

高等植物及藻类植物中 cAMP 研究进展

The advance of cAMP in higher plant and algae

邓海临¹, 李大鹏²

(1. 福建农林大学 食品科学学院, 福建 福州 350002; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

中图分类号: Q257

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)08-0095-07

Sutherland 在研究肾上腺素引起肝细胞中糖原分解成葡萄糖时发现, 如果使肾上腺素和分离出来的细胞膜碎片互相作用, 可生成一种当时不知名的小分子物质, 当把这种物质单独和肝细胞的胞浆接触时, 也能引起胞浆中糖元的分解, 其作用和肾上腺素作用于完整的肝细胞时类似。这说明肾上腺素并不是直接作用于糖元, 而是作用于细胞膜上, 促使其生成小分子物质的结果。这种小分子物质就是后来证明的 cAMP(环腺苷酸)。cAMP 的发现彻底改变了人们对新陈代谢调节机制的认识, 人们把蛋白激酶和磷酸化作用以及去磷酸化作用调节蛋白质活性的系统归为生物信号转导中的第二信使系统之一。cAMP 作为第二信使普遍存在于细菌、真核微生物、真菌以及多细胞动物, 此外, 对外界信号作出的一系列细胞反应都与 cAMP 有关。由于植物中 cAMP 含量通常较低, 一般的检测方法难以达到要求, 随着酶联免疫法、液相色谱法、质谱法等新型精确检测方法的应用, 使得植物细胞中含有 cAMP 得到肯定, 也使海藻中 cAMP 的研究得到了较快的发展。

1 cAMP 信号系统的组成

1.1 腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)

AC 是合成 cAMP 的关键酶类, 目前已知有 9 种腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)异构体。根据 AC 氨基酸序列, 至少可分为两种亚类。各种 AC 异构体表达的组织特异性会影响不同组织在特异刺激下合成 cAMP 的量。除了由 G 蛋白激活, AC 也能整合 G 蛋白的 $\beta\gamma$ 亚基、蛋白激酶 C 以及细胞内钙离子等转导的信号。

目前, 通常使用组织化学和生物化学方法检测植物组织中的 AC 活性。组织化学法主要基于标准 Wachstein-Meisel 法磷酸铅沉淀技术^[1], 以 ATP 作为

AC 的底物, 用电子显微镜检测 ATP 形成 cAMP 过程中产生的 PPi 与铈形成电子致密沉淀物的量来代表 AC 的活性。因为细胞含有大量 ATP 水解酶不断地释放 Pi , 在这一过程中产生许多假阳性反应, 很多化合物都不能避免干扰活动。后来采用对 ATP 酶敏感较低的 5'-三磷酸亚酰胺腺苷代替 ATP 作为底物^[2], 运用这种方法, 最早在细胞质膜中发现 AC 的活性。此外, 在玉米根尖内质网、质膜、核膜^[3]以及豌豆内膜^[4]上都检测到 AC 活性。植物学家发现 AC 的许多生理作用。Rougier^[5]提出 AC 活性是杨树花粉管稳定形成的重要因素, Curvetto^[6]在蚕豆保卫细胞中定位了 AC 活性是由 IAA、 Ca^{2+} 、咖啡因、GTP 等激活的。作者认为在一定程度上 cAMP 参与了气孔运动中由 G 蛋白引起的 IAA 信号转导体系。此外, 在菜豆初生叶的细胞质膜外和类囊体膜中也发现了 AC 的活性, 另一项研究通过免疫定位在叶绿体和细胞壁中发现了 cAMP^[7]。

组织化学方法难以精确定位 AC 活性, 只能揭示其在生理过程中有一定的作用。生物化学方法实际上是用放射性同位素标记 cAMP 的前体(ATP 或者 5'-三磷酸亚酰胺腺苷)测定合成放射性具有 cAMP 的含量来检测 AC 的活性。不过早期的研究因无法检测新合成的化合物而遭到质疑, 随着更加精确的分离技术的发展, 生物化学方法提供更加可靠的证据。例如, Carricarte^[8]初步估计了苜蓿(*Medicago sativa* L.)中水溶性 AC 的分子质量为 84 ku, 并发现 AC 的活性依赖于 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 与 G 蛋白的功能无关。相比之下, Lusini^[9]在蓖麻根中检测到 AC 的活性。酶活性大约在 20 pmol/(min·mg), 而 AC 的活性与 G 蛋白和 NaF

收稿日期: 2010-10-11; 修回日期: 2011-02-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40976087)

作者简介: 邓海临(1987-), 男, 浙江丽水人, 硕士研究生, 研究方向为食品科学; 李大鹏, 通信作者: E-mail: dpli@qdio.ac.cn

有关, AC 可能受 G 蛋白调控。运用质谱分析技术 Pacini^[10]在豌豆中检测到 AC 活性。AC 用 Mg^{2+} -ATP 作为底物合成 cAMP, AC 的活性与 GTP 存在很大关联。低浓度的 GTP 激活 AC 活性, 而过高浓度的 GTP 抑制其活性, 这可能是因为与 ATP 竞争造成的。Cooke^[11]在研究紫花苜蓿细胞组织时发现, 植物黄萎病致病菌激发 AC 的活性。AC 的活性依赖于 Mg^{2+} 由 Ca^{2+} 激发。较低活性的 AC 在加入植物黄萎病致病菌后, AC 活性瞬间升高了 3 倍。AC 活性的短暂性升高同时伴随着细胞内 cAMP 含量升高, 随后磷酸二酯酶活性快速升高。

1.2 磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)

磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)负责降解细胞内 cAMP, 目前已知有 40 种以上 PDE, 可分为七类。某些组织中 AC 基础活性很高, 这时 PDE 在调节 cAMP 信号途径中的作用就很重要了。除了可以活化已有的 PDE 酶类, cAMP 也诱导合成新的 PDE mRNA, 但目前这种调控的分子机制尚未明了。

早在高等植物中提取环核苷酸混合物的报道之前, Wood^[12-13]在豌豆苗种发现 cAMP 被 PDE 水解成 AMP, 随后在烟草、胡萝卜叶、大麦种子、马铃薯、洋姜块茎中发现了 PDE 的活性。诸多的研究表明, cAMP 是植物组织中内源性物质, 其拥有的功能与其他生物体中类似。与此不同的是, Lin 等^[14]在豌豆苗中发现 PDE 活性具有最佳 pH, 并且对甲基黄嘌呤不敏感, 水解得到 3'-AMP 而不是 5'-AMP。更重要的是, 把 RNA 分解中间物 2',3'-cAMP 作为底物而不是第二信使系统中的 3',5'-cAMP。因为在动物体中 PDE 作用于 cAMP 第二信使系统只产生 5'-AMP 并不水解 2',3'-cAMP, 由此推断出豌豆中的 PDE 并不在植物信号转导中发挥作用, 只是作为 RNA 分解代谢的一部分。

1.3 蛋白激酶 A(cAMP-dependent protein kinase A, PKA)

PKA 全酶是一种四聚体, 由两个催化亚基(C)和两个调节亚基(R)构成。在没有 cAMP 时, 以钝化复合体形式存在。cAMP 与调节亚基结合, 改变调节亚基构象, 使调节亚基和催化亚基解离, 释放出催化亚基。活化的蛋白激酶 A 催化亚基可使细胞内某些蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基磷酸化, 于是改变这些蛋白的活性, 进一步影响到相关基因的表达。

在真核生物中, cAMP 的功能主要是由蛋白激酶

对靶蛋白的磷酸化实现的。但近来又有实验证明 cAMP 可以直接作用于离子通道。目前, 植物细胞中的研究主要集中在对 cAMP 依赖型蛋白激酶的查寻上。虽然尚未从植物组织中纯化出 cAMP 依赖的蛋白激酶 A, 但在多种植物的提取物中证明依赖于 cAMP 磷酸化作用是存在的, 如浮萍、玉米、椰子和水稻等^[15-17]。现已在几种植物中发现有类似动物 PKA 的调节亚基(即 cAMP 的结合蛋白)和催化亚基。而且近年来报道的几个植物蛋白激酶基因与动物中 PKA 和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)催化亚基高度同源^[17-18]。虽然植物与动物 PKA 的催化亚基相似, cAMP 能激活 PKA 的催化亚基, 但并不能完成调节亚基的抑制作用, 所以植物体内可能还需其他酶的协助功能完成 PKA 的调节功能。

1.4 cAMP 调控的离子通道(cyclic nucleotide-gated channels)

在植物中建立以蛋白激酶 A 为主要目标和因素研究环核苷酸信使系统存在一定的困难, 植物中 cAMP 调控的离子通道(CNGCs)是研究环核苷酸信使系统的理想体系^[19]。CNGCs 是许多植物中一组运输蛋白质的离子通道, 另外其只由环腺苷酸激活。拟南芥 CNGCs 中就存在至少 20 种基因^[20]。

通过对 CNGCs 的功能分析发现, 拟南芥中胞外高浓度的 Ca^{2+} 抑制 K^{+} 的运动来调控 K^{+} 、 Ca^{2+} 和其他一价阳离子的运动, 并且对 K^{+} 、 Ca^{2+} 的调控都依赖于 cAMP 和 cGMP^[21]。除此之外, 植物 CNGCs 含有相同的钙调蛋白结合域(CaMBD), 但是不同的 CNGCs 拥有不同的钙调蛋白结合能力^[22]。然而钙调蛋白与 CNGCs 的结合依赖于 Ca^{2+} 并由 cAMP 激活。因此, Ca^{2+} 与钙调蛋白和环核苷酸的相互作用彼此相关联, 另外 CNGCs 与胞内钙调蛋白和环核苷酸信号共同形成胞内信号转导通路。

环核苷酸和离子通道共同参与了植物体内众多生理活动。根据 Kurosaki^[23]的研究显示, cAMP 直接调控 K^{+} 通道, K^{+} 受 cAMP 激发流入胡萝卜细胞内同时伴随着 Ca^{2+} 的快速转移, 此外还有进一步的研究显示出 cAMP 和 cGMP 在调控气孔开启具有一定的作用, 这涉及了多组离子通道。双丁酰 cAMP 引起百合花粉管中胞内 Ca^{2+} 浓度的升高, 光解释放 cAMP 使花粉管顶端弯曲, 并使储存 Ca^{2+} 的释放。 Ca^{2+} 的分布迁移是控制顶端生长的一个重要原因, 而 cAMP 是调节 Ca^{2+} 分布的主要因素^[24]。这些通道涉及的离

子运动是否是 CNGCs 还不能确定, cAMP 是直接或是间接影响离子通道的活性, 影响它们的磷酸化也尚不明确, 这些都需要进一步的研究。

2 cAMP 的生理功能

在植物界中, 对海藻的研究给我们提供了较好的研究 cAMP 生理功能的材料, 例如 cAMP 调控衣藻(*Chlamydomonas eugametos*)有性生殖和纤毛裸藻的生理节奏。在海藻的研究中发现 cAMP 的合成和分解机理, 最近已经从纤毛裸藻(*Euglena gracilis*)中成功克隆 cAMP 蛋白激酶基因^[25]。尽管植物细胞中 cAMP 信号系统的某些成分在基因水平上尚未分离, 但研究表明 cAMP 具有多种生理功能。与 cAMP 相关的生理功能的相继发现, 为植物细胞中存在 cAMP 信号途径积累了越来越多的实验证据。

细胞内 cAMP 的变化及 cAMP 相关酶生理作用的报告显示, 植物当中大量的生理活动都与 cAMP 的变化有关^[26-28]。人们发现 cAMP 在多种植物生理活动发挥作用例如离子传输。cAMP 在叶绿体中也显示具有重要的作用, 目前已经发现 cAMP 在该细胞器中完整的运行机制。

2.1 调节植物细胞生理周期

研究发现, cAMP 在众多生理过程中发挥极其重要的作用。Ehsan^[29]报道 cAMP 与烟草 BY-2 细胞的细胞分裂周期密切相关。细胞在 S 期时, cAMP 的含量达到最高在 G1 期时含量相对较低。在加入吡啶美辛(一种腺苷酸环化酶抑制剂)之后^[30], 引起细胞 S 期 cAMP 含量的降低, 并伴随减弱细胞的有丝分裂。作者认为在细胞分裂过程中存在一种前列腺素或前列腺素类似物(素萆酮酸)激活腺苷酸环化酶。

越来越多的研究显示 cAMP 在动物及真菌细胞分裂周期中发挥重要作用。cAMP 含量在连续的细胞分裂周期中发生变化, 在不同细胞类型中 cAMP 显示出具有刺激或抑制细胞增值的作用。在细胞 S 期之前, cAMP 含量的瞬时升高是引起 DNA 合成的原因之一。这说明 cAMP 作用于细胞分裂过程中重要的细胞分裂调解素。酿酒酵母细胞分裂周期也受到 Ras/cAMP 信号转导途径的高度调控^[31]。

cAMP 在调节纤毛裸藻(*Euglena gracilis*)细胞生理节奏发挥重要的作用^[32-33]。Edmunds^[34]认为通过 G1/S 和 G2/M 的协调转变从而形成生物钟和细胞分裂周期之间的联系。一项腺苷酸环化酶和磷酸二酯

酶的研究显示, AC 活性的变化受到其酶活性调节器的调节而不受酶数量的影响。在白天的任何时候加入毛喉素(forskolin)都能最大程度的激活腺苷酸环化酶活性, 此外还能减小 cAMP 含量变化的幅度以及减少细胞分裂过程中的节律性。IBMX 的实验发现磷酸二酯酶活性受时间段的抑制。然而, IBMX 也是各种磷酸二酯酶活性的抑制剂, 只是程度上各不相同而已。正是由于这个原因导致细胞周期中存在各种磷酸二酯酶, 其中某种特别的磷酸二酯酶可能是 cAMP 变化产生的原因。

在研究生物钟影响 cAMP 含量的过程中, Tong^[35]研究了 Ca^{2+} 、钙调蛋白、三磷酸肌醇和 cGMP 在腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶中的调节作用。cGMP 含量的变化先与 cAMP 含量变化。cGMP 及其类似物同样对腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶存在一定的影响。因此可以看出 cGMP 是 cAMP 代谢的调节者。

cAMP 对细胞分裂周期产生的影响主要是延缓或加速细胞周期。在细胞生物钟的白天时段加入 cAMP 会导致细胞分裂周期的延缓, 而在夜晚时段加入 cAMP 则会加速细胞分裂周期的循环。这主要是由于细胞中存在多种不同的 cAMP 受体选择性的调节一个或多个调控途径所致。在纤毛裸藻中发现两种 cAMP 蛋白激酶(cPKA 和 cPKB)与 cAMP 及其类似物联系各不相同^[36]。通过 Edmunds^[34]的实验发现, cAMP 含量的增加会抑制 DNA 的合成, 使细胞分裂停留在 G2 期, 因此抑制了细胞分裂。当 cAMP 含量减少的时候, 对细胞分裂的抑制现象消失了。我们推测细胞分裂周期从 G2 到 M 的转变及整个有丝分裂过程都受 cAMP 的影响。cAMP 对细胞分裂周期的延缓作用受 cPKA 调控, 对细胞周期的加速作用则由 cPKB 调控。由此可见, cPKA 和 cPKB 在细胞分裂周期中的表达有所不同, 至于在什么时段表达什么蛋白激酶还在研究当中^[37]。

2.2 参与植物抗病

许多研究显示植物在抗病毒过程中受 cAMP 的调控。这种应激反应系统和动物第二信使系统中的胞外信号、信号受体、及其反应机制类似^[38]。已发现多种胞外诱导子, 包括多糖、低聚糖、脂肪酸、蛋白质和糖蛋白; 另外还发现了少数信号受体, 都是一些分布在细胞质膜上的蛋白质。信号受体对外界刺激做出的反应的同时激活特殊的防御反应基因, 并诱导植物抗毒素的合成酶的产生。细胞质膜这种

接收信号的机制转接到核基因,已经多方面的运用到 Ca、素馨酮酸、活性氧、甘油二酯和磷酸肌醇、cAMP^[39]。

Oguni 首次在甘薯中发现 cAMP 调控细胞防御体系合成植物抗毒素^[40],之后在胡萝卜中也发现植物抗毒素的增加伴随着细胞内 cAMP 含量的升高^[41]。研究表明, cAMP 参与了苜蓿(*Medicago sativa* L.)抗黄萎病合成植物抗毒素所作出的应激反应^[42],苯基丙氨酸解氨酶(PAL)的活性也大幅提高催化植物抗毒素合成的前期反应。经过双丁酰 cAMP 处理的苜蓿幼苗苯基丙氨酸解氨酶活性提高,并促进美迪紫檀素(medicarpin)的合成^[43,11];通过 FAB/MIKE 光谱分析发现在细胞内源性 cAMP 在经病原激发子处理后含量升高了 4~5 倍。虽然在胡萝卜细胞中也发现了上面类似的现象,但是苜蓿幼苗经病原激发子处理后 3~5 min cAMP 含量就达到了最高水平,而胡萝卜则在 30 min 后才体现出 cAMP 含量的升高,四季豆需要 15min 达到最高反应水平^[44]。在苜蓿中,AC 刺激反应的增强和减弱都随着磷酸二酯酶的变化而变化。胡萝卜中霍乱毒素刺激其植物抗毒素的合成以及激发四季豆中苯基丙氨酸解氨酶的活性与都 G 蛋白有关^[45]。

以上的研究显示 cAMP 与植物合成抗毒素反应的过程,但是究竟如何调控植物抗毒素合成还不明确。AC 对 Ca^{2+} 的敏感性^[11]以及 cAMP 对离子通道的调控作用^[23],均显示 cAMP 的作用是通过 AC/cAMP 和 $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ 途径的对话而起作用的。尽管在胡萝卜细胞中没有明显的检测到对 cAMP 响应的蛋白激酶活性,但是 Ca^{2+} 和钙调蛋白可以快速激活。根据这些结果,我们可以推测,病原激发子诱导的 cAMP 增加可引起 Ca^{2+} 的内流, Ca^{2+} 再进一步激活蛋白激酶的活性^[24]。

2.3 对藻类有性生殖过程的调控

Pasquale 等^[46]在研究莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)雌雄配子粘合过程中发现胞内 cAMP 含量短暂性的升高了 10 倍,在单一生殖性型配子中加入外源性双丁酰 cAMP 之后可以引起雌雄配子粘合时产生的相似反应,如细胞壁的消失,鞭毛顶端的激活等。并且加入环核苷酸磷酸二酯酶抑制剂后加强外源性 cAMP 的促进作用,在配子细胞和鞭毛中发现了腺苷酸环化酶的活性。类似的 Pijst^[47]在研究卵配衣藻正负生殖型的配子混合在一起时,在粘着发

生 20s 后观察到细胞内 cAMP 含量快速升高,并且把一生殖型的配子中加入另一种生殖型的配子的离体的鞭毛时也能引起细胞内 cAMP 数量的短暂性的升高。由于这种 cAMP 浓度的提高先于细胞融合时所有形态学和生理学的改变,推测它可能是由性粘着诱导的第一个主要的反应。Gilles^[48]分别用结合蛋白实验和高效液相色谱法分析了团藻性组织细胞中的 cAMP 含量比普通组织细胞中高,发现过高浓度的 cAMP 会抑制有性生殖的性诱导,性组织的细胞仅当结合时, cAMP 浓度才会升高。在非诱雄性藻株中 10 倍或 20 倍的 cAMP 浓度升高会导致其不育,由此可见 cAMP 作为复杂的性诱导物质中的一员在细胞基质中发生作用。

3 cAMP 含量变化机制的研究

cAMP 系统的机能活动的研究主要是通过对内源性 cAMP 含量的检测来实现的。早前运用较广泛的是 Gilman 的蛋白结合检测法,这种方法基于同位素标记的 cAMP($8\text{-}^3\text{H-cAMP}$)与环核苷酸样品共同竞争特异结合蛋白, cAMP 蛋白激酶就是这种特异蛋白之一^[49]。放射免疫检测法也是常用的方法,抗体结合过量标记的抗原,通过检测未标记的抗原取代标记的具有放射性的抗原的数量来计算 cAMP 的含量。质谱、高效液相色谱及其他生物荧光方法就显得相对复杂,但是能较好地追踪活体细胞中 cAMP 的变化^[50]。此外酶免疫检测法则使用的相对更少,标记与未标记抗原共同竞争多克隆抗体,反应完全之后加入到含有碱性磷酸酶标记的第二抗体的平板中,酶活力的大小就反映所检测 cAMP 的浓度^[51]。这些技术运用得出的大量数据为植物体内 cAMP 系统的研究积累了充足的证据。

cAMP 作为第二信使并能引起相应的反应在植物细胞中普遍存在,当细胞受到外界刺激时,胞外信号分子首先与受体结合形成复合体,然后激活细胞膜上的 Gs-蛋白,被激活的 Gs-蛋白再激活细胞膜上的腺苷酸环化酶(AC),催化 ATP 脱去一个焦磷酸而生成 cAMP。生成的 cAMP 作为第二信使通过激活 PKA(cAMP 依赖性蛋白激酶),使靶细胞蛋白磷酸化,从而调节细胞反应, cAMP 最终又被磷酸二酯酶(PDE)水解成 5'-AMP 而失活。AC 和 PDE 可以从两个不同方面调节细胞内 cAMP 浓度,从而影响细胞、组织、器官的功能。当 AC 的活性升高时, cAMP 浓度升高,当 PDE 浓度增高时, cAMP 浓度降低。PDE

对 cAMP 的调控, 不仅取决于 PDE 的活化、抑制因素, 还与细胞内 PDE 的组成、亚细胞分布有关。

Goodenough^[52]在研究 cAMP 对衣藻鞭毛雌雄配子粘合作用时, 发现雌雄配子粘合引起凝集素的相互作用, 并最终导致 cAMP 含量的升高。此外 Kooijman^[53]将麦胚凝集素加入到衣藻中促使雌雄配子鞭毛粘合, 鞭毛上的锚蛋白(可能通过 G 蛋白)激活腺苷酸环化酶催化 ATP 形成 cAMP。Francisco^[54]在研究光调节几种大型海藻(网地藻、石花菜、石莼)cAMP 含量时发现, 这几种海藻在红光和远红外光的照射下, 并未发生光敏反应 cAMP 含量有一定的升高, 在白光照射下 cAMP 含量大幅升高, 在一定范围内 cAMP 含量随着光照强度升高而升高, 因此他们推测其 cAMP 含量的积累受光合效能的调节, 而不受光敏素的影响。由此可以看出, cAMP 很大程度上受新陈代谢产生的 ATP 的影响, 而光合作用产生 cAMP 的前体例如 ATP, 但是 cAMP 含量的降低是否与 ATP 合成的抑制有关还不能确定。

4 小结

综上所述 cAMP 信使系统是生物体调控众多生理过程的主要信息传递系统, 调节活动过程中出现细胞内的 cAMP 含量的变化, 证明了 cAMP 在调节机体整体活动的协调性和精确性等方面所起的主要作用。目前对藻类细胞内的 cAMP 信使系统研究较少, 只集中在几种衣藻和单细胞微藻当中; 此外, 对于 cAMP 的研究只仅限于其含量变化, 对 cAMP 的相关酶及其结合蛋白的研究则几乎为零, 因此对 cAMP 的调控机制还需要进行广泛而系统的研究。除了检测生理过程中 cAMP 和 cAMP 相关酶活性的波动变化之外, 对 cAMP 响应的蛋白激酶、结合蛋白和他们的靶目标将是今后研究的主要重点。另外, 质谱、生化分析、免疫组织化学技术、结合高压冷冻技术及分子蒸馏法的运用将有助于 cAMP 和 cAMP 结合位点的亚细胞定位, 用细胞化学分析方法对 AC 酶进行定位; 采用分子生物学技术分析 AC 和 PDE 的基因结构, 用反义或 RNA 干扰技术抑制这些酶控制的 cAMP 瞬间升高变化, 同时用 cAMP 类似物调控激酶或 cAMP 结合位点的活性等。

参考文献:

[1] Wachstein M, Meisel E. Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH with a special ref-

erence to the demonstration of bile canaliculi[J]. American Journal of Clinical Pathology, 1957, 27: 13-23.

- [2] Yount R G, Babcock D, Ballentyne W, et al. Adenylyl-imidodiphosphate: an adenosine triphosphate analog containing a P-N-P linkage[J]. Biochemistry, 1971, 10: 2484-2489.
- [3] Al-azzawi M J, Hall J L. Cytochemical localization of adenyl cyclase activity in maize roots[J]. Plant Science Letters, 1976, 6: 285-289.
- [4] Hilton G M, Nesius K K. Localization of adenyl cyclase in meristems of young pea hypocotyls[J]. Physiologia Plantarum, 1978, 42: 49-52.
- [5] Rougier M, Jnoud N, Dumas C. Cytochemical study of adenylate cyclase in pollen-pistil interactions and its relation to incompatibility[C]//Cresti M, Gori P, Pacini E. Sexual reproduction in higher plants. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1988. 363-368.
- [6] Curvetto N, Delmastro S. A biochemical and physiological proposal for stomatal movement : possible involvement of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1990, 28: 367-378.
- [7] Gadeyne J. Het cyclisch 3':5'-adenosine monofosfaat metabolisme in *Phaseolus vulgaris* L. PhD thesis[D]. Belgium: University of Antwerp (UIA), 1992.
- [8] Carricarte V C, Bianchini G M, Muschietti J P, et al. Adenylate cyclase activity in a higher plant, alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Biochemical Journal, 1988, 249: 807-811.
- [9] Lusini P, Tralbalzini L, Franchi G G, et al. Adenylate cyclase in roots of *Ricinus communis*; stimulation by GTP and Mn^{2+} [J]. Phytochemistry, 1991, 30: 109-111.
- [10] Pacini B, Petrigliano A, Brown E G, et al. Adenylyl cyclase activity in roots of *Pisum sativum*[J]. Phytochemistry, 1993, 34: 899-903.
- [11] Cooke C J, Smith C J, Walton T J, et al. Evidence that cyclic AMP is involved in the hypersensitive response of *Medicago sativa* to a fungal elicitor[J]. Phytochemistry, 1994, 35: 899-995.
- [12] Wood H N, Lin M C, Braun A C. The inhibition of plant animal adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by a cell division promoting substance from tissues of *Pinus radiata*[J]. Biochemical

- Journal, 1972, 175: 931-936.
- [13] Giannattasio M, Sica G, Macchia V. Cyclic AMP phosphodiesterase from dormant tubers of Jerusalem artichoke[J]. *Phytochemistry*, 1974, 13: 2729-2733.
- [14] Lin P-P C, Varner J E. Cyclic nucleotide phosphodiesterase in pea seedlings[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1972, 276: 454-474.
- [15] Biermann B, Johnson E M, Feldman L J. Characterization and distribution of a maize cDNA encoding a peptide similar to the catalytic region of second messenger dependent protein kinases[J]. *Plant Physiol*, 1990, 94: 1609-1615.
- [16] Hayashida N, Mizoguchi T, Shinozaki K. Cloning and characterization of a plant gene encoding a protein kinase[J]. *Gene*, 1993, 124: 251-255.
- [17] Lin X, Feng X H, Watson J C. Differential accumulation of transcripts encoding protein kinase homologs in greening pea seedlings[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 6951-6955.
- [18] Trewavas A J, Rodrigues C, Rato C. Cyclic nucleotides: the current dilemma[J]. *Current Opinion Plant Biol*, 2002, 5: 425-429.
- [19] Talke I N, Blaudez D, Maathuis P, et al. CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling[J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 286-293.
- [20] Leng Q, Mercier R W, Hua B-G, et al. Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels[J]. *Plant Physiol*, 2002, 128: 400-410.
- [21] Kohler C, Neuhaus G. Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from *Arabidopsis thaliana*[J]. *FEBS Lett*, 2000, 4710: 133-136.
- [22] Hua B G, Mercier R W, Zielinski R E, et al. Functional interaction of calmodulin with the plant cyclic nucleotide-gated cation channel[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2003, 41, 945-954.
- [23] Kurosaki F. Role of inward K^+ channel located at carrot plasma membrane in signal cross talking of cyclic AMP with Ca^{2+} cascade[J]. *FEBS Letters*, 1997, 408: 115-119.
- [24] Tsuruhara A, Tezuka T. The relationship between the self incompatibility and cAMP level in *Lilium longiflorum*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42, 1234-1238.
- [25] Kiriya H, Nanmori T, Hari K, et al. Identification of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from the photosynthetic flagellate *Euglena gracilis*[J]. *FEBS Lett*, 1991, 450: 95-100.
- [26] Newton R P, Kingston E E, Hakeem N A, et al. Extraction, purification, identification and metabolism of 3',5'-cyclic-UMP, 3',5'-cyclic IMP and 3',5'-cyclic dTMP from rat tissues[J]. *Biochemical Journal*, 1986, 236: 431-439.
- [27] Assmann S M. Cyclic AMP as a second messenger in higher plants[J]. *Plant Physiology*, 1995, 108: 885-889.
- [28] Bolwell G P. Cyclic AMP, the reluctant messenger in plants[J]. *Trends in Biochemical Science*, 1995, 20: 489-492.
- [29] Ehsan H, Reichheld J-P, Roef L. Effect of indomethacin on cell cycle dependent cyclic AMP fluxes in tobacco BY-2 cells[J]. *FEBS Letters*, 1998, 442: 165-169.
- [30] Wang T, Sheppard J R, Foker J E. Rise and fall of cyclic AMP required for onset of lymphocyte DNA synthesis[J]. *Science*, 1978, 201: 155-157.
- [31] Baroni M D, Monti P, Alberghina L. Repression of growth-regulated G1 cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast[J]. *Nature*, 1994, 371: 339-342.
- [32] Carre I A, Edmunds LN Jr. cAMP-dependent kinases in the algal flagellate *Euglena gracilis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 2135-2137.
- [33] Edmunds L N Jr. Clocks, cell cycles, cancer, and aging. Role of the adenylate cyclase-cyclic AMP-phosphodiesterase axis in signal transduction between circadian oscillator and cell division cycle[J]. *Annals of the New York Academy of Science*, 1994, 719: 77-96.
- [34] Roger P P, Reuse S, Maenhaut C. Multiple facets of the modulation of growth by cAMP[J]. *Vitamins and Hormones*[J]. *Nucleotide Research*, 1995, 51: 59-191.
- [35] Tong J, Carre IA, Edmunds LN. Circadian rhythmicity in the activities of adenylate cyclase and phosphodiesterase in synchronously dividing and stationary-phase cultures of the achlorophyllous ZC mutant of *Euglena gracilis*[J]. *Journal of Cell Science*, 1991, 100: 365-369.
- [36] Desdouets C, Matesic G, Molina C A. Cell cycle regula-

- tion of cyclin A gene expression by the cyclic AMP responsive transcription factors CREB and CREM[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15: 3301-3309.
- [37] Barlat I, Henglein B, Plet A. TGF-beta 1 and cAMP attenuate cyclin A gene transcription via a cAMP responsive element through independent pathways[J]. *Oncogene*, 1995, 11: 1309-1318.
- [38] Ward AC, Csar XF, Hofmann BW, et al. Cyclic AMP inhibits expression of D-type cyclins and cdk4 and induces p27Kip1 in G-CSF-treated NFS-60 cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 224: 10-16.
- [39] Baroni MD, Monti P, Alberghina L. Repression of growth-regulated G1 cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast[J]. *Nature*, 1994, 371: 339-342.
- [40] Oguni I, Suzuki K, Uritani I. Terpenoid induction in sweet potato roots by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate[J]. *Agricultural Biological Chemistry*, 1976, 40: 1251-1252.
- [41] Lee S H, Johnson J D, Wlash M P. Differential regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca^{2+} concentration[J]. *Biochem J*, 2000, 350: 299-306.
- [42] Edmunds LN Jr. Clocks, cell cycles, cancer, and aging. Role of the adenylate cyclase-cyclic AMP phosphodiesterase axis in signal transduction between circadian oscillator and cell division cycle[J]. *Annals of the New York Academy of Science*, 1994, 719: 77-96.
- [43] Tong J, Carre I A, Edmunds L N. Circadian rhythmicity in the activities of adenylate cyclase and phosphodiesterase in synchronously dividing and stationary-phase cultures of the achlorophyllous ZC mutant of *Euglena gracilis*[J]. *Journal of Cell Science*, 1991, 100: 365-369.
- [44] Tong J, Edmunds L N. Role of cGMP in the mediation of circadian rhythmicity of the adenylate cyclase-cyclic AMP-phosphodiesterase system in *Euglena*[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1993, 45: 2087-2091.
- [45] Carre I A, Edmunds L N Jr. Oscillator control of cell division in *Euglena*: cyclic AMP oscillations mediate the phasing of the cell division cycle by the circadian clock[J]. *Journal of Cell Science*, 1993, 104: 1163-1173.
- [46] Pasquale S M, Goodenough UW. Cyclic AMP functions as a primary sexual signal in gametes of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Cell Biol*, 1987, 105: 2279-2292.
- [47] Pijst H, Van Driel R, Janssens PM W, et al. Cyclic AMP is involved in sexual reproduction of *Chlamydomonas eugametos*[J]. *FEBS Lett*, 1984, 174: 132-136.
- [48] Gilles R, Moka R, Gilles C, et al. Cyclic AMP as an intraspheroidal differentiation signal in *Volvox carteri* [J]. *FEBS*, 1985, 184: 309-312.
- [49] Roef L, Witters E, Gadeyne J, et al. Analysis of 3' : 5'-CAMP and adenylate cyclase activity in higher plants using polyclonal chicken egg yolk antibodies to adenylate cyclase[J]. *Anal Biochem*, 1996, 233, 188-196.
- [50] Fagan K A, Schaack J, Zweifach A, et al. Adenovirus encoded cyclic nucleotide-gated channels: a new methodology for monitoring cAMP in living cells[J]. *FEBS Lett*, 2001, 500: 85-90.
- [51] Egorov A M, Osipov A P, Dzantiev B B, et al. Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza (Theory and Practice of Enzyme Immunoassay)[M]. Moscow: Vysshaya Shkola, 1991.
- [52] Goodenough W. Cyclic AMP enhances the sexual agglutinability of *chlamydomonas* flagella[J]. *Cell Biology*, 1989, 109: 247-253.
- [53] Kooijman R, Piet D W, Wies B, et al. Cyclic AMP is one of the intracellular signals during the mating of *Chlamydomonas eugametos* [J]. *Planta*, 1990, 181: 529-537.
- [54] Francisco J L. Gordillo, María Segovia. et al. Cyclic AMP levels in several macroalgae and their relation to light quantity and quality[J]. *Plant Physiol*, 2004, 161: 211-217.

(本文编辑: 梁德海)