

细胞外ATP通过刺激NADPH氧化酶缓解水杨酸诱导的细胞死亡

冯汉青*, 白晶月, 管冬冬, 贾凌云, 孙坤

西北师范大学生命科学院, 兰州730070

摘要: 水杨酸(SA)是植物重要的信号分子, 低浓度的SA能够诱导植物的抗病反应, 而高浓度的SA导致植物细胞死亡。本文采用500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的SA处理烟草悬浮细胞BY-2, 研究了细胞外ATP在SA诱导的细胞死亡中的作用及可能的机制。结果显示, 外源ATP可缓解SA诱导的细胞死亡水平的上升。另外, SA导致NADPH氧化酶活性下降, 而外源ATP则刺激其活性上升。外源ATP能缓解SA对NADPH氧化酶活性的抑制, 且这种缓解作用可被NADPH氧化酶的抑制剂——二亚苯基碘(DPI)所消除。DPI还可部分消除外源ATP对SA所诱导的细胞死亡的缓解作用。上述结果表明, 胞外ATP通过刺激NADPH氧化酶活性缓解SA诱导的细胞死亡。

关键词: 细胞死亡; 胞外ATP; 水杨酸; NADPH氧化酶

Extracellular ATP Alleviates the Salicylic Acid-Induced Cell Death by Stimulating NADPH Oxidase

FENG Han-Qing*, BAI Jing-Yue, GUAN Dong-Dong, JIA Ling-Yun, SUN Kun

College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Salicylic acid (SA) is an important signalling molecule for plant cells. At a lower concentration, SA can induce the resistance responses of plants to bacterial (or viral) pathogens, while at a higher concentration, SA can cause cell death. By using the tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2) cell suspension culture, the role of extracellular ATP in the SA-induced cell death and the possible mechanism were studied in the cell subjected to 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA. The results revealed that treatment with exogenous ATP partially alleviated the cell death induced by 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA. It was found that treatment with SA decreased the activity of NADPH oxidase, while exogenous ATP increased the activity of NADPH oxidase. Exogenous ATP partially alleviated the inhibition of NADPH oxidase activity by SA. However, the alleviative effect of exogenous ATP on the SA-induced inhibition of NADPH oxidase activity was abolished by diphenylene iodonium (DPI), an inhibitor of NADPH oxidase. And, this inhibitor also partially abolished the alleviative effect of exogenous ATP on the SA-induced cell death. These results indicate that the extracellular ATP can alleviate the SA-induced cell death by stimulating NADPH oxidase activity.

Key words: cell death; extracellular ATP; salicylic acid; NADPH oxidase

三磷酸腺苷(ATP)通常存在于细胞内部, 并作为能量货币分子去支持细胞的各种代谢活动。尽管ATP是极性分子而无法自由穿过细胞膜, 但近年来的研究表明, 动物、植物和微生物细胞可以通过通道蛋白等方式将细胞质中的部分ATP释放到细胞外基质中, 从而使得细胞外也有ATP存在, 即胞外ATP (extracellular ATP, eATP) (Khakh和Burnstock 2009)。

植物胞外ATP的研究已越来越受到关注和重视。研究表明, 植物细胞能够通过ATP结合转运载体蛋白或膜泡运输的方式将细胞内的ATP释放到胞外, 使得植物细胞存在一定水平的胞外ATP

(Kim等2006; Thomas等2000)。Choi等(2014)已在模式植物拟南芥中鉴定出能特异性结合胞外ATP的受体蛋白。植物的胞外ATP是一种重要的胞外信号分子, 并通过受体介导的作用来调节植物的生长、发育、抗病反应和向地性等生理活动 (Tanaka等2010)。此外, 胞外ATP还能够刺激钙离

收稿 2014-07-03 修定 2014-09-28

资助 国家自然科学基金(31260059和30900105)、教育部科学技术研究重点项目(211190)、甘肃省财政厅高校基本科研业务费项目、西北师范大学基金项目(NWNU-kjcx-gc-03-77、NWNU-09-31、NWNU-LKQN-10-32)。

* 通讯作者(E-mail: fenghanq@nwnu.edu.cn; Tel: 13008762166)。

子通道(Dichmann等2000)、质膜的NADPH氧化酶(Demidchik等2009)以及茉莉酸和乙烯合成相关基因的表达(Song等2006)。这些研究表明胞外ATP可能是通过引起钙离子和活性氧等胞内信号分子的产生而调节植物的生理学反应。

水杨酸(salicylic acid, SA)是植物最为重要的信号分子之一, 较低水平的SA能够诱导植物产生对病毒和病原菌的抗性(Bartsch等2006), 而较高水平的SA则引发细胞死亡(Alvarez 2000; Brodersen等2005), 这是一些生物性或非生物性因素(如病原菌侵染和盐胁迫等)诱导植物出现细胞程序性死亡的关键环节之一(O'Donnell等2001)。关于SA引起上述反应的机制一直是植物生理学研究的重点和热点。

有趣的是, 最近的研究表明SA和胞外ATP之间可能存在密切联系。Chivasa等(2009)发现, 外源施加一定水平的SA能够导致烟草叶片胞外ATP水平下降; 而增加胞外ATP则导致SA含量降低。此外, Chivasa等(2009)还发现, 加入胞外ATP能够抑制SA对烟草抗病反应的诱导作用。然而, 在高水平的SA导致细胞死亡的过程中, 胞外ATP是否也能影响该过程中细胞死亡的发生或水平则尚无明确的报道。

基于此, 我们通过胞外ATP已知的一个作用位点——NADPH氧化酶, 研究了胞外ATP在SA诱导的细胞死亡过程中所扮演的生理学角色, 旨在认识SA和胞外ATP生理学功能的相互关系, 进一步了解植物细胞死亡的调控机制。

材料与方法

1 烟草悬浮细胞培养

烟草悬浮细胞BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2)由香港中文大学姜里文教授馈赠。将悬浮细胞置于添加了3% (W/V)蔗糖和0.4 mg·L⁻¹ 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的MS (Murashige和Skoog 1962)液体培养基(pH为5.8) (Sigma-Aldrich)中, 在25 °C黑暗的条件下振荡培养(振荡速率为130 r·min⁻¹)。每7 d移取10 mL的细胞培养物, 转至100 mL新鲜的培养基中进行传代培养。所有操作都在无菌条件下完成。

2 悬浮细胞的处理

在传代培养5 d后的烟草悬浮细胞中分别加入: (1) 100、300、500或700 μmol·L⁻¹的SA, (2) 500 μmol·L⁻¹ SA、50 μmol·L⁻¹ ATP-Na₂或500 μmol·L⁻¹

SA+50 μmol·L⁻¹ ATP-Na₂, (3) 500 μmol·L⁻¹ SA、50 μmol·L⁻¹ ATP-Na₂、500 μmol·L⁻¹ NADPH氧化酶的抑制剂——二亚苯基碘(diphenylene iodonium, DPI)、500 μmol·L⁻¹ SA+50 μmol·L⁻¹ ATP-Na₂或500 μmol·L⁻¹ SA+50 μmol·L⁻¹ ATP-Na₂+500 μmol·L⁻¹, 在25 °C黑暗条件下孵育10 h; 以未经任何化学处理的悬浮细胞液作为对照。

3 细胞死亡水平的检测

荧光素双醋酸酯(fluorescein diacetate, FDA)可与有活力的细胞结合, 并在被激发后释放出绿色荧光(Guilbault和Kramer 1964), 用于定性检测细胞死亡的水平。悬浮细胞液中加入40 mg·L⁻¹的FDA (Sigma-Aldrich), 在室温下黑暗培养10 min。将染色后的样品在荧光显微镜下进行观察并成像(Leica, DM5000 B, Wetzlar, Germany)。

伊文思蓝(Evans blue)可与死亡的细胞结合(Kawai和Uchimiyu 2000), 用于定量检测细胞死亡的水平。1 mL的悬浮细胞液中加入100 μL 0.25% (W/V)的伊文思蓝染液, 混匀并染色8 min, 然后在1 600×g条件下离心3 min, 吸去上清液。用磷酸缓冲液(PBS)清洗细胞, 再于1 600×g条件下离心3 min, 吸去上清液, 重复多次, 以洗去未与细胞结合的染料。之后加入1 mL 1% (W/V)的十二烷基磺酸钠(SDS, 用50%甲醇配制而成)溶液, 在50 °C的恒温水浴中放置30 min, 使细胞破裂。在10 000×g条件下离心3 min, 取500 μL上清液, 加去离子水稀释至3 mL。用721分光光度计测定600 nm处的吸光值, 以此表示细胞死亡的程度。

4 NADPH氧化酶活性的测定

NADPH氧化酶(NADPH oxidase, EC1.6.3.1)活性的测量采用植物NADPH氧化酶活性光度法定量检测试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司), 具体操作参考产品说明书进行。

5 统计学分析

实验结果均用平均值±标准差表示。数据采用双总体t检验, 检验在P<0.05水平上的差异显著性。

实验结果

1 SA对细胞死亡的诱导

悬浮细胞中分别加入100、300、500或700 μmol·L⁻¹的SA处理10 h, 结果显示, 在100 μmol·L⁻¹ SA的作用下, 细胞死亡水平略有上升, 但对对照相比差异不显著; 在300 μmol·L⁻¹ SA作用下, 细胞死

亡水平显著上升; 随着SA浓度的升高, 细胞死亡水平进一步上升, 但500和700 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理下的细胞死亡水平之间无显著性差异(图1)。

2 胞外ATP缓解SA对细胞死亡的诱导

图2显示, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA导致细胞死亡水平

显著上升, 单独加入50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源ATP未引起细胞死亡水平的显著变化; 但在500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理的细胞中加入50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源ATP则明显降低细胞死亡水平, 使其接近对照水平。可见, 胞外ATP能够缓解SA诱导的细胞死亡。

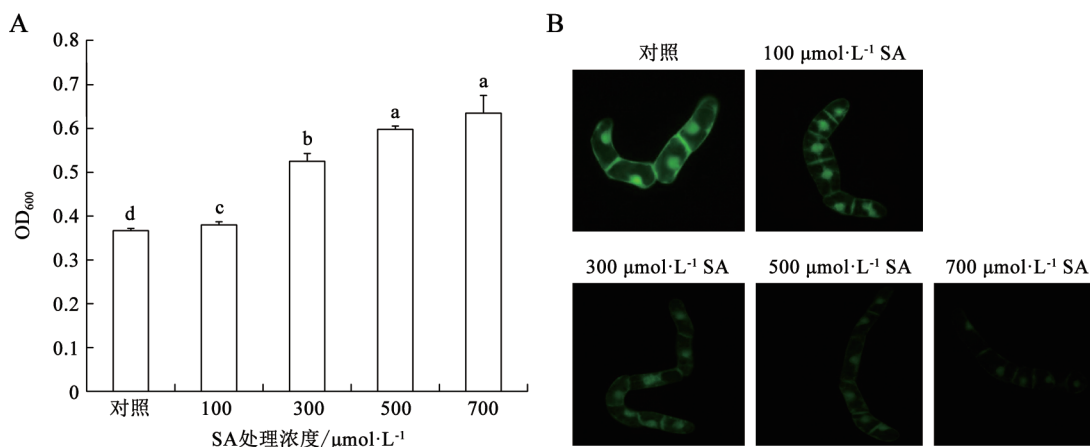


图1 不同浓度SA处理下的细胞死亡水平

Fig.1 The level of cell death under treatment with different SA concentrations

A: 伊文思蓝染色, 结果为6次试验的平均值, 不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著; B: FDA染色。

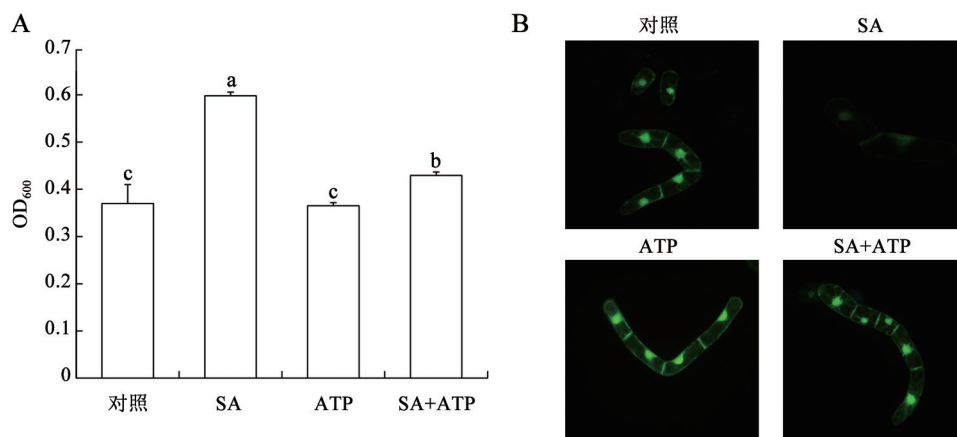


图2 不同处理下的细胞死亡水平

Fig.2 The level of cell death under different treatments

A: 伊文思蓝染色, 结果为6次试验的平均值, 不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著; B: FDA染色。

3 SA和外源ATP对NADPH氧化酶活性的影响

由图3可见, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的SA导致NADPH氧化酶活性显著下降, 而50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的外源ATP则使得NADPH氧化酶活性显著上升; 在500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理下的细胞中加入50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源ATP后, NADPH氧化酶活性显著上升。表明胞外ATP能够

缓解SA对NADPH氧化酶活性的抑制。

4 DPI抑制ATP对SA诱导的细胞死亡的缓解作用

DPI是常用的NADPH氧化酶活性的抑制剂 (Raeymaekers等2003)。本研究用500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DPI处理细胞, 导致NADPH氧化酶活性显著降低 (图3), 表明该浓度的DPI能有效抑制细胞NADPH

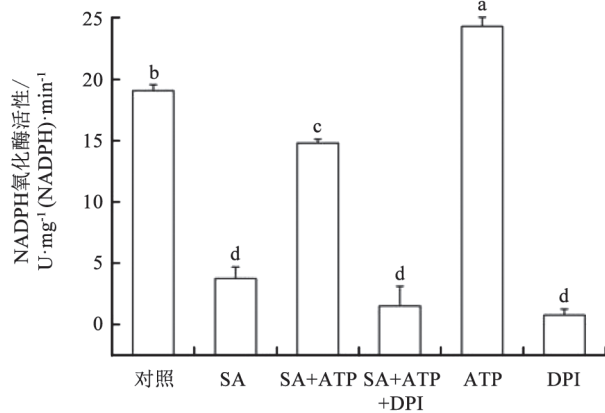


图3 不同处理下的NADPH氧化酶活性
Fig.3 The activity of NADPH oxidase under different treatments

结果为6次试验的平均值,不同字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著。

氧化酶的活性。在SA和ATP处理的细胞中加入DPI后, NADPH氧化酶活性显著下降(图3)。这说明尽管胞外ATP能够缓解SA对NADPH氧化酶活性的抑制,但这一作用会因DPI的加入而消除。

单独加入DPI未对细胞死亡水平产生显著影响,但在SA和ATP处理的细胞中加入DPI后,细胞死亡水平显著上升(图4),表明胞外ATP对SA诱导的细胞死亡的缓解作用会被DPI部分消除。

讨 论

本文结果显示,在 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或更高浓度SA的处理下,细胞死亡水平显著上升(图1),表明高浓度的SA能够诱发植物细胞的死亡。其他研究也表明,较高浓度或较长时间的SA处理能够导致细胞

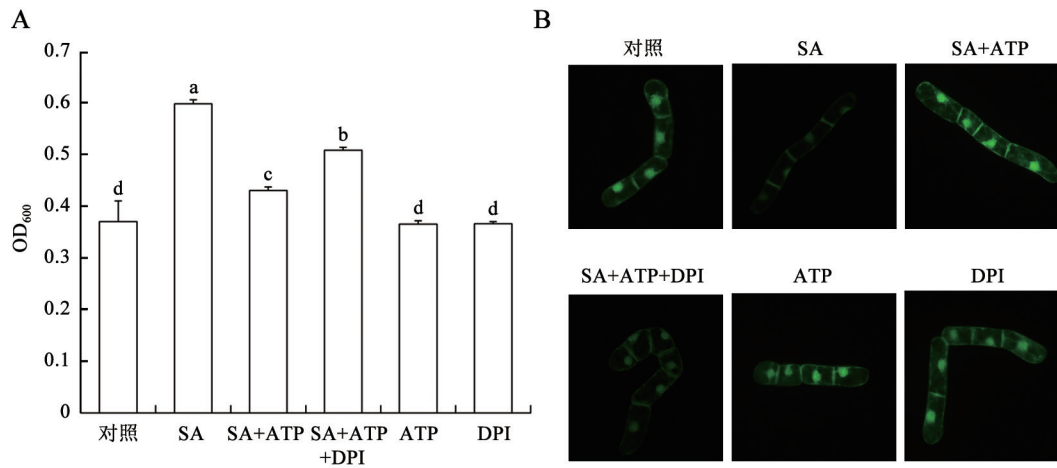


图4 不同处理下的细胞死亡水平

Fig.4 The level of cell death under different treatments

A: 伊文思蓝染色, 结果为6次试验的平均值, 不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著; B: FDA染色。

死亡的发生(Qiao等2003; Broderse等2005)。在植物和病原体互作过程中,植物通过积累较高水平的SA引发或加速被侵染组织的细胞程序化死亡,从而作为一种防御策略以限制病原的生长和蔓延(Alvarez 2000; Gust和Nürnberger 2012)。

研究表明,SA通过阻碍线粒体电子传递、干扰三羧酸循环以及影响NPR转录因子的行为等机制诱导细胞死亡的发生(Norman等2004; Ruffer等1995; Gust和Nürnberger 2012)。Chivasa等(2009)发现,胞外ATP能够抑制SA对植物抗病反应的诱导

作用。我们也发现,较高浓度SA ($500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)引起的细胞死亡水平的上升可以因外源ATP的加入而明显下降(图2),表明胞外ATP作为一种胞外分子,参与SA对植物细胞死亡诱导的调节作用。由此提示SA对植物细胞死亡的诱导机制也和胞外基质有关。

NADPH氧化酶是胞外ATP的重要作用位点(Demidchik等2009)。Hao等(2012)发现,胞外ATP通过增加NADPH氧化酶的活性而提升叶片气孔的开放程度。本文研究了胞外ATP对SA诱导的细胞

死亡的缓解作用与NADPH氧化酶的关系, 结果表明, SA抑制NADPH氧化酶的活性, 胞外ATP能够缓解SA对NADPH氧化酶活性的抑制(图3), 同时也缓解了SA对细胞死亡的诱导(图2)。采用NADPH氧化酶的抑制剂DPI, 进一步证明胞外ATP的这种缓解作用与其刺激NADPH氧化酶活性有关(图4)。

进一步分析表明, 尽管SA能引起细胞死亡和NADPH氧化酶活性的降低(图1和3), 但DPI在降低NADPH氧化酶活性的同时, 并没有导致细胞死亡水平的上升, 而只是部分消除了胞外ATP对SA诱导的细胞死亡的缓解作用(图3和4)。因此, SA对细胞死亡的诱导作用可能和NADPH氧化酶活性受到抑制无关, 而胞外ATP对SA诱导的细胞死亡的缓解作用则依赖于NADPH氧化酶活性的上升。另外, Torres等(2005)注意到病原菌侵染对于拟南芥NADPH氧化酶活性的刺激也能抑制植物细胞死亡的发生, 提示了NADPH氧化酶的激活可引发一种干扰细胞死亡发生的生理机制。本研究表明, 胞外ATP刺激NADPH氧化酶活性, 从而阻碍SA对于细胞死亡的诱导作用。

基于研究结果, 本文提出胞外ATP和NADPH氧化酶影响SA诱导细胞死亡的可能机理, 即高浓度的SA引起细胞死亡, 同时抑制NADPH氧化酶的活性; 胞外ATP刺激NADPH氧化酶活性, 从而引发一种机制去干扰SA对细胞死亡反应的诱导(图5)。但由于SA引起细胞死亡的机制较多, 胞外ATP导致的NADPH氧化酶活性的增加具体影响哪一种机制, 尚需进一步研究。

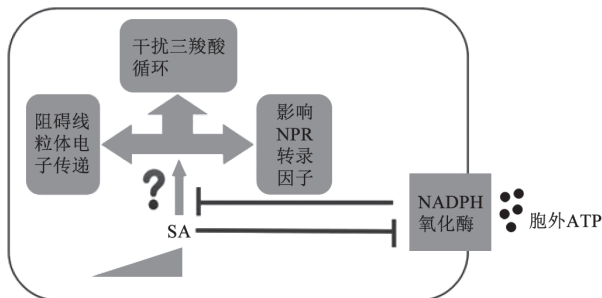


图5 胞外ATP、SA和NADPH氧化酶在SA诱导的细胞死亡中可能的相互关系

Fig.5 A possible model of the interrelationship among extracellular ATP, SA and NADPH oxidase in the SA-induced cell death

参考文献

- Alvarez ME (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol*, 44: 429-442
- Bartsch M, Gobbato E, Bednarek P, Debey S, Schultze JL, Bautor J, Paker J (2006). Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in *Arabidopsis* immunity and cell death is regulated by the monooxygenase *FMO1* and the Nudix hydrolase *NUDT7*. *Plant Cell*, 18: 1038-1051
- Brodersen P, Malinovsky FG, Hématy K, Newman MA, Mundy J (2005). The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis acd111*. *Plant Physiol*, 138: 1037-1045
- Chivasa S, Murphy AM, Hamilton JM, Lindsey K, Carr JP, Slabas AR (2009). Extracellular ATP is a regulator of pathogen defence in plants. *Plant J*, 60: 436-448
- Choi J, Tanaka K, Cao Y, Qi Y, Qiu J, Liang Y, Lee SY, Stacey G (2014). Identification of a plant receptor for extracellular ATP. *Science*, 343: 290-294
- Demidchik V, Shang ZL, Shin R, Thompson E, Rubio L, Laohavisit A, Mortimer JC, Chivasa S, Slabas AR, Glover BJ et al (2009). Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca^{2+} channels. *Plant J*, 58: 903-913
- Dichmann S, Idzko M, Zimpfer U, Hofmann C, Ferrari D, Luttmann W, Virchow CJ, Virgilio DF, Norgauer J (2000). Adenosine triphosphate-induced oxygen radical production and *CD11b* up-regulation: Ca^{2+} mobilization and actin reorganization in human eosinophils. *Blood*, 95: 973-978
- Guilbault GG, Kramer DN (1964). Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha-, and gamma-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. *Anal Chem*, 36: 409-412
- Gust AA, Nürnberger T (2012). Plant immunology: a life or death switch. *Nature*, 486: 198-199
- Hao LH, Wang WX, Chen C, Wang YF, Liu T, Li X, Shang ZL (2012). Extracellular ATP promotes stomatal opening of *Arabidopsis thaliana* through heterotrimeric G protein α subunit and reactive oxygen species. *Mol Plant*, 5 (4): 852-864
- Kawai M, Hirofumi U (2000). Coleoptile senescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Ann Bot*, 86: 405-414
- Khakh BS, Burnstock G (2009). The double life of ATP. *Sci Am*, 301 (6): 84-92
- Kim SY, Sivaguru M, Stacey G (2006). Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol*, 142: 984-992
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497
- Norman C, Howell KA, Millar AH, Whelan JM, Day DA (2004). Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol*, 134: 492-501
- O'Donnell PJ, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J, Klee HJ (2001). Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J*, 25 (3): 315-323
- Qiao JJ, Yuan YJ, Zhao H, Wu JC, Zeng AP (2003). Apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus cuspidata* co-treated with

- salicylic acid and hydrogen peroxide. *Biotech Lett*, 25: 387~390
- Raeymaekers T, Potters G, Asard H, Guisez Y, Horemans N (2003). Copper-mediated oxidative burst in *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 cell suspension cultures. *Protoplasma*, 221: 93~100
- Rüffer M, Steipe B, Zenk MH (1995). Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Lett*, 377 (2): 175~180
- Song CJ, Steinebrunner I, Wang XZ, Stout SC, Roux SJ (2006). Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 140: 1222~1232
- Tanaka K, Gilroy S, Jones AM, Stacey G (2010). Extracellular ATP signaling in plants. *Trends Cell Biol*, 20 (10): 601~608
- Thomas C, Rajagopal A, Windsor B, Dudler R, Lloyd A, Roux SJ (2000). A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance. *Plant Cell*, 12: 519~533
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet*, 37: 1130~1134