

## 钙参与铜诱导的小麦根中NADPH氧化酶活性的升高

郝福顺<sup>1,\*</sup>, 孙立荣<sup>1,2</sup>, 崔香环<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 河南大学农业生物技术研究所, 生命科学学院, 河南开封 475004; <sup>2</sup> 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029

**摘要:** 研究钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ ) 在重金属铜诱导的小麦根质膜NADPH氧化酶活性变化中作用的结果表明,  $\text{Ca}^{2+}$  以剂量依赖的方式提高NADPH氧化酶活性, 且这种增加效应可完全为 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合剂乙二醇-双-(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)所抑制。用 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻断剂氯化镧和异搏定以及EGTA预处理小麦根可抑制铜诱导的NADPH氧化酶活性升高, 这类抑制效应也是剂量依赖的。这些结果说明 $\text{Ca}^{2+}$ 参与铜诱导小麦根NADPH氧化酶活性和活性氧产生的调节过程。

**关键词:** 小麦; 钙; 铜; NADPH氧化酶

## Calcium Was Involved in Copper-induced Increment of NADPH Oxidase Activity of Roots in Wheat (*Triticum durum* D.) Seedlings

HAO Fu-Shun<sup>1,\*</sup>, SUN Li-Rong<sup>1,2</sup>, CUI Xiang-Huan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Agricultural Biotechnology, College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China; <sup>2</sup>College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China

**Abstract:** Function of  $\text{Ca}^{2+}$  in the copper-induced change of plasma membrane NADPH oxidase activity in roots of wheat (*Triticum durum*) seedlings was investigated. The result showed that the activity of NADPH oxidase was significantly increased in a dose-dependent manner induced by  $\text{Ca}^{2+}$ . Furthermore, the enhanced effect was completely inhibited by EGTA, a kind of chelator of  $\text{Ca}^{2+}$ . In addition, pretreatment of the wheat roots with  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers  $\text{LaCl}_3$ , verapamil and EGTA resulted in remarkable inhibition in the increase of activity of NADPH oxidase in a dose-dependent pattern. The three inhibitors also suppressed the copper-stimulated enhancement in the contents of superoxide radical, hydrogen peroxide and malondialdehyde (MDA). These results suggested that  $\text{Ca}^{2+}$  was involved in the copper-induced regulation of NADPH oxidase activity and the production of reactive oxygen species in roots of wheat seedlings.

**Key words:** wheat (*Triticum durum*); calcium; copper; NADPH oxidase

重金属铜既是影响植物生长发育的环境因子, 又是植物必需的营养元素, 但高浓度的铜对植物有毒害作用(Halliwell 和 Gutteridge 1984; 刘文彰和孙典兰 1985; 祝沛平等 1999; 郑曦和肖焯 2003)。已有的研究表明, 铜的毒害作用与铜导致植物产生过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )和超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )等活性氧(reactive oxygen species, ROS)密切相关(Halliwell 和 Gutteridge 1984; Navari-Izzo 等 1998)。铜既能通过Fenton反应产生ROS (Schützendübel和 Polle 2002), 又可通过增加质膜NADPH氧化酶的活性产生ROS (Quartacci 等 2001)。另有研究证实, 质膜NADPH氧化酶通过产生ROS在植物应答生物胁迫和干旱、冷、ABA、紫外照射以及重金属过量或缺乏等非生物胁迫反应中起作用(郝福顺和陈珈 2005)。而且, 在生物胁迫或ABA及

重金属镍作用下, NADPH氧化酶的活性受第二信使钙的调节(Sagi 和 Fluhr 2001; Jiang 和 Zhang 2003; Hao 等 2006)。但植物受过量铜离子胁迫时, NADPH氧化酶的活性是否受 $\text{Ca}^{2+}$ 调节, 还未见报道。为此, 我们以小麦根为材料, 研究铜离子胁迫下质膜NADPH氧化酶活性与 $\text{Ca}^{2+}$ 的关系, 证实 $\text{Ca}^{2+}$ 参与铜诱导的NADPH氧化酶活性升高过程。

### 材料与方法

小麦(*Triticum durum* D.)品种‘京冬8号’

收稿 2007-06-05 修定 2007-08-23

资助 河南大学博士启动基金(B2005060)。

\* E-mail: haofsh@henu.edu.cn; Tel: 0378-3880007

种子来自中国农业科学院品种资源研究所。用2%次氯酸钠消毒小麦种子15 min后,以去离子水冲洗干净,于30℃下催芽约24 h,种子播于置于较大容器的带孔塑料浅盘中,容器中加入1/10 Hoagland 培养液,培养液通气并每天更换。发芽后麦苗的培养条件为:光照/黑暗时间16 h/8 h,温度25℃,光强400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

处理有:(1)用 $\text{CuSO}_4$  (1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )处理发芽后生长7 d的小麦根24 h;(2)分别用 $\text{LaCl}_3$  (2.5、5.0、10.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、异搏定(verapamil, 0.5、1.0、1.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )或乙二醇-双-(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA) (2.5、5.0、10.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )预处理生长7 d的小麦根1 h后,用 $\text{CuSO}_4$  (1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )处理根24 h,以在未经预处理的1/10Hoagland 溶液培养24 h的根作对照,处理后剪下根,立即用于其后的研究。

按Hao等(2006)文中的方法用两相法分离质膜并以标志酶活性检测质膜的纯度;根据超氧阴离子还原1-羟苯氨3,4-四唑双4-甲基-6-硝基苯磺酸钠(XTT)程度确定质膜囊泡的NADPH氧化酶活性。

所有操作均在4℃下进行。蛋白质含量测定按Bradford (1976)的方法。

按Jiang和Zhang (2001)文中的方法测定超氧阴离子含量。

根据形成的钛-过氧化复合物在波长415 nm处的光吸收值确定过氧化氢含量(Brennan和Frenkel 1977)。

按Du和Bramlage (1992)文中的方法测定根中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。

以上实验至少重复3次,在0.05概率水平上用Student's *t* 检验计算差异显著性。

## 结果与讨论

### 1 质膜的分离和纯度鉴定

我们以小麦根为材料成功分离到了质膜囊泡,并通过测定几种不同膜的标志酶(如对钒酸盐敏感的质膜ATP酶、线粒体膜细胞色素c氧化酶以及对硝酸根离子敏感的液泡膜ATP酶)活性鉴定质膜纯度的结果表明,从提取的膜微囊(microsomal pellet, MIC)到质膜囊泡(plasma membrane

fractions,  $U_3$ ),对钒酸盐敏感的质膜ATP酶活性增加8倍之多(表1),说明最终得到的膜囊泡 $U_3$ 富含质膜,其他细胞内膜的成分很少,据此认为,可用来测定质膜NADPH氧化酶活性。

表1 小麦根膜MIC和 $U_3$ 中的标志酶活性  
Table 1 Specific activities of marker enzymes in the microsomal pellet (MIC) and plasma membrane fractions ( $U_3$ ) from roots of wheat seedlings

标志酶	MIC 中酶活性/ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白) $\cdot\text{min}^{-1}$	$U_3$ 中酶活性/ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白) $\cdot\text{min}^{-1}$	$U_3$ / MIC
对钒酸盐敏感的ATP酶	57.2±2.5	461.4±28.0	8.07
细胞色素c氧化酶	198.3±15.8	23.2±2.8	0.12
对硝酸根离子敏感的ATP酶	15.2±1.4	3.1±0.5	0.20

表中数据为3次重复的平均数±标准误。

### 2 铜对质膜NADPH氧化酶活性的影响

测定1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铜对质膜NADPH氧化酶活性影响的结果表明,经铜处理24 h的小麦根中NADPH氧化酶活性显著提高,比未经铜处理的增高2.6倍(图1),说明高浓度铜可提高质膜NADPH氧化酶活性。

### 3 钙对质膜NADPH氧化酶活性的影响

有报道指出, $\text{Ca}^{2+}$ 能调节NADPH氧化酶活性(Sagi和Fluhr 2001; Jiang和Zhang 2003)。据此,我们以从未经铜处理小麦根中得到的质膜囊泡为材料,反应体系中加入 $\text{Ca}^{2+}$ ,体外检测 $\text{Ca}^{2+}$ 对NADPH氧化酶活性影响的结果表明, $\text{Ca}^{2+}$ 以剂量依赖的方式显著增加NADPH氧化酶活性,而且,这种增加效应可为 $\text{Ca}^{2+}$ 的螯合剂EGTA完全抑制(图

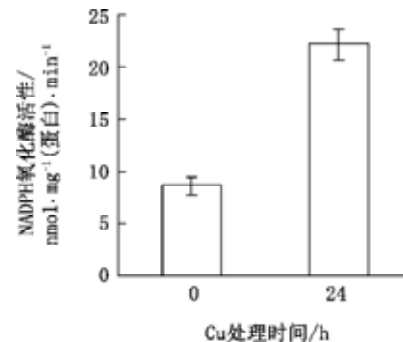


图1 铜对NADPH氧化酶活性的影响

Fig.1 Effects of copper on NADPH oxidase activity

2),  $\text{Ca}^{2+}$  浓度超过  $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 加与不加 EGTA 之间的 NADPH 氧化酶活性差异达到极显著水平, 说明  $\text{Ca}^{2+}$  能提高 NADPH 氧化酶活性。

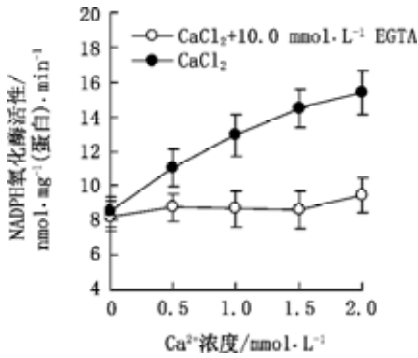


图2 不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  对未经铜处理小麦根质膜囊泡中 NADPH 氧化酶活性的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  on NADPH oxidase activity of plasma membrane vesicle from roots of wheat seedlings untreated with Cu

不同浓度  $\text{CaCl}_2$  或  $\text{CaCl}_2+10.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EGTA 在反应开始 5 min 之前加入反应体系中。所有值均为 3 次独立实验的平均值  $\pm$  标准误。

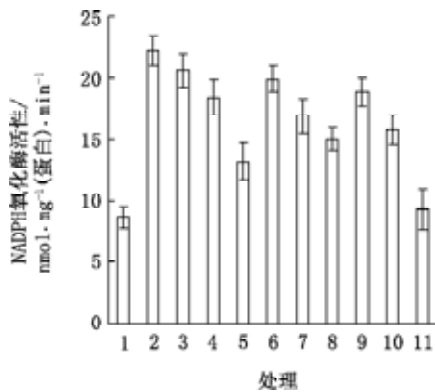


图3 不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  抑制剂对小麦根质膜中 NADPH 氧化酶活性的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  inhibitors on plasma membrane NADPH oxidase activity in roots of wheat seedlings

1 和 2 分别代表小麦根用营养液(对照)和  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  处理小麦根 24 h 后测定的值。3~11 分别为  $2.5$ 、 $5.0$ 、 $10.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$ ,  $0.5$ 、 $1.0$ 、 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  异搏定以及  $2.5$ 、 $5.0$ 、 $10.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EGTA 预处理小麦根 1 h, 再用  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  处理 24 h 后测定的值。3 : Cu+ $\text{LaCl}_3$  2.5 ; 4 : Cu+ $\text{LaCl}_3$  5.0 ; 5 : Cu+ $\text{LaCl}_3$  10.0 ; 6 : Cu+ 异搏定 0.5 ; 7 : Cu+ 异搏定 1.0 ; 8 : Cu+ 异搏定 1.5 ; 9 : Cu+EGTA 2.5 ; 10 : Cu+EGTA 5.0 ; 11 : Cu+EGTA 10.0。所有值均为 3 次独立实验的平均值  $\pm$  标准误。

#### 4 钙通道阻断剂和 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合剂对质膜 NADPH 氧化酶活性的影响

如图 3 所示, 以钙通道阻断剂  $\text{LaCl}_3$  和异搏定以及  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 EGTA 预处理小麦根后, 铜诱导的质膜 NADPH 氧化酶活性增加均受抑, 除  $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$  和  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  异搏定外, 经其他浓度试剂预处理小麦根后的 NADPH 氧化酶活性与

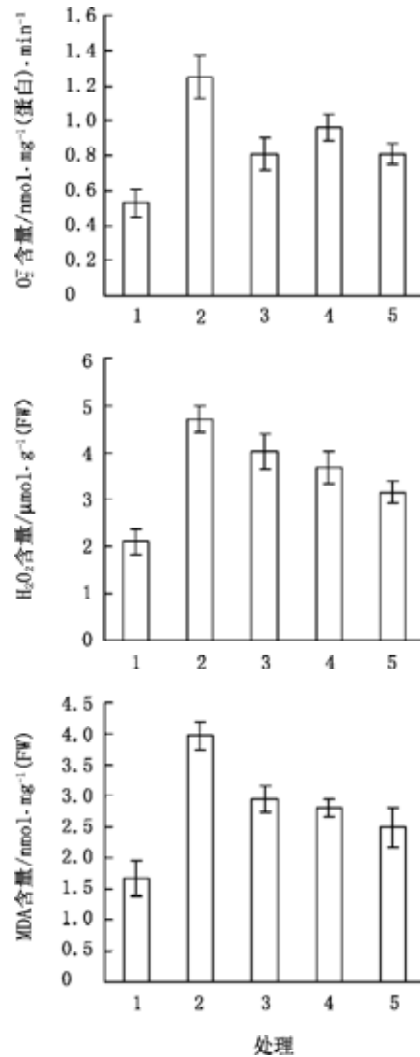


图4  $\text{Ca}^{2+}$  抑制剂对小麦根中  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和 MDA 含量的影响

Fig.4 Effects of inhibitors of  $\text{Ca}^{2+}$  on  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and MDA contents in roots of wheat seedlings

1 和 2 分别为小麦根用营养液(对照)和  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  处理小麦根 24 h 后测定的值。3~5 分别为用  $10.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$ 、 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  异搏定和  $10.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EGTA 预处理小麦根 1 h, 再用  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  处理 24 h 后测定的值。所有值均为 3 次独立实验的平均值  $\pm$  标准误。

仅以铜处理的相比, 差异均达到显著水平。而且, 这3种  $\text{Ca}^{2+}$  抑制剂的抑制效应都是以剂量依赖的方式起作用的, 说明  $\text{Ca}^{2+}$  似乎参与铜诱导的NADPH氧化酶活性增加过程。这与植物在生物胁迫或ABA等影响下, NADPH氧化酶活性受  $\text{Ca}^{2+}$  调节的抗逆(Sagi和Fluhr 2001; Jiang和Zhang 2003; Hao等2006)似乎是一致的。

### 5 钙通道阻断剂和 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合剂对铜诱导的 $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和MDA含量的影响

图4显示, 经3种抑制剂预处理的小麦根中, 铜所诱导的  $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和MDA含量的升高均显著受抑, 说明铜可增强NADPH氧化酶活性从而提高植物体内ROS水平和加剧膜脂过氧化,  $\text{Ca}^{2+}$  参与这一过程的调节。

铜离子可能通过  $\text{Ca}^{2+}$  直接增加NADPH氧化酶活性, 也可能是通过对钙依赖的蛋白激酶由磷酸化介导而间接激活NADPH氧化酶(郝福顺和陈珈2005), 其间机制尚不清楚, 值得深入研究。

### 参考文献

- 郝福顺, 陈珈(2005). 植物质膜NADPH氧化酶的研究进展. 植物学通报, 22 (增刊): 1~10
- 刘文彰, 孙典兰(1985). 铜对黄瓜幼苗生长及过氧化氢酶和吲哚乙酸氧化酶活性的影响. 植物生理学通讯, (3): 22~24
- 郑曦, 肖炜(2003). Cu对小麦种子萌发及幼苗生长的影响. 徐州师范大学学报(自然科学版), 21 (3): 64~66
- 祝沛平, 李凤玉, 梁海曼(1999). 铜对植物器官分化的影响. 植物生理学通讯, 35 (4): 332~333
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Brennan T, Frenkel C (1977). Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. Plant Physiol, 59: 411~416
- Du Z, Bramlage WJ (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. J Agr Food Chem, 40: 1566~1570
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J, 219: 1~14
- Hao FS, Wang XC, Chen J (2006). Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. Plant Sci, 170: 151~158
- Jiang MY, Zhang JH (2001). Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. Plant Cell Physiol, 42: 1265~1273
- Jiang MY, Zhang JH (2003). Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. Plant Cell Environ, 26: 929~939
- Navari-Izzo F, Quartacci MF, Pinzino C, Dalla Vecchia F, Sgherri CLM (1998). Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper. Physiol Plant, 104: 630~638
- Quartacci MF, Cosi E, Navari-Izzo F (2001). Lipids and NADPH dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. J Exp Bot, 52: 77~84
- Sagi M, Fluhr R (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91<sup>phox</sup> NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. Plant Physiol, 126: 1281~1290
- Schützendübel A, Polle A (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. J Exp Bot, 53: 1351~1365