

动物源性激素 DHEA 对拟南芥植株根系生长发育的影响

杜冠魁¹, 周思慧², 朱丽娣², 李 栋³, 肖 曼¹

(1.海南医学院生物化学教研室, 海南 海口 571001; 2.海南医学院理学院, 海南 海口 571001;
3.海南医学院生物学教研室, 海南 海口 571001)

摘要:用DHEA处理拟南芥种子,观察经DHEA处理后拟南芥幼苗根系的生长状态,并研究其体内氧化还原状态的变化。结果表明:经DHEA处理后,拟南芥幼苗的主根缩短了20%,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)酶活降低,过氧化氢(H₂O₂)、丙二醛(MDA)及还原性谷胱甘肽(GSH)含量升高,抗氧化酶总超氧化物歧化酶(T-SOD)和过氧化物酶(POD)活力均增强,但过氧化氢酶(CAT)活力下降。说明动物源性激素DHEA在植物中通过抑制G6PD的酶活,导致植株内的氧化还原状态发生变化,从而影响了主根的生长能力。

关键词:DHEA; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 抑制; 氧化状态

中图分类号:637.9

文献标识码:A

文章编号:1004-874X(2013)03-0029-03

Effect of DHEA on the growth and development of root system of *Arabidopsis* seedling

DU Guan-kui¹, ZHOU Si-hui², ZHU Li-di², LI Li³, XIAO Man¹

(1. Department of Biochemistry, Hainan Medical College, Haikou 571001, China;
2. College of Science, Hainan Medical College, Haikou 571001, China;
3. Department of Biology, Hainan Medical College, Haikou 571001, China)

Abstract: The *Arabidopsis* seeds were treated with DHEA to observe the alteration of root elongation and redox state of *Arabidopsis* seedlings. The results showed that the primary root length was 80% of the control and the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity decreased; the H₂O₂, MDA and GSH contents increased; the activity of T-SOD and POD was improved, although CAT activity reduced. These results suggested that the activity of G6PD was inhibited by DHEA, resulted in oxidative stress and inhibition of primary root growth in *Arabidopsis* seedlings.

Key words: DHEA; glucose-6-phosphate dehydrogenase; inhibition; redox state

脱氢表雄酮(DHEA)是一种C₁₉类固醇激素,主要由肾上腺皮质网状带分泌^[1-2]。目前,DHEA作为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)的抑制剂应用于实验室研究^[3]。G6PD是戊糖磷酸途径的限速酶,主要在细胞内生成还原力NADPH^[4]。NADPH可用于合成脂肪酸或将氧化型谷胱甘肽(GSSG)转变成还原型谷胱甘肽(GSH)。GSH在活性氧解毒过程中具有重要作用^[5]。植物细胞中,活性氧是一种重要的信号分子,可通过改变氧化还原状态参与多种细胞反应,如细胞程序性死亡、生长发育、激素信号转导以及各种生物或非生物环境胁迫的应答^[6]。本研究采用动物源性激素DHEA处理拟南芥种子,观察经DHEA处理后拟南芥幼苗根系的生长情况,以了解DHEA在植物中是否也参与了G6PD酶活的抑制,从而导致细胞内的氧化还原状态发生改变,进而影响植物的正常生长。

收稿日期:2012-12-26

基金项目:2011年海南医学院科研培育基金(HY2010-007)

作者简介:杜冠魁(1983-),男,博士,讲师,E-mail: dugk@163.com

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为野生型(Col-0 type)拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子,编号CS22907,2012年购自英国拟南芥生物资源中心(*Arabidopsis Biology Resource Center*, ABRC)。

总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、组织过氧化物酶(POD)、过氧化氢(H₂O₂)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。DHEA、NBT及DCFH-DA(2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐)购自Sigma公司。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的处理与培养 将拟南芥种子用2%NaClO消毒20 min,4℃下春化处理48 h,然后将其接种到含有50 μmol/L DHEA的Johnson培养基中,同时设置对照,即将其接种到含有50 μmol/L酒精的培养基中。培养基平板用Parafilm封口,竖直放在植物培养箱中,使拟南芥的根可以沿着培养基表面生长。培养条件为:温度22~24℃,16 h光照、8 h黑暗,湿度60%~70%,光强150 μmol/s·m²,共

培养 5 d。5 d 后观察植株的表型并拍照,另外对各项生化指标进行测定。试验设 2 个处理,6 次重复,每个重复 11 颗种子。

1.2.2 抗氧化酶酶活及 H_2O_2 含量测定 SOD、CAT、组织 POD、GSH-PX 酶活和 MDA、 H_2O_2 含量的测定按照试剂盒的说明进行操作。

1.2.3 显微观察 用奥林巴斯荧光显微照相系统和 LEICA 立体解剖显微镜观察根尖淀粉粒、超氧自由基及 H_2O_2 染色情况。淀粉粒采用 I₂-KI 染色,超氧自由基采用 NBT 染色, H_2O_2 采用荧光染料 DCFH-DA 染色。

利用 SARS 13 软件对试验数据进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 DHEA 对 G6PD 酶活及根系生长的影响

经 50 $\mu\text{mol/L}$ DHEA 处理后,拟南芥幼苗根系的生长受到显著抑制,其中主根缩短 20%,子叶生长变缓(图 1,封二)。对拟南芥幼苗的抗氧化物酶活进行测定,发现经 DHEA 处理后,拟南芥幼苗体内的 G6PD 酶活水平显著降低,约为对照植株的 55%(图 2)。这些结果表明,动物源性 DHEA 可以抑制植株的 G6PD 酶活,进而影响植株的正常生长。

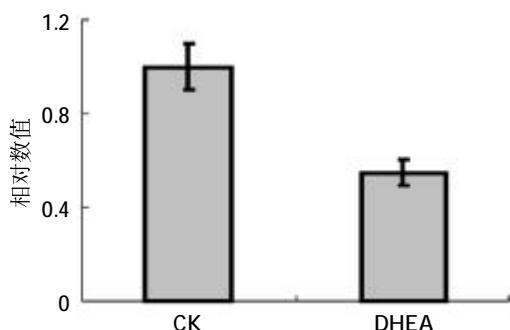


图 2 DHEA 处理对幼苗中 G6PD 酶活的影响

2.2 DHEA 对活性氧及抗氧化物酶的影响

从图 3 可以看出,经 DHEA 处理后,拟南芥体内的 H_2O_2 含量显著升高(升高了 48%),MDA 水平也有所提高(提高了 22%)。同时检测到拟南芥的抗氧化体系相关酶(CAT, SOD 和 POD) 的酶活及 GSH 水平提升了 10%~15%(P<0.05)。这些结果表明,经 DHEA 处理后,拟南芥体内的氧化水平提升(图 4),而植株通过提高其

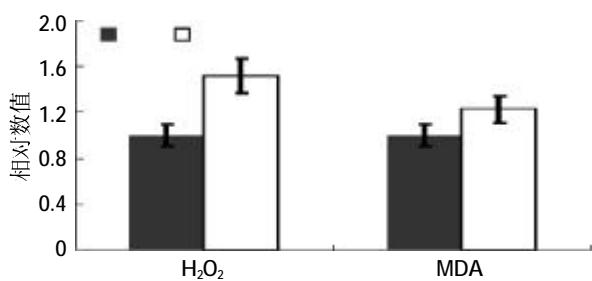


图 3 拟南芥体内 H_2O_2 及 MDA 的变化情况

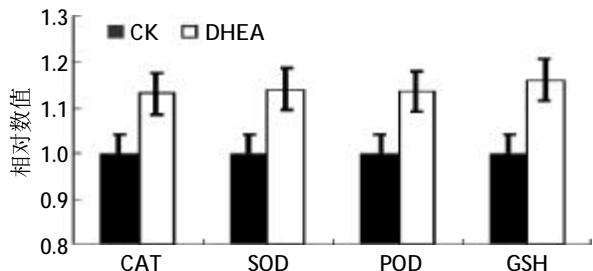


图 4 拟南芥体内与抗氧化相关的物质及酶活的变化情况

他的抗氧化酶酶活及物质含量来补偿 G6PD 酶活的缺失。

2.3 DHEA 对拟南芥根尖结构及根系活性氧分布的影响

从图 5(封二)可以看出,经 DHEA 处理后,拟南芥的主根直径增大。用 I₂-KI 染色检测根尖的淀粉粒,发现经 DHEA 处理的拟南芥根尖的淀粉粒构型紊乱。用 NBT 检测根尖超氧自由基的分布,发现对照拟南芥根尖的超氧自由基位于主根伸长区,经 DHEA 处理的拟南芥根尖的超氧自由基分布于整个主根根尖。用 DCFH-DA 检测 H_2O_2 的分布,发现对照拟南芥根尖的 H_2O_2 分布于根冠及分生区,经 DHEA 处理的拟南芥根尖的 H_2O_2 在分生区及静止中心呈弥散状态。这些结果表明,DHEA 处理会导致主根根尖结构及活性氧分布发生改变。

3 讨论

DHEA 主要由肾上腺皮质网状带分泌,性腺如睾丸、卵巢也有少量分泌,在循环血液中主要以硫化物形式存在(DHEA-S)^[1]。DHEA 是性激素合成过程的中间产物,经靶器官调节,能转化为雌激素、雄激素、孕激素和皮质酮等其他激素。DHEA 被认为是 G6PD 的非竞争性抑制剂,通常用于动物试验及肿瘤细胞的试验中。RNAi 抑制 G6PD 的表达,导致 Raji 细胞的增殖速度减慢,DHEA 处理 Raji 细胞能达到相同的效果^[2]。G6PD 是一个保守的看家基因,其与 NADP⁺作用位点的氨基酸残基是极度保守的。本试验利用 DHEA 处理拟南芥种子,拟南芥的 G6PD 酶活同样被强烈抑制。拟南芥的 G6PD 有 6 个同源基因共同行使功能。经 50 $\mu\text{mol/L}$ DHEA 处理后,植株的 G6PD 酶活下降了 40%~45%,这与抑制肿瘤细胞 G6PD 酶活的处理浓度和结果相似,表明 DHEA 的作用位点可能也具有保守性。在本研究中,当植物的 G6PD 酶活被抑制时, H_2O_2 水平及抗氧化酶活力均增高,这表明经 DHEA 处理后,拟南芥细胞内的氧化还原状态发生改变。

植株体内的活性氧影响着组织的生长速度。植物的生长主要由两个顶端分生区来决定,分别为 RAM(根顶端分生区,Root Apical Meristem) 和 SAM (叶顶端分生区,Shoot Apical Meristem)^[3]。在 RAM 中,其活性氧浓度显著高于其他区域,必要的活性氧可以促进细胞的生长增殖,但是过高的活性氧会导致细胞发生凋亡。精调调控分生

区的活性氧浓度可以影响植株的生长。植株在逆境胁迫下的生长往往会诱导分生区的活性氧浓度发生变化,从而改变根系构型^[10]。GSH 被认为是体内最重要的活性氧清除剂,GSSG 与 GSH 的比值被认为与植物的生长状况相关。因此,磷酸戊糖途径供应的 NADPH 对于 GSH 浓度的维持是至关重要的。G6PD 是保守基因,其表达水平变动幅度较小。有报道认为,G6PD 可以被 GSK3 磷酸化,表明 G6PD 在蛋白水平上可以被调节^[11]。但其在逆境胁迫下的功能尚未知。通过调节 G6PD 酶活,可以模拟一些逆境胁迫下的植株生长状况,如缺磷及高盐所导致的植株地上部生长减小,地下部根系被抑制等状况。因此,我们推测,G6PD 可能通过影响活性氧的分布及浓度变化来影响植株的抗逆性。

参考文献:

- [1] Kumar P, Taha A, Sharma D, et al. Effect of dehydroepiandrosterone(DHEA) on monoamine oxidase activity, lipid peroxidation and lipofuscin accumulation in aging rat brain regions [J]. Biogerontology,2008,9(4):235-246.
- [2] Schwartz A G, Pashko L L. Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity[J].Ageing Res Rev, 2004, 3(2):171-187.
- [3] Biaglow J E, Ayene I S, Koch C J, et al. G6PD deficient cells and the bioreduction of disulfides: Effects of DHEA, GSH depletion and phenylarsine oxide[J].Biochem Biophys Res Commun,2000,273(3):846-852.
- [4] Beutler E. G6PD deficiency [J]. Blood, 1994,84(11):3613-3636.
- [5] Melillo M T, Leonetti P, Bongiovanni M, et al. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato -root -knot nematode interactions[J].New Phytol,2006,170(3):501-512.
- [6] Mehta A, Mason P J, Vulliamy T J. Glucose -6 -phosphate dehydrogenase deficiency [J].Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 2000,13(1):21-38.
- [7] Fischer L R, Glass J D. Oxidative stress induced by loss of Cu,Zn -superoxide dismutase(SOD1) or superoxide -generating herbicides causes axonal degeneration in mouse DRG cultures [J].Acta Neuropathol, 2009,119(2):249-259.
- [8] Zhang D T, Hu L H, Yang Y Z. Effect of glucose -6 -phosphate dehydrogenase on intracellular gsh level in Raji cells during oxidative stress[J].Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, 2007,23(4):487-490.
- [9] Yadav R K, Girke T, Pasala S, et al. Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009,106(12): 4941-4946.
- [10] Dunand C, Crèvecoeur M, Penel C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in Arabidopsis root and their influence on root development:Possible interaction with peroxidases [J]. New Phytologist, 2007,174(2):332-341.
- [11] Hofmann N R The GSK3-type kinase ASK α targets glucose-6-phosphate dehydrogenase to mediate oxidative stress responses in Arabidopsis[J].The Plant Cell Online, 2012,24(8):3380-3392.

(上接第 17 页)

- 中国林副特产,2010,105(2):13-15.
- [11] Bhatia N P, Bhatia P, Ashwath N. Ex vitro rooting of micropropagated shoots of Stackhousia tryonii [J]. Biologia Plantarum,2002,45(3):441-444.
- [12] 肖尊安,熊红.不定根发生机理的研究进展[J].生物技术通报,2002,15(2):31-34.
- [13] 李杨瑞.甘蔗组织中过氧化物酶活性及其与生长和工艺成熟的关系初探[J].广西农学院学报,1990,9(1):13-18.
- [14] 徐继忠,陈四维.桃硬枝插条内源激素(IAA,ABA)含量变化对生根的影响[J].园艺学报,1989,16(4):275-278.
- [15] 李胜,武季玲,李唯,等.初代和继代培养葡萄试管苗的内源 IAA、ZR_s 和 ABA 含量变化及其与生根的关系[J].植物生理学通讯,2005,41(3):286-288.
- [16] 姚永宏,吴全,李忠林,等.茶树插穗生根过程中内源激素动态变化[J].西南农业大学学报(自然科学版),2005,27(6):795-798.
- [17] 王清民,彭伟秀,张俊佩,等.核桃试管嫩茎生根的形态结构及激素调控研究[J].园艺学报,2006,33(2):255-259.
- [18] 于雪飞,白卉,王洪星.4 种内源激素在中美山杨组培生根过程中的变化[J].林业科技,2009,34(2):5-7.
- [19] 詹亚光,杨传平,金贞福,等.白桦插穗生根的内源激素和营养物质[J].东北林业大学学报,2001,29(4):1-4.
- [20] Kevers G C, Hausman J F, Berthon J Y, et al. Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots[J].Agronomie,1992,12(10): 757-765.
- [21] 常永健,陈四维,马宝焜,等.苹果茎尖培养中植物激素与不定根形成关系的研究[J].河北农业大学学报,1991,14(4):1-5.
- [22] 白卉.中美山杨杂种的组织培养以及几种植物生理指标对试管苗生根的影响[D].哈尔滨:东北林业大学,2007.
- [23] Hausman J F, Kevers C, Gaspar T. Putrescine control of peroxidase activity in the inductive phase of rooting in poplar shoots in vitro, and the adversary effect of spermidine [J]. Journal of Plant Physiology, 1995,146(5-6):681-685.
- [24] 韦素铃.白花泡桐根分化过程中过氧化物酶、IAA 氧化酶和过氧化氢酶的变化[J].广西农业科学,2001,8(2):135-137.
- [25] Mato M C, Rua M L, Ferro E. Changes in levels of peroxidase and phenolic root formation in vatic cultured in vitro [J].Physiol Plant,1998,72(1):84-88.