

碳纳米管对植物细胞影响的细胞生物学分析

专业：植物学

硕士生：申聪香

指导教师：姚楠 教授

摘要

碳纳米管 (Carbon Nanotubes, CNTs) 是一种具有独特结构和物理性质的新型纳米材料。近年来随着研究的不断深入, 其广阔的应用前景特别是在生物医药上的潜在优势开始展现, 同时该类材料对生态环境、人类健康的影响日前也逐渐引起科学家的注意。在农业生产中, 纳米技术在增强植物吸收养分能力, 增加农药和除草剂的功效, 降低农药和除草剂的剂量等方面有着可观的应用前景。然而当前纳米材料对植物影响的研究几乎还是空白。探讨纳米材料对植物及其环境的影响, 正确评估碳纳米管的生物学效应, 是具有重要意义的前瞻性研究。本文利用拟南芥和水稻原生质体系统, 结合光镜、电子显微镜观察, 以及 EM-TUNEL、RT-PCR 等检测手段, 从多方面探讨了单壁碳纳米管 (Single-walled carbon nanotubes, SWCNTs) 对植物细胞的影响。

我们用 SWCNTs 处理原生质体和植物组织后, 检测了细胞活性、形态变化、DNA 损伤、活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 产生和相关基因表达。结果表明, SWCNTs 在一定程度上能影响原生质体的活性, 并且这种影响呈现浓度依赖性关系, 但和处理时间关系不大。此外, 单壁碳纳米管还能引起原生质体聚集、植株叶肉细胞染色质凝缩、TUNEL 的阳性反应和 H_2O_2 积累。我们发现 SWCNTs 处理后叶肉细胞细胞壁和细胞膜上有氯化铯的沉积和类似内吞的膜结构, 提出了碳纳米管穿过细胞膜的可能途径。本研究说明, 尽管碳纳米管具有许多特异的性质, 但是在农业生产上应用时要对其毒性作出充分的评价。

关键词: 拟南芥, 纳米材料, 原生质体, 水稻, 单壁碳纳米管

Cell biology analysis of effects of carbon nanotubes on plant cells

Major: Botany

Name: Congxiang Shen

Supervisor: Prof. Nan Yao

ABSTRACT

As new members of nanomaterial family, carbon nanotubes (CNTs) have many unique structural and mechanical properties, their potential applications especially in biomedicine have increasing in recent years. The effects of CNTs on the ecological environment and human health are also gradually caused the scientist's attention. In the agricultural production, nanotechnology has a considerable application prospect in enhancing the ability of plants to absorb nutrients, increasing the efficiency of pesticides and herbicides, allowing lower doses to be used etc. However, the toxicological impact of nanoparticles has rarely been studied in plants. It is an important prospective research to study the effects of nanomaterial on plants and environment, and evaluate carbon nanotubes biocompatibility exactly. Using a protoplast system from *Arabidopsis* or rice leaves, combined with light microscope, electron microscope, EM-TUNEL and RT-PCR, we tested for the effects of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) on plant cells from many aspects.

We exposed leaf protoplast cells and plant tissues to SWCNTs and examined cell viability, cell morphology, DNA damage, reactive oxygen species (ROS) generation and molecular signaling alterations. We found that the effect of SWCNTs on the survival of cells was dose dependent, but not time dependent. We also found SWCNTs can cause adverse cellular responses including cell aggregation, chromatin condensation with a

TUNEL-positive reaction, plasma membrane deposition, and H₂O₂ accumulation. Moreover, we found endocytosis-like structure with cerium chloride deposits after SWCNT treatment, suggesting a possible pathway for nanoparticles to traverse the cell membrane. Consequently, although nanomaterials have great advantages in many respects, their cytotoxicity needs to be evaluated when they are used in the agricultural production.

KeyWords: *Arabidopsis*, Nanoparticles, protoplasts, rice, single-walled carbon nanotubes (SWCNTs)

缩略词

简称	英文全称	中文全称
AC	Activated carbon	活性碳
CM-H ₂ DCFDA	5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester	氯甲基二氯二氢荧光素二乙酯
DAPI	4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride	4',6-联脒-2-苯基吲哚二盐酸盐
EM	Electron microscope	电子显微镜
FDA	Fluorescein diacetate	荧光素二乙酸酯
GA	Glutaraldehyde	戊二醛
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid	3-(N-吗啡啉)-2-羟基丙磺酸
PCD	Programmed cell death	程序性细胞死亡
PFA	Paraformaldehyde	多聚甲醛
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
SWCNTs	Single-walled carbon nanotubes	单壁碳纳米管
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end-labelling	脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记

论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：申聪香

日期：2010年6月7日

学位论文使用授权声明

本人完全了解中山大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆、院系资料室被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，可以采用复印、缩印或其他方法保存学位论文。

保密论文保密期满后，适用本声明。

学位论文作者签名：申聪香

日期：2010年6月7日

导师签名：姚树南

日期：2010年6月7日

第一章 前言

1.1 纳米材料概述

纳米材料是近年来科学上的一项重大发现,已经成为当今许多学科研究的热点。纳米材料是一种介于分子和宏观常规材料之间的介观态材料,是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围(1-100 nm)或由它们作为基本单元构成的材料^[1],包括纳米颗粒(nanoparticles)、纳米纤维(nanofibers)、纳米管(nanotubes)、复合材料(composite materials)和表面具有纳米结构的物质(nano-structure surfaces)^[2]。纳米材料的尺寸很小,结构特殊,由于诸如表面效应、小尺寸效应、量子尺寸效应和宏观量子隧道效应等因素,纳米材料具有许多独特的性质。

纳米材料最主要的特点是尺寸小,处于单个原子或分子与宏观粒子交界的过渡区域^[3]。当直径小于100 nm时,纳米颗粒表面原子数与总原子数之比随着直径变小而急剧增大。直径为30 nm时,有大概10%的原子分布在表面;然而直径降至3 nm时,颗粒表面原子数已经占总原子数的50%。表面对体积之比决定了潜在的活性基团的数目,根据使用目的的不同这种高表面活性可以是有益的(例如抗氧化,药物运载能力,增强吸收能力和与生物组织间的相互作用)或者有害的(有毒性,不稳定,诱导氧胁迫等)^[4,5]。

除尺寸小之外,纳米材料还表现出许多机械、光学、物理、化学及超导等方面的特性,因此被广泛应用于填充剂、遮光剂、催化剂、半导体、化妆品、微电子和生物医学等各个领域^[4]。例如将纳米二氧化钛(TiO_2)按照一定比例添加到化妆品中,不但可以吸收紫外线,而且可以散射紫外线,可同时屏蔽C型紫外线、B型紫外线和部分A型紫外线。目前,日本等国已有部分含纳米二氧化钛的化妆品问世^[6]。

随着纳米技术的产业化,各种形式的纳米尺度的物质已经以各种不同的途径进入我们的日常生活当中,人们在工作和生活中接触到他们的机会越来越多。从2006年发生在德国的魔术纳米气溶胶玻璃危害人体健康事件^[7]到美国环境保护局公布发现防晒霜中的纳米二氧化钛可能导致小鼠脑损伤的研究结果后导致的防晒霜争议

[8], 越来越多的人开始关注纳米材料是否对环境和人类健康带来不利影响。从 2003 年起, *Nature* 和 *Science* 等权威杂志已相继发表论文, 开始讨论纳米尺度材料的生物效应以及对环境和健康的影响问题^[3, 5, 9-12]。

科学界不仅看到纳米材料在各个领域中的巨大作用, 同时也认识到纳米技术可能带来的危害, 2003 年以后, 美国、欧盟、德国、日本等发达国家相继制定了国家研究计划, 资助纳米科技生物安全性的研究, 例如 2004 年美国国家环保局拨款 400 万美元委托 12 所大学开展纳米材料对环境和人体可能产生危害的研究。研究课题包括: 皮肤对纳米材料的吸附及其毒性; 纳米材料对饮水的影响; 纳米粒子对操作者肺组织的影响; 在海洋和淡水水域沉积的纳米材料对环境的影响等^[13]。我国的国家自然科学基金委、国家科技部也相继启动和资助了一些重大课题。总体来讲, 国内外纳米生物安全性的研究从起点、水平看相差不大^[14]。

1.2 碳纳米管及其细胞毒理学研究现状

1.2.1 碳纳米管简介

碳纳米管 (Carbon nanotubes, CNTs) 是日本电子显微镜专家 Iijima 在 1991 年意外发现的一种碳结构^[15], 由片层结构的石墨卷成的无缝中空的纳米级同轴圆柱体, 两端由富勒烯半球封帽而成^[16]。根据石墨片层的数目碳纳米管可以分为单壁碳纳米管 (Single-walled carbon nanotubes, SWCNTs) 和多壁碳纳米管 (Multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs)。单壁碳纳米管的直径在 0.75 nm-3 nm 之间, 长度为 1-50 μm , 多壁碳纳米管的直径在 2-30 nm 之间, 长度为 0.1-50 μm , 层间距约为 0.34 nm^[17]。

碳纳米管具有许多独特的性质, 如重量轻, 强度高, 具有很好的热稳定性、化学稳定性和导电性^[12], 例如碳纳米管的抗拉强度是钢的 100 倍, 弹性模量与金刚石相当, 约为钢的 5 倍, 硬度与金刚石相当, 却拥有良好的柔韧性。除本身具有许多特异性质之外, 碳纳米管还可以通过物理吸附、静电作用和共价连接等手段进行表面修饰。近些年来随着碳纳米管及纳米材料研究的不断深入其广阔的应用前景也不

断展现出来, 在生物、医药上也开始崭露头脚, 有研究发现, 碳纳米管在运输载体、生物传感器、检测病原体、治疗癌症等方面具有良好的应用前景^[18-25]。

1.2.2 碳纳米管毒理学研究现状

随着碳纳米管在生物学方面应用的可能性不断增加, 关于碳纳米管对细胞安全性的研究也越来越多, 碳纳米管是否具有细胞毒性目前在不同的研究系统中有不同的结论, 具有一定的争议性。有研究显示, 碳纳米管能够抑制细胞增殖, 并且呈剂量和时间依赖性关系^[26, 27]; 碳纳米管能诱导活性氧产生^[27-30], 引起细胞聚集^[26, 31], 诱导细胞发生凋亡^[26, 32-34]和激活核因子 κ B(NF- κ B)^[27, 29, 30]。除此之外, Cui 等(2005)用单壁碳纳米管处理人体胚胎肾细胞 1-5 天后, 发现单壁碳纳米管能降低细胞黏附能力, 流式细胞仪分析显示单壁碳纳米管还能改变细胞周期, 细胞被阻滞在 G0/G1 期, S 期细胞显著减少^[26]; 同样 Ding 等(2005)用多壁碳纳米管处理人皮肤成纤维细胞时发现细胞被阻滞在 G2/M 期^[33]。Nicola 等(2008)用单壁碳纳米管、多壁碳纳米管和两者的混合物处理 Jurkat 细胞 24 小时, 流式细胞仪分析显示碳纳米管能引起质膜超极化, 并且这种影响呈现浓度依赖性关系^[32]。另外单壁碳纳米管能促使细胞因子白介素 8 (IL-8) 的释放^[30, 35]。Pacurari 等(2008)用未修饰的单壁碳纳米管处理人体正常和恶性间皮细胞 24 小时后发现单壁碳纳米管造成细胞 DNA 损伤^[29]。

虽然上述研究报道表明碳纳米管可能具有细胞毒性的作用, 但也有研究发现其毒性作用不大。Flahaut 等(2006)用相同的催化化学气相沉积法 (CCAD) 制备了三种不同的碳纳米管 (所用的金属催化剂和量不同), 处理人静脉血管内皮细胞后同时用中性红染色法和 MTT 检验法检验细胞活性, 研究结果表明任何一种碳纳米管都没有细胞毒性^[36]。

除了体外细胞水平的实验之外, 碳纳米管在模式动物体内中的生物学效应也开始得到重视。2004 年 Warheit 等将 5 mg/kg 单壁碳纳米管缓慢灌入小鼠的气管中, 发现小鼠的肺发生短暂的炎症反应, 处理 1 个月后组织切片显示小鼠的肺中发生多发性肉芽肿^[37], 类似实验也表明碳纳米管能诱导小鼠肺部发生肉芽肿^[38-40]。此外, 有研究证实碳纳米管进入小鼠腹腔后能引起炎症和肉芽肿的形成^[41]。然而, 与此相

反,有报道显示小鼠静脉注射单壁碳纳米管后在体内没有发现明显的副作用^[42-44]。

1.2.3 碳纳米管细胞毒性影响因素

在研究和争论碳纳米管是否具有细胞毒性的同时,近年来科学家们对于碳纳米管的生物学效应及其影响因素进行了深入探讨。除了剂量这个关键因素之外, Jia 等用直径 1.4 nm、长度 1 μm 、纯化的单壁碳纳米管和直径 10-20 nm、长度 0.5-40 μm 的多壁碳纳米管处理小泡巨噬细胞,发现单壁碳纳米管的细胞毒性远远大于多壁碳纳米管^[34]。Kang 等研究发现在抗菌方面单壁碳纳米管比多壁碳纳米管效果更好,而且证明碳纳米管的大小是决定抗菌效果的一个关键因素^[45]。

一些研究发现将碳纳米管表面修饰或者高度纯化的碳纳米管能降低其毒性。Kam 等用流式细胞仪分析了暴露于连接羧基、生物素和荧光素的单壁碳纳米管 1 小时后的 HL60 和 Turkat T 细胞,结果显示表面功能化的单壁碳纳米管并无明显毒性作用^[46]。Sayes 等(2006)探讨了不同程度功能化单壁碳纳米管的细胞毒性,发现碳纳米管的细胞毒性与功能化密度有关^[47]。Fiorito 等用高度纯化的单壁碳纳米管处理人巨噬细胞 48 小时后观察统计凋亡或坏死细胞(PI 染色),发现纯化的单壁碳纳米管只引起大约 4%的细胞死亡^[48]。Chlopek 等(2006)将高纯度的多壁碳纳米管处理纤维原细胞和造骨细胞后检测细胞活性及反应,研究结果表明细胞的骨钙素,细胞因子白介素-6(IL-6)和氧自由基的水平没有明显变化,因此该小组认为多壁碳纳米管和检测的两种细胞具有良好的生物适应性^[49]。

也有人认为聚合程度是影响纳米颗粒细胞毒性的因子之一。Wick 等为了确定团聚状态如何影响单壁碳纳米管细胞毒性,测试了四种不同的单壁碳纳米管溶液:碳纳米管生产过程中的原材料,合成后的块状碳纳米管,由块状碳纳米管离心过滤得到的束状碳管和球状碳管^[50]。除了分散得很好的束状单壁碳纳米管,其余的碳管都是聚集成块状的。结果发现块状的碳纳米管细胞毒性比分散性较好的碳管的细胞毒性大。该研究推测团聚的单壁碳纳米管具有较大的刚性和尺寸,使碳纳米管具有类似石棉纤维的毒性,因此毒性相对较大。然而,与此相反 Tian 等研究了未纯化单壁碳纳米管和已经除去金属催化剂的单壁碳纳米管,发现未纯化的单壁碳纳米管的细胞毒性较低^[51]。该研究认为未纯化的单壁碳纳米管细胞毒性较低是因为其聚集程

度大，因此毒性较低。这与 Wick 等提出的假设相悖，可能是由于使用了两种不同的细胞系（石棉诱导的肺癌细胞和角质形成细胞）从而得出不同的结论。

碳纳米管在生产过程中会使用一些金属催化剂，如铁、镍等。Kangan 等探究了单壁碳纳米管中铁在细胞毒性方面的作用，他们选择含有 26% 铁催化剂的未纯化碳纳米管和仅含 0.23% 铁催化剂的纯化碳纳米管处理鼠巨噬细胞系 RAW264.7，与纯化的碳纳米管相比，未纯化富含铁的单壁碳纳米管诱导细胞产生更多的羟自由基、氧自由基并显著降低了细胞内谷胱甘肽（GSH）的含量，积累脂质过氧化物。因此他们推断碳管中铁的存在可能是决定巨噬细胞中氧化还原产生的重要原因^[52]。Shvedova 等报道了未纯化的单壁碳纳米管（含铁杂质）对人表皮角质形成细胞具有剂量和时间依赖性的细胞毒性^[28]。用较高浓度单壁碳纳米管处理较长时间后，发现细胞会产生自由基和过氧化物，谷胱甘肽（GSH）水平减少以及核和线粒体的形态发生变化。但是加入金属螯合剂后能降低毒性，这表明单壁碳纳米管中剩余的铁催化剂可能参与了细胞毒性作用。此外，Jia 等发现使用低浓度的单壁碳纳米管（ $1.14\text{mg}/\text{cm}^2$ ）能抑制 20% 以上的细胞生长^[34]，由于单壁碳纳米管的纯度为 90%，推测是金属催化剂导致的细胞毒性。

碳纳米管的分散性一直是一个难以解决的问题，因此有时候加入一定浓度的表面活性剂以分散碳管。Dong 等研究了不同的表面活性剂对碳纳米管细胞毒性的影响^[53]。实验表明分散在十二烷基硫酸钠（SDS）和钠十二烷基苯磺酸钠（SDBS）中单壁碳纳米管对 1321N1 人星细胞瘤细胞的毒性是由于碳纳米管表面的 SDS 和 SDBS 产生的。而分散在胆酸钠（SC）和单链 DNA 中的单壁碳纳米管对细胞的增殖和存活率没有影响。因此研究者呼吁在探讨碳纳米管的细胞毒性时应注意其分散剂的毒性效应。

除了上述因素之外，碳纳米管的尺寸、比表面积、处理时间等也是影响细胞毒性的重要因素^[51]。因此在探讨碳纳米管的细胞毒性时，对其表征进行全面的考虑是非常必要的。

1.2.4 碳纳米管细胞毒性产生机制

目前，对碳纳米管引起细胞毒性的机制研究还很少，一些假说被提出来用来解

释碳纳米管的细胞毒性。其中一种被广泛认可并得到实验证明的的机制是碳纳米管诱导细胞产生活性氧（ROS）导致细胞发生氧胁迫从而产生毒性^[27, 29, 30, 54]。实验表明碳纳米管刺激细胞产生的活性氧能激活核因子 κ B（NF- κ B）信号转导途径，ROS激活 I κ B 激酶（IKK）使 I κ B α 磷酸化，于是被磷酸化的 I κ B α 与 NF- κ B 分离，NF- κ B 从胞质转移至核内，与 DNA 结合后启动转录，与此同时活性氧释放到细胞外，刺激细胞分泌炎症因子（TNF α ）和 IL-8，进入细胞凋亡通路，导致细胞死亡。

此外，Tang 等用富勒烯（fullerene）研究对微生物的影响时提出纳米材料跟微生物的物理接触导致细胞损伤是纳米材料的主要致死机制^[55]。Kang 等用不同浓度高度纯化的单壁碳纳米管处理大肠杆菌 K12 (*E.coli* K12) 后也提出了相同的猜想^[56]，Kang 等研究结果表明只有直接跟碳纳米管接触的大肠杆菌失去活性，且大肠杆菌的活性并不随碳纳米管的浓度增加而变化，扫描电镜观察结果显示大肠杆菌的细胞膜已经严重受损，失去了细胞完整性。同时检测了大肠杆菌培养液中细胞内含物质粒 DNA 和 RNA 的含量，发现单壁碳纳米管处理的菌液中质粒 DNA、RNA 的含量比对照组中的含量分别高出 5 倍和 2 倍，证明细胞内含物已经外泄。因此，该研究小组认为碳纳米管对细菌的毒性是碳纳米管跟细菌之间的物理接触导致细菌细胞膜受损而引起的。

1.2.5 碳纳米管对植物细胞影响研究现状

碳纳米管细胞毒性的研究大部分围绕着动物或人体细胞，很少有关于纳米材料对植物细胞影响的报道。Lin 等（2009）首次利用多壁碳纳米管研究了对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 悬浮细胞系 T87 的细胞毒性^[57]，用不同浓度（10 mg/l, 60 mg/l, 100 mg/l, 600 mg/l）多壁碳纳米管（有两种不同聚集程度的碳纳米管）处理拟南芥悬浮细胞 2-7 天后，检测了细胞干重，活性，细胞叶绿素含量和过氧化物歧化酶（SOD）的酶活。研究结果表明多壁碳纳米管处理细胞后，细胞干重减少，活性下降，叶绿素含量减少，SOD 酶活性降低，并且聚集程度小的碳纳米管对细胞的影响更明显。

植物细胞壁是植物细胞区别于动物细胞的主要特征之一，主要由相交联的多糖组成。由于有细胞壁和细胞膜组成的双重屏障，外界分子很难进入植物细胞。碳纳

米管具有许多独特的性质,已经有研究报道碳纳米管能运输生物大分子进入动物细胞中^[21, 58, 59]。在植物中也有研究报道硅纳米颗粒能运输 DNA 和化学药品进入去掉细胞壁的原生质体当中^[60]。Liu 等的研究发现单壁碳纳米管能穿过完整植物细胞的细胞壁和细胞膜进入到细胞内部,并且能运输单链 DNA 分子进入植物细胞中^[61]。而且该研究还推测碳纳米管能运输生物大分子至特定的细胞器。由此可见,单壁碳纳米管作为运输载体应用到植物细胞中是很有可能性的。

1.3 植物程序性细胞死亡简介

细胞死亡是生物体的一种常见生命现象,根据死亡的形式一般可分为两种:细胞坏死(necrosis)和程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)。细胞坏死是细胞在遭受环境中的强热、冰冻、强烈机械损伤等因素时出现的一种非生理性细胞死亡,这种死亡以原生质膜的破裂为特征^[62],造成细胞内含物的外泄,引起周围组织发生炎症反应,故对生物体的生长发育很不利。程序性细胞死亡是生物体在发育过程中或环境影响下,通过自身内部机制启动并调节的细胞生理性自然死亡的过程^[63],是一种主动的、生理性的细胞死亡过程。这种死亡是由基因启动和调控的,在高等生物体内广泛存在,对生物体生长发育具有积极意义。

程序性细胞死亡的研究最先开始于动物细胞,1951年,Gluckmann 首先提出了细胞程序化死亡的概念,证明在脊椎动物和无脊椎动物中都存在该现象^[64];1961年,Karl 发表文章阐述程序化细胞死亡的形式及对植物正常生理活动的重要性;1972年,Kerr 等在生物体发育过程中发现了一种与细胞坏死形态特征完全不同的细胞死亡方式,将其命名为细胞凋亡(apoptosis)^[65],并认为细胞凋亡是程序性死亡一种的组织形式。

植物 PCD 的研究起步较晚,1985年,尤瑞麟研究了正常小麦珠心细胞衰退过程中超微结构的变化,引用了 PCD 的概念^[66]。二十世纪 90 年代初,Greenberg 等发现在植物对病原菌的防御反应中存在程序性死亡的现象^[67],此后,众多研究者从形态学观察、超微结构、细胞化学、生物化学、基因调控、酶学和信号传导等方面对植物 PCD 进行了研究。近年来研究证实 PCD 广泛存在于植物生长发育的各个阶段和抵抗病原菌、外界胁迫的防御反应中,如胚柄形成^[68]、糊粉层降解^[69]、导管的

分化形成^[70]和叶片形态的正常形成^[71]、珠心细胞的退化^[72]、通气组织的形成^[73]、根皮层细胞的死亡^[74]、植物病原微生物互作引发的过敏反应(hypersensitive response, HR)^[75-78]等。Jones 认为植物 PCD 的研究主要集中在三个方面: 终端分化(terminal differentiation)、植物衰老、环境胁迫和病害抵抗^[79]。目前国际上主要研究是以病原菌引起的植物 PCD^[80-83]。在 PCD 发生过程当中, 一般伴随着特定的形态、生理生化特征出现^[84]。

1.3.1 植物程序性细胞死亡特征

发生 PCD 的植物细胞有其独特的形态学特征, 主要表现为: 细胞体积缩小, 密度增大; 细胞质和细胞核发生凝缩, 染色质凝集并边缘化; 细胞器发生有序解体、消失; 部分细胞质和细胞核碎片由细胞膜包被形成凋亡小体(apoptotic body), 细胞膜保持完整性, 没有细胞内含物溢出^[85]。但也有研究认为植物细胞由于细胞壁的存在不会产生凋亡小体, 细胞死亡后并不被临近细胞吞噬, 在程序性死亡过程中液泡参与降解细胞器, 在一些情况下构成利于自身发展的特殊结构, 如皮层细胞死亡形成通气组织, 导管细胞死亡后形成输导组织^[70, 73, 86]。

植物程序性细胞死亡在生物化学上的特征主要表现为细胞核内 DNA 的变化, 在内源性核酸内切酶的作用下, 细胞内 DNA 在核小体连接区被切开降解成以 180bp 为基数的寡聚核小体片段, 在琼脂糖凝胶电泳上呈现特异性的“梯状”条带, DNA 断裂会形成 3'-OH 端^[67]。

1.3.2 植物程序性细胞死亡检测方法

研究 PCD 的方法有很多, 目前主要采用的是形态观察法和生化检测法。发生 PCD 的植物细胞与坏死的细胞形态存在明显差别, 根据其典型的形态学特征, 应用光学显微镜和电子显微镜可以观察并区分细胞是否发生 PCD。电子显微镜是观察细胞形态变化的最佳方法, 样品制成超薄切片后, 经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色, 在电镜下可以清楚地观察到细胞核和细胞器的超微结构变化, 并且可以观察到 PCD 不同时期的细胞结构变化, 可对细胞程序性死亡提供确切的证据^[87]。

PCD 发生时, 内源性核酸内切酶激活, 导致 DNA 非随机性断裂成 180bp 整倍

数的寡核苷酸片段，形成 DNA ladder^[67]；而坏死细胞的 DNA 降解随机发生，电泳时表现为连续分布的 DNA 条带。但有研究表明并非所有发生 PCD 的细胞都能产生 DNA 特异片段^[88]。根据细胞发生 PCD 时 DNA 断裂成不同长度的片段，还可以采用彗星电泳法 (comet assay) 检测，在电流作用下 DNA 片段会移出细胞核，DAPI 染色后可观测到彗星状的核 DNA 的迁移。彗星电泳法敏感度高，所需细胞用量少，可较精确地反映细胞的凋亡，但是不能直接检测带壁植物细胞的凋亡^[89]。

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end-labelling) 是指脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法，是原位检测细胞凋亡最为敏感、快速、特异的方法。该法最早是由 Gavrieli 等建立^[90]，利用细胞凋亡中染色体 DNA 双链断裂或一条链上出现缺口产生的 3'-OH 端，在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的作用下，将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、磷酸化酶或生物素形成的衍生物标记到 DNA 的 3'末端，从而进行凋亡细胞的检测。TUNEL 法实际上是分子生物学和形态相结合的方法，对完整的凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色，能准确地反映细胞凋亡最典型的生物化学和形态特征^[63]。1999 年 Goping 等将该技术改良后应用到电镜上^[91]，证明该技术在电镜上也能准确地检测细胞凋亡。由于其可靠性，TUNEL 检测成为目前植物细胞程序性死亡检测的首选手段。同时应用 LM-TUNEL 和 EM-TUNEL 检测，Yao 等证明毒素 victorin 能诱导燕麦叶片发生程序性细胞死亡，并且该实验首次在植物中运用 EM-TUNEL 技术检测程序性细胞死亡^[92]。

1.3.3 活性氧与植物程序性细胞死亡

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 是一类具有超氧化能力、能持续进行反应的物质，如超氧阴离子 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟自由基 ($\cdot OH$) 等。在植物中可以在多个部位通过多条途径生成，如叶绿体可通过 Mehler 反应产生 O_2^- 和 H_2O_2 ，线粒体在消耗 NADH 的同时产生 O_2^- 和 H_2O_2 ，过氧化物酶体通过乙醇酸氧化产生 H_2O_2 ^[93]。

ROS 最初被认为是细胞代谢的有毒的副产物，植物细胞具有多种清除 ROS 的酶，如超氧化物歧化酶 (SOD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、过氧化氢酶 (CAT)

等,使细胞免受 ROS 的毒害。Levine 等研究大豆悬浮细胞时证实 H_2O_2 在植物抵御环境胁迫中充当了信号分子,诱导细胞发生过敏反应(Hypersensitive resistance, HR)^[94]。近年来越来越多的证据表明,ROS 在植物细胞程序性死亡过程中具有调节信号转导的作用。在植物抵御病原菌侵染以及诱导细胞死亡的过程中,ROS 大量产生于细胞壁、细胞膜、线粒体、叶绿体等不同部位,Yao 等利用电镜氯化铯($CeCl_3$)染色法,研究毒素 victorin 诱导燕麦叶片发生 PCD 时发现, H_2O_2 首先在线粒体上产生和积累,之后才发生染色质凝缩和 DNA 断裂,并且阻止线粒体 ROS 迸发也能阻止 PCD 发生,因此推测源于线粒体的 ROS 是调节植物 PCD 的一个重要因素^[95]。目前,人们普遍认为,在植物的 PCD 过程中 ROS 可能起到三个方面的作用:一是低浓度时作为信号分子传导环境胁迫信号;二是中等浓度时能诱导细胞发生 PCD;三是高浓度时细胞发生坏死^[96]。

1.4 本课题的研究意义及创新性

根据 Joseph 和 Morrison 报道,在农业和粮食产业,纳米技术很可能应用于分子治疗疾病、快速疾病诊断、增强植物吸收养分能力等方面。微型传感器和微型传输系统能帮助农业作物抵抗病毒及其他病原菌,在症状可见之前确定植物的健康状态。在不久的将来很可能利用纳米级别的催化剂增加农药和除草剂的功效,降低农药和除草剂的剂量,以减少对环境的污染。纳米技术也可以通过使用纳米级催化剂减少农药污染或清除已存在的污染来间接保护环境^[97]。

碳纳米管具备许多特异的力学、电学和化学性能,近些年来随着研究的深入其广阔的应用前景也不断展现出来。Liu 等的研究发现单壁碳纳米管能运输单链 DNA 分子穿过完整植物细胞的细胞壁和细胞膜进入到细胞内部^[61]。由此可见,单壁碳纳米管作为运输载体应用到植物细胞中是极有可能的。

然而,碳纳米管进入环境或生物体内是否存在风险仍不确定,目前已有大量碳纳米管的细胞毒理学研究,但绝大多数都集中在动物细胞和组织中,且已公开的研究结果也存在极大的争议,碳纳米管对植物细胞的影响鲜有报道。正确评估碳纳米管的生物学效应,探讨纳米对植物及其环境的影响,是具有重要意义的前瞻性研究。

本文利用拟南芥和水稻原生质体系统，结合光镜、电子显微镜观察，以及EM-TUNEL、RT-PCR等检测手段，从多方面探讨了商业化单壁碳纳米管对植物细胞的影响。本研究为进一步研究碳纳米管作用于植物细胞的分子机理打好了基础，给碳纳米管在植物中的应用提供了一些科学依据。

第二章 实验材料和方法

2.1 实验材料

拟南芥 野生型 (Columbia, Col)

水稻 日本晴 (Nipponbare)

植物培养土: 丹麦进口品氏水藓泥炭土

纳米材料: 单壁碳纳米管 (SWCNTs), 购于中国科学院成都有机化学有限公司

直径为 1-2 nm, 长度约为 30 μm , 碳纳米管的纯度大于 95%, 其中单壁碳纳米管的含量大于 90%, 比表面积大于 380 m^2/g 。

2.2 实验试剂

CM-H₂DCFDA 购自 Molecular Probes (Eugene, OR, USA), DAPI 购自 Roche (Shanghai, China), Fluorescein diacetate (FDA) 和 Trypan blue 购自 Sigma (Sigma-Aldrich, China), The ApopTag Plus Fluorescein *in situ* Apoptosis Detection Kit 购自 CHEMICON (California, USA)。Cellulase R10 和 Macerozyme R10 购自北京普博欣新生物技术发展有限公司 (Yakult, Japan, 进口分装), Taq DNA 聚合酶购自 Takara 公司, cDNA 一链反转录酶试剂盒购自 Fermentas 公司, RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen, 活性炭 (activated carbon, AC) 购自天津市福晨化学试剂厂, 其他常用试剂均为广州化学试剂厂分析纯试剂。

试剂配制:

5 mg/ml fluorescein diacetate (FDA) (in acetone)

1 mg/ml DAPI (in ddH₂O)

100 μM CM-H₂DCFDA (in DMSO)

50 mM MOPS (in H₂O)

10 mM CeCl₃ (in 50 mM MOPS)

0.1 M CBS (in dH₂O, PH 7.4)

5 mM PPIX (in DMSO)

50 mM C2-Ceramide (in ethanol)

SWCNTs 配制方法:

称取适量 SWCNTs, 加入 W5 培养液配制成 1 mg/ml 的母液, Elmasonic S30H 超声清洗器超声处理 30 秒获得分散均匀的母液, 置于 4℃ 储存备用。对原生质体处理之前稀释成所需浓度并再次超声 1 分钟进行分散。活性炭 (AC) 配制方法同 SWCNTs。

提取原生质体的酶解液^[98] (25 ml):

0.5 M mannitol	2.275 g
20 mM MES	0.1066 g
20 mM KCl	1 M KCl 母液 0.5 ml
1 M KOH 调 pH 5.7, 定容至 25 ml 再测 PH 值。	
1.2% cellulase R10	0.3 g
0.3% macerozyme R10	0.075 g
缓慢搅匀, 55℃ 水浴 10 min 促溶, 至液体变澄清即可, 冷却至室温。	
10 mM CaCl ₂	0.5 M CaCl ₂ 母液 0.5 ml
5mM β-mercaptoethanol	70 μl
0.1% BSA	0.025 g

滤网过滤后分装, -20℃ 储存。

W5 培养液(200 ml)^[98]:

154 mM NaCl	1.8 g
125 mM CaCl ₂	2.7745 g
5 mM KCl	1 M KCl 母液 1 ml
2 mM MES	0.5 M MES 母液 0.8 ml

5 mM Glucose 1 M Glucose 母液 1 ml
 1 M KOH 调 pH 至 5.7。

B5 培养液配方:

Solution A (100×)

H ₃ BO ₃	0.3 g
MnSO ₄ · H ₂ O	1.0 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g

去离子水定容至 1000 ml, 4℃ 储存。

Solution B (1000×)

NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.125 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.0125 g
KI	0.375 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0125 g

去离子水定容至 500 ml, 4℃ 储存。

Solution E (200×)

Na-Fe-EDTA	3.67 g
------------	--------

去离子水定容至 500 ml, 4℃ 储存。

B5 stock solution (10×)

KNO ₃	2.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.34 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1.5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.5 g
Solution A	100 ml
Solution B	10 ml
Solution E	50 ml

去离子水定容至 1000 ml, 4℃ 储存。

电镜用 4/15 M 磷酸缓冲溶液 (PH 7.4):

A 液: 4/15 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.55 g/100 ml

B 液: 4/15 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.16 g/100 ml

按不同的 A, B 液配比, 即可得到不同 PH 的 PBS

PH(25℃)	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8
A 液(ml)	24.5	30.5	36.0	40.5	43.5	45.75
B 液(ml)	25.5	19.5	14.0	9.5	6.5	4.25

戊二醛-多聚甲醛 固定液配方:

25% glutaraldehyde (GA) 10 ml

↓ + 15 ml H_2O

10% GA

16% paraformaldehyde (PFA) 10 ml

↓ + 10 ml H_2O

8% PFA

10 ml 10% GA + 10 ml 8% PFA

↓

20 ml 5% GA, 4% PFA

↓

+ 20 ml 2/15 M PBS

40 ml 2.5% GA, 2% PFA, 1/15 M PBS

1% OsO_4 固定液配方:

1 g OsO_4 + 25 ml H_2O → 4% OsO_4

8 ml 4% OsO_4 + 8 ml 4/15M PBS + 16 ml H_2O → 1% OsO_4 , 1/15 M PBS

原生质体固定液配方:

1 ml 16% GA + 1 ml 16% PFA + 2 ml 4/15 M PBS

↓

4 ml 4% GA, 4% PFA, 2/15 M PBS

↓

+ 4 ml 0.6 M mannitol

8 ml 2% GA, 2% PFA, 0.3 M mannitol, 1/15 M PBS

包埋剂 Epon 812 (polybed 812)配方:

DDSA	14.8 g
NMA	9.2 g
Polybed812	21.2 g
DMP-30	0.7 g,

先加入前面两种, 缓慢搅拌均匀, 避免出现气泡。再加入 Polybed 812, 充分搅拌, 最后加入加速剂 DMP-30。搅拌均匀, 抽真空除去气泡, 置于干燥器内放置, 备用。包埋剂不宜过早配制, 使用前配制较好。

包埋剂 Spurr 配方:

ERL4211	8.2 g
DER736	2.86 g
NSA	11.8 g
DMAE	0.2 g

先混合前三种试剂, 缓慢搅拌均匀, 避免出现气泡。再加入 DMAE, 充分搅拌至均匀后抽真空除去气泡, 置于 4℃ 冰箱备用。提前一天配制。

乳酸酚试剂配方:

Lactic acid 乳酸	10 ml
Glycerol 甘油	10 ml
Liquid phenol 苯酚	10 ml
dH ₂ O	10 ml

2.3 实验方法

拟南芥的种植

取适量拟南芥种子至 10 ml 离心管中, 加入 0.1% 的琼脂悬浮, 置于 4℃ 冰箱低

温处理 3-5 天。将丹麦进口品氏水藓泥炭土揉碎加入培养盆，土略高于培养盆边缘，抖动使之平整，用喷壶按一定方向浇水至培养土湿透，达到一定重量即可。将已低温处理的种子与 0.1% 琼脂混匀，用细长的玻璃胶头吸管吸出种子点播于培养介质表面。播种时注意一处尽量只播一颗种子并控制植株密度。播种后再铺上薄薄一层土，利于发芽后固根。为保持种子萌发时需要的空气湿度，播种后用塑料透明盖将盆覆盖（盖上扎数个通气孔），置于室温 22℃，光照强度为 4800-6100 lux 的温室培养，光照周期为 16 小时光照和 8 小时黑暗。当植物长出 4 片叶子时揭盖，在四叶期和花期各追施一次 B5 营养液。拟南芥不耐旱，应时刻保持最上层培养土处于湿润状态，否则应浇水。培养盆可放于平底托盘上，浇水时往托盘中加水，使水从盆底部的孔上渗，这样可避免直接往培养基质上浇水时冲倒小苗。应该注意的是要严格控制浇水次数，盆土不干不浇。浇水过多则不利于壮根，介质表面易生藻类及苔藓。

水稻的种植

将适量水稻种子放于 37℃ 培养箱中促进发芽，每日换水至出芽。在培养皿中铺上纱布，加入适量水，将已发芽的水稻种子种于培养皿中，置于暗处室温培养。每日换水。

原生质体的提取

1. 取 20-25 天大小拟南芥植株上大小一致的叶片 40-60 片，蒸馏水冲洗 2-3 次，除去脏物。
2. 将叶片放在垫有纸巾的滤纸上吸干大部分水分后移至称量纸上，滴 1 ml 0.5 M 甘露醇，用锋利的双面刀片快速将叶片切成约 1 mm² 的碎片。
3. 将碎片小心转入已加有 3 ml 0.5 M 甘露醇的 25 ml 广口锥形瓶中，再用 0.5 M 甘露醇将壁上的碎片冲下去，封口，暗中静置 30-60 分钟。
4. 吸弃甘露醇，沿壁加入酶液，以覆盖碎片为宜。轻微抽真空 30 秒，用滤纸片盖在真空室吸气口使空气缓慢进入，可使酶液进入细胞间隙，增加酶解效果。
5. 封口，室温暗处理摇床酶解 2-4 小时，转速为 40-60 rpm，一般 2 小时后观察酶液是否为亮绿色，以决定是否继续酶解。

6. 40 μm 滤网过滤, 800 rpm 离心 1 分钟收集原生质体, 弃上清液, 加入 5 ml W5 培养液重悬后再离心, 清洗 2 次至上清液变明亮。
 7. 加入适量 W5 培养液重悬后置于 8-10 $^{\circ}\text{C}$ 静置。
- 水稻原生质体提取方法与上述方法类似。

SWCNTs 处理原生质体和细胞存活率分析

将提取的拟南芥 (Col) 叶肉细胞原生质体和水稻 (Nipponbare) 黄化苗原生质体用 8 $^{\circ}\text{C}$ -10 $^{\circ}\text{C}$ W5 培养液稀释成适当浓度(以计数板 9 大格细胞总数 200 个左右为宜) 备用。1 mg/ml SWCNTs 母液用 W5 培养液稀释成适当浓度, 并用超声波清洗仪超声处理 1 分钟使 SWCNTs 分散均匀。为选取研究纳米材料 SWCNTs 的合适浓度, 参照相关文献, 设计 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs 的浓度梯度试验, 将各浓度的 SWCNTs 加入原生质体后轻晃混匀, 置 22 $^{\circ}\text{C}$, 空气湿度 70% 的光照培养箱持续光照处理。不同的时间段, 分别取 100 μl 原生质体, 加入 1 μl 5 mg/ml (终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) FDA 室温黑暗条件下染色 5 分钟, 血球计数板计数活细胞的数量, 统计细胞存活率。

用 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs 处理拟南芥原生质体, 原生质体浓度控制在铺满四十八孔板孔底一层, 不同时间段在倒置荧光显微镜 (Axio Imager Z1, Carl Zeiss) 下观察死细胞团的变化并计数拍照。

用 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs 分别和 10 μM PPIX, 50 μM C2-Ceramide 组合处理拟南芥原生质体, 统计细胞存活率。

以上各实验均重复三次以上。数据表示为平均值 \pm 标准方差, 组间方差由 PLSD 检验分析, $p < 0.05$ 为有效统计学差异。所有数据处理均用 Statview statistical package 5.0.1 for Macintosh 分析软件完成。

荧光显微镜观察

用 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs 处理拟南芥原生质体, 置 22 $^{\circ}\text{C}$, 空气湿度 70% 的光照培养箱持续光照处理。不同的时间段用 FDA 和 DAPI 双重染色 (100 μl 原生质体加 1 μl 5 mg/ml FDA 和 1 μl 1 mg/ml DAPI, 室温暗处染色 5 分钟), 在荧光显微镜 (Axio

Imager A1, Carl Zeiss)下观察细胞形态变化。用 $1 \mu\text{M}$ CM-H₂DCFDA 暗处染色 10-15 分钟, 在荧光显微镜下观察处理不同时间段 ROS 的产生, 激发波长为 450-490 nm, 接收波长为 500-550 nm。

电镜制样和观察

1. 取材: 剪取叶片, 去除边缘部分, 用锋利的刀片迅速将叶片切成 $2 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ 的小条, 放入已滴有固定液的夹板中(夹板上用铅笔标记), 迅速投入装有固定液的小玻璃瓶中。
2. 前固定: 轻微抽真空, 2.5% 戊二醛和 2% 多聚甲醛 4°C 固定 12 小时 (可适当延长固定时间, 最长不能超过一周)
3. 1% 的 OsO₄: 吸去前固定液, 置换成 $1/15 \text{ M}$ PBS, 清洗 3 次, 每次 5 分钟, 期间不时晃动玻璃瓶, 倒去 PBS, 将玻璃瓶倒扣在吸水纸上, 小心敲几下, 使吸水纸吸干瓶内残留的 PBS。加入适量的 1% OsO₄, 没过夹板既可。 4°C 固定 1-1.5 小时。
4. 吸去 1% OsO₄ 固定液, 蒸馏水清洗 5 次, 每次 5 分钟, 期间不时晃动玻璃瓶, 倒去蒸馏水, 将玻璃瓶倒扣在吸水纸上, 小心敲几下, 使吸水纸吸干瓶内残留的液体。
5. 梯度脱水: 依次加入 30%, 50%, 70%, 90%, 95% 的酒精, 每个梯度 15-30 分钟, 期间不时晃动玻璃瓶, 使脱水尽量完全。100% 的无水乙醇置换 3 次, 每次 30-60 分钟。
6. 倒掉无水乙醇, 避免夹板变干, 迅速加入 100% 的丙酮, 置换 3 次, 每次 5 分钟。
7. 吸去丙酮, 1: 1 的包埋剂/丙酮混合液, 过夜。
8. 100% 的包埋剂, 过夜。在此时间段, 同时用同批配制的 100% 包埋剂加入样品板 (注意不能加满, 最多一半), 并用针尖小心挑去浮出的气泡。 60°C 聚合 12 小时做半包埋块 (half-bed)。
9. 包埋: 打开夹板, 小心取出叶片, 置于已滴有少量包埋剂的半包埋块上, 用牙签调整叶片的位置, 再加入适量的包埋剂完整覆盖样品。 60°C 烘 5 分钟, 样品的位置会稍微变动, 稍作调整, 并用针尖小心挑去浮出的气泡。 60°C 烘箱烘 72 小时。
10. 切片: 徕卡 EM-UC6 切片机, 钻石刀切取 100 nm 的超薄切片, 铜网捞片, 干燥

备用。

11. 染色：醋酸铀染液避光染色30分钟，蒸馏水充分清洗，吸干铜网上残留的水分，柠檬酸铅染液密闭（NaOH 除去CO₂）染色15分钟，蒸馏水充分清洗，滤纸吸干铜网上残留的水分。
12. 观察：电镜（JEOL 1400）观察并记录。

用电镜氯化铯（CeCl₃）染色法检测H₂O₂发生的定位时，样品取材后应先放入10 mM CeCl₃（现配现用）中，抽真空3次，每次30秒，暗处静置染色1小时后再换至前固定液中。且用0.1 M CBS代替1/15 M PBS，锇酸室温固定30分钟。制作叶片的电镜样品用Spurr包埋剂。

制作原生质体电镜样品，前固定液，PBS和锇酸中都加入了0.3 M甘露醇。操作过程中离心速度为800 rpm离心2分钟。用Epon 812包埋剂。

LM-TUNEL^[92]

1. 前期准备：将水浴锅温度设定为37℃；准备冰盒；Working strength TdT Enzyme（冰上）：77 μl Reaction buffer + 33 μl TdT Enzyme；Working strength Stop/wash Buffer（冰上）：0.3 ml Stop/wash buffer + 10.2 ml dH₂O；Working strength Anti-Digoxigenin fluorescein conjugate（冰上，避光）：112 μl Blocking solution + 98 μl Anti-Digoxigenin fluorescein conjugate。
2. 固定细胞：将处理的原生质体取至2 ml离心管中，600 rpm离心2分钟，弃上清，加入1 ml 4% PFA（0.1 M PBS，0.3 M甘露醇）中冰上固定30分钟。
3. 600 rpm离心2分钟，弃上清，加入1 ml冰上预冷的0.1 M PBS清洗。
4. 600 rpm离心2分钟，弃上清，加入1 ml冰上预冷的70%酒精重悬。
5. 600 rpm离心2分钟，弃上清，加入1 ml 0.1 M PBS清洗两次。
6. 加入75 μl Equilibration buffer重悬，600 rpm离心2分钟，弃上清。
7. 加入55 μl Working strength TdT Enzyme 37℃孵育30分钟。
8. 加入1 ml Working strength Stop/wash Buffer混匀，600 rpm离心2分钟，弃上清，再加入1 ml Working strength Stop/wash Buffer重悬。
9. 600 rpm离心2分钟，弃上清，加105 μl Working strength Anti-Digoxigenin fluorescein conjugate，室温避光处理30分钟。

10. 0.5 ml 0.1 M PBS 清洗两次。
11. 终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI 染色 10 分钟。
12. Zeiss 荧光显微镜观察拍照。

EM-TUNEL^[92]

1. 实验前配制试剂: NaIO_4 (5 g NaIO_4 +40 ml dH_2O), 完全溶解后过滤, 4 $^\circ\text{C}$ 保存; 0.02 M Tris-HCl: 称取 0.4844 g Tris 溶于蒸馏水中, 2 M HCl 定 pH 值至 7.4, 定容至 200 ml, 4 $^\circ\text{C}$ 保存; Tris-BSA (0.05 g BSA + 50 ml 0.02 M Tris-HCl, pH 7.4), 溶解后过滤, 分装于 1.5 ml 离心管中, 封口, -20 $^\circ\text{C}$ 冻存, 避免反复冻融; 0.5 % BSA-TBS (0.25 g BSA + 0.3025 g Tris + 0.435 g NaCl +50 ml dH_2O), 溶解后过滤, 分装于 1.5 ml 离心管中, 封口, -20 $^\circ\text{C}$ 冻存, 避免反复冻融。
2. 前期准备: 封口膜, 培养皿, 载玻片, 滤纸, 计时器; 在培养皿中放入滤纸, 弄湿后放入 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中备用; Working strength TdT Enzyme (冰上): 77 μl Reaction buffer + 33 μl TdT Enzyme; Working strength Stop/wash Buffer (冰上): 0.3 ml Stop/wash buffer + 10.2 ml dH_2O ; The labeling antibody: 15 μl 10 nm gold-antidigoxigenin-conjugate + 185 μl Tris-BSA。
3. 氧化: 每镍网加 30 μl NaIO_4 氧化 2 分钟。
4. 清洗: 灭菌 dH_2O 清洗 2 次, 每次 5 分钟。
5. 平衡: 每镍网加 15-20 μl Equibration buffer, 平衡 15-30 秒。
6. 加一抗: 10 μl Working strength TdT Enzyme 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 小时。
7. 终止反应: 20 μl Working strength Stop/wash Buffer 37 $^\circ\text{C}$ 反应 30 分钟。
8. 清洗: Tris-BSA 清洗 3 次, 每次 5 分钟。
9. 清洗: 0.5 % BSA-TBS 室温清洗 15 分钟 (置于培养皿中保持湿润)。
10. 加二抗: 20 μl gold-conjugate reaction 室温孵育 1 小时 (置于培养皿中保持湿润)。
11. 清洗: Tris-BSA 清洗 5 分钟后 dH_2O 清洗 2 次, 每次 5 分钟。
12. 染色: 醋酸铀染液避光染色 15 分钟, 蒸馏水充分清洗, 吸干铜网上残留的水分, 柠檬酸铅染液密闭 (NaOH 除去 CO_2) 染色 5 分钟, 蒸馏水充分清洗, 滤纸吸干铜网上残留的水分。
13. 观察: 电镜 (JEOL 1400) 观察并记录。

Trypan blue 染色

1. 取新鲜叶片，置于含10 mg Trypan blue + 40 ml 乳酸酚溶液中，煮沸2分钟。
2. 95%乙醇：乳酸酚溶液为2: 1的混合液中清洗2分钟。
3. 50%乙醇洗涤后保存于水中。
4. 将叶片置于载玻片上显微镜下观察。

RT-PCR

提取原生质体RNA

1. 将已处理的原生质体取出转入DEPC处理的离心管中，加入0.5 ml Trizol提取液震荡摇匀，室温静置5分钟。
2. 加入0.1 ml 氯仿，剧烈震荡15秒，室温静置5分钟。
3. 4℃，12000 g离心15分钟，溶液分为两层，下层为酚-氯仿浅红色液层，取上层液体移入干净的DEPC处理的离心管中。
4. 加0.5 ml -20℃预冷的异丙醇，轻柔混匀，室温沉淀10分钟。
5. 4℃，12000 g离心10分钟，RNA沉淀管壁和管底，弃上清。
6. 加1 ml 75%乙醇洗涤沉淀，4℃，7500 g离心5分钟。
7. 弃乙醇，室温干燥。
8. 加适量DEPC·H₂O溶解RNA，储藏于-80℃冰箱备用。

提取植株总RNA

1. 取注射了SWCNTs或MOPS的叶片约50mg在液氮中研磨至细粉，转入预冷的1.5 ml离心管，加入1 ml Trizol提取液震荡摇匀，室温静置5分钟。
2. 加入0.2 ml 氯仿，剧烈震荡15秒，室温静置5分钟。

其余步骤与原生质体RNA提取方法一致。

引物设计

根据网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 提供的*ArAPX1*，*ArMSD1*和*ArPRI*基因登录号NM_100663、NM-111929、NM-127025全长cDNA序列，利用Primer 5.0软件设计如下引物：

APX1-F: 5'-AGAACTACCCAACCGTGAGC-3'

APX1-R: 5'-TATCCTTGTGGCATCGTCCC-3'

MSD1-F: 5'-GAACCTTGCTCCTTCCAGTG-3'

MSD1-R: 5'-CCTTCTCATAAACCTCGCTTG-3'

PR1-F: 5'-GTGCTCTTGTTCTTCCCTCG-3'

PR1-R: 5'-AGCCTTCTCGCTAACCCACA-3'

用 β -tubulin基因作为内参，设计引物如下：

β -tubulin-F: 5'-GAGGGAGCCATTGACAACATCTT-3'

β -tubulin-R: 5'-GCGAACAGTTCACAGCTATGTTCA-3'

逆转录反应体系

RNase Free H ₂ O	8 μ l
5 \times RT buffer	4 μ l
dNTP mixture (各10 mM)	2 μ l
RNase Inhibitor (10 u/ μ l)	1 μ l
Primer Oligo(dt)20(10 μ M/ μ l)	1 μ l
RNA	3 μ l
ReverTra Ace	1 μ l
<hr/>	
Total Volume	20 μ l



42°C 20分钟



99°C 5分钟



4°C 5分钟

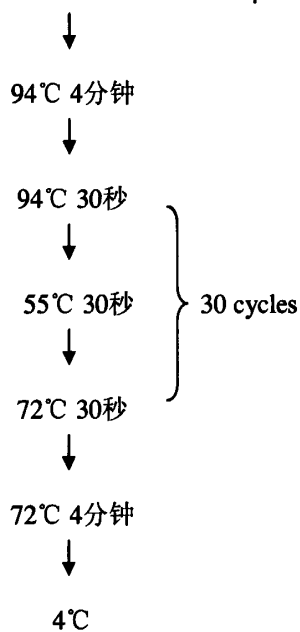


瞬间离心

反应后至于-20°C保存

PCR反应体系

cDNA	1 μ l
primer R	2 μ l
primer F	2 μ l
2.5 mM dNTPs	1.6 μ l
10 \times PCR buffer	2 μ l
灭菌超纯水	11.2 μ l
rTaq (5 u/ μ l)	0.2 μ l
<hr/>	
Total volume	20 μ l



第三章 结果

3.1 SWCNTs 影响原生质体的存活率

为了研究 SWCNTs 是否影响原生质体的活性, 参照相关文献^[26], 我们首先设计了一系列 SWCNTs 的浓度梯度 (5 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$), 光照条件下处理拟南芥野生型原生质体和水稻黄化苗原生质体, 在不同处理时间段取样, FDA 染色, 荧光显微镜下血球计数板计数, 统计细胞存活率。实验结果表明, SWCNTs 在一定程度上能影响原生质体的活性, 并呈现浓度依赖性关系。如图 1-1 所示, 拟南芥原生质体在 SWCNTs 处理后 24 小时后活性出现了不同程度的下降, 而 SWCNTs 处理水稻原生质体 36 小时后也出现了类似的结果 (如图 1-2)。由于 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 处理原生质体后细胞死亡速度适中, 为较合适的处理浓度, 在之后的实验中, SWCNTs 均采用 25 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度。图 1-3 显示用 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 处理拟南芥原生质体 6 小时后, 细胞存活率出现了比较明显的下降, 大约 25% 的原生质体死亡, 但处理 48 小时后细胞存活率与处理 6 小时相比没有明显变化, 水稻原生质体处理也显示出相似的结果。上述数据表明高浓度 SWCNTs 对拟南芥和水稻原生质体活性有影响且这种影响跟处理时间没有很明显的依赖关系。

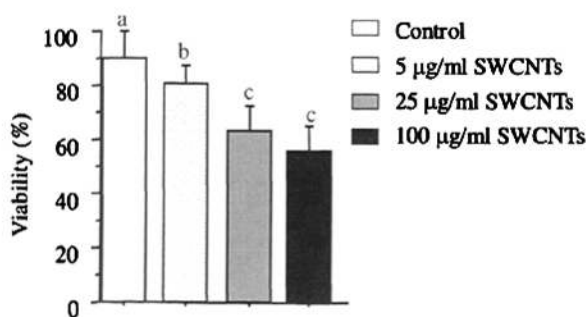


图 1-1 不同浓度 SWCNTs 处理拟南芥野生型原生质体 24 小时后对细胞存活率的影响

Figure 1-1 *Arabidopsis* protoplast viability determined by FDA staining after 24 hours different-concentration of SWCNTs treatment. Letters indicate that values of viability differed in Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, a post hoc multiple t test ($P < 0.005$). Error bars indicate standard deviations. Control treatment was with W5 media (the solvent for SWCNTs).

All experiments were repeated at least three times with similar results.

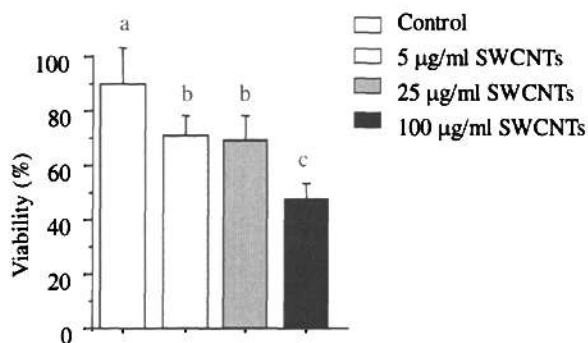


图 1-2 不同浓度 SWCNTs 处理水稻原生质体 36 小时对细胞存活率的影响

Figure 1-2 Rice protoplast viability determined by FDA staining after 36 hours different-concentration of SWCNTs treatment. Letters indicate that values of viability differed in Fisher's PLSD test, a post hoc multiple t test ($P < 0.005$). Error bars indicate standard deviations. Control treatment was with W5 media (the solvent for SWCNTs). All experiments were repeated at least three times with similar results.

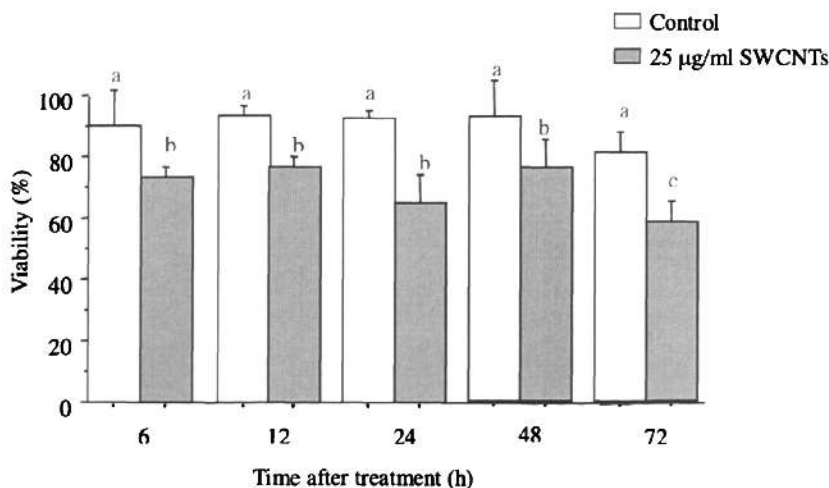


图 1-3 25 µg/ml SWCNTs 处理野生型拟南芥原生质体后不同时间段的细胞存活率

Figure 1-3 *Arabidopsis* protoplast viability after 25 µg/ml SWCNTs treatment. Letters indicate that values of viability differed in Fisher's PLSD test, a post hoc multiple t test ($P < 0.005$). Error bars indicate standard deviations. Control treatment was with W5 media (the solvent for SWCNTs). All experiments were repeated at least three times with similar results.

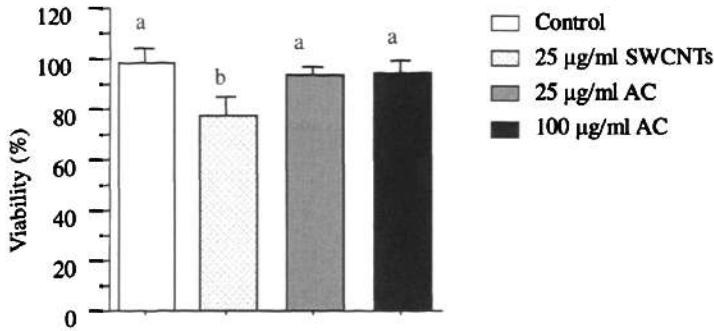


图 1-4 SWCNTs 与活性炭 (AC) 处理野生型拟南芥原生质体 24 小时后的细胞存活率
 Figure 1-4 *Arabidopsis* protoplast viability after 24 hours of 25 µg/ml SWCNTs and different concentration of activated carbon (AC) treatments. Letters indicate that values of viability differed in Fisher's PLSD test, a post hoc multiple *t* test ($P < 0.005$). Error bars indicate standard deviations. Control treatment was with W5 media (the solvent for SWCNTs and AC). All experiments were repeated at least three times with similar results.

为了验证 SWCNTs 引起原生质体死亡是否由其纳米尺寸引起, 我们用同样是碳成分的非纳米材料活性炭 (activated carbon, AC) 处理野生型拟南芥原生质体, 选择 25 µg/ml 和 100 µg/ml 两个浓度与 25 µg/ml SWCNTs 同时处理, 检测处理 6 h, 12 h, 24 h 和 48 h 原生质体的活性, 结果显示活性炭对原生质体的活性没有影响, 如图 1-4 所示, 处理 24 小时后, 25 µg/ml SWCNTs 处理的原生质体活性下降到 76% 左右, 而 25 µg/ml 和 100 µg/ml 活性炭处理的原生质体活性还保持在 97% 左右, 与对照无明显差异。该实验结果表明碳纳米管的纳米尺寸是影响原生质体活性的重要因素。

Joseph 和 Morrison 认为在不久的将来很可能利用纳米颗粒增加农药和除草剂的功效, 降低农药和除草剂的剂量^[97]。为了研究 SWCNTs 是否能促进死亡诱导剂诱导原生质体死亡的效率, 我们选用 C2-神经酰胺 (C2-Ceramide) 和 PPIX(protoporphyrin IX, 原卟啉) 分别与 25 µg/ml SWCNTs 组合处理拟南芥原生质体。C2-神经酰胺是人工合成的短链神经酰胺化合物, 被广泛用于神经酰胺介导的细胞死亡研究。PPIX 是一种常见的诱导植物细胞程序性死亡的诱导剂。根据相关文献^[99]及本实验室研究数据, 选择 50 µM C2-神经酰胺和 10 µM PPIX 分别与 25 µg/ml SWCNTs 组合处理原生质体。如图 1-5 显示, 25 µg/ml SWCNTs 与 50 µM C2-神经酰胺组合处理原生质体 48 小时后的细胞活性, 与 50 µM C2-神经酰胺单独处理原生质体 48 小时细胞活性相比, 没有明显差异。25 µg/ml SWCNTs 与 10 µM PPIX

组合实验也显示类似的结果（图 1-6）。上述数据表明 SWCNTs 不能促进死亡诱导剂诱导原生质体死亡的效率。

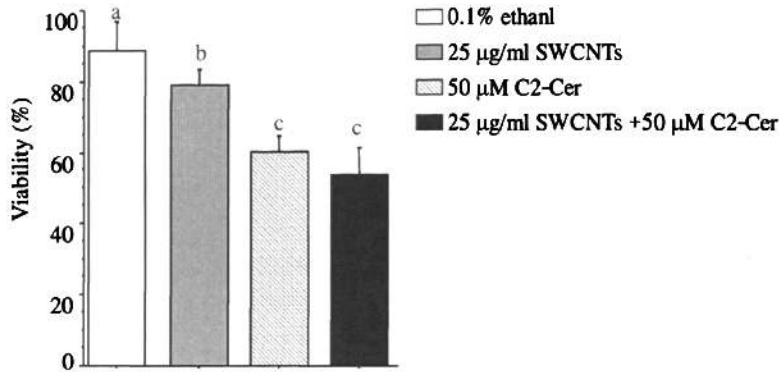


图 1-5 25 µg/ml SWCNTs与50 µM C2-Ceramide组合处理拟南芥原生质体48小时后的细胞存活率

Figure 1-5 *Arabidopsis* protoplast viability after 25 µg/ml SWCNTs and 50 µM C2-Ceramide treatment at 48 hours. Letters indicate that values of viability differed in Fisher's PLSD test, a post hoc multiple *t* test ($P < 0.005$). Error bars indicate standard deviations. All experiments were repeated at least three times with similar results.

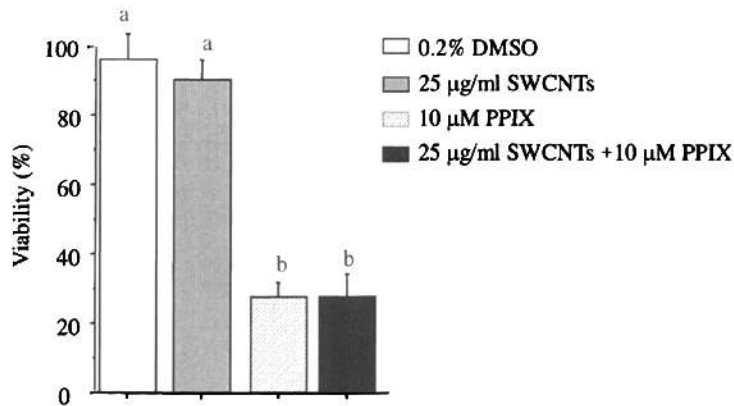


图 1-6 25 µg/ml SWCNTs与10 µM PPIX组合处理拟南芥原生质体4小时后的细胞存活率

Figure 1-6 *Arabidopsis* protoplast viability after 25 µg/ml SWCNTs and 10 µM protoporphyrin IX (PPIX) treatment at 4 hours. Letters indicate that values of viability differed in Fisher's PLSD test, a post hoc multiple *t* test ($P < 0.005$). Error bars indicate standard deviations. All experiments were repeated at least three times with similar results.

为了检测SWCNTs对拟南芥植株组织水平的影响，我们选取玫瑰型叶片，用记号笔在其叶柄处点一点作为标记，1 ml注射器（除去针头）吸入25 µg/ml SWCNTs

或20 mM MOPS，左手食指托着叶片的表面，注射器顶端抵住叶片背面，慢慢推动注射器让试剂通过气孔进入叶片，可见水渍状蔓延至整个叶片即可。注射器抵住的位置不能压住叶片主脉。处理后的叶片用台盼蓝染色后在体式镜下观察拍照。如图1-7所示，注射25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs 3天后的拟南芥叶片并没有显示有细胞死亡的现象，与注射20 mM MOPS的叶片没有明显差异。

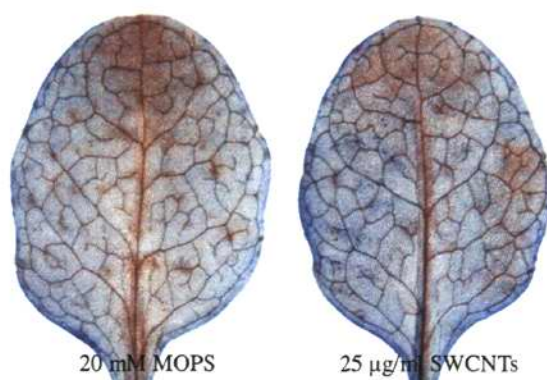


图 1-7 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs注射拟南芥叶片3天后台盼蓝染色

Figure 1-7 Detect *Arabidopsis* leaves cell death by Trypan blue staining after infiltrated with 20 mM MOPS (solvent of SWCNTs) and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs for 72 h. No macroscopic cell death was visible after infiltration with 20 mM MOPS and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs.

3.2 SWCNTs 引起的细胞形态变化

为了进一步分析 SWCNTs 处理后原生质体细胞形态的变化，我们用 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs 处理原生质体后在倒置荧光显微镜 (Carl Zeiss, Axio Observer Z1) 下观察并用 CCD (AxioCam MRm) 拍照。在实验过程中我们发现，用 SWCNTs 处理原生质体一段时间后，SWCNTs 团周围开始聚集死细胞，这与在动物细胞中的研究结果一致^[26, 31]。我们将 5 个或 5 个以上死细胞聚集在一起的聚集物称为死细胞团，标准见图 2-1。如图 2-2 所示，在处理 3 小时后 SWCNTs 处理组的死细胞团数量就与对照组的数量产生明显差异，且死细胞团的数量随着处理时间延长而明显增多，处理 12 小时后，SWCNTs 处理组死细胞团的数量是对照组的 15 倍。并且，死细胞团一般都围绕在 SWCNTs 周围。从图 2-3 可以看出，处理组死细胞团的大小随着处理时间的延长有不断增大的趋势。

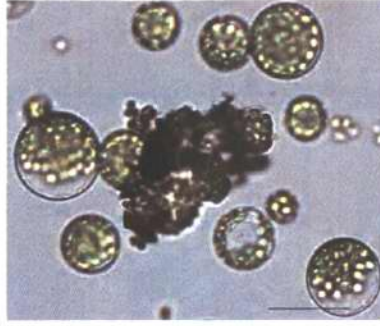


图 2-1 死细胞团标准图

Figure 2-1 Criterion for judging a cell cluster. Bar = 50 μ m.

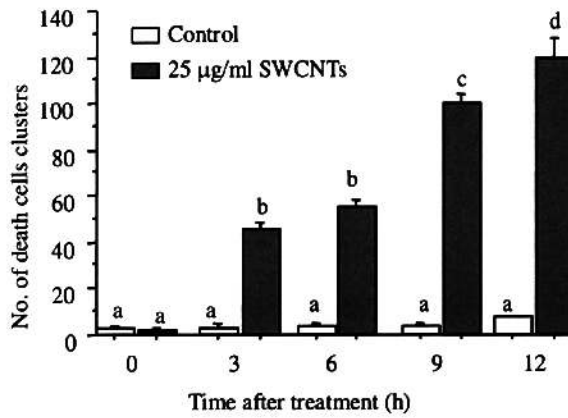


图 2-2 25 μ g/ml SWCNTs处理拟南芥原生质体不同时间死细胞团数量的变化

Figure 2-2 Statistical analysis of number of cell clusters induced by SWCNTs at different times. Letters indicate different values using Fisher's PLSD test ($P < 0.001$). Error bars indicate standard deviations. Controls were treated with W5 media (solvent for SWCNTs). This experiment was repeated three times with similar results.

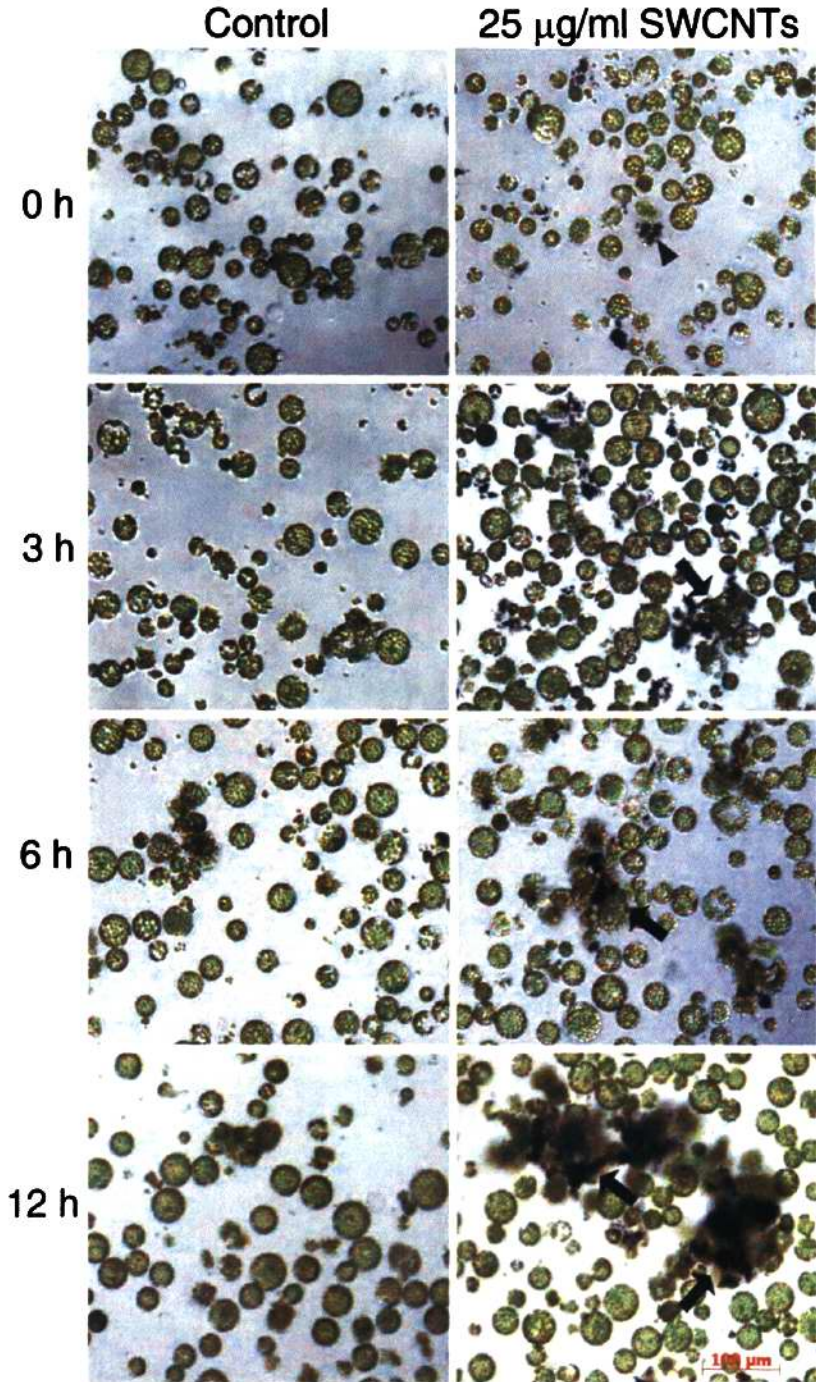


图 2-3 25 μg/ml SWCNTs 处理拟南芥原生质体不同时间段细胞形态变化

Figure 2-3 Abnormal aggregation of protoplast cells cultured with SWCNTs for different durations. Note that green cell clusters (arrows) are surrounded by black nanoparticles (arrowhead). Bar = 100 μm.

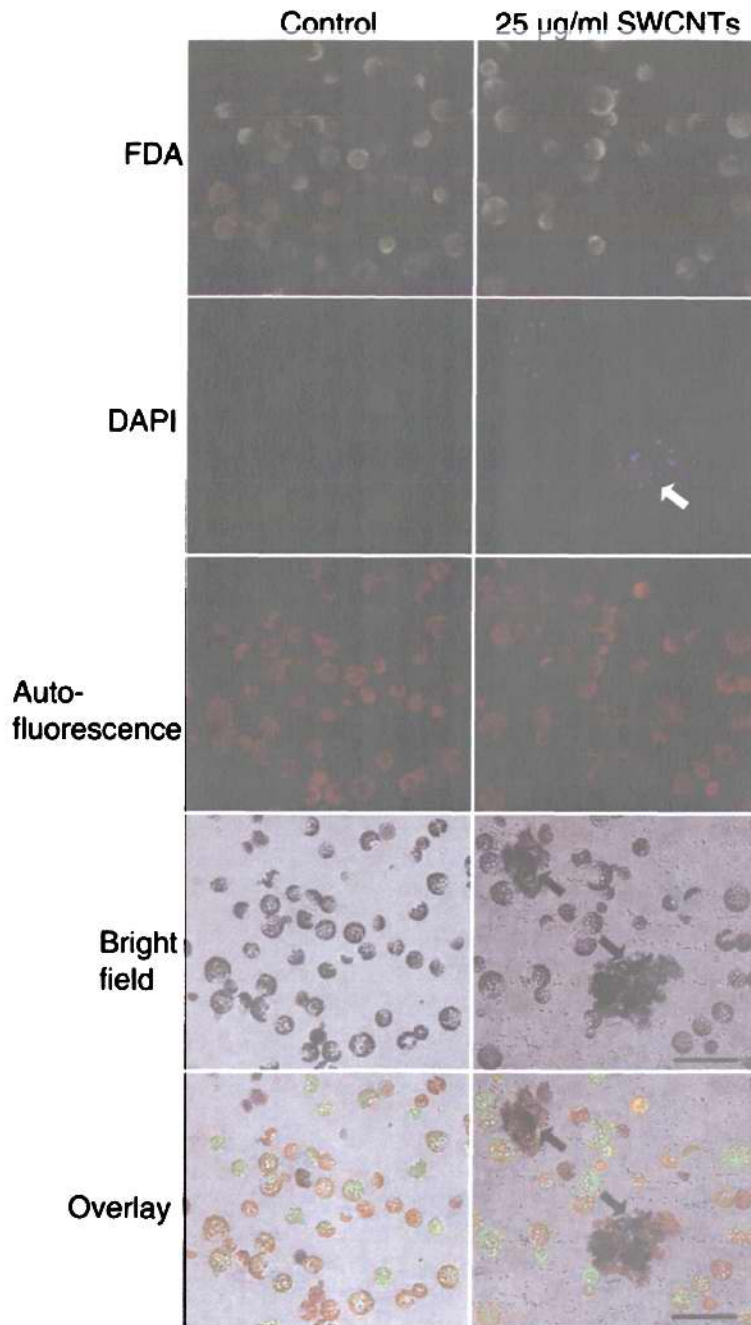


图 2-4 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 处理拟南芥原生质体 12 小时后细胞形态变化

Figure 2-4 Induction of cell death in cell clusters after SWCNT treatments. *Arabidopsis* protoplasts were cultured with or without 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs for 12 h and double stained with FDA and DAPI to distinguish living cells from dead cells. Micrographs were obtained with multichannel microscopy. Red images represent protoplast autofluorescence. Arrows indicate dead cell clusters. Bar = 100 μm .

我们采用 FDA-DAPI 双重染色法验证碳纳米管周围围绕的细胞是否死细胞, 染色后在正置荧光显微镜 (Carl Zeiss, Axio Imager A1) 下观察活细胞和细胞核的形态并用 CCD (AxioCam MRc) 拍照。如图 2-4 所示, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs 处理拟南芥原生质体 12 小时后碳纳米管周围的大部分细胞没有染上 FDA, 却染上了 DAPI, 说明纳米管周围围绕的大部分细胞是死细胞。

上述实验表明 SWCNTs 能够引起原生质体聚集在其周围, 为了检测 SWCNTs 注射进入成熟拟南芥叶片后是否引起植株形态的变化, 我们分别注射 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs 进入拟南芥成熟叶片, 并注射 SWCNTs 溶剂 20 mM MOPS 做为对照。注射 4 天后观察并拍照, 结果表明, SWCNTs 不影响拟南芥植株形态 (如图 2-5)。

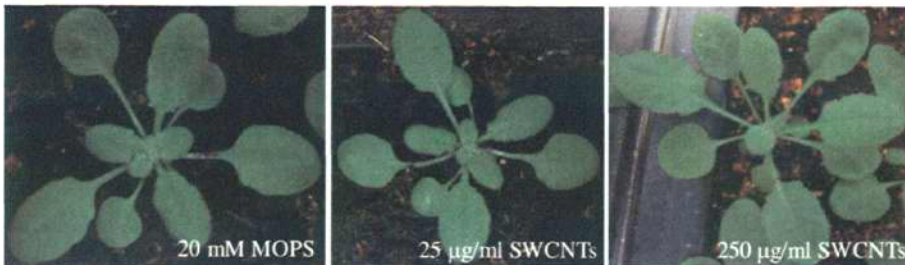


图 2-5 SWCNTs 注射拟南芥叶片 4 天后形态无明显变化

Figure 2-5 *Arabidopsis* leaves were infiltrated with 20 mM MOPS (solvent of SWCNTs) and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs for 96 h. No macroscopic cell death was visible after infiltration with 20 mM MOPS and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs.

3.3 SWCNTs 诱导植物发生 PCD

许多研究表明 SWCNTs 会诱导细胞发生凋亡^[26, 32-34]。为了检测 SWCNTs 是否会诱导原生质体发生 PCD, 用 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs 处理拟南芥原生质体, 参照 Yao 等的实验方法^[92], 用 TUNEL 试剂盒检测。结果如图 3-1, 处理 16 小时后, 被 DAPI 染色的核却没有连接上 FITC, 在原生质体系统目前还没有实验结果证明 SWCNTs 诱导细胞产生 PCD。

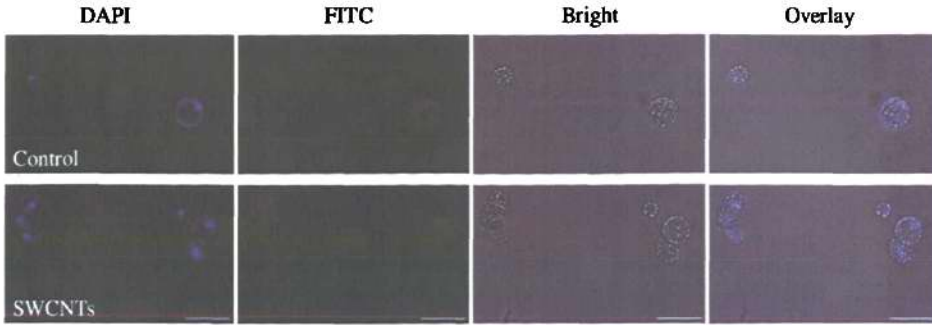


图 3-1 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 处理 16 小时后的原生质体 LM-TUNEL 检测
Figure 3-1 LM-TUNEL assay of protoplast after treatment of 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs for 16 h.
Bar = 50 μm .

为了进一步研究 SWCNTs 对植物组织水平的影响，将注射了 250 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 和 20 mM MOPS 对照的拟南芥成熟叶片制成超薄切片，醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后在透射电子显微镜 (JEOL 1400) 下观察细胞的超微结构形态变化并拍照。电镜观察结果显示注射 250 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 72 小时的处理组中约有 50% 的细胞核出现了异染色质凝缩并边缘化现象 (如图 3-2 中的 B、C)，而 MOPS 对照组中细胞核出现该现象的比例约为 19.23%。为了确定有异染色质凝缩现象的细胞是否发生了 PCD，我们运用 EM-TUNEL 这种检测 PCD 的典型方法，实验具体操作参考 Yao^[92]。实验结果显示，大部分 250 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 处理 72 小时的细胞核异染色质凝缩部位能标记上金颗粒 (如图 3-2E)，在对照组中却很少发现金颗粒标记，统计数据表明处理组异染色质凝缩部位标上金颗粒的密度跟对照组有明显差异 (图 3-2F)。尽管在光镜下没有观察到明显的细胞死亡，但是 SWCNTs 能诱导植物异染色质凝缩以及 DNA 发生有序断裂，有可能引起植物细胞发生 PCD。

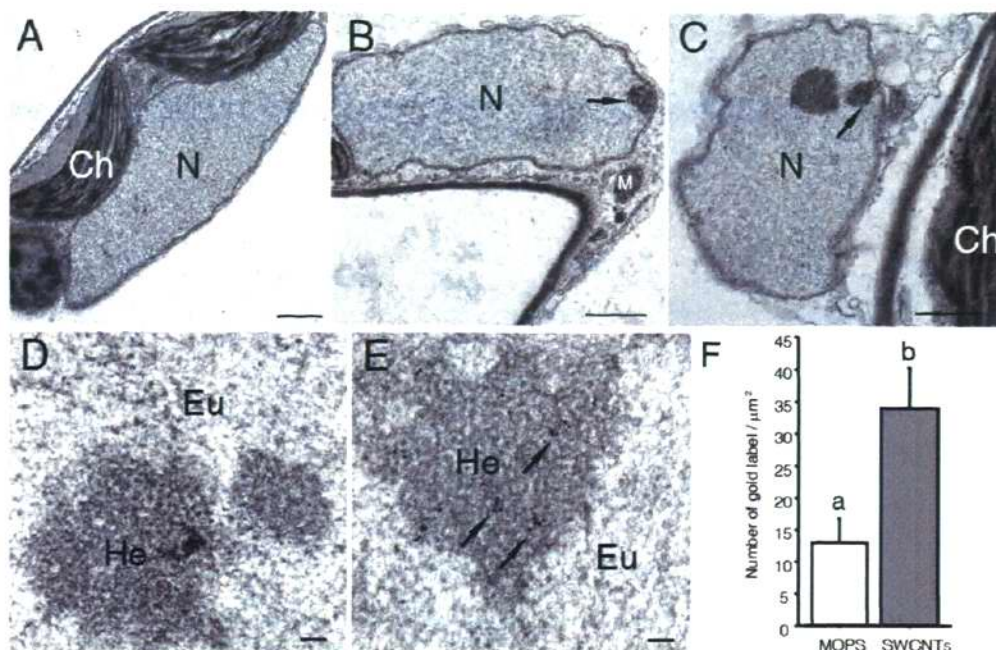


图 3-2 SWCNTs 对植物细胞核的影响

Figure 3-2 Effect of SWCNTs on plant leaves. (A) Mesophyll cell nucleus 48 h after injection with 20 mM MOPS. Note lack of condensed chromatin. (B, C) Mesophyll cell nuclei 48 h after injection with 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs. Arrows indicate an aggregate of condensed chromatin. (D, E) EM-TUNEL analysis of DNA strand breaks in nuclei of mesophyll cells from plants 72 h after injection with 20 mM MOPS (D) and 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs (E). Arrows indicate gold-labeled DNA strand breaks. (F) Mean density of gold-labeled DNA strand breaks in the nuclei of the cells determined by EM-TUNEL assay after *Arabidopsis* leaves were infiltrated with 20 mM MOPS or 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SWCNTs. About 20 mesophyll cell nuclei were counted in each treatment. Letters indicate different values using Student's *t*-test ($P < 0.05$). Error bars indicate standard errors. Bar in (A-C) = 1 μm , in (D and E) = 100 nm.

3.4 SWCNTs 诱导 ROS 的产生

超氧阴离子 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 等细胞活性氧 (ROS) 的产生和增多将导致细胞衰老或凋亡, 因此测量细胞内 ROS 的含量在毒理学研究中有一定的意义。根据检测 ROS 的不同可以选择不同的荧光探针。常用的荧光探针有 CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester), 其原理是不发荧光的 CM-H₂DCFDA 进入细胞后能被存在的过氧化物、氢过氧化物等氧化分解为 dichlorofluorescein (DCF) 而产生荧光, 其反应灵敏, 荧光强度与 ROS 的浓度呈线性关系。

为了检测 SWCNTs 是否引起原生质体的氧化应激反应,选择 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 处理拟南芥原生质体,对照为完全空白对照,不同时间段处理组 and 对照组各取 100 μl 原生质体用终浓度为 1 μM 的 CM-H₂DCFDA 暗中染色 10-15 分钟,用 W5 培养液洗涤后重悬,取约 40 μl 原生质体涂于干净的载玻片上,选择固定的激发光强度和曝光时间,在荧光显微镜下拍照。之后每个时间段处理组和对照组各取 300 个细胞测量其荧光强度,进行数据分析。实验结果显示对照组和处理组的 ROS 水平并无明显差异(图 4-2)。

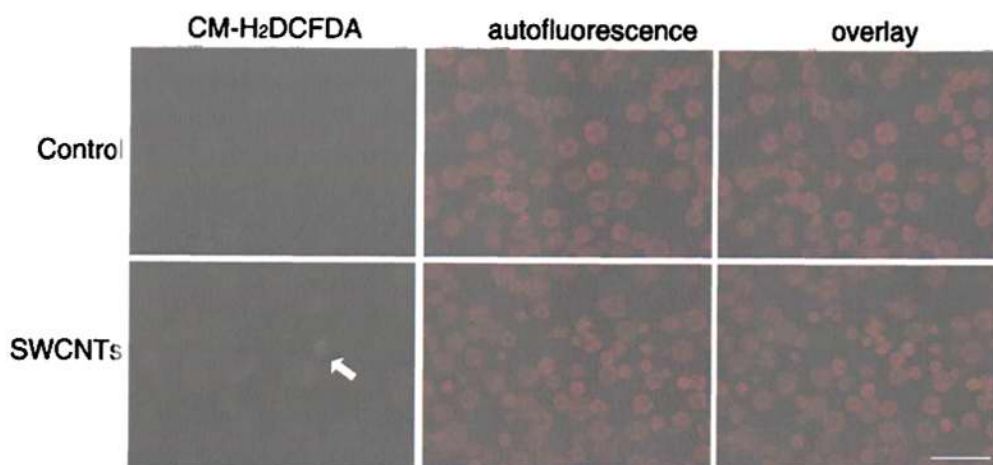


图 4-1 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 处理原生质体 6 小时后 ROS 无明显变化

Figure 4-1 Effect of SWCNTs on ROS generation. Confocal micrographs of ROS generation in SWCNTs-treated cells. Protoplasts from 22-d-old *Arabidopsis* leaves were treated with (SWCNTs) or without (control) 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs for 6 h and then stained with CM-H₂DCFDA (green). Red signals indicate chlorophyll autofluorescence. Images were observed with fluorescence microscopy. Bar = 100 μm .

为了进一步验证注射 50 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 后拟南芥植株体内 ROS 的产生,参照 Yao 等^[95]的方法,通过 CeCl₃ 沉淀对 H₂O₂ 进行亚细胞定位。在电子显微镜下明显观察到,注射对照 MOPS 的叶片,叶肉细胞中 H₂O₂-CeCl₃ 沉淀颗粒很少,只在细胞壁上有少量分布(图 4-2A)。从图 4-2B 图可以看出,注射 50 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 12 小时后叶肉细胞细胞壁上有许多 H₂O₂-CeCl₃ 沉积,着色较深,细胞膜上没有 H₂O₂-CeCl₃ 沉积。在细胞壁和细胞膜之间有个类似胼胝质的结构,也没有 H₂O₂-CeCl₃ 沉积。注射 36 小时后可同时在细胞壁和细胞膜上观察到 H₂O₂-CeCl₃ 沉积(如图 4-2C),并且还观察到类似内吞作用的结构。这些数据显示植物细胞可能通过内吞作用将 SWCNTs 吞入细胞从而诱导 ROS 的产生。

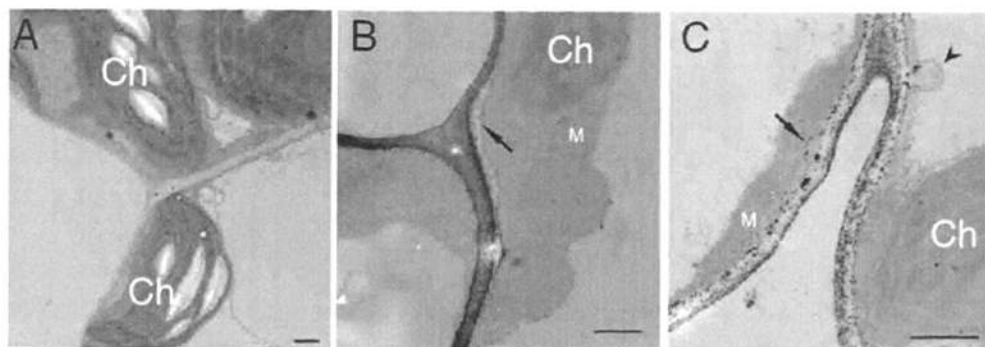


图 4-2 SWCNTs 注射拟南芥叶片后 H_2O_2 细胞化学定位

Figure 4-2 Cytochemical localization of H_2O_2 using cerium chloride staining. Leaves were infiltrated MOPS control at 36 h (A) and 50 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs at 12 h (B) or 36 h (C). Arrow in (B) indicates plasma membrane deposition, in (C) indicates cerium (or H_2O_2) deposition. Arrowhead indicates endocytosis-like structure. Ch, Chloroplast; Eu, euchromatin; He, heterochromatin; M, mitochondrion; N, nucleus. Bar in A-C = 1 μm .

植物细胞具有多种清除 ROS 的酶，如超氧化物歧化酶 (SOD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、过氧化氢酶 (CAT) 等，当植物体内产生大量 ROS 时，这些酶的表达量会大幅提升，使细胞免受 ROS 的毒害。SOD 是植物抗氧化系统的第一道防线，环境胁迫能导致植物体内超氧化物的大量产生，植物依靠 SOD 解除 ROS 的毒害作用^[100]。在高等植物中，SOD 根据其辅基部位结合的金属离子的不同分为三类：Mn-SOD、Fe-SOD、Cu/Zn-SOD^[101]，其中 Mn-SOD 可简称为 MSD1。APX 是清除 H_2O_2 的主要酶类，根据其在植物细胞中的定位分为四类：类囊体 (thylakoid) APX、基质 (stromal) APX、微体 (microsomal) APX 和细胞质 (cytosolic) APX，其中细胞质 APX 又有 APX1, APX2 和 APX6 三种^[102]。APX1 在调节植物细胞体内 H_2O_2 水平和信号方面起着关键作用，尤其表现在保护叶绿体免受 ROS 损害方面^[103]。PR1 是由病原体或 SA 诱导的 PR 蛋白中的一种，通常作为植物系统获得性抗性 (Systemic Acquired Resistance, SAR) 的标志^[104]。ROS 能调节紫外线-B 引起的 PR1 积累^[105]。

为了研究 SWCNTs 是否能诱导原生质体和植物组织水平中 ROS 相关基因的表达发生变化，我们采用半定量 RT-PCR 的方法，以 SWCNTs 处理过的拟南芥原生质体和植株为材料进行检测。提取原生质体和叶片的 RNA，通过反转录合成 cDNA 第一链，以此为模板进行 RCR 扩增。研究结果显示，25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 处理后的原生质体中这些基因的表达跟对照相比没有明显的变化 (如图 4-3)。在叶片水平，

注射 250 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 24 小时和 48 小时后, APX1 和 MSD1 与注射 MOPS 的对照相比表达量有了少量的提高, 但整体趋势不明显 (如图 4-4)。

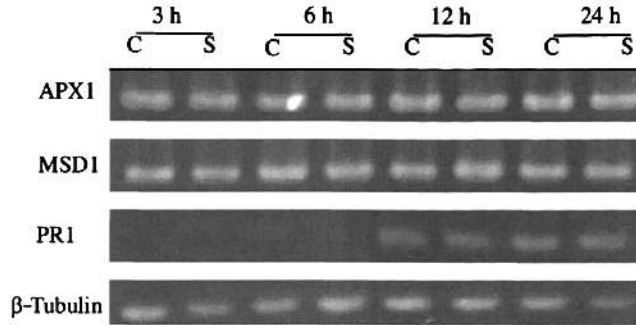


图 4-3 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 处理原生质体后相关基因表达变化

Figure 4-3 Agarose gel electrophoresis of semiquantitative RT-PCR analysis of expression of *APX1*, *MSD1* and *PR1* in protoplasts cultured with 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs for indicated times. C: control, S: 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs.

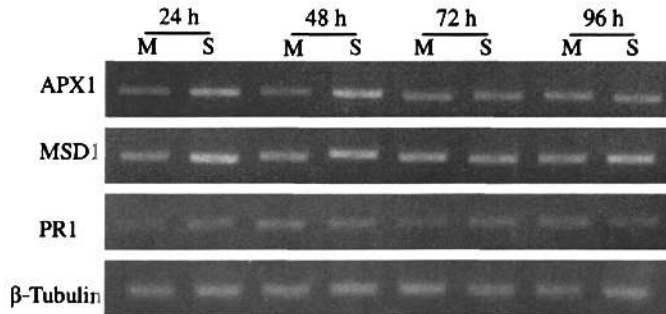


图 4-4 250 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 注射拟南芥叶片后相关基因表达变化

Figure 4-4 Agarose gel electrophoresis of semiquantitative RT-PCR analysis of expression of *APX1*, *MSD1* and *PR1* in plant leaves after infiltrated with 20 mM MOPS or 250 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs for indicated times. M: 20 mM MOPS, S: 250 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs in 20 mM MOPS.

第四章 讨论

碳纳米管具备许多特异的力学、电学和化学性能,近些年来随着研究的深入其广阔的应用前景也不断展现出来,在生物医学领域方面的应用也越来越引起人们的广泛关注。同时也有越来越多的研究结果表明碳纳米管对生物体具有潜在的毒性效应,哺乳动物细胞研究显示,碳纳米管能够抑制细胞增殖,并且呈剂量和时间依赖性关系^[26, 27];碳纳米管能诱导活性氧产生^[27-30],引起细胞聚集^[26, 31],诱导细胞发生凋亡^[26, 32-34]等。然而,目前为止,对它们的细胞毒理学研究开展还不够充分,有些结论还存在着相互矛盾的地方。

在植物方面, Lin 等(2009)首次利用多壁碳纳米管研究了对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 悬浮细胞系 T87 的细胞毒性^[57], 研究结果表明多壁碳纳米管处理细胞后, 细胞干重减少, 活性下降, 叶绿素含量减少, SOD 酶活性降低。根据 Joseph 和 Morrison 报道, 在农业生产中, 纳米技术在增强植物吸收养分能力, 增加农药和除草剂的功效, 降低农药和除草剂的剂量等方面有着可观的应用前景, 可以减少对环境的污染^[97]。Liu 等的研究发现单壁碳纳米管能穿过完整植物细胞的细胞壁和细胞膜进入到细胞内部, 并且能运输单链 DNA 分子进入植物细胞中^[61]。由此可见, 单壁碳纳米管作为运输载体应用到植物细胞中是很有可能。然而在应用之前正确评估碳纳米管的细胞毒性非常重要。

原生质体作为一种细胞水平的研究系统, 虽然没有细胞壁, 但研究表明, 不同植物材料所得的原生质体可以保持原组织的生理特征及对外界刺激的反应, 保持着细胞的全能性^[106], 可以取代植物组织作为实验材料。由于不受植物细胞壁的限制, 其质膜经一定处理可以摄取外源大分子物质(如 DNA、RNA、病毒等), 再加上均一性程度高, 短时间内可以获取大量的原生质体, 是植物基因工程和细胞生物学研究的理想材料^[98]。

在本研究中, 我们使用 SWCNTs, 从植物细胞和组织水平研究了纳米材料对植物的影响。用 SWCNTs 处理原生质体和植物组织后, 我们检测了细胞活性、形态变化、DNA 损伤、活性氧(ROS)产生和相关基因表达。与对照组相比, 我们发

现用 SWCNTs 处理的拟南芥和水稻原生质体存活率出现了明显的下降,用 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 处理了 24 小时的拟南芥原生质体和处理了 36 小时的水稻原生质体活性均下降到 70%左右,而用同样浓度的活性碳 (AC) 处理拟南芥原生质体 24 小时后细胞活性仍保持在 97%左右,跟对照相比没有明显差异,由此可见,并不是由于碳这种成分影响了原生质体的活性,而是由于碳纳米管的纳米尺寸。此外,在我们的研究中,我们发现 SWCNTs 诱导的细胞死亡与处理时间的关系不大,但呈剂量依赖性,而且在比较短的培养时间里 (3 小时),SWCNTs 从最初的均匀分布聚集成团,同时在其周围聚集植物死细胞 (如图 2-3),远离碳纳米管的细胞很少发生死亡,这种现象跟哺乳动物细胞和细菌的报道类似^[26, 31, 56]。Kang 等人提出碳纳米管跟微生物的物理接触导致细胞损伤是纳米材料的主要致死机制^[56]。我们推测随着 SWCNTs 处理时间的延长,在 SWCNTs 周围跟其直接接触的植物细胞开始死亡,并聚集在 SWCNTs 周围,从而孤立碳纳米管与其他活细胞,以防止进一步的伤害。再加上在处理过程中,SWCNTs 由于其本身电学性质而自动聚集成团^[107],总表面积从而减少,因此跟 SWCNTs 直接接触的细胞数目减少,细胞的活性也不再下降。然而,尽管目前的结果显示 SWCNTs 对细胞的毒性较低,在将其投入到商业化应用前必须确定其细胞毒性。

C2-神经酰胺 (C2-Ceramide) 和 PPIX (protoporphyrin IX,原卟啉) 分别与 25 $\mu\text{g/ml}$ SWCNTs 组合处理拟南芥原生质体结果显示碳纳米管并不能促进死亡诱导剂诱导原生质体死亡的效率。推测可能是因为处理时碳纳米管和 C2、PPIX 是分别加入原生质体中,并没有将 C2 或 PPIX 直接链接到碳纳米管,因此碳纳米管难以起到分子运输的作用,这一假设有待进一步的实验验证。

碳纳米管对哺乳动物细胞毒理学研究提出几种碳纳米管细胞毒性作用的可能机制。Manna 等报告认为碳纳米管刺激人角化细胞产生的活性氧能激活核因子 κB (NF- κB) 信号转导途径, NF- κB 从胞质转移至核内,与 DNA 结合后启动转录,与此同时活性氧释放到细胞外,刺激细胞分泌炎症因子 (TNF α) 和 IL-8,进入细胞凋亡通路,导致细胞死亡。用 SWCNTs 处理间皮细胞和角质形成细胞也观察到相似的 ROS 产生^[28, 29]。在本研究中,我们注射 SWCNTs 进入拟南芥叶片中,用氯化铈染色法检测出在细胞壁和细胞膜上有大量 H_2O_2 产生 (如图 4-2)。刚开始时氯化铈在细胞壁上沉积,随着处理时间的延长细胞膜上也有 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-CeCl}_3$ 沉积。而且

SWCNTs 还能诱导染色质凝缩，与对照组相比 EM-TUNEL 检测结果也是阳性的，表明细胞有可能发生了程序性细胞死亡。虽然 SWCNTs 长度较长，不是很容易穿透细胞壁进入植物细胞，但是在细胞膜上发现了 ROS 的积累，暗示有关 SWCNTs 细胞毒性的可能机制。之前有报道提出纳米颗粒是通过依赖于能量的细胞内吞作用穿过细胞膜的^[20, 21]。我们在电镜观察 SWCNTs 处理的完整细胞时也发现了一个类似内吞的结构（图 4-2C），这些数据显示 SWCNTs 有可能是通过内吞作用进入植物细胞。

近期一些研究表明其他纳米颗粒能进入植物细胞并在活细胞中充当运输系统^[60, 108, 109]。也有研究证明内在化的碳纳米管在细胞水平上是无毒的，跟生物体具有良好的适应性，因此很可能作为微型运输系统应用到植物和动物中^[19, 21, 58, 61]。事实上，在本研究中，虽然检测到染色质凝缩和 TUNEL 阳性结果，但是胁迫相关基因的表达并没有大幅度的改变，在 SWCNTs 处理的组织水平也没有观察到明显的细胞死亡，这些实验数据表明很少的细胞受到 SWCNTs 伤害。目前在体内和体外的实验结果表明，SWCNTs 通过机械刺激和氧化应激对原生质体和植物组织产生了不利影响，导致了一定量的细胞死亡。今后的研究应着重于观察碳纳米管是否穿透细胞，以及如何挽救 SWCNTs 颗粒对细胞的影响等方面。

结 论

1. 碳纳米管在一定程度上能影响拟南芥和水稻原生质体的活性,且这种影响呈现浓度依赖性的关系,但跟处理时间关系不大。

2. 碳纳米管能诱导原生质体聚集在其周围,而且其聚集的细胞为死细胞;注射了 SWCNTs 的植物叶肉细胞出现染色质凝缩和边缘化现象, TUNEL 检测结果显示阳性,表明叶肉细胞发生程序性细胞死亡。

3. 电镜氯化铯 (CeCl_3) 染色结果显示注射了 SWCNTs 的植物细胞壁和细胞膜上有大量 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-CeCl}_3$ 沉积,基因表达结果表明 ROS 相关基因超氧化物歧化酶 (MSD) 的表达有所上升,说明碳纳米管能诱导植物体内活性氧的积累。

参考文献

- [1] 刘太奇. 纳米空气净化技术: 化学工业出版社 2004.
- [2] Yang W, Peters J, Williams III R. Inhaled nanoparticles—A current review. *International journal of pharmaceutics*, 2008,356(1-2):239-247
- [3] Hoet P, Brüske-Hohlfeld I, Salata O. Nanoparticles – known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology*, 2004,2(1):12-27
- [4] Oberd rster G, Oberd rster E, Oberd rster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 2005,113(7):823-839
- [5] Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 2006,311(5761):622-627
- [6] 姚超, 张智宏, 林西平, 汪信. 纳米技术与纳米材料 (V)—防晒化妆品中的纳米二氧化钛. *日用化学工业*, 2003,33(5):333-336
- [7] Wolinsky H. Nanoregulation: A recent scare involving nanotech products reveals that the technology is not yet properly regulated. *EMBO reports*, 2006,7(9):858-861
- [8] Long T, Saleh N, Tilton R, Lowry G, Veronesi B. Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity. *Environ Sci Technol*, 2006,40(14):4346-4352
- [9] Colvin V. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 2003,21(10):1166-1170
- [10] Robert F. Nanomaterials show signs of toxicity. *Science*, 2003,300:243
- [11] Wiesner M, Lowry G, Alvarez P, Dionysiou D, Biswas P. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental science & technology*, 2006,40(14):4336-4345

- [12]Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 2007,4(1):26-49
- [13]锡环. 纳米材料的安全隐患. *江苏丝绸*, 2004(006):50-50
- [14]裘著革, 林治脚. 纳米尺度物质对生态环境的影响及其生物安全性的研究进展与展望. *生态毒理学报*, 2006,1(003):203-208
- [15]Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 1991,354(6348):56-58
- [16]孙静. 碳纳米管及其研究进展. *世界科学*, 2006(005):28-29
- [17]高素莲. 功能化多壁碳纳米管的细胞毒性研究: 山东大学; 2008.
- [18]Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005,9(6):674-679
- [19]Feazell R, Nakayama-Ratchford N, Dai H, Lippard S. Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum (IV) anticancer drug design. *J Am Chem Soc*, 2007,129(27):8438-8439
- [20]Kam N, Dai H. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J Am Chem Soc*, 2005,127(16):6021-6026
- [21]Kam N, Liu Z, Dai H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006,45(4):577-580
- [22]Michalet X, Pinaud F, Bentolila L, Tsay J, Doose S, Li J, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 2005,307(5709):538-544
- [23]Elkin T, Jiang X, Taylor S, Lin Y, Gu L, Yang H, et al. Immuno-carbon nanotubes and recognition of pathogens. *ChemBioChem*, 2005,6(4):640-643
- [24]Lin Y, Jiang X, Elkin T, Fernando K, Gu L, Taylor S, et al. Carbon nanotubes for immunomagnetic separation of *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Nanoscience and*

Nanotechnology, 2006,6(3):868-871

[25] Yu B, Yang J, Li W. In vitro capability of multi-walled carbon nanotubes modified with gonadotrophin releasing hormone on killing cancer cells. Carbon, 2007,45(10):1921-1927

[26] Cui D, Tian F, Ozkan CS, Wang M, Gao H. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. Toxicology Letters 2005,155:73-85

[27] Manna SK, Sarkar S, Barr J, Wise K, Barrera EV, Jejelowo O, et al. Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappa B in human keratinocytes. Nano Letters, 2005 Sep,5(9):1676-1684

[28] Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, et al. Exposure to carbon nanotube material: Assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 2003 Oct,66(20):1909-1926

[29] Pacurari M, Yin XJ, Zhao JS, Ding M, Leonard SS, Schwegler-Berry D, et al. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappa B, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. Environmental Health Perspectives, 2008 Sep,116(9):1211-1217

[30] Ye S, Wu Y, Hou Z, Zhang Q. ROS and NF-[kappa] B are involved in upregulation of IL-8 in A549 cells exposed to multi-walled carbon nanotubes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009,379(2):643-648

[31] Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. British journal of pharmacology, 2005,146(6):882-893

[32] Milena De Nicola, Stefano Bellucci, Enrico Traversa, Giovanni De Bellis, Micciulla F, Ghibelli L. Carbon nanotubes on Jurkat cells: effects on cell viability and plasma membrane potential. J Phys: Condens Matter, 2008,20

- [33]Ding L, Stilwell J, Zhang T, Elboudwarej O, Jiang H, Selegue J, et al. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Lett*, 2005,5(12):2448-2464
- [34]Jia G, Wang H, Yan L, Wang X, Pei R, Yan T, et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol*, 2005,39(5):1378-1383
- [35]Monteiro-Riviere N, Nemanich R, Inman A, Wang Y, Riviere J. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology Letters*, 2005,155(3):377-384
- [36]Flahaut E, Durrieu M, Remy-Zolghadri M, Bareille R, Baquey C. Investigation of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells. *Carbon*, 2006,44(6):1093-1099
- [37]Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GAM, Webb TR. Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. 2004:117-125.
- [38]Lam C, James J, McCluskey R, Hunter R. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Sciences*, 2004,77(1):126-134
- [39]Shvedova A, Kisin E, Mercer R, Murray A, Johnson V, Potapovich A, et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2005,289(5):L698-L708
- [40]Chou C-C, Hsiao H-Y, Hong Q-S, Chen C-H, Peng Y-W, Chen H-W, et al. Single-Walled Carbon Nanotubes Can Induce Pulmonary Injury in Mouse Model. *Nano Letters*, 2008,8(2):437-445

- [41]Poland C, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace W, Seaton A, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnology*, 2008,3(7):423-428
- [42]Liu Z, Davis C, Cai W, He L, Chen X, Dai H. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008,105(5):1410-1415
- [43]Schipper ML, Nakayama-Ratchford N, Davis CR, Kam NWS, Chu P, Liu Z, et al. A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice. *Nature Nanotechnology*, 2008 Apr,3(4):216-221
- [44]Yang S, Wang X, Jia G, Gu Y, Wang T, Nie H, et al. Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. *Toxicology Letters*, 2008,181(3):182-189
- [45]Kang S, Herzberg M, Rodrigues D, Elimelech M. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! *Langmuir*, 2008,24(13):6409-6413
- [46]Kam N, Jessop T, Wender P, Dai H. Nanotube Molecular Transporters: Internalization of Carbon Nanotube- Protein Conjugates into Mammalian Cells. *J Am Chem Soc*, 2004,126(22):6850-6851
- [47]Sayes C, Liang F, Hudson J, Mendez J, Guo W, Beach J, et al. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicology Letters*, 2006,161(2):135-142
- [48]Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Bernier P. Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon*, 2006,44(6):1100-1105
- [49]Chlopek J, Czajkowska B, Szaraniec B, Frackowiak E, Szostak K, Beguin F. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon*, 2006,44(6):1106-1111
- [50]Wick P, Manser P, Limbach LK, Dettlaff-Weglikowska U, Krumeich F, Roth S, et al. The

degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology Letters*, 2007 Jan,168(2):121-131

[51]Furong Tian, Daxiang Cui, Heinz Schwarz, Giovanni Gomez Estrada, Kobayashi H. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human Wbroblasts. *Toxicology in Vitro* 2006,20:1202-1212

[52]Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin VA, Konduru NV, Potapovich AI, Osipov AN, et al. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicology Letters*, 2006 Aug,165(1):88-100

[53]Dong L, Joseph KL, Witkowski CM, Craig MM. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes suspended in various surfactants. *Nanotechnology*, 2008 Jun,19(25)

[54]Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *Journal of applied toxicology*, 2008,29(1):69-78

[55]Tang Y, Ashcroft J, Chen D, Min G, Kim C, Murkhejee B, et al. Charge-associated effects of fullerene derivatives on microbial structural integrity and central metabolism. *Nano Lett*, 2007,7(3):754-760

[56]Kang S, Pinault M, Pfefferle L, Elimelech M. Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity. *Langmuir*, 2007,23(17):8670-8673

[57]Lin C, Fugetsu B, Su Y, Watari F. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *Journal of Hazardous Materials*, 2009,170(2-3):578-583

[58]Pantarotto D, Briand J, Prato M, Bianco A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chemical Communications*, 2004,2004(1):16-17

[59]Pantarotto D, Singh R, McCarthy D, Erhardt M, Briand J, Prato M, et al. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004,43(39):5242-5246

- [60] Torney F, Trewyn BG, Lin VSY, Wang K. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nature Nanotechnology*, 2007 May,2(5):295-300
- [61] Liu Q, Chen B, Wang Q, Shi X, Xiao Z, Lin J, et al. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano Lett*, 2009,9(3):1007-1010
- [62] Chae H, Lee W. Ethylene-and enzyme-mediated superoxide production and cell death in carrot cells grown under carbon starvation. *Plant Cell Reports*, 2001,20(3):256-261
- [63] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社 2000.
- [64] Gluckmann E. Cytotaxonomic Studies in the Species *Themeda Triandra* Forsk. University of the Witwatersrand 1951.
- [65] Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 1972,26(4):239-257
- [66] 尤瑞麟. 小麦珠心细胞的超微结构研究. *植物学报*, 1985,27(4):345-353
- [67] Greenberg J, Guo A, Klessig D, Ausubel F. Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, 1994,77(4):551-563
- [68] Schwartz B, Yeung E, Meinke D. Disruption of morphogenesis and transformation of the suspensor in abnormal suspensor mutants of *Arabidopsis*. *Development*, 1994, 120(11):3235-3245
- [69] Wang M, Oppedijk B, Lu X, Duijn B, Schilperoort R. Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid. *Plant molecular biology*, 1996,32(6):1125-1134
- [70] Fukuda H. Tracheary element differentiation. *The Plant Cell*, 1997,9(7):1147-1156
- [71] Gunawardena A, Greenwood J, Dengler N. Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development. *The Plant Cell Online*, 2004,16(1):60-73

- [72] Domínguez F, Moreno J, Cejudo F. The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta*, 2001,213(3):352-360
- [73] Gunawardena A, Pearce D, Jackson M, Hawes C, Evans D. Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 2001,212(2):205-214
- [74] Liljeroth E, Bryngelsson T. DNA fragmentation in cereal roots indicative of programmed root cortical cell death. *Physiologia Plantarum*, 2001,111(3):365-372
- [75] Beckman C. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2000,57(3):101-110
- [76] Lam E, Kato N, Lawton M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 2001,411(6839):848-853
- [77] Ludwig A, Tenhaken R. Defence gene expression in soybean is linked to the status of the cell death program. *Plant molecular biology*, 2000,44(2):209-218
- [78] Suzuki K, Yano A, Shinshi H. Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. *Plant Physiology*, 1999,119(4):1465-1472
- [79] Jones A. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology*, 2001,125(1):94-97
- [80] Jackson A, Taylor C. *Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the Interface*. *The Plant Cell*, 1996,8(10):1651-1668
- [81] Dangl J, Dietrich R, Richberg M. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell*, 1996,8(10):1793-1807
- [82] Greenberg J. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of*

Plant Biology, 1997,48(1):525-545

[83]Greenberg JT, Yao N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. Cellular Microbiology, 2004 Mar,6(3):201-211

[84]Vaux D, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996,93(6):2239-2244

[85]Reed J. Mechanisms of apoptosis. American Journal of Pathology, 2000,157(5):1415-1430

[86]Mittler R, Lam E. Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. The Plant Cell 1995,7(11):1951-1962

[87]Papini A, Mosti S, Brighigna L. Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms. Protoplasma, 1999,207(3):213-221

[88]Bowen I, Morgan S, Mullarkey K. Cell death in the salivary glands of metamorphosing Calliphora vomitoria. Cell biology international, 1993,17(1):13-34

[89]Jiang X, Zhu H, Zhou J, Chen H, Dai Y. Application of comet assay in plant protoplast apoptosis detection. ACTA BOTANICA SINICA-CHINESE EDITION-, 1998,40:928-932

[90]Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. Journal of Cell Biology, 1992,119(3):493-501

[91]Goping G, Wood K, Sei Y, Pollard H. Detection of fragmented DNA in apoptotic cells embedded in LR white: a combined histochemical (LM) and ultrastructural (EM) study. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1999,47(4):561-568

[92]Yao N, Tada Y, Park P, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S. Novel evidence for apoptotic cell response and differential signals in chromatin condensation and DNA cleavage in

victorin-treated oats. *Plant Journal*, 2001 Oct,28(1):13-26

[93]Eltner E. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual Review of Plant Physiology*, 1982,33(1):73-96

[94]Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 1994,79(4):583-593

[95]Yao N, Tada Y, Sakamoto M, Nakayashiki H, Park P, Tosa Y, et al. Mitochondrial oxidative burst involved in apoptotic response in oats. *Plant Journal*, 2002 Jun,30(5):567-579

[96]孔祥翔, 陈哲, 龚明. 活性氧在环境胁迫诱导的植物细胞程序性死亡中的作用. *安徽农学通报*, 2009,15(007):74-76

[97]Joseph T, Morrison M. Nanotechnology in Agriculture and Food. *Nanoforum Report*. 2006.

[98]Yoo S, Cho Y, Sheen J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols*, 2007,2(7):1565-1572

[99]Yao N, Eisfelder BJ, Marvin J, Greenberg JT. The mitochondrion - an organelle commonly involved in programmed cell death in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 2004 Nov,40(4):596-610

[100] Kliebenstein D, Monde R, Last R. Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology*, 1998,118(2):637-650

[101] Bowler C, Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 1992,43(1):83-116

[102] Panchuk I, Zentgraf U, Volkov R. Expression of the Apx gene family during leaf senescence of Arabidopsis thaliana. *Planta*, 2005,222(5):926-932

[103] Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver D, Coutu J, et al. Cytosolic

ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 2005,17(1):268-281

[104] Van Loon L, Van Strien E. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1999,55(2):85-97

[105] Green R, Fluhr R. UV-B-induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *The Plant Cell Online*, 1995,7(2):203-212

[106] Sheen J. Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*, 2001,127(4):1466-1475

[107] Dai H. Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties. *Acc Chem Res*, 2002,35(12):1035-1044

[108] Gonzalez-Melendi P, Fernandez-Pacheco R, Coronado MJ, Corredor E, Testillano PS, Risueno MC, et al. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: Assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Annals of Botany*, 2008 Jan,101(1):187-195

[109] Corredor E, Testillano P, Coronado M, González-Melendi P, Fernández-Pacheco R, Marquina C, et al. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification. *BMC Plant Biology*, 2009,9(1):45-55

致谢

本论文是在我的导师姚楠教授的悉心指导下完成的，从论文的选题、设计、实验到撰写，每一个环节都倾注了导师大量的心血。在本论文完成之际，首先要向姚老师致以最诚挚的谢意！研究生三年，姚老师不仅在学习上悉心指导我，在生活上也无微不至得照顾我。导师敏锐的科研思维，实事求是的科研态度，以及孜孜不倦、奋力拼搏的科研精神，给我留下了深刻的印象，也使我认识到科研的真谛。而姚老师宽广的胸怀，坚忍不拔的性格以及平和的处世之道，都是我今后学习工作中的人生坐标。在此谨向我的导师致以衷心的感谢及崇高的敬意！

同时，我要感谢其他给我帮助的各位老师，特别感谢崔大祥教授在实验早期提供碳纳米管及有关实验设计的建议。

本研究的顺利开展得益于我们有一个团结友爱，互帮互助的集体，其中的每个成员都给予了我热情的帮助和支持。在这里，我要感谢毕方铨师兄在分子生物学实验技术方面和论文写作方面的指导及建议，感谢张全芳师姐在水稻原生质体提取上的帮助及实验设计的建议，感谢方策师兄在显微镜使用操作方面的培训及指导，感谢刘哲在电镜和超薄切片机操作方面的培训以及实验材料的分享，感谢李俭在我实验后期的协助，感谢岳海林师姐、李娟师姐和吴建新对我实验设计及操作提供的建议及实验技术上的指导，还要感谢任奕、席雪丽、常振仪、孙铁军和陆贇在实验和生活中给予的无私帮助。谢谢你们！

最后，特别感谢我的家人和朋友，你们始终是我精神上最坚强的后盾，你们的支持是我顺利完成学业的基础，我爱你们！

再次衷心的感谢所有关心我、帮助我的人，愿你们一生平安！