



NO 介导的 H₂S 合成参与乙烯诱导的拟南芥气孔关闭

刘菁^①, 侯丽霞^①, 刘国华^①, 刘新^{①*}, 王学臣^②

① 青岛农业大学生命学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 青岛 266109;

② 中国农业大学生物学院, 植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京 100094

* 联系人, E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn

2011-06-15 收稿, 2011-09-01 接受

国家自然科学基金(30970288 和 31170237)、山东省自然科学基金(ZR2010CM024)和植物生理学与生物化学国家重点实验室开放课题(SKLPBKF09001)资助项目

摘要 以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 野生型和突变体为材料, 利用激光共聚焦显微技术、实时定量 PCR 和分光光度法, 结合药理学实验, 探讨两种气体信号分子硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 在乙烯 (ethylene, Eth) 调控气孔运动中的相互关系. 结果表明, H₂S 合成抑制剂能明显抑制乙烯诱导的拟南芥气孔关闭; 乙烯能够显著增加拟南芥叶片的 H₂S 含量, 提高 *L/D*-半胱氨酸脱巯基酶 (磷酸吡哆盐依赖性酶) (*L/D*-cysteine desulhydrase, *L/D*-CDes) 活性及 *AtL*-*CDes* 和 *AtD*-*CDes* 的转录水平; 清除 NO 可减弱乙烯的诱导效应; 乙烯亦可明显诱导 *Atnoal* 突变体叶片 H₂S 的积累, 但对 *Atnia1, nia2* 突变体没有明显作用; H₂S 合成抑制剂对乙烯诱导气孔保卫细胞和叶片的 NO 水平升高以及硝酸还原酶 (nitrate reductase, NR) 活性增强没有明显影响, 同样乙烯可以诱导 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 突变体保卫细胞 NO 水平升高, 说明 H₂S 和 NO 均参与乙烯诱导的拟南芥叶片气孔关闭, 且 NO 可能位于 H₂S 上游参与调控这一信号通路.

关键词

硫化氢
一氧化氮
L/D-半胱氨酸
脱巯基酶
拟南芥
乙烯
气孔关闭

气孔作为植物与环境之间气体和水分交换的门户, 其开闭运动在植物生命活动中起着极其重要的作用^[1], 气孔运动调控机制的研究一直受到人们的极大重视. 尽管人们对气孔运动研究已有百年历史, 并取得了一些重要进展, 例如已知光照、温度、CO₂ 浓度及植物激素等均可调控气孔的开闭^[2], 但对其信号转导途径的认识还有待进一步深入. 各种信使系统在气孔运动信号转导中的作用, 应答基因鉴定等研究不够系统, 信号转导网络还有待进一步完善.

乙烯(ethylene, Eth)是广泛存在于植物各组织器官中的气态植物激素. 有报道表明, 乙烯可以诱导拟南芥气孔关闭, 且在这一过程中有来自 NADPH 氧化酶及细胞壁过氧化物酶的过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 的参与^[3]; 亦有证据显示参与此过程的

H₂O₂ 同时还介导了来自硝酸还原酶 (nitrate reductase, NR) 途径一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的合成, 而一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 途径产生的 NO 在乙烯诱导气孔关闭过程中不起主导作用^[3]. 近期又发现, 乙烯诱导气孔关闭过程中发生胞内 Ca²⁺升高^[4]和胞质碱化^[5], 且均可进而诱导 NO 含量的上升. 由此看来, 多信号组分形成的复杂信号网介导了乙烯诱导的气孔关闭过程, 明晰乙烯调控气孔运动的信号转导机制对于深入掌握气孔关闭机理具有重要的意义.

硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S), NO 和一氧化碳 (carbon monoxide, CO) 是近年来被确认的 3 种新的气体信号分子, 它们参与了植物体内多种生理活动过程^[6,7], 在各种应答反应信号转导途径中有重要的

英文版见: Liu J, Hou L X, Liu G H, et al. Hydrogen sulfide induced by nitric oxide mediates ethylene-induced stomatal closure of *Arabidopsis thaliana*. Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-011-4819-y

生理效应^[8]. 业已证明, 在植物中 H₂S 的主要合成酶为半胱氨酸脱硫基酶, 在 L-或 D-半胱氨酸脱硫基酶(磷酸吡哆盐依赖性酶)的作用下催化半胱氨酸降解成 H₂S, 丙酮酸盐和 NH₄⁺. 近期发现, 病原体的侵入可以诱导油菜 H₂S 的释放, 从而提高其防御功能^[9]. 那么 H₂S 是否参与乙烯调控气孔运动的信号转导途径呢? 动物实验数据显示, NO 供体能够促进大鼠主动脉组织内源性 H₂S 的产生, 提高血管平滑肌细胞中 H₂S 的合成酶胱硫醚-γ-裂解酶 (cystathionine-γ-lyase, CSE) 的表达^[10]. 植物体的研究表明, H₂S 位于 NO 上游促进甘薯不定根的形成^[11]. 气孔运动是由复杂的信号网络进行调控的, 那么在乙烯调控气孔运动信号转导链中 H₂S 与 NO 等其他信号组分的关系怎样? 为此, 本实验以拟南芥(野生型, *AtL-cdes*, *AtD-cdes*, *Atnoal* 及 *Atmia1, nia2* 突变体) 为实验材料, 对乙烯的诱导效应进行了检测, 为初步揭示 H₂S 在气孔开闭运动中的作用, NO 和 H₂S 在乙烯调控气孔运动过程中的相互关系提供实验证据.

1 材料与方 法

(i) 药品和试剂. 表皮条缓冲液 Mes/KOH (10 mmol/L, 含 KCl 50 mmol/L, CaCl₂ 0.1 μmol/L, pH 6.1); 20 mmol/L Tris-HCl; 2.5 mmol/L 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT); 0.8 mmol/L L-半胱氨酸 (L-cysteine); 0.8 mmol/L D-半胱氨酸 (D-cysteine); 30 mmol/L FeCl₃; 20 mmol/L N,N-二甲基-对苯二胺 (N,N-dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride); 0.2 mmol/L 2-4,4,5,5-苯-四甲基咪唑-1-氧-3-氧化物[2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxidepotassium salt, cPTIO]; 0.025 mmol/L N_ω-硝基-L-精氨酸-甲酯 (N_ω-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME); 10 μmol/L 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA); 0.1 mmol/L 钨酸钠 (Na₂WO₄); 0.004% 乙烯利 (ethephon, Eth); 0.4 mmol/L 羧甲氧基胺半盐酸盐 (aminooxy acetic acid, AOA); 0.2 mmol/L 丙酮酸钾 (potassium pyruvate, C₃H₃KO₃); 0.2 mmol/L NH₃; 0.4 mmol/L NH₂OH; 其中乙烯利、AOA, cPTIO, L-NAME, DAF-2DA, L-半胱氨酸和 D-半胱氨酸均购于 Sigma 公司(美国); 其他药品为国产分析纯.

(ii) 实验材料. 拟南芥以 Columbia (*Col-0*) 生态型为遗传背景, *AtL-CDes* 的 T-DNA 插入突变体 (SALK_041918, 命名为 *AtL-cdes*)、*AtD-CDes* 的 T-DNA

插入突变体 (CS853264, 命名为 *AtD-cdes*) 购自美国拟南芥生物资源中心, *Atnoal* 突变体由中国农业大学李颖章教授惠赠, *Atmia1, nia2* 突变体由河北师范大学陈玉玲教授惠赠. 将野生型及突变体种子经 10% NaClO 灭菌 15 min, 无菌水冲洗 5 次后, 点种于无菌 MS 固体培养基, 4℃ 条件下处理 2~4 d 打破休眠, 转入光照培养箱 (22℃, 16 h/8 h 光周期) 垂直生长约 1 周, 转入到培养土 (市售花卉营养土) 和蛭石按体积比 1:1 混合的培养介质中, 于光/暗周期为 16 h/8 h, 温度 18~22℃, 光强 120 μmol m⁻² s⁻¹, 相对湿度 70% 下培养, 4~5 周后取生长良好、拟南芥完全展开的莲座叶供实验用.

(iii) 气孔开度的测定. 气孔开度的测定参照刘国华等人^[3]的方法. 取生长良好、4~5 周龄、拟南芥完全展开的莲座叶, 光诱导使气孔张开. 撕取其下表皮, 小心刷涂上面黏附的叶肉细胞, 切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 用显微测微尺测量气孔的初始孔径, 然后分别置于含有不同处理液的 MES 缓冲液中, 在光下 (光强 200 μmol m⁻² s⁻¹) 处理 30 min. 记录终态孔径, 测量时, 随机取 3 个视野, 每个视野内随机取 10 个气孔. 每个处理重复 3 次, 取 3 次重复的平均值和标准误差.

(iv) 荧光实时定量 PCR 检测. 用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen, 美国) 提取拟南芥总 RNA, 以总 RNA 为模板, Oligo d(T)18 为引物, 在逆转录酶 M-MLV (TaKaRa, 日本) 作用下合成第一链 cDNA. 荧光实时定量 PCR 反应及检测以 SYBR green I (Sigma) 为荧光探针在 Bio-Rad 公司的 MyiQ Real-Time PCR Detection System 上进行, 严格遵照该仪器的操作程序. 为保证 PCR 结果的准确性, 对每一种样品的分析都至少重复 3 次, 包括目标基因和作为内参的管家基因 (*β-actin*). *AtL-CDes* 的定量 PCR 正向引物, 5'-TGTA-TGTGAGGAGGAGGC-3'; 反向引物, 5'-GTTTCAT-ACTGATGCTGCTC-3'. *AtD-CDes* 的定量 PCR 正向引物, 5'-ATAGAAGCAGCAAGGGAA-3'; 反向引物, 5'-TGAGGCTCTTACTAATGCT-3'. 用熔解曲线法来检测实时定量 PCR 的产物是否特异, 采用 MyiQ software 进行数据分析.

(v) 拟南芥叶片 H₂S 含量的测定. 拟南芥叶片 H₂S 含量的测定参照 Sekiya 等人^[12]的亚甲基蓝法并稍作修改. 外施乙烯利处理 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 后, 取 0.1 g 叶片加 0.9 mL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 匀浆, 离

心取上清用于检测, 蛋白浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 将装有醋酸锌的吸收井放入装有上清的小测试管内(12 mm \times 75 mm), 加入 100 μL 30 mmol/L FeCl_3 (溶于 1.2 mol/L HCl) 和 100 μL 20 mmol/L *N,N*-二甲基-对苯二胺 (溶于 7.2 mol/L HCl) 后, 将测试管用封口膜迅速封好, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 30 min, 在 670 nm 波长下, 测定吸光度值.

(vi) 拟南芥叶片 *L/D*-半胱氨酸脱巯基酶活性的测定. 拟南芥叶片 *L/D*-半胱氨酸脱巯基酶活性的测定参照 Riemenschneider 等人^[13]的方法. 乙烯利处理 4 h 后取 0.1 g 叶片加 0.9 mL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 匀浆, 离心取上清用于检测, 蛋白浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

L-半胱氨酸脱巯基酶活性的测定是通过测定 *L*-半胱氨酸 (含 DTT) 释放的 H_2S 来测定的. 1 mL 的反应体系包括: 0.8 mmol/L *L*-半胱氨酸, 2.5 mmol/L DTT, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0) 和 10 μg 蛋白溶液. 加入 *L*-半胱氨酸后置于 37 $^\circ\text{C}$ 反应 30 min, 最后加入 100 μL 30 mmol/L FeCl_3 (溶于 1.2 mol/L HCl) 和 100 μL 20 mmol/L *N,N*-二甲基-对苯二胺 (溶于 7.2 mol/L HCl) 终止反应, 在 670 nm 波长下, 测定吸光度值.

D-半胱氨酸脱巯基酶活性的测定除了将 *L*-半胱氨酸换成 *D*-半胱氨酸以及 Tris-HCl 为 pH 8.0 外, 其余与 *L*-半胱氨酸脱巯基酶活性的测定完全相同. 对照和处理都是 3 次重复的平均值和标准误差.

(vii) 保卫细胞胞内 NO 的检测. 保卫细胞 NO 的检测参照 Gonugunta 等人^[14]的方法并稍作修改. 选取生长良好、4~5 周龄、拟南芥完全展开的莲座叶, 进行与测定气孔开度相同的处理后, 加入 NO 的荧光探针 DAF-2DA (Sigma), 25 $^\circ\text{C}$ 下避光孵育 10 或 20 min, 清洗, 制片. 制片用 488 nm 蓝光激发, 发射波长在 505~530 nm 之间, 经激光共聚焦扫描显微镜(Zeiss LSM 510 META)扫描, 气孔保卫细胞 NO 的静态分布图像通过 LSM 5 Image Browse 软件获得. 每个处理至少重复 3 次.

(viii) 拟南芥叶片 NO 含量和 NOS 活性的测定. 用 NO 和 NOS 试剂盒测定 (南京建成生物工程研究所, 中国).

(ix) 拟南芥叶片 NR 活性的测定. 拟南芥叶片 NR 活性的测定参照文献[15]的方法并稍作修改. 对照和处理都是 3 次以上重复的平均值和标准误差.

2 结果

2.1 H_2S 参与乙烯诱导的拟南芥气孔关闭

(i) H_2S 合成抑制剂对乙烯诱导的拟南芥气孔关闭、 H_2S 含量和 *L/D*-半胱氨酸脱巯基活性的影响. 从图 1 得知, 0.004% 乙烯利能够诱导气孔关闭(图 1(a))、明显增加叶片的 H_2S 含量(图 1(b)), H_2S 合成酶(磷酸吡哆盐依赖性酶)抑制剂 AOA 和 NH_2OH 以及 *L/D*-半胱氨酸脱巯基酶产物 $\text{C}_3\text{H}_3\text{KO}_3+\text{NH}_3$ 均可不同程度地抑制乙烯利诱导的拟南芥气孔关闭(图 1(a)) 及叶片 H_2S 含量的增加(图 1(b)).

为了探明乙烯利诱导拟南芥气孔关闭过程中 H_2S 的主要合成途径, 对 H_2S 的主要合成酶的活性进行了测定. 结果表明, 0.004% 的乙烯利可明显增加 *L/D*-半胱氨酸脱巯基酶活性, AOA, NH_2OH 以及 $\text{C}_3\text{H}_3\text{KO}_3+\text{NH}_3$ 可部分逆转乙烯利的作用(图 1(c)和(d)), 推测 H_2S 参与乙烯诱导的拟南芥气孔关闭, 且 H_2S 主要由 *L/D*-半胱氨酸脱巯基酶途径合成.

(ii) 乙烯对拟南芥野生型、*AtL-cdes* 和 *AtD-cdes* 叶片气孔开度的影响. 为了进一步探明 H_2S 在乙烯诱导拟南芥气孔关闭过程中的具体作用, 观测了乙烯利对 H_2S 突变体 *AtL-cdes* 和 *AtD-cdes* 气孔开度的影响. 由图 2 所示, 与野生型相比 0.004% 乙烯利对突变体的气孔开度没有明显作用, 说明 *AtL-CDes* 和 *AtD-CDes* 对乙烯诱导的拟南芥气孔关闭有正调控作用.

2.2 NO 参与乙烯诱导的 H_2S 合成

(i) NO 清除剂和合成抑制剂对乙烯诱导拟南芥叶片中 H_2S 含量及 *L/D*-半胱氨酸脱巯基酶活性的影响. H_2S 和 NO 均参与乙烯诱导气孔关闭过程, 为探明二者在信号链中的上下游关系, 检测了 NO 的清除剂和合成酶抑制剂对乙烯调控的 H_2S 水平和合成酶活性的影响. 结果表明, NO 的清除剂 cPTIO 和 NR 的抑制剂 Na_2WO_4 均可不同程度地抑制乙烯利诱导的拟南芥叶片 H_2S 含量的升高(图 3)及 *L/D*-半胱氨酸脱巯基酶活性的增强(图 4); NOS 抑制剂 *L*-NAME 对乙烯利诱导的 H_2S 合成没有明显影响(图 3 和 4). 由此推测, 在乙烯调控气孔运动过程中, 通过 NR 途径合成的 NO 调控 H_2S 的形成, 进而诱导拟南芥气孔关闭.

(ii) NO 清除剂和合成抑制剂对乙烯调控的拟南芥叶片 *AtL-CDes* 和 *AtD-CDes* 表达量的影响. 采用

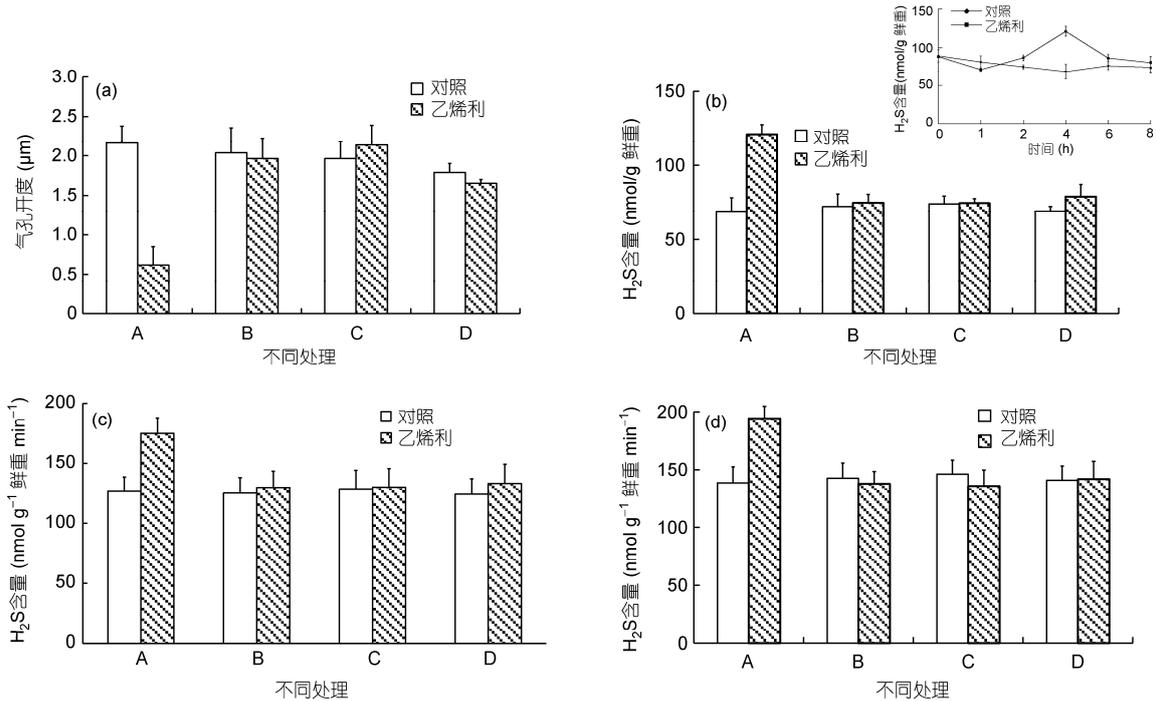


图1 H₂S合成抑制剂对乙烯诱导的拟南芥气孔关闭(a)、H₂S含量(b)、L-半胱氨酸脱巯基活性(c)和D-半胱氨酸脱巯基活性(d)的影响

A, 对照; B, 0.4 mmol/L AOA; C, 0.4 mmol/L NH₂OH; D, 0.2 mmol/L C₃H₃KO₃+0.2 mmol/L NH₃

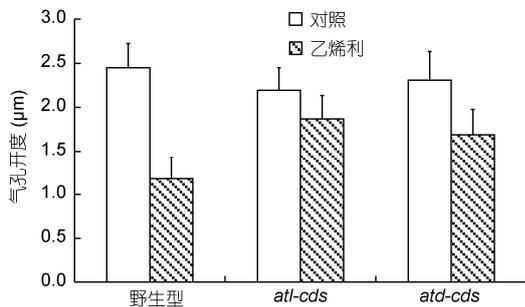


图2 0.004%乙烯利对拟南芥野生型 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 气孔开度的影响

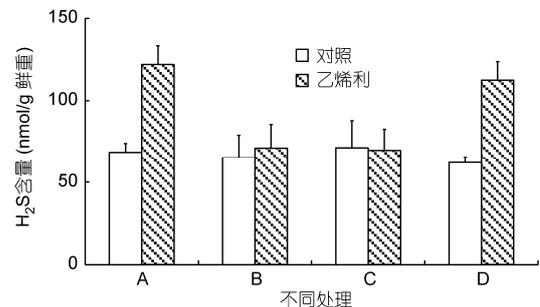


图3 NO清除剂及抑制剂对乙烯调控的拟南芥叶片H₂S含量的影响

A, 对照; B, 0.2 mmol/L cPTIO; C, 0.1 mmol/L Na₂WO₄; D, 0.025 mmol/L L-NAME

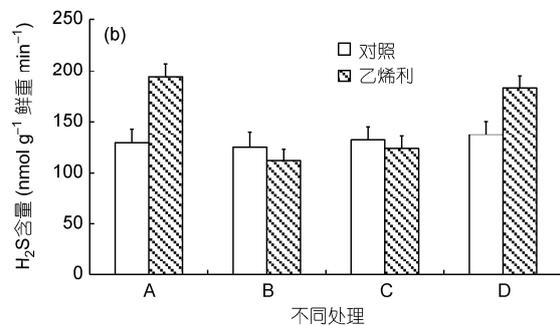
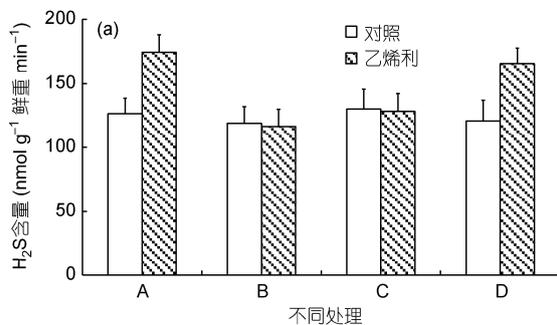


图4 NO清除剂及抑制剂对乙烯调控的拟南芥叶片L-半胱氨酸脱巯基活性(a)和D-半胱氨酸脱巯基活性(b)的影响

A, 对照; B, 0.2 mmol/L cPTIO; C, 0.1 mmol/L Na₂WO₄; D, 0.025 mmol/L L-NAME

荧光定量 PCR 的方法观察 NO 供体 SNP, NO 清除剂 cPTIO, NR 抑制剂 Na₂WO₄ 和 NOS 的抑制剂 L-NAME 对 H₂S 主要合成酶 L-ID-CDes 转录水平的影响. 结果显示, 0.004% 乙烯利可诱导拟南芥叶片 L-ID-半胱氨酸脱巯基酶表达量大量增加. 其中 AtL-CDes 和 AtD-CDes 的表达量分别在处理后 120 和 30 min 达到最高值(数据未显示). 同时 SNP 可以使这一过程增强; cPTIO 和 Na₂WO₄ 可明显减弱这一作用; 而 L-NAME 对乙烯诱导的 AtL-CDes 和 AtD-CDes 转录水平的变化没有显著作用(图 5), 进一步证明乙烯诱导 H₂S 的合成过程中有来自 NR 途径 NO 的参与.

(iii) 乙烯对拟南芥野生型、Atmoa1 及 Atmia1, nia2 突变体 H₂S 合成的影响. 从图 6 可以看出, 与野生型一样, 0.004% 乙烯利可诱导 Atmoa1 突变体 H₂S 含量升高, 但对 Atmia1, nia2 突变体没有显著作用(图 6), 由此进一步说明 NR 途径产生的 NO 参与乙烯诱导的 H₂S 的合成.

2.3 NO 位于 H₂S 下游参与乙烯诱导的气孔关闭

(i) H₂S 抑制剂对乙烯诱导拟南芥叶片或保卫细胞 NO 含量及 NR 和 NOS 活性变化的影响. 为了深入了解在乙烯诱导的拟南芥气孔关闭过程中 NO 和 H₂S 的相互关系, 研究了磷酸吡哆盐依赖性酶抑制剂 AOA 和 NH₂OH 以及 L-ID-半胱氨酸脱巯基酶产物 C₃H₃KO₃+NH₃ 对乙烯诱导的 NO 产生的影响. 结果表明, AOA, NH₂OH 以及 C₃H₃KO₃+NH₃ 都不能明显改变乙烯诱导的保卫细胞(图 7(a))及叶片中 NO 水平(图 7(b))的增加和 NR 活性的升高(图 8(a)), 说明 H₂S 不是在 NO 的上游起作用. 而乙烯并不能诱导叶片中 NOS 活性的升高(图 8(b)), 进一步说明乙烯通过 NR 途径促进 NO 合成调控气孔运动.

(ii) 乙烯对 Atl-cdes 和 Atd-cdes 气孔保卫细胞 NO 含量的影响. 利用 NO 特异性荧光探针 DAF-2DA, 检测 0.004% 乙烯利对拟南芥野生型及 H₂S 突变体气孔保卫细胞 NO 水平的影响. 结果表明, 拟南芥野生型及 Atl-cdes 和 Atd-cdes 突变体植株气孔保卫细胞均含有一定水平的内源 NO(图 9), 0.004% 乙烯利能够明显增加气孔保卫细胞的 NO 水平, 但是乙烯利可以诱导拟南芥野生型气孔关闭, 而对 Atl-cdes 和 Atd-cdes 突变体没有显著作用(图 9), 由此进一步推测, 在乙烯诱导气孔关闭过程中 H₂S 位于 NO 的下游.

3 讨论

1996 年 Abe 和 Kimura^[16]首次证明人体内源性 H₂S 作为一种神经活性物质而存在, 研究发现 H₂S 具有类似 NO 的特征, 如小分子量气体分子, 其生成受内源性关键酶的调节, 在特定浓度时有生理作用等^[16]. 目前, H₂S 已成为继 NO 和 CO 之后的第 3 种内源性气体信号因子, 其研究已成为生物学研究领域的新热点之一. 近期有报道表明, H₂S 的供体可以抑制光诱导的气孔张开^[17], 但尚不清楚 H₂S 作为第二信使参与激素生理作用的普遍性, 亦未见 H₂S 参与气孔运动调控的分子生物学证据. 本实验室的前期工作证明, 乙烯可以诱导拟南芥气孔关闭^[2], 那么该过程中是否有气体信号分子 H₂S 的参与呢? 结果显示, 乙烯处理后叶片 AtL-CDes 和 AtD-CDes 表达量均升高(图 5), 乙烯能够显著提高拟南芥叶片 H₂S 含量(图 1); 加入 H₂S 的合成抑制剂可以逆转乙烯诱导的拟南芥气孔关闭和叶片 H₂S 含量的增加(图 1), 同时乙烯对 H₂S 突变体 Atl-cdes 和 Atd-cdes 气孔开度没有显著作用(图 2). 由此初步推测, H₂S 是乙烯调控气孔运动过程中的一个重要组分.

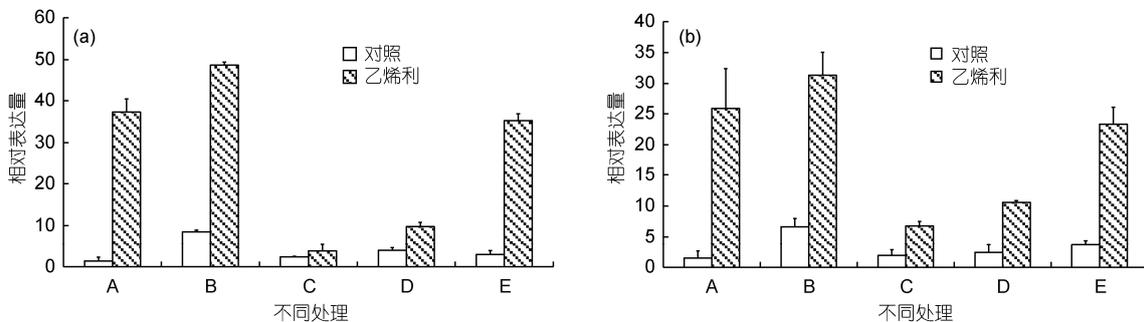


图 5 NO 清除剂及抑制剂对乙烯调控的拟南芥叶片 AtL-CDes (a)和 AtD-CDes (b)表达量的影响
A, 对照; B, 0.1 mmol/L SNP; C, 0.2 mmol/L cPTIO; D, 0.1 mmol/L Na₂WO₄; E, 0.025 mmol/L L-NAME

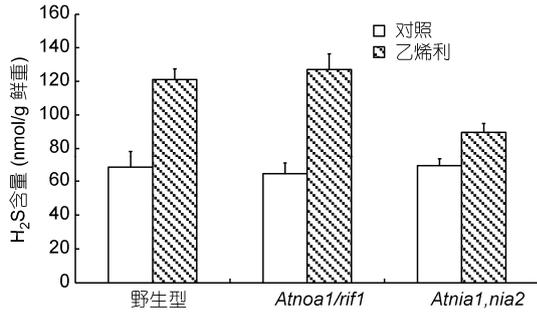


图6 乙烯对拟南芥野生型、*Atnoa1*及*Atnia1,nia2*突变体叶片H₂S水平的影响

越来越多的实验证明, NO 在气孔运动的调控等多种生理过程中起重要作用^[18], 外施乙烯利可以明显提高蚕豆^[4]和拟南芥^[3]气孔保卫细胞胞质和叶片NO水平, 且NO主要通过依赖于硝酸盐的NR途径合成. 动物实验显示, NO和H₂S共同参与了某些生理过程, 在动物体内H₂S可促使平滑肌细胞舒张, 且呈剂量相关性; 小剂量H₂S的存在可以大大增强NO对胸主动脉平滑肌细胞的舒张作用, 同样NO也可使H₂S对胸主动脉平滑肌细胞的舒张作用大大增强,

二者对平滑肌细胞的作用具有协同性^[19]. 但目前鲜见在植物体内H₂S与NO关系的报道, 在乙烯调控气孔运动过程中H₂S与NO的相互关系又是怎样? 本实验研究发现, NO清除剂cPTIO以及NR合成酶抑制剂Na₂WO₄均可以显著降低乙烯所引起的H₂S水平(图3)、*L-D*-半胱氨酸脱巯基酶活性(图4)及*AtL-CDes*和*AtD-CDes*的转录水平的升高(图5); 0.004%乙烯利亦可明显提高*Atnoa1*突变体叶片的H₂S水平, 对*Atnia1,nia2*突变体没有明显影响(图6); 但是清除H₂S后不会改变乙烯所引起的保卫细胞和叶片(图7)NO的水平及NR(图8(a))活性的升高, 且乙烯对H₂S突变体中NO水平的诱导作用与野生型相当(图9), 推测NO可能位于H₂S上游参与乙烯诱导气孔关闭过程. 但Zhang等人^[11]以甘薯为材料研究报道, NO信号可能位于H₂S下游诱导甘薯不定根的形成, 推测这种信号途径之间的差异一方面是由于各组织部位及物种之间存在某种区别; 另一方面是由于不同的生长阶段植物的信号转导途径不同. 综合分析可以得知, 乙烯通过NR途径促进NO合成, NO增强*L-D*-半胱氨酸脱巯基酶活性, 进而诱导*L-D*-半胱氨酸

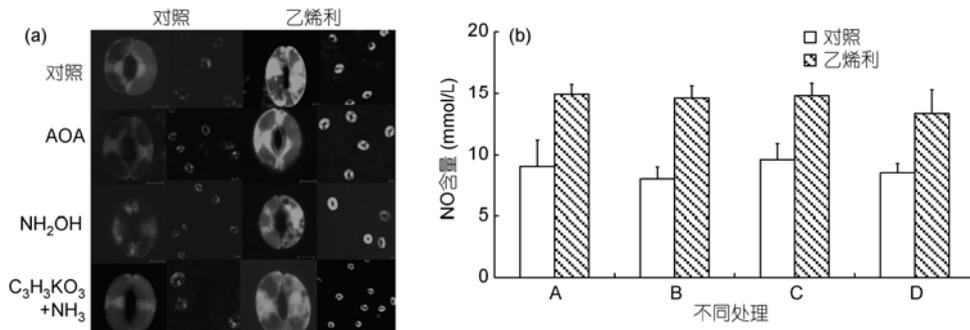


图7 H₂S抑制剂对乙烯诱导拟南芥气孔保卫细胞(a)或叶片(b)NO含量的影响

A, 对照; B, 0.4 mmol/L AOA; C, 0.4 mmol/L NH₂OH; D, 0.2 mmol/L C₃H₃KO₃+0.2 mmol/L NH₃

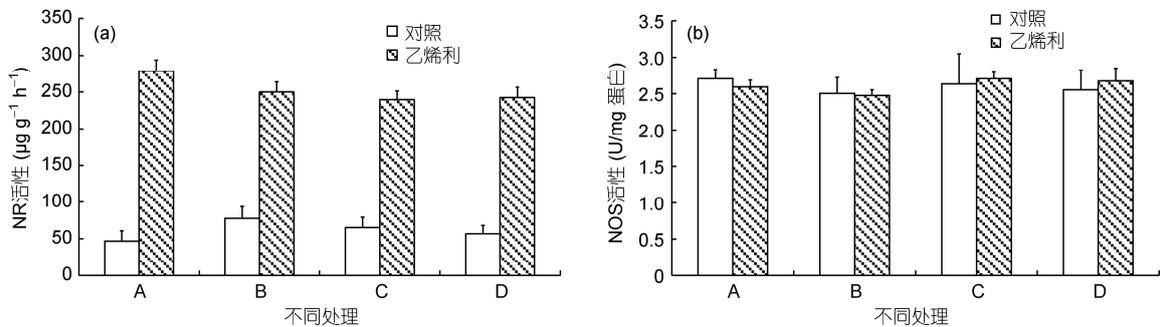


图8 H₂S抑制剂对乙烯诱导拟南芥叶片NR活性(a)和NOS活性(b)的影响

A, 对照; B, 0.4 mmol/L AOA; C, 0.4 mmol/L NH₂OH; D, 0.2 mmol/L C₃H₃KO₃+0.2 mmol/L NH₃

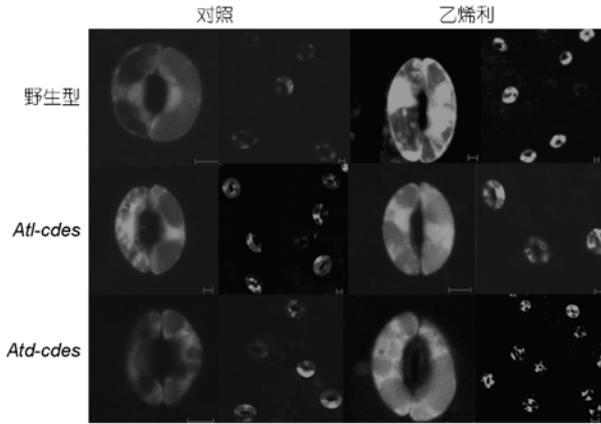


图9 0.004% 乙烯利对 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 气孔保卫细胞 NO 含量的影响

酸分解生成大量的 H_2S , 将信号传递给其下游信号分子, 从而诱导拟南芥气孔关闭.

保卫细胞第二信使(钙、质子、NO 和 H_2O_2)已陆续被证明参与乙烯诱导的气孔关闭过程. 例如, Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 和 Ca^{2+} 通道抑制剂均明显减弱乙烯对

气孔运动的影响^[4]; 分子生物学及药理学实验表明, 来自 NADPH 氧化酶及细胞壁过氧化物酶的 H_2O_2 介导 NO 的合成, 参与乙烯诱导的拟南芥气孔关闭^[3]; 胞质碱化可能是乙烯信号转导过程中的主要组分, 刘菁等人^[5]证明在乙烯诱导拟南芥气孔关闭过程中, NO 的产生在保卫细胞胞质碱化之后, 那么在气孔运动信号转导链中是否还存在其他信使? 近期有报道表明, H_2S 可以阻止多种胁迫下植物体 H_2O_2 浓度的升高和增强各种抗氧化酶活性, 以提高植物体的抗性^[11,20,21], 由此表明, 信号转导途径中 H_2S 可能与 H_2O_2 有交叉作用. 本课题组先期研究发现, 乙烯处理后 H_2S 含量发生变化的时间晚于其所引起的胞质 Ca^{2+} 和 pH 的变化, 这是否表明在乙烯诱导拟南芥气孔关闭过程中 Ca^{2+} 和胞质碱化介导 H_2S 的合成? 乙烯诱导气孔关闭的复杂信号网络中钙、质子、NO 和 H_2O_2 等信号分子与 H_2S 是怎样相互作用的? H_2S 是否是调控气孔运动信号网络的重要枢纽之一? 是否存在下游的结合蛋白(受体)? 这些都是值得进一步探讨的问题.

参考文献

- 1 高巍, 尚忠林. 细胞内离子在气孔运动中的作用. 植物学报, 2010, 45: 632-639
- 2 王书伟, 王巍, 李海侠, 等. 保卫细胞的光合作用在光调节的气孔运动中的功能. 植物生理学通讯, 2010, 46: 499-504
- 3 刘国华, 侯丽霞, 刘菁, 等. NO 与 H_2O_2 参与乙烯诱导的拟南芥叶片气孔关闭. 自然科学进展, 2009, 19: 8-18
- 4 刘国华, 刘菁, 侯丽霞, 等. NO 可能作为 Ca^{2+} 的下游信号介导乙烯诱导的蚕豆气孔关闭. 分子细胞生物学报, 2009, 42: 145-155
- 5 刘菁, 刘国华, 侯丽霞, 等. 胞质 pH 变化介导乙烯诱导的拟南芥保卫细胞 NO 产生和气孔关闭. 科学通报, 2010, 55: 2003-2009
- 6 Cao Z, Huang B, Wang Q, et al. Involvement of carbon monoxide produced by heme oxygenase in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* and its proposed signal transduction pathway. Chinese Sci Bull, 2007, 52: 2365-2373
- 7 Lamattina L, Polacco J C. Nitric oxide in plant growth, development and stress physiology. Plant Cell Monogr, 2007, 6: 1-5
- 8 Mustafa A K, Gadalla M M, Snyder S H. Signaling by gasotransmitters. Sci Signal, 2009, 2: 1-17
- 9 Rausch T, Wachter A. Sulfur metabolism: A versatile platform for launching defence operations. Trends Plant Sci, 2005, 10: 503-509
- 10 Kimura H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator. Mol Neurobiol, 2002, 26: 13-19
- 11 Zhang H, Tang J, Liu X P, et al. Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. J Integr Plant Biol, 2009, 51: 1086-1094
- 12 Sekiya J, Schmid T A, Wilson L G, et al. Emission of hydrogen sulfide by leaf tissue in response to L-cysteine. Plant Physiol, 1982, 70: 430-436
- 13 Riemenschneider A, Nikiforova V, Hoefgen R, et al. Impact of elevated H_2S on metabolite levels, activity of enzymes and expression of genes involved in cysteine metabolism. Plant Physiol Biochem, 2005, 43: 473-483
- 14 Gonugunta V K, Srivastava N, Raghavendra A S. Cytosolic alkalinization is a common and early messenger preceding the production of ROS and NO during stomatal closure by variable signals, including abscisic acid, methyl jasmonate and chitosan. Plant Signal Behav, 2009, 4: 561-564
- 15 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999
- 16 Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J Neurosci, 1996, 16: 1066-1071
- 17 Lisjak M, Srivastava N, Teklic T, et al. A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation. Plant Physiol Biochem, 2010, 48: 931-935

- 18 王鹏程, 杜艳艳, 宋纯鹏. 植物细胞一氧化氮信号转导研究进展. 植物学报, 2009, 44: 517-525
- 19 Hosoki R, Matsuki A N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 237: 527-531
- 20 Zhang H, Hu L Y, Hu K D, et al. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates the oxidative damage against copper stress. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50: 1518-1529
- 21 Zhang H, Jiao H, Jiang C X, et al. Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32: 849-857