的维持起着重要作用。细胞凋亡也会由生物或者非生物的胁迫诱导产生,关于细胞凋亡的机理在动物中研究比较清楚^[2-4]。近期研究发现,铝胁迫也会导致植物出现一些类似凋亡的特征,比如大量产生活性氧(ROS)、线粒体功能障碍、线粒体膜电位丧失、线粒体肿胀、caspase-3蛋白酶激活^[5-10]。但是,在微生物中铝毒诱导细胞发生凋亡的机制还鲜有报道。

前期研究发现,铝胁迫能够导致土生隐球酵母发生细胞凋亡^[11]。本研究应用激光镊子拉曼光谱(LTRS)研究不同浓度铝毒胁迫和铝毒胁迫处理不同时间后土生隐球酵母细胞和线粒体的拉曼光谱变化,以揭示铝毒诱导土生隐球酵母发生凋亡过程中细胞和线粒体中物质的变化规律,从而加深铝胁迫对生物细胞毒害机理的认识。

2 材料和方法

2.1 材料

土生隐球酵母菌株BSLL1-1分离自云南保山茶园酸性土壤中^[12]。

GM培养基:1 g/L 蛋白胨,0.5 g/L 酵母提取物,20 g/L 葡萄糖,pH值为3.5。

含 Al^{3+} 的GM培养基:配制2×GM液体培养基,称取1 g 蛋白胨,0.5 g 酵母提取物,20 g 葡萄糖,用500 mL 蒸馏水溶解,将pH值调节到5.0,115℃下灭菌30 min(如需配制固体培养基,需加入20 g 琼脂粉)。配制 Al^{3+} 溶液,用蒸馏水溶解 $AlCl_3 \cdot 7H_2O$,调节铝浓度至所需浓度的2倍,调节pH至3.0,121℃下灭菌30 min。高压灭菌后,在超净工作台上趁热将等体积的2×GM培养基和 Al^{3+} 溶液混合,即得到所需 Al^{3+} 浓度的GM液体培养基。

2.2 激光镊子拉曼光谱系统

实验所用LTRS系统由TE2000U倒置生物显微镜(Nikon公司)配备波长为780 nm的半导体激光器(SACHER,775~790 nm,500 mW)、拉曼光谱仪(Spectrapro2300i,Acton)、电荷耦合器件(CCD,Spec-10,Princeton Instruments)、摄影相机系统、干涉陷波滤波器(HNF)、台式电脑、监视显示器以及系统透镜组成。780 nm的激光束被导入倒置显微镜油浸物镜(N.A.1.30,100×),聚焦后在焦点附近形成一个单光束光势阱来俘获单个细胞,同时这束激光也用于激发被困细胞产生拉曼散射。系统分辨率为6 cm,激光波长为785 nm,收集拉曼光谱,并校正系统。

2.3 铝胁迫酵母细胞的存活率和拉曼光谱测定

2.3.1 不同浓度铝处理酵母细胞的存活率测定

分别取1 mL的酵母悬浮液,在等体积、终浓度分别为0,20,50,100,150,200 mM的铝溶液中进行处理,28℃、100 rpm条件下缓慢振荡6 h后,离心去掉上清液,用0.01 mol/L PBS缓冲液(NaCl 8 g, KCl 0.2 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.62 g, KH_2PO_4 0.24 g, ddH_2O 1 L,调节pH至7.4)洗涤3次。用0.01 mol/L PBS悬浮酵母菌体细胞,使酵母悬浮液稀释为每毫升 10^4 个细胞,取100 μ L菌液涂布于GM固体培养基上,于28℃培养3 d,直至平板上不再长出新菌落为止,计数活菌落数,计算细胞存活率。

2.3.2 200 mM 铝对细胞处理不同时间的细胞存活率测定

取1 mL的酵母悬浮液,然后用浓度为200 mM的铝离子溶液处理,28℃、100 rpm条件下缓慢振荡,分别在0,2,4,6,8,12 h时间点取样,离心去掉上清液,用0.01 mol/L PBS洗涤3次,然后用0.01 mol/L PBS悬浮酵母,将酵母悬浮液稀释为每毫升 10^4 个细胞后,取100 μ L菌液涂布于GM固体培养基上,在28℃下培养3 d,直至平板上不再长出新菌落为止,计数活菌落数,计算细胞存活率。

2.3.3 铝胁迫群体细胞的拉曼光谱测定

分别取0,20,50,100,150,200 mM铝离子溶液处理后的酵母细胞悬浮液和200 mM铝离子溶液处理0,2,4,6,8,12 h的酵母细胞悬浮液200 μ L于石英载玻片样品池中,入射激光强度为18 mW,积分时间为20 s,光镊子随机俘获单个酵母细胞测定拉曼光谱,共测定30个细胞。

2.3.4 200 mM 铝胁迫不同时间单个细胞的拉曼光谱测定

测定单个酵母细胞时,取酵母细胞悬浮液5 μ L

于样品槽中,再加入配制好的 200 mM 铝溶液 200 μL ,混匀后盖上盖玻片,光镊子随机捕获单个酵母细胞,于 0,20,40,60,80,100,120 min 时间点分别测定光谱,实时监测 2 h,入射激光强度为 3 mW,积分时间为 60 s,为避免激光长时间对细胞的照射,不测光谱的时候遮挡激光,按同样方法重复测定 10 个细胞。

2.4 铝胁迫离体线粒体的拉曼光谱测定

2.4.1 酵母线粒体的提取

酵母线粒体的提取参照金建玲等^[13]提出的方法并进行优化。将收集的菌体用 pH 值为 7.5 的 0.05 mol/L Tris 缓冲液(50 mL 0.1 mol/L Tris 碱溶液与 40.3 mL 的 0.1 mol/L HCl 混合,加水定容至 100 mL)洗涤 3 次,加入预处理缓冲液(pH 8.0,含 0.1 mol/L EDTA、1% β -巯基乙醇的 0.01 mol/L PBS 溶液),在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、100 rpm 条件下振荡 90 min;将上述溶液以 5000 rpm 离心 5 min,弃去上清,沉淀用 0.01 mol/L PBS 洗 2 次,以 5000 rpm 离心 5 min,收集沉淀;向沉淀中加入酶解缓冲液(pH 7.4,含 40 mg/mL 蜗牛酶、4 mg/mL 纤维素酶、0.9 mol/L 山梨醇的 0.01 mol/L PBS 溶液,蜗牛酶和纤维素酶均购于上海楷洋生物技术有限公司),混匀后在 32 $^{\circ}\text{C}$ 、160 rpm 条件下处理 4 h;以 5000 rpm 离心 5 min,去掉酶解缓冲液,用 0.01 mol/L PBS 洗 1 次,取沉淀,加入原生质体裂解液[pH 7.5,含 10 mM/L Tris-HCl(1.21 g/L Tris 碱,pH 8.0)、5 mM/L EDTA、0.35 mol/L 山梨醇的 0.01 mol/L PBS 溶液],混匀后加入 5 倍体积的玻璃珠涡旋振荡 15 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 、1500 g 条件下离心 10 min,去沉淀,用原生质体裂解液洗涤 2 次,每次均弃去沉淀收集上清溶液,将所得上清液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、18000 g 条件下离心 20 min,收集沉淀;加入线粒体洗涤缓冲液(pH 7.5,含 10 mM/L Tris-HCl、2 mM/L EDTA、0.5 mol/L 山梨醇的 0.01 mol/L PBS 溶液),在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1500 g 条件下离心 10 min,去沉淀;将上述上清液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、18000 g 条件下离心 20 min 后收集沉淀,所得沉淀即为线粒体,加入线粒体洗涤缓冲液悬浮线粒体。

2.4.2 不同浓度铝胁迫细胞后单个线粒体的拉曼光谱测定

将土生隐球酵母涂板培养 36 h,挑取单菌落至新鲜 GM 培养基上培养 24 h,按 1% 的接种量接种到新鲜的 GM 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 条件下培养 24 h,离心收集菌体,用 0.01 mol/L PBS 洗

2~3 次,在等体积、终浓度分别为 0,50,100,200 mM 的铝离子溶液中进行处理,28 $^{\circ}\text{C}$ 、100 rpm 条件下缓慢振荡 60 min,离心去掉处理液,用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,称湿重,提取酵母线粒体。分别取提取的酵母线粒体悬浮液 200 μL 于石英载玻片样品池中,入射激光强度为 18 mW,积分时间为 20 s,光镊子随机俘获单个酵母线粒体测定拉曼光谱,共测定 20 个线粒体。

2.4.3 不同浓度铝胁迫细胞后群体线粒体的拉曼光谱测定

分别取 0,50,100 和 200 mM 铝胁迫酵母 60 min 后,提取其线粒体,然后取线粒体悬浮液 200 μL 于石英载玻片样品池中,入射激光强度为 18 mW,积分时间为 60 s,光镊子随机俘获单个线粒体测定拉曼光谱,共测定 20 个线粒体。

2.4.4 50 mM 铝胁迫单个线粒体的拉曼光谱测定

将活化的土生隐球酵母划线培养 36 h,挑取单菌落至新鲜培养基中培养 24 h,按 1% 的接种量接种到新鲜的 GM 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 条件下培养 24 h,离心收集菌体,用 0.01 mol/L PBS 洗 2~3 次,称湿重后提取线粒体。取线粒体悬浮液 5 μL 于样品槽中,再加入配制好的 50 mM 铝溶液 200 μL ,混匀后盖上盖玻片,光镊子随机捕获单个线粒体,在 0,20,40,60,80,100 min 时间点分别测定光谱,实时监测 100 min,入射激光强度为 3 mW,积分时间为 60 s,为避免激光长时间对线粒体的照射,不测光谱的时候遮挡激光,按同样方法重复测定 10 个线粒体。

2.5 数据处理

将收集到的光谱数据以 spe 格式导入软件 Micro-Origin 8.0 进行前处理后,通过自编的 Matlab 程序进行去背景平滑,利用 Raman Baseline 软件进行基线校正。数据通过 t 检验进行显著性分析($P < 0.05$)。

3 结果与分析

3.1 铝胁迫导致土生隐球酵母存活率下降

不同浓度铝处理 6 h 后,随着铝浓度的增大,土生隐球酵母细胞的存活率逐渐下降,当铝浓度为 50 mM 时,存活率为 71.6%。当铝浓度达到 200 mM 时,细胞存活率下降为 16.8%(图 1)。

用 200 mM 浓度铝处理不同时间后,土生隐球酵母细胞的存活率会随着时间的增加而逐渐降低。当处理 1 h 后,存活细胞为处理前的 62.8%;当处

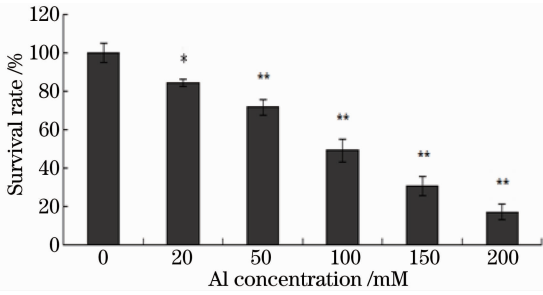


图 1 不同浓度铝胁迫 6 h 后酵母的存活率

Fig. 1 Survival rate of yeast treated with different Al concentrations for 6 h

理 2 h 后,存活率下降到 42.5%,而当处理时间达到 6 h 后,酵母细胞大部分死亡,存活率仅为 16.8% (图 2)。这些结果说明酵母的死亡随着铝处理浓度的增加和处理时间的延长而增加。

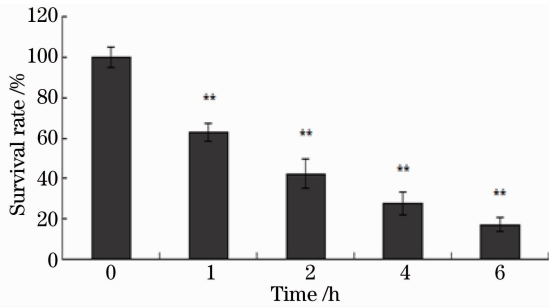


图 2 200 mM 铝处理酵母不同时间的存活率

Fig. 2 Survival rate of yeast treated with 200 mM Al for different time

3.2 铝处理酵母群体细胞的拉曼光谱

用 0, 20, 50, 100, 150, 200 mM 铝处理酵母群体细胞 6 h 后, 721, 872, 1081, 1301, 1445, 1604, 1657 和 1746 cm^{-1} 这几个谱峰的强度随着铝浓度的增加而降低(图 3)。用 200 mM 铝处理酵母群体细胞不同时间后, 上述几个谱峰的强度也随着处理时间的延长而降低(图 4), 说明以上谱峰强度的变化对处理浓度和处理时间有明显的依赖性。

721 cm^{-1} 谱峰归属于腺嘌呤和蛋白质侧链 C—S 键的反式构象, 872 cm^{-1} 谱峰是色氨酸环呼吸振动引起的, 1081 cm^{-1} 谱峰来源于双链 DNA 的骨架磷酸基团的 PO_2^- 对称伸缩振动, 1301 cm^{-1} 谱峰是腺嘌呤、胞嘧啶和脂类 CH_2 扭曲引起的谱线, 1445 cm^{-1} 谱峰是由脂类和蛋白质侧链的 CH_2 弯曲振动共同产生的谱线, 1604 cm^{-1} 谱峰归属酪氨酸和苯丙氨酸, 1657 cm^{-1} 谱峰是蛋白质主链酰胺 I 的 α -螺旋引起的谱线, 1746 cm^{-1} 谱峰归属 C=O 结构(表 1)。图 3 和图 4 结果说明, 随着铝浓度增加或随着铝处理时间的延长, 酵母群体细胞中与蛋白质、

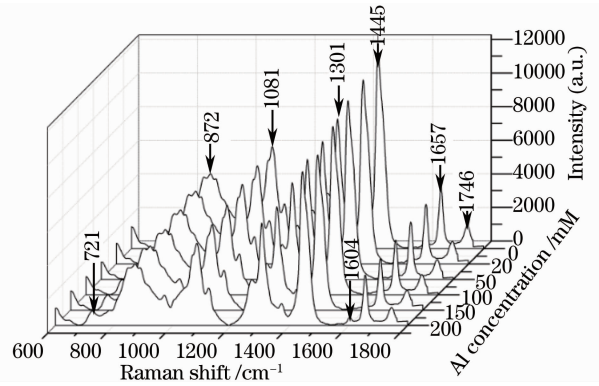


图 3 不同浓度铝处理酵母群体细胞 6 h 后的平均拉曼光谱图

Fig. 3 Average Raman spectra of yeast cells treated with different Al concentrations for 6 h

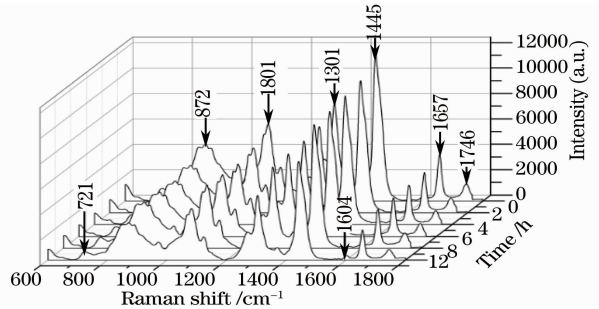


图 4 200 mM 铝处理群体细胞不同时间后的平均拉曼光谱图

Fig. 4 Average Raman spectra of cells treated with 200 mM Al for different time

核酸、脂类相关的谱峰强度在不断降低, 反映了酵母凋亡过程中细胞内的核酸、蛋白质和脂类的含量均随铝浓度和处理时间增加而减小, 显示了细胞凋亡过程中这三类生物大分子的变化趋势。

表 1 酵母细胞的拉曼谱峰归属表^[14-16]

Table 1 Tentative assignment of Raman spectrum peak derived from yeast cells^[14-16]

Raman band / cm^{-1}	Assignment		
	DNA/RNA	Protein	Lipid
721	A	C—S	
872		Trp	
1081	O=P=O		
1301	C, A		CH_2 stretch
1445		CH_2 bend	CH_2 bend
1604		Tyr, Phe	
1657		Amide I α -helix	
1746			C=O stretch

3.3 铝处理单个细胞不同时间的拉曼光谱分析

如图 5 所示, 一个酵母细胞用 200 mM 铝胁迫

后,在 0,20,40,60,80,100,120 min 时间点的拉曼光谱表明,随着铝处理时间的增加,721,872,1081,1301,1445,1604,1657 和 1746 cm^{-1} 的拉曼谱峰强度呈逐渐降低的趋势,这与铝胁迫群体细胞的变化趋势是一致的。为了描述酵母细胞中生物大分子的含量随铝处理时间变化的规律,应用单因素方差分析方法对 8 个谱峰强度变化进行比较分析(图 6)。结果显示,8 个拉曼谱峰强度随铝处理时间增加而逐渐降低[图 6(a)~(h)],但是不同的谱峰变化趋势有所差异。铝胁迫 100 min 和未胁迫(时间为零)时的峰强度相比,721[图 6(a)],1301[图 6(d)],1445[图 6(e)],1604[图 6(f)]和 1746 cm^{-1} [图 6(h)]谱峰表现出显著差异,分别降到对照值的 70.0%,68.5%,70.5%,63.2%和 66.9%。872[图 6(b)],1081[图 6(c)]和 1657 cm^{-1} [图 6(g)]谱峰是在 120 min 时呈显著差异,分别降到对照值的 72.9%,

71.2%和 79.1%。这些结果反映了酵母凋亡过程中大分子的变化趋势是一个渐进的过程,但不同成分的降低并不随铝胁迫的时间延长而趋于同步。

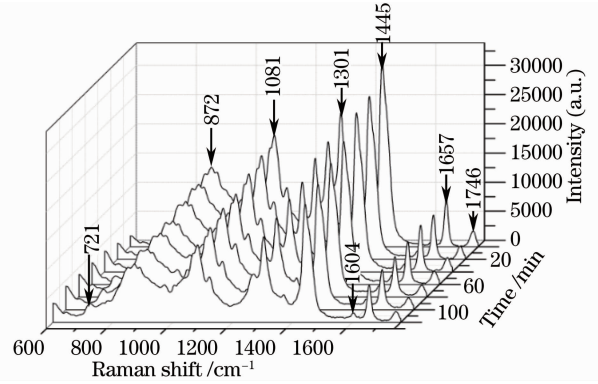
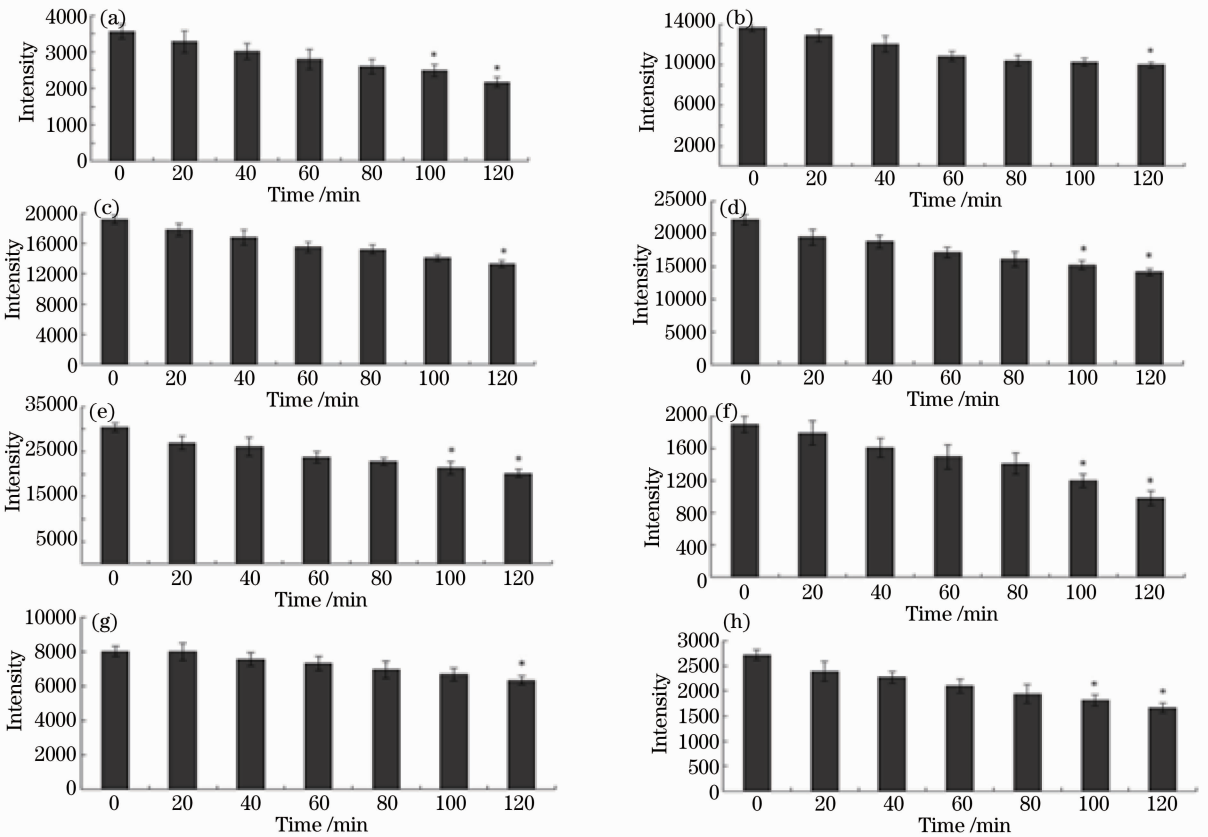


图 5 200 mM 铝胁迫单个细胞随时间变化的拉曼光谱图
Fig. 5 Raman spectra of a single cell induced by 200 mM Al



Note: * means statistically significant ($P < 0.05$), $n = 10$ cells/group

图 6 200 mM 铝处理细胞后拉曼谱峰强度随时间的变化趋势图

Fig. 6 Variation trend of intensity of Raman peaks

3.4 铝胁迫细胞后线粒体的拉曼光谱分析

单个线粒体的拉曼光谱(图 7)显示了磷酸离子 $\text{O}=\text{P} \cdots \text{O}$ 的对称伸缩振动(1081 cm^{-1})、苯丙氨酸特征峰(1004 cm^{-1})、蛋白质和脂类的 C-H 振动

模型(1445 cm^{-1})、蛋白质酰胺 I 振动(1657 cm^{-1})的谱峰,说明线粒体主要由蛋白质、核酸、脂类等生物大分子组成。具体每个峰的归属如表 2 所示。750、1130、1320、1587 cm^{-1} 分别归属吡咯呼吸环伸

缩振动、吡咯半环对称伸缩振动、Cm-H 变角振动、Ca-Cm 对称伸缩振动^[17], 是 Cyt c 的特征峰。酵母线粒体光谱也表征了 750 cm⁻¹ 和 1130 cm⁻¹ 这两个 Cyt c 的特征峰(图 7)。

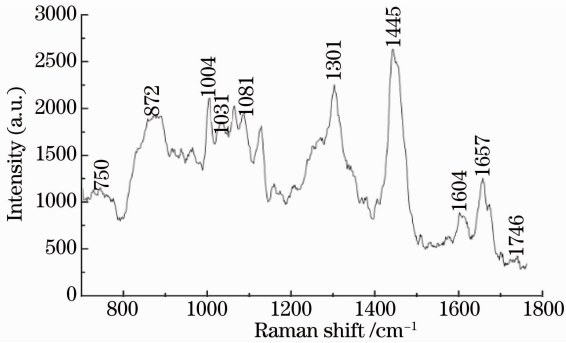


图 7 铝胁迫细胞后单个线粒体的拉曼光谱图
Fig. 7 Raman spectrum of a single mitochondrion of cell treated with Al

表 2 线粒体以及 Cyt c 的拉曼谱峰归属表^[14-16]
Table 2 Tentative assignment of Raman spectrum peak from mitochondria and Cyt c^[14-16]

Raman band /cm ⁻¹	Assignment		
	DNA/RNA	Protein	Lipid
750		Trp	
872		Trp	
1004		Phe	
1031		Phe	
1064			Skeletal C-C stretch
1081	O=P=O		
1130			C-C
1301	C, A		CH ₂ stretch
1445		CH ₂ bend	CH ₂ bend
1604		Tyr, Phe	
1657		Amide I α-helix	
1746			C=O stretch

图 8 的结果显示, 酵母细胞用铝胁迫后, 随着铝浓度的增加, 其线粒体拉曼光谱各个峰的强度明显减弱。Cyt c 松散地结合在线粒体内膜外侧磷脂上, 不能自由通过线粒体外膜。当线粒体膜通透性转运孔(MPTP)不断开放, 线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)降低时, 线粒体膜完整性被破坏, 这促使 Cyt c 从线粒体内膜上脱落下来释放到细胞质中^[18]。细胞色素 c 的特征峰 750 cm⁻¹ 和 1130 cm⁻¹ 的强度随着铝浓度的增加而不断下降。用 50、100、200 mM 的铝处理 60 min 后, 这两个特征峰的强度与对照相比分别下降了 15%、50%、80%。这说明随着铝浓度的不断

增加, 线粒体中的细胞色素 c 不断减少。归属核酸的谱峰如 1081 cm⁻¹ 和 1301 cm⁻¹ 的强度随着铝胁迫浓度的增加而降低, 当用 50、100、200 mM 的铝处理 60 min 后核酸的峰强度与对照相比下降了 30%、50%、80%, 这说明随着铝浓度的不断增加, DNA 的完整性不断被破坏, 含氮碱基含量不断减少, 线粒体的核酸含量减少。代表蛋白质的谱峰如 872、1004、1031、1445、1604 和 1657 cm⁻¹ 的强度随着铝浓度的增加而降低, 与对照相比, 用 50、100、200 mM 的铝处理 60 min 后其峰强度分别下降约 20%、40%、80%, 说明线粒体中的蛋白质含量减少。1064、1301、1445 和 1746 cm⁻¹ 谱峰归属线粒体主要成分磷脂, 表明处理的铝浓度越高, 线粒体磷脂的谱峰强度越低, 线粒体主要成分磷脂含量越低。此外, 1604 cm⁻¹ 是线粒体的呼吸特征峰, 随着铝浓度增加, 这个呼吸特征峰强度随之降低。由于谱峰的强度与线粒体的代谢活动密切相关, 它的变化反映线粒体的呼吸水平^[19-20], 可以作为衡量线粒体生物活性的一个敏感标准谱峰, 当线粒体的能量代谢受阻时, 1604 cm⁻¹ 谱峰的强度明显下降甚至消失。铝诱导酵母细胞凋亡过程中, 观察到 1604 cm⁻¹ 谱峰的强度明显下降, 说明铝胁迫使得线粒体的功能受损, 从而造成细胞能量代谢受阻。

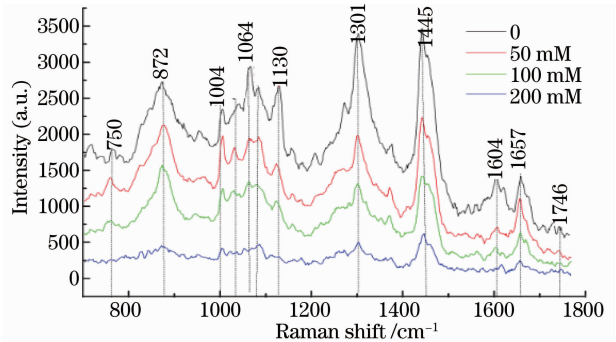


图 8 不同浓度铝处理酵母细胞 60 min 后线粒体拉曼光谱图

Fig. 8 Raman spectra of yeast mitochondria induced by Al for 60 min

图 9 显示一个典型的离体线粒体用 50 mM 铝胁迫后的拉曼光谱。随着铝处理时间的增加, 酵母线粒体主要拉曼谱峰 750, 872, 1004, 1031, 1064, 1081, 1130, 1301, 1445, 1604, 1657 和 1746 cm⁻¹ 的峰强度呈逐渐降低的趋势。

图 10 是用 50 mM 铝处理了 10 个酵母线粒体后 12 个拉曼谱峰强度随时间的变化趋势。与对照相比, 实验组的 10 个酵母线粒体暴露在 50 mM 铝离子

溶液中 80 min 后,750[图 10(a)],872[图 10(b)],1004[图 10(c)],1031[图 10(d)],1064[图 10(e)],1081[图 10(f)],1130[图 10(g)],1301[图 10(h)],1445[图 10(i)],1604[图 10(j)],1657[图 10(k)]和 1746 cm^{-1} [图 10(l)]处的峰强度和对照相比有显著差异($P < 0.05$),其峰强度分别降到对照值的 62.7%,75.4%,75.2%,78.3%,69.5%,75.1%,74.4%,67.2%,73.9%,72.5%,78.1%和 75.7%。

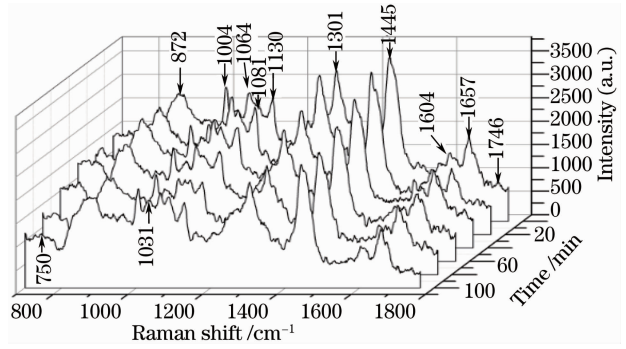


图 9 一个典型离体线粒体暴露在 50 mM 铝溶液中随时间变化的拉曼光谱图

Fig. 9 Raman spectra of a typical single mitochondrion induced by 50 mM Al

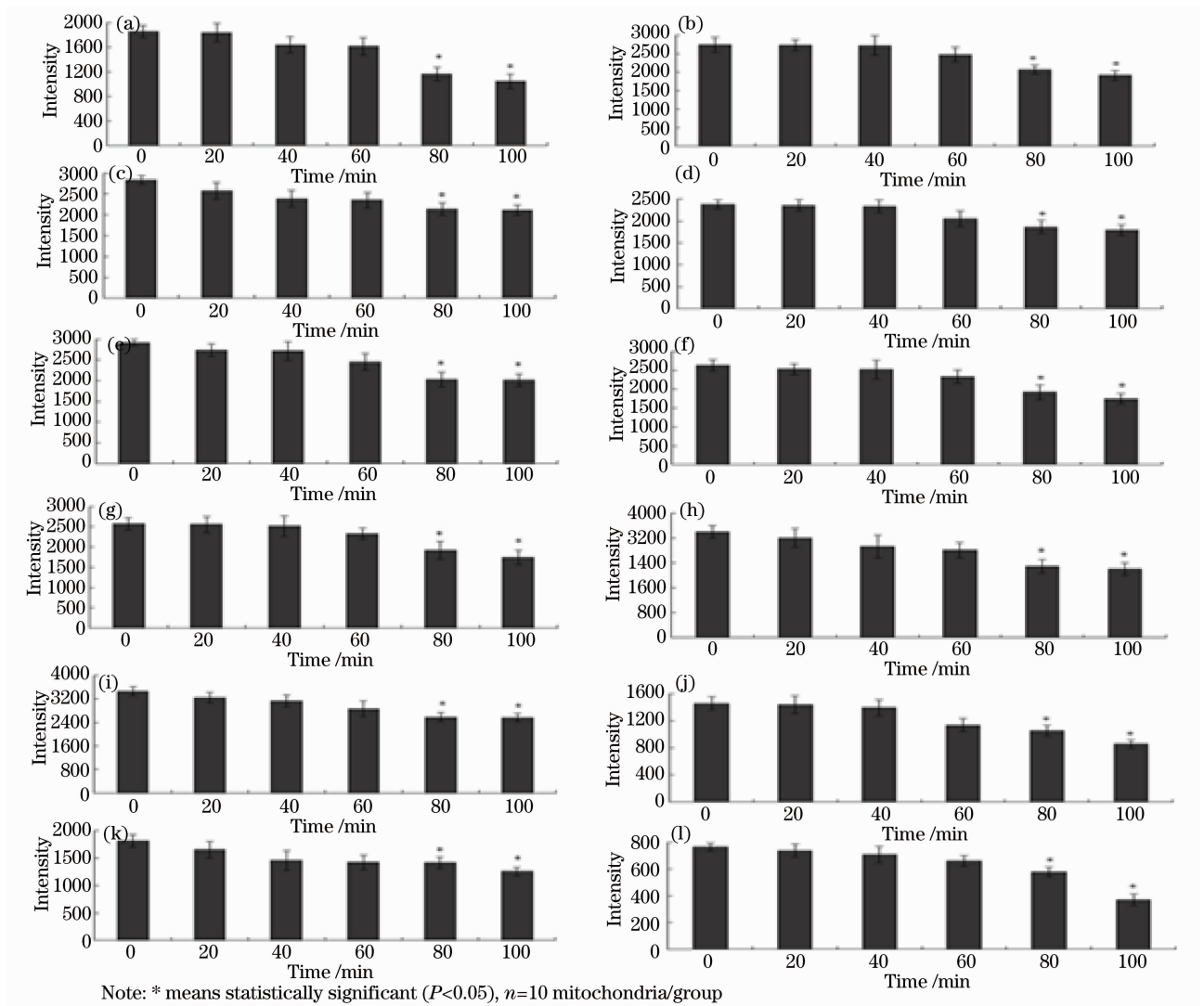


图 10 50 mM 铝处理酵母线粒体后 12 个拉曼谱峰的峰强度随时间增加的变化趋势图

Fig. 10 Variation trend of intensity of Raman peaks

4 讨 论

目前检测细胞凋亡的方法有很多,但是这些检

测方法都无法获知细胞凋亡的内部变化。LTRS 具有非破坏性,非标记性,检测速度快等优点,可以实

时、无损伤测定细胞受胁迫后单个细胞以及胞外线粒体动态的生理生化变化过程,近几年在生命科学研究领域得到了广泛应用^[21-25]。由于生物大分子如核酸、蛋白质、脂类等都具有特异的拉曼光谱,从这些特征的光谱中可以获得它们的组织结构及生理状态等信息。关于细胞凋亡机理的研究报道对大分子物质包括蛋白质、核酸和脂类的变化规律还知之甚少。在酿酒酵母中,乙酸可以激活内源性的核酸内切酶,有规律地将染色质上的 DNA 剪切成 200 bp 整数倍的小片段。凋亡细胞加速膜内磷脂组分的双向运动,导致膜质双层的不对称性丧失,膜上出现许多微孔,细胞膨胀,细胞膜的强度降低,使得细胞膜渗透性增加,降解的 DNA 通过细胞膜扩散到细胞外,这可能也是铝胁迫导致土生隐球酵母细胞中核酸含量降低的原因。乙酸胁迫细胞凋亡过程中,乙酸抑制某些蛋白质的合成,同时上调表达可以水解蛋白质的酶如半胱氨酸蛋白酶家族,部分蛋白质也因为膜透性增加而外流,造成胞内蛋白质的含量相对减少^[26]。另外,细胞内脂类的减少可能是不饱和脂肪酸被氧化而引起的。

线粒体和细胞色素 c 在细胞凋亡中发挥着重要的作用。胞外离体线粒体约 1 μm 左右,可被高度会聚的激光镊子所捕获。而线粒体内含有丰富的细胞色素,具有较强的拉曼光谱信号,激发的拉曼光谱可被连续记录,实现在非标记条件下,对线粒体实时监测。Tang 等^[27]曾利用 LTRS 监测到小鼠单个线粒体在 Ca^{2+} 作用下因细胞肿胀而引起内含物的释放过程和单个肿胀线粒体的生物活性。Chiu 等^[28]研究酵母离体线粒体 1602 cm^{-1} 这个生命特征峰的存在和反应与活的酵母细胞相同,当加入呼吸抑制剂(如叠氮化钠)时,这个生命特征峰的强度会降低。Kakita 等^[29]利用拉曼光谱观察到活的酵母细胞中的线粒体和离体线粒体细胞色素 b 和细胞色素 c 的氧化还原态随着呼吸的变化而变化。经典的研究方法主要是测定线粒体中细胞色素 c 含量或者是利用 Western-blot 分析细胞色素 c 从线粒体到细胞质中的释放^[30]。本研究利用激光拉曼光谱技术观察铝胁迫引起土生隐球酵母细胞和线粒体中生物大分子的动态变化过程,实时监测了铝胁迫引起细胞色素 c 的变化规律,这些研究结果有助于了解铝胁迫对生物的毒害和引起细胞凋亡的机理。

5 结 论

LTRS 能够通过聚焦光束囚禁悬浮液中的单个

活体土生隐球酵母和线粒体,收集其拉曼光谱信号,所测到的拉曼光谱强度可以反映细胞和线粒体中主要生物大分子物质(核酸、蛋白质、脂类)和线粒体中细胞色素 c 在铝胁迫后的动态变化规律,通过观察线粒体的呼吸特征峰的变化了解线粒体的呼吸水平,从而了解酸性土壤中铝产生生物毒性的机理。

参 考 文 献

- Pina R G, Cervantes C. Microbial interactions with aluminium [J]. *Biometals*, 1996, 9(3): 311-316.
- Liu X, Kim C N, Yang J, *et al.*. Induction of apoptotic program in cell-free extracts; Requirement for dATP and cytochrome c [J]. *Cell*, 1996, 86(1): 147-157.
- Verhagen A M, Ekert P G, Pakusch M, *et al.*. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins [J]. *Cell*, 2000, 102(1): 43-53.
- Lorenzo H K, Susin S A, Penninger J, *et al.*. Apoptosis inducing factor (AIF): A phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(6): 516-524.
- Panda S K, Yamamoto Y, Kondo H, *et al.*. Mitochondrial alterations related to programmed cell death in tobacco cells under aluminum stress [J]. *C R Biol*, 2008, 311(8): 597-610.
- Keith D R, Eric J S, Yogesh K S, *et al.*. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116(1): 409-418.
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Rama D S, *et al.*. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells [J]. *Plant Physiol*, 2002, 128(1): 63-72.
- Boscolo P R, Menossi M, Jorge R A. Aluminum induced oxidative stress in maize [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(2): 181-189.
- Yin L N, Mano J C, Wang S W, *et al.*. The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(3): 1406-1417.
- Li Z, Xing D. Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminum phytotoxicity using fluorescence techniques [J]. *J Exp Bot*, 2010, 62(1): 331-343.
- Nian H, Wang G, Chen L. Physiological and transcriptional analysis of the effects of aluminum stress on *Cryptococcus humicola* [J]. *Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(6): 2319-2329.
- Nian H J, Wang G Q, Zhao L W, *et al.*. Isolation of Al-tolerant yeasts and identification of their Al-tolerance characteristics [J]. *J Biol Res*, 2012, 18: 227-234.
- Jin Jianling, Gao Dong, Sun Zhongdong. A simple procedure for preparation mtDNA in yeast [J]. *Hereditas*, 1996, 18(2): 46-48.
金建玲, 高 东, 孙忠东. 一种制备酵母菌线粒体 DNA 的简便方法 [J]. *遗传*, 1996, 18(2): 46-48.
- Shetty G, Kendall C, Shepherd N, *et al.*. Raman spectroscopy: Elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus [J]. *Brit J Cancer*, 2006, 94(10): 1460-1464.
- Nottingham I. Raman spectroscopy cell-based biosensors [J]. *Sensors*, 2007, 7(8): 1343-1358.
- Xu Yiming. Raman Spectroscopy and Its Application in Structural Biology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- Chikao O, Hamaguchi H O. *In vivo* resonance Raman detection

- of ferrous cytochrome c from mitochondria of single living yeast cells[J]. Chem Lett, 2010, 39(3): 270–271.
- 18 Tonshin A A, Saprunova V B, Solodovnikova I M. Functional activity and ultrastructure of mitochondrial isolated from myocardial apoptotic tissue[J]. Biochemistry (Moscow), 2003, 68(8): 875–881.
- 19 Pully V V, Otto C. The intensity of the 1602 cm^{-1} band in human cells is related to mitochondrial activity[J]. J Raman Spectrosc, 2009, 40(5): 473–475.
- 20 Hamada K, Fujita K, Smith N I, *et al.*. Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells[J]. J Biomed Opt, 2008, 13(4): 044027.
- 21 Li Zida, Lai Junzhuo, Liao Wei, *et al.*. Raman spectroscopic profile of ethanol fermentation in high gravity cassava starch brewing[J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(3): 0317001.
李自达, 赖钧灼, 廖威, 等. 浓醪乙醇发酵的单细胞拉曼光谱表征[J]. 光学学报, 2012, 32(3): 0317001.
- 22 Ye Yuhuang, Chen Yang, Li Yongzeng, *et al.*. Discrimination of nasopharyngeal carcinoma and normal nasopharyngeal cell lines based on confocal Raman microspectroscopy [J]. Chinese J Lasers, 2012, 39(5): 0504003.
叶宇煌, 陈阳, 李永增, 等. 基于拉曼光谱的鼻咽癌与正常鼻咽细胞株的分类研究[J]. 中国激光, 2012, 39(5): 0504003.
- 23 Liu Shupeng, Zhu Hongfei, Chen Na, *et al.*. Surface enhanced Raman scattering spectrum analysis of nude mouse serum with Au nanoparticles active substrate[J]. Chinese J Lasers, 2012, 39(5): 0504004.
刘书朋, 朱鸿飞, 陈娜, 等. 金颗粒为活性基底的裸鼠血清表
面增强拉曼散射光谱分析[J]. 中国激光, 2012, 39(5): 0504004.
- 24 Sun Meijuan, Jiang Yuling, Lai Aihua, *et al.*. Analysis of lipid and carotenoids in *Rhodospiridium toruloides* using laser tweezer Raman spectroscopy [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2013, 50(3): 033001.
孙美娟, 蒋玉凌, 来爱华, 等. 激光镊子拉曼光谱技术分析圆红冬孢酵母生成油脂和类胡萝卜素[J]. 激光与光电子学进展, 2013, 50(3): 033001.
- 25 Niu Liyuan, Lin Manman, Li Xue, *et al.*. Raman spectroscopic analysis of single white blood cell of DM mouse *in vivo*[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2012, 49(6): 063001.
牛丽媛, 林漫漫, 李雪, 等. 活体糖尿病小鼠中单个白细胞的拉曼光谱分析[J]. 激光与光电子学进展, 2012, 49(6): 063001.
- 26 Arends M J, Morris R G, Wyllie A H. Apoptosis. The role of the endonuclease[J]. Am J Pathol, 1990, 136(3): 593–608.
- 27 Tang H, Yao H, Wang G, *et al.*. NIR Raman spectroscopic investigation of single mitochondria trapped by optical tweezers [J]. Opt Express, 2007, 15(20): 12708–12716.
- 28 Chiu L D, Ando M, Hamaguchi H O. Study of the ‘Raman spectroscopic signature of life’ in mitochondria isolated from budding yeast[J]. J Raman Spectrosc, 2010, 41(1): 2–3.
- 29 Kakita M, Kaliaperumal V, Hamaguchi H O. Resonance Raman quantification of the redox state of cytochromes b and c *in-vivo* and *in-vitro*[J]. J Biophoton, 2012, 5(1): 20–24.
- 30 Jiang X, Wang X. Cytochrome c-mediated apoptosis [J]. Annu Rev Biochem, 2004, 73: 87–106.

栏目编辑:吴秀娟