

植物细胞膜 ATP 酶及其与植物低温生理过程的关系 (综述)

李美茹 刘鸿先 王以柔

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

A REVIEW OF THE STUDIES ON ATPase IN PLANT CELLULAR MEMBRANES IN RELATION TO PHYSIOLOGICAL PROCESS AT LOW TEMPERATURE

Li Meiru Liu Hongxian Wang Yirou

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

细胞膜是生命有机体的基础结构, 细胞一切的内外物质交流、信息传递都必需通过细胞膜, 再反馈到细胞各部位, 从而进行相应的生理生化调节。细胞膜上的 ATP 酶 (ATPase) 对有生命的细胞维持内外环境的平衡具有极重要的作用, 由它建立的跨膜质子推动力 $\Delta\mu\text{H}^+$, 可用于 ATP 的形成, 驱动次级离子或溶质的跨膜运输等。因此, 质膜 ATPase 在高等植物生命活动中有主宰酶 (master enzyme) 之称。自 1972 年 Hodges 等^[1] 证明应用蔗糖梯度离心分离得到的原生质膜制剂存在 ATPase 活性, 从此开始了探索高等植物细胞中 ATPase 的分子特性。由于表面活性剂的应用、分离纯化技术的改进和基因工程技术手段的渗透, 对 ATPase 的研究已取得了很丰富的实验结果^[2,3]。近年来, 由于 Ca^{2+} 介导多种植物生理过程, 充当植物细胞内的信使功能正逐步得到确认, 因而 Ca^{2+} 在细胞内的动态分布、 Ca^{2+} 的跨膜运输引起大家的关注, 而影响 Ca^{2+} 在细胞内动态分布的主要因子之一就是各细胞器膜上的 ATPase 活力。本文对植物细胞膜上 ATPase 的特性、特别是 ATPase 与跨膜 Ca^{2+} 的运输以及它与植物低温生理过程的关系作一概述和讨论。

1 各种细胞膜 H^+ -ATPase 的特性

根据 H^+ -ATPase 某些特性的差异, 可将它划分成三类: (1) 线粒体或叶绿体 F_0F_1 类型的 F-ATPase, 即 ATP 合成酶, 它从膜上脱落成游离态或被活化后又具 ATPase 的活性。(2) 原生质膜 E_1E_2 类型的 P-ATPase。(3) V-ATPase, 在真核细胞中分布很广, 溶酶体、高尔基体及液泡膜上均可见到。这些泵质子 ATPase (H^+ -ATPase) 的共同特点是需 Mg^{2+} , 分解 Mg-ATP , 释放出无机磷; 由于酶的激活需 Mg^{2+} , 所以 H^+ -ATPase 也被称为 Mg^{2+} -ATPase。

根据各种细胞器膜的密度不同, 可以将各种细胞器膜区别开。由于各种细胞器膜的 H^+ -ATPase 具有较专一的抑制剂, 藉此特性, 可以鉴别具 ATPase 活性制剂的来源。

1.1 原生质膜 H^+ -ATPase

质膜 H^+ -ATPase 是质膜的插入蛋白, 分子量大约 100 kD, 水解 ATP 的部位在质膜的细胞质

一侧, ATP 水解产生的能量, 把胞质中的 H^+ 泵到膜外, 形成跨膜的 H^+ 梯度。Serrano^[2] 曾设想 H^+ -ATPase 结构模型图, 认为酶的大部分亲水区域在膜的原生质一侧, N 端构成 H^+ 入口的门, 暴露在膜外侧的 C 端构成离子通道出口。ATP 在被酶水解过程中, 先以酰基磷酸键与 H^+ -ATPase 上的门冬酰残基结合, 形成磷酸化中间产物; 钒酸盐因能与磷酸发生竞争, 抑制了磷酸化中间体的形成, 为此, 目前钒酸盐被认为是质膜 H^+ -ATPase 活性的专一性抑制剂。外加 K^+ 可以加速 H^+ -ATPase 的磷酸化周期。 H^+ -ATPase 对蛋白激酶磷酸化有着依赖性, 因此, 推测蛋白激酶具有调节 H^+ -ATPase 活性的作用, 而影响蛋白激酶活性的因子, 如 Ca^{2+} 、pH, 又可通过蛋白激酶影响着 H^+ -ATPase 的活性^[3]。

1.2 线粒体和叶绿体 H^+ -ATPase

F-ATPase 对 NaN_3 和寡霉素都很敏感, 这可用作区别 F-ATPase 和 P-ATPase、V-ATPase 的佐证。F-ATPase 水解 ATP, 将 H^+ 泵入线粒体和叶绿体内, 因水解 ATP 时不形成磷酸化中间体, 它对钒酸盐不敏感。线粒体 H^+ -ATPase 由 F_0F_1 ^[4] 组成, 存在于嵴膜上, F_0 为膜结合蛋白, F_1 具催化功能, 它由 5 个亚基组成: α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 。游离态的 F_1 不需活化就能直接水解 ATP。叶绿体的 H^+ -ATPase 由 CF_0CF_1 组成^[5], 是结合于类囊体膜表面的一种颗粒蛋白。通常情况下, 其水解活力需经活化后才表现出来, 如经 DTT 和光活化后, 可显示出较高的水解 ATP 的 ATPase 活力。用 EDTA 稀溶液可将 CF_1 从类囊体膜上洗脱下来, 这可溶性 CF_1 的 ATPase 活力需经活化处理, 其水解活力才表现出来, 用 DTT 活化后, 表现为需 Ca^{2+} 的 ATPase 活性。 CF_1 也由 5 个亚基组成, 其中 ϵ 亚基有抑制 CF_1 的 Ca^{2+} -ATPase 活力的效应, 当加入 -SH 试剂或胰蛋白酶时, 就会摘去抑制剂 ϵ 亚基, 从而表现出 Ca^{2+} -ATPase 活性。

1.3 液泡膜 H^+ -ATPase

对于在植物细胞内离子平衡起中心调节作用的液泡来说, 液泡膜 H^+ -ATPase 起着关键的作用。液泡膜 H^+ -ATPase 的功能是在水解 ATP 过程中, 将 H^+ 泵进液泡。它最明显的特征就是能被硝酸盐所抑制和被阴离子所激活, 对于燕麦根液泡膜 H^+ -ATPase 来说, 各种单价阴离子激活的顺序为 Cl^- 和 $Br^- > I^- > HCO_3^-$, 它对 NaN_3 和钒酸盐均不敏感^[4]。最初的研究表明植物液泡膜 H^+ -ATPase 有 3 个亚基, 分别为 70、60 和 16 kD, 这与所有 V-ATPase 相同。最近的研究表明, 植物液泡膜 H^+ -ATPase 不只由 3 个亚基组成, 不同材料来源的 H^+ -ATPase, 其多肽组成也不一样^[6,7]。

2 ATPase 与跨膜 Ca^{2+} 的运输

Ca^{2+} 在植物生长和发育中起着很重要的调节作用, 目前 Ca^{2+} 在植物细胞内的信使功能正逐步得到确认, 通过细胞质中 Ca^{2+} 浓度 ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) 的变化, 影响 Ca^{2+} 所调节的蛋白和这些蛋白的作用对象, 从而调节着相当广泛的细胞生命活动过程, 它所调节的范围可由控制离子的运载到基因的表达^[8]。细胞中 Ca^{2+} 的分布很不均一, 试图在细胞上标明 Ca^{2+} 电化学势 ($\Delta\mu_{Ca^{2+}}$), 是一项很复杂、困难的工作。陡峭的 $\Delta\mu_{Ca^{2+}}$ 存在于质膜 (为 $45-60 \text{ kJ mol}^{-1}$)、液泡膜 (为 $28-34 \text{ kJ mol}^{-1}$) 以及亦可能在内质网上。正常情况下, 跨越这些细胞膜的 $\Delta\mu_{Ca^{2+}}$ 是相当稳定的, 但在信号传导时, 梯度将发生改变。较小的梯度可能存在于胞质与质

体、线粒体之间, 这些梯度将随着光合和呼吸活性变化而变化。即使在被认为是连续体的胞质和核内, Ca^{2+} 的分布也不是均一的。 $\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$ 对于细胞维持正常功能很重要, 不仅对信号传导, 而且对胞质和细胞器中发生的代谢过程也有调节作用。因此, 维持细胞中 $\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$ 的稳定对保持细胞活力是很重要的。细胞在长期进化过程中发展了一组赖以调节细胞内 Ca^{2+} 浓度的精细机制来维持细胞 $\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$ 的稳定, 这组机制总称为钙稳衡(Calcium homeostat)。钙稳衡机制的组成包括泵(pump), 如质子泵、钙泵, 次级运载体(secondary transporter), 如 $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$, 以及离子通道(ion channel), 如 Ca^{2+} 通道。 Ca^{2+} 信使功能是通过调控植物细胞内游离 Ca^{2+} 浓度来实现的, 而这种调控依赖于细胞钙稳衡的作用。即使细胞处于静息态, 细胞中各部位中的 $\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$ 处于稳定, 这些稳定的梯度也由跨越每一细胞膜 Ca^{2+} 的出入平衡所维持着。各种刺激可以通过钙稳衡引起细胞中 Ca^{2+} 浓度的改变, 所引起的 Ca^{2+} 浓度变化具有特异的空间和时间特征, 这正好对应于由 Ca^{2+} 所介导的细胞反应具有多样性和特殊性^[9]。

Ca^{2+} 跨膜运输到胞质是钙信号系统行使功能的首要步骤, Ca^{2+} 完成信息传递之后, 将被迅速泵出胞外或被胞内贮钙体吸收, 使 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 回落到静息态时的水平, 行使这种对钙信使反馈功能有赖于细胞质膜和细胞器膜中的 Ca^{2+} 转运系统。植物细胞中的 Ca^{2+} 运输系统从运输方式上主要分为三类^[9]: (1) Ca^{2+} -ATPase, 它水解 ATP, 提供能量, 将 Ca^{2+} 泵出胞质, 故称钙泵, 它存在于质膜和内质网上; (2) 与电子传递链偶联的 Ca^{2+} 泵, 利用电子传递产生的电化学势, 将 Ca^{2+} 主动泵进细胞器内, 它存在于线粒体或叶绿体上; (3) $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ 反向传递体, 利用已建立的质子电化学势, 实现 Ca^{2+} 与 H^+ 跨膜交换, 将 Ca^{2+} 运出胞质, 它存在于液泡膜上, 也可能存在于质膜、高尔基体上。

由于 H^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase 参与 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的调节, 各种细胞膜上 ATPase 的特性, 对二价离子 (Mg^{2+} , Ca^{2+}) 的依赖性以及与钙调素 (CaM) 的关系正是目前需要了解的知识。就二价离子的依赖性而言, 目前对植物细胞质膜上 Ca^{2+} 激活的 ATPase 有三种提法^[10]: 一种是把反应系统中含 Ca^{2+} 、不含 Mg^{2+} 时表现酶活的称为 Ca^{2+} -ATPase, 而把反应系统中含 Mg^{2+} 、不含 Ca^{2+} 时表现酶活的称为 Mg^{2+} -ATPase; 第二种提法是只称 Ca^{2+} -ATPase, 强调对 Ca^{2+} 的依赖性, 这种提法虽未表明对 Mg^{2+} 的依赖性, 但酶活测定中均加入 Mg^{2+} ; 第三种提法是把系统中同时含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 时表现活性的称为 $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -ATPase。这些不同提法的出现, 说明目前对细胞质膜上 Ca^{2+} 激活的 ATPase 特性了解还不够。 Mg^{2+} -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 是不同酶还是同一种酶, 目前还不清楚。有实验^[9]表明 Ca^{2+} -ATPase 对钒酸盐敏感, 对质子载体不敏感, 所以属于 P-ATPase; 它受低浓度的藻红 B (erythrocin B) 抑制, 浓度小于 $1 \mu\text{mol/L}$ 的藻红 B 就可以完全抑制 Ca^{2+} -ATPase 的活性; 而抑制 H^+ -ATPase 活性, 藻红 B 浓度要高达 $100 \mu\text{mol/L}$ 。因此, 可利用 Ca^{2+} -ATPase 对低浓度藻红 B 的敏感性作为判断是否为 Ca^{2+} -ATPase 的标志。

非植物细胞质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性受到几种机制的调控^[11]: (1) 被 CaM 激活, 当胞内 Ca^{2+} 浓度增加时, Ca^{2+} 与 CaM 结合并使其活化, 活化的 CaM 进一步与 Ca^{2+} -ATPase 蛋白结合, 使后者活化为一种反馈性调节机制, 将 Ca^{2+} 排出胞质; (2) 钙泵可为酸性膜脂—二磷酸肌醇磷脂所激活; (3) 钙泵被有限地水解活化, 如胰蛋白酶将钙泵蛋白切去一个肽段后, 不但

不影响其活性, 反而使其活化; (4) 蛋白激酶 C 和依赖 cAMP 的激酶 (蛋白激酶 A) 均可使钙泵磷酸化。目前将非植物细胞中的 Ca^{2+} -ATPase 分成二类^[12]: 第一类是在动物细胞的肌质网和内质网中发现的, 因而被称作是 ER-型, 分子量为 100–120 kD, La^{3+} 阻止磷酸化中间体的形成, 酶活性不被 CaM 激活, 每运载 2 个 Ca^{2+} , 消耗 1 分子的 ATP; 第二类, 因是在红细胞中最初发现的, 所以称之为 PM 型 Ca^{2+} -ATPase, 分子量为 134–140 kD, La^{3+} 增加磷酸化中间体的形成, 酶活性受到 CaM 和酸性磷脂的激活, 每运载 1 分子 Ca^{2+} , 消耗 1 分子 ATP。

在植物细胞质膜上已确认有 Ca^{2+} -ATPase 的存在。CaM 对植物质膜 Ca^{2+} -ATPase 是否有调节作用, 尚有争议。关于 Ca^{2+} -ATPase 不受 CaM 的激活, 有二种解释^[9]: 一种是认为可能存在着大量的内源 CaM, 所以加入外源 CaM, 体现不出它的激活效应。但用 EGTA 反复洗脱, 除去内源 CaM 来研究 CaM 是否有激活 Ca^{2+} -ATPase 的作用, 不同的实验, 得出的结果也不一致; 另一种解释是可能在制备微囊体时, Ca^{2+} -ATPase 被部分水解。Rasi-Caldogno 等^[12]证明 Ca^{2+} -ATPase 一旦被胰蛋白酶水解, 被水解的肽段刚好是 CaM 的结合部位, 因此就失去了被 CaM 激活的效应。有些实验认为在线粒体和叶绿体中也有钙泵的存在^[13,14]。液泡膜上是否有钙泵, 尚未得到确认^[15]。液泡是植物细胞特有的结构, 贮存有大量 Ca^{2+} , 对它进行 Ca^{2+} 激活的 ATPase 的研究对于解答 Ca^{2+} 跨膜转运的机制很有意义。目前已相继在大麦根、玉米根和小麦根等发现有液泡膜 Ca^{2+} -ATPase 的活性^[15–17], 而植物细胞液泡膜上是否存有 Ca^{2+} -ATPase 似乎与所采用的实验材料有关^[15]。Bush^[9]将植物细胞中的 Ca^{2+} -ATPase 分成两类, 一类是相当于非植物细胞中的 PM-型, 酶活受到 CaM 激活, La^{3+} 增加酶蛋白磷酸化, 主要存在于内质网膜和液泡膜上, 很少存在于原生质膜中; 另一类不被 CaM 激活, 多发现于质膜上, 与 ER 型相似。

Ca^{2+} -ATPase 依赖于 Ca^{2+} 形成磷酸化中间体, 对 Ca^{2+} 有高亲和性, K_m 为 0.07–12 $\mu\text{mol/L}$, 这个范围包括了一般情况下 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化的范围。大麦糊粉层细胞液泡的 K_m 为 0.15 $\mu\text{mol/L}$, 原生质膜的为 2 $\mu\text{mol/L}$, 说明液泡膜和质膜的 Ca^{2+} -ATPase 对 Ca^{2+} 的亲和性很高, 在静息状态细胞质长期低浓度 Ca^{2+} 的维持中, 质膜和液泡膜 Ca^{2+} 运输系统可能起着主要的作用; 线粒体膜上 Ca^{2+} 运输系统对 Ca^{2+} 的亲和力很低, 仅约质膜系统的十分之一, 而运输能力却高出 10–20 倍, 这表明线粒体膜上 Ca^{2+} 运输系统可能起着迅速清除胞质中高浓度 Ca^{2+} 的作用^[8,9]。

植物液泡膜上存在 $\text{Ca}^{2+}/n\text{H}^+$ 反向传递体, 它对 Ca^{2+} 的亲和力较低, K_m 约 20 $\mu\text{mol/L}$, 质膜上是否存在这一系统, 尚有争议^[18]。郝鲁宁等^[19]报道在大麦根质膜上存在不需 Mg^{2+} (由 Ca^{2+} -ATPase 驱动的初级转运系统) 和需 Mg^{2+} (依赖于跨膜 H^+ 梯度的次级转运系统, 即 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$) 的两个 Ca^{2+} 转运系统, 不需 Mg^{2+} 的 Ca^{2+} 转运系统对 Ca^{2+} 有较高的亲和力, 但转运能力较低; 需 Mg^{2+} 的 Ca^{2+} 转运系统对 Ca^{2+} 亲和力较低, 但具较高的转运能力, 这两个系统在钙信使传递胁迫信号的过程中起着不同的作用。 Ca^{2+} -ATPase 驱动初级 Ca^{2+} 转运系统可能与胁迫信号的传递有关, 而次级 Ca^{2+} 转运系统 ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$) 则可能起着信息传递之后将剩余 Ca^{2+} 运出胞外, 恢复细胞钙稳衡。

3 ATPase 与植物低温生理过程的关系

细胞膜是细胞对外界环境的屏障,当细胞面临环境胁迫或内部指令需进行渗透调节以维持细胞内外渗透势平衡时,必然需要膜传递蛋白的跨膜运输作用。ATPase 是跨膜运输动力的产生者,因此,近来不少研究集中在胁迫因子对细胞膜 ATPase 的影响,以探讨细胞膜 ATPase 在胁迫条件下调节细胞过程的作用^[20-22]。

Palta 等^[23]用洋葱表皮细胞和马铃薯叶肉细胞为材料,证明结冰伤害的最早细胞器是质膜和液泡膜,并提出结冰膜伤害的假说:质膜和糖的主动运输酶失活可能是结冰伤害的原初部位。为此,各种生物膜的组成、膜上功能蛋白(ATPase)在不同程度冻害、冷害中的变化和冷驯化过程中的变化成为研究的对象。一些研究结果支持或证实了以上的假说。简令成等^[20]采用磷酸铅沉淀的细胞化学方法,测定细胞 Mg^{2+} -ATPase 的活性。在小麦幼苗的冻害过程中,发现未以锻炼的麦苗在低温处理后,叶肉细胞的质膜、液泡膜、胞间连丝、核染色质和核仁上,不显示或很少显示 Mg^{2+} -ATPase 活性反应。经过锻炼的麦苗,在低温处理后,叶肉细胞的这些细胞器上, Mg^{2+} -ATPase 活性的反应很强。Iswari 等^[24]研究番茄叶片在4种不同程度冻害中的变化,结果证明质膜对低温的敏感性比线粒体和叶绿体大,认为质膜 Mg^{2+} -ATPase 是冰冻伤害的原初位点。王洪春等^[25]根据玉米根尖端 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 快速或缓慢结冰处理的实验结果,认为结冰伤害时,物质的外参与质膜 ATPase 活力无关,ATPase 并不是结冰伤害的最早部位。而在慢融冰时质膜 ATPase 活力的降低,可能是结冰伤害后细胞内生理代谢发生变化引起的。王洪春和李锦树^[26]的实验还表明液泡的耐寒力比原生质体差,说明液泡是冻害的一个敏感细胞器。Arora 等^[27]进一步证明,在遭非致死性冻害后,如果质膜 ATPase 被抑制,亦即就抑制了细胞活力的恢复。这说明质膜 ATPase 对调节细胞活力的恢复起到关键作用。

简令成等^[28]研究了番茄幼苗冷害过程中 ATPase 活性的变化,指出番茄幼苗在 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 12 h 后,子叶细胞质膜、细胞壁及细胞间隙内的 ATPase 活性开始明显下降,但是细胞核和叶绿体片层膜上的 ATPase 仍保持较高的活性反应。在 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 24 h,质膜及细胞壁上的 ATPase 活性几乎完全丧失,而细胞核和叶绿体片层膜的 Mg^{2+} -ATPase 活性仅开始减弱。此外,细胞形态学的观察表明,整个细胞结构形态仍保持完整,没有看到明显的伤害。以上情况说明,冷害首先影响细胞表面(质膜、细胞壁以及细胞间隙) Mg^{2+} -ATPase 的活性,使之降低或完全失活。恢复培养的试验表明,将各种冷处理后的番茄幼苗放回 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 再培养时,全部植株存活。这进一步证明,在以上冷处理条件下,细胞表面活性 ATPase 的降低或完全丧失,是初始性的损伤,当然也是可逆的。Kasamo^[29]研究不同抗冷力的水稻细胞液泡 Mg^{2+} -ATPase 和质膜 Mg^{2+} -ATPase 对低温的反应,发现冷敏感品种,其液泡膜的 Arrhenius 折点温度($32\text{ }^{\circ}\text{C}$)比质膜高 $9\text{ }^{\circ}\text{C}$,经 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 1 d,液泡膜 Mg^{2+} -ATPase 活性明显下降,而质膜的 Mg^{2+} -ATPase 在处理的第 6 天,才表现出下降;抗冷品种液泡膜的 Arrhenius 折点温度为 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$,比质膜的高 $3\text{ }^{\circ}\text{C}$,经 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理,其液泡膜 Mg^{2+} -ATPase 活性也下降,但质膜的 Mg^{2+} -ATPase 活性一直呈增加状态。说明无论是冷敏感植物或抗冷植物,液泡膜 Mg^{2+} -ATPase 比质膜 Mg^{2+} -ATPase 对冷处理更敏感。Yoshida 等^[30]以绿豆幼苗为研究材料,研究不同低温程度对细胞电解质、各种细胞器标志酶活性的影响,发现 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 1 d,电解质渗漏不明显,这时液泡膜 Mg^{2+} -ATPase 活

性表现明显下降, 但内质网的标志酶 NADH cyt C 还原酶、高尔基体的标志酶 UDPase、线粒体的 Mg^{2+} -ATPase 和 cyt C 氧化酶活性都没有变化, 而在处理的 2 d 后, 才观察到这些酶活性下降, 说明液泡膜 Mg^{2+} -ATPase 是对冷害处理作出反应的最早部位, 其它细胞器膜酶活性的变化是次生的反应。戴金平等^[31]实验表明, 经过低温锻炼的黄瓜幼苗在 22 °C 培育反应中, 其 Mg^{2+} -ATPase 活性也和未经低温锻炼的幼苗一样, 在质膜、叶绿体片层膜以及核内染色质和核仁等部位上显示高的活性反应, 不同之处在于冷锻炼苗的内质网和液泡内 Mg^{2+} -ATPase 也呈高活性。在 5 °C 培育中, 未经锻炼的幼苗质膜不产生活性反应, 而经锻炼的, 其质膜产生高的 ATPase 活性, 表明适度的低温锻炼提高了质膜 Mg^{2+} -ATPase 对低温的适应性。Du Pont 等^[32]报道番茄经低温锻炼后细胞液泡膜质子运输能力获得了对低温的适应性。总之, 细胞膜上 Mg^{2+} -ATPase 是低温的敏感部位, 其中以液泡膜和质膜上的 Mg^{2+} -ATPase 最为显著, Mg^{2+} -ATPase 活性在低温伤害处理后能否恢复关系到能否恢复细胞活力, 而冷驯化提高细胞抗低温能力也与其提高 Mg^{2+} -ATPase 对低温的适应性有关。

低温处理降低细胞膜 ATPase 活性的原因很复杂。宓容钦等^[33,34]证明玉米根线粒体 ATPase 活化能折点温度的改变和脂肪酸链长度、不饱和度有关: 短链脂肪酸在降低酶活化能折点温度比长链的效果大; 不饱和脂肪酸的也比饱和脂肪酸的大。添加脂肪酸不饱和度相同而极性端基不同的大豆磷脂、PC 和 PE+PG, 发现磷脂极性端基对膜结合酶活力的影响并不比脂肪酸链的作用小。膜脂由亲水性极性端基和疏水性脂肪酸尾基构成, 磷脂的极性端基和脂肪酸链的长短、饱和度都通过对膜的流动性影响着膜结合酶 ATPase 的活力, 而膜的流动性又受温度的影响。因此, 低温对膜 ATPase 活性的影响可能是通过低温影响膜的流动性而引起的。ATPase 是富含 -SH 基的蛋白质, 按 Levitt 的硫氢基假说, 它对低温可能引起的由 -SH 向 -S-S 转变很敏感, 也对低温引起的氧化胁迫环境很敏感, 因而易受到低温直接的伤害。曾韶西等^[35]实验表明, 冷胁迫下黄瓜幼苗子叶细胞中的 SH 基含量下降, 而丙二醛 (MDA) 含量增加; SH 基含量与 MDA 含量呈负相关; 低温引起的 SH 基含量降低和 MDA 的增加可因苯甲酸钠和维生素 E 预处理而受抑制; 外源 MDA 预处理黄瓜幼苗, 可降低 SH 基的含量。Huner 等^[36]观察到低温下 CF_1 的 γ -亚基的 35 kD 多肽, 在分子内形成一个二硫键, 而变成分子比较紧凑的 34 kD 多肽; 经过冷驯化, 其 35 kD 多肽对分子内二硫键的形成不敏感。Hotsubo 等^[37]实验表明冷敏感植物绿豆和抗冷植物豌豆的液泡膜 Mg^{2+} -ATPase 对冷处理反应不一样, 这可能与它们的 16 kD 蛋白对冷反应不一样有关: 0 °C 处理使绿豆液泡膜 Mg^{2+} -ATPase 的 16 kD 脱落, 破坏了酶的结构; 而豌豆液泡膜 16 kD 仍稳定地结合在酶上。彭永康等^[38]研究 ATPase 同工酶变化与植物耐冷性之间的关系, 发现 0-1 °C 培养时, 幼苗根系内 ATPase 同工酶谱带减少, 恢复生长时, ATPase 同工酶有不同程度的恢复, ATPase 同工酶谱带变化与植物幼苗耐冷性呈一定的相关性。因此, 低温对膜 ATPase 活性的影响也可能是低温直接影响酶蛋白的结构或影响其代谢引起的。

Ca^{2+} 与冷害的关系正逐步地引起人们的注意, 因为 Ca^{2+} 对维持膜的完整性和调节离子运输起着很重要的作用, 因而推测 Ca^{2+} 有减轻低温伤害的作用。冰冻引起细胞离子外渗量增加, 渗出的离子主要是 K^+ ; 随着伤害程度的增加, Ca^{2+} 外渗量增加。因此, Palta 等^[39]提出冰冻的次生伤害是细胞外 K^+ 取代了膜上的 Ca^{2+} 。随后又证明膜中一定量的 Ca^{2+} 是保持细胞活力

所必需的^[40]。在冰冻前用0.1—0.3%的CaCl₂喷施植物,可减轻冻害;在冰冻后喷施则可加快植物活力的恢复,避免伤害^[25]。用CaCl₂浸种,可以在一定程度上提高冬小麦和水稻幼苗的抗寒抗冷力^[25,41],Ca²⁺与植物抗冷性发生变化的许多相关的生理生化过程有着密切的关系^[42]。由于Ca²⁺作为植物细胞内第二信使的确认,Ca²⁺是否亦是细胞低温过程中的信使引起了研究者的注意。Minorsky^[43]首先提出Ca²⁺可能是传导冷害生理信使的假说,后来又继续报道^[44]一些快速的、非伤害的冷刺激引起的生理过程,与[Ca²⁺]cyt的增加可能有关。Monory等^[45]的实验结果表明阻止细胞壁中的Ca²⁺流向胞质,可以阻断冷驯化的作用,可见,Ca²⁺信使在冷驯化提高抗寒力的过程中起着极其重要的调节作用。因长时间的高[Ca²⁺]cyt会扰乱细胞的代谢功能,故Ca²⁺在完成信息传递功能之后,高浓度的Ca²⁺应被及时排出胞质。前面讲过,[Ca²⁺]cyt的调节有赖于各细胞器膜上的ATPase和Ca²⁺-ATPase的活性,而ATPase正是冷胁迫、冷驯化作用的首要部位。Ca²⁺可以通过蛋白激酶的磷酸化作用或通过与CaM结合影响ATPase的活性,使ATPase行使功能作用,另一方面,如果低温损伤了ATPase的活性,胞质中大量的Ca²⁺不能运转,造成Ca²⁺的毒害,所以Ca²⁺的信使功能和生理功能与ATPase活性密切相关。因此,在研究冷害及冷驯化过程中,运用有关钙信号系统方面的理论来研究Ca²⁺运转活性、ATPase活性和Ca²⁺-ATPase活性等的变化,与细胞抗冷力变化的关系,对于探讨低温生理的原初反应是很有意义的。

参考文献

- 1 Hodges T K, Leonard R T, Bracker C E et al. Purification of an ion-stimulated adenosine triphosphatase from plant roots: association with plasma membranes. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1972, 69:3307—3311
- 2 Serrano R. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann Rev Plant Physiol*, 1989, 36:61—94
- 3 焦新之. 高等植物细胞膜的传递蛋白和与其有关的渗透调节作用. *植物生理学通讯*, 1993, 29:3—9
- 4 Wang Y Z, Sze H. Similarities and differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H⁺-ATPase of oat roots. *J Bio Chem*, 1985, 260:10434—10443
- 5 卫瑾. 寡霉素在叶绿体中的作用部位. *植物生理学报*, 1991, 17:151—156
- 6 Parry R V, Turner J C, Rea P A. High purity preparations of higher plant vacuolar H⁺-ATPase reveal additional subunits. *J Biol Chem*, 1989, 264:20025—20032
- 7 Ward J M, Sze H. Subunit composition and organization of the vacuolar H⁺-ATPase from oat roots. *Plant Physiol*, 1992, 99:170—179
- 8 郝鲁宁, 余叔文. *植物生理与分子生物学*. 北京: 科学出版社, 1992, 123—140
- 9 Bush D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46:95—122
- 10 郝鲁宁, 余叔文. 大麦根细胞质膜Ca²⁺-ATP酶和Ca²⁺转运系统的特性. *植物生理学报*, 1993, 19:172—180
- 11 孙大业, 郭艳林. *细胞信号系统*. 北京: 科学出版社, 1993, 146
- 12 Rasi-Caldogno F, Carnelli A, De Michelis M I. Identification of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase and of its autoinhibitory domain. *Plant Physiol*, 1995, 108:105—113
- 13 王小菁, 潘瑞焱. 红光对绿豆下胚轴线粒体Ca²⁺积累、ATPase及NAD激酶活性的影响. *植物生理学报*, 1993,

- 19:71-76
- 14 刘厚田, 郝鲁宁. Al^{3+} 对水稻叶绿体 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响及其与钙调素的关系. 植物学报, 1990, 32:528-532
 - 15 王延枝, 许献忠, 朱文成. 小麦根液泡膜上存在两种类型 ATP 酶. 生物化学与生物物理学报, 1993, 25:481-485
 - 16 Du Pont F M, Morrissey P J. Subunit composition and Ca^{2+} -ATPase activity of the vacuolar ATPase from barley roots. Arch Biochem Biophys, 1992, 294:341-346
 - 17 Pfeiffer W, Hager A. A Ca^{2+} -ATPase and a Mg^{2+}/H^{+} antiporter are present on tonoplast membranes from roots of *Zea mays* L. Planta, 1993, 191:377-385
 - 18 郝鲁宁, 余叔文. 大麦根细胞质膜存在 H^{+}/Ca^{2+} 反向传递系统. 中国科学(B辑), 1993, 23:827-832
 - 19 郝鲁宁, 余叔文. 大麦根细胞质膜 Ca^{2+} 转运系统对盐胁迫的反应. 植物生理学报, 1993, 19:275-284
 - 20 简令成, 孙龙华, 董合铸等. 冬小麦幼叶细胞内 ATP 酶活性的超微结构定位及其在抗寒锻炼和冻害中的变化. 植物学集刊, 第一集, 北京: 科学出版社, 1983, 183-189
 - 21 胡章立, 李琳, 荆家海等. 水分胁迫对玉米幼叶生长区细胞膜 H^{+} -ATPase 活性的影响. 植物生理学报, 1993, 19:124-130
 - 22 李美茹, 陈思学, 李琳等. 盐或低温胁迫对花生幼苗下胚轴 ATP 酶和质膜中 PIP_2 含量的影响. 西北植物学报, 1996, 16:17-22
 - 23 Palta P, Levitt J, Stadelmann E J. Freezing injury in onion bulbs. I. Evaluation of the conductivity method and analysis of ion and sugar efflux from injured cells. Plant Physiol, 1977, 60:393-397
 - 24 Iswari S, Palta J P. Plasma membrane ATPase activity following reversible and irreversible freezing injury. Plant Physiol, 1989, 90:1088-1095
 - 25 刘祖祺, 张石城. 植物抗性生理学. 北京: 中国农业出版社, 1994, 8-80
 - 26 王洪春, 李锦树. 植物耐寒性及防寒技术. 北京: 学术书刊出版社, 1990, 114-117
 - 27 Arora R, Palta J P. A loss in the plasma membrane ATPase activity and its recovery coincides with incipient freeze-thaw injury and postthaw recovery in onion bulb scale tissue. Plant Physiol, 1991, 95:846-852
 - 28 简令成, 董合铸, 孙龙华. 番茄子叶细胞内三磷酸腺苷酶活性的超微结构定位及其在冷害中的变化. 植物学报, 1981, 23:257-261
 - 29 Kasamo K. Response of tonoplast and plasma membrane ATPase in chilling-sensitive and insensitive rice (*Oryza sativa* L.) culture cells to low temperature. Plant Cell Physiol, 1988, 29:1085-1094
 - 30 Yoshida S et al. Impairment of tonoplast H^{+} -ATPase as an initial physiological response of cells to chilling in Mung bean (*Vigna radiata* (L.) Welczek). Plant Physiol, 1989, 89:634-642
 - 31 戴金平, 沈征言, 简令成. 低温锻炼对黄瓜幼苗几种酶活性的影响. 植物学报, 1991, 33:627-632
 - 32 Du Pont F M et al. Acclimation to low temperature by microsomal membranes from tomato cell cultures. Plant Physiol, 1985, 77:74-78
 - 33 宓容钦等. 生物膜组分对膜功能和膜脂相变的调控 I. 吐温表面活性剂对玉米根端线粒体 ATP 酶活力的影响. 生物化学与生物物理学报, 1981, 13:245-250
 - 34 宓容钦, 李锦树, 王洪春. 生物膜组分对膜功能和膜脂相变的调控 III. 磷脂脂质体对玉米根端线粒体 ATP 酶活力的影响. 植物生理学报, 1983, 9:217-222

- 35 曾韶西, 王以柔, 刘鸿先. 低温下黄瓜幼苗子叶巯基(SH)含量变化与膜脂过氧化. 植物学报, 1991, 33:50-54
- 36 Huner N P A. Plant cold hardiness and freezing stress, In: Li P H, Sakai A eds. Vol II, 1982, 129-136
- 37 Hotsubo K, Takezawa D, Arakawa K et al. Characterization of vacuolar H⁺-ATPase that are sensitive and tolerant to cold. Fifth International Plant Cold Hardiness Seminar, 1996, 56
- 38 彭永康, 祁忠占. 低温处理对植物幼苗生长及根系 ATPase 同工酶的影响. 西北植物学报, 1994, 14:210-215
- 39 Palta J P, Li P H. Alteration in membrane transport properties by freezing injury in herbaceous plants: evidence against rupture theory. Physiol Plant, 1980, 50:169-175
- 40 Arora R, Palta J P. *In vivo* perturbation of membrane-associated calcium by freeze-thaw stress in onion bulb cells. Plant Physiol, 1988, 87:622-628
- 41 李美茹, 刘鸿先, 王以柔等. 钙对水稻幼苗抗冷力的影响. 植物生理学报, 1996, (4): 379-384
- 42 李美茹, 刘鸿先, 王以柔. 植物细胞中的抗寒物质及其与植物抗冷性的关系. 植物生理学通讯, 1995, 31:328-334
- 43 Minorsky P V. An heuristic hypothesis of chilling in plants: a role for calcium as the primary physiological transducer of injury. Plant Cell Environ, 1985, 8:75-94
- 44 Minorsky P V, Spanswick R M. Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings. Plant Cell Environ, 1989, 12:137-143
- 45 Monory A, Sarhan F, Dhindsa R. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression, evidence for a role calcium. Plant Physiol, 1993, 102:1227-1234