

## 损伤条件下油菜黄单胞菜豆致病变种内源过氧化氢与间体形成的联系

李欣<sup>1</sup>, 庞新跃<sup>2</sup>, 刘严<sup>1</sup>, 郭茵<sup>1</sup>, 李红玉<sup>3</sup>, 赵春燕<sup>3</sup>

(河南科技大学,<sup>1</sup> 食品与生物工程学院,<sup>2</sup> 医学技术与工程学院, 洛阳 471003)

(<sup>3</sup> 兰州大学药学院, 兰州 730000)

**摘要:**【目的】本实验通过透射电子显微镜观察黄单胞菌在细胞损伤条件下的亚细胞结构和过氧化氢积累定位的变化。【方法】采用氯化铯对过氧化氢特异染色的组织化学法。【结果】细菌细胞受损伤后, 出现了一个细胞壁之外的过氧化氢大量积累的额外位点。并且这个额外位点出现的频率和过氧化氢积累量都与细胞损伤的程度密切相关。另一方面, 亚细胞结构的常规染色结果也显示, 受到损伤的细胞中也出现一个额外的亚显微结构, 即间体。间体出现的频率和大小也随着细胞损伤程度的增加而显著上升。【结论】多元线性回归分析的结果证明细胞损伤条件下细菌中出现的额外过氧化氢大量积累的位点就是间体。细胞损伤后间体中的过氧化氢积累对受损细胞应是一种主动调控机制。

**关键词:** 过氧化氢; 间体; 细胞损伤; 黄单胞菌

**中图分类号:** Q936      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0876-09

1953年, Chapman等首次从电镜中观察到蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)细胞中含有一个或多个大的、不规则的折叠结构, 称为“外周体”<sup>[1]</sup>, 即后来所称的间体。Fitz-James (1960)证实, 间体是细菌中的独特膜结构。随后, 在杆菌和其他的革兰氏阳性细菌中也发现了间体的存在<sup>[3-8]</sup>。Reavely和Burge (1972)提出, 细菌中“间体”一词的定义为: “细胞质膜的囊状内陷结构, 是层状的膜结构, 有管状结构与细胞质膜相连”<sup>[9]</sup>。

众多研究结果显示, 间体在多种细胞生理进程中起到重要的作用, 包括染色体复制和分离、细胞分裂、隔的形成和细胞外酶的转运<sup>[10-11]</sup>。1970年前后, 曾有研究者对间体的存在提出质疑, 认为间体仅仅是电镜制片时因脱水操作引起的矫作物<sup>[12-13]</sup>, 细胞的固定过程和高浓度丙三醇的处理能够诱导间体

的形成<sup>[6, 14]</sup>。随着电镜制片新技术的发展, 出现了不固定、不染色的冷冻含水切片技术, 这种快速方法可以消除样品制备中矫作物的产生<sup>[15-16]</sup>。

但随后的研究发现, 采用冷冻含水切片技术时, 多种抗菌素包括青霉素G<sup>[17]</sup>、防卫素<sup>[5, 18]</sup>、甲氧苄氨嘧啶<sup>[19]</sup>和利福平<sup>[20]</sup>的处理都仍然能够诱导细胞中间体的出现。未固定的细胞进行浓缩处理或者突变也很可能能够诱导间体的出现<sup>[6]</sup>。最新的研究进一步证实, 抗菌肽、抗生素的作用模式能够显著影响细菌中间体形成的体积、数量和形态<sup>[21-22]</sup>。作为一种胞内细胞膜内含物的间体已经被视为细胞状态改变后诱导出现的胞内次生结构<sup>[23]</sup>。

众所周知, 细胞中许多基础反应都是由活性氧和氧化机制介导的<sup>[24-25]</sup>。与其他活性氧相比, 过氧化氢是更稳定的化合物。过氧化氢能够穿过细胞膜

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(30170238, 30670070); 甘肃省中青年基金项目(099RJYA008); 河南科技大学科研创新能力培育基金(2009CZ0015)

**作者简介:** 李欣(1979-), 女, 河北省邯郸市人, 博士, 研究方向为病原微生物学。Tel/Fax: +86-379-64282342; E-mail: lixinpxy@hotmail.com

**收稿日期:** 2009-11-26; **修回日期:** 2010-02-06

并且在细胞生理过程中起到不同的作用<sup>[26]</sup>。高浓度时过氧化氢对细胞具有毒性,而适当浓度的过氧化氢可以作为第二信使分子参与信号传导途径并调节细胞代谢<sup>[17, 26]</sup>。本实验室之前的研究结果证实了细菌中超氧阴离子、过氧化氢等内源活性氧的产生和积累<sup>[27-29]</sup>,发现在正常细菌细胞中内源产生的过氧化氢主要定位在细胞壁,并且意外的在受损细胞中发现过氧化氢的过量产生<sup>[30-31]</sup>。虽然有研究者证实了间体是被细胞的损伤诱导形成的次生结构<sup>[6, 21-23]</sup>,但是间体在细菌细胞的损伤机制中的作用尚未阐明,细胞损伤条件下过量产生的过氧化氢对间体的功能的参与国内外尚未见报道。确认并阐明细胞损伤条件下间体形成和过氧化氢积累之间的联系为研究细菌中间体的功能开辟了新的思路,也为生物体内源过氧化氢功能的研究提出了新的证据,对研究细胞损伤机制具有重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:**利福平、 $O_5O_4$ 、丙酮、环氧树脂、醋酸铀、醋酸铅、从上海生工生物工程技术有限公司购买。氯化铈( $CeCl_3$ )从Sigma公司购买。透射电子显微镜(TEM100C, JEOL, Tokyo)。

**1.1.2 菌株:**油菜黄单胞菌菜豆致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*)的*ahpC*突变体(XcpahpC)和野生型菌株(Xcpw)均由泰国Chulabhorn研究院生物工艺学实验室的Skorn教授馈赠。将冻干保存的上述菌株取干粉划线接种到PSA平板上,28℃下培养48h以上,挑单菌落与NA液体培养基中,28℃振荡培养至菌液混浊,甘油保存菌种,备用。

### 1.2 组织化学法检测过氧化氢积累

采用组织化学的方法对细菌内源过氧化氢的积累进行检测。在样品制备时采用了两种染色程序。亚显微结构染色时,根据Ryter<sup>[8]</sup>的方法(1968)将样品用 $O_5O_4$ 固定,丙酮脱水,根据Spurr的方法用低粘度环氧树脂包埋<sup>[32-33]</sup>。菱形刀超薄切片并置于400目铜网上。样品用醋酸铀和醋酸铅常规染色<sup>[9, 34]</sup>。 $H_2O_2$ 的特异染色时,收集菌体细胞并用含50 mmol/L  $CeCl_3$ 的溶液在28℃预处理1.5 h<sup>[35]</sup>。 $H_2O_2$ 用 $CeCl_3$ 特异染色并且按照Bestwick等的方法检测铈过氧化物的沉积物<sup>[36]</sup>。然后如上述方法包埋并且免去醋酸铀和醋酸铅染色的步骤。本实验中,对铈过氧化物沉积密度设定了4个等级:0, 无

特定部位的沉积;1, 微弱并不连续的沉积;2, 从不连续到连续的清晰沉积;3, 大量的沉积。

### 1.3 利福平处理

菌株在28℃下于NA培养基中振荡培养。420 nm下检测菌悬液密度,培养至光密度0.8时,离心收集菌体并用含0, 40  $\mu\text{g/L}$ 、70  $\mu\text{g/L}$ 、100  $\mu\text{g/L}$ 或者150  $\mu\text{g/L}$ 利福平的无菌水重悬,28℃下温育30 min后<sup>[37]</sup>,水洗除去菌悬液中的利福平,制备电镜样品。

### 1.4 统计学分析

用SPSS 11.5进行统计学分析。通过多元线性回归分析的方法分析病原菌胞内过量的过氧化氢积累和利福平浓度以及利福平处理后胞内的间体大小之间的关系。采用Tukey B post hoc test进行差异的显著性分析。采用Pearson correlation test进行相关性计算。

## 2 结果

### 2.1 氯化铈特异染色分析利福平处理对细胞过氧化氢积累的影响

实验中通过 $CeCl_3$ 处理病原菌后形成的铈过氧化物沉积物来检测油菜黄单胞菌菜豆致病变种菌株(*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, Xcp)中过氧化氢的细胞定位。结果显示,野生型菌株Xcpw中的过氧化氢在细胞壁上大量积累(图1-B)。当利福平的浓度在40  $\mu\text{g/L}$ 到100  $\mu\text{g/L}$ 的宽浓度范围内,利福平处理细胞后,病原菌细胞壁上的过氧化氢积累维持稳定的水平,过氧化氢的积累量没有明显的变化(图1-C, E)。直到利福平的处理浓度达到150  $\mu\text{g/L}$ 时,大部分细胞开始裂解,病原菌细胞在细胞壁上的过氧化氢积累增强(图1-F)。更重要的是,利福平处理后细胞受到损伤甚至开始裂解时,病原菌细胞中出现一个铈过氧化物的额外的大量沉积位点(图1-C, F)。这种细胞质膜内陷结构的可见的层状结构显示这种过氧化氢的额外沉积位点是细菌中的类似间体的结构(图1-D和图1-E)。

利福平处理细胞后的实验结果显示,当利福平浓度从40  $\mu\text{g/L}$ 逐渐上升到150  $\mu\text{g/L}$ 时,细胞类间体结构中的额外的过氧化氢积累量也随之增加(图1-C, F)。在未经利福平处理的对照电镜样品细胞中,未观察到这种额外的过氧化氢积累,因此这种过氧化氢的额外积累现象并不是由于电镜样品制备过程造成的,实验中排除了电镜样品制备过程对细胞中过氧化氢积累的影响。

浓度为 40  $\mu\text{g/L}$  的利福平处理细胞 30 min 后, *Xcpw* 细胞中类间体结构中额外过氧化氢积累的直径在细胞中的平均比例为  $16.802\% \pm 1.54\%$ 。浓度为 70  $\mu\text{g/L}$ , 100  $\mu\text{g/L}$  和 150  $\mu\text{g/L}$  的利福平分别处理细胞 30 min 后, 细胞中额外过氧化氢的积累出现的频率随着利福平处理浓度的升高大大的增加(分别为 0.35/cell, 0.72/cell 和 0.89/cell), 而 40  $\mu\text{g/L}$  利福平处理细胞后, 额外过氧化氢积累出现的频率仅仅为(0.15/cell) (图 1- C-F)。此外, 不仅额外过氧化氢积累位点的出现频率增加, 这种损伤

情况下细胞中额外过氧化氢积累位点, 即类间体结构的直径占细胞的平均比例也随着利福平处理浓度从 70  $\mu\text{g/L}$ , 100  $\mu\text{g/L}$  到 150  $\mu\text{g/L}$  的增加显著上升为  $21.147\% \pm 4.54\%$ ,  $27.698\% \pm 5.71\%$  和  $35.579\% \pm 8.27\%$ 。这一现象代表着这些类间体结构中的过氧化氢积累量的增加。Tukey B test 的结果显示, 对样品和 150  $\mu\text{g/L}$  利福平处理后样品中的过氧化氢积累具有显著的差异(置信度为 99.9%)。

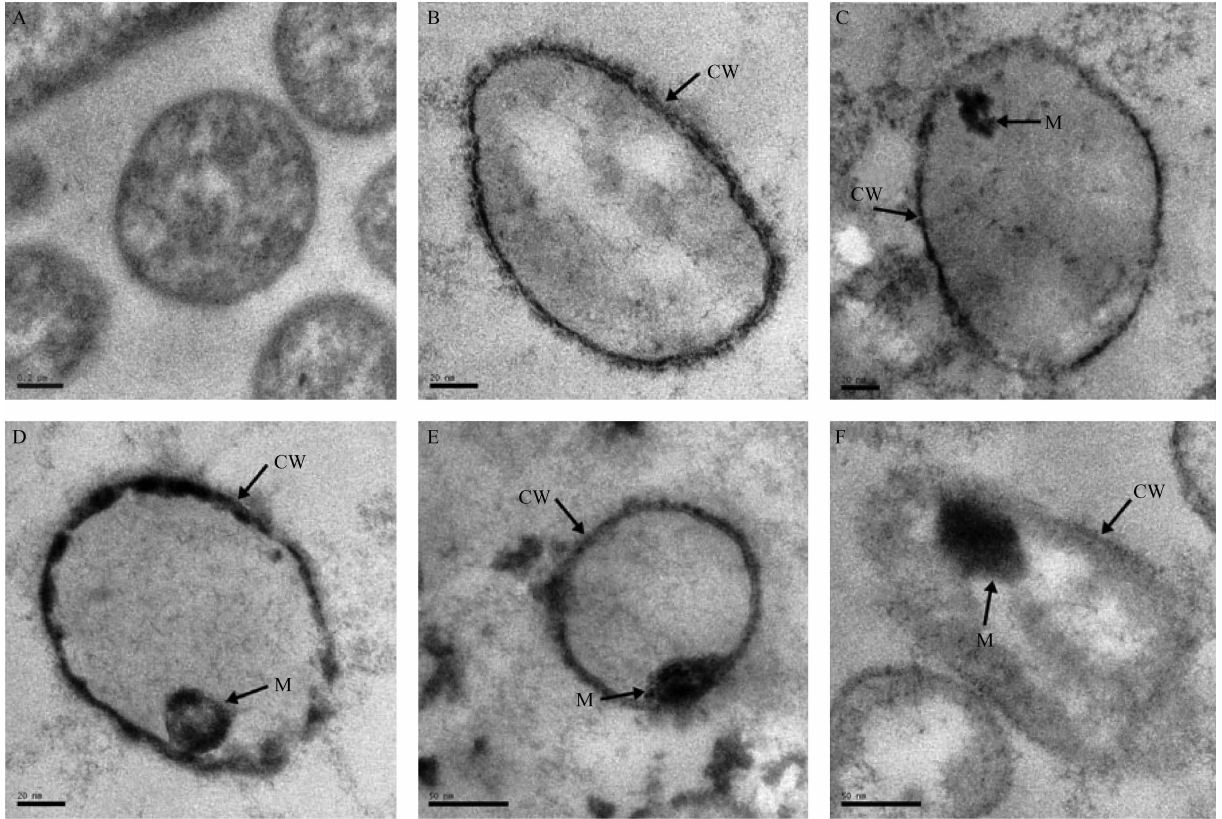


图 1 利福平对黄单胞菌野生型菌株内源过氧化氢积累的影响

Fig. 1 Effects of rifampicin treatment on endogenous hydrogen peroxide accumulation in wild-type strain of *Xanthomonas*. Bars are 0.2  $\mu\text{m}$  in (A), 20 nm in (B), (C) and (D), or 50 nm in (E) and (F). Mesosome-like structures (M) presented as an additional location of hydrogen peroxide accumulation (arrowed). A: Non-cerium treated cell. B: Control cells not treated with rifampicin. Accumulation of dense deposits on the cell wall (CW). C: Cell treated for 30 min with 40  $\mu\text{g/L}$  rifampicin. Accumulation of dense deposits on the cell wall and mesosome-like structures. D: Cell treated for 30 min with 70  $\mu\text{g/L}$  rifampicin. Accumulation of dense deposits on the cell wall and adjacent mesosome-like structures. E: Cell treated for 30 min with 100  $\mu\text{g/L}$  rifampicin. Accumulation of dense deposits on mesosome-like structures and faintly on the cell wall. F: Cell treated for 30 min with 150  $\mu\text{g/L}$  rifampicin. Highly localized dense deposits on both the cell wall and the mesosome-like structures.

## 2.2 利福平处理对 *ahpC* 突变体中过氧化氢积累的影响

未经利福平处理的野生型菌株 *Xcpw* 的对照细胞中, 不连续的铈过氧化物沉积物大量定位在 *Xcpw* 的细胞壁上(图 2-A)。相反, 在未经利福平处理的 *ahpC* 突变体菌株 *XcpahpC* 对照细胞中几乎没有检

测到过氧化氢的积累(图 2-B)。在未经利福平处理的对照细胞中, 突变体 *XcpahpC* 细胞中的过氧化氢积累量显著低于野生型菌株 *Xcpw*。

利福平处理后, 无论野生型菌株 *Xcpw* 还是胞内过氧化氢水平非常低的 *ahpC* 突变体菌株 *XcpahpC* 细胞中, 都清晰的观察到在类间体结构中

大量的过氧化氢额外积累(图 2- C 和图 2- D)。此外,虽然 *ahpC* 基因的突变导致 *XcpahpC* 细胞内 CAT 酶的活性升高,但是 *XcpahpC* 胞内类间体结构

中钼过氧化物沉积物的体积 ( $18.037\% \pm 3.07\%$ ) 与 *Xcpw* 细胞 ( $16.802\% \pm 1.54\%$ ) 中没有显著的差异 (Tukey B,  $p > 0.1$ ) (图 2- C 和图 2- D)。

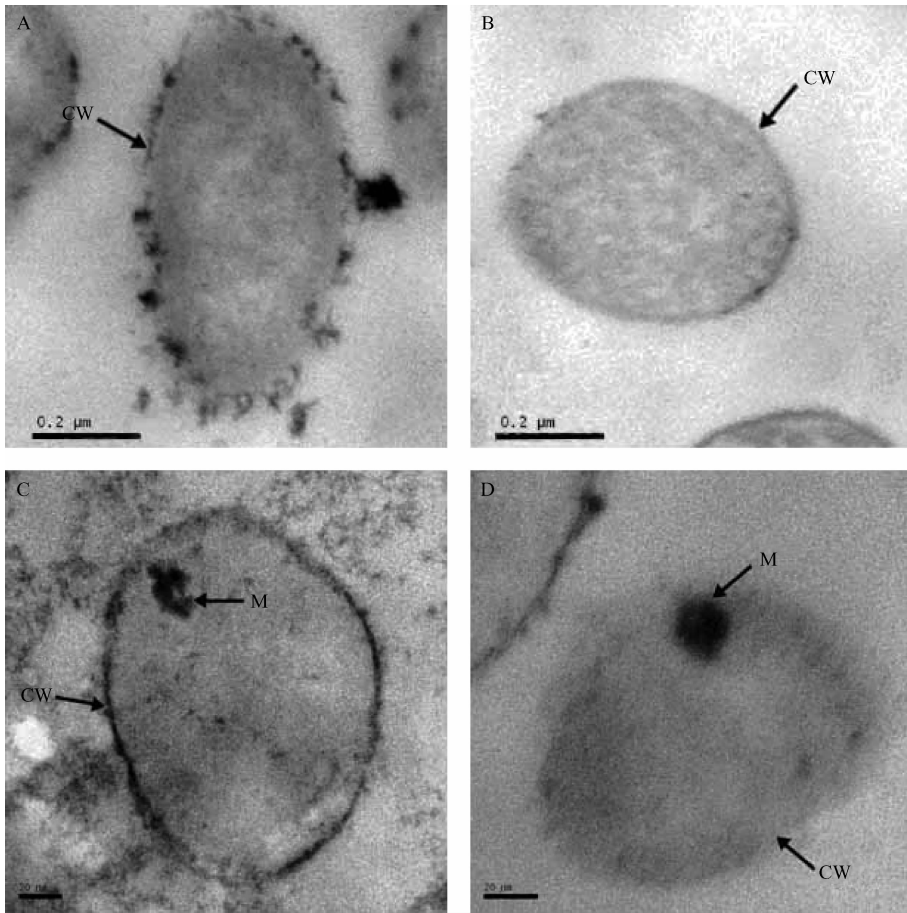


图 2 *ahpC* 基因突变对黄单胞菌细胞中过氧化氢的影响

Fig. 2 Effects of *ahpC* mutation on hydrogen peroxide formation in *Xanthomonas* cells. A: Wild type strain *Xcpw*. Category 2, accumulation of dense deposits on the cell wall (arrowed). Bar,  $0.2\mu\text{m}$ . B: Mutant *XcpahpC*. Category 0, no specific of staining on cell wall (CW) or other sites. Bar,  $0.2\mu\text{m}$ . C: Wild type strain *Xcpw* cells treated for 30 min with  $40\mu\text{g/L}$  rifampicin. Category 2, accumulation of dense deposits on the cell wall (CW) and mesosome-like structure (M) (arrowed). Bar,  $20\text{nm}$ . D: Mutant *XcpahpC* cells treated for 30 min with  $40\mu\text{g/L}$  rifampicin. Category 1, no specific of staining on the cell wall (CW), but deposit on mesosome-like structure (M) (arrowed). Bar,  $20\text{nm}$ .

### 2.3 醋酸铀染色分析利福平处理对细胞亚显微结构的影响

透射电子显微镜下对亚细胞结构常规染色样品的观察结果显示,利福平处理 30 min 后,大量 *Xcpw* 的细胞中观察到一种额外的亚显微结构。图 3-B 中这种结构与细胞膜相连的纤维状小管证明这种结构是细菌的特有结构-间体。细胞中间体为层状结构,并且由细胞质膜内陷形成。未经利福平处理的对照细胞中这种结构的出现频率非常低,仅仅为  $0.04/\text{cell}$ 。实验结果显示,利福平的处理能造成细胞明显损伤,同时 *Xcpw* 细胞中间体的出现频率和大小和利福平的处理浓度密切相关。当利福平的处理浓度从  $40\mu\text{g/L}$  增加到  $150\mu\text{g/L}$  时,随着利福平处

理浓度的增加,细胞的损伤程度、间体的出现频率和大小都有显著的上升(图 3-A-D)。本实验中  $40\mu\text{g/L}$  的利福平处理后,细胞中间体的出现频率显著上升到  $0.11/\text{cell}$ 。进一步的加大利福平浓度处理时,浓度为  $70\mu\text{g/L}$ ,  $100\mu\text{g/L}$  和  $150\mu\text{g/L}$  的利福平在相同条件下分别处理细胞后,间体的出现频率随着利福平处理浓度的增加出现显著的上升,分别为  $0.32/\text{cell}$ ,  $0.65/\text{cell}$  和  $0.84/\text{cell}$  (图 3-B-D)。另一方面,从间体的大小来看,浓度为  $40\mu\text{g/L}$  的利福平处理细胞后,细胞中间体的直径占细胞的平均比例为  $16.027\% \pm 0.72\%$ 。当浓度为  $70\mu\text{g/L}$ ,  $100\mu\text{g/L}$  和  $150\mu\text{g/L}$  的利福平分别处理细胞时,间体的直径占细胞的比例分别为  $23.371\% \pm$

5.54% , 33.635%  $\pm$  8.71% 和 42.750  $\pm$  6.06% 。

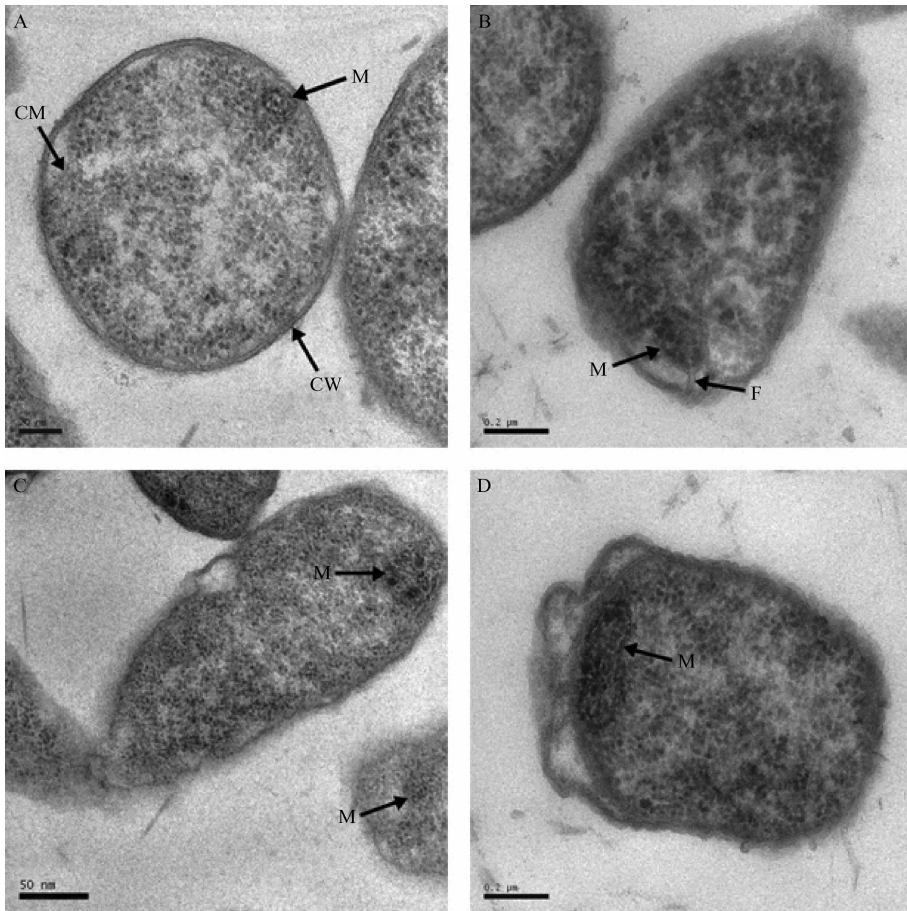


图3 利福平对黄单胞菌亚细胞结构的影响

Fig.3 Effects of rifampicin treatment on ultrastructure of *Xanthomonas*. CW, cell wall. Bars are 20, 200, 50, and 200 nm in (A)-(D), respectively. A: Cells treated for 30 min with 40  $\mu\text{g/L}$  rifampicin. Mesosomes (M) were observed in cells under rifampicin treatment by the electron-dense material, which were adjacent to the cell membrane (CM). B: Cells treated for 30 min with 70  $\mu\text{g/L}$  rifampicin. Mesosomes (M) were connected with the cell membrane through the arrowed fibrillar (F). C: Cells treated for 30 min with 100  $\mu\text{g/L}$  rifampicin. Mesosomes (M) were observed in cells under rifampicin treatment by the electron-dense material. D: Cells treated for 30 min with 150  $\mu\text{g/L}$  rifampicin. Electron-dense material from the mesosomes (M) come close to the cell membrane.

## 2.4 利福平处理后细胞中过量过氧化氢积累的模型建立

如表1所示,在利福平处理下,如果结合利福平处理浓度和间体大小两个因子,在 *Xcpw* 细胞中的类间体结构这个额外位点中过量过氧化氢积累的模型的  $r^2$  能够符合到 0.970。模型1的  $F$  值为

875.240。如果只采用间体的大小为模型2的唯一参数,那么模型2中过氧化氢积累的  $r^2$  略微下降到 0.969,同时  $F$  值显著上升到 1755.962。并且如果将间体大小这个因子剔除,那么利福平损伤损伤情况下, *Xcpw* 细胞中过氧化氢额外积累的模型3中  $r^2$  和  $F$  值都显著降低,分别为 0.779 和 197.849 (表1)。

表1 利福平作用下 *Xcpw* 细胞中过氧化氢积累计算模型的建立

Table 1 The coefficients of several models (multiple linear regression) to explain the model of quantity of excess hydrogen peroxide accumulation in *Xcpw* cells during rifampicin effect with the rifampicin concentration

and size of mesosome. e. g.  $\text{H}_2\text{O}_2 = \text{Rifampicin} \times a1 + \text{Mesosome} \times a2$ .

Model	Coefficients <sup>1</sup>		Statistics		
	Rifampicin (a1)	Mesosome (a2)	$r^2$	$F$	$p$
Model 1	0.009111	0.816	0.970	875.240	**
Model 2	-	0.851	0.969	1755.962	**
Model 3	0.177	-	0.779	197.849	**

<sup>1</sup> The a1 and a2 coefficients correspond to the respective coefficients listed in the table. The fit of the linear model is represented by the  $r^2$ ,  $F$  and the  $p$  value shows the significance of the model; the significance of the individual coefficients is also shown: +,  $p < 0.1$ ; \*,  $p < 0.05$ ; and \*\*,  $p < 0.01$ .

由表 1 结果可知,当间体的大小被作为唯一的参数时,模型 2 是分析利福平处理后细胞中过量过氧化氢积累量的最好的模型。图 4 是过量过氧化氢积累量和间体大小线性回归分析的点状图。图中显示了浓度为 40  $\mu\text{g/L}$ , 70  $\mu\text{g/L}$ , 100 $\mu\text{g/L}$  和 150  $\mu\text{g/L}$  的利福平处理下的超过 160 个细胞的数据。结果显示,在额外的过氧化氢积累量和间体的大小之间有显著的线性关系 (Pearson one-tailed correlation coefficient 为 0.984,  $P < 0.0001$ ;  $\sigma = 1.26865$ ) (图 4)。细胞中类间体结构中的额外过氧化氢积累量用额外过氧化氢的位点直径占细胞的比例 (%) 来计算 (图 1)。间体的大小用间体的直径在细胞中的比例 (%) 来计算 (图 3)。

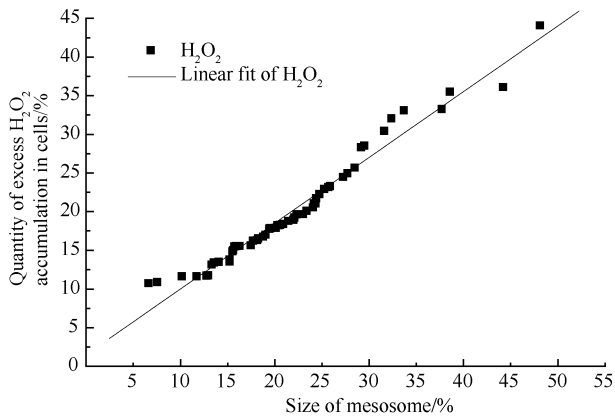


图 4 黄单胞菌中过量过氧化氢积累与间体的线性回归分析

Fig. 4 Quantity of excess hydrogen peroxide accumulation versus size of mesosome in *Xanthomonas*. The quantity of excess hydrogen peroxide accumulation in cells during rifampicin effect is calculated by diametral percentage of the additional location of hydrogen peroxide accumulation in cells (%). The size of mesosome is calculated by the diametral percentage of mesosomes in cells (%). Pearson one-tailed correlation coefficient 0.984,  $P < 0.0001$ .

### 3 讨论和分析

本实验室之前的研究结果显示油菜黄单胞菌菜豆致病变种 (*Xcp*) 细胞中有内源过氧化氢的产生,并且这些过氧化氢主要定位于 *Xcp* 细胞的细胞壁上,在细胞膜及胞内没有明显的积累位点<sup>[30]</sup>。许多研究者已经报道,利福平可以抑制细菌的 RNA 聚合酶,通过与 RNA 聚合酶结合阻止转录的起始,造成对细胞的损伤<sup>[26, 38-39]</sup>。本实验中采用利福平处理细胞,观察野生型油菜黄单胞菌菜豆致病变种菌株 *Xcpw* 在受到损伤的情况下,细胞中亚显微结构的变化以及内源过氧化氢的产生和定位的变化。结果显示,利福平处理细胞后,大量 *Xcpw* 细胞中出现一个

细胞壁之外的过氧化氢积累的额外位点。并且这些额外的过氧化氢积累的量随着处理 *Xcp* 细胞的利福平浓度的增加而增加 (图 1)。额外过氧化氢积累位点的出现频率和体积与处理细胞的利福平浓度之间有密切的联系。

为了进一步研究利福平处理条件下细胞中的这种额外过氧化氢积累的位点,作者通过醋酸铀对病原菌细胞结构进行常规染色,观察透射电子显微镜下 *Xcpw* 细胞中亚显微结构的变化。实验结果显示,利福平处理后,大量 *Xcpw* 细胞中出现间体结构 (图 3)。并且,在利福平处理浓度与间体的出现频率和间体大小之间也存在着密切的联系。因此,利福平的处理可能刺激了 *Xcpw* 细胞中膜结构的合成以及胞内额外过氧化氢的产生。利福平处理诱导细菌在丧失活力之前形成间体,但是在较大的利福平处理浓度范围内没有对细菌的细胞壁造成显著的影响 (图 3)。虽然有研究显示,微生物的外膜可以作为疏水试剂的渗透屏障<sup>[26]</sup>,但是细菌质膜或细胞壁物质的合成应该不会被利福平所抑制。因此,仅仅从利福平的作用机理无法解释利福平的处理对细胞膜结构以及过氧化氢产生的影响。作者推测,间体的形成和增大以及其中额外的过氧化氢积累与利福平对转录的抑制作用无关,而是由利福平处理对细胞的损伤诱导。这一推测与研究者的结论是相符的,即细菌细胞中间体是由对细胞状态造成改变的一些行为诱导形成的,包括细胞的浓缩和突变<sup>[6, 23]</sup>。同时,本实验中未经利福平处理的细胞不含间体,这一结果进一步证实利福平处理后间体是由利福平导致的细胞损伤诱导形成的。

用多因子 (利福平处理的浓度和间体的大小) 结合构建多元线性回归分析模型来分析利福平处理后 *Xcpw* 细胞胞内过量的过氧化氢积累 (Model = Rifampicin  $\times$  a1 + Mesosome  $\times$  a2), 通过 least-square 方法 (SPSS, Inc., Chicago) 计算模型系数 (a1 和 a2)。如果在多元线性回归分析中结合利福平的浓度和间体的大小两个因子,模型的  $r^2$  为 0.970 (表 1)。如果在模型中剔除利福平浓度这个因子, F 值浓度显著上升但是  $r^2$  仅有微弱的下降,因此利福平浓度对模型的影响非常小。相反的,如果在细胞内额外过氧化氢积累量的模型中剔除间体大小这个因子,  $r^2$  和 F 值都有非常显著的下降 (表 1)。因此,间体大小这个因子是建立利福平处理后细胞损伤条件下,病原菌胞内额外过氧化氢积累量这个模型中的关键因子。也就是说,利福平处理后,胞内

额外的过氧化氢积累的量是由胞内产生的间体的大小决定的。

由表 1 和图 4 可以看出,胞内额外过氧化氢积累量的计算模型能够与间体的大小成非常明显的线性关系。间体的大小强烈的影响胞内额外的过氧化氢积累量,二者呈线性相关。这一结果说明,利福平处理后细胞损伤条件下,间体是胞内额外过氧化氢的大量积累的位点。在利福平的作用下,Xcpw 细胞中间体的形成始终伴随过氧化氢在间体中的积累。

在 *ahpC* 突变体菌株中,由于 AhpC 酶的缺失,CAT 酶的活性补偿性的显著增加<sup>[33]</sup>。因此,病原菌细胞升高的抗氧化酶水平导致内源的过氧化氢水平显著的降低。本实验以油菜黄单胞菌菜豆致病变种的野生型菌株 (Xcpw) 和 *ahpC* 突变体菌株 (XcpahpC) 为实验对象,通过 *ahpC* 基因突变引起的胞内过氧化氢水平变化尝试探讨细胞损伤条件下胞内过氧化氢的产生和积累的变化的机制。结果清晰显示,XcpahpC 细胞中细胞壁上积累的过氧化氢量比野生型菌株 Xcpw 细胞中显著降低(图 2-A 和图 2-B)。然而,突变体 XcpahpC 细胞内额外的过氧化氢积累的量与野生型菌株 Xcpw 类似,没有显著的差异(图 2-C 和图 2-D)。这一结果暗示,XcpahpC 细胞中升高的 CAT 酶活性并未抑制细胞损伤条件下胞内的额外过氧化氢积累。细菌细胞受到损伤后,很可能主动调控细胞胞内过氧化氢的过量产生,细胞中这种额外的过氧化氢积累很可能是受损的细胞中的一种必需机制。

由于过氧化氢的寿命较长是稳定的化合物并且能够穿过质膜在细胞生理过程中起到不同的作用<sup>[32]</sup>,细胞内源的过氧化氢是由膜结构(包括外周胞质和细胞质膜)产生并且积累的细胞壁上。考虑到间体的膜结构,我们推测在细胞逆境条件下间体是一个新的内源过氧化氢产生位点,间体的形成及伴随的过氧化氢产生和大量积累都是由于膜的受损,紧接着膜的内陷导致了间体的形成以及过氧化氢的产生,间体的形成和伴随的间体内额外的过氧化氢积累很可能是细胞受到损伤后的一种相应的病理机制,这些额外产生的过氧化氢可能具有毒性,对细胞组分造成损伤,也有可能是细胞损伤机制中信号传导途径中的第二信使分子。这种调控的机制还有待进一步的研究。

**致谢** 感谢泰国 Chulabhorn 研究院生物工艺学实验室的 Skorn 教授馈赠实验用油菜黄单胞菌菜豆致病

变种野生型和 *ahpC* 突变体菌株。

## 参考文献

- [ 1 ] Chapman GB, Hillier J. Electron microscopy of ultra-thin sections of bacteria I. Cellular division in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 1953, 362-373.
- [ 2 ] Fitz-James P. Participation of the cytoplasmic membrane in the growth and spore formation of *Bacilli*. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1960, 8: 507-528.
- [ 3 ] Balkwill DL, Stevens SEJR. Effects of Penicillin G on Mesosome-like Structures in *Agmenellum quadruplicatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1980, 17: 506-509.
- [ 4 ] Burdett IDJ, Rogers HJ. The structure and development of mesosomes studied in *Bacillus licheniformis* strain 6346. *Journal of Ultrastructure Research*, 1972, 38: 113-133.
- [ 5 ] Friedrich CL, Rozek A, Patrzykat A, Hancock REW. Structure and Mechanism of Action of an Indolicidin Peptide Derivative with Improved Activity against Gram-positive Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 24015-24022.
- [ 6 ] Higgins ML, Tsien HC, Daneo-Moore L. Organization of Mesosomes in Fixed and Unfixed Cells. *Journal of Bacteriology*, 1976, 127: 1519-1523.
- [ 7 ] Rucinsky TE, Cota-Robles EH. Mesosome Structure in *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Bacteriology*, 1974, 118: 717-724.
- [ 8 ] Ryter A. Association of the Nucleus and the Membrane of Bacteria: a Morphological Study. *Bacteriological Reviews (Now Published as MMBR)*, 1968, 32: 39-54.
- [ 9 ] Reavely DA, Burge RE. Walls and membranes in bacteria // Rose AH, Tempest DW. ed. *Advances in Microbial Physiology*. New York: Academic Press Inc, 1972, 7: 1-81.
- [ 10 ] Greenawalt JW, Whiteside TL. Mesosomes: Membranous Bacterial Organelles. *Bacteriological Reviews (Now Published as MMBR)*, 1975, 39 (4): 405-463.
- [ 11 ] Reusch VM, Burger MM. Reviews on Biomembranes: The Bacterial Mesosome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1973, 300: 79-104.
- [ 12 ] Silva MT, Sousa JC, Polónia JJ, Macedo MA, Parente AM. Bacterial mesosomes. Real structures or artifacts? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1976, 443 (1): 92-105.
- [ 13 ] Ebersold HR, Cordier JL, Lüthy P. Bacterial mesosomes; method dependent artifacts. *Archives of Microbiology*, 1981, 130 (1): 19-22.



- [14] Higgins ML, Daneo-Moore L. Factors influencing the frequency of mesosomes observed in fixed and unfixed cells of *Streptococcus faecalis*. *The Journal of Cell Biology*, 1974, 61: 288-300.
- [15] Dubochet J, McDowell AW, Menge B, Schmid EN, Lickfeld KG. Electron microscopy of frozen-hydrated bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1983, 155 (1): 381-390.
- [16] Nanninga N, Brakenhoff GJ, Meijer M, Woldringh CL. Bacterial anatomy in retrospect and prospect. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1984, 50 (5-6): 433-460.
- [17] Barth C, Moeder W, Klessig DF, Conklin PL. The Timing of Senescence and Response to Pathogens Is Altered in the Ascorbate-Deficient Arabidopsis Mutant vitamin c-1. *Plant Physiology*, 2004, 134: 1784-1792.
- [18] Shimoda M, Ohki K, Shimamoto Y, Kohashi O. Morphology of defensin-treated *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 1995, 63: 2886-2891.
- [19] Nishino T, Wecke J, Krüger D, Giesbrecht P. Trimethoprim-induced structural alterations in *Staphylococcus aureus* and the recovery of bacteria in drug-free medium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1987, 19: 147-159.
- [20] Gottfredsson M, Erlendsdottir H, Kolka R, Gudmundsson A, Gudmundsson S. Ultrastructural alterations of bacteria during the postantibiotic effect. *Chemotherapy*, 1993, 39: 153-162.
- [21] Li JX, Xu XQ, Xu CH, Zhou WP, Zhang KY, Yu HN, Zhang YP, Zheng YT, Rees HH, Lai R, Yang DM, Wu J. Anti-infection Peptidomics of Amphibian Skin. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007a, 6: 882-894.
- [22] Santhana RL, Hing, HL, Baharudin O, Teh Hamidah Z, Aida Suhana R, Nor Asiha CP, Vimala B, Paramsarvaran S, Sumarni G, Hanjeet K. Mesosomes are a definite event in antibiotic-treated *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Tropical Biomedicine*, 2007, 24 (1): 105-109.
- [23] Murata K, Kawai S, Mikami B, Hashimoto W. Superchannel of Bacteria, Biological Significance and New Horizons. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72 (2): 265-277.
- [24] Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM. Free oxygen radicals regulate plasma membrane  $Ca^{2+}$ - and  $K^{+}$ -permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science*, 2003, 116: 81-88.
- [25] Hoidal RJ. Reactive Oxygen Species and Cell Signaling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2001, 25: 661-663.
- [26] Turpaev TK. Reactive Oxygen Species and Regulation of Gene Expression. *Biochemistry (Moscow)*, 2002, 67: 281-292.
- [27] 李欣, 李红玉, 庞新跃, 王金生, 李敏权. 植物病原细菌中超氧阴离子释放及其释放位点的研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45 (2): 283-287.
- [28] 李欣, 李红玉, 庞新跃, 冯汉青, 王金生. 互作对水稻白叶枯病菌 JXO III 和 JXO V 超氧阴离子释放的调控. *生态学报 (Acta Ecologica Sinica)*, 2006, 26 (12): 322-327.
- [29] 李欣, 李红玉, 冯汉青, 王金生. 水稻白叶枯病菌中超氧阴离子的非酶来源分析. *植物生理与分子生物学学报 (Journal Of Plant Physiology and Molecular Biology)*, 2007, 33(2): 146-152.
- [30] Li X, Li HY, Pang XY, Feng HQ, Zhi DJ, Wen JQ, Wang JS. Localization Changes of Endogenous Hydrogen Peroxide during Cell Division Cycle of *Xanthomonas*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2007b, 300: 207-213.
- [31] 李欣, 于慧春, 庞新跃, 李红玉, 王金生. 水稻白叶枯病菌内源过氧化氢的产生及定位. *南京农业大学学报 (Journal of Nanjing Agricultural University)*, 2009, 32(3): 159-162.
- [32] Spurr AR. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 1969, 26: 31-43.
- [33] Skorn M, Wirongrong W, Paiboon V, Suvit L, Mayuree F. A *Xanthomonas* Alkyl Hydroperoxide Reductase Subunit C (*ahpC*) Mutant Showed an Altered Peroxide Stress Response and Complex Regulation of the Compensatory Response of Peroxide Detoxification Enzymes. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 6845-6849.
- [34] Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 1963, 17: 208-212.
- [35] Able AJ, Guest DI, Sutherland MW. Hydrogen Peroxide Yields during the Incompatible Interaction of Tobacco Suspension Cells Inoculated with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Physiology*, 2000, 124: 899-910.
- [36] Bestwick CS, Brown IR, Bennett MH, Mansfield JW. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *The Plant Cell*, 1997, 9: 209-221.
- [37] Hu YM, Mangan JA, Dhillon J, Sole KM, Mitchison DA, Butcher PD, Coates ARM. Detection of mRNA Transcripts and Active Transcription in Persistent



Mycobacterium tuberculosis Induced by Exposure to Rifampin or Pyrazinamide. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 6358-6365.

[38] Inghama CJ, Furneaux PA. Mutations in the  $\beta$  subunit of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase that confer both

rifampicin resistance and hypersensitivity to NusG. *Microbiology*, 2000, 146: 3041-3049.

[39] Leyns F, Cleene DM, Swings JG, Ley DJ. The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review*, 1984, 50: 308-356.

## Correlation between endogenous hydrogen peroxide and mesosome formation in cellular injured bacteria

Xin Li<sup>1\*</sup>, Xinyue Pang<sup>2</sup>, Yan Liu<sup>1</sup>, Han Guo<sup>1</sup>, Hongyu Li<sup>3</sup>, Chunyan Zhao<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Food and Bioengineering College, <sup>2</sup> Medical Technology and Engineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China)

(<sup>3</sup> School of pharmaceutical, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] Ultrastructural alteration and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) localization were examined in *Xanthomonas* under cellular injury using transmission electron microscopy. [ **Methods** ] Histochemical methods were used in the present study. [ **Results** ] Intriguingly, the injury led to presence of an additional location of  $H_2O_2$  accumulation within the cells. There was an association between the frequency and size of the additional location of  $H_2O_2$  accumulation and the degrees of injury. Furthermore, an additional ultrastructure, mesosomes, was also present in injured cells. The frequency and size of mesosomes also increased with the increasing degrees of injury. [ **Conclusion** ] Result of multiple linear regression showed that the size of mesosome plays as a key factor in the quantity of excess  $H_2O_2$  accumulation in bacteria under cellular injury. Linear correlation was confirmed between quantity of excess  $H_2O_2$  accumulation and the size of mesosome in injured cells. This finding intensely indicated that mesosomes are just the additional location of  $H_2O_2$  accumulation in cells under cellular injury. The excess  $H_2O_2$  accumulation in mesosomes should be a positive regulatory mechanism in bacteria under cellular injury.

**Keywords:** hydrogen peroxide; mesosome; cellular injury; *Xanthomonas*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Fund of China (30170238, 30670070), the Foundation for Middle-aged and Young Scientist of Gansu Province, China (099RJYA008) and the Foundation for Talent Training of the Innovative Scientific Research of Henan University of Science and Technology (2009CZ0015)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-379-6428234; E-mail: lixinpxy@hotmail.com

Received: 26 November 2009/ Revised: 6 February 2010