

双氯芬酸对烟草BY-2细胞呼吸代谢的影响

刘玉亭¹, 程丹丹², 刘美君¹, 高辉远^{1*}

¹山东农业大学生命科学学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018; ²东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

摘要: 双氯芬酸是一种新的全球性环境污染物, 严重影响植物的生长发育, 但其作用机制至今尚不清楚。本研究从双氯芬酸对烟草BY-2细胞呼吸代谢和活性氧代谢的影响入手, 探讨双氯芬酸抑制植物细胞生长的作用机理。结果表明, 双氯芬酸处理1 d后, 显著抑制了烟草BY-2细胞的生长, 引起细胞内活性氧(ROS)的爆发和积累, 并导致烟草BY-2细胞死亡。双氯芬酸对烟草BY-2细胞的糖酵解途径(EMP)、三羧酸循环(TCA)和戊糖磷酸途径(PPP)三个碳代谢途径以及细胞色素氧化酶(COX)和交替氧化酶(AOX)参与的两条呼吸电子传递途径均有即时抑制作用。双氯芬酸可能通过抑制细胞线粒体呼吸电子传递链的活性, 导致电子从呼吸链泄漏加速ROS的形成, 并反馈抑制呼吸碳代谢途径, 进而导致细胞内物质代谢和能量代谢紊乱, 这些是双氯芬酸抑制烟草BY-2细胞生长、导致细胞死亡的重要原因。

关键词: 双氯芬酸; 烟草BY-2细胞; 呼吸代谢; 活性氧代谢; 呼吸电子传递链

Effect of Diclofenac on Respiratory Metabolism of Tobacco BY-2 Cell

LIU Yu-Ting¹, CHENG Dan-Dan², LIU Mei-Jun¹, GAO Hui-Yuan^{1*}

¹State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; ²College of Life Sciences, Northeast Forest University, Harbin 150040, China

Abstract: Diclofenac is a new kind of global environmental pollutant, influencing the growth and development of plants seriously. However, it has not been elucidated the mechanism by which the diclofenac inhibits plant growth. In order to explore the inhibition mechanism, in this study, we explored the effect of diclofenac on respiratory metabolism and metabolism of reactive oxygen species (ROS) in tobacco BY-2 cells. The results showed that after treated with diclofenac for 1 d, the growth of tobacco BY-2 cell was significantly inhibited, a burst and overproduction of ROS in the BY-2 cell were induced, which promoted death of the BY-2 cells. Diclofenac treatment instantly inhibited the respiration of the BY-2 cell, the EMP, TCA, PPP respiration pathway and the respiratory electron transport via COX and AOX were inhibited by the diclofenac treatment. Diclofenac might inhibit respiratory electron transport and the inhibition of mitochondrial respiratory electron transport chain caused electrons leaking from respiratory electron transport chain, which accelerated generation of ROS, and the inhibition of respiratory electron transport also caused feedback inhibition of respiratory carbon metabolic pathways, disordering substance metabolism and energy metabolism in the BY-2 cell, this is one of the important reasons of diclofenac to inhibit the growth and induce death of the BY-2 cells.

Key words: diclofenac; tobacco BY-2 cell; respiratory metabolism; active oxygen metabolism; respiratory electron transport chain

近些年来,越来越多的用于医疗的药物通过各种途径扩散到环境中,并在环境中积累,对环境造成污染(Matsuo等2011),这些污染不仅对人类(Yamazaki等2006)和动物(Eades和Waring 2010)造成直接或间接的危害,而且还会对植物的生长(Ferrari等2003; Clevers 2003)产生不良影响。因此,有机药物的环境污染问题已经成为一个新的全球性的环境问题,受到人们的广泛关注(Dietrich等2002)。

目前,人们已在污水处理厂和地表水,甚至在饮用水中频繁检测到双氯芬酸镇痛消炎类药物

(Hua等2006; Schmitt-Jansen等2007)。有研究表明,有些水体中积累的双氯芬酸已经可以严重抑制植物的生长。Ferrari等(2003)观察到双氯芬酸可以抑制藻类(*Selenastrum capricornutum*)的生长。Clevers (2004)观察到即使在极低浓度(约为0.035 mmol·L⁻¹)条件下,双氯芬酸也会抑制浮游绿球藻(*Desmodesmus*

收稿 2014-08-01 修定 2014-08-18

资助 高等学校博士学科点专项科研项目(20113702110008)和国家自然科学基金(31370276)。

* 通讯作者(E-mail: gaohy@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8245985)。

subspicatus)的生长,并且双氯芬酸可与水体中残留的其他有机药物发生协同作用,严重威胁水生植物的生存。Schmitt-Jansen等(2007)选用绿色植物栅藻(*Scenedesmus vacuolatus*)同步培养的单细胞系为实验材料,对双氯芬酸的植物毒性做了评估,实验结果表明,较低浓度(约为 $0.072 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的双氯芬酸即可抑制藻类的生长,抑制程度随着处理浓度和时间的增加而加重。到目前为止,人们虽然观察到双氯芬酸对水生植物的生长有明显的抑制作用,但是尚未有人研究双氯芬酸对植物产生毒害的机理(Huber等2012)。因此,阐明双氯芬酸抑制植物生长的生理机制对理解其对环境的污染作用有重要的理论意义。

呼吸作用是维持植物生命活动最主要的生理过程之一,也是衡量生命活动强弱的重要指标。线粒体是细胞物质代谢和能量代谢的枢纽,它在植物生长代谢过程中起重要的作用,同时线粒体也是逆境胁迫的主要伤害位点之一(Jones 2000; Lam等2001),在生物和非生物逆境胁迫条件下,细胞线粒体正常功能的维持对生物抵抗逆境能力的大小起至关重要的作用。因此,探讨双氯芬酸对植物呼吸代谢的影响有助于我们理解双氯芬酸对植物的毒害机理。

迄今为止,已有大量学者研究了逆境胁迫导致植物细胞死亡的关键因素(Ng等2006; Yin等2006; Watabe和Nakaki 2007)。有文献指出,ROS爆发能够参与多种信号转导途径,如MAPK信号转导过程(Jonak等2002; Kovtun等2000)。孙学娟等(2012)认为 CuCl_2 胁迫0.5 h后, H_2O_2 的爆发可能作为一种信号启动细胞死亡。ROS爆发在启动细胞死亡过程中的详细机制是个非常复杂的信号转导网络系统(Apel和Hirt 2004)。此外,Cheng等(2011)的研究证明,ROS爆发在AT毒素诱导的烟草BY-2细胞死亡中起着关键作用。Bethke和Jones (2001)的研究也表明,ROS爆发是赤霉素诱导的大麦糊粉细胞死亡的关键因素。ROS可以通过氧化脂质、蛋白质、DNA和碳水化合物等来扰乱植物的正常代谢,导致正常细胞功能的降低甚至崩溃,最终导致细胞凋亡或坏死。烟草BY-2细胞不含有叶绿体,因此线粒体电子传递链被认为是其ROS产生的主要部位(孙学娟等2012)。

本文以烟草BY-2细胞为实验材料,通过研究双氯芬酸对其呼吸速率、呼吸代谢途径、呼吸电子传递链及细胞内ROS代谢的影响探讨双氯芬酸抑制植物细胞生长的作用机理。

材料与方法

1 实验材料及处理

1.1 烟草BY-2细胞的培养

烟草(*Nicotiana tabacum* L.) BY-2细胞(Bright Yellow-2; Japan Tobacco, Inc.)接种在改良的LS培养基中(Linsmaier和Skoog 1965),并于 27°C 、振荡频率为 $135 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的THZ-C台式恒温振荡器里避光培养。以处于对数生长期(3 d)的烟草BY-2悬浮细胞为实验材料(Cheng等2011),细胞在处理前过滤至新配制的培养基中,进行预培养等待处理。

1.2 双氯芬酸处理烟草BY-2细胞

本研究所用的双氯芬酸(CAS RN 15307-79-6)购自Sigma公司。预实验表明,双氯芬酸显著抑制细胞呼吸作用,随着双氯芬酸浓度的增加,对呼吸作用的抑制程度也显著增加,当双氯芬酸浓度达到 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,双氯芬酸对呼吸的抑制程度不再随浓度的增加而有较明显改变。本实验用超纯水(Ferrari等2003; Schmitt-Jansen等2007)配制 $12 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的双氯芬酸母液,用 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的双氯芬酸(本文 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度均为反应体系和培养液中双氯芬酸的最终浓度)处理对数期的烟草BY-2细胞作为处理,用与处理组所用双氯芬酸母液等体积的超纯水处理的对数期烟草BY-2细胞作为对照。

将未经任何处理的烟草BY-2悬浮细胞用200目的细胞筛过滤,并用吸水纸从滤网下面将液体吸干(保证每次实验中用吸水纸最后一次吸水时吸水纸不再潮湿)。然后称取 0.1 g 细胞并用 1 mL pH 6.8的PBS测定缓冲液重悬浮,并全部转移到Oxytherm氧电极(Hansatech, 英国)的反应杯里,然后向反应杯里加入 $966.7 \mu\text{L}$ pH 6.8的PBS测定缓冲液和 $33.3 \mu\text{L}$ 双氯芬酸母液(保证反应杯里 2 mL 反应体系中双氯芬酸终浓度为 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),测定BY-2细胞的耗氧速率,待耗氧速率稳定时开始记录,观察双氯芬酸对细胞呼吸、线粒体呼吸电子传递链的即时抑制作用;称取 4 g 烟草BY-2细胞放到 100 mL

的三角瓶里, 加入59 mL改良的LS培养基将细胞重新悬浮, 再加入1 mL双氯芬酸母液(保证60 mL培养液中双氯芬酸的最终浓度为 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)摇匀, 并于 $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、振荡频率为 $135 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的THZ-C台式恒温振荡器里避光培养1 d, 测定并分析双氯芬酸对细胞的生长量和死亡率以及细胞内ROS的影响。

2 烟草BY-2细胞生长及细胞死亡率的测定

因为本实验的目的是通过研究双氯芬酸对烟草BY-2细胞呼吸代谢途径的影响来研究其对细胞生长产生抑制作用的机理, 因此本研究用细胞干重的变化来反映细胞生长量的变化。为了保证称量过程中细胞损失量相一致, 在测定初始干重时称取4 g未经任何处理的烟草BY-2细胞放到100 mL的三角瓶里, 加入59 mL改良的LS培养基将细胞重新悬浮, 再加入1 mL超纯水摇匀, 然后用200目的细胞筛过滤重新悬浮的烟草BY-2细胞, 用吸水纸吸干液体, 并用已经烘干并称重(m_0)的称量纸包好于 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干, 称量细胞和称量纸的总重量(m_1), $m_1 - m_0$ 即为处理前的细胞干重。用同样的方法称量经双氯芬酸处理1 d后的烟草BY-2细胞的干重, 每个处理重复3~5次。

以双氯芬酸处理0、3、6、12和24 h的烟草BY-2细胞为处理组, 以与处理组所用双氯芬酸母液等体积的超纯水处理的、同一批培养的烟草BY-2细胞为对照组。分别将取经双氯芬酸处理0、3、6、12和24 h的烟草BY-2细胞及各时间点对应的对照组细胞悬浮液用200目的细胞筛过滤, 并用吸水纸吸干液体, 各称取0.5 g, 在室温下用1 mL 0.025% (W/V)埃文斯蓝中染色5 min, 接着每次用20 mL $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 (pH 5.6)缓冲液冲洗3次至无色。死亡的细胞不能把埃文斯蓝排除在细胞外部, 因此细胞核被染成蓝色。相反, 活细胞核不被染色。细胞染色完毕后, 用200目的细胞筛将细胞滤出, 用吸水纸吸干液体, 然后全部转移到10 mL离心管中, 向离心管中加入4 mL 1%的十二烷基磺酸钠(SDS) (50%甲醇配成), 在水浴锅中 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温0.5 h后, 冷却后加入2 mL蒸馏水稀释, 然后在 $10\ 000\times g$ 条件下离心10 min, 取上清液用UV2500分光光度计(岛津, 日本)在600 nm波长下测定吸光值。用高温($100\text{ }^{\circ}\text{C}$)处理1 h后的细胞做平行实验, 以高温($100\text{ }^{\circ}\text{C}$)处理1 h后细胞的死亡率为100%, 其

他处理细胞的死亡率换算成高温处理细胞死亡率的百分数, 以百分数的大小来代表细胞的相对死亡率(孙学娟等2012)。各时间点的对照组和处理组的细胞死亡率的测定均重复3~5次。

3 烟草BY-2细胞内 H_2O_2 浓度的测定

由于 H_2O_2 是活性氧中最稳定的一种分子, 所以本研究通过监测烟草BY-2细胞内 H_2O_2 浓度的变化来反映双氯芬酸处理后烟草BY-2细胞内ROS的变化。

以双氯芬酸处理0、0.5、1、2、3、6、12和24 h的烟草BY-2细胞为处理组, 以与处理组所用双氯芬酸母液等体积的超纯水处理的、同一批培养的烟草BY-2细胞为对照组。分别将经双氯芬酸处理0、0.5、1、2、3、6、12和24 h的烟草BY-2细胞及各时间点对应的对照组细胞悬浮液用200目的细胞筛过滤, 并用吸水纸吸干液体, 各称取3 g, 用5 mL 5% (W/V)三氯乙酸(TCA)磨样, 接着在 $12\ 000\times g$ 条件下离心10 min, 上清液用于 H_2O_2 浓度的测定(Patterson等1984)。各时间点的对照组和处理组的细胞内 H_2O_2 的测定均重复3~5次。

4 烟草BY-2细胞呼吸代谢途径的测定

4.1 呼吸速率的测定

将未经任何处理的烟草BY-2悬浮细胞用200目的细胞筛过滤, 并用吸水纸吸干液体, 称取0.1 g用1 mL pH 6.8的PBS测定缓冲液重新悬浮, 全部转移到氧电极的反应杯里, 然后分别向反应杯里加入998.33、996.67、993.33、990、986.7、983.3、966.7、950和933.3 μL pH 6.8的PBS测定缓冲液和1.67、3.33、6.67、10、13.3、16.7、33.3、50和66.7 μL 双氯芬酸母液(对照组加入等体积的超纯水)以确保在2 mL的反应体系里双氯芬酸的终浓度依次为0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.20、0.30和 $0.40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 开始测定, 待耗氧速率稳定时开始记录, 此时得到的总呼吸速率是用来比较分析各浓度的双氯芬酸对细胞呼吸的即时抑制作用。并以各对照组呼吸速率为100%, 对应各处理组呼吸速率均换算成对照组呼吸速率的百分数, 以百分数代表各浓度双氯芬酸对细胞呼吸速率的即时抑制作用的大小。所有的呼吸速率均于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下测定, 测定液的温度由Oxytherm氧电极的半导体控温装置控制。

4.2 呼吸途径的测定及计算

将未经任何处理的烟草BY-2悬浮细胞用200目的细胞筛过滤,并用吸水纸吸干液体,称取0.1 g用1 mL pH 6.8的PBS测定缓冲液重新悬浮,并全部转移到氧电极的反应杯里,先按照上述方法测得细胞的总呼吸;然后,待耗氧速率稳定后再向反应杯里加入双氯芬酸使反应杯中双氯芬酸的终浓度为 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,此时测得的呼吸是加入双氯芬酸后的剩余呼吸 R_1 ;最后,待耗氧速率稳定后分别向氧电极反应杯里加入各呼吸途径抑制剂,此时测得的呼吸是在加入双氯芬酸后剩余呼吸的基础上再加入呼吸途径抑制剂后的剩余呼吸 R_2 。对照组不加双氯芬酸母液,其余操作均与处理组相同,分别得到剩余呼吸 R_3 和 R_4 。对照组2次剩余呼吸的差值(R_3-R_4)与处理组2次剩余呼吸的差值(R_1-R_2)作差 $[(R_3-R_4)-(R_1-R_2)]$,即为双氯芬酸对烟草BY-2细胞呼吸途径的抑制大小。本实验选取NaF (Gambino等2009)、丙二酸(McLean等2009)、正磷酸钠(Liu等2007)分别抑制EMP(糖酵解途径)、TCA(三羧酸循环)、PPP(磷酸戊糖途径)呼吸碳代谢途径;以KCN和SHAM(水杨基羟肟酸, salicylhydroxamic acid) (Yip和Vanlerberghe 2001; Robson和Vanlerberghe 2002)分别抑制COX(细胞色素氧化酶)和AOX(交替氧化酶)两条呼吸电子传递途径。分析双氯芬酸对各呼吸代谢途径抑制作用的大小。所有的呼吸速率均于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温条件下测定,测定液的温度由Oxytherm氧电极的半导体控温装置控制。

5 数据处理

采用Excel 2003软件进行数据分析并作图,并用SPSS 11.5对数据进行统计分析。细胞干重、细胞死亡率和细胞内ROS的测定结果均为3~5次重复测定的平均值,呼吸速率、各呼吸途径的测定结果均为15~20次重复测定的平均值。

实验结果

1 不同浓度的双氯芬酸对烟草BY-2细胞呼吸的即时抑制作用

将烟草BY-2细胞的悬浮液和双氯芬酸加到氧电极反应杯里,开始测定,大约90 s后,烟草BY-2细胞呼吸作用就受到显著的抑制,而且随着双氯芬酸浓度的增加,对呼吸作用的抑制程度也显著增

加(图1)。当双氯芬酸浓度达到 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对烟草BY-2细胞的呼吸抑制就达到较大水平(16%左右)。此后,双氯芬酸对呼吸的抑制不再随浓度的增加而显著改变。

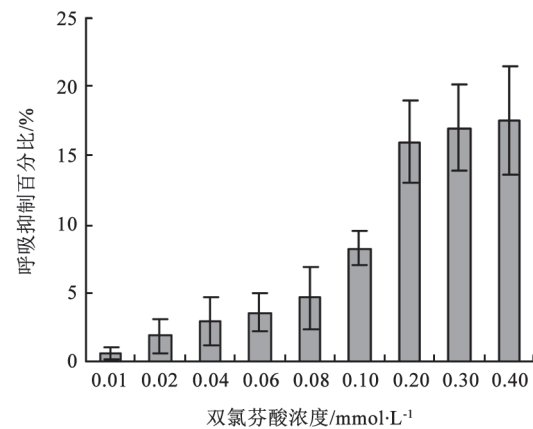


图1 不同浓度的双氯芬酸对烟草BY-2细胞呼吸速率即时抑制作用

Fig.1 The instant inhibition of total respiration in tobacco BY-2 cells treated with different concentrations of diclofenac
每个数据为15~20次独立测定的平均值 \pm SE。

2 双氯芬酸对烟草BY-2细胞的生长和死亡率以及细胞内 H_2O_2 浓度的影响

双氯芬酸处理烟草BY-2细胞1 d, 处理组细胞干重显著降低(图2-A), 反映双氯芬酸显著抑制了烟草BY-2细胞的生长。

经双氯芬酸处理24 h后, 双氯芬酸显著地促进烟草BY-2细胞的死亡, 并且随着双氯芬酸处理时间的延长, 烟草BY-2细胞的死亡率逐渐增加(图2-B)。双氯芬酸处理3、6、12和24 h后, 处理组烟草BY-2细胞的相对死亡率分别增加了16.34%、30.32%、30.62%、42.42%。

与对照相比, 双氯芬酸处理烟草BY-2细胞1 h时, 细胞内 H_2O_2 浓度明显增加, 约达到对照水平的2.3倍, 然后降低, 随后又逐渐增加, 处理24 h时细胞内 H_2O_2 浓度达到峰值, 约为对照组的5.2倍(图2-C)。

3 双氯芬酸对烟草BY-2细胞的总呼吸、COX和AOX呼吸电子传递途径的即时抑制作用

双氯芬酸处理约90 s后, 烟草BY-2的细胞总呼吸、COX和AOX参与电子传递途径均受到显著

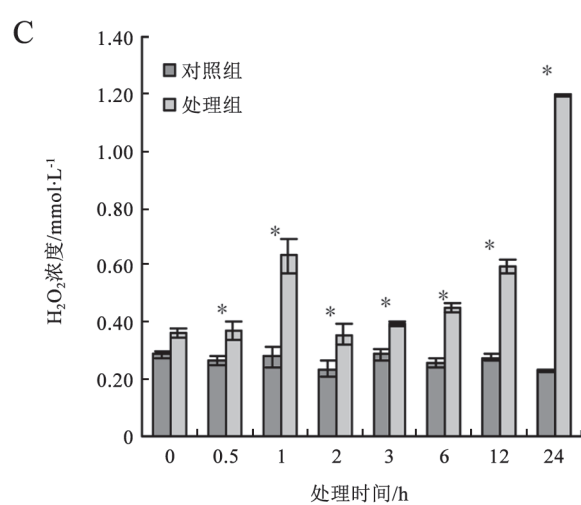
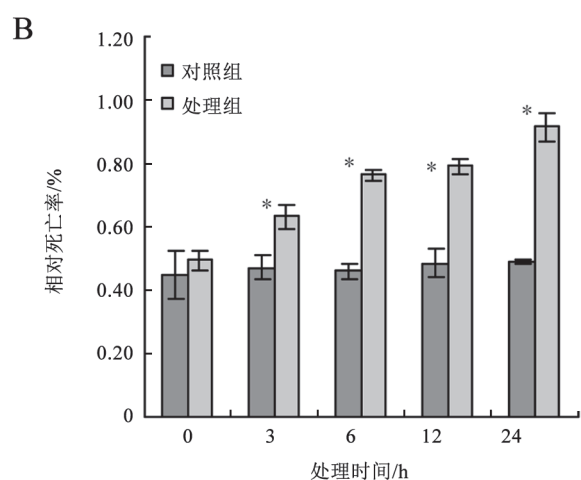
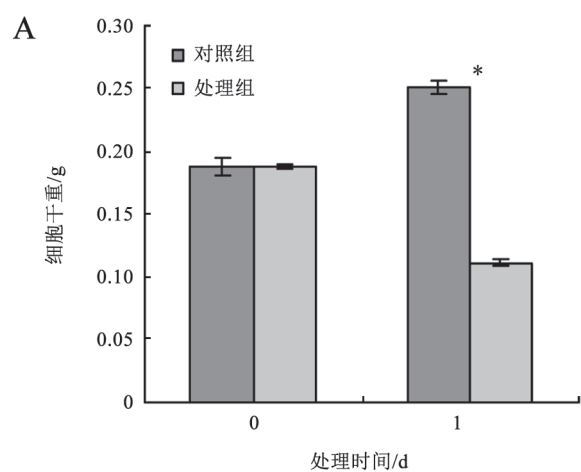


图2 双氯芬酸对烟草BY-2细胞的生长和死亡率以及细胞内H₂O₂浓度的影响

Fig.2 Effects of diclofenac on growth, death, and H₂O₂ concentration of tobacco BY-2 cells

每个数据为3~5次独立测定的平均值±SE; *表示同一时间的处理与对照在0.05水平上有显著性差异。

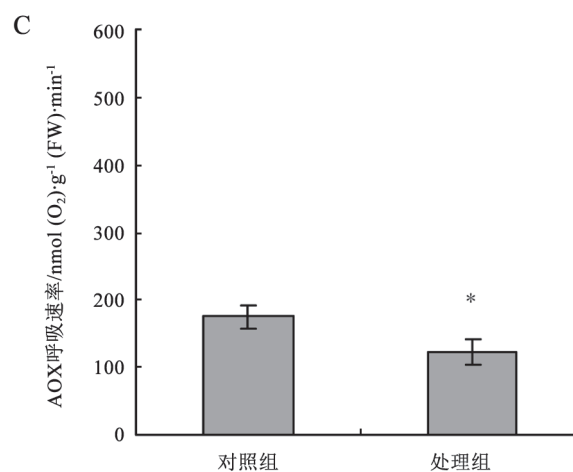
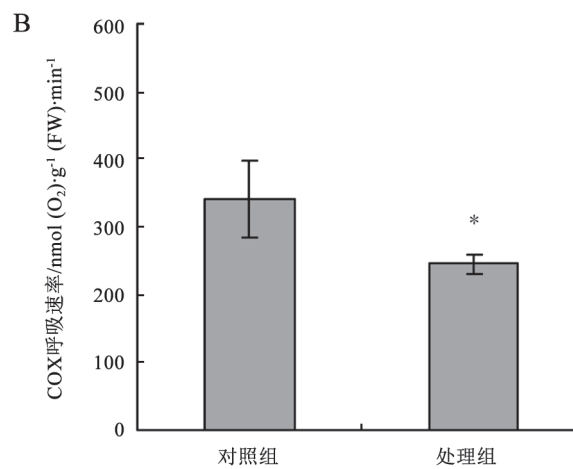
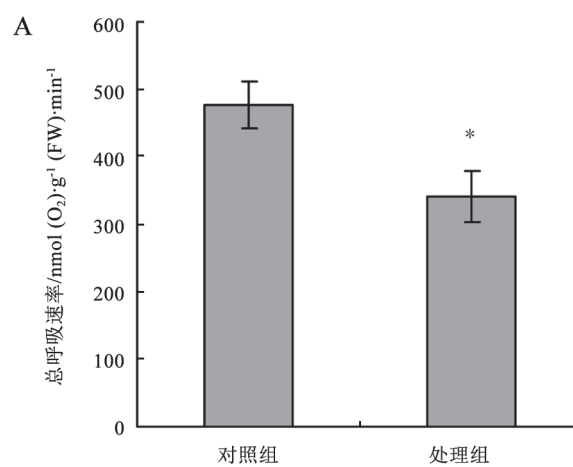


图3 双氯芬酸对烟草BY-2细胞的总呼吸、COX和AOX参与的呼吸电子传递的即时抑制作用

Fig.3 The instant inhibition of total respiration and capacities of COX and AOX pathways in tobacco BY-2 cells treated with diclofenac

每个数据为15~20次独立测定的平均值±SE; *表示处理与对照在0.05水平上有显著性差异。

的抑制。与对照组相比,处理组的细胞总呼吸、COX和AOX参与的呼吸电子传递速率分别降低了约28.35%、28.02%和30.72% (图3)。

双氯芬酸对烟草BY-2细胞的EMP、TCA和PPP三个呼吸代谢途径均有不同程度的抑制作用(图4),抑制百分比依次约为9.20%、15.95%、20.53%。

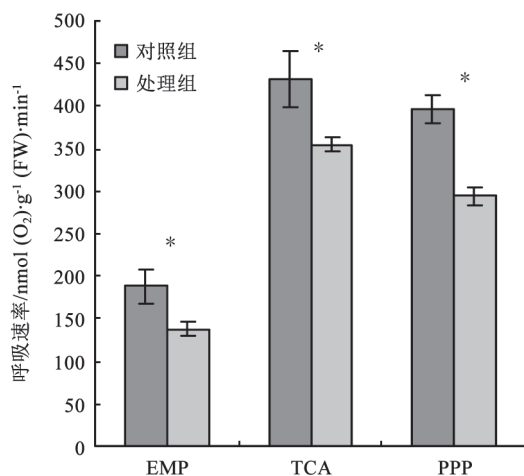


图4 双氯芬酸对烟草BY-2细胞的EMP、TCA和PPP呼吸途径的抑制作用

Fig.4 The inhibition of EMP, TCA and PPP pathway in tobacco BY-2 cells treated with diclofenac

每个数据为15~20次独立测定的平均值±SE; *表示各途径处理与对照在0.05水平上有显著性差异。

讨 论

双氯芬酸能显著抑制烟草BY-2细胞的生长(图2-A),这可能与双氯芬酸对细胞呼吸作用的显著抑制相关(图3-A)。由于ATP是细胞代谢所需的直接能量,且ATP本身也是一种重要的信号分子,因此ATP在细胞生长发育代谢过程中具有重要作用。有报道指出,ATP损耗可能是苯甲基腺苷(benzyladenosine)诱导烟草BY-2细胞死亡的关键因素(Mlejnek等2003)。孙学娟等(2012)的研究表明,CuCl₂胁迫导致的细胞内ATP损耗在CuCl₂诱导的烟草BY-2细胞死亡过程中起重要作用。双氯芬酸抑制了COX和AOX的活性,进而影响线粒体呼吸电子传递,使得ATP合成受抑制,导致能量供应不足,进而限制了烟草BY-2细胞的生长。

双氯芬酸处理烟草BY-2细胞后,细胞中COX

和AOX参与的呼吸电子传递途径都受阻(图3-B、C),EMP、TCA和PPP呼吸碳代谢途径也受到不同程度的抑制(图4)。为了证明双氯芬酸对烟草BY-2细胞EMP、TCA和PPP途径的间接抑制作用,我们分别用COX和AOX专一性抑制剂KCN和SHAM,使COX和AOX的受抑制程度与双氯酚酸对两者的抑制程度相近时,得出与双氯芬酸对EMP、TCA和PPP三个呼吸碳代谢相似的抑制程度(数据未列出)。结果表明,双氯芬酸确实是通过抑制呼吸电子传递从而反馈抑制呼吸碳代谢。因此,我们认为双氯芬酸是通过抑制烟草BY-2细胞中COX和AOX参与的呼吸电子传递,进而反馈抑制了EMP、TCA和PPP三个呼吸碳代谢,从而导致代谢产物供应不足,限制了烟草BY-2细胞的生长。

AOX途径是植物细胞特有的一种呼吸途径,是一种非磷酸化偶联的途径,它不受线粒体跨膜质子梯度及ADP/ATP比值的影响而快速地氧化还原性物质NADPH和NADH (Kornfeld等2013; Zhang等2012)。植物正常生长时,呼吸电子传递主要通过COX途径进行。但是,当有环境胁迫存在时,由于呼吸底物和ADP的限制将会导致COX途径活性的下降,AOX途径可以分流COX途径的电子,减少电子流从呼吸电子传递链的泄漏,从而阻止ROS的大量产生,降低ROS引起的氧化胁迫(Cvetkovska和Vanlerberghe 2012; Zhang等2011)。程丹丹等(2011)的研究指出,赤星病菌代谢产物可以抑制烟草BY-2细胞的AOX途径,并且这种抑制作用是导致烟草BY-2细胞中ROS爆发的原因。由于烟草BY-2细胞是一种无叶绿体的细胞系,因此线粒体电子传递链被认为是烟草BY-2细胞ROS产生的主要部位,当线粒体电子传递链被阻断时,大量的电子从线粒体电子传递链泄漏,与细胞中的分子氧反应从而产生超氧阴离子,随后在细胞中转化为H₂O₂ (Fleury等2002),产生大量的ROS (Vranová等2002)。双氯芬酸对烟草BY-2细胞COX呼吸电子传递的抑制导致大量的电子从线粒体电子传递链泄漏,此外它对AOX途径的抑制(图3-C),也降低了AOX对细胞的保护作用,导致烟草BY-2细胞内H₂O₂大量积累(图2-C),ROS的积累会对细胞的膜脂、蛋白质和核酸造成伤害,严重时会导致细胞的死亡(Pospíšil 2012)。因此,双氯芬酸对线粒体

电子传递的抑制作用是它抑制细胞生长、促进细胞死亡的重要原因。

综上所述, 我们的研究表明, 双氯芬酸抑制烟草BY-2细胞COX和AOX呼吸电子传递途径, 导致ROS的积累; 此外, 双氯芬酸对呼吸电子传递的抑制导致对EMP、TCA和PPP碳代谢途径的反馈抑制。上述过程导致烟草BY-2细胞内ATP和中间代谢产物供应不足。这些是双氯芬酸抑制细胞生长、促进细胞死亡的重要原因。至于双氯芬酸对其他植物生长抑制的机理是否与对烟草BY-2细胞的抑制机理相同, 以及双氯芬酸对呼吸电子传递链抑制的详细机制还需要做进一步的研究来阐明。

参考文献

- 程丹丹, 孙学娟, 高辉远, 杨程, 张立涛, 孟庆伟(2011). 烟草赤星病菌代谢产物诱导的烟草BY-2细胞ROS爆发和ATP损耗. 中国农业科学, 44 (8): 1610~1617
- 孙学娟, 刘美君, 高辉远, 杨程, 张子山, 孟庆伟(2012). CuCl₂胁迫对烟草BY-2悬浮细胞死亡的诱导. 植物生理学报, 48 (2): 173~180
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373~399
- Bethke PC, Jones RL (2001). Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *Plant J*, 25 (1): 19~29
- Cheng DD, Jia YJ, Gao HY, Zhang LT, Zhang ZS, Xue ZC, Meng QW (2011). Characterization of the programmed cell death induced by metabolic products of *Alternaria alternata* in tobacco BY-2 cells. *Physiol Plant*, 141: 117~129
- Cleuvers M (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett*, 142: 185~194
- Cleuvers M (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol Environ Saf*, 59: 309~315
- Cvetkovska M, Vanlerberghe GC (2012). Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentrations of superoxide and nitric oxide. *New Phytol*, 195: 32~39
- Dietrich DR, Webb SF, Petry T (2002). Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment. *Toxicol Lett*, 131: 1~3
- Eades C, Waring CP (2010). The effects of diclofenac on the physiology of the green shore crab *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res*, 69: S46~S48
- Ferrari B, Paxéus N, Giudice RL, Pollio A, Garric J (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol Environ Saf*, 55: 359~370
- Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 84: 131~141
- Gambino R, Piscitelli J, Ackattupathil TA, Theriault JL, Andrin RD, Sanfilippo ML, Etienne M (2009). Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. *Clin Chem*, 55: 1019~1021
- Hua W, Bennett ER, Letcher RJ (2006). Ozone treatment and the depletion of detectable pharmaceuticals and atrazine herbicide in drinking water sourced from the upper Detroit River, Ontario, Canada. *J Water Res*, 40: 2259~2266
- Huber C, Bernadett B, Peter S (2012). Metabolism of diclofenac in plants—hydroxylation is followed by glucose conjugation. *J Hazard Mater*, 243: 250~256
- Jonak C, Ökrész L, Bögre L, Hirt H (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Plant Biol*, 5: 415~424
- Jones A (2000). Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci*, 5: 225~230
- Kornfeld A, Atkin OK, Griffin KL, Horton TW, Yakir D, Turnbull MH (2013). Modulation of respiratory metabolism in response to nutrient changes along a soil chronosequence. *Plant Cell Environ*, 36: 1120~1134
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 2940~2944
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411: 848~853
- Linsmaier EM, Skoog F (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 18: 100~127
- Liu YG, Wu RR, Wan Q, Xie GQ, Bi YR (2007). Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots. *Plant Cell Physiol*, 48: 511~522
- Matsuo H, Sakamoto H, Arizono K, Shinohara R (2011). Behavior of pharmaceuticals in waste water treatment plant in Japan. *Bull Environ Contam Toxicol*, 87: 31~35
- McLean S, Richards SM, Cover SL, Brandon S, Davies NW, Bryant JP, Clausen TP (2009). Papyriferic acid, an antifeedant triterpene from birch trees, inhibits succinate dehydrogenase from liver mitochondria. *J Chem Ecol*, 35: 1252~1261
- Mlejnek P, Doležel P, Procházka S (2003). Intracellular phosphorylation of benzyladenosine is related to apoptosis induction in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Environ*, 26: 1723~1735
- Ng LE, Vincent AS, Halliwell B, Wong KP (2006). Action of diclofenac on kidney mitochondria and cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 348: 494~500
- Patterson BD, Macrae EA, Ferguson IB (1984). Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Anal Biochem*, 139: 487~492
- Pospišil P (2012). Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1817: 218~231
- Robson CA, Vanlerberghe GC (2002). Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiol*, 129: 1908~1920

- Schmitt-Jansen M, Bartels P, Adler N, Altenburger R (2007). Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Anal Bioanal Chem*, 387: 1389~1396
- Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot*, 53: 1227~1236
- Watabe M, Nakaki T (2007). ATP depletion does not account for apoptosis induced by inhibition of mitochondrial electron transport chain in human dopaminergic cells. *Neuropharmacology*, 52: 536~541
- Yamazaki T, Muramoto M, Oe T, Morikawa N, Okitsu O, Nagashima T, Nishimura S, Katayama Y, Kita Y (2006). Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, suppresses apoptosis induced by endoplasmic reticulum stresses by inhibiting caspase signaling. *Neuropharmacology*, 50: 558~567
- Yin LY, Huang JQ, Li W, Liu YD (2006). Microcystin-RR-induced apoptosis in tobacco BY-2 cells. *Toxicon*, 48: 204~210
- Yip JYH, Vanlerberghe GC (2001). Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. *Physiol Plant*, 112: 327~333
- Zhang LT, Gao HY, Zhang ZS, Xue ZC, Meng QW (2012). Multiple effects of inhibition of mitochondrial alternative oxidase pathway on photosynthetic apparatus in *Rumex K-1* leaves. *Biol Plant*, 56 (2): 365~368
- Zhang LT, Zhang ZS, Gao HY, Xue ZC, Yang C, Meng XL, Meng QW (2011). Mitochondrial alternative oxidase pathway protects plants against photoinhibition by alleviating inhibition of the repair of photodamaged PSII through preventing formation of reactive oxygen species in *Rumex K-1* leaves. *Physiol Plant*, 143: 396~407