

植物胞外钙调素与信号转导

廖星昊 赵洁*

(武汉大学生命科学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072)

摘要 植物体需要构建复杂的信号转导体系以调节自身的生长发育过程并适应外界环境的变化, 这种功能的实现需要胞内和胞外诸多信号分子的参与, 胞外钙调素的发现使人们开始相信植物细胞外多肽信使的存在。胞外钙调素的生物学功能极其广泛, 几乎涉及到植物生长发育的各个阶段, 其信号转导途径是目前研究得最多也是最为清楚的方面, 异三聚体G蛋白、磷脂酶C (PLC) - 肌醇三磷酸(IP₃)- 肌醇三磷酸受体(IP₃R)信号通路、活性氧和Ca²⁺通道之间直接或间接的相互作用是胞外钙调素信号转导的核心。

关键词 植物; Ca²⁺; 胞外钙调素; 信号转导

所有的植物细胞都拥有众多的信号转导途径以调节细胞的生长分化、营养吸收、物质代谢等生命活动, 使其能更好地适应周围环境, 而这些信号途径相互之间的联系也极其复杂, 许多重要的信号分子, 如Ca²⁺、H⁺、脂类、环鸟苷酸(cGMP)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)等, 参与了这些复杂的信号网络体系, 从而使植物体能快速而有效地应对外界刺激^[1]。但是, 还没有一种信号分子被证明比Ca²⁺具有更为重要的作用。Ca²⁺广泛介导了植物细胞的正常生理活动以及在外界刺激如干旱、寒冷、渗透压升高下的胁迫反应^[2]。

细胞中感受Ca²⁺信号的元件被称为Ca²⁺感受器或者叫Ca²⁺结合蛋白, 可分为三大类: 钙调素(calmodulin, CaM), 钙依赖型蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK)以及钙调神经磷酸酶B样蛋白(calcineurin B-like protein, CBL), 它们都有一个螺旋-环-螺旋(HLH)结构, 也称为EF手型结构域^[3]。在拟南芥中, CaM、CDPK、CBL这三类蛋白质都由多基因家族编码, 成员数分别为11个、9个和34个^[3]。在真核生物中, CaM是最为主要也是结构和功能被研究得最为清楚的钙结合蛋白, 它在进化上具有高度的保守性, 一个典型的植物CaM分子具有4个EF手型结构域^[3]。自20世纪60年代末发现以来, CaM一直被认为是细胞内钙信号的多功能受体蛋白, 在调节多种胞内酶活性、生理功能以及基因表达方面起着重要的作用^[4,5]。目前, 在动物细胞中发现了三种CaM激活机制: 自抑制消除(relieve autoinhibition)、活性位点重排

(active site remodeling)以及CaM诱导的二聚体化(CaM-induced dimerization)^[3], 但是植物细胞中CaM的激活机制还未报道, 可能与这三种激活机制具有一定的相似性。近十几年来人们利用不同植物的组织细胞研究后发现, CaM也普遍存在于高等植物细胞质外体(apoplast)中, 在胞外即可调节细胞的生长分化和生理活动^[6]。

相对于动物细胞而言, 植物细胞中的CaM, 特别是胞外CaM的研究进展还不尽人意。目前, CaM的结构特点和激活的分子机制的结论往往来自于对动物细胞的研究。植物胞外CaM的存在于10多年前就已确认, 与胞内CaM结构性质上的相似性也得到证实, 许多相关研究认为植物细胞可以通过调节CaM的分泌来控制胞外CaM的浓度变化^[7], 但至今对其分泌途径仍不清楚。胞外CaM作用机制和信号传递极其复杂, 这直接导致了人们研究的困难。我们综合了近年来的研究成果, 总结了胞外CaM的跨膜及胞内信号转导机制, 并归纳出几种极有可能参与胞外CaM的信号传递但还有待证实的信号元件。

1 胞外CaM的信号转导机制

细胞外CaM具有极为广泛的生物学功能, 其活性的调节也与诸多因素有关。异三聚体G蛋白、磷脂酶C (PLC) - 肌醇三磷酸(IP₃)- 肌醇三磷酸受体

收稿日期: 2005-12-20 接受日期: 2006-06-12

国家自然科学基金创新团队基金资助项目(No.30170091, No.30521004)

* 通讯作者。Tel: 027-68752378, Fax: 027-68756010, E-mail:

jlzhao@whu.edu.cn

(IP₃R)信号通路和 ROS 已被证明参与了胞外 CaM 的胞内信号转导途径，它们之间直接或间接的联系也已得到初步揭示。胞外 CaM 诱导的胞内游离 Ca²⁺ 浓度的升高可能是其调节细胞生长发育的主要方式。

1.1 细胞表面受体的存在

CaM 为一分子量为 17 kDa 的酸性蛋白质，很难跨过质膜进入细胞内部。因此，胞外 CaM 极有可能与胞外位点结合从而激活胞内信号途径。Houston 等^[8]发现在人单核细胞的质膜外表面存在 CaM 结合蛋白，利用 ¹²⁵I 标记的 CaM 亲和性实验则表明这个 CaM 结合蛋白有可能为潜在的 CaM 受体。在植物细胞研究中发现，添加胞外 CaM 可以促进原生质体增殖^[7]、促进花粉萌发和花粉管伸长^[6]、诱导气孔关闭^[9,10]和细胞内蛋白质的磷酸化^[11]，暗示胞外 CaM 可直接作用于细胞膜外表面。随后用生物素及 ¹²⁵I 标记的 CaM 都初步证明白芷悬浮细胞及百合花粉细胞原生质体表面存在 CaM 结合位点，而且结合具有时间饱和性、剂量饱和性及部分竞争抑制现象。利用共价交联-SDS-PAGE 方法也在花粉质膜外表面检测到与钙调素特异结合的蛋白质^[6]。使用不能透过细胞膜的大分子钙调素抗血清和钙调素抑制剂 W7-琼脂糖均能抑制胞外 CaM 的生物学功能^[9,12]，进一步证明胞外 CaM 可能并未跨膜而是直接作用于胞外位点发挥作用。因此，细胞外表面存在 CaM 受体的假说正进一步得到证实。

1.2 胞外 CaM 的细胞外调节

植物体胞外 Ca²⁺ 浓度(约 10~50 μmol/L)比细胞质中的游离 Ca²⁺ 浓度([Ca²⁺]_{cyt})(约 0.2 μmol/L)^[2]高得多，高钙环境使胞外 CaM 的调节机制与胞内 CaM 不尽相同。同时，植物细胞质外体中 pH 值约为 4~5，比胞内约低 2~3 个 pH 单位，偏低的 pH 值会显著影响 Ca²⁺ 和 CaM 结合的亲和力。汤文强等^[13]发现在 pH 4.5 的条件下，激活 CaM 所需的 Ca²⁺ 浓度是 pH 7.4 时的 10 倍(约 10⁻⁵ mol/L)，而且 CaM 对其靶酶——NAD 激酶的激活也被显著抑制。另外，胞内外 CaM 结构上可能存在的差别也造成了它们之间调节方式的差异。刘德龙等^[14]发现胞内外 CaM 中 Tyr 残基的周围环境并不相同，反应了它们构象上的差别；而对胞内外 CaM 的 CD 光谱学研究则表明^[15]，胞外 CaM 本身与 Ca²⁺ 的结合能力比较弱，但具体的分子机制仍未阐明。

值得注意的是，胞外 CaM 不仅仅被 Ca²⁺ 所调节，已经有人发现并提纯白芷细胞外区域中存在的

分子量为 21 kDa 的胞外 CaM 结合蛋白(ECBP21)^[16,17]。Mao 等^[17]则发现在白芷基因组中至少存在两个编码 ECBP21 的基因，且在 ECBP21 的 C 端存在一个长度为 16 个氨基酸残基的 CaM 结合区域，说明 ECBP21 确实为一胞外 CaM 结合蛋白。对该蛋白质和其抗体的功能分析表明：外加 21 kDa 的此蛋白质能抑制白芷悬浮培养细胞的增殖，而它的抗体则能显著促进细胞增殖并维持细胞的脱分化状态^[18]。由于先前的研究表明 CaM 在维持白芷悬浮细胞的增殖过程中发挥重要作用^[7]，那么胞外 CaM 结合蛋白对悬浮培养细胞增殖的抑制作用可能是因为它与胞外 CaM 结合从而降低了胞外 CaM 的活性所造成的。总之，植物胞外 CaM 的作用特点是胞外低 pH 环境、胞内外 CaM 结构上的差异和胞外 CaM 结合蛋白的存在等多种因素综合作用的结果，它的调节机制还有待更深入的研究。

1.3 异三聚体 G 蛋白介导的胞外 CaM 信号转导

异三聚体 G 蛋白介导的信号转导是一个存在于几乎所有的真核生物中保守的信号转导机制，它能传递来自胞内外的信号刺激^[19,20]。在植物界中 G 蛋白能调节幼苗下胚轴和叶片的形成^[21]、花粉萌发和花粉管伸长^[22]以及植物激素的作用^[19,20]。

异三聚体 G 蛋白参与胞外 CaM 跨膜信号转导途径的过程已得到证实。马力耕等^[22]发现添加钙调素抗血清可以完全抑制花粉萌发和花粉管伸长，但这种抑制作用可被 G 蛋白特异性激活剂霍乱毒素(cholera toxin, CTX)解除。相反，胞外 CaM 对花粉萌发和花粉管伸长的促进作用可被 G 蛋白特异性抑制剂百日咳毒素(pertussis toxin, PTX)完全阻滞。这说明异三聚体 G 蛋白可能作用于胞外 CaM 的下游。更多的证据来自于对蚕豆保卫细胞的研究^[19,23]，G 蛋白激活剂 CTX 和抑制剂 PTX 能分别促进和阻滞胞外 CaM 诱导的[Ca²⁺]_{cyt}上升和气孔关闭。类似的方法证实 G 蛋白同样也参与了胞外 CaM 诱导 *rbcS* 基因表达的过程^[24]。胞外 CaM 的生物学功能在突变体 *gpa1-1* 和 *gpa1-2* 中完全失活，而在 *AtGPA1 cGα* 过表达的细胞中胞外 CaM 诱导的气孔关闭的速度明显加快，这也为异三聚体 G 蛋白偶联的胞外 CaM 跨膜信号转导提供了遗传学证据^[19]。

1.4 ROS 转导了胞外 CaM 的胞内信号途径

细胞感受外界刺激并作出相应反应的一个重要表现就是 ROS 的产生或消除^[25]。过去一直认为 ROS 是细胞内主要的毒性物质，但现在的研究表明 ROS

更可能作为一类信号分子而在细胞内发挥作用。细胞内 ROS 种类繁多, 主要可分为自由基形式(O_2^- , $OH\cdot$, $HO_2\cdot$)和非自由基形式(H_2O_2)^[26], 其中 H_2O_2 是人们研究最多也是 ROS 发挥其信号转导作用而采取的最为重要的形式。植物细胞中 H_2O_2 的产生主要是由膜结合蛋白 NADPH 氧化酶催化的反应所介导: $O_2 + NADPH \rightarrow O_2^- + NADP^+ + H^+$ ^[27]。 O_2^- 是不能跨膜运输的小分子, 但它能在植物细胞质外体中被超氧化物歧化酶(SOD)自发催化形成 H_2O_2 ^[28]。 H_2O_2 能通过水通道蛋白(aquaporin, AQP)实现跨膜运输进入胞内^[29], 目前的研究证实, H_2O_2 转导了胞外 CaM 的胞内信号途径。

水稻 *dwarf1(dl)* 突变体的植株矮小且瘦弱, 并显示出对病虫害高度敏感的表现型。Suharsono 等^[30] 发现 *dl* 突变体的上述表型是因为编码 $G\alpha$ 的基因突变的结果, 病原体和 elicitors 诱导的 H_2O_2 产生和相关的植物抗性反应, 如 *PBZ1* 基因的表达, 在 *dl* 突变体中是高度抑制的, 暗示植物体内 $G\alpha$ 亚基与 H_2O_2 的产生密切相关, 异三聚体 G 蛋白可能在 ROS 信号的上游发挥作用。Chen 等^[9] 则发现加入 NADPH 氧化酶的特异性抑制剂 DPI 或者加入能够分解 H_2O_2 的过氧化氢酶(CAT), 均能阻止胞外 CaM 诱导的 H_2O_2 的产生和气孔的关闭。 $H_2DCF-DA$ 是一种能够作为胞内 H_2O_2 水平变化的指示剂^[31], 采用这一指示剂可以观察到胞外 CaM 处理过的蚕豆叶表皮细胞中 H_2O_2 的产生显著加快^[9], 说明胞外 CaM 诱导的气孔关闭中需要 H_2O_2 的参与。随后的实验表明, CTX 可以促进胞内 H_2O_2 的产生并促进气孔关闭, 而这种正向调节作用可被 DPI 和 CAT 所阻断, 并且在突变体 *gpal-1* 和 *gpal-2* 中, 胞外 CaM 是不能诱导 H_2O_2 产生的^[9]。以上实验结果说明, 胞外 CaM 可以通过激活异三聚体 G 蛋白中的 $G\alpha$ 亚基促进 H_2O_2 的产生, 从而导致气孔关闭。

1.5 PLC 和 IP_3

早已证实, 动物细胞质膜上的磷脂酰肌醇二磷酸(PIP_2)在 PLC 的作用下产生甘油二酯(DG)和 IP_3 。 DG 作为信号分子是通过激活钙依赖的蛋白激酶 C (PKC)传递信息的, IP_3 则可与胞内钙库上的 IP_3 受体(IP_3R)结合促使其中的 Ca^{2+} 流入胞质, 使 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上升^[32]。在植物细胞中虽然已经发现了 PKC 家族^[33], 但 DG/PKC 途径是否存在尚待进一步验证。

Cote 等^[34] 认为植物细胞中存在 PLC 且活性可受 G 蛋白调控。Pan 等^[35] 利用百合花粉原生质体作为

研究体系, 找到两个 PLC 全长 cDNAs, *LdPLC1* 和 *LdPLC2*, 并且发现这两个 cDNA 片段中包含有 X、Y 催化模体和 C2 结构域。药理学实验结合显微注射 PLC β 抗体、 IP_3 和 IP_3R 抗体等方法表明植物细胞中存在 PLC- IP_3 - IP_3R 信号通路, 并且可能参与花粉萌发和花粉管生长^[36]。马力耕等^[37] 发现 PLC 的拮抗剂 U-73122 在浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时即可完全抑制由外源 CaM 促进的花粉萌发和花粉管生长, 表明 PLC 可能参与了由胞外 CaM 调控的这一过程。G 蛋白激动剂 CTX 对 PLC 活性的促进作用可被 U-73122 显著抑制, 而另一较弱的 PCL 拮抗剂 U-73343 则表现出较少的抑制作用^[35]。笼化(caged)的 IP_3 导入花粉后用紫外光处理释放出 IP_3 , 不仅可以消除 G 蛋白抑制剂 PTX 的抑制作用, 而且花粉萌发和花粉管生长被促进的程度随 IP_3 浓度的增加而增加, 而 IP_3 受体专一性拮抗剂——低分子量肝素(heparin)则可明显抑制花粉萌发和花粉管生长^[37], CTX 只能很小幅度地增加肝素处理后的川百合花粉细胞内 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的上升^[38]。由此表明, PLC 可能受 G 蛋白的调控并为其下游效应器, PIP_2 水解产生 IP_3 可传递来自胞外 CaM 的信号。

1.6 胞外 CaM 激活的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高及 Ca^{2+} 的反馈调节

细胞内 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 能作为多种外界刺激的第二信使调节细胞的生理活动, 它是否也作为胞外 CaM 的胞内信号而参与其信号转导途径呢? 答案是肯定的。 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的上升能促进花粉萌发和花粉管生长^[37]。用不能透过细胞膜的植物钙调素抗血清和钙调素拮抗剂 W7-琼脂糖处理川百合花粉, 发现胞内 Ca^{2+} 浓度显著降低, 最后可导致 Ca^{2+} 浓度梯度减弱甚至消失, 表明内源的胞外 CaM 在花粉萌发初期可能参与了细胞内 Ca^{2+} 浓度的调控以及花粉细胞内 Ca^{2+} 浓度梯度的形成^[12,39]。Shang 等^[12] 证明在胞外 CaM 诱导的花粉中 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上升是由超极化激活 Ca^{2+} 通道(HACCs)介导的胞外 Ca^{2+} 进入胞内产生的。更多的药理学实验表明, 质膜 Ca^{2+} 通道阻断剂($LaCl_3$ 、 $AlCl_3$ 、NIF 和异搏定)可以抑制胞外 CaM 和 G 蛋白激动剂 CTX 促进蚕豆气孔关闭和保卫细胞内 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的升高^[12,23]。最近 Chen 等^[9] 采用 Fluo-3 做 Ca^{2+} 探针并结合激光共聚焦显微(CLSM)技术证实胞外 CaM 确实可以使蚕豆保卫细胞中 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高, 10^{-8} mol/L CaM 处理即可使 63% 的实验细胞内 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 发生典型改变, 280 s 后可明显提高。可见, 胞外 CaM 通

过激活 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的上升来调节细胞的生理活动。

胞外 CaM 诱导的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上升可能通过了两条途径: 一条是 ROS 信号通路, 另一条是 PLC-IP₃-IP₃R 信号通路。对植物激素——脱落酸(ABA)的研究发现, ROS 可以通过调节质膜上的 Ca²⁺ 通道(I_{Ca})促进胞外 Ca²⁺ 内流导致 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高, 这也是气孔关闭和根毛生长的前提^[29,40,41]。I_{Ca} 通道在植物细胞中广泛存在, 说明植物中 ROS 调节 I_{Ca} 通道活性的信号途径具有普遍性^[25]。在拟南芥的两类 NADPH 氧化酶功能缺失突变体 *atrbohD/F* 和 *rhod2* 中, ABA 均不能诱导 ROS 的产生和胞内钙离子浓度的增加^[40,42]。体外使用膜片钳技术则能直接证明 H₂O₂ 能够促进 Ca²⁺ 内流^[41], 可见 ROS 在调节 I_{Ca} 通道中的重要性。ROS 信号通路在胞外 CaM 诱导的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上升中发挥作用的更为直接的证据来自于对蚕豆保卫细胞的研究, 加入 DPI 和 CAT 人为阻断胞外 CaM 诱导的 H₂O₂ 产生, 可显著阻断蚕豆气孔的关闭和保卫细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的上升, 暗示胞外 CaM 功能的实现需要 ROS 激活 I_{Ca} 通道促进胞外 Ca²⁺ 内流^[19]。当然, ROS 是直接影响了钙离子通道还是通过了其他的中间物发挥作用有待进一步研究。H₂O₂ 也可能并不是直接作用于 I_{Ca} 通道的 ROS 形式, Foreman 等^[40]以拟南芥根尖生长区表皮细胞原生质体为实验体系, 发现单纯添加 H₂O₂ 并不能激活 Ca²⁺ 内流, 而添加 OH· 则能很快激活 I_{Ca} 通道。考虑到 H₂O₂ 和 OH· 的化学稳定性不同, H₂O₂ 可能只是 ROS 信号在胞内传递的主要形式, 而只有转变为 OH·(或其余形式的 ROS)后才能作用于靶蛋白, 产生生物学效应^[25]。

在成熟植物细胞中一般都具有中央大液泡, 作为细胞内重要的钙库, 液泡膜上已经发现一些 Ca²⁺ 释放的通道^[2], 一类是配体门控型 Ca²⁺ 通道, 另一类是电压门控型 Ca²⁺ 通道。IP₃ 激活的 Ca²⁺ 通道属于前者^[1,2]。另一植物细胞内的重要钙库是内质网(ER), 电压门控型 Ca²⁺ 通道已经被发现存在于 ER 膜上^[43]。Martinec 等^[44]证明 ER 膜上存在高亲和力的 IP₃ 结合位点, 暗示 IP₃ 配体门控 Ca²⁺ 通道的存在。综上所述, 胞外 CaM 通过 PLC-IP₃-IP₃R 途径激活胞内钙库中 Ca²⁺ 释放, 引起 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上升的胞内信号途径可能广泛存在于植物细胞中。在研究胞外 CaM 促进 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高实验中发现, 单独阻断质膜 Ca²⁺ 通道而不抑制 PLC^[45]或单独抑制 PLC 而不阻断 Ca²⁺ 通道^[37]均可完全抑制花粉萌发和花粉管生长。添加 PLC 拮抗剂 U-73122 可显著降低胞外 CaM 引发的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的

上升。由于 PLC 和 IP₃ 受体活性均依赖于 Ca²⁺, 推测通过质膜 Ca²⁺ 通道流入的 Ca²⁺ 主要作用可能是激活 PLC 和 IP₃ 受体, 而通过 PLC-IP₃-IP₃R 途径从胞内钙库中动员流出的游离 Ca²⁺ 是 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上升的主要来源。

在胞外 CaM 的信号传递过程中, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的上升不仅仅调控了下游信号途径, 如蛋白质磷酸化和相关基因的表达, 而且对其上游的信号元件也有反馈作用。研究证实植物中 NADPH 氧化酶类 gp91^{phox} 亚基中包含两个 Ca²⁺ 结合的 EF 手型结构域^[46]。Sagi 等^[47]则发现添加钙离子螯合剂 EGTA 能显著降低 NADPH 氧化酶的活性, 说明 Ca²⁺ 能激活 NADPH 氧化酶进而促进 ROS 的产生。最近的实验表明, 烟草胞内 CaM 能够在 Ca²⁺ 存在和适当 pH 值条件下激活 NAD 激酶而促进 NADPH 的产生^[48]。过氧化氢酶(CAT)作为细胞内最重要的消除 H₂O₂ 的酶类, 其活性也受到 Ca²⁺/CaM 的调节。Yang 等^[49]发现 AtCat3 中包含一个 CaM 结合位点, 且其活性可被 Ca²⁺/CaM 上调。其他的细胞抗氧化酶类, 如超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)均可被 Ca²⁺ 以剂量相关的方式激活^[50]。

由此可见, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的升高在胞外 CaM 的胞内信号转导中具有两方面的反馈调节作用: (1)正反馈调节。Ca²⁺ 可激活 NAD 激酶和 NADPH 氧化酶, 促进 ROS 产生, 并激活质膜上 Ca²⁺ 通道引起胞外 Ca²⁺ 内流。Ca²⁺ 还可作用于 PLC 和 IP₃ 受体, 促进胞内钙库中 Ca²⁺ 的释放; (2)负反馈调节。Ca²⁺ 和 Ca²⁺/CaM 复合体可激活细胞抗氧化酶类(CAT、SOD、APX、GR), 降低胞内 ROS 水平, 导致减少胞外 Ca²⁺ 内流。

2 小结及展望

根据 CaM 普遍存在于人、动物和植物细胞外, 可以与细胞外位点结合产生多种生物学功能, 以及具有跨膜及胞内信号转导机制等实验结果, 孙大业等^[6]提出胞外 CaM 可能是一种广谱性多功能肽类第一信使的观点。由于 CaM 既是胞内信号传递途径组分之一, 又可以起胞外信使作用, 因此可被称之为“兼性”信使^[51]。与其他“兼性”信使相比, 胞外 CaM 的存在和功能更为广泛。

综合近年来对胞外 CaM 和其他相关信号分子的研究进展, 我们综合前人观点归纳出了细胞外 CaM 信号转导机制的假设模型(图 1): 被 Ca²⁺ 活化的胞外 CaM 与膜受体结合, 使其激活; 活化的胞外 CaM

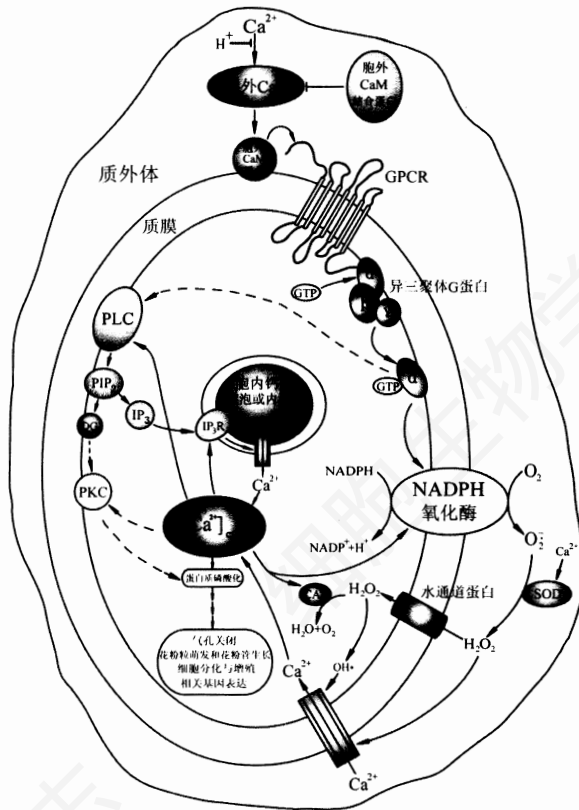


图1 植物胞外CaM的信号转导(自绘)

膜受体作为配体结合于G蛋白偶联受体(GPCR),导致异三聚体G蛋白接受GTP分子而被激活,G α 亚基与G $\beta\gamma$ 亚基分离。活化的G α 亚基可激活膜结合蛋白NADPH氧化酶产生ROS(主要是H₂O₂),H₂O₂转变为OH·后可作用于质膜上Ca²⁺通道(I_{Ca})促进胞外Ca²⁺内流使[Ca²⁺]_{cyt}上升。[Ca²⁺]_{cyt}达到一定水平后可激活PLC-IP₃-IP₃R信号通路,促进胞内钙库中Ca²⁺的释放,引起[Ca²⁺]_{cyt}进一步上升,这也许是[Ca²⁺]_{cyt}上升的主要原因。Ca²⁺则可与胞内的Ca²⁺结合蛋白(CaMs、CBLs、CDPKs)结合,调节下游信号途径,如蛋白质磷酸化、基因表达,也可反馈调节胞外CaM的信号通路。

作为一个小分子的酸性蛋白质,胞外CaM要在胞外实现其对胞内信号的调控,需要很多胞内信使的参与。其信号转导机制的大致轮廓虽然已在上文被阐述,但要完全证实上述观点还需要做大量深入的研究。[Ca²⁺]_{cyt}增加的主要来源在不同的植物细胞(如成熟细胞和分生细胞)以及植物细胞在应对不同外界刺激(如干旱、寒冷、病虫害、射线等)的过程中各不相同,PLC-IP₃-IP₃R信号通路是否真的位于

ROS信号通路的下游值得商榷。最近的研究发现拟南芥保卫细胞微丝骨架的解聚可能参与了胞外CaM诱导的气孔关闭^[10],可能解释是异三聚体G蛋白通过诱导微丝骨架的动力学变化来调节PLC的活性,而这种调节作用需要某些依赖于Ca²⁺的蛋白质参与。微丝骨架的解聚也可激活I_{Ca}通道促进胞外Ca²⁺内流^[52],暗示了Ca²⁺、ROS和细胞骨架三者之间可能存在某种直接或间接的关系。细胞的吞噬和外排作用离不开细胞骨架的动力学变化,胞外CaM的分泌极有可能与其自身对微丝骨架的调节有关,但这一点还未引起人们的重视。Park等^[53]发现磷脂酰肌醇3-磷酸(PI₃P)可激活NADPH氧化酶促进ROS产生和气孔关闭,暗示磷脂酰肌醇信使系统与ROS信号途径之间也可能存在直接联系。植物细胞内参与信号转导的GTP酶除了异三聚体G蛋白外还包括许多小G蛋白,如ROP1~ROP11^[54],小G蛋白可能作为异三聚体G蛋白的下游信号分子而广泛介导了众多信号通路,帮助其行使正常功能^[54]。CaM已被证明可与不同于CDPKs的CaM依赖的蛋白激酶(CBKs)结合而启动下游信号途径^[55],相信胞内Ca²⁺/CaM复合体与Ca²⁺的生物学功能势必存在某些不同之处。从胞外CaM功能和其可能的信号途径来看,胞外CaM与植物激素ABA的信号通路^[56]极为相似,它有可能参与了ABA的信号途径。ABA一方面可在质外体中影响胞外CaM的生物活性而调节胞内的信号事件,而另一方面由于ABA也能影响微丝骨架动力学变化^[57,58],它对CaM分泌的调节也可能存在。膜联蛋白(annexins)被证明在ABA信号转导中发挥了重要作用,它能感受ABA引起的[Ca²⁺]_{cyt}上升并激活下游信号通路^[59]。此外,膜联蛋白还具有过氧化物酶活性^[60]。这暗示了膜联蛋白极有可能在胞外CaM发挥其生物学功能的过程中扮演了重要的角色。但是,胞外CaM促进花粉萌发和花粉管生长的作用与ABA恰好相反,它们在花粉早期信号事件中的差别有待深究。我室最近研究了添加外源CaM对水稻早期胚胎离体发育的影响,发现外源CaM促进细胞增殖是在一定浓度范围内进行的,浓度过高会对其产生抑制^[61]。这一点可能与CaM是动植物细胞质膜Ca²⁺排出钙泵激活剂有关^[62],CaM通过激活质膜钙泵使Ca²⁺大量外流,胞内Ca²⁺浓度降低,导致细胞增殖受到抑制有关。这让我们认识到胞外CaM作用的双重性,它也可能在防止早期胚胎过快生长发育的过程中起到一定的作用。值得提出的

是, 胞外 Ca^{2+} 在调节植物细胞生理活动中具有重要作用, 除能调节胞外 CaM 活性外, Han 等^[63]发现在拟南芥嫩芽和保卫细胞膜上存在 Ca^{2+} 感知受体 (Ca^{2+} -sensing receptor, CAS), 介导了干旱条件下的气孔关闭, 但这一作用机制与 ABA 无关。

在过去的几十年里, 许多细胞外多肽信使, 诸如 systemin、PSK、CLV3 和 SCR 等, 都已经被人们发现, 它们具有众多的生物学功能^[12]。以往人们虽然认识到植物体中可能存在多肽信使, 但对它们在细胞生理功能及生长发育上的调节作用不甚了解, 使一些生物学现象没能得到合理解释。如今胞外 CaM 的发现及其信号转导途径的初步阐明, 不仅证实了植物也像动物一样存在胞外的多肽信使, 而且也对研究其他的胞外信号分子甚至胞内的多肽信使具有一定的指导意义。胞外 CaM 还可能参与植物细胞间信号通讯, 这为人们重新认识植物如何作为一个有机整体提供了新的思路。植物细胞质外体中除 Ca^{2+} 外还存在其余多种金属离子, 它们由于配位环境与 Ca^{2+} 具有相似性, 能够取代 Ca^{2+} 与 CaM 产生竞争性结合, 对 CaM 的结构和构象产生影响, 有可能促进或抑制胞外 CaM 的作用^[64,65]。Sun 等^[65]发现低浓度的 La^{3+} 或 Ce^{3+} 能促进花粉萌发和花粉管生长, 而高浓度的 La^{3+} 或 Ce^{3+} 则起到抑制作用。 La^{3+} 的这种生物学功能是在与胞外 CaM 的结合后产生的, G 蛋白传递了来自 La^{3+} -CaM 复合体的信号^[65]。小 G 蛋白和细胞骨架均能影响胞外 CaM 的胞内信号通路, 甚至将几个信号元件通过另一条途径联系起来, 可见胞外 CaM 的信号转导途径仍有待深入研究, 更多的信号分子将随之被发现。胞外 CaM 与 ABA 的信号转导途径有许多共同之处, 它们之间也可能存在着某种联系。最近发现胞外存在的 ATP 和 ADP 也可能具有胞外信使的功能, 它们能激活胞外 Ca^{2+} 内流以及由此引发的下游反应, 这一点可能在植物体面对压力和伤害胁迫时具有重要的意义^[66]。非多肽的胞外小分子信使与胞外多肽信使之间可能存在的联系需要人们更为深入的研究。

总之, 胞外 CaM 的信号通路只是整个复杂的细胞信号转导网络中的一小部分, 只有将其放在整个细胞这个大环境中与其余的相关途径一起研究, 而不是孤立的探索, 才能更好地探索和认识胞外 CaM 的生物学功能及其作用机制。随着对胞外 CaM 研究的不断深入, 它在细胞中作为一种多肽信使的重要地位也会逐渐被揭示出来。

参考文献 (References)

- [1] Sanders D et al. *Plant Cell*, 2002, (Suppl): S401
- [2] Sanders D et al. *Plant Cell*, 1999, **11**: 691
- [3] Yang T et al. *Trends Plant Sci*, 2003, **8**: 505
- [4] 赵洁等. *植物学报*, 1998, **40**: 28
- [5] Yang J et al. *Acta Bot Sin*, 2002, **44**: 264
- [6] 孙大业等. *中国科学(C辑)*, 2001, **31**: 289
- [7] Sun DY et al. *Plant Cell Physiol*, 1995, **36**: 133
- [8] Houston DS et al. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 11778
- [9] Chen YL et al. *Acta Bot Sin*, 2003, **45**: 40
- [10] 肖玉梅等. *中国科学(C辑)*, 2004, **34**: 129
- [11] 张来群等. *植物生理学报*, 2001, **27**: 201
- [12] Shang Z et al. *Plant Cell Physiol*, 2005, **46**: 598
- [13] 汤文强等. *河北师范大学学报(自然科学版)*, 1999, **23**: 106
- [14] 刘德龙等. *中山大学学报(自然科学版)*, 1997, **36**: 126
- [15] 刘德龙等. *高等学校化学学报*, 2000, **21**: 860
- [16] Tang J et al. *Planta*, 1996, **198**: 510
- [17] Mao GH et al. *Planta*, 2005, **222**: 428
- [18] 毛国红等. *植物生理学报*, 1999, **25**: 165
- [19] Chen YL et al. *Plant Physiol*, 2004, **136**: 4096
- [20] Wang XQ et al. *Science*, 2001, **292**: 2070
- [21] Ullah H et al. *Science*, 2001, **292**: 2066
- [22] Ma LG et al. *Plant Cell*, 1999, **11**: 1351
- [23] 陈玉玲等. *自然科学进展*, 2003, **13**: 343
- [24] 郭毅等. *科学通报*, 2000, **45**: 2195
- [25] Mori IC et al. *Plant Physiol*, 2004, **135**: 702
- [26] Edreva A. *Agr Ecosyst Environ*, 2005, **106**: 119
- [27] Neill S et al. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, **5**: 388
- [28] Mittler R. *Trends Plant Sci*, 2002, **7**: 405
- [29] Pastori GM et al. *Plant Physiol*, 2002, **129**: 460
- [30] Suharsono U et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 13307
- [31] Zhang X et al. *Plant Physiol*, 2001, **126**: 1438
- [32] 权宏等. *植物学通报*, 2003, **20**: 664
- [33] Peck SC. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, **6**: 334
- [34] Cote GG et al. *Bioessays*, 1994, **16**: 39
- [35] Pan YY et al. *Plant Cell Physiol*, 2005, **46**: 1657
- [36] 王昕等. *植物学报*, 2000, **42**: 697
- [37] 马力耕等. *植物生理学报*, 1998, **24**: 196
- [38] 尚忠林等. *自然科学进展*, 2003, **13**: 746
- [39] 尚忠林等. *植物学报*, 2001, **43**: 12
- [40] Foreman J et al. *Nature*, 2003, **422**: 442
- [41] Pei ZM et al. *Nature*, 2000, **406**: 731
- [42] Kwak JM et al. *EMBO J*, 2003, **22**: 2623
- [43] Klusener B et al. *Plant Physiol*, 1999, **119**: 1399
- [44] Martinec J et al. *Plant Physiol*, 2000, **124**: 475
- [45] 马力耕等. *自然科学进展*, 1997, **7**: 751
- [46] Keller T et al. *Plant Cell*, 1998, **10**: 255
- [47] Sagi M et al. *Plant Physiol*, 2001, **126**: 1281
- [48] Karita E et al. *Plant Cell Physiol*, 2004, **45**: 1371
- [49] Yang T et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 4097
- [50] Jiang M et al. *Plant Cell Environ*, 2003, **26**: 929
- [51] 孙大业. *科学通报*, 1999, **44**: 1576
- [52] Wang YF et al. *Plant Physiol*, 2004, **136**: 3892
- [53] Park KY et al. *Plant Physiol*, 2003, **132**: 92
- [54] Yang Z. *Plant Cell*, 2002, (Suppl): S375

- [55] Zhang L *et al. Trends Plant Sci*, 2003, **8**: 123
[56] Hetherington AM. *Cell*, 2001, **107**: 711
[57] Eun SO *et al. Plant Physiol*, 1997, **115**: 1491
[58] Hwang JU *et al. Plant Physiol*, 2001, **125**: 2120
[59] Lee S *et al. Plant Cell*, 2004, **16**: 1378
[60] Gidrol X *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 11268
[61] 吴娟子等。作物学报, 2005, **31**: 1314
[62] 袁生等。实验生物学报, 1999, **32**: 39
[63] Han S *et al. Nature*, 2003, **425**: 196
[64] Ma LG *et al. Plant Cell Physiol*, 2000, **41**: 372
[65] Sun Y *et al. Plant Cell Environ*, 2003, **26**: 887
[66] Jeter CR *et al. Plant Cell*, 2004, **16**: 2652

Extracellular Calmodulin in Plants and Its Signaling Transduction Pathways

Xing-Hao Liao, Jie Zhao*

(Key Laboratory of Ministry of Education for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract Complex signal transduction networks have been constructed in plants. They are necessary for plants to regulate their growth and developmental programs, and response to environmental cues. Many intracellular and extracellular signal molecules participate in the regulation of plants. People believed the existence of extracellular peptide signal molecules in plants since the discovery of extracellular calmodulin (CaM). Because of the extensive biological functions, extracellular CaM participates in nearly all plant growth and development processes. We summarized recent findings, and then delineated extracellular CaM transmembrane and intracellular signaling transduction pathways. The direct or indirect relationships among heterotrimeric G proteins, PLC-IP₃-IP₃R signaling pathway, reactive oxygen species (ROS) and calcium channels, were the core contents of extracellular CaM signaling transduction.

Key words plant; Ca²⁺; extracellular calmodulin; signaling transduction

Received: December 20, 2005 Accepted: June 12, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170097, No.30521004)

*Corresponding author. Tel: 86-27-68752378, Fax: 86-27-68756010, E-mail: jzhao@whu.edu.cn