

杜氏盐藻肌醇磷脂信息传递系统在低渗震动中的可能作用

陈思学 李琳 颜季琼* 许政恺 焦新之

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

关键词 杜氏盐藻 肌醇磷脂信息传递系统 低渗震动

在植物生命活动中, 胞外信号(光、温度、重力、水分和激素等)控制着许多生理生化过程. 细胞如何感受环境信号, 并把它们传递到细胞内, 转换为生理反应成为近年来生命科学研究热点之一. 这方面的研究在动物细胞中开展的较早、较广泛和深入^[1]. 外界信号被动物细胞表面的受体接受后, 引起磷脂酶 C(PLC)活化, 使质膜肌醇磷脂降解, 产生第二信使——肌醇三磷酸(IP₃)和二酰甘油(DAG). IP₃ 可促进细胞质贮钙体释放 Ca²⁺, 活化 Ca²⁺-CaM 系统或 Ca²⁺ 依赖的蛋白激酶; DAG 可激活蛋白激酶 C(PKC), 从而引起功能蛋白的活性变化. 自从 Boss 和 Massel(1985)首先在胡萝卜细胞质膜中发现肌醇磷脂之后, 人们已在植物材料中鉴定了肌醇磷脂及其转化与再生的激酶、G 蛋白、PLC, IP₃ 和 DAG, PKC 和其他蛋白激酶, 研究了它们的生化特性与代谢, 以及它们对一些外界刺激的反应. 不断积累的实验表明, 植物细胞也存在一个和动物类似的肌醇磷脂信息传递系统^[2].

杜氏盐藻是一种不具有细胞壁的单细胞绿藻. 可以生活在 0.5~5 mol/L NaCl 营养液中. 它以甘油作为胞内主要的渗透调节物质, 渗透调节的能力极强, 是研究刺激与细胞反应耦联过程的好材料. 前人的实验表明杜氏盐藻肌醇磷脂信息系统可能参与了信号传导过程^[3,4]. 但是, 对于信息物质(如第二信使 IP₃)含量的变化在信号传导中的作用及其和生理反应的耦联机制尚缺乏研究. 本文观察了低渗震动过程中杜氏盐藻细胞肌醇磷脂化合物含量下降与 IP₃ 含量升高的关系, 结合 G 蛋白的激活剂和 PLC 的抑制剂实验, 初步证明“低渗震动信号→G 蛋白→PLC→IP₃→甘油转化”的刺激-反应耦联过程.

1 材料与方法

1.1 材料培养和渗透震动处理

参照文献[5]的方法进行, 低渗震动处理为 2.0~0.67 mol/L NaCl.

1.2 肌醇磷脂的提取、分离与测定

肌醇磷脂的提取、分离参照 Einspahr 等^[3]介绍的方法, 薄板层析(TLC)用含 1% 草酸钾的硅胶 H 板, 展层系统为氯仿:丙酮:甲醇:乙酸:水(40:15:13:12:8 体积分数), 显色用碘蒸汽或

1995-12-25 收稿, 1996-03-18 收修改稿

* 华东师范大学生物学系, 上海 200062

钼蓝法. 肌醇磷脂含量的测定按张龙翔等^[6]的方法.

1.3 肌醇磷酸化合物的提取、分离与测定

将对数期藻细胞 500 mL 转移至不含磷的 2 mol/L NaCl 培养液中, 加入 $3 \times 3.7 \times 10^6$ Bq³²Pi(无载体 NaH₂PO₄), 培养 26 h. 细胞以悬浮液洗涤 3 次, 使密度达到 $(1.0 \sim 3.0) \times 10^9$ / mL. 从中取出 0.5 mL 进行各种处理, 加入 1.25 mL 15% 冰冷的三氯乙酸(TCA)终止反应, 再于冰上抽提 10 min. 然后于 10 000 g 冰冻离心 10 min, 上清液用 5 mL 水饱和乙醚洗涤 5 次后, 下相用 5 mmol/L 四硼酸二钠/0.5 mmol/L EDTA 调 pH 至 7.4. 样品可以于 -70℃ 保存.

把提取的样品加到 1 mL 床体积的微型阴离子交换柱 Dowex 1($\times 8$, 甲酸型, 200~400 目, Sigma Chemical Co. UK), 分别用 20 mL 下述溶液顺序洗脱:(a) ddH₂O(洗脱肌醇); (b) 5 mmol/L 四硼酸二钠/60 mmol/L 甲酸铵(洗脱甘油磷酸肌醇 GPI); (c) 0.2 mol/L 甲酸铵/0.1 mol/L 甲酸(洗脱肌醇-1-磷酸 IP); (d) 0.4 mol/L 甲酸铵/0.1 mol/L 甲酸(洗脱肌醇-1, 4-二磷酸 IP₂); (e) 1.0 mol/L 甲酸铵/0.1 mol/L 甲酸(洗脱 IP₃). 分部收集, 2.0 ml/管 5 min. 收集液用 Beckman LS 6500 液闪计数器测定 Cerenkev 计数.

1.4 甘油含量的测定

按照文献[5]的方法进行.

2 结果

2.1 低渗震动和新霉素(neomycin)对藻细胞 PI, PIP 和 PIP₂ 水平的影响

我们用肌醇磷脂的标准品与实验样品同时进行 TLC, 并参考相似实验条件下 PI, PIP 和 PIP₂ TLC 的相对迁移率值(Rf), 确定它们在薄板上的位置, 其 Rf 分别为 0.379, 0.254 和 0.174. 低渗震动对 PI 水平的影响很小, 但却显著降低了 PIP 和 PIP₂ 水平, 在 2 min 时达到

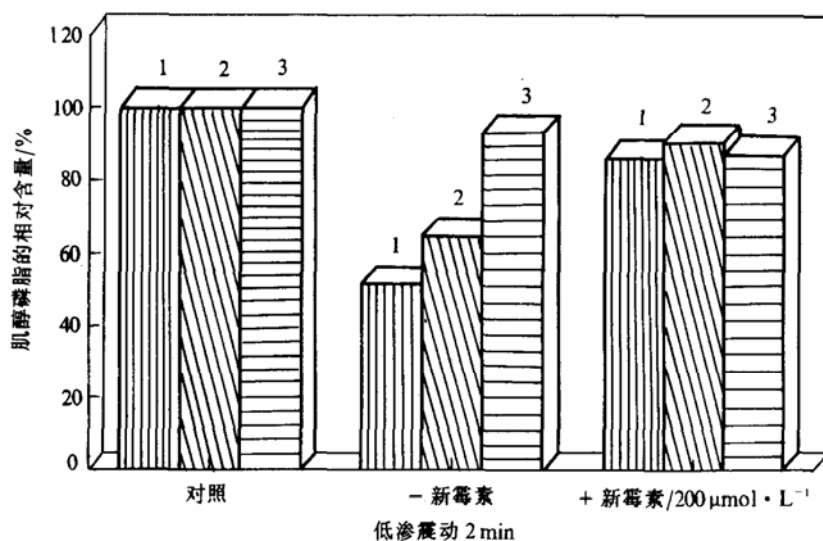


图 1 低渗震动和新霉素对藻细胞肌醇磷脂水平的影响

1——PIP₂, 2——PIP, 3——PI

最低,分别是对照的 63.57% 和 51.15% (图 1); 之后,其含量开始逐渐增加. 新霉素是一种正电性的氨基糖苷,可以与肌醇磷脂结合,使它们不被质膜 PLC 降解. 经过新霉素处理的藻细胞在低渗震动过程中 PIP 和 PIP_2 含量的变化受到了明显抑制(图 1).

2.2 低渗震动对藻细胞中 IP_3 水平的影响

我们用常规的阴离子交换柱层析方法,较好地分离了杜氏盐藻细胞中的肌醇磷酸化合物. 根据前人的经验,我们所洗脱、检测到的 4 个峰依次为 GPI, IP, IP_2 和 IP_3 (图 2). 低渗震动对细胞中 GPI, IP 的影响不大,而使 IP_2 , IP_3 的含量增加. IP_3 水平变化十分显著,其含量在低渗震动 1 min 时即开始增加,2 min 时达到高峰,为对照的 196% (图 2, 3), 而 5 min 时就明显下降.

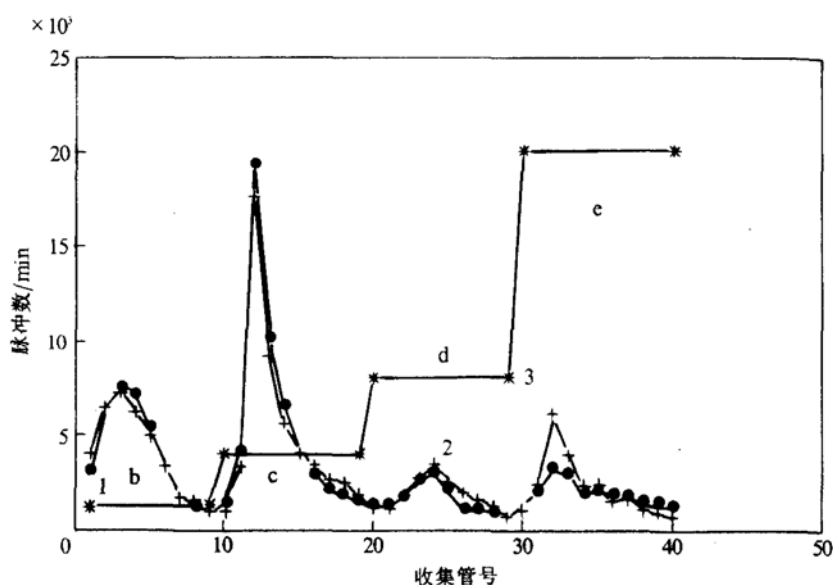


图 2 杜氏盐藻细胞肌醇磷酸化合物的阴离子交换柱层析洗脱图谱

1——对照, 2——低渗震动, 3——梯度洗脱液

肌醇磷脂降解的抑制剂新霉素可以阻抑低渗震动起初阶段 IP_3 水平的快速升高(图 3).

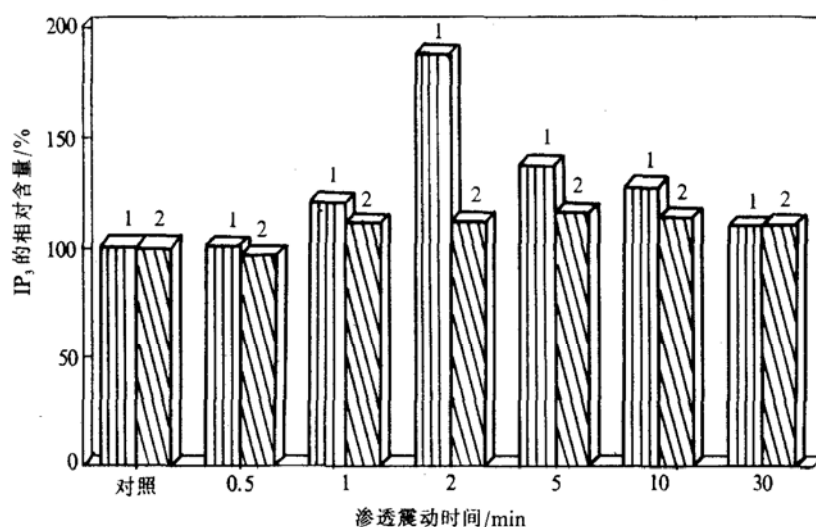


图 3 低渗震动和新霉素处理对藻细胞中 IP_3 水平的影响

1——低渗震动, 2——+ 新霉素, 剂量为 200 $\mu\text{mol/L}$

2.3 Mastoparan 对藻细胞 IP_3 水平的影响

Mastoparan 是一种阳离子亲水脂的十四肽,可以模仿活化的细胞质膜受体而结合到 G 蛋白的 α 亚基上,使 G 蛋白激活. $10 \mu\text{mol/L}$ mastoparan 处理引起了藻细胞中 IP_3 水平的升高,在 20min 内回落至对照. 新霉素抑制 mastoparan 对细胞 IP_3 产生的刺激效应(表 1).

表 1 Mastoparan 对藻细胞 IP_3 水平的影响

处 理 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	IP ₃ 的相对含量/%					
	时间/min	0	1	2	5	20
Mastoparn(10)		100	145.2	166.4	146.9	100.3
Mastoparan(10) + 新霉素(200)		100	97.3	94.4	93.5	96.0

2.4 新霉素对低渗过程中甘油转化的影响

如图 4 所示,低渗震动 5 min 之后,藻细胞即开始快速地转化其主要渗透调节物质甘油为没有渗透活性的淀粉,降低细胞内的渗透势,适应低渗震动. 新霉素在一定程度上抑制了甘油的转化过程.

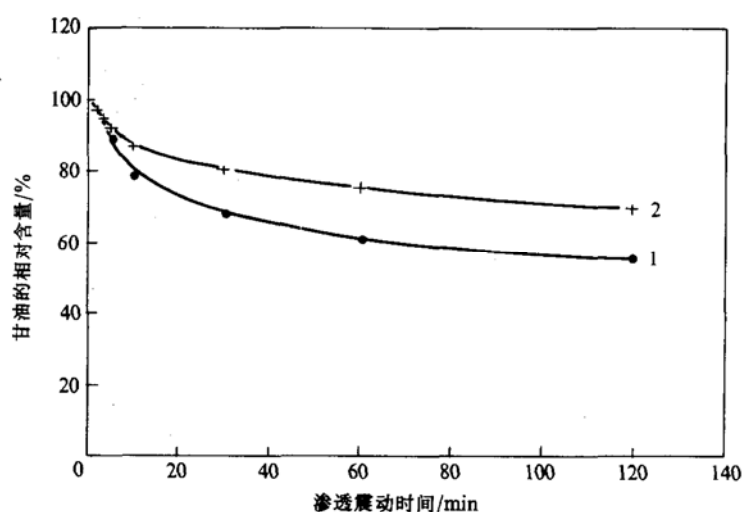


图 4 新霉素对低渗过程中甘油转化的影响
1——低渗震动, 2——+ 新霉素, 剂量为 $200 \mu\text{mol/L}$

3 讨论

植物肌醇磷脂信息传递系统的研究开展得比较晚. 以往的研究多集中在对信息物质的鉴定及外界刺激引起一、二种信息物质含量、活性的变化上;而对于肌醇磷脂信息系统中各因子的协同作用关系及信息传递与生理效应之间的耦联缺乏了解. 本文研究表明低渗震动不仅引起细胞肌醇磷脂 PIP 和 PIP_2 含量的下降(图 1);而同时也引起了 IP_3 的瞬时升高(图 2, 3),这说明低渗震动诱导了 PLC 的短暂活化. PIP 和 PIP_2 含量的快速下降并不是因为肌醇磷脂磷酸化反应被抑制,而是由于 PIP_2 被降解,产生 IP_3 . 外界刺激引起细胞肌醇磷脂化合物的降解

并不重要,只有证明它们降解为具有信使活性的物质(IP_3 或 DAG)时,那么在信号的传导中才会更具有意义. 信息传递过程的抑制剂和激活剂是目前确定信息传递途径、研究刺激-信使-反应耦联的主要手段之一. PLC 的抑制剂新霉素对低渗过程中 PIP, PIP_2 含量的下降(图 1)和 IP_3 含量升高的抑制(图 3),以及 G 蛋白活化剂 mastoparan 对 IP_3 含量升高的刺激作用都进一步证明了低渗震动激活了 G 蛋白和/或 PLC. 像动物细胞中的一样,植物细胞中 PLC 的活化很可能也受 G 蛋白控制^[1]. 与 Einspahr 等^[3]的结果一致,我们也观察到低渗震动引起杜氏藻细胞肌醇磷脂快速降解的效应. 不仅如此,还分离了杜氏盐藻细胞中肌醇磷酸化合物,并研究了低渗震动过程中第二信使 IP_3 的变化. 我们发现 PIP 和 PIP_2 含量快速下降和 IP_3 水平的瞬时增加皆发生于低渗震动 2~3 min 之内;先于甘油的大量快速转化. 并且,新霉素抑制低渗震动过程中 PIP_2 和 IP_3 含量的变化,也抑制了甘油的快速转化(图 4). 虽然新霉素同时又是蛋白质合成的抑制剂,但由于低渗震动中信息物质的变化很迅速,新霉素可能主要是作为 PLC 的抑制剂而起作用的. 因此,质膜 PLC 的活化很可能将渗透震动信号与甘油转化的生理过程耦联起来. 结合本文和前人^[2~4,7]的结果,可以推测杜氏盐藻细胞对低渗震动信号的传递过程:低渗震动开始时,杜氏盐藻细胞表面积和体积的增加可能改变了质膜的理化特性和膜相(?)或 Na^+ 或 Cl^- 等的通透性(?)而活化 G 蛋白和/或 PLC,引起第二信使 IP_3 和 DAG 水平的短暂升高,使胞质 Ca^{2+} 水平增加,激活 Ca^{2+} 或 CaM 依赖的蛋白激酶或是 PKC,进而可能使甘油和淀粉相互转化过程中的关键酶因磷酸化修饰而活化(?),促使甘油转化为淀粉,降低细胞内渗透势,适应低渗环境. 渗透震动信息传递过程的许多关键步骤还有待于深入研究.

参 考 文 献

- 1 Berridge M J. Inositol triphosphates and calcium signalling. *Nature*, 1993, 361:315~325
- 2 陈思学,焦新之. 植物细胞的肌醇磷脂信息传递系统. *植物生理学通讯*, 1994, 30:405~414
- 3 Einspahr K J, Peeler T C, Thompson Jr G A. Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism associated with the response of *Dunaliella salina* to hypoosmotic shock. *J Biol Chem*, 1988, 263:5 775~5 779
- 4 Einspahr K J, Peeler T C, Thompson Jr G A. Phosphatidylinositol 4, 5-bis-phosphate phospholipase C and phosphomonoesterase in *Dunaliella salina* membranes. *Plant Physiol*, 1989, 90:1 115~1 120
- 5 李红萍,焦新之. 杜氏盐藻渗透调节过程中的甘油代谢途径. *植物生理学报*, 1994, 20:91~99
- 6 张龙祥,张庭芳,李令媛等主编. *生化实验技术和方法*. 北京:高等教育出版社,1985. 24, 65
- 7 Maeda M, Thompson Jr G A. On the mechanism of rapid plasma membrane and chloroplast envelope expansion in *Dunaliella salina* exposed to hypoosmotic shock. *J Cell Biol*, 1986, 102:289~297