百日咳毒素与霍乱毒素对乙酰胆碱诱导气孔运动的影响*

张蜀秋 王恒彬 孟凡霞 王学臣 娄成后

中国农业大学生物学院，植物生理学与生物化学国家重点实验室，北京 100094

摘要 在动物细胞中神经递质乙酰胆碱与其受体结合后，通过G蛋白的偶联传递信号．在植物中，乙酰胆碱也普遍存在并参与调节许多生理过程．乙酰胆碱及其受体参与了气孔运动的调节，G蛋白的激活剂霍乱毒素与抑制剂百日咳毒素影响乙酰胆碱诱导的气孔开放，而且仅在含Ca^{2+}的介质中才能起作用；同时用Ca^{2+}荧光探针Fluo-3检测保卫细胞胞质Ca^{2+}动态变化，表明乙酰胆碱的胞内信号转导中有Ca^{2+}的参与．由此推测在毒蕈碱型乙酰胆碱受体介导乙酰胆碱诱导的气孔运动中，可能存在与G蛋白偶联的信号转导．

关键词 乙酰胆碱 气孔运动 G蛋白 百日咳毒素 霍乱毒素

G蛋白是一类鸟苷酸结合蛋白质，其分子的多样性和精细调节，能将多种复杂的外部信号在细胞内准确转导．所以G蛋白作为细胞膜上的重要信号分子介入了多种信号传递[1]．由于气孔保卫细胞对环境因子非常敏感，接受刺激后能做出快速反应，所以成为研究细胞信号转导的经典材料．在气孔运动的调节中，G蛋白可能参与介导信号传递的作用．

在动物细胞中，重要的神经递质乙酰胆碱(ACh)与其受体结合后，通过G蛋白的偶联，激活细胞内的磷脂酶C、腺苷酸环化酶、鸟苷酸环化酶等催化产生第二信使，继而引起胞内一系列级联放大反应[2]．和动物一样，植物细胞中也存在胆碱能系统，其功能的发挥有烟碱型受体(nAChR)与毒蕈碱型受体(mAChR)介导[3]．Tretyn等[4]发现mAChR介导的小麦原生质体膨胀中，G蛋白抑制剂可抑制ACh诱导的Ca^{2+}依赖的原生质体膨胀，他们的研究说明，乙酰胆碱不仅存在于植物中，而且参与植物的某些生理过程的调节，其信号转导机制也和动物相似．我们的研究已经证明ACh可通过其受体的介导诱导气孔开放，并发现nAChR功能的发挥与介质中K^+有关，而mAChR与Ca^{2+}有关[5, 6]．本文观察了G蛋白的激活剂和抑制剂对ACh诱导的气孔运动的影响，初步证明G蛋白参与了ACh的信号转导途径．对保卫细胞胞内Ca^{2+}的分析提示Ca^{2+}在G蛋白的下游参与保卫细胞内ACh的信号转导．

1 材料和方法

1.1 植物材料

蚕豆(*Vicia faba* L.)种子经清洗和表面消毒后浸种12 h，25℃催芽24 h，播种于掺入适量蛭石的营养土中，以增强其透水性，在生长室(12 h光照，光强200 $\mu mol/m^2 \cdot s$，昼/夜温度为24℃/18℃，相对湿度60%）中培养3周．

1.2 气孔孔径的测定

取蚕豆幼苗第3对完全展开叶片，用镊子小心地撕取其下表皮并用毛刷除去上面粘附的叶肉细胞，放入MES/Tris缓冲液(10 mmol/L MES/Tris, 50 mmol/L KCl或1 μmol/L $CaCl_2$，pH 6.05)，暗处理3 h以使气孔完全关闭，转入含有ACh (10 μmol/L)和各种试剂的溶液中，继续保持在暗中3h．随机选取5个视野，每个视野内随机选取10个气孔，用显微测微尺测定其孔径．以上处理均在

2002-05-10收稿，2002-07-10收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划(批准号：G1999011700)资助项目

E-mail：sqzhang@cau.edu.cn

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

25℃进行. 重复3次.

1.3 百日咳毒素(PTX)和霍乱毒素(CTX)的活化

PTX活化[7]: PTX溶解于50 mmol/L的Hepes缓冲液中(pH 7.5, 含20 mmol/L DTT, 1 mg/mL BSA, 0.1% SDS), 30℃下保温30 min, 母液(100 μg/mL)于4℃保存. 使用时稀释到适宜浓度(100 ng/mL), 加入NAD^+使最终浓度为5 μmol/L, 作为G蛋白ADP核糖基化的底物.

CTX活化[7]: CTX溶解于10 mmol/L的Hepes缓冲液中(pH 7.3, 含100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L DTT, 0.5% SDS), 30℃下保温30 min, 母液(1 mg/mL)于4℃保存. 使用时稀释到适宜浓度(100 ng/mL), 并加入NAD^+使最终浓度为5 μmol/L, 作为G蛋白ADP核糖基化的底物.

1.4 胞质Ca^{2+}测定

将表皮条放于缓冲液中, 加入10 μmol/L Fluo-3-AM (Bio-Rad, 溶于二甲基亚砜)及Pluronic F-127 (0.1%), 25℃下避光孵育2 h左右, 取出后用表皮条缓冲液冲洗多次, 除去吸附的染料[8]. 将冲洗好的表皮条置于载玻片上, 用488 nm蓝光激发, 经激光共聚焦扫描显微镜(Bio-Rad, MRC-1024)扫描, 共聚焦系统由Bio-Rad公司提供的软件控制, 在Pentium 333 Dell计算机下进行. 荧光染料在细胞中的静态分布图像在LaserSharp Acquisition软件包下获得. 荧光强度随时间变化的数据在TimeCourse面板下获得, 数据处理在Excel下进行[8].

2 结果和讨论

前期的工作已经证明, 乙酰胆碱诱导的气孔开放与介质中一定浓度的K^+和Ca^{2+}相关. 在含50 mmol/L K^+的介质中, 一定浓度的ACh及其激活剂烟碱可诱导蚕豆叶片气孔开放, 而在含1 μmol/L $CaCl_2$的介质中, 一定浓度的毒蕈碱也可诱导气孔开放[5, 6]. 说明两种乙酰胆碱受体介导的乙酰胆碱对气孔运动的影响有不同的作用机理. PTX与CTX分别是G蛋白的抑制剂与激活剂. 由图1可以看出, 在含有K^+的介质中, PTX和CTX对乙酰胆碱诱导的气孔开放都没有影响, 推测在含K^+介质中, 乙酰胆碱诱导的气孔开放过程可能不涉及G蛋白的转导信号作用, 而直接与N型乙酰胆碱受体介导的K^+通道有关. 在含Ca^{2+}的介质中(图2), PTX和CTX单独处理比对照的气孔孔径略大, CTX的作用稍大于PTX, 但经t检验, 与对照相比均没有达到显著差异; 然而, PTX和CTX与ACh共同处理时, 分别降低了ACh诱导气孔开放作用的35%和33%. 由此初步判断, G蛋白介入了ACh作用的信号转导.

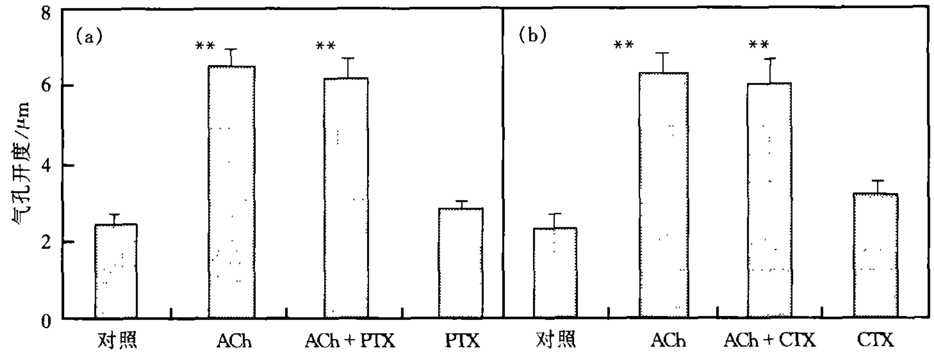

图1 在含K^+的介质中, PTX (a)与CTX (b)对ACh诱导的气孔开放的影响

** 所示与对照、PTX或CTX相比差异显著, t检验$p<0.01$

Ca^{2+}作为细胞内第二信使系统中的重要成员, 在气孔保卫细胞对刺激的反应中起重要作用[9]. 有证据表明G蛋白介导调控保卫细胞离子通道的活性可能依赖于Ca^{2+}[10]. 为了进一步证明经G蛋白转换ACh信号后, 是否有Ca^{2+}信号参与, 本实验用荧光探针并借助激光共聚焦扫描显微镜观察了保卫细胞胞质Ca^{2+}的动态变化. 结果表明外源ACh可引起保卫细胞Ca^{2+}的短时间增加后下降(图3), 而ACh的类似物丙酰胆碱(PCh)却没有效应(图4), 说明ACh的信号是特异的; 用PTX(图5)和CTX(图6)预处理后, 胞质Ca^{2+}基本上没有变化, 即抑制了G蛋白的活性就抑制了ACh引起的保卫细胞胞质Ca^{2+}的增加, 可见G蛋白参与mAChR介导的ACh诱导气孔运动与Ca^{2+}信号系统有关.

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

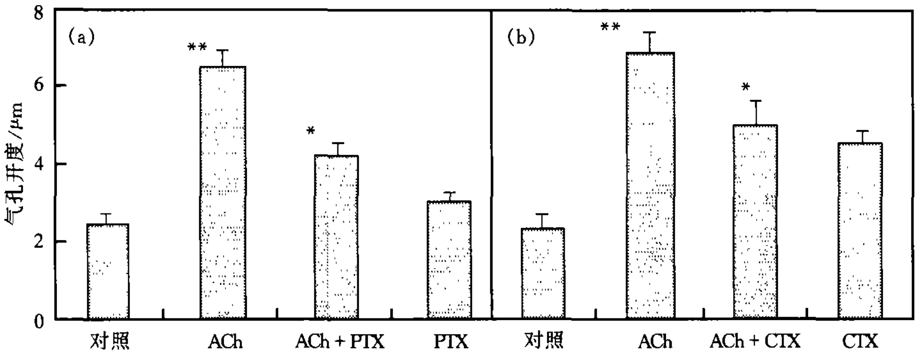

图2 在含 Ca^{2+} 的介质中，PTX (a)与 CTX (b)对 ACh 诱导的气孔开放的影响

** 所示与对照相比差异显著，t 检验 $p<0.01$，

* 与 ACh 相比差异显著，但与 PTX 或 CTX 差异不显著

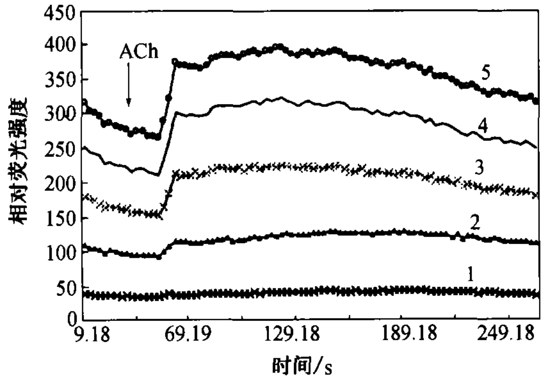

图3 10^{-5} mol/L ACh 引起保卫细胞胞内 Ca^{2+} 变化的动态曲线

曲线1为背景值，曲线2～5示细胞内不同点的荧光变化

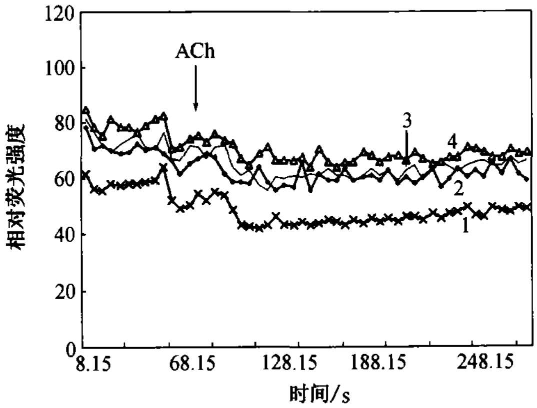

图5 外源 PTX 预处理对 ACh 引起的胞内 Ca^{2+} 变化的影响

曲线1为背景值，曲线2～4示细胞内不同点的荧光变化

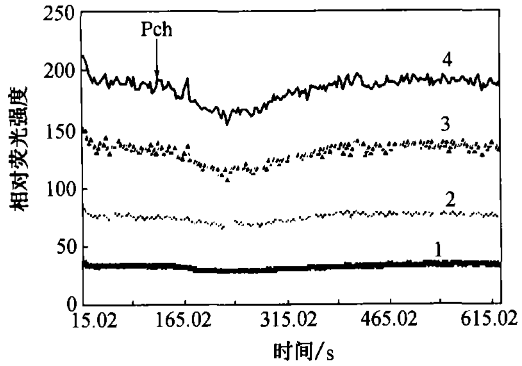

图4 10^{-5} mol/L Pch 引起保卫细胞胞内 Ca^{2+} 变化的动态曲线

曲线1为背景值，曲线2～4示细胞内不同点的荧光变化

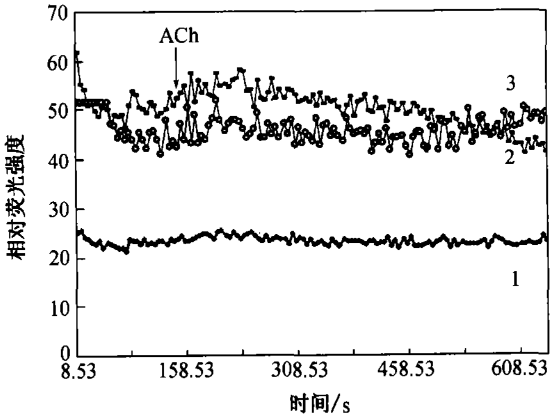

图6 外源 CTX 预处理对 ACh 引起的胞内 Ca^{2+} 变化的影响

曲线1为背景值，曲线2，3示细胞内不同点的荧光变化

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

G蛋白是细胞中一类具有重要生理调节功能的蛋白质，是偶联细胞膜受体与其所调节的相应生理过程之间的主要信号传递者[11]．植物细胞G蛋白的研究始于20世纪80年代中后期，近些年来的研究不仅证明了G蛋白在高等植物中普遍存在，而且发现G蛋白参与植物对光或激素的生理反应、植物细胞跨膜离子运输、植物组织和器官的形态建成等信号转导过程[12]．用G蛋白的激活剂或抑制剂处理可提供G蛋白是否参与信号转导的药理学证据．Ma等[13]证明百合花粉质膜上存在G蛋白，且在细胞外CaM启动花粉萌发和促进花粉管伸长过程中起重要作用，他们的实验显示(100～200)ng/mL CTX可促进花粉萌发而PTX则明显抑制．Fairley等[14]利用膜片钳技术研究发现，蚕豆保卫细胞质膜上的内向K^+通道受膜上的G蛋白调控．Wu等[7]在分离膜片上的检测结果进一步表明PTX和CTX均抑制K^+的内流而影响气孔运动．他们推测植物中G蛋白可能与动物中的有所不同，有多种G蛋白参与气孔运动的调节．Wang等[15]发现拟南芥的G蛋白一个亚基基因*GPA*1突变，则对ABA抑制保卫细胞K^+通道作用不敏感，直接证明G蛋白参与保卫细胞K^+通道调节，他们认为活化的G蛋白使K^+通道关闭而抑制气孔开放．看来G蛋白参与了花粉萌发或气孔运动的信号转导，但PTX和CTX的作用却不尽相同，这可能与Ca^{2+}变化在花粉萌发和气孔运动中的行为不同有关，仍有待更广泛深入的研究．

ACh的毒蕈碱型受体(mAChR)是跨膜7次的糖蛋白，从结构与功能上看，属于G蛋白偶联的受体家族，其在胞内的第三区段的某些氨基酸，可能是G蛋白的激活部位[2, 16]，在配基存在时，mAChR首先与G蛋白结合，再通过第二信使或直接调节细胞膜上的离子通道的功能状态[2]．本实验结果表明：G蛋白的激活剂CTX和抑制剂PTX可以在不同程度上减小乙酰胆碱诱导气孔开放的作用，而且这种作用要求介质中Ca^{2+}的存在；ACh引起的胞质Ca^{2+}变化也被G蛋白抑制剂PTX或激活剂CTX基本抑制．表明毒蕈碱型受体介导ACh的作用由G蛋白偶联的第二信使中有Ca^{2+}的参与．据此推测，乙酰胆碱与其毒蕈碱型受体结合及其功能的发挥依赖于G蛋白与下游事件的偶联，而Ca^{2+}作为其中的第二信使之一，但其信号传递途径的细节需要进一步研究．

致谢 感谢中国农业大学作物学院王昌贵帮助进行差异显著性的检验．

参 考 文 献

1 Simon M I, et al. Diversity of G proteins in signal transduction. Science, 1991, 252: 802
2 吕宝璋, 等. 受体学概论. 北京: 科学出版社, 1991. 112～120; 123～135
3 Tretyn A, et al. Acetylcholine in plants: Presence, metabolism and mechanism of action. The Botanical Review, 1991, 57: 33
4 Tretyn A, et al. Influence of acetylcholine agonists and antagonists on the etiolated wheat (Triticum asstivum) mesophyll protoplasts. Planta, 1990, 182: 473
5 Wang H B, et al. Nicotinic acetylcholine receptor is involved in acetylcholine regulating stomatal movement. Science in China, Seri C, 1998, 41(6): 650
6 Wang H B, et al. Muscarinic acetylcholine receptor is involved in acetylcholine regulating stomatal movement. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(3): 250
7 Wu W, et al. A membrane-delimited pathway of G-protein regulation of the guard-cell inward K^+ channel. Pro Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 6310
8 Irving H R, et al. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 1790
9 Schroeder J I, et al. Guard cell signal transduction. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio, 2001, 52: 627
10 Kelly W B, et al. Effects of cytosolic calcium and limited, possible dual, effects of G protein modulators on guard cell inward potassium channels. The Plant Journal, 1995, 8: 479
11 Gilman A G. G proteins: Transducers of receptor-generated signals. Annu Rev Biochem, 1987, 56: 615
12 Ma H. GTP-binding proteins in plants: New members of old family. Plant Mol Biol, 1994, 26: 1611
13 Ma L, et al. The presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tube growth. Plant Cell, 1999, 11: 1351
14 Fairley-Grenot K, et al. Evidence for G-protein regulation of inward K^+ channel current in guaed cells of faba been. Plant Cell, 1991, 3: 1037
15 Wang X Q, et al. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. Science, 2001, 292: 2070
16 Weiss C A, et al. Immunolocalization of the G protein, a subunit encoded by the *GPA*1 gene in *Arabidopsis*. Plant Cell, 1993, 5: 1513

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net