

番茄幼苗血红素加氧酶-1对热激的响应及其抗氧化防护作用

陈笑玥^{1,*}, 张毅华^{1,*}, 张耀文², 沈文飏^{1,**}

¹南京农业大学生命科学学院, 南京210095; ²山西省农业科学院作物科学研究所, 太原030031

摘要: 植物受到高温胁迫以后, 会通过诱导热激响应(HSR)包括诱导热激蛋白(HSP)和抗氧化酶编码基因的表达来缓解胁迫造成的伤害, 但是不清楚其具体的诱导机理。本实验以番茄(*Solanum lycopersicum*) ‘苏红2003’幼苗为材料, 研究了血红素加氧酶-1 (HO-1, EC 1.14.99.3)对热激的响应及其抗氧化防护作用。结果表明, 45 °C热激3 h内不但能以时间依赖性的方式诱导番茄幼苗脂质过氧化和抑制茎生长, 还能上调HO的活性和HO-1蛋白水平; 进一步加入HO-1的活性抑制剂锌原卟啉IX (ZnPPIX)则加剧热激诱导的氧化胁迫; 此外, ZnPPIX还能部分阻断热激诱导的HO活性上调, 同时热激诱导的两种抗氧化酶——过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性明显受到抑制, 编码热激蛋白的*SIHSP70*和*SIHSP20*基因表达也被显著削弱或延迟, 但*SIHSP17.7*和*SIHSP101*的转录本则不受ZnPPIX的影响。以上的研究结果表明, 番茄HO-1能够部分参与HSP的诱导和抗氧化防护。

关键词: 血红素加氧酶-1; 热激; 抗氧化防护; 番茄

Response of Tomato Seedlings Heme Oxygenase-1 to Heat Shock Stress and Its Role in Antioxidative Defense

CHEN Xiao-Yue^{1,*}, ZHANG Yi-Hua^{1,*}, ZHANG Yao-Wen², SHEN Wen-Biao^{1,**}

¹College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Crop Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China

Abstract: Upon heat shock stress, plants normally induce heat shock response (HSR). For example, the induction of genes encoding heat shock proteins (HSP) and antioxidant enzymes could protect plants against damages caused by heat stress. However, the detailed inducible mechanism is still elusive. In this study, the response of tomato heme oxygenase-1 (HO-1, EC 1.14.99.3) to heat shock stress and its role in antioxidative defense were investigated. Our results show that heat shock treatment is not only able to time-dependently induce lipid peroxidation and stem elongation inhibition in tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings, but also increase HO activity and HO-1 protein level. Furthermore, ZnPPIX, the potent inhibitor of HO-1, could aggravate the heat-induced oxidative damage. Meanwhile, the increased HO activity triggered by heat shock was partly blocked by ZnPPIX. Activities of the two antioxidant enzymes, including catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), were also differently inhibited by ZnPPIX. Similarly, as for several genes encoding heat shock proteins (HSPs), for example, the up-regulation of *SIHSP70* and *SIHSP20* was weakened or delayed, respectively. By contrast, the changes of *SIHSP17.7* and *SIHSP101* transcripts were not affected. In sum, our results suggest that tomato HO-1 is, at least partially, involved in the induction of HSP and heat-induced antioxidative defense.

Key words: heme oxygenase-1; heat shock; antioxidative defense; *Solanum lycopersicum*

温度是影响植物生长的主要胁迫因子之一。近年来, 随着温室效应的加剧, 全球气温上升, 植物生产也面临着高温胁迫的严峻挑战。已知高温可以通过影响膜结合过程改变膜的流动性和通透性(Alfonso等2001; Sangwan等2002); 而酶对温度变化也很敏感; 温度改变所诱导的酶活性变化会打破代谢通路的平衡, 或通过使蛋白变性引起酶的完全失活(Kampinga等1995); 膜和蛋白的损伤导

致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的形成从而引起热诱导的氧化损伤(Dat等1998a, b; Larkindale和Knight 2002)。在植物中, 这些不同的损伤最终导致光合作用的减少、碳获得的下降, 从而改变

收稿 2015-04-18 修定 2015-08-29

资助 国家自然科学基金(J1210056和J1310015)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: wbsenh@njau.edu.cn; Tel: 025-84399032)。

植物生长和繁殖, 表现为根或茎生长受抑制、叶片变黄甚至植株死亡。同时, 植物体内也会发生相应的适应反应即热激响应(heat shock response, HSR)来缓解胁迫造成的伤害, 从而维持稳定的代谢过程(Tang等2006)。大量证据表明, HSR只是耐热机制的一个方面; 脱落酸(abscisic acid, ABA)、ROS以及水杨酸(salicylic acid, SA)等都能作为信号分子参与植物耐热性的形成。

作为非生物胁迫的一种, 热激对植物造成的伤害特征之一是造成ROS诱导的氧化胁迫, 主要表现为脂质过氧化。以抗坏血酸为底物的抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)对过氧化氢(H_2O_2)分解有显著的作用, 可反映出脂质过氧化作用的强弱。同样, 过氧化氢酶(catalase, CAT)作为催化细胞内 H_2O_2 分解的关键酶之一, 在植物的氧化防御系统中也起着重要作用(Liang等2003)。另外, 当动物或植物受到热激胁迫时, 体内会迅速表达热激蛋白(heat shock proteins, HSP)。HSP作为胁迫蛋白在动植物受到热激时产生保护效应已经被证实(Lindquist和Craig 1988)。已经知道, HSP是个大家族, 其中不同的家族成员在不同的信号途径中发挥作用, 其中HSP-SIHSP17.7、SIHSP20、SIHSP70和SIHSP101均被报道参与动植物中热激诱导的抗氧化防护(Bruce等1993; Jacquier-Sarlin和Polla 1996)。

有研究表明, 各种不同环境胁迫(如高盐、氧化剂、重金属、紫外线和活性氧等)以及活性氮(例如NO)能够诱导植物体内新发现的抗氧化酶血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的基因表达。已经知道, HO包含HO-1、2、3, 其中HO-1是诱导型HO, HO-2、3是组成型, HO-3没有HO活性, 而HO-1是HO的主要成分, 也是一种新发现的抗氧化酶(Dulak和 Józkwicz 2003; Yannarelli等2006); 伴随HO-1诱导产生的一氧化碳(carbon monoxide, CO)同样具有缓解氧化损伤的作用(Noriega等2004, 2007; Balestrasse等2005; Yannarelli等2006; Liu等2007; Han等2008); 此外, 外源胆绿素(HO-1的另外2个产物之一)能够通过上调镉(Cd^{2+})胁迫下大豆叶片抗氧化酶——超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(oxidase, POD)活性, 缓解 Cd^{2+} 诱导的叶片脂质过氧化(Noriega等

2004)。番茄是重要的蔬菜, 包括高温在内的非生物胁迫是限制其产量的重要因素。本文初步研究和探讨了番茄HO-1参与热激诱导的HSP和抗氧化防护的相关机理, 以期为提高植物抗逆性的相关实践提供初步的理论依据。

材料与方法

1 材料培养

番茄‘苏红2003’(*Solanum lycopersicum* L. Mill. cv. ‘Suhong 2003’)种子由江苏省农科院提供。种子经15%次氯酸钠消毒15 min后用自来水冲洗3次, 每次5 min, 之后放在浸入蒸馏水的湿润滤纸上并置于25 °C黑暗条件下发芽2 d; 挑选根长约6 mm的番茄幼苗于含有5 mL蒸馏水并铺有滤纸的培养皿中, 继续在25 °C黑暗条件下生长4 d。热激(HS)处理之前根据需要将各培养皿里的培养液换成新鲜的蒸馏水或HO-1专一性抑制剂锌原卟啉(zinc protoporphyrin, ZnPPIX; $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)溶液5 mL, 之后迅速将各培养皿放入45 °C恒温培养箱内, 经过不同的热激时间后取出换成水处理转入25 °C培养箱内继续培养1~3 d后立即测定, 或迅速取样后投入液氮中保存, 以正常温度(25 °C)处理为对照。

2 试剂

如果没特殊说明, 所有试剂均购自Sigma公司。

3 茎长分析

番茄幼苗经不同时间的热激后转至25 °C培养箱内生长3 d, 拍照并用Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)测量茎长, 每个实验重复至少3次($n=25$)。

4 硫代巴比妥酸反应物(TBARS)含量测定

检测TBARS含量是判断脂质过氧化程度的一种指标, 测定方法依据Liu等(2007)。将约500 mg新鲜样品用含有0.25% 2-硫代巴比妥酸(TBA)的10%三氯乙酸(TCA)溶液研磨, 混合液在95 °C加热30 min后迅速冷却, 之后在 $10\ 000\times g$ 转速下离心10 min。测定532 nm波长的吸光值, 并减去600 nm处干扰物质的吸光值, 空白参比是含有0.25% TBA的10% TCA溶液, 消光系数(ϵ)为 155×10^3 , TBARS单位是 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。

5 酶活性检测

血红素加氧酶(EC 1.14.99.3)活性测定: 将大

约500 mg的新鲜样品用30 mL预冷的研磨液[含250 mmol·L⁻¹甘露醇、25 mmol·L⁻¹ HEPES-Tris (pH 7.4)、1 mmol·L⁻¹ EDTA、1% PVP、10%甘油和1 mmol·L⁻¹ DTT]研磨成匀浆,经4层纱布过滤杂质后于1 300×g离心30 min。小心倾倒入上清液转至另一离心管,60 000×g离心30 min,将沉淀用悬浮缓冲液悬浮得到酶液,用于HO活性测定。测定的80 μL反应体系包括20 μL酶液以及10 μmol·L⁻¹ Hemin、0.15 mg·mL⁻¹ BSA、50 μg·mL⁻¹菠菜铁氧化还原蛋白(ferredoxin)、0.025 U·mL⁻¹菠菜ferredoxin-NADP⁺还原酶、5 mmol·L⁻¹抗坏血酸盐和2 mmol·L⁻¹去铁胺(desferrioxamine)。反应从加入NADPH开始,于37 °C反应30 min,通过测量650 nm吸光值的变化计算胆绿素IX (BV)的形成,一个单位(U)酶的定义是在30 min内生成1 nmol BV所需的酶量。

CAT活性测定参照Dhindsa等(1981)的方法。番茄幼苗用提取缓冲液(50 mmol·L⁻¹ PBS, pH 7.0, 1% PVP)冰浴研磨,4 °C下10 000×g离心30 min取上清液。在反应体系中加入适量酶液启动反应,检测初反应时间内240 nm吸光值的连续变化值($\epsilon=39.4\times 10^3$)。

APX活性测定:番茄幼苗用提取缓冲液(50 mmol·L⁻¹ PBS, pH 7.0, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, 1% PVP, 1 mmol·L⁻¹ ASA, 5 mmol·L⁻¹ MgCl₂)冰浴研磨,4 °C下10 000×g离心30 min,取上清液测定APX的活

性。测定方法参照Nakano和Asada (1981),反应体系中含有0.5 mmol·L⁻¹ ASA、0.5 mmol·L⁻¹ EDTA和过量H₂O₂,加入适量酶液启动反应,检测初反应时间内290 nm吸光值的连续变化值($\epsilon=2.8\times 10^3$)。

6 HO-1的Western-Blot分析

Western杂交所用的样品来自于测定HO活性所提取的酶液。先将各种处理的蛋白样品(50 mg)分别用两块相同浓度的SDS-PAGE凝胶(浓缩胶T=10%,分离胶T=12.5%)电泳分离,然后将其中一块湿转到PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TPBS缓冲液(pH 7.4)室温下封闭2 h,洗膜后将膜孵育在含番茄HO-1抗体(1:200)和1%脱脂奶粉的TPBS缓冲液中4 °C下过夜,接着用HRP标记的羊抗兔二抗检测,DAB显色;另一块胶固定后用考马斯亮蓝R-250染色,再经过脱色扫描电泳图谱,以此来证明相同的蛋白上样量。

7 半定量RT-PCR分析

取番茄幼苗100 mg,用液氮研磨,加入TRIzol试剂提取总RNA。不含DNA的RNA样品(5 μg)用于第一链cDNA合成,反应体系为20 μL,包含2.5 U的AMV逆转录酶XL (TaKaRa, 大连)和1 μmol·L⁻¹的Oligo-dT。PCR反应在含2 μL的双链cDNA、10 pmol引物和1 U的Taq酶的25 μL反应体系里进行。

每次PCR反应的循环数以条带亮度清晰且在线性扩增期为标准调整,每种特定的PCR产物均通过测序验证。

表1 半定量RT-PCR引物

Table 1 Primers used for semiquantitative RT-PCR

基因名称	GenBank登录号	引物序列(5'→3')
<i>SlHsp17.7</i>	AF123255	上游: GGAAGGAAACTCCAGAAG 下游: CGCACAAGACACAGACAG
<i>SlHsp70</i>	EU195057	上游: TCTCCACCAGCTCCACCT 下游: GTATCCCTCCAGCACCAA
<i>SlHsp101</i>	DV103942	上游: ATCAACCCGTTCTCTCT 下游: AGCGTTCCTCCGACACTAT
<i>SlHsp20</i>	U59917	上游: GTTCCGCTTTGATTTTA 下游: GGGGCTATTTCTGTGAT
<i>SlHO1</i>	AF320028	上游: CTAAGGAAGGGGAAAAAGAG 下游: TTTGCTATCCACCAAGAACT
<i>SlHO2</i>	AF320029	上游: AAGTTGTTGCGAGATGTGCG 下游: TGAGCCAGCTGTCAATTGAGAA
<i>SlActin</i>	BT012695	上游: AAGAGCTATGAGCTCCCAGATGG 下游: TTAATCTTCATGCTGCTAGGAGC

8 蛋白和基因的相对表达量分析

将Western杂交所得的条带和RT-PCR所得的电泳条带经Quantity One 4.4.0软件进行灰度值分析,以处理0 h (T₀)的数值为1,相对灰度值代表蛋白和基因表达的相对差异。

9 统计分析

实验结果来自3次独立实验,统计分析用SPSS 8.0软件。统计学分析采用Duncan新复极差法 ($P < 0.05$)。

实验结果

1 热激抑制番茄幼苗茎伸长并促进脂质过氧化物的形成

热处理对植物的作用主要体现在影响生长和造成氧化损伤等方面(Dat等1998a, b; Larkindale和Knight 2002)。本文研究了45 °C热激处理对番茄茎伸长及幼苗体内TBARS含量的影响。图1-A的结果表明,与正常温度(25 °C)相比,45 °C处理0、0.5、1、1.5和3 h后常温恢复生长3 d,番茄幼苗的茎伸长随热激时间的延长而逐渐受到抑制($P < 0.05$),其中3 h热激的作用最为明显。TBARS含量结果显示,45 °C处理后恢复1 d生长的番茄幼苗体内脂质过氧化程度随热激时间增加而提高(图1-B; $P < 0.05$)。以上结果说明在本文所采用的实验条件下,45 °C热激以时间依赖的方式对番茄幼苗造成

生长抑制和氧化胁迫。

2 热激诱导HO活性及HO-1蛋白表达

大鼠脑组织中的HO-1在热激后表达显著增加,相似的现象在其他动物组织中也有过类似的报道(Shibahara等1987; Ewing和Maines 1991)。为了探明番茄HO-1的表达是否受热诱导,本文研究了45 °C处理3 h内HO活性、HO-1蛋白表达及HO-1、HO-2基因表达的变化情况。图2-A~D的结果显示,随处理时间的延长,HO活性和HO-1蛋白含量的水平在总体上呈现增加的趋势($P < 0.05$);有趣的是,HO-1和HO-2的基因表达在热激3 h内基本没有变化(图2-E)。

3 HO-1活性抑制剂ZnPPiX加剧热激对番茄幼苗的氧化损伤

为了进一步证实热激对HO的上调是否与抗氧化防护有关,本文采用了HO-1的活性专一性抑制剂ZnPPiX进行验证。如图3-A所示,与对照相比,在热激的同时对番茄幼苗施加ZnPPiX处理(HS+ZnPPiX)能够显著促进热激3 h所引起的TBARS含量上升,其含量比单独热激(HS)提高了45.4%;但是,在常温下单独施加ZnPPiX则不会影响脂质过氧化水平。为了明确ZnPPiX对高温及常温下HO活性的影响,本文检测了施加ZnPPiX后相关指标的变化。如图3-B的结果所示,常温下ZnPPiX可以轻微地抑制HO活性,同时加入ZnPPiX的

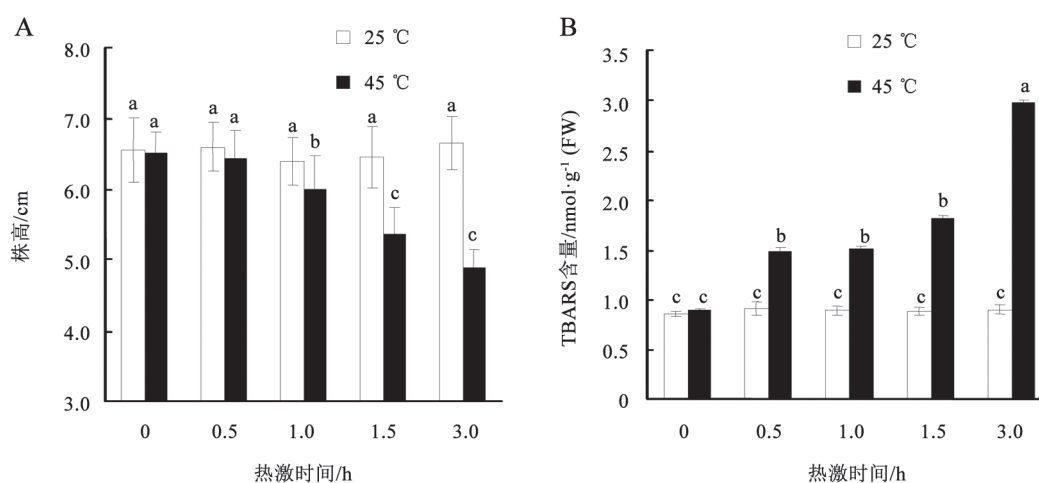


图1 热激对番茄幼苗茎伸长(A)及脂质过氧化(B)的影响

Fig.1 Effect of heat shock on tomato stem elongation (A) and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) content (B)

各柱形上不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下图同。

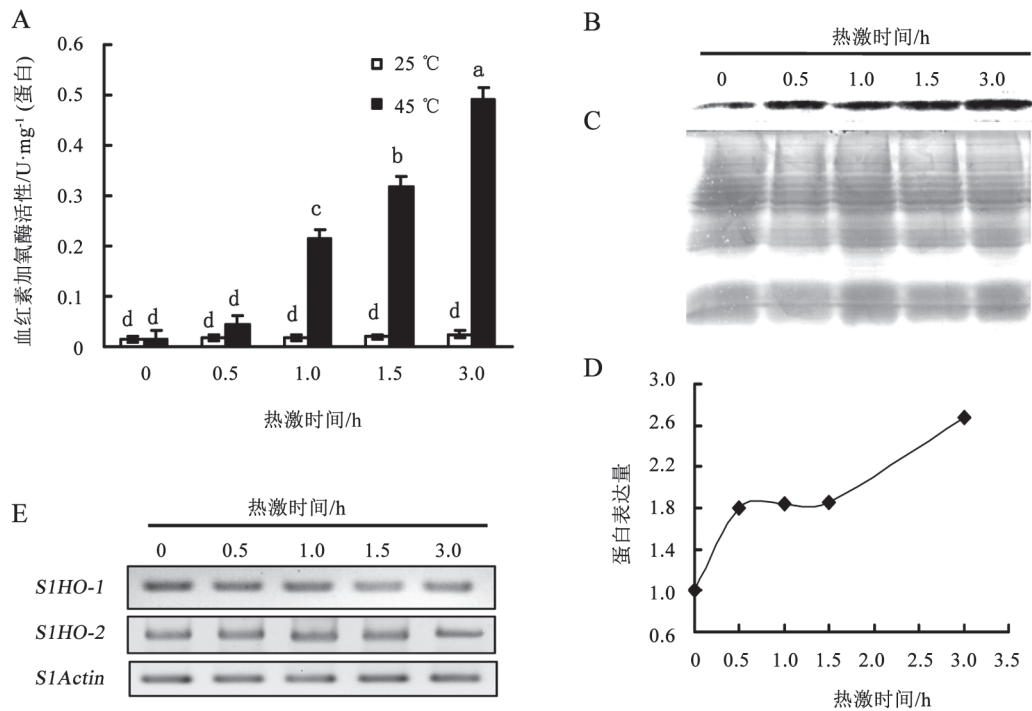


图2 热激对番茄幼苗HO活性、HO-1蛋白水平和HO-1、HO-2转录本的影响

Fig.2 Effect of heat shock on tomato HO activity, HO-1 protein level, HO-1 and HO-2 transcripts

A: 血红素加氧酶在不同热激处理时间的活性; B、D: HO-1蛋白水平在不同热激处理时间的表达; C: 总蛋白的考马斯蓝染色结果; E: HO-1、HO-2转录水平在不同热激处理时间的表达。

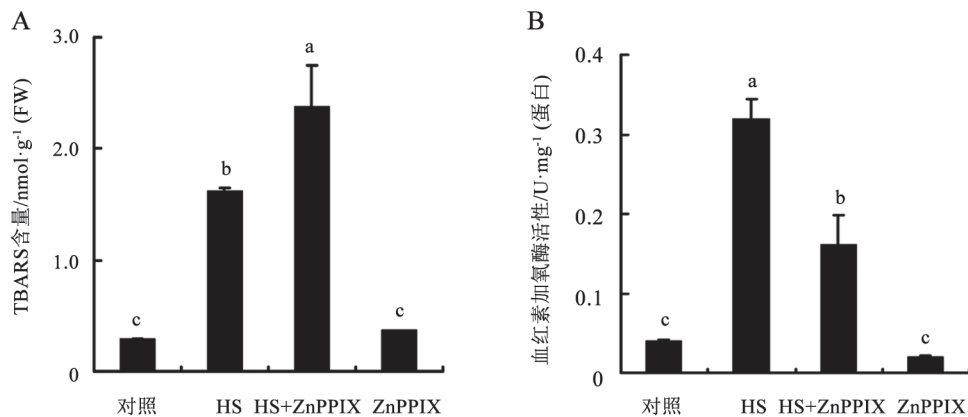


图3 ZnPPiX对热激下番茄幼苗TBARS含量(A)和HO活性(B)的影响

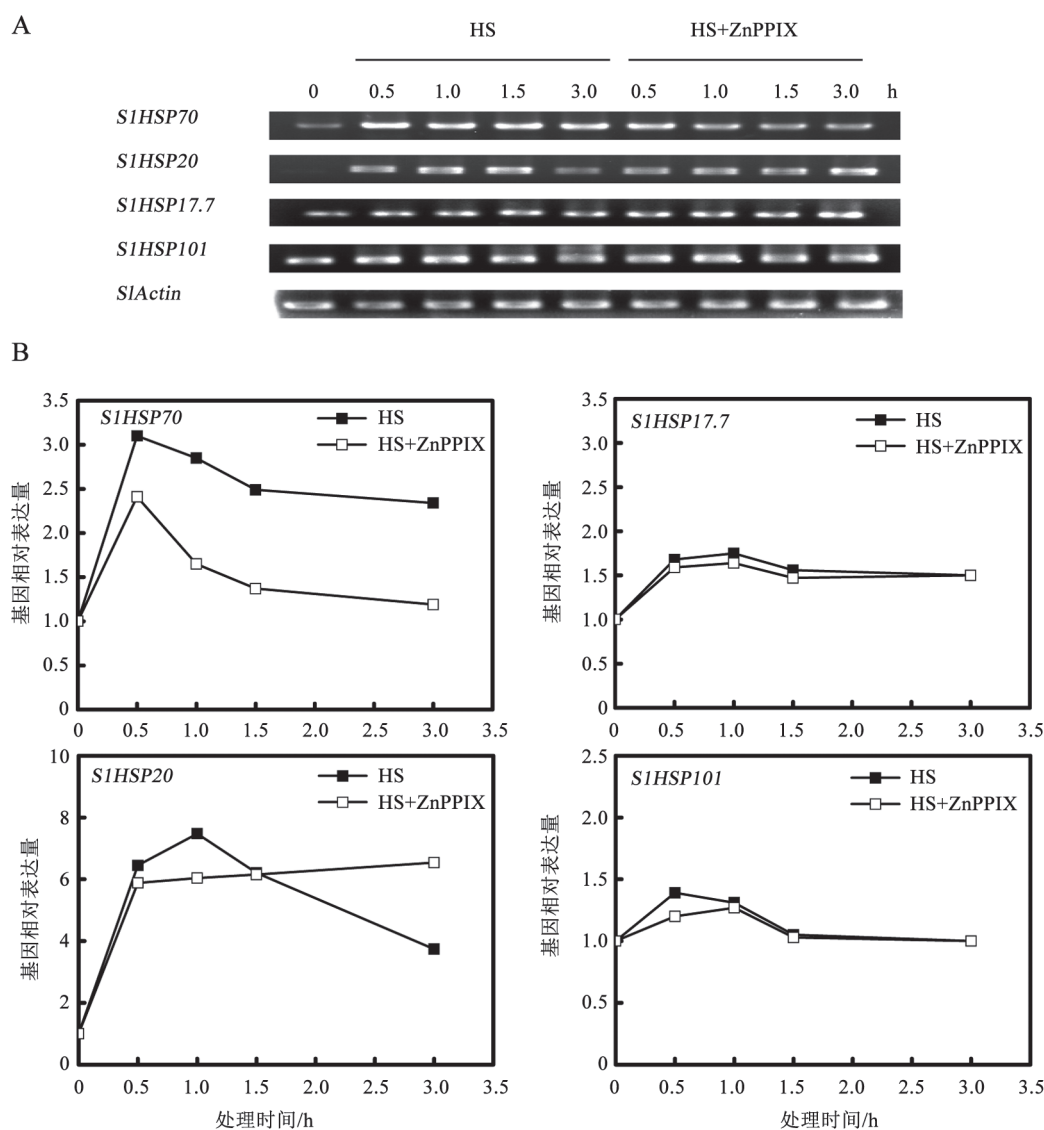
Fig.3 Effect of ZnPPiX on tomato TBARS content (A) and HO activity (B) under heat shock

热激3 h后HO的活性则被抑制了49.5%。上述结果进一步表明,热激诱导的HO-1可能参与了热胁迫下的抗氧化防护。

4 ZnPPiX对热激下番茄热激蛋白基因表达的影响

为了探究HO-1与热激蛋白在热激过程中的关

系,本文结合ZnPPiX处理来分析热激处理下当HO活性被抑制时,HSP基因的表达是否受到影响。如图4所示,与单独热激的相比,施加ZnPPiX使SI-HSP70的基因表达从热激开始后0.5 h起直至3 h均被削弱,SIHSP20的表达则被延迟2 h,而HSP17.7和

图4 ZnPPIX对热激下番茄幼苗*SIHSP17.7*、*SIHSP20*、*SIHSP70*和*SIHSP101*基因表达的影响Fig.4 Effect of ZnPPIX on tomato *SIHSP17.7*, *SIHSP20*, *SIHSP70* and *SIHSP101* transcripts under heat shock

*HSP101*的表达几乎没有受到影响。上述结果暗示*SIHSP70*和*SIHSP20*可能参与了HO-1在热激中的抗氧化防护作用。

5 HO-1活性抑制剂ZnPPIX对热激下CAT、APX活性和基因表达的影响

抗氧化酶作为植物体内清除ROS的酶系统,是参与植物抗氧化防护的一个重要成分。为了进一步探索HO-1调节热胁迫下抗氧化防护系统的机制,本文检测了抗氧化酶CAT和APX在热激以及ZnPPIX的组合处理3 h过程中活性和转录水平的变化。

图5的结果表明,与对照相比,热激3 h内CAT的活性先上升后下降,并在1 h达到峰值,总体呈现上升趋势,而加入ZnPPIX使得CAT的活性受到抑制。与CAT活性变化不同的是,APX的活性在热激中下降,而加入ZnPPIX后其活性被进一步抑制;但是,在常温下单加ZnPPIX不会对CAT和APX的活性造成明显的影响。

讨 论

1 热激诱导番茄HO活性及HO-1蛋白表达

在动物组织中,HO-1可以被血红素、血红素

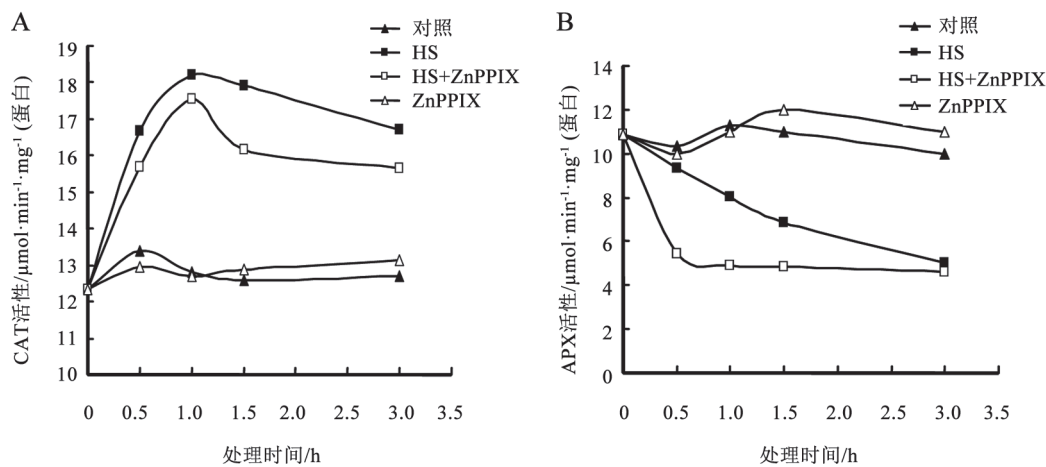


图5 ZnPPIX对热激下番茄幼苗CAT (A)和APX (B)活性的影响

Fig.5 Effect of ZnPPIX on CAT (A) and APX (B) activities in tomato seedlings under heat shock

蛋白、重金属、高温、紫外照射、缺氧、高氧和 H_2O_2 诱导(Dulak和Józkowicz 2003)。近年来随着对植物HO-1的深入研究,发现在植物中HO-1也能被某些其他因素诱导。例如,100或200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 能诱导苜蓿幼苗根部HO-1表达和CO释放(Han等2008);盐胁迫也能引起小麦幼苗根部组织HO活性的变化,并与CO释放相一致(Xie等2008); H_2O_2 能在转录、蛋白水平上上调小麦幼苗叶片HO-1表达,并提高HO的总活性(Chen等2009)。本文发现热激能够诱导番茄HO-1蛋白水平以及HO活性的提高(图2; $P < 0.05$),而HO-1和HO-2转录本则基本不变。以上结果说明,在本文的实验条件下,番茄HO的活性和HO-1蛋白水平受到热激的正调节,且热激对番茄HO-1的诱导可能是转录后水平上。另外,热激上调的HO和热激引起的生长抑制和脂质过氧化程度的变化规律(图1)基本是一致的,暗示HO与热激诱导的生长抑制和氧化胁迫可能有一定的联系。

另一方面,Shibahara等(1987)发现热激能够在转录水平上调大鼠神经胶质瘤细胞中的HO-1,且在人和小鼠的特定细胞系中也观察到类似现象,此外热激还能诱导HO-1蛋白水平的提高(Ewing和Maines 1991)。因此,HO-1又被命名为HSP32。结合本实验的结果(热激仅仅提高番茄HO-1蛋白水平的提高),有关动物和植物HO-1基因对热激应答的差异以及相关的机理有待于进一步的研究。

2 番茄HO部分参与热激对SIHSP70和SIHSP20的转录调节作用

已知在高温下,生物体能够通过合成一系列HSP作为响应,这些蛋白通过行使包括折叠、去折叠、重新折叠蛋白的分子伴侣功能,从而起到保护细胞的作用(Schett等1999)。进一步的研究表明,伴随着热激过程中HO活性和HO-1蛋白水平的持续升高(图2),与此对应的是SIHSP70基因表达的上调;而当施加HO-1活性抑制剂ZnPPIX时,被热诱导的HO活性降低(图3-B),同时SIHSP70的上调被显著削弱(图4),暗示番茄在受到热刺激时,HO-1可能参与了SIHSP70的转录调节;类似地,当ZnPPIX抑制了热激诱导的HO活性时,热诱导的SIHSP20转录本增加也被延迟(图4)。在动物和藻类中,已有报道表明HO-1的诱导物hemin可以非热依赖地上调HSP70基因和蛋白表达(Kim等2005; Von Gromoff等2008);小鼠肺血管内皮细胞中的HSP70的蛋白表达可以被外源CO处理诱导,相反,HO-1的活性抑制剂SnPPIX削弱了组成型和血红素诱导的HSP70表达。因此,本文的结果暗示了高等植物中可能也存在HO-1对HSP70和HSP20的转录调节。同时,也为HO-1调控番茄幼苗的耐热性提供了一个合理的解释。

3 番茄HO部分参与热激诱导的抗氧化防护路径

在动植物组织中,热激可以通过产生过量的ROS导致氧化胁迫(Dat等1998a, b; Gong等1998;

Larkindale和Knight 2002)。在植物组织中, 热诱导的氧化损伤主要表现为脂质过氧化。在本实验中, 45 °C处理后恢复1 d生长的番茄幼苗体内脂质过氧化程度随热激时间增加而提高(图1-B; $P < 0.05$)。

作为植物抗氧化防护中的一个重要方面, 抗氧化酶的活性在植物抗逆境胁迫中起到关键作用。Tang等(2006)证明Cu/Zn-SOD和APX上调表达的转基因土豆植株耐热性显著提高。本文发现, 在45 °C处理3 h内, 与对照相比, CAT的活性显著增高, 并在1 h达到峰值; 与CAT活性变化不同的是, APX活性在热激中呈下降趋势(图5)。

已知在动物中, HO-1/CO信号通路也是一种抵抗不同胁迫的重要分子机制。到目前为止, 植物HO-1作为抗氧化机制首先被阿根廷的Tomaro课题组报道, 他们证明在由Cd以及紫外线B (UV-B) 诱导的氧化胁迫中, HO活性、HO-1基因和蛋白表达上调, 从而起到保护细胞的作用; 外源施加HO-1的产物BV, 可以作为一种有效的ROS清除剂部分缓解由Cd引起的大豆叶片氧化损伤(Noriega等2004, 2007; Balestrasse等2005; Yannarelli等2006)。此外, 本实验室的研究工作也表明HO-1参与了植物氧化胁迫适应性的形成(Chen等2009)。本研究发现, 随着处理时间的增加, 热激诱导的HO-1蛋白水平以及HO活性和热激引起的脂质过氧化程度的变化规律是一致的, 暗示HO-1与热激诱导的氧化胁迫有一定的关联(图1和图2); 其次, 考虑到无法单独测定HO-1活性, 我们采用了HO-1的活性抑制剂ZnPPIX, 发现加入ZnPPIX使得热激诱导的氧化胁迫进一步加剧(图3-A), 说明主要是HO-1参与了热胁迫下的抗氧化防护路径; 为了进一步探究HO-1的抗氧化机制, 本文还检测了ZnPPIX对抗氧化酶CAT和APX活性的影响, 结果发现这两种酶的活性受到不同程度的抑制(图5), 以上结果暗示番茄HO-1可能部分参与热激对抗氧化酶系统的调节。此外, 已有报道证明动物HSP70和植物HSP20参与抗氧化防护路径(Schett等1999), 而本研究发现HO-1可能参与热激对SIHSP70和SI-HSP20的转录调节(图4)。综合以上几点, 本文推测HO-1可能通过调节抗氧化酶活性和HSP20/HSP70转录, 从而部分参与了HSP的诱导和抗氧化防护。

参考文献

- Alfonso M, Yruela I, Almarcegui S, Torrado E, Pérez MA, Picorel R (2001). Unusual tolerance to high temperatures in a new herbicide-resistant D1 mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid desaturation. *Planta*, 212: 573~582
- Balestrasse KB, Noriega GO, Batlle A, Tomaro ML (2005). Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in soybean nodules. *Free Radic Res*, 39 (2): 145~151
- Bruce JL, Price BD, Coleman CN, Calderwood SK (1993). Oxidative injury rapidly activates the heat shock transcription factor but fails to increase levels of heat shock proteins. *Cancer Res*, 53: 12~15
- Chen XY, Ding X, Xu S, Wang R, Xuan W, Cao ZY, Chen J, Wu HH, Ye MB, Shen WB (2009). Endogenous hydrogen peroxide plays a positive role in the upregulation of heme oxygenase and acclimation to oxidative stress in wheat seedling leaves. *J Integr Plant Biol*, 51 (10): 951~960
- Dat JF, Foyer CH, Scott IM (1998a). Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol*, 118: 1455~1461
- Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM (1998b). Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol*, 116: 1351~1357
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot*, 32 (1): 93~101
- Dulak J, Józkwicz A (2003). Carbon monoxide — a “new” gaseous modulator of gene expression. *Acta Biochim Pol*, 50 (1): 31~47
- Ewing JF, Maines MD (1991). Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5364~5368
- Gong M, Li YJ, Chen SZ (1998). Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. *J Plant Physiol*, 153: 488~496
- Han Y, Zhang J, Chen X, Gao Z, Xuan W, Xu S, Ding X, Shen W (2008). Carbon monoxide alleviates cadmium-induced oxidative damage by modulating glutathione metabolism in the roots of *Medicago sativa*. *New Phytol*, 177: 155~166
- Jacquier-Sarlin MR, Polla BS (1996). Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin. *Biochem J*, 318: 187~193
- Kampinga HH, Brunsting JF, Stege GJJ, Burgman PWJJ, Konings AWT (1995). Thermal protein denaturation and protein aggregation in cells made thermotolerant by various chemicals: role of heat shock proteins. *Exp Cell Res*, 219: 536~546
- Kim HP, Wang X, Zhang J, Suh GY, Benjamin IJ, Ryter SW, Choi AMK (2005). Heat shock protein-70 mediates the cytoprotective effect of carbon monoxide: involvement of p38 β MAPK and heat shock factor-1. *J Immunol*, 175: 2622~2629
- Larkindale J, Knight MR (2002). Protection against heat stress-in-

- duced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol*, 128: 682~695
- Liang Y, Chen Q, Liu Q, Zhang W, Ding R (2003). Exogenous silicon (Si) increase antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Plant Physiol*, 160: 1157~1164
- Lindquist S, Craig EA (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 22: 631~677
- Liu K, Xu S, Xuan W, Ling T, Cao Z, Huang B, Sun Y, Fang L, Liu Z, Zhao N et al (2007). Carbon monoxide counteracts the inhibition of seed germination and alleviates oxidative damage caused by salt stress in *Oryza sativa*. *Plant Sci*, 172: 544~555
- Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22 (5): 867~880
- Noriega GO, Balestrasse KB, Batlle A, Tomaro ML (2004). Heme oxygenase exerts a protective role against oxidative stress in soybean leaves. *Biochem Biophys Res Commun*, 323: 1003~1008
- Noriega GO, Yannarelli GG, Balestrasse KB, Batlle A, Tomaro ML (2007). The effect of nitric oxide on heme oxygenase gene expression in soybean leaves. *Planta*, 226: 1155~1163
- Sangwan V, Örvar BL, Beyerly J, Hirt H, Dhindsa RS (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J*, 31 (5): 629~638
- Schett G, Steiner CW, Gröger M, Winkler S, Graninger W, Smolen J, Xu Q, Steiner G (1999). Activation of Fas inhibits heat induced activation of HSF1 and up-regulation of hsp70. *FASEB J*, 13: 833~842
- Shibahara S, Muller RM, Taguchi H (1987). Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem*, 262 (27): 12889~12892
- Tang L, Kwon SY, Kim SH, Kim JS, Choi JS, Cho KY, Sung CK, Kwak SS, Lee HS (2006). Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Rep*, 25: 1380~1386
- Von Gromoff ED, Alawady A, Meinecke L, Grimm B, Beck CF (2008). Heme, a plastid-derived regulator of nuclear gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, 20: 552~567
- Xie Y, Ling T, Han Y, Liu K, Zheng Q, Huang L, Yuan X, He Z, Hu B, Fang L et al (2008). Carbon monoxide enhances salt tolerance by nitric oxide-mediated maintenance of ion homeostasis and up-regulation of antioxidant defense in wheat seedling roots. *Plant Cell Environ*, 31: 1864~1881
- Yannarelli GG, Noriega GO, Batlle A, Tomaro ML (2006). Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *Planta*, 224: 1154~1162