

血红素加氧酶介导 GA 对小麦糊粉层中 α -淀粉酶的诱导表达

武明珠, 徐晟, 崔为体, 张博, 刘雅辉, 凌腾芳, 沈文飏*

南京农业大学生命科学学院, 南京农业大学-贝克曼离心机合作示范实验室, 南京 210095

摘要: 单独以赤霉素(GA)处理或与HO-1诱导物高铁血红素(Ht)和CO水溶液组合处理均导致小麦糊粉层中血红素加氧酶(HO)活性的提高, 同时 α -淀粉酶基因表达和 α -淀粉酶活性也明显受诱导; 用HO-1专一性抑制剂锌原卟啉(ZnPPIX)预处理6 h后, 上述效应部分受阻断。这暗示HO可能参与GA诱导的 α -淀粉酶基因表达。

关键词: 小麦糊粉层; 血红素加氧酶; 高铁血红素; 一氧化碳; 赤霉素; α -淀粉酶

Involvement of Heme Oxygenase in Gibberellic Acid-induced α -Amylase Expression in Wheat Aleurone Layer

WU Ming-Zhu, XU Sheng, CUI Wei-Ti, ZHANG Bo, LIU Ya-Hui, LING Teng-Fang, SHEN Wen-Biao*

Cooperative Demonstration Laboratory of Centrifuge Technique, Nanjing Agricultural University and Beckman Coulter Ltd. Co., College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: In this study, we showed that gibberellic acid (GA) with or without HO-1 inducer hematin (Ht) or carbon monoxide (CO) aqueous solution not only led to promote heme oxygenase (HO) activity in wheat aleurone layer, but also enhanced α -amylase gene expression and its enzyme activities. Whereas, application of HO-1 inhibitor zinc protoporphyrin IX (ZnPPIX) for 6 h blocks partially above processes. Together, above results suggested that HO might be involved in GA-induced α -amylase gene expression.

Key words: wheat (*Triticum aestivum* L.) aleurone layer; heme oxygenase; hematin; carbon monoxide; gibberellic acid; α -amylase

在种子萌发过程中, 胚产生的赤霉素(GAs)诱导糊粉层细胞合成并分泌水解酶(主要是 α -淀粉酶), 从而为种子萌发提供能量和底物。这一过程也称为糊粉层细胞内的GA响应事件, 因此糊粉层可以作为研究GA信号转导的一种模式系统(Kuo等1996; Jones等1998)。

血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是血红素分解代谢过程中的限速酶, 它催化血红素降解成为胆绿素(BV)、一氧化碳(CO)和游离的二价铁离子(Fe^{2+})。已经知道, 与一氧化氮合酶/一氧化氮(NOS/NO)信号系统的功能相类似, 动物的HO/CO信号系统也具有舒张血管和支气管平滑肌, 参与血压调节和拮抗炎症反应, 以及抗氧化的功能(Verma等1993; Dulak和Józkowicz 2003)。HO有3种不同类型的同工酶: HO-1、HO-2和HO-3。其中HO-1是诱导型, 而属于组成型的HO-2和HO-3在生物体内表达量较低。现已知HO-1几乎分布于动物所有的器官和组织中, 并涉及整个生长发育过程。近年来的研究表明, HO在植物的生长发育和抗逆过程中也有生理生化功能, 例如HO参与ABA诱导的蚕

豆叶片气孔的关闭(Cao等2007), HO/CO是生长素诱导黄瓜不定根发生的下游信号系统(Xuan等2008)。胡冰等(2008)的研究也表明, HO-1的诱导物高铁血红素(hematin, Ht)可以缓解 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl胁迫所导致的小麦幼苗根部生长受抑, 并维持根部的离子稳态。

本文以小麦品种‘扬麦13’的成熟种子糊粉层为材料, 研究Ht或CO对GA诱导糊粉层中 α -淀粉酶基因表达的影响, 并初步探讨HO是否属于GA信号转导的下游媒介。

材料与方法

GA、Ht和HO-1专一性抑制剂锌原卟啉(zinc protoporphyrin IX, ZnPPIX)均购自Sigma公司, 所有试剂均为现用现配。CO饱和溶液的制备参考徐霖等(2006)文中的方法: 用浓硫酸与甲酸共热制备

收稿 2009-03-23 修定 2009-04-15

* 通讯作者(E-mail: wbshenh@njau.edu.cn; Tel: 025-84395773)。

CO气体, 反应式为: $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{l}) + \text{HCOOH}(\text{l}) \rightarrow \text{CO}(\text{g}) + \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}(\text{l})$ 。气体持续通入盛有 100 mL 糊粉层培养液($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 水溶液)的玻璃烧杯中长达 30 min 以上, 以确保溶液达到饱和。饱和溶液用无菌过滤器过滤后立即用无菌的糊粉层培养液稀释至实验所需的 CO 浓度(10.0% 饱和度)。

材料为小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘扬麦 13’种子。去掉胚和尾端的半粒种子用 1% 的次氯酸钠消毒 20 min, 再用灭菌水清洗数次, 置于盛有无菌水的培养皿中, 在温度为(25 ± 1) $^\circ\text{C}$ 的温箱中培养 48 h。先用金属刮刀轻轻的刮去半粒种子的淀粉, 剥离的糊粉层再用无菌水洗数次, 再把附着的淀粉除去。最后剥离的糊粉层用 3 mL 糊粉层培养液($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, Con)放置于 25 mL 的三角瓶中培养, 每个小瓶中有 10 片糊粉层。其他处理有: (1) Ht: Con+ $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ht; (2) CO: Con+10.0% CO; (3) GA: Con+ $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA; (4) GA+Ht: Con+ $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA+ $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ht; (5) GA+CO: Con+ $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA+10.0% CO; (6) ZnPPIX \rightarrow GA: $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ZnPPIX \rightarrow Con+ $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA; (7) ZnPPIX \rightarrow GA+Ht: $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ZnPPIX \rightarrow Con+ $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA+ $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ht; (8) ZnPPIX \rightarrow GA+CO: $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ZnPPIX \rightarrow Con+ $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA+10.0% CO; (9) Con \rightarrow GA: Con \rightarrow Con+ $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA; (10) ZnPPIX \rightarrow Con: $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ZnPPIX \rightarrow Con。其中, ZnPPIX 和培养液的预处理(ZnPPIX \rightarrow 和 Con \rightarrow)时间均为 6 h, 每组处理至少 3 次重复, 每次重复至少 30 片糊粉层。

α -淀粉酶的活性测定和单位规定参照 Jones 和 Varner (1967)以及 Kuo 等(1996)文中的方法。HO 的活性测定按照我们前文中的方法(Han 等 2008; Xuan 等 2008), 以 37°C 下每 30 min 催化生成 1 nmol 胆绿素为一个酶活单位(U)。

按照沈文飏等(2003)文中的方法提取各个不同处理小麦糊粉层的总 RNA, 采用提取的总 RNA 进行 cDNA 第一条链的合成反应。反应体系为: 20 μL 体系中含 5 μg RNA 样品, 2.5 U AMV 反转录酶(TaKaRa), $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Oligo-dT 引物, 合成后的 cDNA 放在 -20°C 中保存备用。PCR 反应体系为 20 μL , cDNA 稀释 2 倍后取 2 μL , 各个引物终浓度为 $10 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq 聚合酶(TaKaRa) 1 U; 反应循环参数: 预变性 95°C 5 min; 94°C 35 s, $47\sim 54^\circ\text{C}$ 30 s, 72°C

60 s, 29 个循环; 72°C 延伸 5 min。引物按以下基因设计: α -淀粉酶基因(*alpha-Amy3*, GenBank 登录号为 X05809)上游引物 5'-TCGGTGATCCAGG-CGTTCCG-3', 下游引物 5'-GGCATCCACCCA-ATCATAACCG-3' (扩增片段为 568 bp); *18S rRNA* (GenBank 登录号为 AJ272181)上游引物 5'-CAAGCCATCGCTCTGGATACATT-3', 下游引物 5'-CCTGTTATTGCCTCAAACCTTCC-3' (扩增片段长度为 658 bp)。以 18S rRNA 基因的 RT-PCR 产物为内参, 对目的基因转录本水平进行 RT-PCR 半定量分析。凝胶电泳结束后, 以溴化乙锭染色后检测, 并克隆测序验证。用 Quantity One 软件对 *alpha-Amy3* 基因相对表达进行条带定量分析, 为便于比较, 设定对照(Con, 0 h)表达量为 1。

所有数据是至少 3 次独立实验结果的平均值, 选择 Duncan's 测验做显著性统计分析。

实验结果

1 HO-1 诱导物 Ht 和 CO 水溶液对 GA 诱导 α -淀粉酶表达的影响

图 1 结果显示, 与 Kuo 等(1996)报道的结果相一致, GA 处理后的小麦糊粉层中 α -淀粉酶活性显著得到诱导; 单独加入 Ht 或 CO 也有不同程度的诱导 α -淀粉酶活性的作用, 但是效果不如 GA。与单独 GA 处理的相比, Ht 和 CO 分别与 GA 组合处

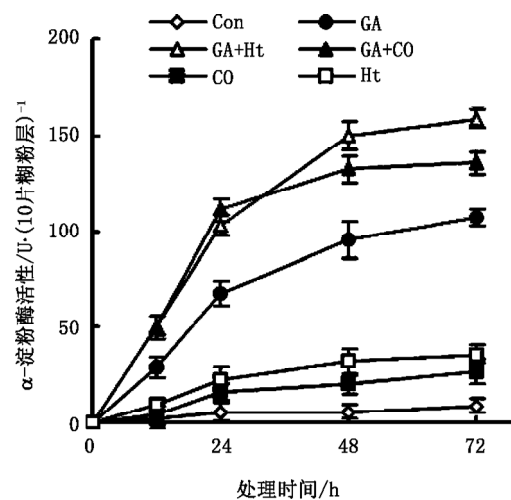


图 1 高铁血红素和 CO 对 GA 诱导小麦糊粉层中 α -淀粉酶活性的影响

Fig. 1 Effects of hematin and CO on GA-induced α -amylase activity in wheat aleurone layer

理(GA+Ht 和 GA+CO)的 α -淀粉酶活性有明显提高。各处理24 h时的 α -淀粉酶基因表达与酶活性的变化趋势一致(图2)。Ht 或 CO 与 GA 共处理后的 α -淀粉酶表达诱导有一定的叠加效应。

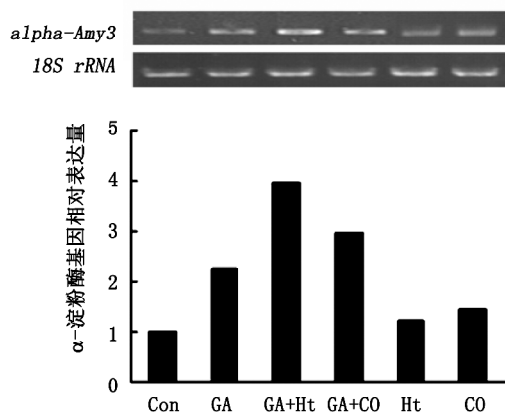


图2 高铁血红素和CO对GA诱导小麦糊粉层中 α -淀粉酶基因表达的影响

Fig.2 Effects of hematin and CO on GA-induced α -amylase gene expression in wheat aleurone layer

2 HO-1的抑制剂ZnPPIX预处理对GA诱导糊粉层中 α -淀粉酶表达的影响

图3结果显示, HO-1的抑制剂ZnPPIX预处理(ZnPPIX \rightarrow GA) 6 h与GA单独处理的(Con \rightarrow GA)

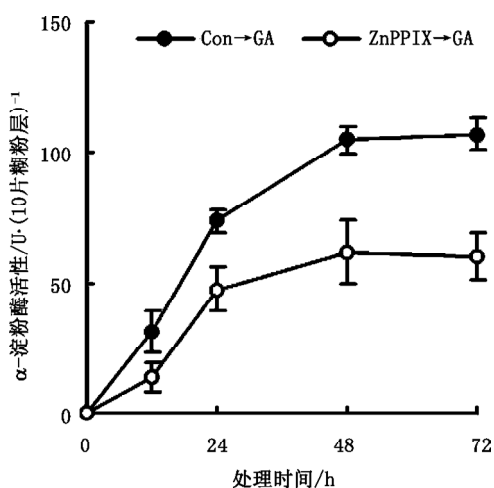


图3 ZnPPIX预处理对GA诱导的小麦糊粉层中 α -淀粉酶活性的逆转作用

Fig.3 HO-1 inhibitor ZnPPIX pretreatment reversed the enhancement of α -amylase activity induced by GA in wheat aleurone layer

相比, 其受GA诱导的 α -淀粉酶活性明显降低, 其中处理72 h的 α -淀粉酶活性比GA单独处理的降低43.7%。图4结果表明, ZnPPIX预处理能部分下调GA诱导24 h内的 α -淀粉酶基因转录本, 这与酶活性的变化是一致的。这些结果表明, ZnPPIX预处理能部分阻断GA诱导的小麦糊粉层 α -淀粉酶活性和基因表达。

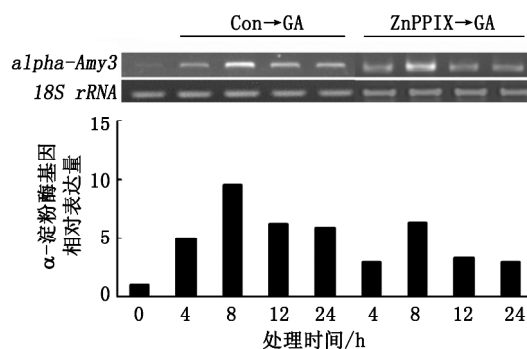


图4 ZnPPIX预处理对GA诱导的小麦糊粉层中 α -淀粉酶基因表达的下调作用

Fig.4 HO-1 inhibitor ZnPPIX pretreatment downregulated α -amylase gene expression induced by GA in wheat aleurone layer

3 ZnPPIX预处理部分抑制GA和Ht以及CO组合对HO和 α -淀粉酶活性的诱导

图5-a结果表明, GA单独处理8 h的小麦糊粉层中HO的活性受到诱导($P < 0.05$); GA和Ht或CO组合可进一步上调HO活性。而ZnPPIX预处理则部分削弱上述的诱导效应。值得注意的是, ZnPPIX单独处理的(ZnPPIX \rightarrow Con) HO活性比不用ZnPPIX处理的明显下降($P < 0.05$)。 α -淀粉酶活性的变化与HO的趋势类似(图5-b)。

讨论

近年来的研究表明, HO/CO信号系统在植物生长发育过程中也起作用。如HO可调节ABA诱导的蚕豆叶片气孔的关闭(Cao等2007)以及生长素诱导的黄瓜不定根的发生(Xuan等2008), 此外, CO对镉诱导苜蓿根组织的氧化伤害也有防护作用(Han等2008)。本文结果表明, HO还可能参与GA诱导小麦糊粉层中 α -淀粉酶基因的表达。GA单独处理能诱导 α -淀粉酶和HO活性的提高(图1、5)。GA和HO-1诱导物Ht以及CO水溶液的组合对小

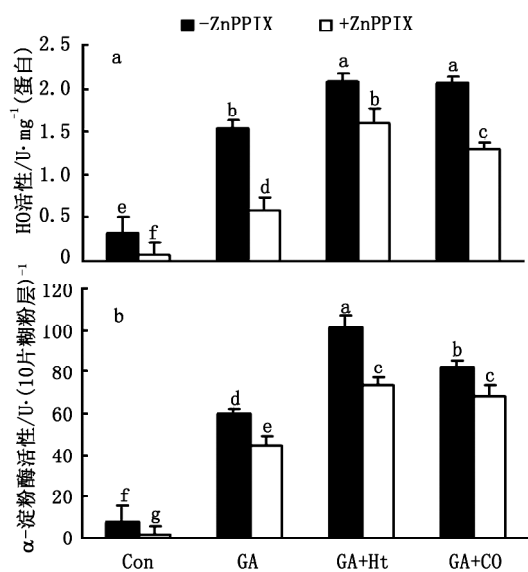


图5 ZnPPIX 预处理对 GA 和 Ht 或 CO 组合诱导的小麦糊粉层中 HO (8 h) (a) 和 α -淀粉酶 (24 h) (b) 活性的影响

Fig.5 Effects of ZnPPIX pretreatment on HO (8 h) (a) and α -amylase activity (24 h) (b) induced by individual GA in wheat aleurone layer

柱形上不同字母表示数字间差异达到 $P < 0.05$ 水平。

麦糊粉层中 HO 和 α -淀粉酶活性的诱导还有一定的叠加效应, HO-1 的专一性抑制剂 ZnPPIX 预处理能部分阻断这一效应(图5), 这暗示小麦糊粉层中受 GA 诱导的 α -淀粉酶活性对 HO-1 有依赖型和不依赖型两大类。

已经知道, α -淀粉酶的诱导表达与 G 蛋白、cGMP、蛋白质磷酸化作用、磷酸肌醇循环途径、 Ca^{2+} 和钙调素等因素都有关系(Jones 等 1998; Penson 等 1996; Kuo 等 1996; Yotsushima 等 1993; Bush 1996)。另外, 有人认为 HO 分解产物之一的 CO 是一种气体信号分子, 并主要通过 sGC/cGMP 发挥作用(Verma 等 1993; Dulak 和 Józkwicz 2003)。Muramoto 等(2002)也发现体外表达拟南芥 HO-1 基因可以产生 CO, 因此 cGMP 是否也属于 HO 介导 GA 诱导 α -淀粉酶基因表达的下游信号分子还有待进一步研究。

参考文献

胡冰, 贺子义, 林国庆, 谢彦杰, 齐继艳, 江丹君, 沈文飏, 黄丽琴

(2008). 高铁血红素对盐胁迫下小麦根部生长受抑的缓解和根尖中离子微域分布的影响. 植物生理学通讯, 44 (5): 865~868

沈文飏, 汪仁, 王益华, 郑天清, 万建民(2003). 从水稻种胚中提取 RNA 的新方法. 遗传, 25 (2): 208~210

徐霁, 宣伟, 黄本开, 周业华, 凌腾芳, 徐晟, 沈文飏(2006). 一氧化碳诱导绿豆下胚轴不定根的发生. 科学通报, 51 (4): 409~414

Bush DS (1996). Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells. Planta, 199: 89~99

Cao ZY, Huang BK, Wang QY, Xuan W, Ling TF, Zhang B, Chen X, Nie Li, Shen WB (2007). Involvement of carbon monoxide produced by heme oxygenase in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* and its proposed signal transduction pathway. Chin Sci Bull, 52 (17): 2365~2373

Dulak J, Józkwicz A (2003). Carbon monoxide—a “new” gaseous modulator of gene expression. Acta Biochim Pol, 50: 31~47

Han Y, Zhang J, Chen XY, Gao ZZ, Xuan W, Xu S, Ding X, Shen WB (2008). Carbon monoxide alleviates cadmium-induced oxidative damage by modulating glutathione metabolism in the roots of *Medicago sativa*. New Phytol, 177 (1): 155~166

Jones HD, Smith SJ, Desikan R, Plakidou-Dymock S, Lovegrove A, Hooley R (1998). Heterotrimeric G proteins are implicated in gibberellin induction of α -amylase gene expression in wild oat aleurone. Plant Cell, 10: 245~254

Jones RL, Varner JE (1967). The bioassay of gibberellins. Planta, 72: 53~59

Kuo AL, Cappelluti S, Cervantes MC, Rodriguez M, Bush DS (1996). Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. Plant Cell, 8: 259~269

Muramoto T, Tsurui N, Terry MJ, Yokota A, Kohchi T (2002). Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required for phytochrome chromophore synthesis. Plant Physiol, 130: 1958~1966

Penson SP, Schuurink RC, Fath A, Gubler F, Jacobsen JV, Jones RL (1996). cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. Plant Cell, 8: 2325~2333

Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH (1993). Carbon monoxide: a putative neural messenger. Science, 259: 381~384

Xuan W, Zhu FY, Xu S, Huang BK, Ling TF, Qi JY, Ye MB, Shen WB (2008). The heme oxygenase/carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious rooting process. Plant Physiol, 148: 881~893

Yotsushima K, Mitsui T, Takaoka T, Hayakawa T, Igaue I (1993). Purification and characterization of membrane-bound inositol phospholipid-specific phospholipase C from suspension-cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells. Plant Physiol, 102: 165~172