

真菌细胞壁抑制剂刚果红诱导酵母 细胞凋亡及其机制研究

张小华,孙业盈,卞伟华,许 聪,武玉永,刘向勇*
(滨州医学院 药学院,山东 烟台 264003)

摘要:以酿酒酵母为研究材料,分析真菌细胞壁抑制剂刚果红(CR)对酵母细胞凋亡的影响及其机制,为植物病原真菌细胞凋亡机制研究提供新的理论依据。结果表明:与正常对照组相比,CR处理后酵母细胞存活率下降、活性氧升高、磷脂酰丝氨酸外翻、细胞核裂解,发生细胞凋亡;外源添加抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)、过表达超氧化物歧化酶基因 *SOD1* 和缺失 *YCA1* 基因,均可以显著降低CR诱导的酵母细胞凋亡。以上结果说明,CR可以诱导ROS和Ycalp依赖的酵母细胞凋亡。

关键词:细胞壁;刚果红;酿酒酵母;细胞凋亡;细胞壁抑制剂

中图分类号: S432.4⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)12-0065-05

Fungal Cell Wall-perturbing Agent Congo Red-induced Yeast Apoptosis and Its Underlying Mechanisms

ZHANG Xiaohua,SUN Yeying,BIAN Weihua,XU Cong,WU Yuyong,LIU Xiangyong*
(Department of Pharmacy,Binzhou Medical College,Yantai 264003,China)

Abstract: This paper investigated the effect of fungal cell wall-perturbing agent Congo red (CR) treatment on apoptosis of *Saccharomyces cerevisiae* and its underlying mechanisms, to provide a new theoretical foundation for study of plant pathogenic fungi apoptosis in future. The results showed that the CR-treated yeast cells displayed more serious apoptosis compared with the normal control group, including decrease of cell survival rate, increase of reactive oxygen species, phosphatidylserine externalization, and nuclei lysis. The CR-induced yeast apoptosis was suppressed by addition of antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC), overexpression of Cu,Zn-superoxide dismutase encoding gene *SOD1* or deletion of *YCA1* gene. Taken together, CR could induce ROS and Ycalp-dependent yeast apoptosis.

Key words: cell wall; Congo red; *Saccharomyces cerevisiae*; apoptosis; cell wall-perturbing agents

真菌是最重要的植物病原微生物,目前已可引起植物病害的病原真菌高达8 000余种。植物真菌性病害种类多,危害性大,占全部植物病害的70%~80%,且一种作物上可发生几种甚至几十种真菌性病害,其成为导致农作物产量降低和质量下降的主要原因之一,每年给农业生产造成巨大损

失^[1-2]。因此,深入开展真菌生物学研究,对提高植物真菌病害防治技术,促进农业发展具有重要理论意义。

酿酒酵母是真菌酵母菌属中的典型菌种,作为最早完成测序的真核生物,其遗传背景清楚,各种分子遗传操作平台完善,易于培养,同时在细胞结构、

收稿日期:2015-06-06
基金项目:国家自然科学基金项目(31000039);山东省自然科学基金项目(ZR2012CQ041);烟台市科技发展计划项目(2013ZH097)
作者简介:张小华(1980-),女,山东威海人,讲师,硕士,主要从事微生物遗传与分子生物学研究工作。
E-mail: xiaohua124@gmail.com
* 通讯作者:刘向勇(1981-),男,山东滨州人,副教授,博士,主要从事微生物遗传与分子生物学研究工作。
E-mail: liuxiangyong81@gmail.com

基因表达调控、信号转导等方面与其他植物病原真菌之间具有较高的同源性。因此,酿酒酵母为人们了解植物病原真菌相关的生物学特征提供了良好的研究模式材料^[3-4]。

细胞壁作为真菌重要的亚细胞结构,在维持细胞形态、细胞防御、细胞增殖等方面起着重要的作用。酿酒酵母细胞壁主要成分包括 β -1,6-葡聚糖、 β -1,3-葡聚糖、几丁质、甘露糖蛋白等,它们之间相互交联形成一种韧性结构^[5-6]。细胞壁抑制剂刚果红(CR)可以特异性地与酵母细胞壁中的 β -1,3-葡聚糖结合,阻碍细胞壁的正常组装,破坏细胞壁内稳定性,产生细胞壁胁迫,抑制菌体生长^[7]。

细胞凋亡是由基因调控的细胞程序性死亡。近年来,人们研究发现,高盐、高温、高渗透盐、氧化损伤等胁迫条件刺激均可诱发酵母细胞凋亡,但是目前关于酵母细胞壁胁迫与细胞凋亡之间的关系尚不明确^[8-9]。为此,以酿酒酵母为材料,研究细胞壁抑制剂 CR 对酵母细胞凋亡的影响及其相关机制,解析真菌细胞壁内稳定性与细胞凋亡的关系,为植物病原真菌细胞凋亡机制研究提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试野生型酿酒酵母 BY4741 菌株(MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0)由日本酵母遗传中心提供。含酿酒酵母铜锌超氧化物歧化酶编码基因 *SOD1* 的表达质粒载体 pRS316-SOD1 由美国耶鲁大学 Shadel G S 教授惠赠。酿酒酵母常规培养采用 YPD 培养基:葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、酵母粉 10 g,加蒸馏水至 1 000 mL,分装,pH 值 6.0~6.5,115 ℃ 30 min 灭菌。酿酒酵母转化子筛选采用 SC-URA 培养基和 SC-LEU 培养基。SC-URA 培养基:0.17% YNB(无氨基酸酵母氮源)、2% 葡萄糖、0.5% 硫酸铵、0.77 g/L CSM-Ura(补充氨基酸混合物-不含尿嘧啶)。SC-LEU 培养基:0.17% YNB、2% 葡萄糖、0.5% 硫酸铵、0.69 g/L CSM-Leu(补充氨基酸混合物-不含亮氨酸)。固体培养基添加 2% 的琼脂。

1.2 试验方法

1.2.1 酵母 CR 胁迫处理 接种酵母单菌落至 15 mL 的 YPD 液体培养基中,30 ℃ 摇床培养过夜。离心收集过夜培养物,转接至含有 80 mL YPD 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,菌体起始浓度为 OD₆₀₀ = 0.2。继续培养至酵母细胞进入对数生长期 OD₆₀₀ =

0.6~0.7,将培养物均匀分为 2 份(各 40 mL),一份添加 100 μ L 质量浓度为 20 mg/mL 的 CR 母液(CR 终质量浓度为 50 μ g/mL),另一份添加等体积的 YPD 培养基作为对照组。30 ℃ 摇床培养,定时取 1 mL 培养物,离心收集细胞,检测酵母细胞存活率变化。

1.2.2 酵母细胞存活率检测 采用台盼蓝(TB)染色法检测酵母细胞的存活率,TB 受到活体细胞的排斥,而死亡细胞摄入染料显示蓝色。离心收集(3 000 r/min,5 min)酵母菌体,无菌水洗涤 2 次后,重悬细胞于 1 mL 0.4% 的 TB 染液中,室温染色 10 min。取 4 μ L 染色后的菌悬液,置于显微镜下观察,记录细胞存活率。

1.2.3 酵母醋酸锂完整细胞转化法 接种酿酒酵母单菌落于含有 15 mL YPD 液体培养基的 100 mL 三角瓶中,30 ℃ 振荡培养过夜。离心收集(3 000 r/min,5 min)过夜培养的菌体,转接至新鲜的 50 mL 液体 YPD 中,使菌体浓度为 OD₆₀₀ = 0.25。30 ℃ 振荡培养至对数生长期(菌体浓度 OD₆₀₀ = 0.6~0.7),离心收集菌体,无菌水洗涤后用 1 mL 的 100 mmol/L LiAc 洗涤,重悬酵母细胞于 400 μ L 的 100 mmol/L LiAc 中,混匀。分成 50 μ L 小份后,依次加入 240 μ L 50% PEG6000、36 μ L 1 mol/L LiAc、5 μ L 单链鱼精 DNA、70 μ L 无菌重蒸水和质粒 DNA,混匀。30 ℃ 保温 30 min 后,42 ℃ 水浴中热激处理 25 min。离心除去上清,重悬酵母细胞于 200 μ L 无菌水中,涂布 SC-URA 选择平板,30 ℃ 恒温培养 72 h 后,挑取酵母转化子。

1.2.4 酵母染色体 DNA 的提取 取 15 mL 的酵母过夜培养物,离心收集菌体,悬浮于 0.5 mL 的无菌水中,13 000 r/min 离心 30 s,加入 200 μ L 的裂解缓冲液[2% Triton X-100、1% SDS、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L Tris-Cl(pH 值 8.0)、1 mmol/L EDTA(pH 值 8.0)]重新悬浮细胞,再加 200 μ L 的酸预处理玻璃珠和 200 μ L 的苯酚/氯仿,涡旋振荡器上振荡 3 min,加 200 μ L TE 缓冲液(pH 值 8.0)混匀,13 000 r/min 离心 5 min,在上清中加入 1 mL 的无水乙醇进行沉淀,13 000 r/min 离心 10 min,沉淀干燥后加 400 μ L 的 TE 缓冲液(pH 值 8.0)、5 μ L 10 mg/mL 的 RNase A,37 ℃ 温育 15 min,加 10 μ L 4 mol/L 的乙酸铵、1 mL 无水乙醇混匀后 13 000 r/min 离心 10 min,去上清干燥,用 100 μ L 的 TE 缓冲液(pH 值 8.0)溶解。

1.2.5 *YCA1* 基因缺失菌株的构建 采用 Wach^[10]报道的长臂同源多聚酶链反应技术(LFH-PCR),

构建酵母 *YCA1* 基因缺失菌株。依据 *YCA1* 基因和亮氨酸营养缺陷型筛选标记 (*LEU2*) 上下游序列设计 4 条引物, *ycal* - 1: 5' - TATTCAATGCATTG-GATCTTATT - 3' (位于 *YCA1* 基因上游 363 bp 处); *ycal* - 2: 5' - GTCATCACCGAAACGCGCGATTGTA-AATCTAGTCGGTC - 3'; *ycal* - 3: 5' - AGAAAATAC-CGCATCAGGAAAAAATATATGAATGTGTACGTTG - 3'; *ycal* - 4: 5' - AAAGGAATTGGAAGAAAAAAGA - 3' (位于 *YCA1* 基因下游 332 bp 处)。以野生型酵母 BY4741 染色体 DNA 为模板, 用引物 *ycal* - 1 和 *ycal* - 2 PCR 反应扩增 *YCA1* 基因上游同源敲除片段, 用引物 *ycal* - 3 和 *ycal* - 4 PCR 反应扩增 *YCA1* 基因下游同源敲除片段。以 PCR 扩增得到的 *YCA1* 基因上、下游同源敲除片段为引物, 含有 *LEU2* 营养缺陷型筛选标记的质粒 pRS315 为模板, PCR 反应得到两侧与 *YCA1* 基因两端侧翼序列同源、中间为 *LEU2* 筛选标记基因的敲除片段。将敲除片段转入野生型酵母细胞 BY4741, 使用 SC - LEU 培养基进行 *YCA1* 基因缺失酵母转化子的筛选。以转化子染色体 DNA 为模板, 用引物 *ycal* - 1 和 *ycal* - 4 进行 PCR, 通过比较扩增产物和预期产物大小确定 *YCA1* 基因缺失阳性转化子。PCR 扩增程序为: 94 °C 2 min; 94 °C 1 min、56 °C 1 min、72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.2.6 活性氧 (ROS) 含量测定 酵母细胞胞内活性氧含量测定采用二氯荧光素双醋酸盐 (DCFH2 - DA) 荧光探针。DCFH2 - DA 本身不带荧光, 其进入细胞内, 可以被活性氧氧化生成有荧光的 2, 7 - 二氯荧光黄 (DCF)。低速离心 (3 000 r/min、5 min) 收集酵母细胞, 1 × PBS (pH 值 7.2) 洗涤后, 重悬细胞于 1 × PBS 中, 加入 DCFH2 - DA 至终浓度为 10 μmol/L, 室温避光染色 30 min。取一定量染色后的菌悬液, 置于荧光显微镜下观察, 统计胞内活性氧含量升高的酵母细胞比例。

1.2.7 DAPI (4', 6 - 二脒基 - 2 - 苯基吡啶) 染色

低速离心 (3 000 r/min、5 min) 收集酵母细胞, 1 × PBS (pH 值 7.2) 洗涤后, 重悬酵母细胞于 80% 乙醇中, 室温下固定 10 min。离心收集细胞, 用 1 × PBS 洗涤细胞, 重悬酵母细胞于 DAPI 染液 (终浓度为 1 μg/mL) 中, 室温避光孵育 15 min。取一定量染色后的菌悬液, 置于荧光显微镜下观察, 统计细胞核发生碎片化的酵母细胞比例。

1.2.8 Annexin V - FITC/PI 染色 低速离心 (3 000 r/min、5 min) 收集酵母细胞, 山梨醇缓冲液

(0.8 mol/L 山梨醇、2% 醋酸钾) 洗涤 2 次后, 重悬于 1 mL 酵母裂解酶 lyticase 溶液 (20 U/mL) 中, 30 °C 酶解 45 min。离心收集酶解后的酵母细胞 (原生质体), 重悬于 100 μL 结合缓冲液 (150 mmol/L NaCl、5 mmol/L CaCl₂、1.2 mol/L 山梨醇、10 mmol/L HEPES) 中, 加入 Annexin V - FITC 和 PI 荧光探针, 室温避光孵育 20 min。离心去除荧光探针, 用结合缓冲液洗涤 2 次, 置于荧光显微镜下观察, 记录 Annexin V - FITC 染色阳性 (绿色) 而 PI 染色阴性 (红色) 的细胞数量, 计算细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻的酵母细胞比例。

2 结果与分析

2.1 CR 胁迫对酵母细胞凋亡的影响

如图 1 所示, 随着 CR 胁迫处理时间的增加, 酵母细胞存活率下降, 当 CR 胁迫处理 9 h 时, 酵母细胞存活率下降 40 个百分点, 同时呈现明显的细胞凋亡特征: 胞内活性氧升高比率上升 9.5 个百分点, 细胞核碎化率升高 7.0 个百分点, 细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻率升高 8.0 个百分点 (图 2), 说明 CR 胁迫可诱导酵母细胞凋亡。

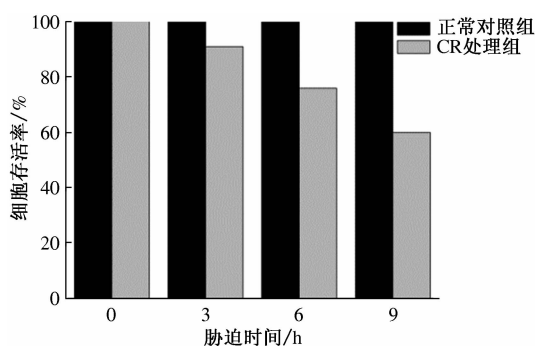


图 1 CR 胁迫下酵母 BY4741 菌株的细胞存活率

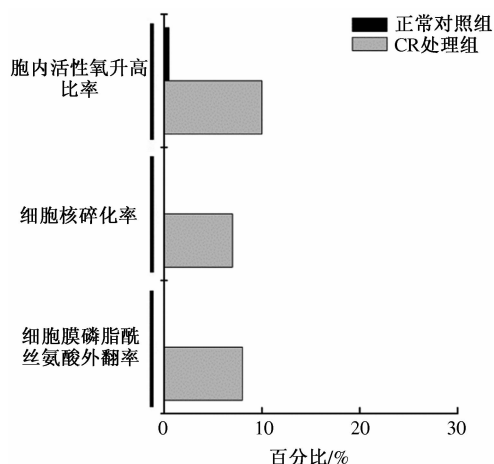


图 2 CR 胁迫对酵母细胞凋亡的影响

2.2 NAC 和 Sod1p 对 CR 诱导酵母细胞凋亡的影响

细胞内 ROS 过度积累,会对膜脂、蛋白质、核酸等产生氧化损伤,进而触发或者加速细胞凋亡进程。图 2 显示,CR 胁迫诱导的酵母凋亡细胞中伴随 ROS 升高,为进一步研究 ROS 的作用,检测了外源添加抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)和过表达铜锌超氧化物歧化酶基因 *SOD1* 对 CR 诱导酵母细胞凋亡的影响。

NAC 为细胞内还原性谷胱甘肽的前体,是一种含巯基的抗氧化剂,可以有效抑制和清除细胞内 ROS^[11]。图 3 结果显示,CR 胁迫条件下(50 μg/mL、6 h),与未添加 NAC 处理组相比,添加 NAC(35 mmol/L)组酵母细胞凋亡减少,其中胞内活性氧升高比率下降 9.0 个百分点,细胞核碎化率下降 5.0 个百分点,细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻率下降 6.2 个百分点。

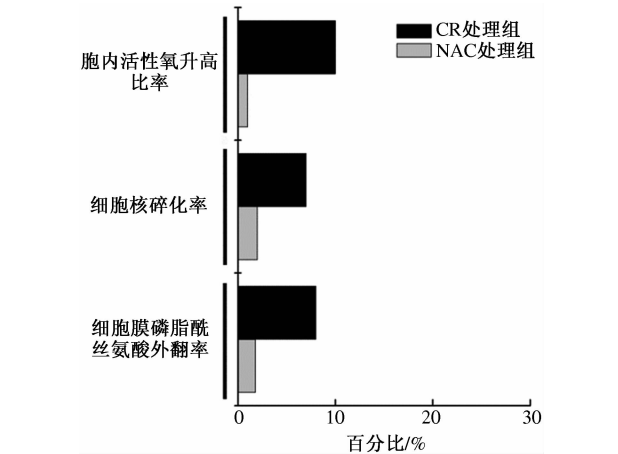


图 3 NAC 对 CR 诱导酵母细胞凋亡的影响

SOD1 基因编码的铜锌超氧化物歧化酶是酵母细胞内最重要的抗氧化酶,其可催化超氧阴离子自由基歧化成过氧化氢和氧气,从而消除负一价自由基对生物体的毒性^[12]。图 4 结果显示,CR 胁迫条件下(50 μg/mL、6 h),*SOD1* 过表达组与正常酵母组相比凋亡细胞减少,其中胞内活性氧升高比率下降 8.5 个百分点,细胞核碎化率下降 4.5 个百分点,细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻率下降 5.9 个百分点。

2.3 Yca1p 缺失对 CR 诱导酵母细胞凋亡的影响

酵母 Yca1p 是哺乳动物细胞凋亡重要调控因子 Caspase 半胱氨酸蛋白酶家族的同源物^[13]。为研究 Yca1p 是否参与 CR 诱导的酵母细胞凋亡,构建 *YCA1* 基因缺失菌株,分析 *YCA1* 基因缺失对 CR 诱导酵母细胞凋亡的影响。

以筛选得到的酵母转化子和野生型酵母 BY4741 的染色体 DNA 为模板,用引物 yca1-1 和 yca1-4 进行 PCR 反应,电泳结果显示(图 5),酵母转化子染色体 DNA 扩增得到 3 169 bp 目的条带(大小为 *LEU2* 筛选标记 2 474 bp 及 *YCA1* 基因上游 363 bp、下游 332 bp 长度之和),野生型菌株染色体 DNA 扩增得到 1 994 bp 目的条带(大小为 *YCA1* 基因 1 299 bp 及其上游 363 bp、下游 332 bp 长度之和),与预期结果一致,表明转化子中 *YCA1* 基因已被成功敲除,*YCA1* 基因缺失菌株(*YCA1*Δ)构建成功。细胞凋亡检测显示(图 6),CR 胁迫条件下(50 μg/mL、6 h),*YCA1*Δ 酵母与正常酵母相比凋亡细胞减少,其中胞内活性氧升高比率下降 6.0 个百分点,细胞核碎化率下降 4.0 个百分点,细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻率下降 3.8 个百分点。

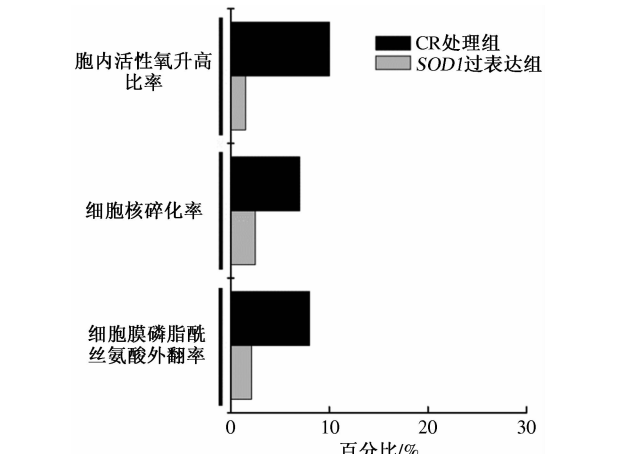
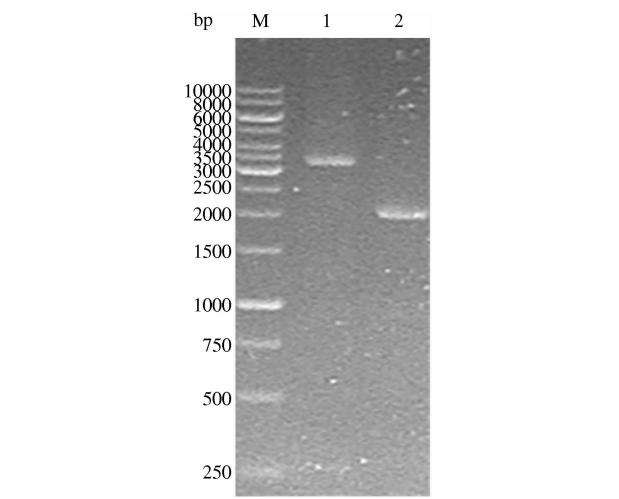


图 4 Sod1p 对 CR 诱导酵母细胞凋亡的影响



M. 1 kb DNA Ladder; 1. *YCA1* 基因缺失转化子染色体 DNA 作为模板的 PCR 产物; 2. BY4741 染色体 DNA 作为模板的 PCR 产物

图 5 *YCA1* 基因缺失转化子的 PCR 验证

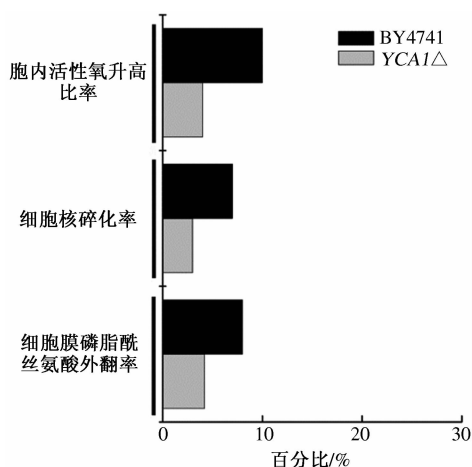


图 6 YCA1 缺失对 CR 诱导酵母细胞凋亡的影响

3 结论与讨论

细胞壁作为真菌最外层的亚细胞结构,在外界胁迫环境下,一方面直接发挥第 1 道屏障保护作用,另一方面通过位于细胞膜上的 Mid2p 和 Wsc1p 等信号糖蛋白,及时识别和感知外界胁迫信号,激活细胞壁完整性信号通路,进而调节细胞壁合成代谢相关基因表达,改变细胞壁中各组分比例及组装结构,使其更好地适应外界胁迫环境^[5-6,14]。真菌细胞壁抑制剂 CR 可以抑制酵母细胞壁正常组装,引发细胞壁胁迫反应,本研究发现 CR 可以导致酵母细胞存活率下降、活性氧升高、磷脂酰丝氨酸外翻、细胞核裂解,发生细胞凋亡,表明细胞壁内稳定性与细胞凋亡相关。

真菌细胞凋亡现象最早由 Madeo 等^[15]在研究酿酒酵母 CDC48^{S565G}点突变体时发现,随后人们在真菌细胞凋亡诱因、凋亡调控因子以及凋亡信号通路调控等多方面取得一系列重要成果。例如,ROS 和 Yca1p 被发现参与多种因素诱导的酵母细胞凋亡过程,发挥重要调控作用^[16]。本研究发现,CR 诱导酵母细胞凋亡伴随活性氧升高,而外源添加抗氧化剂 NAC、过表达 *SOD1* 基因和缺失 *YCA1* 基因,均可以显著降低 CR 诱导的酵母细胞凋亡,表明 ROS 和 Yca1p 参与 CR 诱导的酵母细胞凋亡。

目前,人们已经在稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)等一些重要植物病原真菌中发现细胞凋亡现象^[17-19]。本研究将为植物病原真菌的细胞凋亡研究提供新的理论指导。

参考文献:

[1] 焦斌,周琳,宋天有,等.旋覆花花序氯仿萃取物抗植物病原真菌活性研究[J].河南农业科学,2010,39(7):60-62,65.

[2] 王宗华,鲁国东,谢联辉,等.对植物病原真菌群体遗传研究范畴及其意义的认识[J].植物病理学报,1998,8(1):5-9.

[3] 吴敏,谷守芹,李坡,等.玉米大斑病菌转录因子 StStel2 的活性及其对酵母生长的功能互补分析[J].中国农业科学,2012,45(16):3281-3287.

[4] 彭静静.植物病原真菌中 MAPK 级联通路研究进展[J].江苏农业科学,2014,42(9):11-15.

[5] Lesage G, Bussey H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(2): 317-343.

[6] Levin D E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway[J]. Genetics, 2011, 189(4): 1145-1175.

[7] Ram A F, Klis F M. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red[J]. Nat Protoc, 2006, 1: 2253-2256.

[8] 姜俏,林琳,汪天虹.研究细胞凋亡的新模式生物——酵母[J].生物化学与生物物理进展,2008,35(4): 361-367.

[9] 刘向勇,张小华,刘乃国,等. Bdf1p 转录因子 BD2 和 ET 结构域双缺失对盐胁迫诱导酵母细胞凋亡的影响[J].广东农业科学,2012,39(18): 167-169.

[10] Wach A. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruption in *S. cerevisiae*[J]. Yeast, 1996, 12(3): 259-265.

[11] 龙民慧,王蕾,王清静. N-乙酰半胱氨酸的生物学功能及在畜牧业中的研究进展[J].饲料工业,2012,33(18): 50-52.

[12] Bonawitz N D, Rodeheffer M S, Shadel G S. Defective mitochondrial gene expression results in reactive oxygen species-mediated inhibition of respiration and reduction of yeast life span [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(13): 4818-4829.

[13] Madco F, Herker E, Maldener C, et al. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast [J]. Mol Cell, 2002, 9(4): 911-917.

[14] Levin D E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69(2): 262-291.

[15] Madeo F, Fröhlich E, Fröhlich K U. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis [J]. J Cell Biol, 1997, 139(3): 729-734.

[16] Sharon A, Finkelstein A, Shlezinger N, et al. Fungal apoptosis: Function, genes and gene function [J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(5): 833-854.

[17] Barhoom S, Sharon A. Bcl-2 proteins link programmed cell death with growth and morphogenetic adaptations in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. Fungal Genet Biol, 2007, 44(1): 32-43.

[18] 厉晓东,卢建平,李海娇,等.丝状真菌的细胞凋亡[J].微生物学通报,2011,38(2): 242-249.

[19] Ito S, Ihara T, Tamura H, et al. α -Tomatin, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* [J]. FEBS Lett, 2007, 581(17): 3217-3222.