

## IP<sub>3</sub>敏感的钙离子通透性通道参与茉莉酸诱导的钙动员

李洋洋<sup>1,2</sup>, 杜希华<sup>1</sup>, 于涌鲲<sup>2</sup>, 赵福宽<sup>2</sup>, 孙清鹏<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; <sup>2</sup>北京农学院生物技术学院, 北京 102206)

**摘要:**以低温导入法将钙离子荧光探针 Fluo-3/AM 导入拟南芥叶片细胞中, 利用 LAS AF (Leica Application Suite-Advanced Fluorescence) 软件记录肝素对茉莉酸 (JA) 诱导的胞内钙离子荧光强度的变化。结果显示, 经不同浓度的肝素预处理后, 拟南芥叶细胞中胞内钙离子的荧光强度降低, 再用 100 μmol/L JA 处理时, 其荧光强度升高, 但仅与未经肝素处理的荧光强度相当。实验证明, 肝素预处理可抑制 JA 诱导的胞内钙离子浓度的升高。

**关键词:**拟南芥; 钙离子; 肝素; 茉莉酸

中图分类号: Q291

文献标志码: A

论文编号: 2010-1918

### IP<sub>3</sub> Sensitive Calcium Channel Involved in the Jasmonic Acid Induced Calcium Mobilization

Li Yangyang<sup>1,2</sup>, Du Xihua<sup>1</sup>, Yu Yongkun<sup>2</sup>, Zhao Fukuan<sup>2</sup>, Sun Qingpeng<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014;

<sup>2</sup>College of Biotechnology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

**Abstract:** *Arabidopsis thaliana* leaves were labeled by fluorescent probe Fluo-3/AM under low temperature at 4°C to measure the fluorescent intensity of intracellular Ca<sup>2+</sup> which was pretreated with heparin on jasmonic acid (JA)-induced. The results showed that the fluorescent intensity of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> was reduced after pretreated with different concentration of heparin, and then treated with 100 μmol/L JA, the fluorescent intensity of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> was close to the fluorescent intensity which was not pretreated with heparin. The experiment showed that the pretreatment with heparin could inhibit the increase of the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration significantly which JA-induced in leaves of *Arabidopsis thaliana*.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; Ca<sup>2+</sup>; heparin; jasmonic acid

### 0 引言

Ca<sup>2+</sup>在植物细胞信号转导过程中起着重要作用<sup>[1]</sup>, 在植物受到生物和非生物胁迫以及激素刺激时, 胞内游离钙离子浓度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>) 就会升高<sup>[2]</sup>。茉莉酸 (JA) 被公认为是一种植物逆境激素<sup>[3]</sup>, 调节植物的生长发育和各种胁迫反应<sup>[4]</sup>。利用 JA 生物合成突变体 *spr22* 及 JA 反应突变体 *jal21* 的研究表明, JA 及其衍生物可作为长距离传输信号分子<sup>[5]</sup>。当拟南芥叶细胞受 JA 刺激时其胞内钙离子浓度会升高, 胞外 Ca<sup>2+</sup> 参与了 JA 诱导

的钙动员<sup>[6-7]</sup>。

IP<sub>3</sub> (Inositol trisphosphate) 受体由四个相同的亚基组成, 每一亚基上至少存在一个 IP<sub>3</sub> 结合位点和一个 Ca<sup>2+</sup> 结合位点。而 IP<sub>3</sub> 受体上有激活和抑制两种不同作用的 Ca<sup>2+</sup> 结合位点<sup>[8]</sup>。肝素是胞内 IP<sub>3</sub> 受体的抑制剂, 可抑制 IP<sub>3</sub> 诱导的胞内 Ca<sup>2+</sup> 向胞质的流动<sup>[9]</sup>。Sun<sup>[7]</sup> 等通过采用不同类型离子通透性抑制剂 (nifedipine 和肝素) 对拟南芥叶细胞的处理, 说明 nifedipine 敏感的钙离子通透性通道参与了 JA 诱导的钙动员, 肝素可降低

**基金项目:** 国家自然科学基金“环核苷酸门控的离子通道在拟南芥茉莉酸信号通路中的作用”、“AtCNGC2/AtCNGC19 在茉莉酸诱导的钙离子动员中的分子机制” (30700428, 30911130166); 北京市自然科学基金“ATCNGC 离子通道在茉莉酸诱导的钙动员中的作用” (5072009); 北京市科技新星计划“ATCNGC2 或 AtCNGC4 在茉莉酸诱导的钙离子动员中的作用” (2006B26)。

**第一作者简介:** 李洋洋, 女, 1984 年出生, 山东淄博人, 在读硕士, 研究方向为植物生理及分子生物学。E-mail: yangyang6321@163.com。

**通讯作者:** 孙清鹏, 男, 1973 年出生, 副教授, 主要研究方向为植物细胞信号传导。通信地址: 102206 北京市昌平区回龙观镇北农路 7 号北京农学院生物技术系, Tel: 010-86075292; E-mail: sunqp@bac.edu.cn。

**收稿日期:** 2010-06-24, **修回日期:** 2010-08-18。

JA 诱导的胞内钙离子的荧光强度。本实验以拟南芥叶片为材料,通过低温导入法将钙离子荧光探针 Fluo-3/AM 装载到叶细胞中,利用激光扫描共聚焦显微技术检测 IP<sub>3</sub> 敏感的钙离子通透性通道对 JA 诱导的拟南芥叶细胞 Ca<sup>2+</sup> 动员的影响,并为进一步探究 JA 诱导的 Ca<sup>2+</sup> 动员在 JA 信号传导网络中的作用及其分子机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料、仪器与试剂

本研究以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia) 为实验材料,所用到的主要实验仪器及试剂有钙离子荧光探针 Fluo-3/AM、激光扫描共聚焦显微镜 (Leica SP5)、茉莉酸 (Sigma 公司产品)、肝素、MS 培养基 (按常规方法配制)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 无菌播种 拟南芥种子用 75% 乙醇表面消毒 30 s 后,用 10% 次氯酸钠消毒 10 min,再用无菌水洗 3 次,播种于 MS 固体培养基上。于 16 h 光照 (26℃), 8 h 黑暗 (22℃) 光周期下培养。

1.2.2 探针低温导入 取生长 10 天左右的拟南芥,将其叶片切成约 2~3 mm 宽的细条放入新鲜的 MS 液体培养基中,加入 1 mmol/L 的 Fluo-3/AM (无水 DMSO 溶解) 至终浓度为 20 μmol/L, DMSO 终浓度约为 1% (v/v)。混匀后于 4℃ 避光放置 2 h,再用 MS 洗 2~3 次,于室温下避光放置 2 h 后可于激光扫描共聚焦显微镜下

观察。

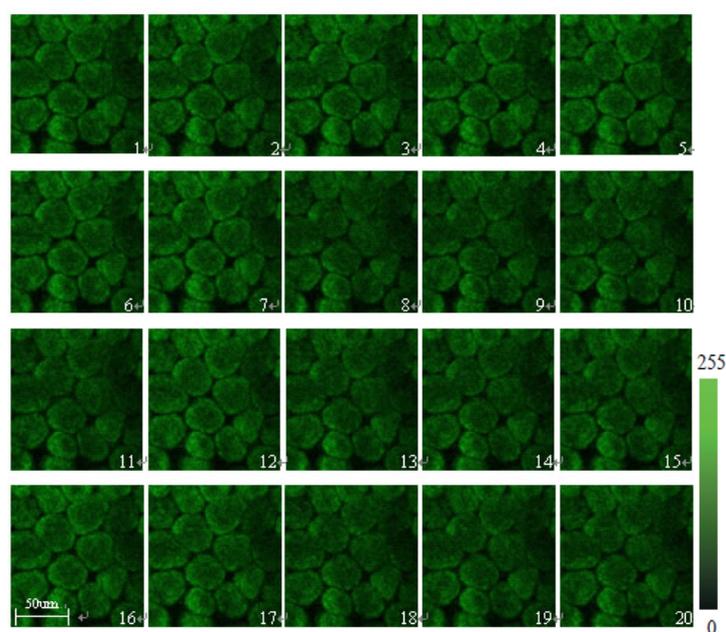
1.2.3 肝素及 JA 处理 将经过低温装载 Fluo-3/AM 后的拟南芥叶片分别经 10 ng/mL、50 ng/mL 及 100 ng/mL 肝素处理 1 h,再用 100 μmol/L JA 进行处理并立即于激光扫描共聚焦显微镜下进行观察和记录。以不作任何处理的材料为对照,每次实验至少重复 6 次。

1.2.4 激光扫描共聚焦显微镜观察 经过处理的拟南芥叶细胞以氩激光激发波长 488 nm,发射波长 514 nm 进行扫描,记录细胞中钙离子的荧光强度随时间变化的图像和数据。以图像和数据记录经肝素和 JA 处理后的胞质 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度的变化和时间曲线。

## 2 结果与分析

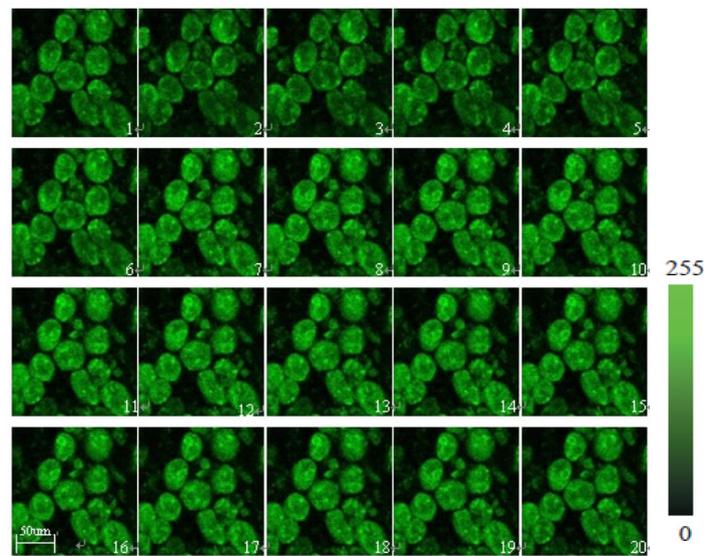
### 2.1 叶细胞染色结果及 JA 处理后 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度变化

培养 10 天的拟南芥叶片切成细条后放入含 20 μmol/L Fluo-3/AM 的 MS 营养液中,4℃ 低温装载 2 h 后,用新鲜的不含 Fluo-3/AM 的 MS 洗两次,然后再将其放入不含 Fluo-3/AM 的新鲜 MS 营养液中,25℃ 放置 2 h,在激光扫描共聚焦显微镜下观察。如图 1 所示,装载钙离子荧光探针 Fluo-3/AM 的拟南芥叶细胞结构清晰,内有明亮的绿色荧光。在扫描过程中未出现荧光猝灭现象,图像采集过程中拟南芥叶细胞稳定无变化,荧光强度无明显差异。当用 100 μmol/L JA 处理装载 Fluo-3/AM 后的拟南芥叶细胞时,叶细胞内的荧光由暗逐渐变亮 (图 2),荧光强度升高,且图像采集过程中叶细胞稳定。



图片右下角的数字分别表示拟南芥叶细胞经装载 Fluo-3/AM 后的图像采集的时间 (min)。右侧的色柱是采用伪彩的色阶标尺,黑色代表荧光强度的最小值 0,绿色代表最大值 255。下同

图 1 4℃ 装载 Fluo-3/AM 的拟南芥叶细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> 荧光观察



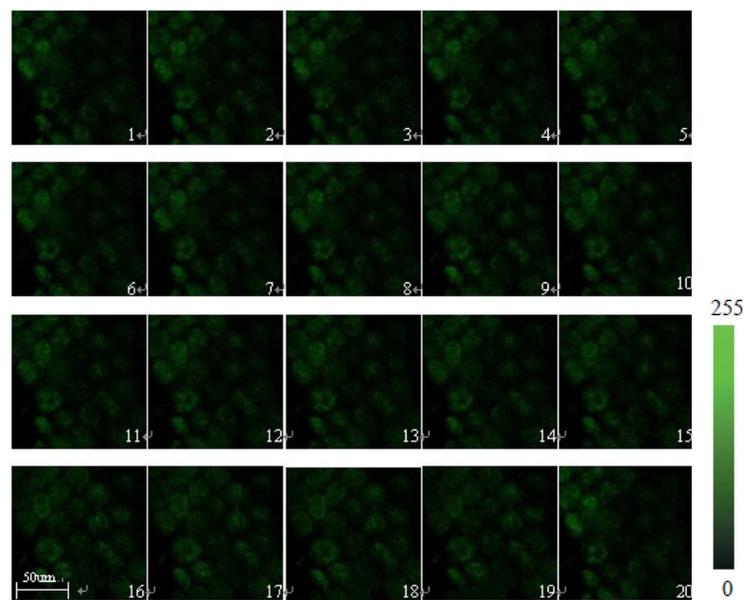
图片右下角的数字分别表示叶细胞加入 100  $\mu\text{mol/L}$  JA 刺激后图像采集时间(min)。

图 2 100  $\mu\text{mol/L}$  JA 处理对拟南芥叶细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的影响

## 2.2 肝素对 JA 诱导的叶细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化的影响

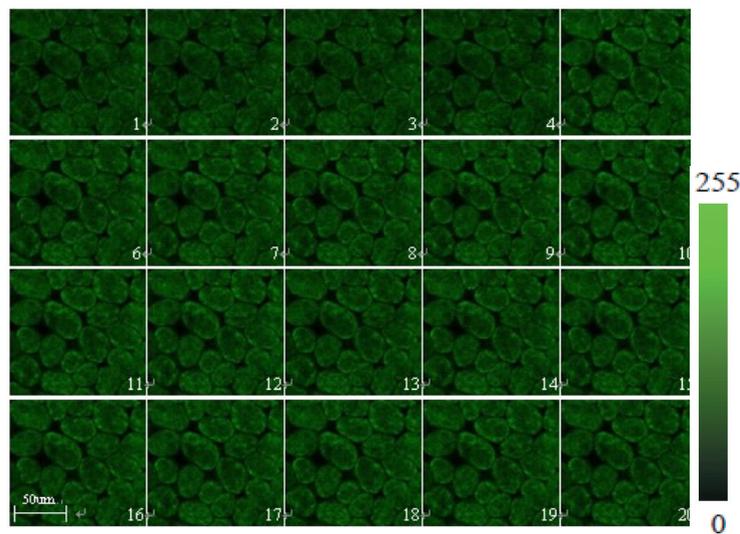
肝素为胞内 IP<sub>3</sub>受体的抑制剂,可抑制 IP<sub>3</sub>诱导的胞内钙库中 Ca<sup>2+</sup>向胞质的释放。经装载 Fluo-3/AM 的拟南芥叶细胞,用 10 ng/mL、50 ng/mL 及 100 ng/mL 肝素预处理 1 h 后,在激光共聚焦显微镜下观察。如图 3 所示,经肝素预处理的拟南芥叶细胞基态荧光较弱,荧光强度较未用肝素处理的细胞低。图像采集过程中,叶细胞稳定,荧光强度无明显差异。经肝素预处理后的叶细胞,再用 100  $\mu\text{mol/L}$  JA 刺激时,细胞的基态荧光开始变亮,钙离子荧光强度缓慢增强(图 4)。

如图 5 所示,拟南芥叶细胞经 10 ng/mL、50 ng/mL 及 100 ng/mL 肝素预处理后,胞内游离钙离子荧光强度均比未经处理的降低,经不同浓度肝素预处理后,再用 100  $\mu\text{mol/L}$  JA 刺激时,其胞内钙离子荧光强度逐渐升高且趋于稳定,这时与未经肝素处理的对照细胞的荧光强度相当,不及单独用 JA 刺激时的叶细胞内钙离子的荧光强度高。拟南芥叶细胞经三个不同浓度的肝素处理后的胞内 Ca<sup>2+</sup>荧光强度下降的幅度无明显差异,且用 100  $\mu\text{mol/L}$  JA 刺激三者上升的幅度也无明显变化( $p < 0.05$ ),因此,本文仅列出了 10 ng/mL 肝素处理图(图 3、图 4)。



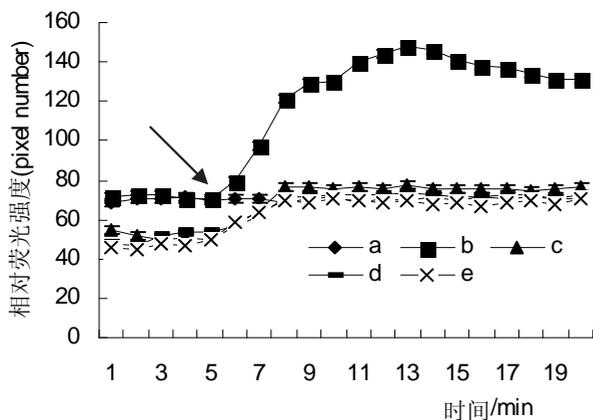
图片右下角的数字分别表示叶细胞经 10 ng/mL 肝素处理后图像采集的时间(min)。

图 3 10 ng/mL 肝素预处理对拟南芥叶细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的影响



图片右下角的数字分别表示经肝素处理后的拟南芥叶细胞加入 100 μmol/L JA 刺激后图像采集的时间 (min)。

图 4 10 ng/mL 肝素预处理后, 加入 100 μmol/L JA 对叶细胞  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  的影响



叶细胞经不同浓度肝素预处理 1 h 后, 再用 100 μmol/L JA 处理。  
a: 对照 (无肝素和 JA 处理); b: 单独 JA 处理; c: 10 ng/mL 肝素预处理;  
d: 50 ng/mL 肝素预处理; e: 100 ng/mL 肝素预处理。  
图中箭头表示加入 JA 的时间。

图 5 肝素预处理对 JA 诱导叶细胞  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  升高的影响

### 3 结论与讨论

实验过程中采用  $Ca^{2+}$  荧光探针 Fluo-3/AM 在低温下标记拟南芥叶细胞<sup>[10-11]</sup>, 显著增加了  $Ca^{2+}$  通过质膜的内流, 且用激光扫描共聚焦显微镜技术准确测定细胞内  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  水平的变化。当植物遭受缺氧、冷激、干旱及盐胁迫时会引起胞内  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  水平的升高<sup>[12-15]</sup>, 这既包括胞内钙库中钙离子的释放也包括质外体钙离子的流入<sup>[6]</sup>。Zhang<sup>[17]</sup>, Blume<sup>[18]</sup> 等的实验结果证实装载 Fluo-3/AM 引起  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  水平的升高不是由低温引起的, 低温引起的  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  水平的升高只是瞬时的, 随着温度的升高这种现象即可逆转。因此, 实验中采用的探针标记方法可完全排除低温对  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  水平的影响。在

图像采集过程中经 Fluo-3/AM 装载后的拟南芥叶细胞稳定且荧光无明显差异, 用 100 μmol/L JA 刺激时, 荧光强度随着处理时间的变化逐渐升高, 在加入 8 min 时荧光强度达到最高, 随后开始缓慢下降且趋于稳定。这证实了孙清鹏<sup>[9]</sup> 的实验结果, 说明 JA 能诱导胞内钙离子荧光强度的升高。

肝素作为胞内  $IP_3$  受体的抑制剂, 可抑制  $IP_3$  诱导的胞内钙库中  $Ca^{2+}$  向胞质的释放。实验过程中采用三个不同浓度 (10 ng/mL、50 ng/mL 及 100 ng/mL) 的肝素预处理后, 拟南芥叶细胞中钙离子的基态荧光强度均降低, 说明肝素预处理降低了细胞内钙离子的荧光强度。当加入 100 μmol/L JA 时, 其胞内钙离子荧光强度立即升高, 但仅与未经肝素处理的荧光强度相当, 这说明肝素预处理抑制了 JA 诱导的胞内钙离子荧光强度的增加。由此可知, 肝素既可抑制细胞内  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  水平的升高, 也可抑制 JA 诱导的胞内  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  水平的升高。以上分析说明,  $IP_3$  敏感的胞内钙库抑制剂肝素可抑制 JA 诱导的  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  升高,  $IP_3$  敏感的钙离子通透性通道参与了 JA 诱导的钙动员。

实验用 10 ng/mL、50 ng/mL 及 100 ng/mL 肝素预处理拟南芥叶细胞, 钙离子的荧光强度均降低但无明显差异 ( $p < 0.05$ ), 而再用 100 μmol/L JA 处理时, 钙离子荧光强度升高的程度也是相近的。Sun 等<sup>[7]</sup> 用不同浓度的不可过膜的质膜钙离子通道抑制剂 nifedipine 预处理拟南芥叶肉细胞, 然后再用 JA 进行刺激时, JA 诱导的  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  的升高随 nifedipine 浓度的升高而降低。而实验中并未出现 JA 诱导的  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  随肝素处理浓度的变化而变化的剂量依赖关系, 具体的原因还有

待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Gilroy S, Trewavas A. Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2001,2: 307-314.
- [2] Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants[J]. *Exp. Bot.*,2004,55,225-236.
- [3] Katsir L, Chung H S, Koo A J K, et al. Jasmonate signaling: A conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant [J]. Biology*,2008,11:428-435.
- [4] Fingrut O, Flescher E. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells [J]. *Leukemia*,2002,16:608-616.
- [5] Li L, Li C, Lee GI, et al. Distinct roles for jasmonate synt hesis and action in the systemic wound response of tomato [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002,99:641-642.
- [6] 孙清鹏,于涌鲲,赵福宽,等.茉莉酸诱导钙离子动员的可能机制.中国植物生理学会第十次会员代表暨全国学术年会[C].2009,297.
- [7] Sun Q P, Guo Y, Sun Y, et al. Influx of ext racellular Ca<sup>2+</sup> in2volved in jasmonic2acid2induced elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> and JR1expression in *Arabidopsis Thaliana* [J]. *Plant Res*,2006,119:343-350.
- [8] Takahashi S, Katagiri T, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4, 5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture[J]. *Plant Cell Physiol*,2001,42,214-222.
- [9] Yamamoto H, Kanaide H, Nakamura M. Heparin specifically inhibits the inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release from skinned rat aortic smooth muscle cells in primary culture [J]. *Naunyn- Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*,1990,341: 273-278.
- [10] 李楠,王凤翔,周春喜.荧光探针应用技术[M].北京:军事医学科学出版社,1998.
- [11] 李楠,尹岭,苏振伦.激光扫描共聚焦显微术[M].北京:人民军医出版社,1997.
- [12] Knight H, Trewavas A J, Knight M R. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity [J]. *Plant J*, 1997,12:1067-1078.
- [13] Blume B, Nürnberger T, Nass N, et al. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley[J].*The Plant Cell*,2000,12:1425-1440.
- [14] Subbaiah C C, Bush D S, Sachs M M. Elevation of cytosolic calcium procedures anoxic gene expression in maize suspension culture cells [J].*Plant cell*. 1994,5:1747-1762.
- [15] Haley A, Russel A J, Wood N, et al. Effects of mechanical signaling on plant cell cytosolic calcium [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,1995, 92:4124-4128.
- [16] McAinsh M R, Hetherington A M. Encoding specificity in Ca<sup>2+</sup> signaling systems [J]. *Trends in Plant Sci*,1998,3:32-36.
- [17] Zhang W H, Rengel Z, Kno J. Determination of intracellular Ca<sup>2+</sup> in cells of intact wheat roots: loading of acetoxymethyl ester of Fluo-3 under low temperature [J]. *Plant Journal*,1998,15(1):147-151.
- [18] Blume B, Nurnberger T, Nass N, et al. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley [J]. *Plant Cell*, 2000,12:1425-1440.
- [19] 孙清鹏,王小菁.拟南芥叶细胞游离钙离子的测定[J].热带亚热带植物学报,2004,12(1):79-82.