

TFP 促进粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 细胞增殖机理的探讨*

陈一楠** 陆玲 张超英 袁生
(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘要 采用激光扫描共聚焦显微镜观察的方法,以 Fluo-3 负载 *Schizosaccharomyces pombe* 细胞,荧光强度反映胞质游离 Ca^{2+} 浓度,结果表明,在无钙培养基中生长的 *S. pombe* 胞内游离 Ca^{2+} 浓度低于在含 $10\mu\text{mol/L}$ 外钙培养基中的 *S. pombe* 细胞,而一定浓度三氟拉嗪(TFP)处理过的 *S. pombe* 胞内游离钙浓度则有明显增加;用与 TFP 在对酵母质膜 ATPase 活性有拮抗效应的无机硫酸盐处理 *S. pombe* 细胞,发现可抑制其增殖,通过原子吸收光谱法测得胞内游离钙含量降低,因此认为 TFP 通过作用于质膜、促进 Ca^{2+} 内流刺激裂殖酵母细胞的增殖。

关键词: 三氟拉嗪(TFP) Ca^{2+} fluo-3 激光共聚焦显微镜 粟酒裂殖酵母

三氟拉嗪(Trifluoperazine, TFP)等吩噻嗪类试剂是一类抗精神病药,具有抑制许多依赖于钙调素(CaM)调节功能的作用,同时它还能引起真核细胞的许多不依赖于 CaM 的细胞膜效应^[1]。Eilam 和 Chernenichovsky^[2]在研究酵母细胞质膜 Ca^{2+} 转运系统时发现 $20\mu\text{mol/L}$ TFP 可提高酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞的质膜电位,使细胞周期终止在 $G_2 + M$ 期。本实验室^[3]曾首次发现 TFP 对于 *S. pombe* 细胞的增殖具有低浓度促进、高浓度抑制的双重效应。Eilam^[4]等人认为,TFP 及其他吩噻嗪类化合物对酵母细胞具有以下影响:(1)可抑制分离出来的膜制备物上的 H^+ -ATP 酶;(2)通过激活某种 K^+ 泵出机制,诱导 K^+ 外流;(3) K^+ 外流引起膜超极化;(4)膜电位升高驱使 Ca^{2+} 内流增加。那么,低浓度的 TFP 对 *S. pombe* 的促进作用是否会通过促进 Ca^{2+} 内流,进一步刺激 *S. pombe* 细胞增殖?为了验证这一设想,本实验室曾采用原子吸收光谱的方法,发现低浓度 TFP 处理过的裂殖酵母胞内游离钙含量的确有所上升。但是,原子吸收光谱法只是从数量上证明了裂殖酵母胞内钙量的增加,而没有表现出胞内钙离子分布及浓度的时空变化。因此,我们运用激光扫描共聚焦显微镜观察的手段,以进一步研究 TFP 与 Ca^{2+} 内流之间的关系。

材料与方 法

1. 试剂

TFP, Fluo-3, Tris 购自 Sigma 公司, Mes[2-(N-吗啡啉)乙磺酸]为 Serva 产品,其余为国产分析纯。

2. 细胞培养

裂殖酵母(AKU4220)购自中国普通微生物菌种保藏中心。斜面固体采用 YEPD 培养基, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏保存。实验前将斜面菌种首先接种于 YEPD 液体培养基中进行活化, $29\text{ }^\circ\text{C}$, 200 rpm, 震荡培养至指数期,取菌液进行离心,用无菌双蒸水洗三遍,显微镜计数法计数,定量接种于 EMM 液体培养基中培养。起始细胞接种浓度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 。

3. 细胞密度的测定

采用 Brock 等人的分光光度法^[5],于 595nm 波长处,用 722 型分光光度计测定 OD 值,以 OD 值表示细胞生长量的相对大小。

4. Ca^{2+} 荧光染料对细胞的负载^[6,7]

对 *S. pombe* 负载 Fluo-3 染料。取细胞悬液于 Eppendorf 管中,双蒸水洗 3 遍,然后细胞以 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 的密度重悬在双蒸水中,加入 Fluo-3 令终浓度为 $10\mu\text{mol/L}$,取

本文 2002 年 10 月 17 日收到,2003 年 7 月 11 日接受。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30170474)。

** 通讯作者。E-mail: chenyanan@hotmail.com

0.4ml细胞悬液进行电穿孔(Gene Pulser II, Bio-Rad),每15ms一个脉冲,共3-4次,电压500V,电容250 μ F,电阻800 Ω 。电穿孔后,迅速将细胞悬液离心,双蒸水洗3次后重新加入1ml新鲜培养液,于30 $^{\circ}$ C下保温30min。

5. 激光扫描共聚焦显微镜观察细胞内游离Ca²⁺分布及相对浓度^[6,8]

将负载了Ca²⁺荧光染料Fluo-3的细胞黏附于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,用盖玻片盖住后,四周用指甲油封边,以防止在激光扫描共聚焦显微镜下观察时水分蒸发使细胞失活。将载玻片置于激光扫描共聚焦显微镜(MRC-1024, Bio-Rad,物镜 \times 60)下观察单个细胞内游离Ca²⁺分布及相对浓度。Fluo-3的激发光波长为488nm,发射光波长为525nm。

6. 细胞内可溶性钙含量测定用缓冲液的配制

首先配制200mmol/L Mes母液,用Tris溶液将缓冲液调成pH6.0,定容时根据Mes的用量稀释10倍备用。细胞内可溶性钙含量测定用缓冲液:20mmol/L Mes-Tris buffer, 10mmol/L 葡萄糖,10 μ mol/L CaCl₂。处理步骤:YEPD培养基中菌体密度生长至 5×10^7 /mL,离心收集,蒸馏水洗3次,重悬,离心,用Mes-Tris缓冲液定容至细胞密度为 5×10^7 /mL,根据不同的处理分别加入葡萄糖、CaCl₂溶液,处理时间以加入CaCl₂开始计时。

7. 细胞内可溶性钙含量测定^[4]

离心收集细胞,用MgCl₂(20mmol/L,2 $^{\circ}$ C)清洗1次,用蒸馏水(2 $^{\circ}$ C)清洗两次,重悬,离心,沉淀用0.75% LaCl₃重

悬,置沸水中煮10min,使Ca²⁺从细胞内释放,离心弃去沉淀,测定上清液中Ca²⁺浓度。试验每次两个平行管,重复两次计算平均值。仪器为Z-8100 Polarized Zeeman型原子吸收光谱仪。

结 果

1. TFP对*S. pombe*胞内Ca²⁺含量及分布的影响

将活化的*S. pombe*菌种分别接入EMM-Ca和外加10 μ mol/L Ca²⁺的EMM培养基中,培养至对数期。避光同时加入50 μ mol/L TFP和10mmol/L CaCl₂并开始计时,30min后以Fluo-3负载裂殖酵母细胞,洗去TFP以防止TFP的自发荧光对荧光染料的染色结果产生干扰;荧光强度反映胞质游离Ca²⁺浓度,激光扫描共聚焦显微镜下观察。可以看到,经TFP处理过的*S. pombe*细胞内荧光强度最高,而在有10 μ mol/L外Ca²⁺培养基中的酵母细胞荧光强度明显弱于TFP处理过的细胞,但高于缺Ca²⁺培养基中生长的细胞(图1)。这一结果一方面表明,TFP处理后胞内游离Ca²⁺浓度有所升高;另一方面,有外Ca²⁺及无Ca²⁺培养基中生长的*S. pombe*,胞质内游离Ca²⁺的浓度及分布均有差别。

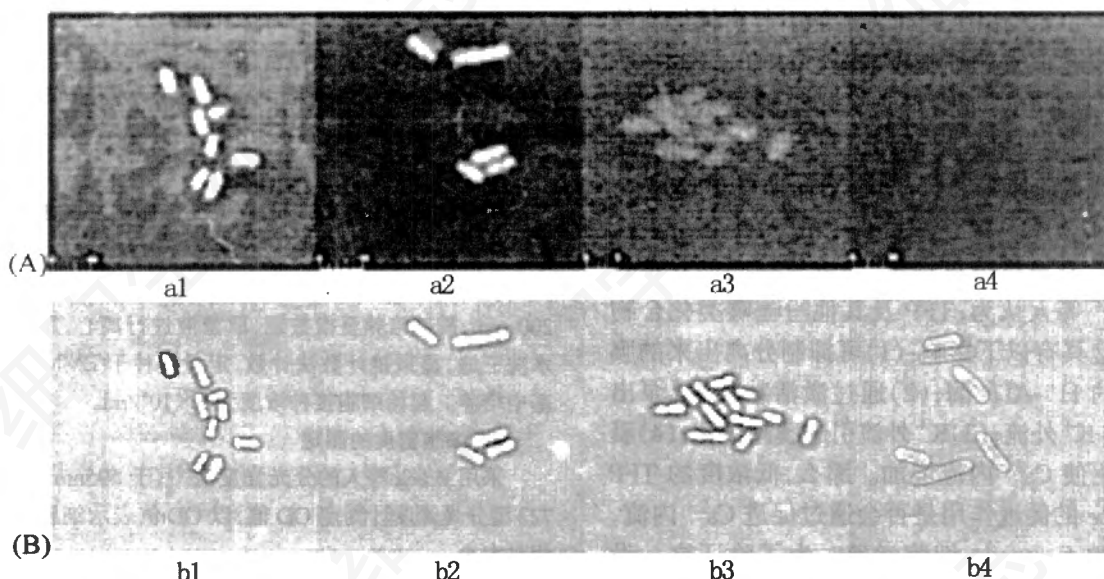


图1 激光扫描共聚焦显微镜下*S. pombe*细胞内游离Ca²⁺分布图像(A)及相应透射图像(B)

a1和b1 50 μ mol/LTFP处理后的菌体; a2和b2含10 μ mol/L外钙培养基中生长的菌体; a3和b3 EMM-Ca培养基中生长的菌体; a4和b4未负载fluo-3细胞的自发荧光。

2. 激光扫描共聚焦显微镜对TFP引起*S. pombe*胞内游离Ca²⁺变化的定量分析

在激光扫描共聚焦显微镜下观察经Fluo-3负载的细胞内游离Ca²⁺的相对浓度,选取了几个区域

进行测定,其中系列1为背景,系列2-6为酵母细胞的不同胞质区。实验本底的相对荧光强度值低于10,经TFP处理的裂殖酵母细胞内的荧光强度相对最高,最低值为 157.82 ± 6.00 ,最高值为 $212.74 \pm$

6.25(图2和表1);而生长在含 $10\mu\text{mol/LCa}^{2+}$ 培养基中的 *S. pombe* 细胞胞质内荧光较弱,相对强度值在 36.13 ± 2.94 和 77.76 ± 5.20 之间;缺 Ca^{2+} 培养基中生长的 *S. pombe* 细胞胞质内荧光则最弱,其相

对强度值为 $4.66\pm 1.47 - 29.16\pm 4.41$ 。可见,TFP处理过的 *S. pombe* 细胞胞质内 Ca^{2+} 相对浓度远远高于未经TFP处理的细胞。

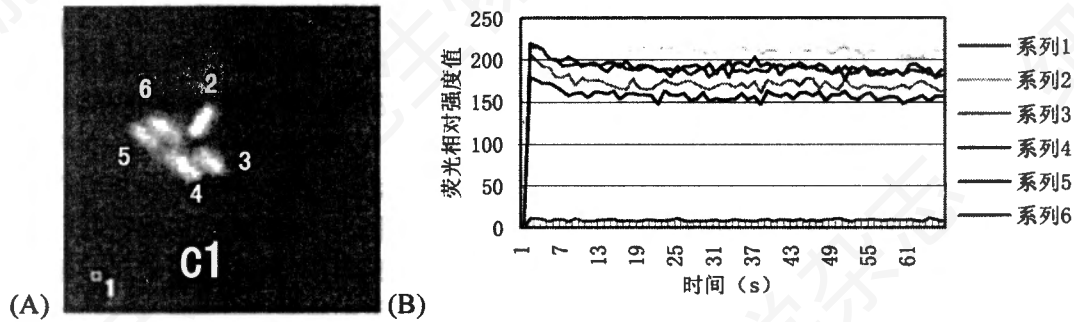


图2 50 $\mu\text{mol/L}$ TFP处理后的 *S. pombe* 细胞胞质内荧光相对强度

图中6条纪录曲线分别对应于背景及胞质内5个不同区域(具体数值见表1。A图为激光扫描共聚焦显微镜下 *S. pombe* 细胞胞质荧光图像;B图为各区域相应的荧光强度分析曲线)。

表1 细胞胞质内荧光相对强度值

系 列	1	2	3	4	5	6
均 值	9.05	212.74	172.03	192.14	157.82	189.47
标准差	1.13	6.25	8.07	7.62	6.00	7.43

3. 质膜 H^+ -ATP酶活性的拮抗剂Tris-硫酸对裂殖酵母细胞增殖和胞内钙含量的影响

根据Goffean和Meis等^[9]报道,10-100mmol/L的无机硫酸盐能刺激从野生型 *S. pombe* 质膜上纯化得到的 H^+ -ATPase活性,而一定浓度TFP能够抑制其活性,也就是说,无机硫酸盐和TFP在对 *S. pombe* 质膜 H^+ -ATPase活性的影响上具有拮抗性。因此我们设计了下列一系列实验,观察其对裂殖酵母的影响来进一步验证低浓度TFP是否通过作用于质膜来促进裂殖酵母的增殖。

(1) 在EMM-Ca培养基中一定浓度Tris-硫酸和TFP对 *S. pombe* 细胞增殖的不同影响 本实验所用EMM合成培养基是按照Nurse^[10]等提供的改良配方配制,不添加任何外源 Ca^{2+} ,进行缺 Ca^{2+} 培养。将 *S. pombe* 转接入EMM-Ca培养基,同时用10、20、50mmol/L Tris-硫酸和 $20\mu\text{mol/L}$ TFP进行处理,通过测定生长曲线,观察其对裂殖酵母生长的影响(图3和图4)。图3表明,低浓度TFP与Tris-硫酸效应相反,在同一条件下 $20\mu\text{mol/L}$ TFP促进了裂殖酵母的增殖,而50mmol/L Tris-硫酸则完全抑制了裂殖酵母的生长。同时图4的生长曲线表明,Tris-硫酸浓度越高,对裂殖酵母生长的抑制作用

就越明显,可见Tris-硫酸对裂殖酵母生长的抑制作用具有浓度效应。

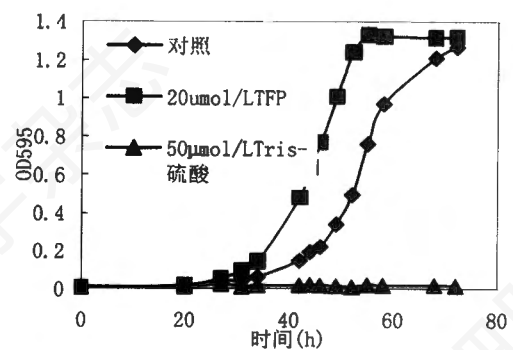


图3 50mmol/L Tris-硫酸和 $20\mu\text{mol/L}$ TFP对 *S. pombe* 细胞增殖的影响

(2) 不同浓度Tris-硫酸处理下 *S. pombe* 胞内游离 Ca^{2+} 的变化 用原子吸收光谱法测定20mmol/L Tris-硫酸处理下 *S. pombe* 胞内游离 Ca^{2+} 含量的变化进程(图5)。15min时, *S. pombe* 胞内游离 Ca^{2+} 的含量开始有所降低;30min时 Ca^{2+} 含量降至最低点;直至60min时,处理组胞内游离 Ca^{2+} 含量仍低于对照组。采用10、20、50mmol/L Tris-硫酸处理 *S. pombe* 细胞,20min后测定胞内游

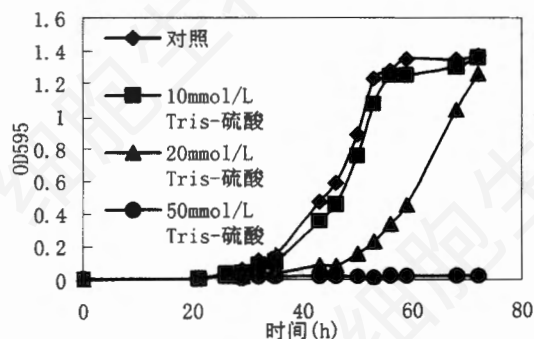


图4 不同浓度 Tris-硫酸对 *S. pombe* 细胞增殖的影响

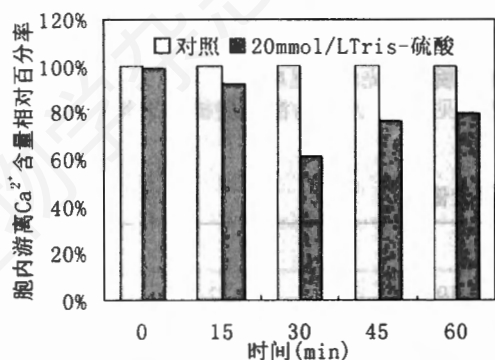


图5 20mmol/L Tris-硫酸处理下 *S. pombe* 胞内游离 Ca^{2+} 的动态变化

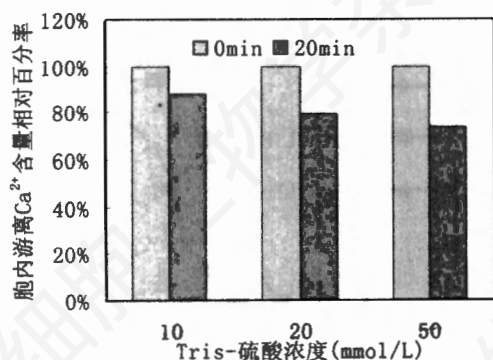


图6 不同浓度 Tris-硫酸处理下 *S. pombe* 胞内游离 Ca^{2+} 的变化

离 Ca^{2+} 含量(图6)。从图中看到, Tris-硫酸处理过的 *S. pombe* 细胞胞内游离 Ca^{2+} 含量有不同程度的下降, 而随着 Tris-硫酸浓度的升高, Ca^{2+} 含量下降的程度似乎也有增加的趋势。

讨 论

本实验室^[11]曾采用原子吸收光谱法分别对含有不同处 Ca^{2+} 浓度培养基中生长的 *S. pombe* 细胞

进行钙含量测定, 发现在一定范围内(0-50mmol/L)胞外 Ca^{2+} 浓度越高, 相应的胞质内 Ca^{2+} 浓度也越高。本实验中激光共聚焦显微镜下观察到的现象也表明, 在无钙培养基中生长的 *S. pombe* 胞内游离 Ca^{2+} 浓度明显低于在含 10 μ mol/L 外钙培养基中生长的 *S. pombe* 细胞(图1、图2)。我们曾证明当外源 Ca^{2+} 浓度在 0-20mmol/L 范围内变动时, 随着 Ca^{2+} 浓度的增大, 细胞增殖速率越快, 因此增加培养基中 Ca^{2+} 浓度能够促进 *S. pombe* 细胞增殖最终是通过引起更多的 Ca^{2+} 内流, 从而增加了胞质内游离 Ca^{2+} 含量, 使酵母细胞内游离 Ca^{2+} 在一定范围内一直维持较高水平, 缩短了受 Ca^{2+} 调控的细胞分裂过程, 促进细胞生长与增殖过程。

本实验的前期工作在证实 Ca^{2+} 可以促进 *S. pombe* 细胞增殖, 缩短细胞增殖代时的同时, 还发现低浓度的 TFP (低于 100 μ mol/L) 可以促进 *S. pombe* 细胞增殖^[3]。原子吸收光谱实验的结果证明, 经 TFP 处理过的 *S. pombe* 细胞胞内游离钙含量有所增加。Eilam^[4]提出吩噻嗪类 CaM 抑制剂除了能抑制 CaM 活性外, 还能影响酿酒酵母细胞膜的特性。他在研究酿酒酵母细胞膜电位与 Ca^{2+} 吸收时, 采用不同浓度的 TFP 处理酿酒酵母细胞, 得到具有不同 $\Delta\psi$ 值的酿酒酵母细胞, 并且发现膜电位操纵着能量缺失的酿酒酵母 Ca^{2+} 流进质膜。Borst-Pauwels 和 Theuvenet^[12]也发现, 酿酒酵母的负表面势的增加, 会引起二价离子 Ca^{2+} 和 Sr^{2+} 的吸收。本实验首次采用激光共聚焦显微镜这一方法得到的结果(图1、图2)不仅从现象上, 而且还通过对荧光强度的定量分析表明了 TFP 通过增加胞质 Ca^{2+} 浓度来刺激 *S. pombe* 细胞增殖。因此可以这样认为, 一定浓度的 TFP 并不是单纯的作为 CaM 抑制剂发挥其功能, 而是可能主要作用于细胞质膜, 通过提高 *S. pombe* 质膜膜电位, 促进 *S. pombe* 胞内总钙瞬时增加, Ca^{2+} 作为胞内第二信使与 Ca^{2+} 受体蛋白结合, 诱发了一系列的生化过程, 加速 *S. pombe* 细胞周期的进程, 从而促进了增殖。

为了进一步研究 TFP 是否主要是通过作用于细胞质膜而发生这一系列生理生化反应, 我们选取了一些能够改变酵母细胞质膜膜势的药物, 观察其对 *S. pombe* 细胞增殖的影响, 并通过原子吸收光谱等方法测定胞质 Ca^{2+} 含量的相应变化。Goffean 和 Meis^[9]发现, 10-100mmol/L 的无机磷酸盐和硫酸盐能刺激从野生型 *S. pombe* 质膜上纯化得到的 H^{+} -ATPase 活性, 而 10-40 μ mol/L TFP 能够抑制

其活性,也就是说,无机硫酸盐和 TFP 在对 *S. pombe* 质膜 H^+ -ATPase 活性的影响上具有拮抗性。而且通过实验我们发现,无机硫酸盐能够抑制 *S. pombe* 细胞增殖,这与低浓度 TFP 对 *S. pombe* 细胞增殖的影响效应正好相反。而通过原子吸收光谱法测定无机硫酸盐处理后胞内可溶性钙含量的结果表明,20mmol/L Tris-硫酸处理下 60min 内 *S. pombe* 胞内游离 Ca^{2+} 含量及 10、20、50mmol/L Tris-硫酸处理 20min 后胞内游离 Ca^{2+} 含量均有所下降。我们推断,Tris-硫酸可能是通过刺激质膜上的 H^+ -ATPase 活性增加了 H^+ 运输,改变了细胞质膜的膜电位,抑制了质膜上的 Ca^{2+} 流,使胞内游离 Ca^{2+} 浓度下降,从而达到抑制细胞增殖的作用。这一研究结果在说明 Tris-硫酸处理能抑制裂殖酵母细胞增殖的同时,又发现其对胞内钙含量的影响与 TFP 正好相反,这提供了一个间接的证据,表明 TFP 可能是通过改变质膜特性,影响钙流,从而促进粟酒裂殖酵母的增殖。

参 考 文 献

- [1] Eilam, Y., H. Lavi and N. Grossowicz, 1985, *J. Gene. Microbiol.*, **131**:2555 - 2564.
- [2] Eilam, Y. and D. Chernichovsky, 1987, *J. Gene. Microbiol.*, **133**:1641 - 1649.
- [3] 陆玲等,2000,实验生物学报,**33**(2):142 - 146.
- [4] Eilam, Y., 1983, *Biochim. Biophys. Acta*, **733**:242 - 248.
- [5] Brock T D, Madigan M T, Martinko J M., 1994, *Biology of Microorganisms*, 7th edition, Prentice-all, pp. 321 - 360, Inc. Engleod Cliffs, New Jersey.
- [6] Iida H., Yagawa Y and Anraku Y., 1990, *J. Biol. Chem.*, **265**:13391 - 13399.
- [7] Ohya Y, Umemoto N, Tanida I, 1991, *J Bio Chem.*, **266**:13971 - 13977.
- [8] McCormack J. G. and P. H. Cobbold(ed), 1991, *Cellular Calcium*(ed), pp. 24 - 30, 55 - 57, 134 - 157, 205 - 230, Oxford University Press.
- [9] Andre Goffean and Leopoldv de Meis, 1990, *The Journal of Biological Chemistry*, **265**:15503 - 15505.
- [10] Moreno, S., A. Klar and P. Nurse, 1991, *Methods in enzymology*, Vol. **194**, pp. 800 - 801, Academic Press Inc., San Diego.
- [11] 陆玲等,2000,菌物系统,**19**(1):97 - 101.
- [12] Borst-Pauwels G W F H and Theuvenet A P R, 1984, *Biochim Biophys Acta*, **771**:171 - 176.

THE STUDY ON TFP STIMULATING PROLIFERATION OF *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE* *

CHEN Yi Nan** LU Ling ZHANG Chao Ying YUAN Sheng
(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, China 210097)

ABSTRACT *Schizosaccharomyces pombe* cells loaded with Fluo-3 were observed under laser scanning confocal microscope (LSCM). The result showed that the cytosolic free Ca^{2+} concentration in *S. pombe* cells cultured in Ca^{2+} -free medium was lower than cells cultured in medium containing $10\mu\text{mol/L } Ca^{2+}$, while Ca^{2+} concentration in cells treated with $50\mu\text{mol/L TFP}$ increased apparently. We also found that inorganic sulfate which arrested the growth of *S. pombe* decreased the cytosolic free Ca^{2+} concentration. Therefore, we conclude that TFP promotes the proliferation of *S. pombe* cell by stimulating Ca^{2+} influx.

Key words: Trifluoperazine Calcium fluo-3 LSCM *Schizosaccharomyces pombe*

* National natural science foundation of China(30170474).

** Corresponding author. E-mail: chenyanan@hotmail.com