

细胞色素 c 在盘基网柄菌细胞凋亡中的作用

叶平 宋金辉 侯连生*

华东师范大学生命科学学院 上海 200062

摘要:细胞色素 c 在细胞凋亡中发挥着重要的作用,其作用机理在高等真核生物及低等真核生物酵母中已经比较清楚,但在盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 中的作用却没有相关报道。所以我们用 western blot 和实时荧光定量 PCR 的方法分别测定了盘基网柄菌前柄细胞和前孢子细胞中细胞色素 c 的含量及表达量的变化,来探讨细胞色素 c 在盘基网柄菌前柄细胞凋亡中的作用。结果显示,①凋亡的前柄细胞发育 16 ~ 20 h 的过程中,线粒体内细胞色素 c 含量呈递减趋势,与之相反的是胞质中细胞色素 c 的含量却呈现出递增趋势。前柄细胞细胞色素 c 总含量高于前孢子细胞。②前柄细胞中细胞色素 c 基因的表达水平明显高于前孢子细胞,并且呈现出递增的趋势,而在前孢子细胞中细胞色素 c 基因的表达量比较稳定。两个研究结果相互印证,说明细胞色素 c 在一定程度上参与了盘基网柄菌前柄细胞的凋亡过程。

关键词:盘基网柄菌;细胞色素 c;线粒体;细胞凋亡

中图分类号:Q948 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)06-73-07

Role of Cytochrome c in Apoptosis of *Dictyostelium discoideum*

YE Ping SONG Jin-Hui HOU Lian-Sheng*

School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China

Abstract: Cytochrome c plays an important role in apoptosis of eukaryotes and yeast, but there are few reports about its role in *Dictyostelium discoideum*. Western blot and S Fluorescence Quantitative PCR were used to detect the quantity and expression changes of cytochrome c in prestalk cells and prespore cells, in order to reveal the role of cytochrome c in apoptosis of dictyostelium prestalk cells. In process of 16 - 20 h development of apoptotic prestalk cells, the amount of mitochondrial cytochrome c showed a decreasing tendency while the amount of cytoplasmic cytochrome c showed an increasing tendency inversely. Total amount of cytochrome c in prestalk cells was higher than that in prespore cells. Cytochrome c gene expression in prestalk cells was higher than that in prespore cells, and showed an increasing tendency, but cytochrome c gene expression in prespore cell was relatively stable. These results indicate that cytochrome c, to some extent, participates in the apoptosis of *Dictyostelium* prestalk cells.

Key words: *Dictyostelium discoideum*; Cytochrome c; Mitochondrial; Apoptosis

盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 是一种“土壤阿米巴”,在营养丰富条件下,以单细胞形式存在;一旦食物匮乏,单个细胞聚集成多细胞体,盘基网柄菌多细胞体在 12 h 时开始分化为前柄细胞 (prestalk, pst) 和前孢子细胞 (prespore, psp)^[1]。前孢子细胞继续发育为可

育的孢子细胞,前柄细胞则逐渐凋亡为支持孢

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30970316);

* 通讯作者, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 叶平,男,硕士研究生;研究方向:细胞生物化学与分子生物学; E-mail: hsu yxz168@126.com。

收稿日期:2011-05-03,修回日期:2011-09-20

子体的死亡柄细胞^[2]。整个发育过程 24 h, 历经细胞丘、蛭蛹体、拔顶阶段形成柄细胞和孢子体组成的子实体。野生型盘基网柄菌 KAX-3 的前柄细胞到柄细胞的形成过程表现出自噬性凋亡现象^[3], 并在前孢子细胞的形成过程出现线粒体内自噬现象^[4]。

已有报道表明, 细胞色素 c 在凋亡中发挥着重要的作用^[5], 它是由核基因编码, 在细胞质中的核糖体上合成后, 跨过线粒体外膜, 在膜间隙经细胞色素血红素裂解酶催化, 偶联上血红素辅基形成完整的细胞色素 c 并定位于内膜的外侧, 参与呼吸链电子的传递。当凋亡前信号导致线粒体外膜的透化作用后^[6], 细胞色素 c 便释放到胞质中, 激活 apaf-1 (apoptosis-protease activating factor 1) 和 caspase-9^[4], 活化的 caspase-9 激活 caspases 3, 最后导致生化和形态学上的凋亡现象。而在盘基网柄菌的细胞凋亡中, 鲜有与细胞色素 c 相关的报道。

本研究选取野生型细胞 KAX-3 饥饿发育 16 h、18 h、20 h 的前柄细胞作为凋亡的 3 个阶段, 并与前孢子细胞做比较, 通过 western blot 和荧光定量 PCR 在细胞水平和分子水平比较了细胞色素 c 的相对变化情况, 探讨细胞色素 c 是否参与了盘基网柄菌的细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 细胞的培养和收集

1.1.1 细胞的培养 野生型细胞 KAX-3 是纯系培养的细胞株, 按 Sussman 法在琼脂平板上培养, 用克雷伯氏菌 (*Klebsiella aerogenes*) 喂养^[7]。对数期收集细胞, 用磷酸缓冲液 (pH 6.4) 洗净细菌, 并用 PDF 制成 2×10^8 个/ml 细胞悬液, 24℃ 下在 2% 琼脂平板上发育, 分别收集发育 16 h、18 h、20 h 的多细胞体。

1.1.2 Percoll 分离前柄细胞和前孢子细胞 根据 Ratner 等的方法^[8], 将发育 16 h、18 h、20 h 的多细胞体充分打散, 铺于预制的 50% Percoll 溶液上 15 000 r/min 离心 10 min。前柄细胞和前孢子细胞分处于 Percoll 溶液的上下两层, 分别收集并计数, 每个样品为 5×10^8 个

细胞(以上各步均在 4℃ 环境下操作)。

1.2 线粒体的提取 按照 Rarish 等的方法^[9], 每 5×10^8 细胞加 2.5 ml 缓冲液, 匀浆器匀浆, 匀浆液 4 500 r/min 离心 10 min, 上清液 13 000 r/min 离心 10 min, 所得沉淀即为线粒体, 上清液与上一步离心所得的沉淀合并作为胞质中总蛋白(以上所有操作均在 4℃ 环境下进行)。提取的线粒体用 1% 詹纳斯绿 B(线粒体的专一性活体染色剂)染色, 显微镜下观察。

1.3 免疫蛋白印记 将各细胞线粒体及胞质蛋白稀释至终体积为 50 μ l 的上样缓冲液, 线粒体和胞质蛋白量分别上样 7.5 μ l 和 15 μ l, 胞质中细胞色素 c 含量相对较少, 为了更清楚地看到变化, 胞质蛋白的上样量为线粒体的 2 倍, 分析结果时, 将其含量相应减半。以 Laemmili 的非连续 SDS-PAGE 系统^[10], 12% 凝胶分离蛋白质。再将凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜 (nitrocellulose filter membrane, NC) 上。用封闭液封闭 NC 膜上的蛋白结合位点 2 h, 加入特异性抗体鼠抗人细胞色素 c IgG2b, 再用碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG (H + L) 孵育 1 h, 最后用 BCIP + NBT 进行底物显色。显色结果拍照后用 Bandscan 软件分析细胞色素 c 含量的变化情况。

1.4 荧光定量 PCR

1.4.1 总 RNA 的提取和反转录 用 1.1.2 获得的 16 h、18 h、20 h 发育阶段的盘基网柄菌前柄细胞和前孢子细胞共 6 个样品, 每个样品取 10^7 个细胞分别置于 1.5 ml EP 管中, 向其中加入 1 ml Trizol 试剂 (Takara), 按照说明书进行总 RNA 的提取。测定提取的细胞总 RNA 的 OD 值, 并计算出总 RNA 浓度, -80℃ 保存备用。

以 oligo dT 作为下游引物进行反转录, 反应体系 (20 μ l): 13 μ l 总 RNA, 依次加入 Buffer 4 μ l, oligo dT 1 μ l, Random6 1 μ l, mix I 1 μ l, 以上操作均在冰上进行。然后 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 检测合成好的 cDNA 浓度, 配制成 20 μ l 体系, cDNA 含量为 200 ng 的工作液, -20℃ 保存备用。

1.4.2 引物的设计与合成 根据 NCBI 中的

盘基网柄菌 AX4 的细胞色素 c 基因序列,利用 primer premier 5.0 软件设计了一对引物,上游引物 P1:5'-ACC AAA CAA ACA AGG TCC AAA T-3',下游引物 P2:5'-TTC AAG GTA AGC GAC AAC ATC A-3';选取 *GAPDH* 基因作为内参基因,并设计了一对引物,上游引物 P3:5'-TAT GTC ATT CCG TGT TCC A-3',下游引物 P4:5'-GTA TTT GTC AGA TTC AGA GGC-3'。引物由上海 Invitrogen 贸易有限公司合成。

1.4.3 验证 cDNA 扩增产物 以 1.4.1 中合成好的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系 25 μl : *Taq* (5 U/ μl) 5 μl , 10 \times PCR Buffer (Mg^{2+} Plus) 2.5 μl , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μl , P1/P3 (20 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μl , P2/P4 (20 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μl , cDNA (200 ng/ μl) 1 μl , 加灭菌 ddH₂O 补足至 25 μl 。上述体系参照 TaKaRa *Taq*TM 使用说明书。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,验证扩增产物。

1.4.4 SYBR Green I 荧光定量 PCR 用验证合格的 cDNA 模板,在 Bio-Rad CFX96TM Real Time System 荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量 PCR,每个样品都设 3 个平行组进行上样,并多次重复实验,根据 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex *Taq*TM (Perfect Real Time) 实时荧光定量试剂盒操作流程,25 μl 反应体系中含有:SYBR Premix Ex *Taq* (2 \times) 12.5 μl , P1/P3 (20 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μl , P2/P4 (20 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μl , cDNA (200 ng/ μl) 1 μl , 加灭菌 ddH₂O 至 25 μl 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;94 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,40 个循环;60 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。上述反应完成后,利用 Bio-Rad CFX Manager 分析软件获得扩增曲线和融解曲线。

2 结果

2.1 线粒体的鉴定 按上述差速离心法提取的线粒体滴加詹纳斯绿 B 染液后在油镜下观察,可见均匀分布的蓝绿色线粒体颗粒(图 1)。詹纳斯绿 B 是线粒体专一性活体染色剂,线粒

体中细胞色素氧化酶使染料保持氧化状态呈蓝绿色,而背景中染料则被还原成无色。结果显示,提取的线粒体结构基本保持完整,细胞色素氧化酶系统没有被破坏,符合实验要求。

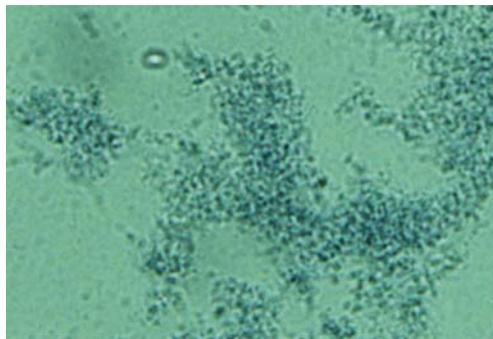


图 1 詹纳斯绿 B 染色的盘基网柄菌线粒体

Fig. 1 Mitochondrial staining by Janus Green B in *Dictyostelium discoideum*

2.2 细胞色素 c 含量的变化 前柄细胞线粒体和胞质中的细胞色素 c 含量有一定的变化,相对的,前孢子细胞中细胞色素 c 的含量基本恒定(图 2)。为更直观的比较,用 Bandscan 准确分析蛋白印记灰度值(peak gray),扫描分析结果显示,在前柄细胞中,细胞色素 c 在线粒体中的含量在发育 16 h 时最多,18 h 次之,20 h 最少,呈现出递减的趋势(图 3)。而在胞质中,16 h 的含量在一个比较低的水平,到 20 h 达到 3 个发育时段的最高值,呈现出相反的递增的趋势(图 3)。前孢子细胞线粒体和胞质中细胞色素 c 的含量在发育 16~20 h 基本不变。综合比较显示前柄细胞中细胞色素 c 平均总含量高于前孢子细胞(图 3),且前柄细胞 18 h、20 h 的总含量比 16 h 有一定的下降。在前柄细胞和前孢子细胞线粒体及胞质中都保持着一定含量的细胞色素 c,但使我们困惑的是,前孢子细胞胞质中也有一定量的细胞色素 c。

2.3 细胞色素 c 表达量的测定

2.3.1 总 RNA 纯度的检测 测得提取的各类细胞总 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值都在 1.9~2.0 之间,说明基本无蛋白质污染。

2.3.2 cDNA 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果 以提取的细胞总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,

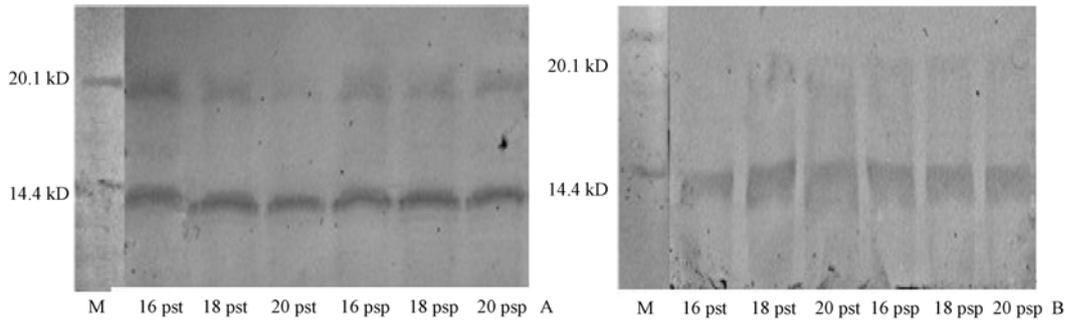


图 2 盘基网柄菌细胞线粒体(A)及细胞质(B)中细胞色素 c 在 NC 膜上的染色显带

Fig.2 Staining band of cytochrome c in mitochondria (A) and cytoplasm (B) of *Dictyostelium discoideum*

M: SDS-PAGE 低分子量标准蛋白; pst:前柄细胞; psp:前孢子细胞; 16、18、20 表示发育时间为 16 h、18 h、20 h。

M: SDS-PAGE LMW protein marker; pst: Prestalk cells; psp: Prespore cells; 16,18,20: 16 h,18 h,20 h.

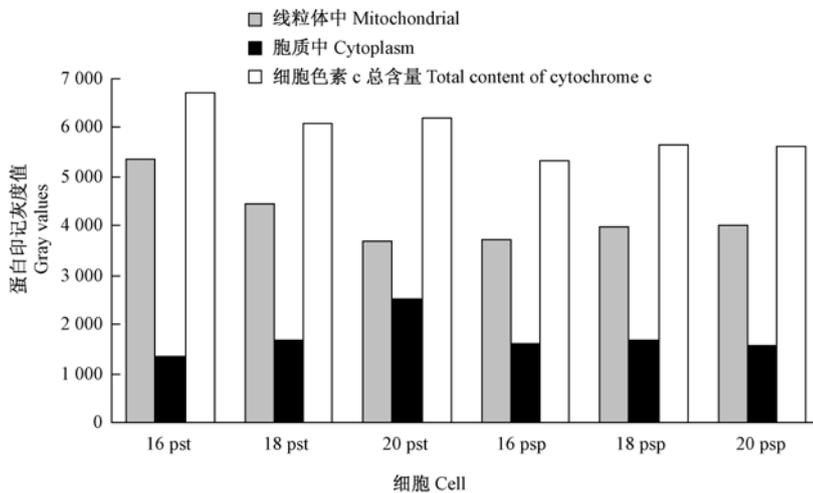


图 3 细胞色素 c 在 NC 膜上的染色显带灰度值

Fig.3 Grey values of staining bands of cytochrome c

pst:前柄细胞; psp:前孢子细胞; 16、18、20 表示发育时间为 16 h、18 h、20 h。

pst: Prestalk cells; psp: Prespore cells; 16,18,20: 16 h,18 h,20 h.

分别加入已经设计合成好的细胞色素 *c* 及 *GAPDH* 基因引物进行常规 PCR 扩增,将 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,分别见片段大小约为 124 bp (*GAPDH*) 和 235 bp (细胞色素 *c*) 的电泳条带(图 4),实验结果与预先设计的基因片段长度一致,并且没有杂条带。说明设计的引物及合成的 cDNA 模板均符合实验要求,可以进行以下的荧光定量 PCR 实验。

2.3.3 荧光定量 PCR 结果 为了进一步确定

前柄细胞和前孢子细胞中细胞色素 *c* 表达情况,进行了定量分析。对发育 16 h、18 h、20 h 阶段的前柄细胞和前孢子细胞的 cDNA 进行荧光定量 PCR 后,Bio-Rad CFX Manager 软件自动生成了 16 h、18 h、20 h 发育阶段的前柄细胞和前孢子细胞中细胞色素 *c* 及 *GAPDH* 基因的扩增曲线、融解曲线。从扩增曲线中可以看出,目的基因和内参基因扩增的 Ct 值均在 20 左右,结果比较可信;融解曲线显示。细胞色素 *c* 基因

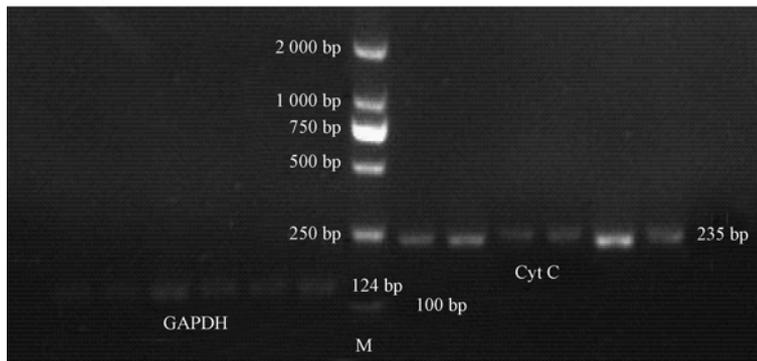


图 4 细胞色素 *c* 及 *GAPDH* 基因 RT-PCR 扩增

Fig. 4 Amplification of cytochrome *c* and *GAPDH* genes by RT-PCR

M: DL2000 DNA 分子量标准; Cyt C: 细胞色素 *c* 基因扩增产物; *GAPDH*: *GAPDH* 基因扩增产物。

M: DL2000 DNA maker; Cyt C: Amplification of cytochrome *c* gene by RT-PCR;

GAPDH: Amplification of *GAPDH* gene by RT-PCR.

的融解温度约为 82℃, *GAPDH* 基因的融解温度约为 80℃, 且二者均为单一峰, 峰值较为一致, 无非特异性荧光融解峰出现, 这些数据说明定量结果较为准确。

对 Bio-Rad CFX Manager 软件生成的实验数据进行分析, 得到了野生型盘基网柄菌 16 h、18 h、20 h 发育阶段前柄细胞和前孢子细胞中

细胞色素 *c* 基因相对表达情况的数据(图 5)。结果显示: 前柄细胞中细胞色素 *c* 的表达量明显高于前孢子细胞。发育 16 h 的表达量最低, 18 h 次高, 20 h 最高, 表现出明显的递增趋势。而前孢子细胞中的细胞色素 *c* 基因在细胞发育过程中表达量比较稳定, 没有明显的变化趋势, 基本处于同一水平。

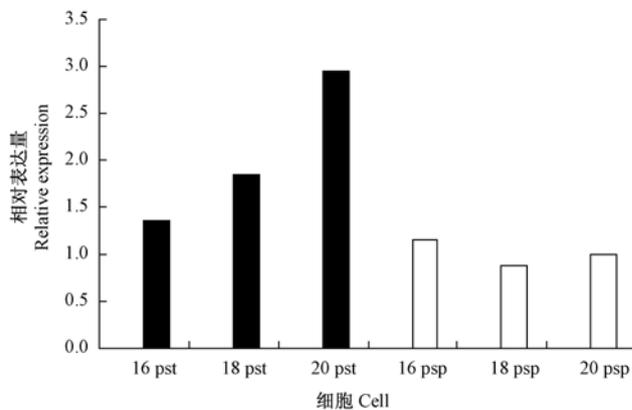


图 5 野生型盘基网柄菌前柄细胞和前孢子细胞中细胞色素 *c* 基因相对表达情况

Fig. 5 Relative expression of cytochrome *c* gene in prestalk cells and prespore cells of wild-type *Dictyostelium discoideum*

pst: 前柄细胞; psp: 前孢子细胞; 16、18、20 表示发育时间为 16 h、18 h、20 h。

pst: Prestalk cells; psp: Prespore cells; 16, 18, 20: 16 h, 18 h, 20 h.

3 讨论和分析

3.1 细胞色素 c 在凋亡过程中的变化 细胞色素 c 是细胞呼吸系统电子传递的载体, 释放到胞质中又可以作为一种凋亡诱导因子激活多个细胞凋亡的信号通路^[4,11-12]。关于细胞色素 c 如何从线粒体释放到胞浆, 目前还没有完全阐明。Hao 等^[13]将小鼠 (*Mus musculus*) 细胞色素 c 基因突变成 KA 基因。KA 基因是细胞色素 c 基因的等位基因, 只有传递电子的功能, 而不能激活凋亡活化因子-1 (apoptosis activated factor-1, Apaf-1)。突变型小鼠的线粒体呼吸功能正常, 但缺少了激活 Apaf-1 的能力, 也就不能激活凋亡受体蛋白家族依赖的信号通路。我们的结果显示, 盘基网柄菌前柄细胞在发育 16~20 h 的凋亡过程中, 线粒体中细胞色素 c 含量逐渐减少, 而胞浆中细胞色素 c 含量却呈现相反的变化趋势。这种增减的相反趋势提示, 胞质中增加的细胞色素 c 是从线粒体内释放而来的。在未凋亡的前孢子细胞中却没有发生类似情况, 说明细胞色素 c 的释放是一个伴随着凋亡而发生的事件。前柄细胞的凋亡过程同时也是一个分化形成柄细胞的过程^[2], 细胞色素 c 既是一个凋亡因子又是呼吸系统必不可少的组成部分, 凋亡与发育是一个统一的过程。前柄细胞中细胞色素 c 含量高于前孢子细胞, 笔者分析可能是前柄细胞的细胞色素 c 既要参与细胞凋亡的过程, 又需要足够的能量来完成细胞分化, 所以前柄细胞中细胞色素 c 的总需求量才会高于前孢子细胞。相关研究表明, 在发生凋亡的前柄细胞中, 线粒体仍保持完整的结构^[14], 尚未完全凋亡的细胞仍在进行正常的能量代谢作用。

3.2 凋亡对细胞色素 c 表达水平的影响

GAPDH 基因作为管家基因其表达相对恒定, 可以作为一个总体表达水平的参照, 消除实验过程带来的误差, 较准确地反映出在细胞凋亡的过程中细胞色素 c 基因的相对表达水平。荧光定量 PCR 结果表明, 前柄细胞中细胞色素 c 基因的表达水平明显高于前孢子细胞, 并且表达

量呈现出一个递增的趋势, 使得前柄细胞中细胞色素 c 含量高于前孢子细胞, 这从转录水平进一步证实了细胞色素 c 的作用。笔者推测, 正是表达水平的调控, 导致了上述细胞色素 c 总含量的变化。可以假设, 发育 20 h 后, 随着凋亡的继续进行, 细胞色素 c 的表达会越来越少, 最终在各种凋亡因子的共同作用下使得柄细胞逐渐走向死亡。

3.3 前孢子细胞胞质中的细胞色素 c 前孢子细胞中存在典型的线粒体内自噬现象, 被认为是细胞器水平的凋亡^[4]。其胞质中少量的细胞色素 c 可能是线粒体内自噬的结果, 那么细胞色素 c 是否也参与了该细胞器水平的凋亡, 目前还没有报道。

参 考 文 献

- [1] Town C D, Gross J D, Kay R R. Cell differentiation without morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 1976, 262(5570): 717-719.
- [2] Stodola F H, Raper K B, Fennell D I. Pigments of *Penicillium herquei*. *Nature*, 1951, 167(4254): 773-774.
- [3] Cornillon S, Foa C, Davoust J, et al. Programmed cell death in *Dictyostelium*. *Journal of Cell Science*, 1994, 107(10): 2691-2704.
- [4] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, 91(4): 479-489.
- [5] Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 87-106.
- [6] Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, et al. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 2006, 13(9): 1423-1433.
- [7] Sussman M. Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions. *Methods Cell Biol*, 1987, 28: 9-29.
- [8] Ratner D, Borth W. Comparison of differentiating *Dictyostelium discoideum* cell types separated by an improved method of density gradient centrifugation. *Exp Cell Res*, 1983, 143(1): 1-13.
- [9] Parish R W. The isolation and characterization of peroxisomes (microbodies) from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 1975, 105(1): 187-192.
- [10] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the

- assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259): 680 – 685.
- [11] Liu X S, Kim C N, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996, 86(1): 147 – 157.
- [12] 陈建伟, 钟玲. 细胞色素 C 与 caspase 家族在缺血/再灌注所致心肌细胞凋亡中的作用. *医学综述*, 2009, 15(2): 173 – 176.
- [13] Hao Z Y, Duncan G S, Chang C C, et al. Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome c reveals a differential requirement for cytochrome c and apaf-1 in apoptosis. *Cell*, 2005, 121(4): 579 – 591.
- [14] 谭宁, 施佳乐, 彭建涛, 等. 盘基网柄菌细胞分化和凋亡的形态特征. *动物学报*, 2006, 52(3): 603 – 611.