中国科学 B 辑: 化学
2007 年 第 37 卷 第 4 期: 386~389
http://www.scichina.com

《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

# 铜离子对 SV 通道电流特性的影响

张丽平[①②] 杨 频[②*]

(① 太原科技大学环境科学研究所, 太原 030024; ② 山西大学分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

**摘要** 利用全液泡膜片钳技术, 在液泡上研究了氯化铜对钙离子激活的慢液泡阳离子通道电流特性的影响. 外液中加入氯化铜后, 在高浓度时, 抑制通道电流, 并且抑制率随浓度增大而增大, 并随电压的变化而变化; 而在低浓度时, 则促进通道电流, 对 SV 通道电流的促进率随着刺激电压增大而减小; 而且通道电流的激活时间常数明显减小, 且当刺激电压在 20 ~ 120 mV 时, 激活时间常数减小的幅度比较大; 而当大于 120 mV 时, 则不太明显. 这些提示 SV 通道上可能存在着铜离子的结合位点, 此结合位点结合铜离子后, 可能会改变通道的一些特性.

**关键词** 膜片钳技术 SV 通道 铜离子

液泡是成熟的植物细胞和许多真菌、藻类(原核细胞除外)的重要组成部分. 不仅仅是细胞内被动地单纯贮藏、避毒的场所, 而且是能够参与调节细胞新陈代谢, 控制多种细胞物质的合成、积累和运输, 维持细胞内环境稳定, 缓冲外环境对植物生长发育的影响, 提高物种适应环境变化和生存能力, 帮助正常繁衍等的多功能细胞器, 已引起越来越多的重视[1]. 研究表明, 离子通道和离子泵是许多离子和代谢产物跨液泡膜的运送途径[2].

离子通道(即通道蛋白)在生长发育以及细胞感受外界环境的过程中起着非常关键的作用[3]. 液泡膜上普遍存在着慢液泡离子通道(Slow Vacuolar channel, 即SV通道), 其为阳离子选择性通道, 且具有电压和时间依赖性, 液泡外液中的钙离子可以激活该通道[4,5].

铜是植物正常生命活动所必需的 7 种微量元素之一, 参与植物生长发育过程中的多种代谢反应. 但由于绝大多数植物对其具有敏感性, 因此铜的吸收一旦超过正常量即可造成毒害. 铜盐毒害往往造成植株生长缓慢或停止生长, 甚至死亡[6]. 过量铜离子通过提高质膜的非选择性电导和抑制质子泵($H^+$-ATPase)活性而改变质膜通透性[7]; 且大量的铜会破坏细胞质膜, 造成胞内离子泄漏[8]和水分代谢失调[9], 这可能是过量铜对植物造成毒害的机理之一[10]. 但是有关铜元素对植物影响的研究国内多集中在植物的地理分布、种群学的调查、含量测定等方面, 而对其分子电生理方面及膜片钳方面的研究很少见报道.

在这之前, 我们初步研究了铜离子对萝卜液泡膜SV通道电流的影响, 实验结果表明在低浓度(约$<5.5\times10^{-5}$ mol · $L^{-1}$)时, 促进通道电流, 而在高浓度(约$>5.5\times10^{-5}$ mol · $L^{-1}$)时, 则抑制通道电流[11]. 而关于其对通道的促进率、抑制率以及激活时间常数的影响, 及其与浓度、刺激电压之间的关系未进行深入的研究. 本文中用膜片钳全液泡记录方式深入研究了氯化铜对萝卜液泡膜SV通道电流特性的的影响, 得到了一系列结果, 如外液中加入低浓度氯化铜时, 对SV通道电流的促进率随着刺激电压的增大而减小; 同

收稿日期: 2006-06-30; 接受日期: 2006-07-21
国家自然科学基金(批准号: 20637010)、山西省青年科技基金(批准号: 2007021010)和太原科技大学青年基金(批准号: 2004001)资助项目
* 联系人, E-mail: yangpin@sxu.edu.cn

时通道的激活时间常数明显减少, 而且当刺激电压在 20~120 mV时, 减少的比较明显, 大于 120 mV时, 则不太明显. 而高浓度时, 对SV通道电流的抑制率随浓度增大而增大, 且随电压的变化而变化(先增大而后又有所减小). 这表明SV通道蛋白上可能存在着铜离子的结合位点, 此结合位点结合铜离子后, 可能会改变通道的一些特性, 进而影响信号传导等, 从而对植物的生长发育产生直接或间接的影响.

## 1　实验部分

### 1.1　试剂及溶液配制

KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ 以及$CuCl_2$ 均为国产分析纯, HEPES, MES, Tris-base以及D-山梨醇均购自Sigma公司. 用于记录SV通道电流的电极内液含 100 mmol·$L^{-1}$ KCl, 2 mmol·$L^{-1}$ $MgCl_2$, 5 mmol·$L^{-1}$ MES, 用Tris碱调溶液pH = 5.5; 液泡外液含 100 mmol·$L^{-1}$ KCl, 10 mmol·$L^{-1}$ HEPES, 用Tris碱调溶液pH = 7.3[5], $CaCl_2$, $CuCl_2$在外液中所加的浓度在文中有详细说明, 加入D-山梨醇调电极内液和液泡外液渗透压分别为 460 mmol·$kg^{-1}$ 和 390 mmol·$kg^{-1}$.

### 1.2　萝卜液泡的分离

液泡由萝卜(*Raphanus Satirus* L.)新鲜主根分离得到[2,5]. 用单面刀片切开萝卜部分组织, 则切开组织表面的一部分细胞的细胞壁被切破, 液泡暴露于组织表面, 然后滴少许液泡外液于刚切开的组织表面上, 用移液枪吹吸组织表面溶液数次, 则液泡脱离细胞壳、被冲入溶液中, 最后将溶液移入记录槽中待用.

### 1.3　膜片钳实验

记录模式根据Hamill等人[12]改进的膜片钳技术进行. 将玻璃毛细管(北京BJ-40), 用两步拉制仪(日本Narishige, PP-830 型)制备成内径 1~2 μm的玻璃微电极, 并用抛光仪抛光. 临实验前, 充灌电极内液, 尖端阻抗为 5 ~ 7 MΩ, 在 20 ~ 25℃的室温下, 利用 Axopatch 200B 膜片钳放大器(Axon Instrument, USA)进行全液泡膜片钳记录, 当电极尖端与液泡膜之间形成高阻抗封接(GΩ)后, 负压破膜, 即形成全液泡记录模式. 在电压钳模式下记录电流. 使用膜片钳放大器 (Axopatch 200B)、数模转换装置(Digidata 1200)、Pclamp 6.0 软件采集数据, 所得数据采用 Clampfit 及 Microcal-Origin (5.0)分析及绘图. 激活时间常数$\tau$值采用一次指数方程拟合得到.

## 2　结果

### 2.1　SV 通道电流

萝卜液泡外液分别在含 0, 1, 2 mmol·$L^{-1}$ 的 $CaCl_2$ 时, 保持电压设为 0 mV, 从–40 mV 开始以 20 mV 阶梯跃迁至 180 mV 的电压刺激, 持续时间 4.1 s, 记录 SV 通道电流($n$ > 5). 内外液其他成分见实验部分. 外钙离子可以激活 SV 通道, 是该通道的一大显著特征, 当外液 $CaCl_2$ 浓度为 2 mmol·$L^{-1}$ 时, 电流基本上达到最大. 外液 $CaCl_2$ 浓度为 1 mmol/L 时的 SV 通道电流如图 1 所示. 不同浓度 $CaCl_2$ 的 SV 通道电流的电流-电压关系曲线见图 2. 以上结果验证了 SV 通道的钙依赖性和电压依赖性.

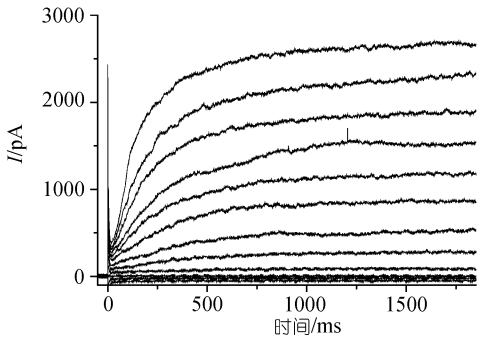


图 1　电压依赖性的 SV 通道电流

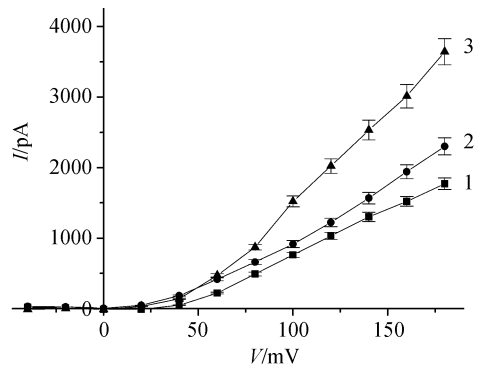


图 2　不同浓度 $CaCl_2$ 的电流-电压关系曲线
(其中 1, 0 mmol·$L^{-1}$; 2, 1 mmol·$L^{-1}$; 3, 2 mmol·$L^{-1}$)

### 2.2　不同浓度 $Cu^{2+}$对 SV 通道电流特性的影响

保持电压设为 0 mV, 从–40 mV 开始以 20 mV 阶梯跃迁至 180 mV的电压刺激, 持续时间 4.1 s, 内外液成分见实验部分. 在液泡外液中加入 2 mmol·$L^{-1}$

的$CaCl_2$, 再分别加入低浓度 $1\times10^{-8}$, $1\times10^{-7}$, $1\times10^{-6}$ mol·L$^{-1}$ $CuCl_2$(分别对应于Cu1,Cu2,Cu3)时记录通道电流($n$ > 5), 并与不加入$CuCl_2$(作为control)时相对照, 可发现低浓度的$CuCl_2$ 对电流有明显的促进作用图 3(a). 低浓度$Cu^{2+}$促进SV通道电流, 从而增强液泡膜的通透性. 研究表明: $1\times10^{-7}$ mol·L$^{-1}$ 时$CuCl_2$ 对电流的促进作用基本上达到了最大[9], 当继续增大浓度时, 促进作用又有所降低图 3(a). 将不同浓度$Cu^{2+}$对SV通道电流的增加值与其相应的空白对照电流值相比, 求出对电流的促进率, 然后对刺激电压作图(图 3(b)). 从图 3(b)中可以观察到$Cu^{2+}$对SV通道电流的促进率随着刺激电压增大而减小, 且在低刺激电压时减小得比较快.

当外液中加入高浓度(Cu4: $1\times10^{-4}$ mol·L$^{-1}$, Cu5: $5\times10^{-4}$ mol·L$^{-1}$)的 $Cu^{2+}$时, 对 SV 通道电流又表现出抑制作用. 从图 4(a)中可看到随着 $CuCl_2$ 浓度的增大抑制作用明显增强. 将不同浓度 $Cu^{2+}$抑制掉的电流值与其相应的空白对照的电流值相比, 求得抑制率, 然后对刺激电压作图(如图 4(b)). 可发现抑制率随着浓度的增大而增加, 并且随着刺激电压的增大先增加而后又有所减小.

### 2.3 $Cu^{2+}$对 SV 通道激活时间常数的影响

对 2 mmol·L$^{-1}$ $CaCl_2$ 和不同低浓度 $CuCl_2$ (Cu1, Cu2, Cu3)条件下的 SV 通道电流进行指数方程拟合, 求得不同浓度条件下的 SV 通道电流的激活时间常数 $\tau$, 然后对刺激电压作图(图 5). 结果发现加入 $CuCl_2$ 后, 激活时间常数$\tau$在 20 ~ 120 mV 区间内显著减小了, 即加快了通道的激活; 而当刺激电压继续增大时, 减少的不明显. 同时可以观察到各浓度下, 激活时间常数$\tau$都随着刺激电压的增大而变小.

## 3 讨论与结论

液泡是高等植物的储存库, 在营养离子和代谢物富足时, 多余成分被储存到液泡中去, 而当植物缺乏某营养时, 该营养物又能及时释放出来, 从而维持

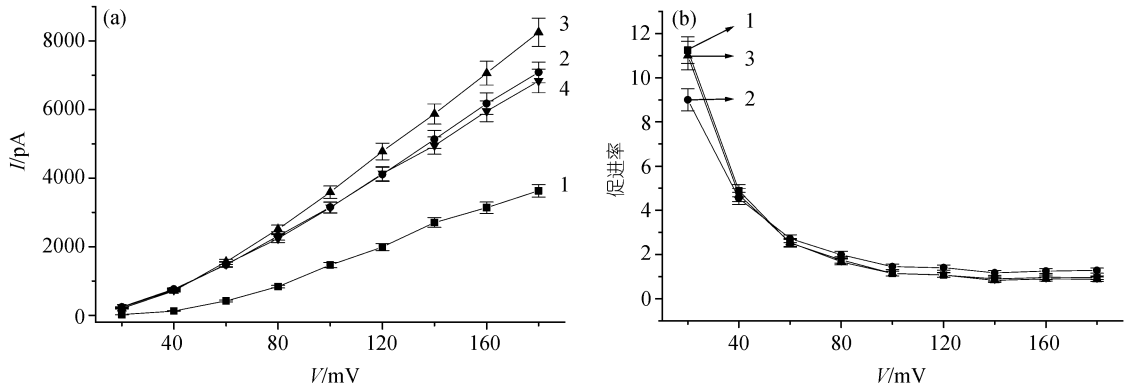


图 3 低浓度 $CuCl_2$ 对 SV 通道的影响

(a) 促进 SV 通道的电流-电压关系曲线(其中 1, control; 2, Cu1; 3, Cu2; 4, Cu3); (b) 促进率-电压的关系曲线(其中 1, Cu1; 2, Cu2; 3, Cu3)

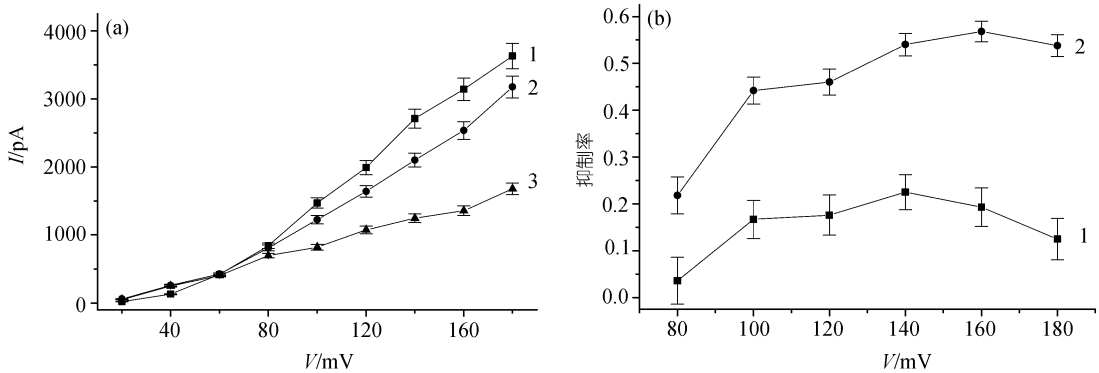


图 4 高浓度 $CuCl_2$ 对 SV 通道的抑制作用

(a) SV 通道电流-电压曲线; (其中 1, control; 2, Cu4; 3, Cu5); (b) 抑制率-电压曲线(其中 1, Cu4; 2, Cu5)

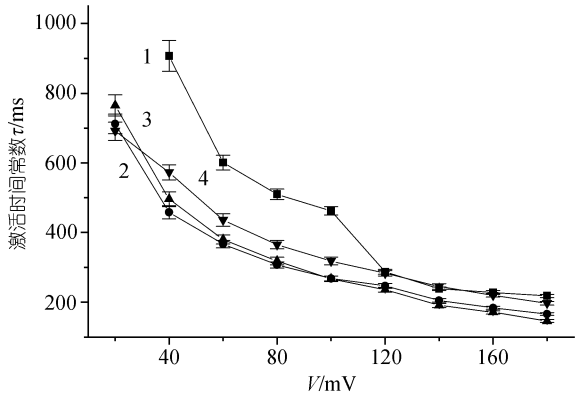


图 5　低浓度 $CuCl_2$ 通道激活时间常数的影响
(其中 1, control; 2, Cu1; 3, Cu2; 4, Cu3)

植物的正常生理功能. SV通道作为植物液泡膜最先被发现的离子通道[13], 参与了对阳离子的储存和释放, 对调节胞质内的阳离子浓度具有重要的作用. 许多一价阳离子($K^+$, $Na^+$, $Cs^+$)和二价阳离子($Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Ba^{2+}$)等都可通过此通道[5]. 而$Ca^{2+}$作为胞内第二信使, 通过浓度的变化, 引发细胞一系列反应, 调节细胞内的许多功能, 对外界的各种刺激做出及时的响应. 所以SV通道对植物细胞生理功能的正常发挥起着重要的作用.

本文研究了 $CuCl_2$ 对 SV 通道电流特性的影响. 实验发现, 低浓度 $CuCl_2$ 对 SV 通道电流的促进作用随着浓度增加而增加, 当增加到一定程度时又变小; 而对电流的促进率随着刺激电压增大而减小, 表明刺激电压增大可以加快通道的激活; 同时通道的激活时间常数比不加入 $CuCl_2$ 时有明显的降低, 特别是刺激电压在 20 ~ 120 mV 区间时; 而刺激电压在 120 ~ 180 mV 之间激活时间常数减小的幅度不大. 这提示 SV 通道蛋白上可能存在 $Cu^{2+}$的结合位点, 此位点上结合了 $Cu^{2+}$后, 使通道的结构发生了变化, 从而增强了膜的通透性. 同时低浓度 $Cu^{2+}$减少了通道的激活时间常数, 从而加快了通道的激活, 这有可能加快细胞对外界刺激的响应, 提高细胞的耐胁迫性. 而高浓度时, $Cu^{2+}$又抑制通道电流, 且抑制率随浓度的增大而增大. 这可能是高浓度的$Cu^{2+}$对通道蛋白上的$Ca^{2+}$结合位点(激活 SV 通道)产生了一定的竞争作用, 从而引起通道电流的减小; 而且抑制率随电压的变化而变化, 先增大后又有所变小. $Cu^{2+}$可能通过影响通道电流大小、通道激活过程对植物产生直接的影响或间接的影响胞内 $Ca^{2+}$浓度, 进而影响胞内信号传导, 从而对植物的生长发育产生影响. 这些都为进一步研究铜离子对植物生理活动的影响以及铜肥对农作物的影响在通道水平上提供重要的理论依据.

对于$Ba^{2+}$对SV通道影响的研究也得到了类似的结果, 即低浓度促进通道电流, 而高浓度抑制通道电流[14]. 这些结果与法国科学家Bertrand提出的最适营养定律(植物缺少某种必需元素时不能成活, 当该元素适量时就能茁壮成长, 但过量时又转为有害[15]作用)之间有怎样的联系? 以及产生这种特殊效应的机理, 还待于进一步的深入研究. 金属离子对植物生理过程的作用机理是一个复杂的过程, 还需要从多个角度, 选择多种方法加以论证和完善.

## 参　考　文　献


1 Ouzounidou G, Symeonidis L, Babalonas D. Comparative responses of a copper-tolerant and a copper-sensitive population of Minuartia hirsuta to copper toxicity. J Plant Physiology, 1994, 144: 109—115
2 Hedrich R, Neher E. Cytoplasmic calcium regulates viltage-dependent ion channels in plant vacuoles, Nature. 1987, 329: 833—836[DOI]
3 Hille B. Ionic Channel of Excitable Membranes. Sunderand: Sinauer Associates Inc, 1992. 8
4 Allen G J, Sander D. Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. Plant J, 1996, 10: 1055—1069[DOI]
5 Pei Z M, Ward J M, Schroeder J I. Magnesium sensitizes slow vacuolar channels to physiological cytosolic calcium and inhibits fast vacuolar channels in fava bean guard cell vacuoles. Plant Physiology, 1999, 121: 977—986[DOI]
6 潘瑞炽, 董愚得编著. 植物生理学. 第 3 版. 北京; 高等教育出版社, 1995. 35: 81—83, 127—131
7 Demidchik V, Sokolik A, Yurin V. The effect of $Cu^{2+}$ ion transport systems of the plant cell plasmalemma. Plant Physiology, 1997, 114: 1313—1325
8 De Vos, C H R, Vonk M J, Vooijs R, Schat H. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in Silene cucubalus. Plant Physiology, 1992, 98: 853—858
9 Barceló J, Poschenrieder C H. Plant water relationships as affected by heavy metals stress. A review J Plant Nutr, 1990, 13: 1—37
10 田生科, 李廷轩, 杨肖娥, 卢玲丽, 彭红云. 植物对铜的吸收运输及毒害机理研究进展. 土壤学报, 2006, 37(2): 387—394
11 张丽平, 杨频. 用膜片钳研究 $CuCl_2$ 对萝卜液泡膜 SV 通道的影响. 高等学校化学学报, 2003, 24(3): 390—393
12 Hamill O P, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F J. Improved patch-clamp technique for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patch. Pflugers Arch, 1981, 391: 85—100[DOI]
13 Pottosin I I, Martínez-Estévez M, Dobrovinskaya O R, Muñiz J, Schönknecht G. Mechanism of luminal $Ca^{2+}$ and $Mg^{2+}$ action on the vacuolar slowly activating channels. Planta, 2004, 219: 1057—1070[DOI]
14 Yang P, Zhang L P. Effects of $BaCl_2$ on slow vacuolar ion channels on radish by patch-clamp. Science in China, Series B, 2003, 46(1): 84—89
15 杨频, 高飞. 生物无机化学原理. 北京: 科学出版社, 2002