

# 木麻黄质膜离子泵在酸雨条件下对镧的响应\*

李裕红<sup>1,2</sup>, 严重玲<sup>1\*</sup>, 刘景春<sup>1</sup>, 陈英华<sup>1</sup>, 胡俊<sup>1</sup>, 薛博<sup>1</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 泉州师范学院生物系, 福建 泉州 362000)

**摘要:** 研究镧对酸雨(pH 为 4.5)胁迫下木麻黄幼苗早期生长和质膜离子泵 ATP 酶活性的影响。结果表明: 较低浓度 La<sup>3+</sup> 浸种能使幼苗株高、根长、鲜重以及质膜质子泵活性明显增强, 在 200 mg L<sup>-1</sup> La<sup>3+</sup> 处理时达到最高增强值, 而高浓度的 La<sup>3+</sup> 浸种使之表现出抑制效应; 幼苗质膜钙泵的活性受 La<sup>3+</sup> 抑制。质子泵活性与细胞的伸长生长呈显著正相关关系, 镧对质子泵的活化作用有助于促进植物的生长, 且适量的镧具有缓解酸雨胁迫下生长的植物细胞质酸化, 维持细胞内环境稳定的间接作用。为抗酸雨和促生长, 木麻黄经镧浸种 8 h 的最适宜 La<sup>3+</sup> 浓度为 50~200 mg L<sup>-1</sup>。

**关键词:** 生态学; 质膜离子泵; 镧; 木麻黄; 酸雨; 稀土

**中图分类号:** O641.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4343(2003)06-0695-04

质膜离子泵 ATP 酶作为一类重要的膜转运蛋白, 它们能穿膜运送矿物质、糖类、代谢物以及其他化合物, 使植物细胞得以与环境进行物质交流和信息传递, 对植物的生长和细胞内环境的稳定起着关键作用<sup>[1]</sup>。本试验以水双相分配分离法获得高纯度的木麻黄(*Casuarina*) 幼苗质膜微囊为材料, 研究镧对酸雨胁迫下木麻黄幼苗质膜离子泵活性的影响, 以便揭示稀土元素调节植物抗酸雨能力的内在机制, 为探求稀土在增强木麻黄防护林抗逆性上的应用途径提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

普通木麻黄(*Casuarina equisetifolia*) 种子由福建省木麻黄种苗基地惠安赤湖林场提供, 种子平均千粒重为 1.44 g, 随机取种, 用 0.5% KMnO<sub>4</sub> 表面消毒 5 min, 用蒸馏水反复冲洗过滤 3 遍后, 分别以 0 (对照, 蒸馏水), 50, 100, 200, 300, 400 mg L<sup>-1</sup> 的 LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 溶液浸泡 8 h, 每处理种子 10 g。浸种完毕将种子冲洗滤去浸泡液, 然后进行沙培处理, 用配制的模拟酸雨作沙培液。模拟酸雨的 pH 值按厦门地区酸雨频率较高的 pH 值 (4.5) 设定<sup>[2]</sup>, 离子浓度比按文献[3]配制, 每处理

重复 9 次, 置于玻璃温室内培育。培养期间, 每天傍晚通气一次 (1 h), 并保持模拟酸雨 pH 值 (4.5) 的恒定。实验时气温为 (22 ± 2) 。2 周后幼苗长至株高约 5~6 cm 时取用。

### 1.2 试验测定

**植株的生长生物量:** 于每处理组随机取 10 株幼苗, 测量其株高和根长, 并用电子天平称量其鲜重。木麻黄幼苗质膜微囊的制备参考 Zheng H L<sup>[4]</sup> 等的水双相分配分离法。

**质膜质子泵活性测定**参照章文华<sup>[5]</sup>方法: 0.5 ml 反应体系中含 MgSO<sub>4</sub> 3 mmol·L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 mmol·L<sup>-1</sup>, Triton X-100 0.02% (V/V), Tris-Mes 50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 6.5, ATP-Na<sub>2</sub> 3 mmol·L<sup>-1</sup>, 加膜制剂 20 μl, 37 °C 保温 30 min, 加入 20% (w/v) TCA 200 μl 终止反应, 测定无机磷的释放量。质膜钙泵活性测定参考文献[6]方法: 1.1 ml 反应体系中含 10 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑, MgCl<sub>2</sub> 5 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 50 μmol·L<sup>-1</sup>, ATP-Na<sub>2</sub> 3 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.0, 加入 20 μl 膜制剂, 酶反应步骤同质膜质子泵活性测定。

**无机磷的测定**参照 Ohnishi<sup>[7]</sup>方法; 膜蛋白含量的测定按 Bradford<sup>[8]</sup>, 用考马斯亮蓝 G-250 显色法测定。以上实验均作 6 次重复测定。

\* 收稿日期: 2003-01-30; 修订日期: 2003-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170190); 福建省自然科学基金重点项目 (D0120001) 和泉州师范学院科研基金 (2002L104) 资助项目

作者简介: 李裕红 (1969-), 女, 博士研究生, 讲师

\* 通讯联系人 (E-mail: ycl@xmu.edu.cn)

## 2 结果与讨论

### 2.1 镧对幼苗生长的影响

试验结果(表1)表明:  $\text{LaCl}_3$  浸种 8 h 对 pH 值为 4.5 的模拟酸雨胁迫培养下的木麻黄幼苗生长有明显影响。当以  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为  $50 \sim 200 \text{ mg L}^{-1}$  浓度范围浸种 8 h,  $\text{La}^{3+}$  对幼苗生长(株高、根长、鲜重)有促进作用,且促进效果随浓度的增大越来越明显,当  $\text{La}^{3+}$  浓度为  $200 \text{ mg L}^{-1}$  时,对幼苗的株高、根长和鲜重的促进达到峰值;在  $\text{La}^{3+}$  浓度为  $300 \text{ mg L}^{-1}$  时,促进效果下降,到  $400 \text{ mg L}^{-1}$  的浓度时则相对于对照表现出抑制生长的效应。实验结果表明:稀土元素对酸雨影响植物生物量有明显的减缓作用;也说明适宜浓度的稀土元素对植物的生长起促进作用。 $\text{La}^{3+}$  运用在提高木麻黄抗酸雨胁迫能力上具有可行性。

### 2.2 镧对质膜质子泵活性的影响

不同浓度镧浸种处理后,木麻黄幼苗质膜质子泵活性的变化(图1)表明,较低浓度的  $\text{La}^{3+}$  对质膜质子泵活性起促进作用,但浓度高时对其有抑制效应。在  $\text{La}^{3+}$  为  $50 \sim 200 \text{ mg L}^{-1}$  浓度范围浸种后,  $\text{La}^{3+}$  对质膜质子泵活性的促进效果越来越强,至  $200 \text{ mg L}^{-1}$  浓度时,其活性达到峰值,比对照增加了 35.85%,而当  $\text{La}^{3+}$  浓度超过  $200 \text{ mg L}^{-1}$  时其活性受到抑制,甚至低于对照。在 300 和  $400 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{La}^{3+}$  处理时,其质子泵活性仅分别是对照组酶活性的 72.29% 和 90.88%。

质膜质子泵被认为是植物细胞的“主宰酶”,质子泵活性的提高有助于增强跨膜的质子电势梯度<sup>[9]</sup>,既为无机离子或有机溶质如氨基酸、糖等同向或反向运输提供较强的驱动力,从而促进跨膜物质的运输和植物的生长发育。中国的酸雨属硫酸型酸雨,硫酸根在植物细胞质膜上的转运受质子泵向外排出质子产生的电势梯度所驱动,硫酸根转运蛋白将一个硫酸根离子协同 3 个质

子主动共转运进入细胞内,结果硫酸根离子的进入使双倍的质子流入胞内,势必影响胞质 pH 值稳定(胞质 pH 值通常稳定在 7.3~7.5)<sup>[11]</sup>,质子泵具有向胞外泵出质子的功能,其活性的提高则有助于将多余的质子运出细胞外,缓解胞质酸化从而保持酸雨胁迫下细胞内环境的正常与稳定。

促使植物生长的因素有两方面。第一是植物体有限空间内细胞数目的增加;第二是每个细胞在体积上的扩展,植物激素如生长素对植物生长的促进作用属于此类<sup>[9]</sup>。质子泵会被生长素激活,质子泵产生的质子可使细胞壁内表面酸化,细胞壁的酸化会激活细胞壁内松弛氢键的蛋白质,细胞产生膨胀生长<sup>[11]</sup>,最后,植物体加速伸长。由此质子泵活性对植物的生长有直接的贡献,我们推测镧对木麻黄幼苗质膜质子泵活性的促进机制相似于生长素。对照观察表1所示木麻黄幼苗株高生长情况,各处理样品株高与质子泵活性对镧的响应呈现相一致的反应趋势,以这两组数据的均值作相关分析,二者呈显著正相关。由此可见,镧对质膜质子泵活性的促进是镧加速植物伸长生长的内在机制之一。

质膜质子泵的 C 末端是自抑制区,自抑制区的解除可以提高酶的活力<sup>[11]</sup>。质子泵 C 末端自抑制结构域的可能调节机制之一是通过与效应物结合,使质子泵多肽链的 C 末端区失去自抑制功能<sup>[10]</sup>。 $\text{La}^{3+}$  调节质膜质子泵活性的机制可推测为  $\text{La}^{3+}$  作为一种效应物与质子泵 C 末端结合,解除其自抑制功能,从而增强质子泵活力表达;亦或可能是  $\text{La}^{3+}$  首先与细胞膜上的磷脂部分优势结合<sup>[11]</sup>后,其结合物作为一种信使促使质子泵解除 C 末端自抑制作用,继而影响酶活化。至于在  $\text{La}^{3+}$  含量较高( $300 \sim 400 \text{ mg L}^{-1}$ )时质膜质子泵活性出现下降现象,可能是由于  $\text{La}^{3+}$  超过一定的浓度阈值时,成为一种离子胁迫,抑制了部分质子泵基因的表达。

表1 镧对酸雨胁迫下木麻黄幼苗生长的影响( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )

$\text{La}^{3+}/(\text{mg L}^{-1})$	0	50	100	200	300	400
株高(cm/株)	5.43 $\pm$ 0.49	5.66 $\pm$ 0.46	5.76 $\pm$ 0.39	6.32 $\pm$ 0.79	5.54 $\pm$ 0.38	5.31 $\pm$ 0.24
根长(cm/株)	3.09 $\pm$ 0.36	3.17 $\pm$ 0.39	3.22 $\pm$ 0.32	3.54 $\pm$ 0.34	3.28 $\pm$ 0.41	2.85 $\pm$ 0.26
鲜重(mg/株)	8.04 $\pm$ 0.1	8.36 $\pm$ 0.15	9.70 $\pm$ 0.36	9.90 $\pm$ 0.65	9.30 $\pm$ 0.15	7.82 $\pm$ 0.26

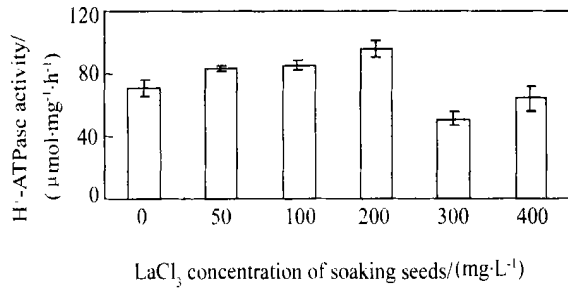


图1 镧对木麻黄幼苗质膜质子泵活性的影响

### 2.3 La<sup>3+</sup>对质膜钙泵活性的影响

酸雨胁迫下木麻黄幼苗质膜钙泵活性对不同镧浓度浸种的响应情况如图2所示:在50~400 mg L<sup>-1</sup>浓度范围,La<sup>3+</sup>对质膜钙泵的活性起抑制效应,且随着La<sup>3+</sup>浓度的增加,抑制作用越来越强。

Ca<sup>2+</sup>作为参与许多生命活动的第二信使,在传递胞内信息,调节细胞代谢等方面起着极为重要的作用。Ca<sup>2+</sup>的跨膜转运主要通过钙泵,Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向传递体和Ca<sup>2+</sup>通道3种传递体蛋白,前两者负责细胞内外流,后一种负责内流<sup>[12]</sup>。在生物系统中,稀土元素可表现出与钙离子相似的生理作用,并取代质膜外表面结合点的钙离子,阻塞钙离子的内流与外放<sup>[13]</sup>。已有实验证明:La<sup>3+</sup>抑制钙泵的活性<sup>[14]</sup>,稀土元素是细胞膜表面Ca<sup>2+</sup>拮抗剂和Ca<sup>2+</sup>通道阻断剂<sup>[15]</sup>,但其作用机制尚不清楚。

质膜钙泵作为高等植物细胞质膜上专一性主动钙转运系统,能直接水解ATP,主动转运Ca<sup>2+</sup>,对降低胞质Ca<sup>2+</sup>水平,维持细胞低钙稳态起着重要作用(胞质中自由Ca<sup>2+</sup>浓度约0.2 mol L<sup>-1</sup>)。钙调素可提高植物细胞质膜上钙泵的活性<sup>[1]</sup>。在本实验中,对于La<sup>3+</sup>抑制木麻黄幼苗质膜钙泵活性的原因有几个方面的可能解释:(1)木麻黄幼苗质膜质膜钙泵在酸雨的刺激下活性异常升高以抵抗胁迫,有实验表明在pH 4.5酸雨胁迫下生长的木麻黄幼苗质膜钙泵活性明显高于其在无酸雨胁迫条件下生长的活性,由于稀土的使用会使植物对酸雨的敏感性减弱<sup>[3]</sup>,因此La<sup>3+</sup>对Ca<sup>2+</sup>的替代与补充明显减弱了钙离子泵对酸雨的敏感性,使质膜钙泵活性恢复到较低水平。(2)由于La<sup>3+</sup>是质膜表面Ca<sup>2+</sup>拮抗剂,La<sup>3+</sup>在质膜上竞争性地结合到Ca<sup>2+</sup>结合位点后,堵塞细胞的Ca<sup>2+</sup>内流和外放,影

响了钙信号的传递,从而阻碍Ca<sup>2+</sup>绑定的蛋白质如钙调素的活化,进而抑制了钙泵活性;(3)Ca<sup>2+</sup>与膜的离解常数较La<sup>3+</sup>的大,La<sup>3+</sup>取代Ca<sup>2+</sup>在质膜上的键合位置后,因La<sup>3+</sup>电荷比Ca<sup>2+</sup>大,La<sup>3+</sup>对Ca<sup>2+</sup>的取代行为会导致膜表面电荷密度的改变,造成膜电位的变化,而间接影响了质膜钙泵活性。(4)酸雨会使膜脂发生过氧化等致伤行为<sup>[2]</sup>,酸雨胁迫影响了细胞膜膜脂的结构和功能。有研究表明:随着La<sup>3+</sup>浓度的增加,La<sup>3+</sup>对去脂纯化的质膜钙泵的抑制作用逐渐增大<sup>[6]</sup>。本实验的研究结果与之一致,酸雨胁迫下生长的木麻黄幼苗其细胞膜脂环境的不正常变动也使La<sup>3+</sup>降低质膜钙泵的活性,且在La<sup>3+</sup>为50~400 mg L<sup>-1</sup>浓度范围浸种后,随La<sup>3+</sup>浓度的增加,其降低钙泵活性作用越强。

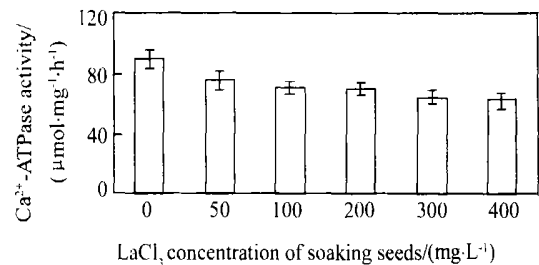


图2 镧对木麻黄幼苗质膜钙泵活性的影响

## 3 结 论

1. 木麻黄种子经LaCl<sub>3</sub> (0~400 mg L<sup>-1</sup>)浸种处理8 h后,胁迫培养于pH 4.5模拟酸雨条件下,其幼苗的株高、根长、鲜重及质膜质子泵活性受低浓度La<sup>3+</sup>浸种促进,在200 mg L<sup>-1</sup>处理达到峰值,而高浓度处理后则表现出抑制效应。幼苗质膜质子泵活性与株高具有显著正相关关系,镧对质膜质子泵活性的促进是镧加速植物伸长生长的内在机制之一;适宜浓度的镧通过提高质子泵活性,能减缓细胞胞质酸化,具有维持酸雨胁迫下生长的植物胞质环境稳定的间接作用。

2. La<sup>3+</sup>抑制幼苗质膜钙泵的活性,且随着La<sup>3+</sup>浓度的增加,抑制作用越来越强。可能La<sup>3+</sup>对Ca<sup>2+</sup>的替代减弱了钙离子泵对酸雨的敏感性,使钙调素活化受阻,使膜电位变化,或是酸雨造成的膜脂环境不正常等原因导致质膜钙泵活性下降。

3. 从抗酸雨促生长的情况看,木麻黄经镧浸种8 h的最适宜浓度为50~200 mg L<sup>-1</sup>。

## 参考文献:

- [1] Buchanan Bob B, Wilhelm Gruissem, Jones Russell L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants [M]. Beijing: Science Press, 2002, 110, 121, 123, 831, 832, 833.
- [2] 陈登云, 庄峙厦, 王晓如. 厦门酸雨的区域分布及降雨过程分析 [J]. 环境科学研究, 1994, 7(6): 26.
- [3] Yan Chongling, Hong Yetang, Lin Peng, et al. Accumulation of rare earth elements in spinach and soil under condition of using REE and acid rain stress [J]. Journal of Rare Earths, 2002, 20(2): 133.
- [4] Zheng HL, Zhao ZQ, Zhang C G, et al. Changes in lipid peroxidation, the redox system and ATPase activities in plasma membranes of rice seedling roots caused by lanthanum chloride [J]. BioMetals, 2000, 13: 157.
- [5] 章文华, 刘良友, 於丙军, 等. 大麦根液泡膜微囊依赖 ATP 质子泵测定技术的改进 [J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(4): 282.
- [6] 李新民, 倪嘉瓚, 王海英, 等. 稀土对肌质网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的影响 [J]. 生物化学杂志, 1995, 11(3): 281.
- [7] Ohnishi T R S Call, Mayer M L. An improved assay of inorganic phosphate in the presence of extralabile phosphate compounds: Application to the ATPase assay in the presence of phosphocreatine [J]. Anal. Biochem., 1975, 69: 261.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal. Biochem., 1996, 72: 248.
- [9] Pierre Morsomme, Marc Boutry. The plant plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase: Structure, function and regulation [J]. Biochimica et Biophysica Acta., 2000, (1465): 1.
- [10] Palmgren M G. Regulation of plant plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase activity [J]. Physiol. Plant., 1991, 83: 316.
- [11] 蔡继宝, 王平, 黄碧霞, 等. 镧在细胞膜上键合形态研究 [J]. 中国稀土学报, 2001, 19(2): 191.
- [12] Douglas S B. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling [J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1995, 46: 95.
- [13] Rai M, Yang S Q, McClain C, et al. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats [J]. Am. J. Physiol., 1996, 270: G909.
- [14] Peter Gräber, Weiler Elmar W. ATP-driven  $\text{Ca}^{2+}$  transport in sealed plasma membrane vesicles prepared by aqueous two-phase partitioning from leaves of *Commelina communis* [J]. Physiol. Plant, 1989, 75: 469.
- [15] Terry B T, Findlay G P, Tyerman S D. Direct effects of  $\text{Ca}^{2+}$ -channel blockers on plasma membrane cation channels of *Amaranthus tricolor* protoplasts [J]. J. Exp. Bot., 1992, 43(256): 1457.

## Response of Ion-Pumping ATPase Activities of Plasma Membrane Vesicles Isolated from *Casuarina equisetifolia* to Lanthanum under Acid Rain

Li Yuhong<sup>1,2</sup>, Yan Chongling<sup>1\*</sup>, Liu Jingchun<sup>1</sup>, Chen Yinghua<sup>1</sup>, Hu Jun<sup>1</sup>, Xue Bo<sup>1</sup> (1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Biology, Quanzhou Normal College, Quanzhou 362000, China)

**Abstract:** The response of the growth and the ion-pumping ATPases activities of plasma membrane (PM) vesicles isolated from *Casuarina equisetifolia* to lanthanum under artificial acid rain (pH 4.5) were studied. The results show that the height and length of roots, fresh weight and PM pumping-ATPase activities of *Casuarina equisetifolia* seedlings increase by treatments of soaking seeds in  $\text{LaCl}_3$  solutions with lower concentrations, and those can reach their peak values by treating with  $200 \text{ mg L}^{-1} \text{La}^{3+}$ . However, in comparison with the CK, those are inhibited by the higher  $\text{La}^{3+}$  concentrations. PM  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase activity is

inhibited with the treatments of  $\text{La}^{3+}$ . The results also reveal that the  $\text{H}^{+}$ -pumping ATPase activity and the growth of cell enlarge have a remarkable positive correlativity, and  $\text{La}^{3+}$  activating  $\text{H}^{+}$ -pumping ATPase can facilitate plant growth.  $\text{La}^{3+}$  also can alleviate cytosolic acidification of plant under acid rain stress and indirectly maintain the stability of intracellular environment. In order to resistant to acid rain and accelerate the growth of *Casuarina equisetifolia*, and the suitable range of  $\text{La}^{3+}$  concentrations soaking seeds for 8 h is  $50 \sim 200 \text{ mg L}^{-1}$ .

**Key words:** ecology; PM ion-pumping ATPase; lanthanum; *Casuarina equisetifolia*; acid rain; rare earths