引用：魏情情，刘晓艺，门淑珍. 拟南芥 *AtHSD* 基因家族的功能研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版)，2026，39(6)：950-960.
Citation：Wei Qingqing，Liu Xiaoyi，Men Shuzhen. Functional studies of the *AtHSD* gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition)，2026，39(6)：950-960.
文章编号 1672-6634(2026)06-0950-11 **DOI** 10.19728/j.issn1672-6634.2026030014

拟南芥 *AtHSD* 基因家族的功能研究

魏情情，刘晓艺，门淑珍

(南开大学 生命科学学院 植物生物学和生态学系，天津 300071)

摘要 短链脱氢酶/还原酶(SDRs)是一类依赖 NAD(P)(H)辅酶的氧化还原酶，广泛参与生物体的多种生命活动。然而，目前对植物 SDR 家族成员，特别是拟南芥羟基类固醇脱氢酶(AtHSD)家族的系统研究仍较为缺乏。为探究其功能，本研究综合运用生物信息学、分子生物学及遗传学方法，对拟南芥*AtHSD* 基因家族进行了系统分析。结果显示：该家族共有 8 个成员，其中*AtHSD1b* 和*AtHSD7* 分别是拟南芥基因组中*AtHSD1a* 和*AtHSD4* 的串联重复拷贝。AtHSD 成员之间具有较高的序列同源性，且 AtHSD2 与 AtHSD3 同源性最高。表达模式分析表明，各成员具有组织特异性：*AtHSD2* 和*AtHSD3* 在各器官中普遍高表达，*AtHSD1a/b* 与*AtHSD4/7* 主要在根中表达，而*AtHSD5* 与*AtHSD6* 则在角果、种子及发育中的胚中优势表达。亚细胞定位实验证实，AtHSD 蛋白主要定位于内质网，同时观察到点状荧光信号，推测该点状信号对应脂滴。在正常生长条件下，单基因突变体(*Athsd2*、*Athsd5*)未出现显著表型变化，提示该家族成员间可能存在功能冗余。本研究分析了 AtHSD 家族的表达模式与亚细胞定位，为进一步解析该家族在植物生长发育中的生物学功能提供了实验依据。

关键词 短链脱氢酶/还原酶家族；羟基类固醇脱氢酶；表达模式；亚细胞定位；突变体
中图分类号 Q943.2 **文献标志码** A

Functional studies of the *AtHSD* gene family in *Arabidopsis thaliana*

WEI Qingqing，LIU Xiaoyi，MEN Shuzhen

(Department of Plant Biology and Ecology，College of Life Sciences，Nankai University，Tianjin 300071，China)

Abstract Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) are a class of NAD(P)(H)-dependent oxidoreductases that are widely involved in various biological processes. However，systematic research on plant SDR family members，particularly the Arabidopsis hydroxysteroid dehydrogenase (AtHSD) family，remains relatively scarce. To explore their functions，this study conducted a systematic analysis of the Arabidopsis *AtHSD* gene family using bioinformatics，molecular biology，and genetics approaches. The results showed that this family comprises eight members，among which *AtHSD1b* and *AtHSD7* are tandem duplicates of *AtHSD1a* and *AtHSD4*，respectively，in the Arabidopsis genome. Members of the AtHSD family share high sequence homology，with AtHSD2 and AtHSD3 exhibiting the highest similarity. Ex-

收稿日期：2026-03-18
基金项目：国家自然科学基金项目(32370271)资助
通信作者：门淑珍，女，汉族，博士，教授，博士生导师，研究方向：植物分子生物学，E-mail：shuzhenmen@nankai.edu.cn。

pression pattern analysis revealed tissue specificity among the members: *AtHSD2* and *AtHSD3* are ubiquitously and highly expressed in various organs; *AtHSD1a/b* and *AtHSD4/7* are predominantly expressed in roots; while *AtHSD5* and *AtHSD6* are preferentially expressed in siliques, seeds, and developing embryos. Subcellular localization experiments confirmed that AtHSD proteins are primarily localized to the endoplasmic reticulum, with punctate fluorescent signals also observed that are speculated to correspond to lipid droplets. Under normal growth conditions, single-gene mutants (*Athsd2*, *Athsd5*) did not exhibit significant phenotypic changes, suggesting potential functional redundancy among family members. This study analyzed the expression patterns and subcellular localization of the AtHSD family members, providing experimental evidence for further elucidation of the biological functions of this family in plant growth and development.

Keywords short-chain dehydrogenase/reductase family; hydroxysteroid dehydrogenase; expression patterns; subcellular localization; mutants

0　引言

羟基类固醇脱氢酶(Hydroxysteroid dehydrogenases, HSDs)属于短链脱氢酶/还原酶(short-chain dehydrogenase, SDRs)超家族，是一类依赖辅酶 NAD(P)(H)的氧化还原酶[1-5]。该类酶通过调控羟基类固醇类物质(包括多种激素与信号分子)的生物合成与代谢，影响其活性与稳态，从而广泛参与生物体的生理生化过程[6-7]。

在动物系统中，HSD 的功能与机制研究已较为成熟[8]。以哺乳动物为例，11β-羟基类固醇脱氢酶(11β-HSD)的两种同工酶 11β-HSD1 与 11β-HSD2，虽共同参与糖皮质激素活性的调控，但其分子特性与生理功能迥异[9-10]。11β-HSD1 主要定位于内质网胞质侧，以 NADPH 为辅酶，在肝脏和前体脂肪细胞中催化活性皮质酮转化为无活性的 11-脱氢皮质酮(氧化反应)；而在成熟脂肪细胞中，它也能反向催化还原反应[11]。相比之下，11β-HSD2 严格依赖 NAD^+，定位于肾脏、结肠、胎盘等组织的上皮细胞，单向催化皮质酮氧化为 11-脱氢皮质酮，其核心功能是防止糖皮质激素受体被过量糖皮质激素激活，并避免靶器官中激素的异常积累[12-13]。此外，17β-羟基类固醇脱氢酶(17β-HSD)家族成员广泛分布于性腺、乳腺、前列腺等组织，通过调控性激素(如睾酮与雌二醇)的胞内水平，直接影响生殖发育、肿瘤发生及代谢过程[14-15]。上述研究不仅揭示了 HSD 在动物激素级联反应中的重要功能，也表明其在代谢网络中具有多底物催化潜能和复杂的调控机制[16-17]。

在植物中，Persson 等人检测了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)SDR 超家族的 138 个蛋白[18]，发现其中 41%属于 $NADP^+$ 依赖的“经典”SDR 家族。尽管 11-羟基固醇底物尚未得到鉴定，但基因组测序结果显示，拟南芥共存在 8 个 *HSD* 类似基因，均编码 SDR 家族成员，含有“Rossmann-fold”结构域，催化 NAD(P)(H)依赖的 11β 和 17β-羟基类固醇的氧化还原反应。基于数据库信息推测，在 NAD(P)(H)存在下，AtHSD 通过氧化还原反应催化 11β-羟基固醇与 11β-酮基固醇、17β-雌二醇与 17β-雌酮等醇类与酮类物质之间的相互转化[19]。目前仅有 *AtHSD1* 的功能得到初步阐释。研究表明，AtHSD1 蛋白特异性定位于成熟种子胚细胞的脂滴表面；体外酶活实验证实其具有广泛的底物谱，能够以 NAD(P)(H)为辅酶，催化皮质醇、雌二醇等多种 11β-或 17β-羟基类固醇的脱氢或还原反应[20]。功能上，*AtHSD1* 参与调节植物对油菜素甾醇(Brassinosteroid, BR)和脱落酸(Abscisic acid, ABA)的敏感性。过表达 *AtHSD1* 可显著促进拟南芥和油菜的营养生长与种子产量，表现为莲座叶增大、茎秆粗壮、角果数增加及种子萌发率提高等，这些表型与 BR 过量表达相似[21]。上述发现表明 *AtHSD1* 与植物激素信号转导及生长发育密切相关。然而，拟南芥 *AtHSD* 家族中其他基因的表达模式、所编码蛋白的亚细胞定位及其生物学功能仍未有研究报道。

本研究通过生物信息学方法明确了 AtHSD 家族成员的基本理化性质；利用 RT-PCR、定量 PCR 和 GUS 报告基因检测系统，探究了 *AtHSD* 基因的组织表达水平；通过构建融合表达载体，对烟草和拟南芥分别进行瞬时转化和稳定遗传转化，明确 AtHSD 家族的亚细胞定位情况；并通过观察 *AtHSD* 基因突变体的

表型,初步探究 *AtHSD* 基因家族的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型 Col-0 和本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)种子由本实验室保存。T-DNA 插入突变体 SALK_123315、SALK_073492、SALK_041915 种子均购买自 ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)种子库。植物培养条件为:温度 22 ℃,光照强度设定为 120 μmol·m^{-2}·s^{-1},光周期 16 h 光照/8 h 黑暗,湿度 60%～70%。

1.1.2 载体与菌种 克隆构建所用大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α,烟草瞬时转化和拟南芥遗传转化所用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) C58C1 菌株,均由本实验室保存。植物表达载体 pBA002、pBA002-EGFP、pGREENII0229-GUS、pGREENII0229-EGFP 均由本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 拟南芥*AtHSD* 基因家族的生物信息学分析 利用 NCBI 和 TAIR 网站获取拟南芥 *AtHSD* 基因家族成员的相关序列,并进行染色体定位分析,以展示各成员在染色体上的分布。采用 MEGA 软件进行多序列比对及进化树构建。基于拟南芥 GFF3 文件和基因家族成员的 ID 号,提取每个成员的 UTR(untranslated region)、外显子及内含子信息,进而利用 GSDS 在线网站(http://gsds.gao-lab.org/)绘制基因结构示意图。

1.2.2 基因表达量分析 使用 Trizol 提取植物组织总 RNA,利用反转录试剂盒将总 RNA 反转为 cDNA。以 cDNA 为扩增模板,*AtACTIN2* 基因作为内参,进行 RT-PCR 反应。以 cDNA 为扩增模板,*AtTIP41* 基因作为内参,进行 RT-qPCR 反应,采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算相对表达量。

1.2.3 载体构建与转基因株系筛选 以 7 日苗龄野生型拟南芥 Col-0 幼苗的 cDNA 为模板,PCR 扩增 *AtHSD* 家族成员的编码区(CDS)。以野生型拟南芥 Col-0 基因组 DNA 为模板,扩增各基因起始密码子上游约 1500～2000 bp 的启动子区域。将扩增产物经相应限制性内切酶酶切后,连接至经同样酶切的 pBA002 或 pGREENII0229-GUS 等植物表达载体,转化大肠杆菌 DH5α,筛选阳性克隆并测序验证。重组质粒转化农杆菌 C58C1 菌株,采用花苞浸泡法转化野生型拟南芥。收获 T1 代种子,于 37 ℃烘箱干燥 1～2 周。然后将种子均匀地撒播在湿润的土壤上,待种子萌发后喷施 Basta 除草剂溶液(0.02%)进行抗性苗的筛选,直到出现黄化苗为止(约连续喷施 5 天)。获得的阳性植株待生长到 3 周龄时可进行 PCR 鉴定。单株收获 T2 代种子,重复上述筛选步骤,统计抗性分离比,并挑选单拷贝株系继续筛选至 T3 代,获得纯合株系。

1.2.4 GUS 组织化学染色 选取 *ProAtHSD*:*GUS* 转基因拟南芥不同发育时期、不同组织部位的样品,放入 GUS 染色液(50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)、0.5 mmol/L 铁氰化钾、0.5 mmol/L 亚铁氰化钾、0.1% TritonX-100、0.5 mg/L X-Gluc)中,于 37 ℃温育。染色时长根据基因表达强度进行调整,其中 *ProAtHSD5*:*GUS* 和 *ProAtHSD6*:*GUS* 转基因植株,分别在 37 ℃染色 11 h 和 15 h。接下来,用固定剂(无水乙醇∶冰乙酸= 3∶1)处理 2～4 h,70%乙醇(脱色剂)处理 2 h。之后用透明剂(水合氯醛∶水∶甘油的比例为 8∶3∶1)浸泡处理,透明时长取决于样品的染色情况。透明完全后,在体视显微镜和高级正置显微镜下进行观察,并拍照记录。

1.2.5 蛋白质亚细胞定位分析 将构建好的质粒载体转入农杆菌 C58C1 感受态细胞中,挑选单菌落进行 PCR 鉴定,并摇菌扩大培养。配制农杆菌活化液($MgCl_2$ 10 mmol/L、MES 10 mmol/L pH 5.7、AS 20 μmol/L)重悬菌体,调 OD600 至 0.6 左右,28 ℃黑暗放置 3 h。选取生长 4 周的本氏烟叶片进行下表皮渗透注射,培养 2～3 天,取标记的农杆菌注射叶片制片,激光共聚焦显微镜下观察(GFP 激发光波长 488 nm,接收光波长 496～518 nm;内质网红色分子标记(CD3-959)激发光波长 561 nm,接收光波长 570～620 nm,并拍照。

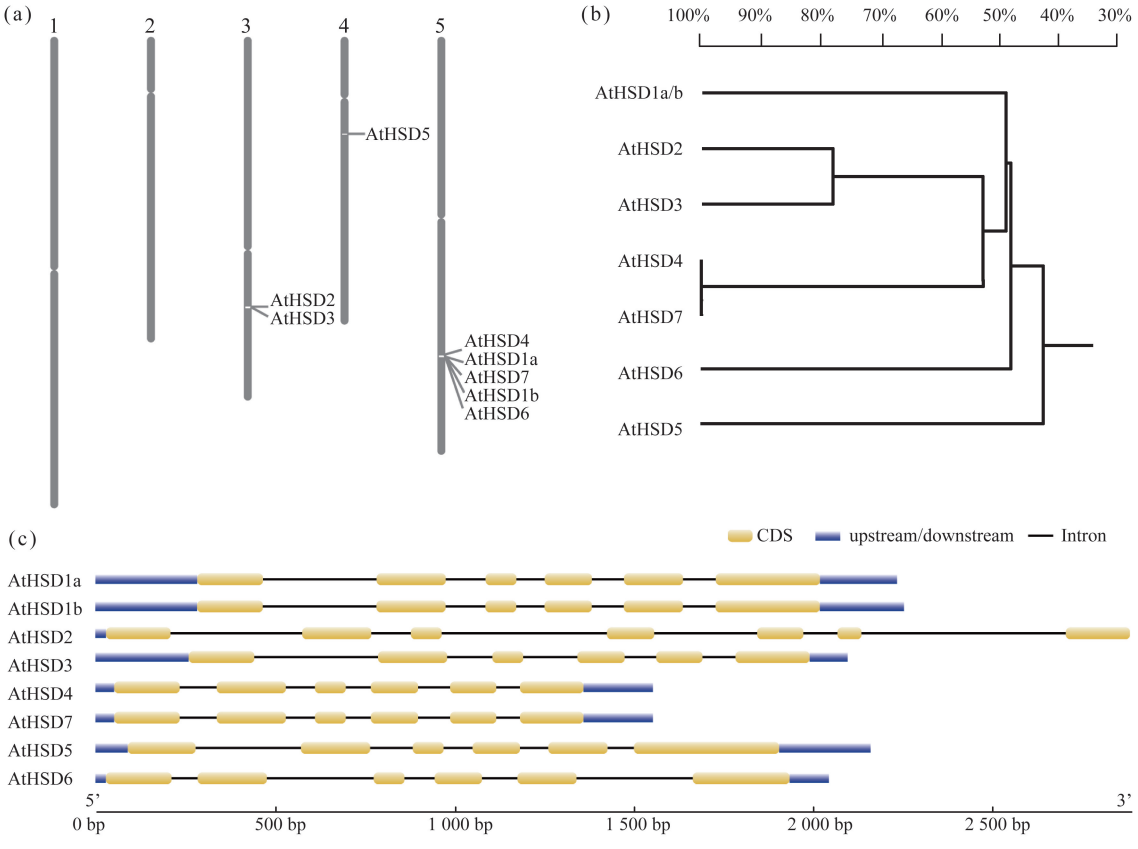
1.2.6 拟南芥突变体表型分析 用扫描仪扫描 5 天苗龄的拟南芥幼苗,或者在体视显微镜下进行观察和拍照,用 ImageJ 测量根长、下胚轴长。用相机对拟南芥成熟植株进行图像采集,对莲座直径、株高等生理指标进行测量观察与记录。

2　结果与分析

2.1　拟南芥*AtHSD* 基因家族的生物信息学分析

拟南芥 *AtHSD* 基因家族包括 8 个成员。*AtHSD*2（AT3G47350）与 *AtHSD*3（AT3G47360）位于第 3 号染色体；*AtHSD*5（AT4G10020）位于第 4 号染色体；*AtHSD*1*a*（AT5G50600）、*AtHSD*1*b*（AT5G50700）、*AtHSD*4（AT5G50590）、*AtHSD*6（AT5G50770）及 *AtHSD*7（AT5G50690）位于第 5 号染色体。在第 5 号染色体上，*AtHSD* 基因区域存在串联重复现象。其中，*AtHSD*1*b* 和 *AtHSD*7 分别为 *AtHSD*1*a* 和 *AtHSD*4 的复制拷贝；*AtHSD*4 与 *AtHSD*1*a*、*AtHSD*7 与 *AtHSD*1*b* 在基因组上彼此相邻，如图 1（a）。*AtHSD*4 与 *AtHSD*7 的基因组序列、CDS 序列、cDNA 序列及蛋白质序列完全一致。*AtHSD*1*b* 的基因组序列和 cDNA 序列在 3′非翻译区（UTR）比 *AtHSD*1*a* 多 20 bp，但其 CDS 序列及编码的蛋白质序列与 *AtHSD*1*a* 一致。基因结构分析显示，*AtHSD*2 含有 7 个外显子，其余 7 个成员均含有 6 个外显子，如图 1（c）。

蛋白序列比对结果显示，AtHSD 家族成员之间具有较高的序列相似性。其中 AtHSD2 与 AtHSD3 的氨基酸序列相似性最高（75.7%），其余成员之间的相似性多介于 40%至 50%之间。为进一步阐明家族成员之间的进化关系，采用邻接法（Neighbor-Joining，NJ）构建系统进化树，并采用 bootstrap 检验（1 000 次重复）评估各分支的置信度，如图 1（b）。系统发育分析表明，AtHSD 家族成员可分为三个分支：分支 I 包含 AtHSD1a/1b、AtHSD2、AtHSD3 与 AtHSD4/7，其中 AtHSD2 与 AtHSD3 的亲缘关系最近；分支 II 由 AtHSD5 单独构成；分支 III 由 AtHSD6 单独构成。



注：（a）*AtHSD* 基因家族在染色体上的定位；（b）AtHSD 家族成员进化分支图；（c）*AtHSD* 基因结构图。

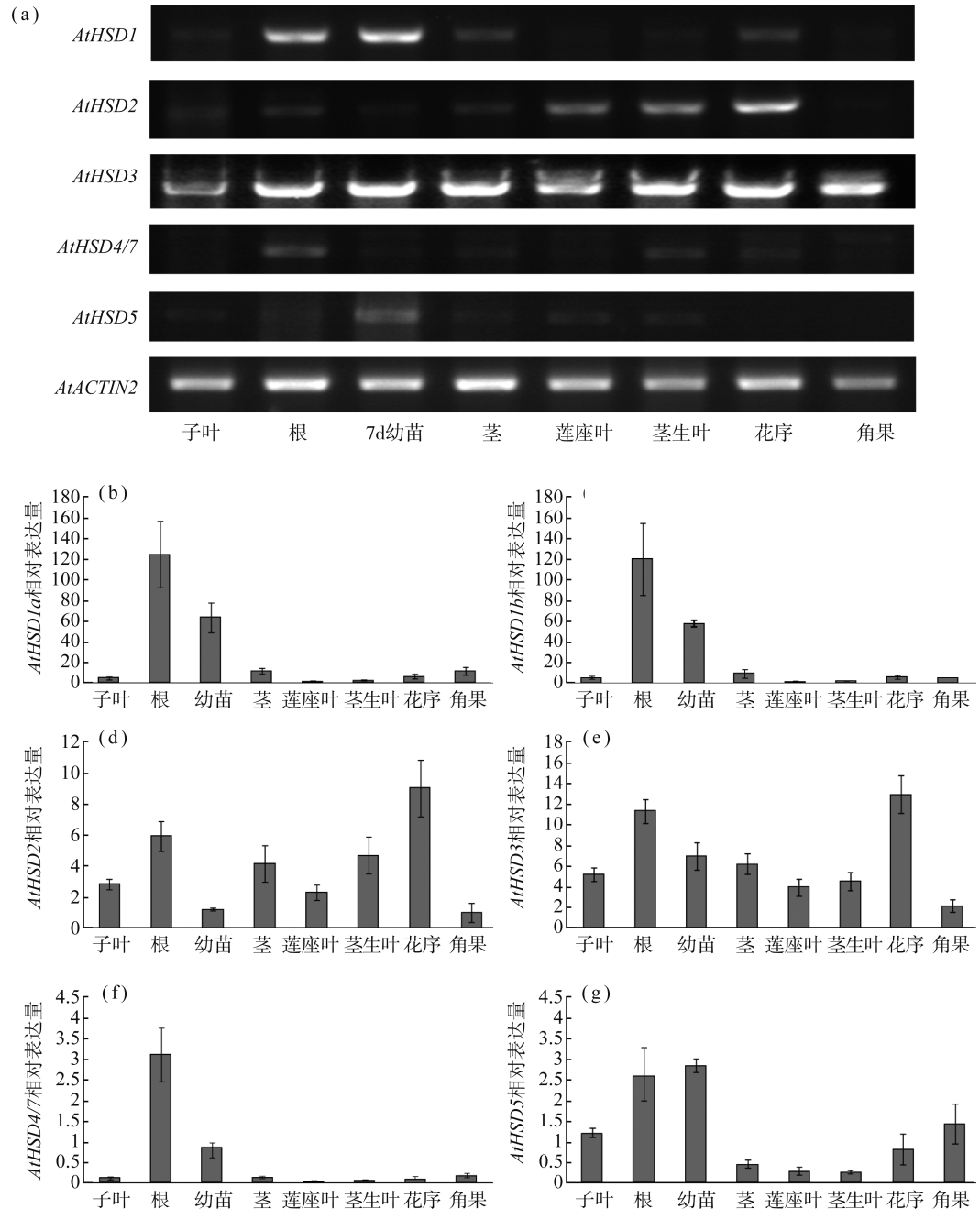
图 1　拟南芥*AtHSD* 基因家族的染色体定位、系统进化树及基因结构分析

Fig. 1　Chromosomal localization, phylogenetic tree, and gene structure analysis of the *Arabidopsis AtHSD* gene family

2.2　*AtHSD* 基因家族的组织表达水平分析

为探究拟南芥 *AtHSD* 基因家族成员的时空表达模式，本研究利用半定量 RT-PCR 和荧光定量 PCR 技术，检测 Col-0 野生型拟南芥 7 日龄幼苗及其子叶和根，以及 6 周龄植株的茎、莲座叶、茎生叶、花序和角果

等不同组织中 *AtHSD* 基因的表达水平。结果表明,*AtHSD*2 和 *AtHSD*3 在检测的各个组织中均有表达,且在花序中的表达水平明显较高,在根中次之;并且在各组织中,*AtHSD*3 表达水平均高于 *AtHSD*2,如图 2(a)。*AtHSD*1、*AtHSD*4/7 和 *AtHSD*5 基因在幼苗的根中表达水平明显较高,如图 2(b~g),本研究中未检测到 *AtHSD*6 的表达信号,推测可能与其表达水平较低有关。



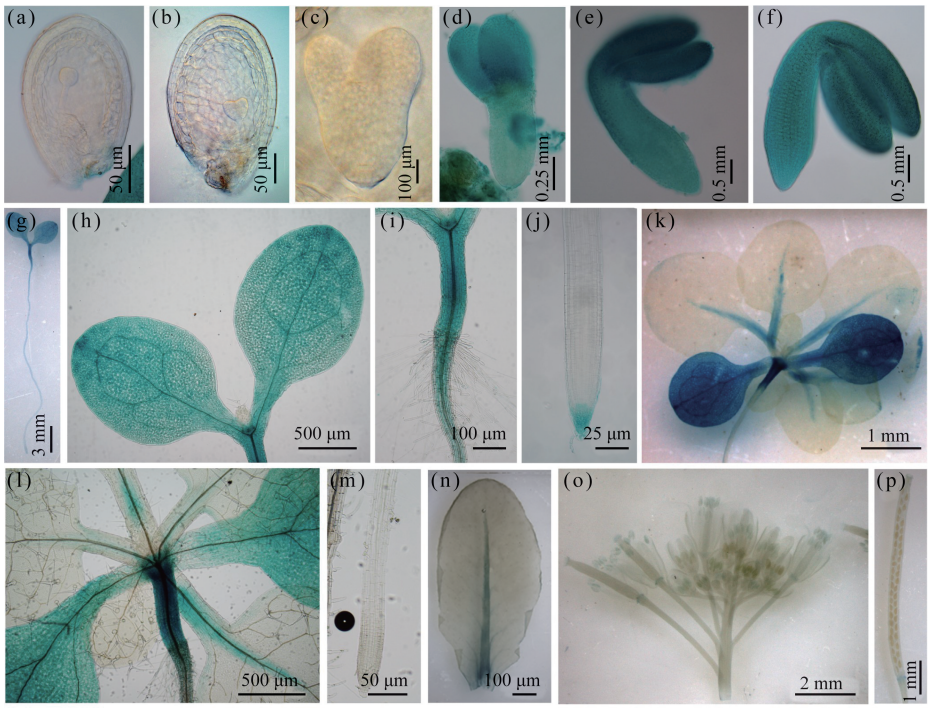
注:(a)半定量 RT-PCR 检测 *AtHSD* 基因在拟南芥不同组织中的表达量;(b~g)定量 PCR 检测 *AtHSD1a* 、*AtHSD1b* 、*AtHSD2*、*AtHSD3*、*AtHSD4/7*、*AtHSD5* 的相对表达水平。

图 2 *AtHSD* 基因在拟南芥不同组织中的表达水平

Fig. 2 Expression levels of the *AtHSD* genes in different tissues of *Arabidopsis thaliana*

为进一步探究拟南芥 *AtHSD* 基因的组织特异性表达,本研究对 *ProAtHSD*:*GUS* 转基因植株进行了不同组织的 GUS 染色检测。*AtHSD*5 和 *AtHSD*6 在胚胎发育后期表达量较高,尤其在拐杖期与成熟期,发育早期几乎检测不到 GUS 信号。其中,*AtHSD*6 在鱼雷期的表达显著高于 *AtHSD*5(图 3、4)。幼苗期,*ProAtHSD*5:*GUS* 在 5 日龄幼苗中染色较深,子叶与下胚轴尤为明显;在两周龄莲座叶中,其在子叶和下胚轴的表达仍较强,新生叶叶柄及茎尖生长点仅检测到较弱表达;而在 3 周龄莲座叶、花序及角果中表达均较

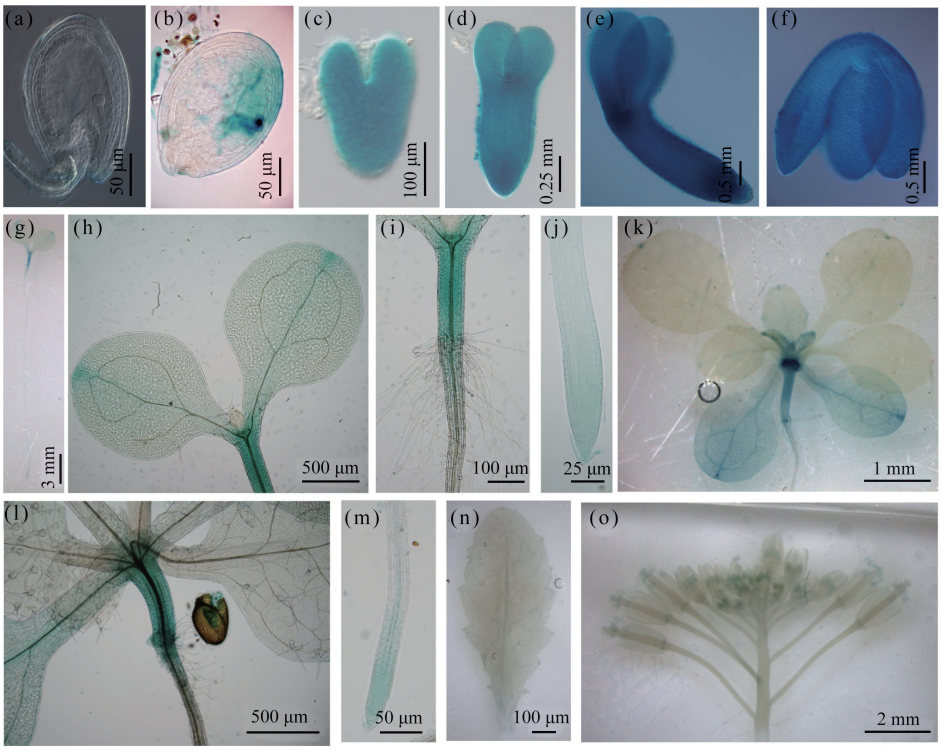
弱(图 3)。整体而言，*AtHSD6* 的表达水平较 *AtHSD5* 更弱(图 3、4)。



注：(a) 球形期；(b) 心形期；(c) 早期鱼雷期；(d) 晚期鱼雷期；(e) 拐杖期；(f) 成熟期；(g) 5 日龄幼苗；(h) 5 日龄幼苗子叶放大图；(i) 5 日龄幼苗下胚轴及与根部连接处放大图；(j) 5 日龄幼苗根尖放大图；(k) 2 周龄植株；(l) 2 周龄植株茎尖生长点放大图；(m) 2 周龄植株根尖放大图；(n) 3 周龄植株莲座叶；(o) 花序；(p) 角果。

图 3　*ProAtHSD5*：*GUS* 在不同组织中的表达模式

Fig. 3　Expression pattern of *ProAtHSD5*：*GUS* in different tissues

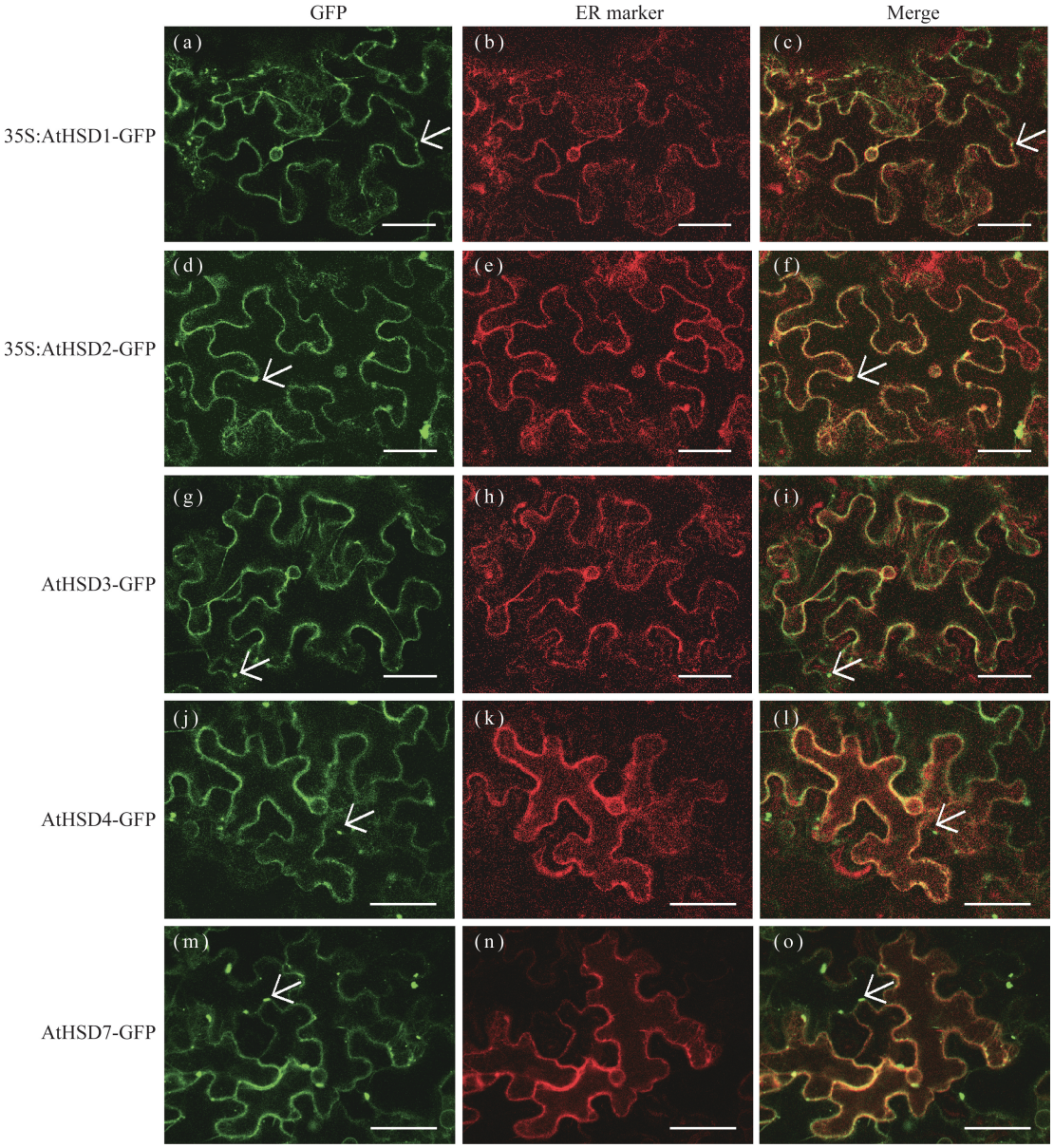


注：(a) 球形期；(b) 心形期；(c) 早期鱼雷期；(d) 晚期鱼雷期；(e) 拐杖期；(f) 成熟期；(g) 5 日龄幼苗；(h) 5 日龄幼苗子叶放大图；(i) 5 日龄幼苗下胚轴及与根部连接处放大图；(j) 5 日龄幼苗根尖放大图；(k) 2 周龄植株；(l) 2 周龄植株茎尖生长点放大图；(m) 2 周龄植株根尖放大图；(n) 3 周龄植株莲座叶；(o) 花序。

图 4　*ProAtHSD6*：*GUS* 在不同组织中的表达模式

Fig. 4　Expression pattern of *ProAtHSD6*：*GUS* in different tissues

2.3 AtHSD 蛋白的亚细胞定位



注:(a～c)、(d～f)、(g～i)、(j～l)、(m～o) 分别代表 AtHSD1、AtHSD2、AtHSD3、AtHSD4、AtHSD7 与 ER marker (CD3-959)在本氏烟草叶片下表皮细胞的共定位情况;箭头标示细胞中的点状荧光信号;标尺 25 μm。

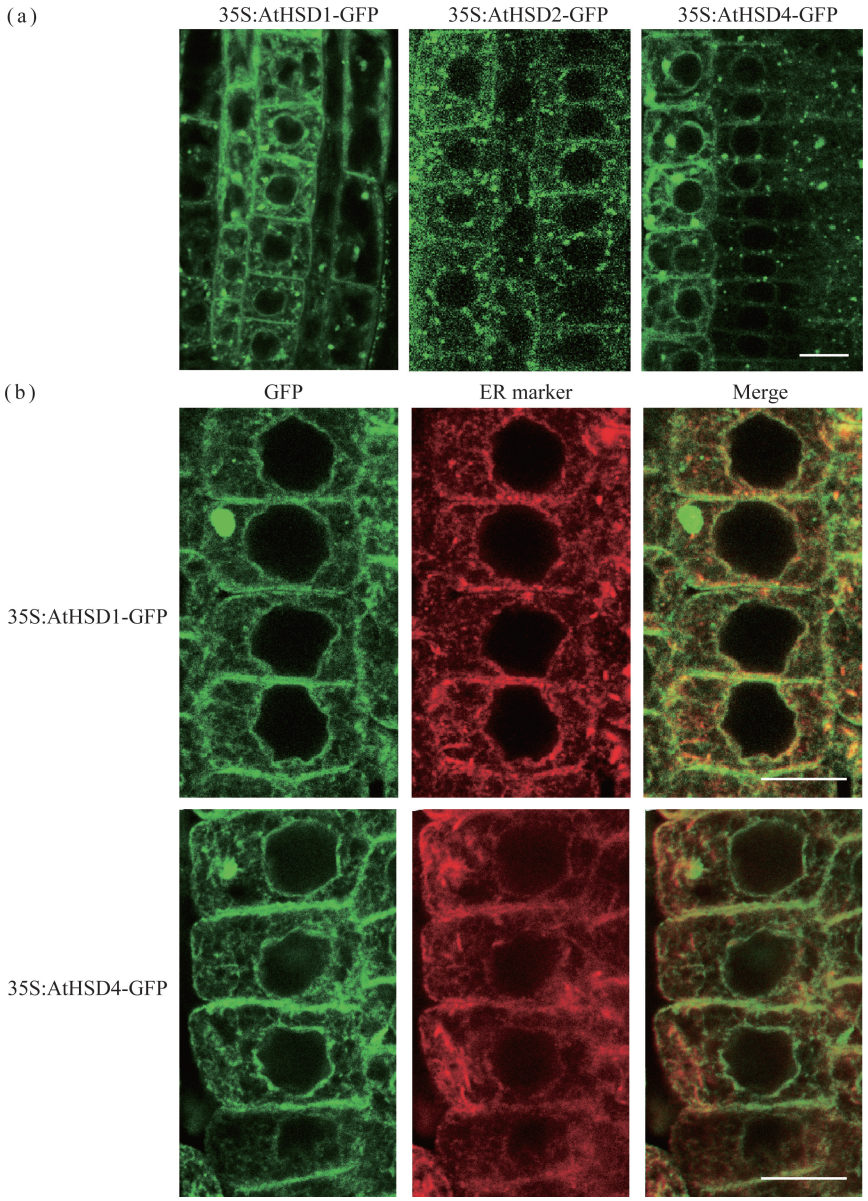
图 5 AtHSD 蛋白在本氏烟草叶片表皮细胞中的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of AtHSD proteins in epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* leaves

为了研究拟南芥 AtHSD 家族蛋白在细胞内的定位情况,本研究将组成型 *35S* 启动子驱动的 *35S: AtHSD1-GFP* 和 *35S: AtHSD2-GFP* 以及基因组序列与 *GFP* 融合的 *AtHSD3-GFP*、*AtHSD4-GFP* 和 *AtHSD7-GFP* 分别与内质网标记(ER marker)*CD3-959*,共转化农杆菌 C58C1,随后利用本氏烟草叶片进行瞬时转化实验。通过激光共聚焦显微镜观察转化后的烟草叶片下表皮细胞,检测 AtHSD 家族蛋白的亚细胞定位情况。结果显示,AtHSD1/2/3/4/7 的绿色荧光信号与 CD3-959 的红色荧光共定位(图 5 a-o);同时在细胞质中可观察到明显的点状荧光信号,推测这些点状结构为脂滴。上述结果表明,AtHSD1/2/3/4/7 蛋白主要定位于内质网,并可能在脂滴中有分布。

本研究同时获得了 *35S: AtHSD1-GFP*、*35S: AtHSD2-GFP* 和 *35S: AtHSD4-GFP* 的转基因拟南芥植株,用于明确 AtHSD 家族蛋白在拟南芥细胞中的亚细胞定位情况。对 5 日龄幼苗根尖细胞的激光共聚焦观察结果显示,AtHSD1、AtHSD2、AtHSD4 均定位于内质网,且在细胞中呈现不规则点状分布(图 6a)。结

合已有文献报道，这些点状信号可能为脂滴[20]。随后，选取*35S: AtHSD1-GFP* 、*35S: AtHSD4-GFP* 转基因拟南芥 5 日龄幼苗的根尖，进行蛋白质免疫荧光原位杂交实验。结果发现，在拟南芥幼苗的根尖分生区细胞中，AtHSD1 和 AtHSD4 的绿色荧光信号均能够与内质网标记的红色荧光信号发生共定位，如图 6(b)，进一步证明 AtHSD1 和 AtHSD4 在拟南芥细胞中定位于内质网。



注：(a) AtHSD1、AtHSD2 和 AtHSD4 在拟南芥根尖分生区细胞的亚细胞定位；标尺 2.5 μm；(b) AtHSD1、AtHSD4 在拟南芥根尖分生区细胞中与内质网标记(ER marker)的共定位情况；标尺 5 μm。

图 6　AtHSD1、AtHSD2、AtHSD4 在拟南芥根尖分生区细胞的定位情况

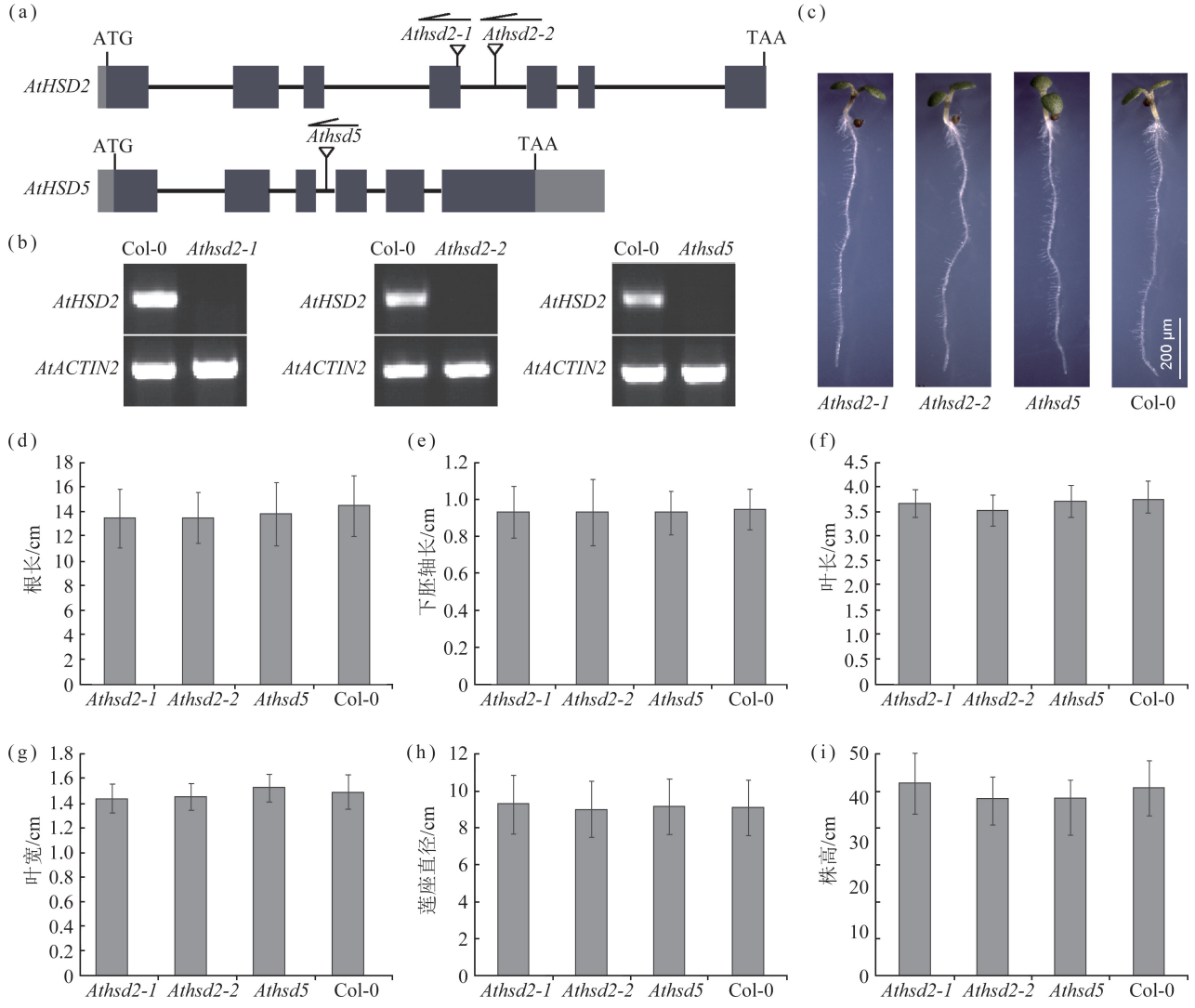
Fig. 6　Localization of AtHSD1, AtHSD2, and AtHSD4 in meristematic cells of *Arabidopsis thaliana* root tips

2.4　拟南芥*AtHSD* 基因突变体鉴定及表型分析

由于 *AtHSD* 基因在染色体上存在重复拷贝，对部分 *AtHSD* 基因的 T-DNA 插入突变体进行基因型鉴定时，未能筛选获得纯合突变株系。在 *AtHSD2* 突变体株系中，*Athsd2*-1(SALK_073492)的 T-DNA 插入位点位于第 4 个外显子，*Athsd2*-2(SALK_123315)的插入位点位于第 4 个内含子，二者分别位于 ATG 下游 1 514 bp 和 1 673 bp 处。*Athsd5*(SALK_141915)突变体的 T-DNA 插入位点位于第 3 个内含子，如图 7(a)。提取突变体植株的基因组 DNA 进行 PCR 检测后，确定三者均为纯合突变体。进一步通过半定量 RT-PCR 检测发现，这些突变体中几乎检测不到相应 *AtHSD* 基因的表达，如图 7(b)，因此判断其为基因敲

除突变体,可用于后续表型分析。

为探究 *AtHSD* 基因的功能,我们观察了 Col-0 野生型及 *Athsd*2-1,*Athsd*2-2 和 *Athsd*5 单基因突变体在正常生长条件下幼苗和成苗的表型。结果显示,与野生型相比,各单基因突变体在幼苗根长、下胚轴长度、五周苗龄莲座叶的叶片长度与宽度,以及成熟植株的株高等方面均无明显差异,如图 7(c～i)。这表明,单独缺失 *AtHSD*2 或 *AtHSD*5 基因对拟南芥的生长发育无显著影响。



注:(a) *AtHSD2* 与 *AtHSD5* 基因结构图及突变体 T-DNA 插入位点,其中深灰色框代表外显子,横线代表内含子,浅灰色框代表 5′和 3′ UTR;(b) RT-PCR 显示 *Athsd2-1*,*Athsd2-2* 与 *Athsd5* 突变体为基因敲除突变体,*AtACTIN2* 作为内参;(c～e) *Athsd2-1*,*Athsd2-2*,*Athsd5* 和 Col-0 在 1/2 MS 培养基上生长 5 天时的状态及根长、下胚轴长统计;(f～h) *Athsd2-1*,*Athsd2-2*,*Athsd5* 和 Col-0 4 周龄植株莲座叶的叶片长度和宽度及莲座直径统计;(i) *Athsd2-1*,*Athsd2-2*,*Athsd5* 和 Col-0 成熟植株的株高统计。

图 7 *Athsd2* 与 *Athsd5* 突变体的鉴定与表型分析

Fig. 7 Identification and phenotypic analysis of *Athsd2* and *Athsd5* mutants

3 讨论

蛋白质作为基因的编码产物,在维持生物体正常生命活动中发挥重要作用,其功能通常与其亚细胞定位密切相关。本研究发现,AtHSD 家族成员(AtHSD1、AtHSD2、AtHSD3、HSD4/7)在瞬时转化的烟草细胞和稳定转化的拟南芥细胞中均主要定位于内质网,并伴随清晰可辨的点状荧光信号。已有研究报道 AtHSD1 定位于成熟种子胚细胞的脂滴表面[11, 20],结合本研究中点状信号与内质网标记共存的现象,我们推测这些点状信号很有可能对应脂滴。这一发现具有重要的理论意义:提示 AtHSD 家族蛋白可能在内质网与脂滴之间存在动态转运或功能联系。内质网是植物固醇和中性脂生物合成的核心场所,而脂滴则负责

储存中性脂（如三酰甘油）。AtHSD 家族成员同时定位于这两个细胞器，暗示其可能参与脂代谢与固醇代谢的协同调控[20]。类似的双重定位现象在动物 HSD 同源蛋白中也有报道，例如小鼠 17β-HSD11 同样定位于内质网并关联脂滴[22]。本研究为植物 HSD 家族在脂代谢-固醇代谢交叉调控网络中的潜在功能提供了重要的亚细胞定位证据，也为后续探索植物固醇代谢与脂滴生物学之间的联系开辟了新方向。

系统进化与表达模式分析表明，AtHSD 家族成员呈现明显的功能分化趋势。其中，AtHSD2 与 AtHSD3 的氨基酸序列相似性最高（75.7%），且二者在所检测的组织中均呈高水平表达，表现出组成型表达模式，提示它们可能是 *AtHSD* 家族中发挥主要功能的成员。*AtHSD*5 与 *AtHSD*6 均在胚胎发育后期和成熟种子中高表达，且其启动子区含有胚乳发育相关的顺式作用元件，推测它们可能参与胚和胚乳的后期发育过程。此外，*AtHSD*1*a*/1*b* 和 *AtHSD*4/7 在根中表现出极强的组织特异性表达，暗示它们可能在根系发挥独特的生理功能，例如参与根尖分生组织活性的维持或次生代谢产物的合成。然而，目前 AtHSD 参与的具体代谢通路尚不明确。在动物中，17β-HSD 通过催化性激素（如睾酮与雌二醇）的最终活化与失活，精确调控生殖发育和性成熟过程[23]。基于此，我们提出以下假设：AtHSD 可能通过催化特定固醇类物质的氧化还原转化，参与调控拟南芥的生长发育，尤其是根、花序和胚的发育及配子体发生。这一假设不仅拓展了我们对植物固醇代谢网络的认识，也为探讨动植物在固醇/类固醇调控通路上的趋同或趋异演化提供了比较研究的切入点。

初步表型分析显示，在正常生长条件下，*Athsd*2 和 *Athsd*5 单基因突变体均未表现出明显的形态或发育异常。这提示 *AtHSD* 家族成员之间可能存在功能冗余，或其生理功能仅在特定环境胁迫（如干旱、盐碱、营养缺乏）或特定发育阶段（如胚后期发育、种子休眠、萌发）中才得以体现。后续研究可利用 RNAi 或 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建多基因敲降或敲除突变体，结合非生物胁迫处理、固醇代谢物靶向检测及脂质组学分析，进一步揭示 AtHSD 家族在植物固醇代谢网络中的生化功能和生理贡献。

综上所述，本研究通过系统的生物信息学、分子生物学和遗传学分析，首次全面揭示了拟南芥 *AtHSD* 基因家族的序列特征、表达模式和亚细胞定位，初步验证了其在正常生长条件下的遗传冗余性。这些发现为后续深入解析该家族在植物生长发育及环境适应中的分子机制奠定了基础。此外，本研究揭示了植物与动物 HSD 蛋白在亚细胞定位和功能分化上的相似性及其植物特异性，为理解 SDR 超家族在真核生物中的演化保守性与功能多样性提供了重要数据支持。

参　考　文　献

[1] Jörnvall H, Hedlund J, Bergman T, et al. Superfamilies SDR and MDR: from early ancestry to present forms. Emergence of three lines, a Zn-metalloenzyme, and distinct variabilities[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 396(1): 125-130.

[2] Moummou H, Kallberg Y, Tonfack L B, et al. The Plant Short-Chain Dehydrogenase (SDR) superfamily: genome-wide inventory and diversification patterns[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(1): 219.

[3] Kramm A, Kisiela M, Schulz R, et al. Short-chain dehydrogenases/reductases in cyanobacteria[J]. The FEBS Journal, 2012, 279(6): 1030-1043.

[4] FILLing C, BERNDT K D, BENACH J, et al. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases[J]. Journal of Biological Chemistry, 2022, 277(28): 25677-25684.

[5] Jörnvall H, Persson B, Krook M, et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)[J]. Biochemistry, 1995, 34(18): 6003-6013.

[6] Kavanagh K L, Jörnvall H, Persson B, et al. Medium-and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(24): 3895-3906.

[7] Tanaka N, Nonaka T, Nakanishi M, et al. Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family[J]. Structure, 1996, 4(1): 33-45.

[8] Moeller G, Adamski J. Multifunctionality of human 17β-hydroxysteroid dehydrogenases[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006, 248(1/2): 47-55.

[9] Hult M, Elleby B, Shafqat N, et al. Human and rodent type 1 11β-hydroxysteroid dehydrogenases are 7β-hydroxycholesterol dehydrogenases involved in oxysterol metabolism[J]. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2004, 61(7): 992-999.

[10] Kristan K, Brunskole M, Stojan J, et al. Two homologous fungal carbonyl reductases with different substrate specificities[J]. Chemico-Biological Interactions, 2009, 178(1/2/3): 295-302.

[11] Bujalska I J, Kumar S, Stewart P M. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? [J]. The Lancet, 1997, 349(9060): 1210-3.

[12] Albiston A L, Obeyesekere V R, Smith R E, et al. Cloning and tissue distribution of the human 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1994, 105(2): R11-R17

[13] Dube S, Norby B J, Pattan V, et al. 11β-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 activity in subcutaneous adipose tissue in humans: implications in obesity and diabetes[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2015, 100(1): E70-E76.

[14] Lanišnik Rižner T, Moeller G, Thole H H, et al. A novel 17β-hydroxysteroid dehydrogenase in the fungus Cochliobolus lunatus: new insights into the evolution of steroid-hormone signalling[J]. Biochemical Journal, 1999, 337(3): 425-431.

[15] Moeller G, Adamski J. Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 301(1/2): 7-19.

[16] Oppermann U C T, Filling C, Jörnvall H. Forms and functions of human SDR enzymes[J]. Chemico-Biological Interactions, 2001, 130: 699-705.

[17] Kwon Y J, Son D H, Chung T H, et al. A review of the pharmacological efficacy and safety of licorice root from corroborative clinical trial findings[J]. Journal of Medicinal Food, 2020, 23(1): 12-20.

[18] Fujimoto Y, Itabe H, Jun S K, et al. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2004, 1644(1): 47-59.

[19] D'andréa S, Canonge M, Beopoulos A, et al. At5g50600 encodes a member of the short-chain dehydrogenase reductase superfamily with 11β-and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase activities associated with *Arabidopsis thaliana* seed oil bodies[J]. Biochimie, 2007, 89(2): 222-229.

[20] Baud S, Dichow N R, Kelemen Z, et al. Regulation of HSD1 in seeds of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(8): 1463-1478.

[21] Li F, Asami T, Wu X, et al. A putative hydroxysteroid dehydrogenase involved in regulating plant growth and development[J]. Plant Physiology, 2007, 145(1): 87-97.

[22] Tsachaki M, Odermatt A. Subcellular localization and membrane topology of 17β-hydroxysteroid dehydrogenases[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2019, 489: 98-106.

[23] Andersson S, Moghrabi N. Physiology and molecular genetics of 17β-hydroxysteroid dehydrogenases[J]. Steroids, 1997, 62(1): 143-147.

(责任编辑:刘庆松)

(上接第940页)

[27] Peng C, Zhou T, Wei P, et al. Regulation of the rutile/anatase TiO_2 phase junction in-situ grown on —OH terminated Ti_3C_2T (MXene) towards remarkably enhanced photocatalytic hydrogen evolution[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 439: 135685.

[28] Liang X X, Gao T, Cui Y Q, et al. Photoreforming of poly(ethylene-terephthalate) plastic into valuable chemicals and hydrogen over $BiVO_4/MoO_x$: synergistic promotion of oxidation and reduction processes[J]. Applied Catalysis B: Environment and Energy, 2024, 357: 124326.

[29] Du M M, Zhang Y, Kang S L, et al. Trash to treasure: photoreforming of plastic waste into commodity chemicals and hydrogen over MoS_2-tipped CdS nanorods[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(20): 12823-12832.

[30] Zong X, Yan H J, Wu G P, et al. Enhancement of photocatalytic H_2 evolution on CdS by loading MoS_2 as cocatalyst under visible light irradiation[J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(23): 7176-7177.

[31] Li Z P, Huang W X, Liu J X, et al. Embedding CdS@Au into ultrathin $Ti_{3-x}C_2T_y$ to build dual Schottky barriers for photocatalytic H_2 production[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(14): 8510-8520.

[32] O'Hayre R, Nanu M, Schoonman J, et al. Mott-Schottky and charge-transport analysis of nanoporous titanium dioxide films in air[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2007,111(12): 4809-4814.

[33] Sellers M C K, Seebauer E G. Measurement method for carrier concentration in TiO_2 via the Mott-Schottky approach[J]. Thin Solid Films, 2011, 519(7): 2103-2110.

[34] Peng C, Wei P, Li X Y, et al. High efficiency photocatalytic hydrogen production over ternary $Cu/TiO_2@Ti_3C_2T_x$ enabled by low-work-function 2D titanium carbide[J]. Nano Energy, 2018, 53: 97-107.

[35] Xiao R, Zhao C X, Zou Z Y, et al. In situ fabrication of 1D CdS nanorod/2D Ti_3C_2 MXene nanosheet Schottky heterojunction toward enhanced photocatalytic hydrogen evolution[J]. Applied Catalysis B: Environment and Energy, 2020, 268: 118382.

(责任编辑:陈梦圆)