

## 玉米幼苗节和节间中乙酰胆碱酯酶测定

兰平 张蜀秋 娄成后

(中国农业大学 植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京 100094)

**摘要** 用生化分析结合细胞显微观察研究了黄化玉米幼苗节和节间细胞中乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 的活性和分布特征。结果表明乙酰胆碱酯酶的专一性抑制剂可以抑制该酶的活性。节细胞具有较高的、特异水解乙酰胆碱酯酶活性, 是节间组织中该酶活性的近 2 倍。组织化学定位结果显示, 在节细胞中, 乙酰胆碱酯酶的反应产物主要分布于细胞核中, 而在节间组织中, 酶反应产物多位于细胞间隙。这些结果提示 AChE 在玉米幼苗节和节间中可能具有不同的生理功能。

**关键词** 玉米; 乙酰胆碱; 乙酰胆碱酯酶

**中图分类号** Q 945

**文章编号** 1007-4333(2003)05-0001-03

**文献标识码** A

### Activity and distribution of acetylcholinesterase from node and internode in maize seedling

Lan Ping, Zhang Shuqiu, Lou Chenghou

(State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** Acetylcholinesterase, one of the members in animal cholinergic system, capable of hydrolyzing acetylcholine and modulating several activities in animal and in plant as well, has been detected in the node and internode from etiolated maize seedlings by biochemistry method and electron microscope observation. Huperzine A and neostigmine, special inhibitors of acetylcholinesterase, could inhibit enzyme activity. The acetylcholinesterase activity was higher in the node ( $16.4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein) than in the internode ( $9.01 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein). The result of cytochemical localization showed that the enzymatic reaction products of acetylcholinesterase mainly localized in the nucleolus in the node and in the outside of the cell wall in the internode. These results suggest that the physiological functions of acetylcholinesterase in the node or internode of maize seedlings may be different.

**Key words** maize; acetylcholine; acetylcholinesterase

动物神经递质乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 及胆碱能系统 (包括乙酰胆碱合成的酶系、两类乙酰胆碱受体和乙酰胆碱酯酶等), 广泛存在于植物中并参与一些重要生理过程的调节<sup>[1]</sup>。其中, 乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 是动物神经系统中重要的水解酶, 它催化水解由神经末梢释放出的化学递质乙酰胆碱, 使之在完成信息传递后迅速失活, 以维持正常的神经活动<sup>[2]</sup>。在动物中, AChE 主要位于神经突触前膜、突触后膜及突触间隙内。在多种植物中也检测到了 AChE 的活性<sup>[1]</sup>。组织化学定位表明某些植物该酶位于细胞壁中、细胞壁和质膜之间的空间及质膜的外表面<sup>[1]</sup>。但植物界对 AChE 的研究远远落后于动物。本研究室研究了 ACh 参与气孔运动的调控, 发现在气孔保卫细胞壁区存在大量 AChE<sup>[3]</sup>, 也报道了乙酰胆碱对黄化玉米幼苗物质跨

节运输有调控效应<sup>[4]</sup>。基于乙酰胆碱的作用需要乙酰胆碱酯酶的参与, 本实验对黄化玉米幼苗的节和节间细胞 AChE 活性和分布进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

玉米种子经  $w = 1\%$  NaOCl 消毒 30 min, 用水冲洗过夜, 置 25℃ 生长箱黑暗条件下生长 4 d, 选取生长一致的黄化幼苗以避免叶绿素干扰, 切取其节和节间进行检测。

### 1.2 AChE 活性测定

乙酰胆碱酯酶的提取依据 Fluck 和 Jaff<sup>[5]</sup> 及 Madhavan 等<sup>[6]</sup> 的方法: 组织在 10 倍体积的 4℃ 预冷的磷酸缓冲液 [ $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4%, EGTA  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $w = 1\%$  PVP] 中充分匀浆后, 4

收稿日期: 2003-05-09

基金项目: 国家重点基础研究专项经费资助项目 (G1999011700)

作者简介: 兰平, 博士研究生; 张蜀秋, 教授, 联系作者, 主要从事植物体内信息传递及气孔保卫细胞信号转导的研究, E-mail: sqzhang@cau.edu.cn

静置 30 min, 提取物于 11 000 g 离心 20 min, 弃沉淀, 上清液用于乙酰胆碱酯酶活性的测定。

乙酰胆碱酯酶活性测定参照 Ellman 等<sup>[7]</sup>和王恒彬等<sup>[3]</sup>, 略有改动: 以终浓度为 1 mmol L<sup>-1</sup> 的硫代乙酰胆碱或丁酰胆碱作为反应底物, 所有反应在上述磷酸钠缓冲液中 35 ℃ 下进行。抑制剂实验的酶提取物终浓度为 10 μmol L<sup>-1</sup> 的新斯的明 (Neostigmaine) 或石杉碱甲 (Huperzine A)<sup>[8]</sup> 中预孵育 15 min 后加入终浓度为 1 mmol L<sup>-1</sup> 的反应底物硫代乙酰胆碱启动反应。在 412 nm 波长下记录吸光度变化, 并据此计算乙酰胆碱酯酶的活性。提取液中蛋白含量用 Bradford<sup>[9]</sup> 方法测定, 牛血清白蛋白作标准。

### 1.3 AChE 的细胞定位观察

玉米幼苗的节和节间切成约 2 mm<sup>2</sup> 的小块进行电镜制样<sup>[10]</sup>, LKB- ultramicrotome 超薄切片, 用 JEM 100S 观察照相。

## 2 结果

### 2.1 玉米幼苗节和节间中乙酰胆碱酯酶活性

随着加入硫代乙酰胆碱启动反应时间的延长, 玉米幼苗节组织中 AChE 的活性逐渐增加 (图 1); 与之对照的是, 预先将酶提取物与 AChE 的抑制剂新斯的明 (Neo) 或石杉碱甲 (Hup) 温育 15 min, 则酶活性随时间的增加受到了一定的抑制, 其中石杉碱甲的抑制效果 (68%) 比新斯的明 (20%) 明显。石杉碱甲是对动物 AChE 专一性强的抑制剂, 本实验证明它对植物中的 AChE 亦有显著抑制作用, 也表明所测到的酶活性变化确实是 AChE 催化乙酰胆碱水解的结果。同时, 以硫代丁酰胆碱 (Btch) 代替硫代乙酰胆碱时, 几乎测不到酯酶的活性, 这进一步表明在玉米幼苗的节组织中存在 AChE。

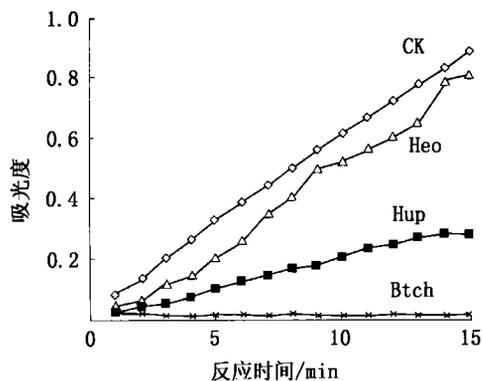


图 1 黄化玉米节乙酰胆碱酯酶活性测定

Fig. 1 Detection of AChE activity in node of etiolated maize seedling

AChE 在玉米节组织中活性比节间组织中活性高, 分别为 16.4 和 9.01 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>。表明在玉米幼苗不同部位 AChE 的活性存在较大的差异。

### 2.2 玉米幼苗节和节间中乙酰胆碱酯酶定位

为进一步证明 AChE 在不同细胞中的分布是否存在差异以推测其功能, 本研究对乙酰胆碱酯酶在节和节间细胞中的分布进行了定位观察。结果表明, 在节细胞的细胞核内非常特异地出现大量酶反应产物沉淀 (图 2-A, B), 而在质膜和细胞间隙中几乎没有。但在节间组织中, 该酶反应产物沉淀 (图 2-C) 主要位于细胞间隙而在核中比较少。对照中没有酶反应产物沉淀 (图 2-D)。以上结果说明, 在玉米幼苗节细胞核内集中分布有乙酰胆碱酯酶, 而在节间组织中, 乙酰胆碱酯酶主要存在于细胞间隙。

## 3 讨论

通常认为动物中的乙酰胆碱酯酶主要起信号传递的作用。近来, 张学军等<sup>[11]</sup>发现, 处于生长条件越差的 ES-T 细胞, AChE 活性越强, 尤其在细胞核中, 甚至在凋亡小体样结构中 AChE 活性特别明显, 据此提出 AChE 的活性与细胞凋亡相关的新观点, 认为除了其分解 ACh 的经典作用外, 可能还具有如蛋白水解酶或核酸酶等功能。

Dettbarn<sup>[12]</sup>首次在丽藻中发现 AChE 以来, 已有 70 多种植物检测到 AChE 活性<sup>[2]</sup>。并发现某些植物的 AChE 比较集中分布在运动细胞周围, 如紫花大翼豆的叶、叶柄及茎中都有 AChE 分布, 而叶褥中 AChE 活性较高, 并且叶片处于不同状态时酶活性存在差异, 由此推测 AChE 可能参与调节这种植物叶片的运动<sup>[13]</sup>; Momonoki<sup>[14]</sup>在玉米根尖木质部和韧皮部交界处检测到了该酶活性, 推测 AChE 参与了幼根的向地性反应。本研究测定了玉米幼苗 AChE 的活性并检测了其特异性, 石杉碱甲对动物和人体中的 AChE 活性具有非常显著和特异的抑制作用, 专一性较高, 也有效抑制玉米幼苗的 AChE 活性, 以此证明 AChE 确实存在于玉米幼苗中。

Fluck<sup>[5]</sup>用组织化学定位研究表明在绿豆细胞中该酶活性主要位于细胞壁质膜外侧, 认为该酶和动物中的 AChE 的功能相似。迄今还未发现植物细胞核中存在 AChE。本研究电镜观察发现, 在玉米节组织细胞核内非常特异地出现 AChE, 而在节间细胞中主要位于细胞间隙, 推测该酶在不同部位可能有不同的作用。生长 4 d 的玉米幼苗的节细胞具有分生细胞的特性, 在一定条件下可分化出次生根, 因

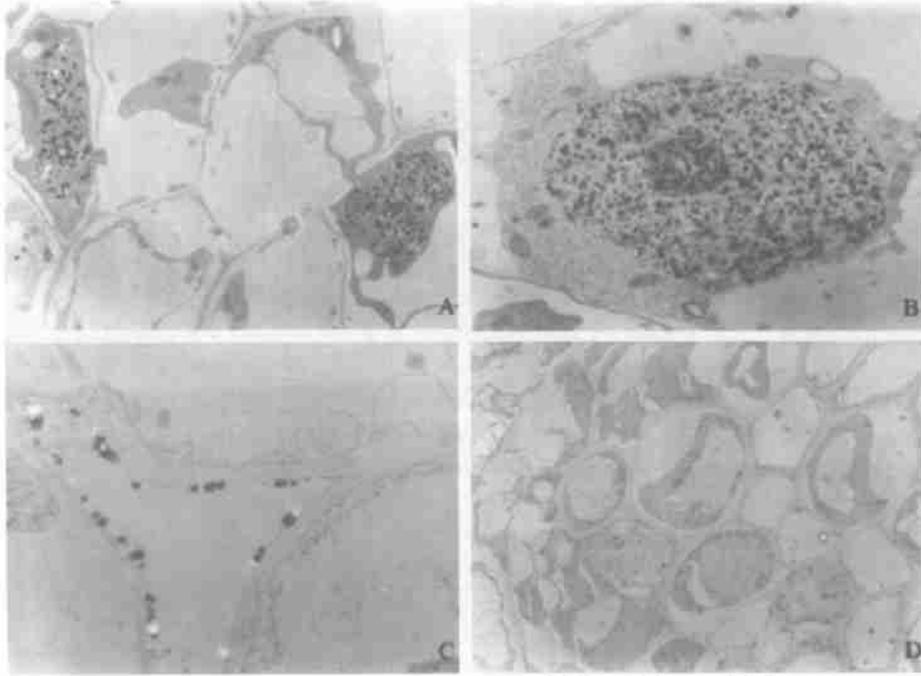


图 2 乙酰胆碱酯酶在节和节间细胞的定位

Fig. 2 Localization of AChE in node and internodal cells

A, B. 乙酰胆碱酯酶在节细胞核中大量分布 ( $\times 200$ ,  $\times 600$ );

C. 乙酰胆碱酯酶分布于节间细胞的质膜和细胞壁上 ( $\times 7000$ ); D. 对照 ( $\times 2100$ ).

此, 节中乙酰胆碱酯酶的高活性可能与细胞分化有关。而节间组织细胞大都是已分化成熟的细胞, 酶活性较低, 根据此酶主要位于质膜外面, 推测有可能参与物质的运输和信息的快速传递, 这与观察到的 ACh 参与调控玉米苗物质跨节运输的结果<sup>[4]</sup>吻合。

目前对植物中 AChE 的确切功能并不明确, 本研究初步表明植物中的 AChE 可能在细胞分化过程中起作用。还需要分子遗传学、分子生物学和生物化学的研究提供证据, 如分化细胞中 AChE 的 mRNA 是否特异性升高并引起 AChE 的大量表达等; 也可通过转基因植物来证明 AChE 的确切功能。

致谢: 感谢中科院上海药物所的唐希灿院士馈赠乙酰胆碱酯酶的抑制剂石杉碱甲。

## 参 考 文 献

- [1] Tretyn A, Kendrick R E. Acetylcholine in plants: presence, metabolism and mechanism of action [J]. Bot Rev, 1991, 57: 33 ~ 73
- [2] 吕宝璋, 田英. 受体学概论 [M]. 北京: 科学出版社, 1991. 112 ~ 120
- [3] 王恒彬, 王学臣, 张蜀秋, 等. 乙酰胆碱酯酶在蚕豆保卫细胞中集中分布 [J]. 植物学报, 1999, 41 (4): 364 ~ 368
- [4] 兰平, 姜成后. 乙酰胆碱对黄化玉米幼苗中胚轴通透性与物质运转的调控效应 [J]. 植物学报, 2001, 43 (12): 1229 ~ 1232
- [5] Fluck R A, Jaffe M J. Cholinesterase from plant tissue: Distribution and subcellular localization in *Phaseolus aureus* Roxb [J]. Plant Physiol, 1974, 53: 752 ~ 758
- [6] Madhavan S, Sarath G, Lee H B, et al. Guard cell protoplasts contain acetylcholinesterase activity [J]. Plant Science, 1995, 109: 119 ~ 127
- [7] Ellman G L, Courtney K D, Andres V, et al. A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochem Pharmacol, 1961, 7: 88 ~ 95
- [8] Tang X C, He X C, Bai D L. Huperzine A: a novel acetylcholinesterase inhibitor [J]. Drugs of Future, 1999, 24 (6): 647 ~ 663
- [9] Bradford M M. A new and sensitive method for the quantitation of microgram protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. Anal Biol Chem, 1976, 72: 348 ~ 354
- [10] Karnovsky M J, Roots L A. A direct-coloring thiocholine method for cholinesterase [J]. J Histochem, 1964, 12: 219 ~ 221
- [11] 张学军. 哺乳类凋亡细胞表达乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的研究介绍 [J]. 生命科学, 1998, 10 (4): 200 ~ 201
- [12] Dettbarn W D. Acetylcholinesterase activity in *Niella* [J]. Nature, 1962, 194: 1175 ~ 1176
- [13] Momonoki Y S, Momonoki T. Histochemical localization of acetylcholinesterase in Leguminous plant, Siratro (*Macroptilium atropurpureum*) [J]. Japan J Crop Science, 1993, 62 (4): 571 ~ 576
- [14] Momonoki Y S. Occurrence of acetylcholine-hydrolyzing activity at the stele-cortex interface [J]. Plant Physiol, 1992, 99: 130 ~ 133