

## 非洲狼尾草珠心细胞程序死亡过程的超微结构观察

刘 林, 叶秀麟, 梁承邺

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

**摘要:** 用透射电子显微镜观察了非洲狼尾草珠心细胞衰亡过程, 比较明显的结果是, 染色质凝集, 核周腔膨大呈袋状, 内有包裹着核物质的内膜突起; 有些内质网槽库膨大成囊泡, 能吞噬细胞质; 线粒体结构简化, 内嵴消失。

**关键词:** 非洲狼尾草; 珠心; 细胞程序死亡; 植物解剖学

中图分类号: Q944.59 文献标识码: A 文章编号: 1005-3395(2001)02-0136-06

## ULTRASTRUCTURAL OBSERVATION ON PROGRAMMED CELL DEATH OF NUCELLUS IN *PENNISETUM SQUAMULATUM*

LIU Lin, YE Xiu-lin, LIANG Cheng-ye

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** Ultrastructural observations on programmed cell death of nucellus in *Pennisetum squamulatum* demonstrate that the chromatin of the nucleus of the cell in apoptosis shows a condensation process and that the nuclear envelope becomes swollen by the outer membrane heaving. The inner membrane of nuclear envelope develops some protrusions into the swollen space. The endoplasmic reticulum cisternae dilate. Mitochondria are found to lose cristae.

**Key words:** *Pennisetum squamulatum*; Nucellus; Programmed cell death; Plant anatomy

细胞程序死亡(programmed cell death, PCD)与偶然因素诱发的死亡不同,它是一个由基因群编制的程序控制的严格有序的复杂过程<sup>[1]</sup>,是细胞分化的最后阶段<sup>[2]</sup>。对动物细胞程序死亡的研究已有半个世纪,而对植物细胞程序死亡的研究则在20世纪90年代以后才引起注意。1985年尤瑞麟在有关小麦珠心组织衰退的超微结构研究中首先引用了PCD概念<sup>[3]</sup>,国际上在1990年之后才把这一概念引入植物学。植物叶片和花瓣衰老过程<sup>[4]</sup>、根生长过程中根冠细胞的死亡过程<sup>[5]</sup>、次生木质部导管分子的分化过程<sup>[6]</sup>、小孢子发育过程中绒毡层细胞的死亡<sup>[2]</sup>等都是PCD。

被子植物雌配子体发育过程中,珠心组织细胞逐步发生衰退,而且为胚囊所吸收,这一过程是PCD<sup>[3]</sup>。然而,从PCD的角度研究珠心组织细胞衰亡的工作很少。温沁山、叶秀麟等<sup>[7]</sup>用光学显微镜观察到非洲狼尾草无孢子生殖胚囊发育过程中,从单核胚囊时期开始一直伴随有珠心细

胞死亡。本文报道该植物珠心细胞程序死亡过程中的几个超微结构变化。

## 1 材料和方法

非洲狼尾草 (*Pennisetum squamulatum* Fresen.) 种子由美国农业部农业服务中心海岸平原实验站提供, 种植于中国科学院华南植物研究所实验田内。

取出子房, 将其顶部切去以利固定。置入 2% 戊二醛 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH6.8) 于室温下 12 h。冲洗后用 1% 锇酸在 4℃ 温度下再固定 12 h。梯度酒精脱水后, 包埋在 Epon-812 中。用玻璃刀做超薄切片 (厚度 80 μm), 铜网收集, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染, JEM-1010 透射电镜观察并照相。

## 2 观察结果

从无孢子生殖胚囊单核时期开始, 各个时期胚珠中都有珠心细胞死亡现象。在死亡过程中, 细胞核最明显的变化表现在两个方面。第一, 染色质高度凝集。染色质本来是分散在核基质中的 (图版 I: 1, 2), 但随着细胞死亡过程进行, 染色质发生汇聚、凝集, 核基质与染色质之间界限变得明显 (图版 I: 3)。随着死亡过程加深, 染色质进一步凝集, 核基质减少 (图版 I: 4)。第二, 细胞核的核周腔膨大, 在膨大的部分, 核膜的内膜向核周腔内突起, 突起中包着核基质 (图版 I: 5, 6)。膨大的核周腔内含物在不同细胞中有一定区别, 有时较稀 (图版 I: 5), 有时较浓 (图版 I: 6)。

在细胞死亡过程中, 内质网有一种比较明显的变化: 内质网槽库膨大, 衍生出较大的囊泡结构 (图版 II: 7-9), 这种结构的外表面附着核糖体颗粒, 内部有大量小泡, 小泡中包着较浓密的内含物, 其密度比细胞质部分大, 内含物中及小泡界膜内表面有大量核糖体颗粒 (图版 II: 9)。在变形、凝聚的细胞质残迹中可观察到一种囊泡结构, 这一种结构相互交联, 分割、包围细胞质, 但不含小泡, 据其表面有核糖体可判断也是由内质网所衍生 (图版 II: 10, 11)。

在进入衰亡过程的细胞内, 线粒体的一种变化方式为: 内嵴减少或消失 (图版 II: 8, 11)。这种结构简化的线粒体与分化早期细胞中的线粒体有十分明显的差别, 早期细胞中的线粒体有发达的内嵴 (图版 II: 12)。

## 3 讨论

处于 PCD 过程的非洲狼尾草珠心细胞的染色质高度凝集。这一现象在动物细胞 PCD 过程中是普遍的。根据生物医学中有关动物细胞程序死亡的大量研究, 一般 PCD 过程中出现一系列生物化学变化, 其结果是细胞核 DNA 断裂成寡聚核苷酸片断、染色质浓缩、胞泡形成, 最后形成凋亡小体而被体内其他细胞吞噬<sup>[1]</sup>。而在植物细胞中, 由于有关 PCD 过程的研究很少, 还不知道染色质方面的这一变化是否为普遍现象。这一现象在杜仲次生木质部导管分子<sup>[6]</sup>、小麦珠心细胞<sup>[3]</sup> PCD 过程中都十分明显。

非洲狼尾草珠心细胞 PCD 过程中, 细胞核的核周腔 (核膜的内外膜间隙) 膨大, 膨大的核周腔中有包裹核物质的内膜突起 (图 1)。类似的现象也曾在杜仲<sup>[6]</sup>次生木质部导管分子 PCD 过程中观察到 (图 2)。小麦珠心细胞<sup>[3]</sup> PCD 过程中, 核周腔膨大呈袋状, 里面有很多自噬小

泡,根据自噬小泡界膜的内表面排列一层核糖体颗粒分析,小泡是由核膜的外膜吞噬细胞质组分而产生的(图3),认为核周腔膨大后形成一种消化细胞质的结构。杜仲程序死亡的次生木质部导管分子中以及非洲狼尾草衰亡珠心细胞中,核周腔膨大可能与核基质的消化有关。



图1 非洲狼尾草衰亡珠心细胞的膨大核周腔轮廓。核膜的内膜向核周腔突起。

Fig. 1 Sketch of a swollen perinuclear cisterna in a nucellar cell in *Pennisetum squamulatum*

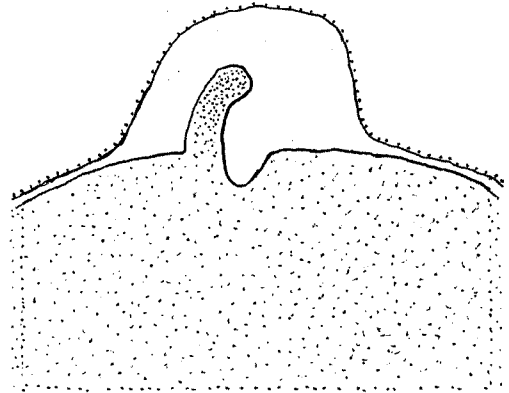


图2 杜仲分化过程中次生木质部导管分子的膨大核周腔轮廓。核膜的内膜向核周腔内突起。(描绘自王雅清等图片<sup>[6]</sup>)

Fig. 2 Sketch of a swollen perinuclear cisterna in a differentiating vessel member in *Eucommia ulmoides* (From Wang Yaqing et al.<sup>[6]</sup>)

根据电镜图像分析,处于PCD过程中的非洲狼尾草珠心细胞内,内质网槽库膨大,膨大的空间中有大量小泡或小球体,依据小泡界膜内表面有核糖体颗粒判断,它们是通过囊膜内陷吞噬细胞质而产生的(图4)。程序死亡的小麦珠心细胞<sup>[3]</sup>、杜仲次生木质部导管分子<sup>[6]</sup>、棉花珠心细胞<sup>[9]</sup>中,内质网也形成这种结构。Santos<sup>[9]</sup>对一些双子叶植物绒毡层的衰退过程研究指出,粗糙内质网呈现出一种膨大槽库的复杂系统,引起绒毡层细胞完全解体。我们认为,处于PCD过程中的非洲狼尾草珠心细胞内,内质网通过槽库膨大形成一种消化结构,不断吞噬细胞质,是引起细胞自溶的一种重要机制。因而,观察到内质网发生这一变化时,应考虑这一细胞是否已经处于自杀过程中。

非洲狼尾草幼期珠心细胞的线粒体有多数内嵴,而衰亡中的珠心细胞的线粒体内嵴明显减少甚至消失。类似的情况在其他植物细胞中也曾观察到。小麦<sup>[3]</sup>珠心细胞衰亡时,线粒体结构变形,虽然双层界膜存在,但内嵴消失或极少,基质内仅存在少量核糖体颗粒。杜仲<sup>[6]</sup>次生木质部导管分子分化初期,线粒体结构清晰,内外膜完整,线粒体以两种方式发生破坏性变化,一种是线粒体皱缩变形,内部结构紊乱,嵴极不清晰,基质浓缩;另一种为线粒体拉长,产生缢缩,出现一些电子密度低的透明区,进而从透明区处裂开。上述情况值得注意,它可能意味着植物细胞PCD与线粒体之间有密切相关性。已经证实动物细胞的死亡程序是由核基因和线粒体基因共同编制的;线粒体的功能除在于产生ATP(adenosine triphosphate,腺苷三磷酸)外,还在于产生活性氧和诱导PCD发生的物质。线粒体膜上存在着许多由不同蛋白质组成的透性可转变孔(permeability transition pore, PTP), Bcl-2(一种抗凋亡蛋白)抑制PTP的开放,从而抑制

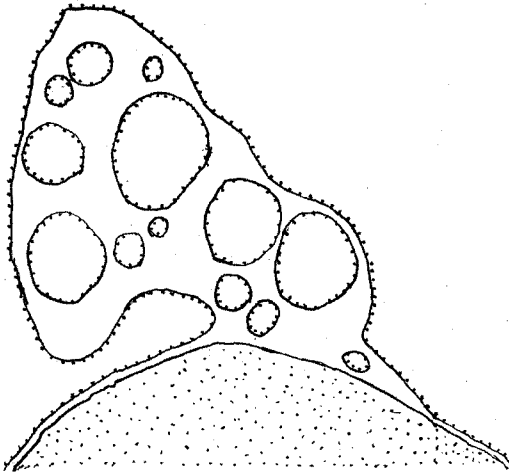


图 3 小麦衰退珠心细胞的膨大核周腔轮廓。注意外核膜和自噬泡界膜上核糖体颗粒的排列。(引自尤瑞麟<sup>[3]</sup>)

Fig. 3 Sketch of a swollen perinuclear cisterna in a degenerating nucellar cell in *Triticum aestivum*. Note the arrangement of the ribosomes on outer membrane of nuclear envelope and on inner surface of limiting membranes of autophagosomes. (From You Ruilin<sup>[3]</sup>)

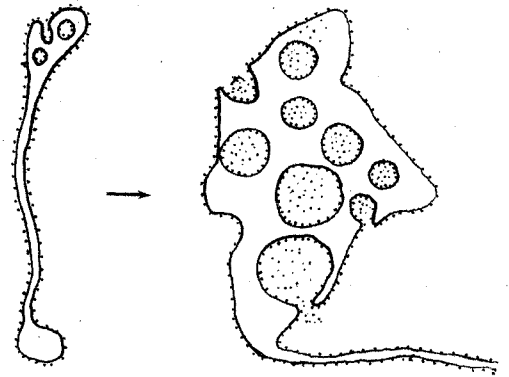


图 4 非洲狼尾草衰退珠心细胞中的内质网膨大、吞噬细胞质形成自噬泡。

Fig. 4 Dilating cisterna of rough endoplasmic reticulum in degenerating nucellar cell in *Pennisetum squamulatum* and autophagosomes present in the dilated space

PCD 因子的释放, 达到阻止 PCD 发生的效果, 而另外一些因子, 如 Bax (proapoptotic protein, 哺乳动物细胞的一种致死蛋白), 则能促进 PTP 开放, 导致 Cyto C (cytochrome C, 细胞色素 C) 的释放。释放到细胞质中的 Cyto C 与 Apaf-1 (apoptosis protease activating factor) 结合, 在 ATP 存在的条件下再与 Caspase 9 (caspase, 具有在天门冬氨酸后进行酶切特性的半胱氨酸蛋白酶) 前体结合而激活 Caspase 9。活化的 Caspase 9 激发 Caspase 的级联反应, 从而使细胞发生 PCD。如果 PCD 诱导因子导致渗透压发生明显变化, 引起线粒体内部间隙扩大, 乃至整个线粒体出现肿胀而使外膜破裂, 造成 Cyto C 大量外逸, 直接影响线粒体呼吸链的电子传递和能量代谢, ATP 产量显著减少, 并且氧自由基大量产生, 最终使细胞发生慢性坏死<sup>[10]</sup>。如果细胞内  $Ca^{2+}$  增多, 打开了  $Ca^{2+}$  通道, 也会启动 PCD, 因为  $Ca^{2+}$  可诱导线粒体 PTP 的开放<sup>[11]</sup>。近来对植物材料的研究表明, Bcl-xL (一种抗凋亡蛋白) 和 Ced-9 (*Caenorhabditis elegans* death gene product, inhibiting death, 一种抑制 *Caenorhabditis elegans* 死亡的基因产物) 也能抑制植物细胞的 PCD<sup>[12]</sup>, 但是否也抑制 PTP 的开放尚待证实。试验已经证明,  $Ca^{2+}$  通道的打开是启动管状分子分化中 PCD 的关键步骤<sup>[13]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 崔克明. 植物细胞程序死亡的机理及其与发育的关系 [J]. 植物学通报, 2000, 17(2):97-107.
- [2] 崔克明. 植物细胞分化的启动控制和分化过程的阶段性 [J]. 生命科学, 1997, 9(2):49-54.
- [3] 尤瑞麟. 小麦珠心细胞衰退过程的超微结构研究 [J]. 植物学报, 1985, 27(4):345-353.
- [4] Bleeker A B, Patterson M A. Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1997, 9:1169-1179.

- [5] Wang H, Li J, Bostock R H, et al. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development [J]. *The Plant Cell*, 1996, 8:375-391.
- [6] 王雅清, 崔克明, 杜仲次生木质部导管分子分化中的程序性死亡 [J]. *植物学报*, 1998, 40(12):1102-1107.
- [7] 温沁山, 叶秀麟, 黎垣庆, 等. 非洲狼尾草无融合生殖胚胎学研究 [J]. *植物学报*, 1998, 40(7):598-604.
- [8] Jensen W A. The composition and ultrastructure of the nucellus in cotton [J]. *J Ultrastruct Res*, 1965, 13:112-128.
- [9] Santos A, Abreu I, Salema R. Elaborate system of RER and degeneration of tapetum during pollen development in some dicotyledons [J]. *J Submicr Cytol*, 1979, 11:99-107.
- [10] Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulation in apoptosis and necrosis [J]. *Annu Rev Physiol*, 1998, 60:619-642.
- [11] McConkey D J, Orrenius S. Calcium and cyclosporin in the regulation of apoptosis [A]. In: Kroemer G, Martinz C. *Apoptosis in Immunology* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1995, 95-105.
- [12] Mitsuahara I, Malik M A, Ohashi Y et al. Animal cell-death suppressors Bcl-xL and Ced-9 inhibit cell death in tobacco [J]. *Current Biol*, 1999, 9:775-778.
- [13] Groover A, Jones A M. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119:375-384.

## 图版说明

CH: 染色质; ER: 内质网; EV: 内质网膨大产生的小泡; M: 线粒体; N: 核; NC: 膨大的核周腔; VE: 小泡

### 图版 I

1. 示一个珠心细胞的细胞核, 染色质分散在核基质中;  $\times 4\ 500$
2. 示不同状态的细胞核。A. 细胞核中染色质分散, 核基质密度不均匀; B. 细胞核的基质密度均匀; C. 染色质凝集;  $\times 3\ 900$
3. 上图标 C 的细胞核部分放大;  $\times 13\ 500$
4. 示高度凝集的染色质;  $\times 13\ 400$
5. 示核周腔膨大, 注意核膜内膜向核周腔中陷入(箭号), 里面包括着电子染色很深的物质;  $\times 12\ 000$
6. 示核周腔膨大, 注意核膜内膜向核周腔中陷入(箭号)。  $\times 22\ 400$

### 图版 II

7. 示内质网槽库膨大(箭号), 膨大的空间中有内含物很浓的小泡;  $\times 6\ 400$
8. 图 7 部分放大, 示内质网正在膨大(箭号)和膨大所衍生的结构, 注意线粒体内嵴消失;  $\times 26\ 400$
9. 示内质网槽库膨大所衍生的结构及其所包含的小泡, 小泡中及其界膜内表面有核糖体颗粒;  $\times 39\ 000$
10. 示退化得只余下少量细胞质的细胞, 注意小泡结构(箭号);  $\times 7\ 200$
11. 图 10 部分放大, 小泡结构外表面有核糖体颗粒(箭号);  $\times 22\ 000$
12. 分化早期的珠心细胞, 线粒体有发达的内嵴。  $\times 28\ 800$

## Explanation of plates

CH, chromatin; ER, endoplasmic reticulum; EV, vesicle-like structure by enlarging of endoplasmic reticulum; M, mitochondrion; N, nucleus; NC, swollen perinuclear cisterna; VE, vesicle.

### Plate I

1. Showing the nucleus of a nucellar cell, chromatin dispersed throughout the matrix;  $\times 4\ 500$
2. Showing nuclei. The nucleus marked with A having matrix of inhomogeneous density, that marked with B having matrix of homogeneous density, and that with C revealing condensation of chromatin and having matrix of homogeneous density;  $\times 3\ 900$
3. Enlarged view of a portion of the nucleus marked with C in Fig. 2;  $\times 13\ 500$
4. Showing condensation of chromatin;  $\times 13\ 400$

5. Showing dilation of nuclear envelope. The inner membrane of nuclear envelope protrudes into dilated space (arrow);  
×12 000

6. Showing dilation of nuclear envelope. The inner membrane of nuclear envelope protrudes into dilated space (arrow).  
× 22 400

Plate II

7. Cisternae of ER dilating (arrows) and forming complicated structures. Vesicles appearing in the structure; ×6 400

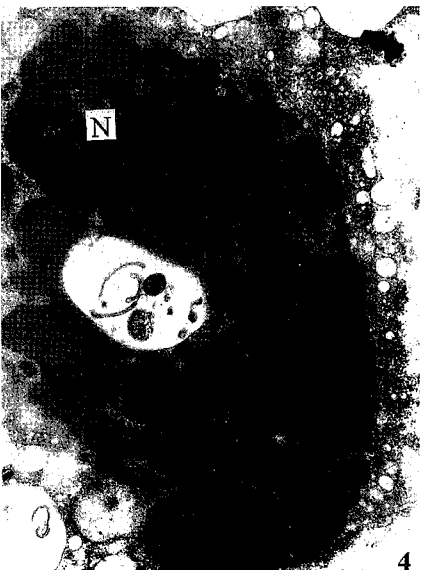
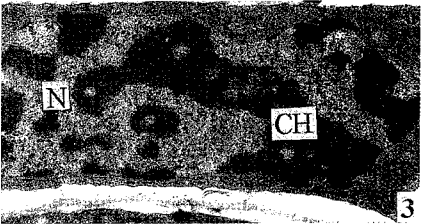
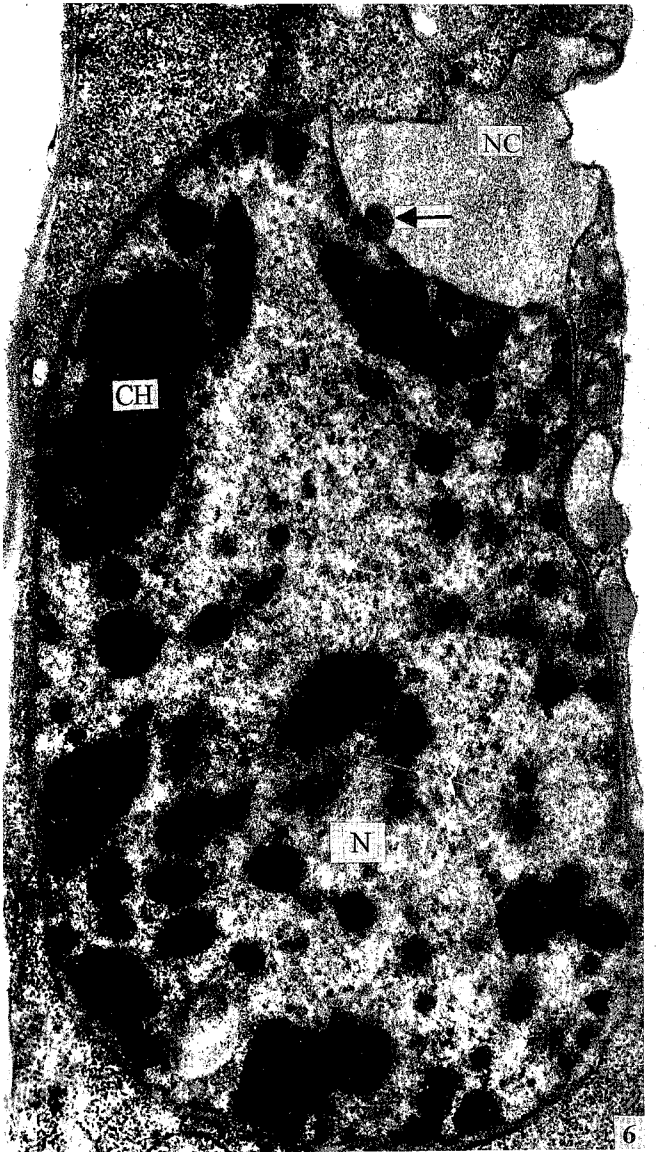
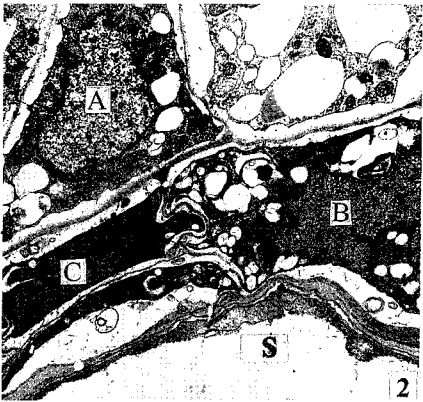
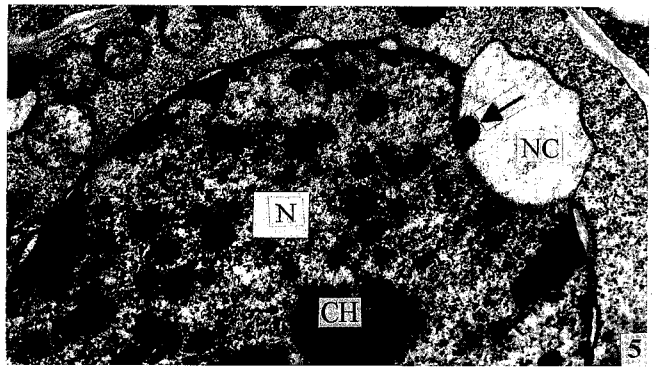
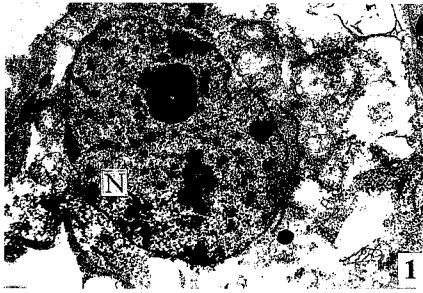
8. Enlarged view of a portion of Fig. 7. Cisternae of ER dilating (arrow). A lot of vesicles present in ER-derived vesicular structure. Cristae disappear in the mitochondrion; ×26 400

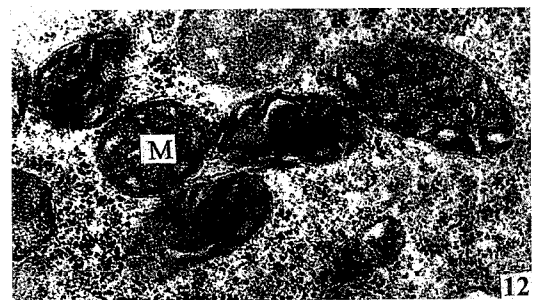
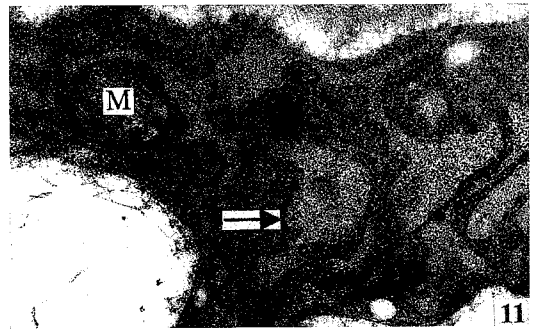
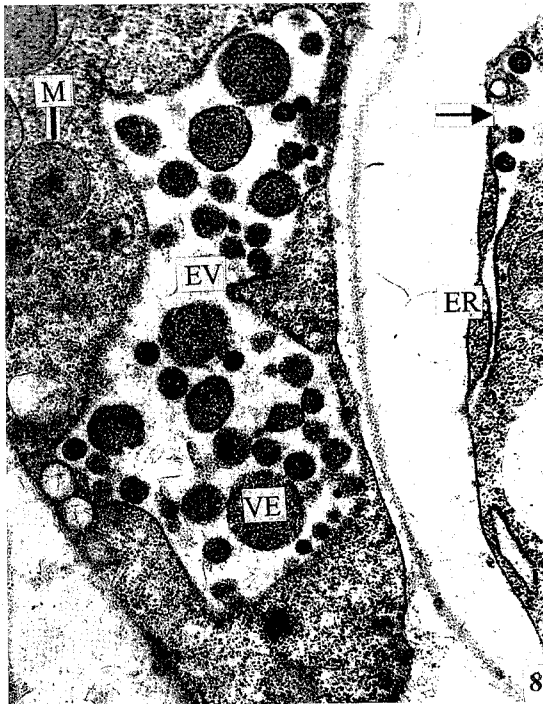
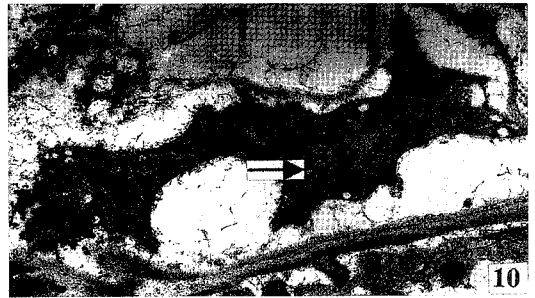
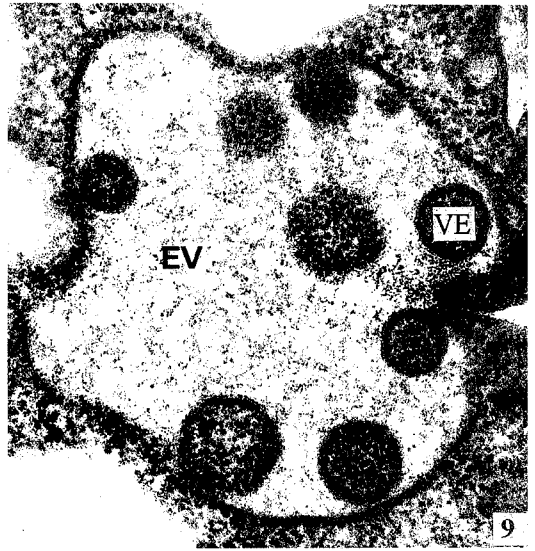
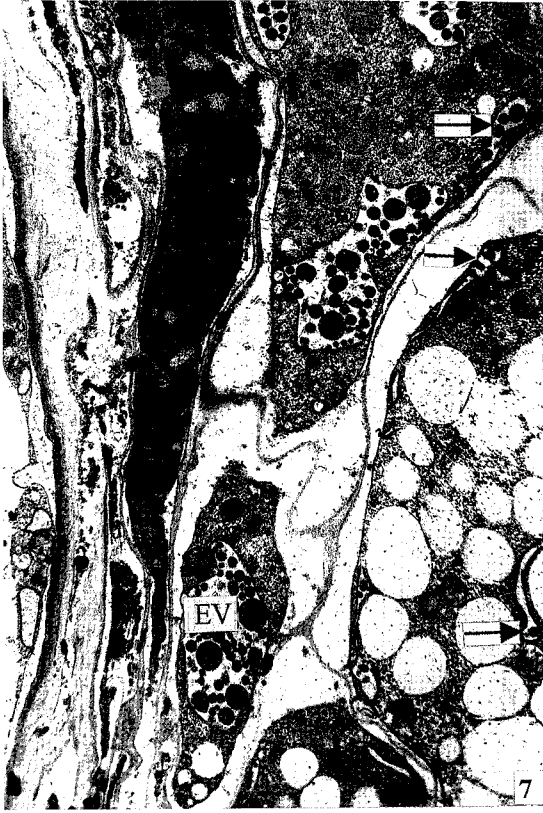
9. Showing the ER-derived vesicular structure and vesicles in it. Note the ribosomes on the outer surface of the structure and on the inner surface of the small vesicles; ×39 000

10. Showing the remnant of a cell. Note the vesicles (arrow); ×7 200

11. Enlarged view of a portion of Fig. 10, showing vesicles with ribosomes on their surfaces (arrow); × 22 000

12. Showing mitochondria with a lot of cristae in young cell. ×28 800





See explanation at the end of text