

(11): 2394-2400.

[5] Meng D S, Wang S L. Progress in study of quercetin and its derivatives [J]. *J China Pharm* (中国药房), 2000, 11(5): 232-233.

[6] Bao T Z, Wang Q L, Liao Z H. Recent progress of quercetin research [J]. *J Jiangxi Coll Tradit Chin Med* (江西中医学院学报), 1998, 10(2): 90-91.

[7] Zhou B, Zhang J P, Hu Z L, et al. Effects of Ro 31-8220 on smooth muscle cell proliferation induced by fibrinogen degra-

ation products [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1997, 18(5): 463-465.

[8] Hu Z L, Zhang J P, Yi Y H, et al. Effect of esculentoside H on release of tumor necrosis factor from mouse peritoneal macrophages [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1993, 14(6): 550-552.

[9] Zhang J P, Qian D H, Qi L H. Effects of cantharidin on interleukin-2 and interleukin-1 production in mice *in vivo* [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1992, 13(3): 263-264.

蜜环菌激发子诱导猪苓细胞活性氧产生的信号途径

夏洪燕, 郭顺星*

(中国医学科学院 中国协和医科大学 药用植物研究所, 北京 100094)

摘要: 目的 阐明蜜环菌激发子诱导猪苓细胞活性氧的产生机制。方法 用 Luminol 化学发光法测定活性氧产生量。结果 在猪苓细胞活性氧产生过程中, 含乙二醇双(β-氨基)四乙酸(EGTA)的缺钙培养基能抑制其活性氧产生, 而加入钙, 则可起促进作用。钙离子载体 A 23187 单独可诱导含钙介质活性氧的产生, 说明活性氧的产生有钙离子的参与。蛋白丝酶抑制剂苯甲烷碘酰氟(PMSF)可以抑制活性氧形成。磷脂酶 C(PLC)的抑制剂硫酸新霉素及磷酸肌醇磷酸酶的抑制剂氯化锂均可促进活性氧的产生。结论 猪苓细胞活性氧的产生与 Ca²⁺、蛋白磷酸化有关。

关键词: 猪苓; 活性氧; 激发子; 钙离子

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)03-0249-03

Signal transduction pathway of active oxygen species in *Polyporus umbellatus* induced by elicitor from *Armillaria mellea*

XIA Hong-yan, GUO Shun-xing

(Institute of Medicinal Plant Development, CAMS & PUMC, Beijing 100094, China)

Key words: *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr.; active oxygen species (AOS); elicitor; Ca²⁺

活性氧(H₂O₂, O₂^{·-}, ·OH)是生物在有氧条件下产生的毒性氧化剂^[1]。动物吞噬细胞如多形核白细胞能产生活性氧(O₂^{·-}及H₂O₂)^[2],且其产生的活性氧在抵御病原菌侵染过程中起重要的作用。Schwack等^[3]认为不同生物之间在建立共生关系初期也会引起防卫反应,但这种防卫反应能够被精确地控制,以允许两种生物建立有效的共生体系。来源于外生菌根真菌 *Amanita muscaria* 和 *Hebeloma crustuliniforme* 的激发子处理云杉细胞,发现同来源于病原真菌 *Heterobasidion annosum* 激发子处理一样,均可诱导活性氧的产生。关于活性氧产生的信号机制认为有Ca²⁺及蛋白磷酸化的参与。但关于两种真菌共生初期是否伴随着活性氧的产生及其产生的机制和意义尚未见报道。猪苓、蜜环菌属特殊的菌

与菌共生关系,对两者共生机制的研究仅限于解剖学,作者曾报道来源于蜜环菌的激发子可以诱导猪苓活性氧产生^[4],本实验旨在探讨其活性氧产生的机制,从而为阐明猪苓与蜜环菌的共生机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源:猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 菌株由本所真菌室提供。

1.2 蜜环菌激发子:参考文献方法制备^[4]。

1.3 猪苓菌丝细胞活性氧释放量的测定

1.3.1 将培养3周的猪苓菌丝细胞用试验介质洗涤3遍,试验介质组成:2%蔗糖,1 mmol/L NaH₂PO₄, 1 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 1 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L CaCl₂, 25 mmol/L KNO₃, 5 mmol/L 2-[N-吗啡]乙磺酸,用NaOH调pH至

* 收稿日期:2002-06-11

作者简介:夏洪燕(1973—),2001年毕业于中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所,获理学博士学位。主要从事药用真菌生物技术研究工作。

* 通讯作者 Tel: (010) 62899729 E-mail: sxguo@hotmail.com

7. 0。将洗涤后的菌丝细胞按 0.5 g/mL 转至相同介质中, 25 , 120 r/min 振荡培养 90 min 后加入蜜环菌激发子, 终浓度相当于 10.8 mg/mL 菌丝。

1. 3. 2 Luminol 化学发光法测定活性氧: 仪器为 KH463A 自动定标器。参照 Glazener 等^[5] 配制 Luminol 母液。反应体系组成: 1. 5 mL 猪苓悬浮液, 200 μL 激发子, 400 μL 20 mmol/L K₃[Fe(CN)₆], 260 μL 70 μmol/L Luminol。在加入激发子后 90 min 测定活性氧产生量。去 Ca²⁺ 试验时, 培养液中不含 Ca²⁺, 另含 1 mmol/L EGTA。A23187, EGTA、硫酸新霉素、CaCl₂ 与激发子同时加入, 终浓度分别为 20 μmol/L, 1 mmol/L, 3. 2 μmol/L 和 1. 5 mmol/L, 氯化锂在加入激发子前 30 min 内加入。图表中 E 指激发子。

2 结果与分析

2. 1 Ca²⁺, EGTA 和 A23187 对猪苓细胞活性氧产生的影响: EGTA 可以螯合基质中的 Ca²⁺, 向无钙的猪苓细胞中加入 EGTA (终浓度 1 mmol/L), 可以减少但不能完全抑制活性氧的产生, 而外加 CaCl₂ 则可以提高活性氧释放量 (图 1), 说明胞外 Ca²⁺ 内流可能参与了活性氧的释放。

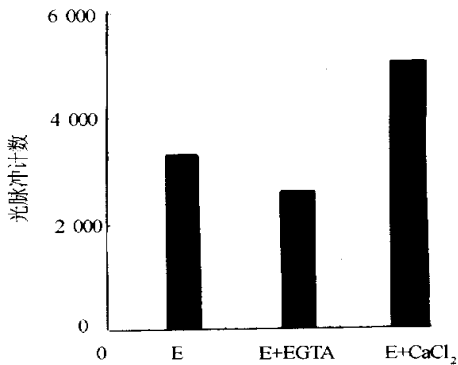
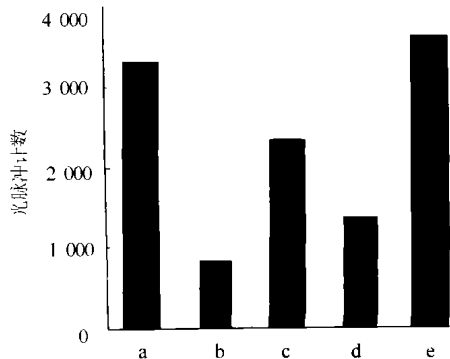


图 1 EGTA 和 CaCl₂ 对猪苓细胞活性氧产生的影响

Fig. 1 Effect of EGTA and CaCl₂ on AOS in *G. umbellata*

A23187 是电压依赖型的 Ca²⁺ 载体, 可以促使胞外 Ca²⁺ 内流。从图 2 可以看出单独加入 A23187 可以诱导活性氧产生, 但产生的量较单独加入激发子少, 而 A23187 与激发子同时加入, 在含 Ca²⁺ 悬浮细胞中活性氧积累量基本与单加激发子持平。另外, 无论是单独加入 A23187, 还是与激发子同时加入, 含 EGTA 的悬浮细胞均较含 Ca²⁺ 的悬浮细胞中产生活性氧少。

2. 2 PMSF 对猪苓活性氧产生的影响: 苯甲磺酰氟 (PMSF) 是蛋白丝酶的特异性抑制剂, 向激发子处理后的猪苓菌丝细胞中加入 PMSF 可以抑制活



a-E b-A23187+ EGTA c-A23187+ CaCl₂
d-E+ A23187+ EGTA e-E+ A23187+ CaCl₂

图 2 A23187 对猪苓细胞活性氧产生的影响

Fig. 2 Effect of A23187 on AOS in *G. umbellata*

性氧产生, 抑制率约为 20%。

2. 3 硫酸新霉素和氯化锂对猪苓细胞活性氧释放的影响: 用 3. 2 μmol/L 硫酸新霉素 (磷酸酶 C 的抑制剂) 处理猪苓细胞后, 可以提高活性氧释放量 (图 3)。加入磷酸肌醇磷酸酶的抑制剂氯化锂也可以提高活性氧释放, 且活性氧释放量随氯化锂浓度增加而增大 (图 4)。

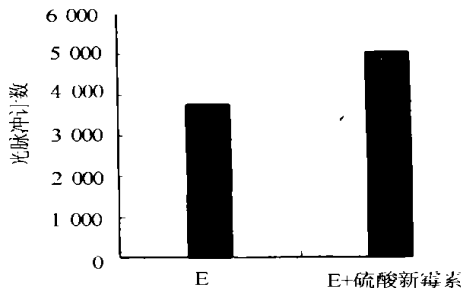


图 3 硫酸新霉素对猪苓活性氧释放的影响

Fig. 3 Effect of neomycin sulphate on AOS in *G. umbellata*

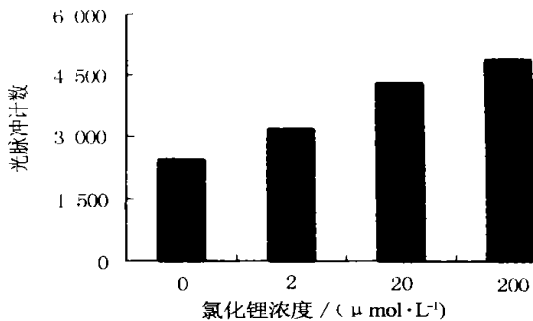


图 4 氯化锂对猪苓活性氧释放的影响

Fig. 4 Effect of LiCl on release of AOS in *G. umbellata*

3 讨论

3. 1 Ca²⁺ 及蛋白磷酸化与活性氧产生的关系: 用 1 mmol/L EGTA 处理猪苓细胞可以减少但不能完全抑制活性氧的产生, 而外加 1. 5 mmol/L CaCl₂, 则

可以增加活性氧释放量,说明在活性氧产生过程有钙离子的参与。用钙离子载体 A23187 进一步证实了上述结论。向猪苓细胞中单独加 A23187 可以诱导活性氧产生,而 A23187 与激发子同时加入与单独加激发子相比活性氧产生水平相当,这与 Shawacke 等^[3]报道结果相一致:即用 A23187 或 A23187 与激发子共同处理云杉细胞都可诱导活性氧的释放。

在生物系统中,蛋白质的磷酸化与脱磷酸化协同作用,共同完成胞内信号传递^[6]。应用磷酸酶及蛋白激酶的抑制剂是研究磷酸化与生物效应常用的方法,如激酶抑制剂阻碍特定的反应,则磷酸酶抑制剂可以激活该反应^[7]。PMSF 是蛋白酶的抑制剂,可以抑制蛋白的脱磷酸化,从而使被蛋白激酶激活的蛋白保持磷酸化状态。不同蛋白酶抑制剂处理不同细胞所得结果也不同,用酵母激发子或带无毒基因的 *Pseudomonas syringae* pv *glycine* 处理大豆悬浮细胞,外加 PMSF 可以加强氧化迸发^[8]。而蛋白酶 chymotrypsin 特定的抑制剂,可以抑制被激活的人类多形核白细胞^[9,10]。用不同的蛋白酶抑制剂处理豚鼠腹膜巨噬细胞,发现 PMSF、3,4-双氯异香豆素、*n*-甲苯磺酰-L-氨基联苯氯甲基酮、亮异蛋白酶肽对活性氧的产生无影响,而 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟可以抑制 $O_2^{\cdot-}$ 的产生,认为 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟可能直接阻止 p^{47phox} 或 p^{67phox} 亚单位与催化亚单位 cytb59 的结合,从而抑制 $O_2^{\cdot-}$ 的产生。本实验用 PMSF 处理猪苓细胞可以抑制 $O_2^{\cdot-}$ 的产生,其机制可能类似于 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟对豚鼠腹膜巨噬细胞产生 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制。

3.2 肌醇磷脂系统与活性氧释放的关系: Ca^{2+} 被认为参与生物系统的防卫反应,胞内 Ca^{2+} 浓度增加来源于胞外 Ca^{2+} 内流及胞内钙库的释放。位于质膜内侧的磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂) 可在磷脂酶 C (PLC) 的催化下水解产生 IP₃和 DG,其中 IP₃可以引起胞内钙库总动员,促使钙库释放钙,从而提高胞质钙浓度,引发生理效应。硫酸新霉素通过抑制磷脂酶 C 活性而抑制 PIP₂水解为 IP₃,从而导致细胞质

中 Ca^{2+} 浓度减少。而氯化锂则可抑制从磷酸肌醇向磷脂酰肌醇转变,阻断磷酸肌醇的循环,从而影响胞内 Ca^{2+} 库释放。一般说来,硫酸新霉素和氯化锂可以抑制动物、植物细胞活性氧的释放,对猪苓细胞所做的实验表明硫酸新霉素和氯化锂可以促进活性氧的释放,说明猪苓细胞中活性氧的释放途径与动物和植物细胞不同。

蜜环菌与猪苓属特殊的真菌与真菌的共生关系。蜜环菌激发子诱导猪苓活性氧产生可能象动植物一样可以激活防卫基因表达并限制蜜环菌入侵范围的扩大,对此仍待深入研究。

References:

- [1] Machida K, Tanaka T, Fujita K I, *et al.* Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180: 4460-4465.
- [2] Karnovsky M L, Badwey J A. Determinants of the production of active oxygen species by granulocytes and macrophages [J]. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1983, 21: 545-553.
- [3] Schwacke R, Hager A. Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca^{2+} and protein-kinase activity [J]. *Planta Med*, 1992, 187: 136-141.
- [4] Xia H Y, Guo S X. Generation and variety of active oxygen species in the hyphae of *Grifola umbellata* [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 2000, 19: 576-579.
- [5] Glazener J A, Orlandi E W, Hammon G L, *et al.* An improved method for monitoring active oxygen in bacteria-treated suspension cells using luminol-dependent chemiluminescence [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1991, 39: 123-133.
- [6] Sun D Y, Guo Y L, Ma L G. *Cell Signal Transduction* (细胞信号传导) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [7] Raz V, Fluhr R. Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants [J]. *Plant Cell*, 1993, 5: 523-530.
- [8] Guo Z J, Lamb C, Dixon R A. Potentiation of the oxidative burst and isoflavonoid phytoalexin accumulation by serine protease inhibitors [J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 1487-1494.
- [9] Frankel K, Chrzan K, Ryan C A, *et al.* Chymotrypsin-specific protease inhibitors decrease H₂O₂ formation by activated human polymorphonuclear leukocytes [J]. *Carcinogenesis*, 1987, 8: 1207-1212.
- [10] Diatchuk V, Lotan O, Koshkin V, *et al.* Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 13293-13301.

葡 萄 籽 提 取 物

电话: 0086-022-26721040; 26723305; 26737125 传真: 0086-022-26721041

网址: <http://www.jf-natural.com>

Tianjin Jianfeng Natural Product R & D Co., Ltd

天津尖峰天然产物公司