

植物叶绿体和线粒体的超微弱发光

张新华 杨洪强*

山东农业大学园艺学院, 泰安 271018

Ultraweak Bioluminescence of Chloroplast and Mitochondria in Plants

ZHANG Xin-Hua, YANG Hong-Qiang*

College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Taian 271018

提要 介绍叶绿体和线粒体的超弱发光基础, 以及各自的发光特点与影响因素。

关键词 叶绿体; 线粒体; 超弱发光

随着现代光子计数技术的发展, 现已发现几乎所有的活组织或细胞在代谢过程中都能自发地辐射出一种极其微弱的光子流^[1,2]。这种光不同于荧光素-荧光素酶体系那样的高效率生物发光, 而是一种极其微弱的低水平的化学发光(强度为 $10^5 \sim 10^8 \text{ hV} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), 称为生物系统的超微弱发光(ultraweak or superweak bioluminescence, UWL)^[3,4]。目前的研究表明, UWL与生物系统的氧化代谢、细胞凋亡、光合作用、生长调节以及能量转换等都有密切的关系^[5~7]。活细胞的这种超微弱发光是一种来自细胞内的本原的信号。检测这种本原信号, 破译其所携带的与生命活动相关的信息, 可以了解各种生命过程的真实现象。

近代物理学的理论表明, 核外电子获得的能量会跃迁到激发态, 当由激发态回到基态时会发出相应波长的光来。生物物理与生物化学的研究表明, 为维持正常的生命活动, 细胞内不断进行着各种各样的由电子传递引发的生物氧化反应。在这些反应中, 一些生物大分子获得能量而被激发, 其核外电子从基态向较高能级的激发态跃迁, 处于激发态的电子很不稳定, 当其回落到低能级轨道时会以光子的形式向外辐射能量, 因而发出各种强度的光, 其中包括强度只有 $10^5 \sim 10^8 \text{ hV} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ 的超微弱发光。线粒体和叶绿体是进行生物氧化的主要细胞器, 也是产生超弱发光的主要部位。本文着重介绍叶绿体和线粒体的UWL。

1 叶绿体和线粒体的发光基础

线粒体和叶绿体是细胞内进行能量转换的细胞器。线粒体广泛存在于各类真核细胞中, 叶绿

体存在于植物细胞中, 它们能将光能、化学能转换成驱动细胞进行生命活动所需要的生物能。它们的形态特征都是封闭的双层单位膜结构, 且内膜经过折叠并演化为表积极大扩增的内膜特化结构系统——线粒体的嵴和叶绿体的类囊体。内膜是能量转换的载体, 大量扩增的内膜为线粒体的氧化磷酸化和叶绿体光合作用的化学反应提供了场所与框架。在线粒体内膜上存在有关氧化磷酸化的电子传递链(呼吸链), 在叶绿体的类囊体膜上有进行光合磷酸化的电子传递链。这两条链按一定的顺序和方向排列。其次, 它围成了一个包含能催化其它细胞生命化学反应的多种酶的内膜(基质)^[8], 从而构成了一个生物氧化还原反应的完整体系。

在自然情况下, 叶绿体就像一个精致微观的换能器, 不断地将光能转换为化学能贮存在有机分子中。此时, 反应中心的激发态叶绿素a分子只能进行一种高效率的反应, 即光氧化反应, 而不会发生电子传递的逆转。停止光照后光合需要的能量来源截断, 反应中心原初光化学反应推动的一系列复杂的电子传递过程、质子的跨膜运输以及与之相偶联的光合磷酸化过程都停止下来, CO_2 的同化过程也停下来。光氧化裂解水释放电子的途径受阻, 光系统II反应中心 P^+_{680} 只有从 Pheo^- 夺取一个电子填补空穴, 从而造成电子传递

收稿 2003-02-08 修定 2003-10-22

资助 山东省优秀中青年科学家奖励基金项目(No. 02BS021)。

* 通讯作者(E-mail: hqyang@sdau.edu.cn, Tel:0538-8249660)。

的逆转和激发态分子 P_{680}^* 的形成。 P_{680}^* 以光子的形式释放能量回到基态时, 就产生反应中心电荷重合时的发光。这样, 贮存在 ATP 中的部分能量又重新以光子的形式由叶绿素分子释放出来^[9]。Eva和Humio^[10]曾指出叶绿体类囊体膜光合磷酸化电子传递链上的电子泄漏, 能产生大量的活性氧基团, 叶绿素分子受激发, 于是产生生物光子发射。此外, 叶绿体的形成和数量也影响 UWL 的强度^[11]。

线粒体是生物体的能量供应站, 也是糖、脂肪、氨基酸最终氧化释能的场所。线粒体还是细胞中产生活性氧的一个重要部位。Chance等^[12]证明, 在正常生理情况下约有2%的氧消耗于线粒体活性氧的产生。生成的活性氧主要是超氧阴离子自由基和过氧化氢。它们是由呼吸链底物端漏出的电子引起氧分子单电子还原而生成的。线粒体的自由基代谢水平, 或呼吸链的电子漏程度以及由其所控制的能量转换和生物体的代谢活性, 都可直接影响 UWL 强度的变化。线粒体的完整性对 UWL 的强度也有调节作用^[3]。

2 叶绿体超微弱发光的特点

目前, 还不能将 UWL 与植物的某一生理过程或某一化学反应联系起来而圆满解释植物超弱发光现象。但普遍认为植物的 UWL 和外界光激发有直接关系。叶绿体是植物进行光能吸收、转化、能量贮存的场所。所以, 许多研究者认为植物的 UWL 与植物光形态建成和光合作用等生长代谢过程有密切联系。

李韶山和潘瑞炽^[13]报道, 蓝光和其它光明显影响水稻幼苗叶绿体的发育和光合作用。李德红等^[14]研究发现不同的光质对水稻幼苗的 UWL 也有很大影响, 在白光下生长的水稻幼苗的 UWL 比蓝光下高 30%~65%。这可能是因为蓝光处理后水稻幼苗叶绿体的发育受阻, 叶中叶绿素 a 和叶绿素 b 含量降低, 其光合速率远远低于普通白光处理的水稻所致。王维江等^[11]在黄化绿豆芽实验中发现, 从暗不见光的黄化幼苗开始到光下培养 3 h 后, 随着光培养时间的延长, 其光诱导的延迟发光强度也随之加强, 不同部位的 UWL 强度不同, 胚芽发光最强, 胚轴上和子叶次之, 未变绿的胚轴下部与根部最小(接近本底)。李德红等^[15]

发现, 绿豆和花生幼苗在光形态建成期间 UWL 逐渐增强, 恰好与叶绿体的发育过程相对应; 而在黄花苗中则观测不到这种现象, 完成光形态建成的正常幼苗根中没有叶绿素, 其光诱导的 UWL 强度也非常低。他们的实验还发现, 植物叶片的 UWL 与其所处的生长发育阶段密切相关。叶片是植物进行光合作用的主要器官, 成熟叶片的光合作用强, 其 UWL 也较强; 光合作用相对较弱的叶片, 如未展开的幼叶、伸长叶和老叶的 UWL 强度较弱。洒金榕 (*Codiaeum variegatum*) 是一种色素缺失型植物, 其叶片上间杂有许多黄色斑点。谭石慈等^[9]研究其叶片的 UWL 时观察到, 叶片的黄色斑点和叶脉在超弱发光图象中呈现为暗区, 而叶片的绿色部分则呈现为亮区。这说明洒金榕叶片的绿色部分有 UWL, 而黄色部分没有。他们进一步取叶片的黄色和绿色部分, 分别提取色素进行检测时发现, 黄色部分只含有胡萝卜素和叶黄素, 而绿色部分除这两种色素之外还含有叶绿素 a、b。

为进一步确认 UWL 的性质, 许多学者对植物叶片的 UWL 光谱特性进行了研究。李德红等^[15]发现, 花生叶片在 427.3 和 496.5 nm 处各有一很强的峰, 在 707.8 和 730.3 nm 处各有一较强的峰。经比较发现, UWL 光谱分布特征与叶绿素的吸收光谱很相似, 只是峰值明显向长波方向偏移。他们还根据花生叶片的 UWL 衰减曲线证明这种 UWL 不是叶绿素分子的延迟荧光或磷光, 而可能是来自光合作用两个光系统 (PS I、PS II) 的能量遗失。谭石慈等^[9]研究白菜叶片和叶绿体的 UWL 光谱时发现, 叶片与叶绿体的 UWL 光谱极为相似。二者在 485、580~590、650、685、725~735 nm 附近均存在较强的峰, 发光强度随着时间的延长而很快地衰减, 但光谱分布基本保持不变。叶片与叶绿体之间发光光谱的这种一致性说明叶片的 UWL 主要来自叶绿体。此外, 李德红等^[16]还对白菜叶绿体的 UWL 机制进行了研究。他们观察到, 无论是将叶绿体悬浮在等渗溶液(完整叶绿体)还是在低渗溶液(破碎叶绿体)中都有非常明显的 UWL, 而上清液则观察不到 UWL; 若在纯净的上清液中加入叶绿体, 又可观察到 UWL, 但向上清液中加入叶绿素则观测不到

UWL。将上述叶绿体放入低温(4℃)中保存5 d, 其UWL均明显下降。较低浓度的自由基清除剂抗坏血酸(2 mmol·L⁻¹)和甘露醇(10 mmol·L⁻¹)对叶绿体UWL的影响不明显; 浓度增大到10倍时, 甘露醇处理的UWL比不作处理的降低28.69%, 抗坏血酸处理的UWL十分微弱。百草枯(0.05 mmol·L⁻¹)对叶绿体UWL的影响也较明显, 使用浓度越高, UWL越弱, 5~10 mmol·L⁻¹百草枯可完全抑制叶绿体的UWL^[16]。众所周知, 百草枯会释放大量的氧自由基。据此, 可以认为叶绿体的UWL可能主要来自光合作用的电子传递链, 而不能简单地归因于该过程的自由基。

3 线粒体的超微弱发光特点

许多研究表明, UWL与生物体的生理生化和病理状态密切相关^[7]。而生物的生理状态在一定程度上是依赖于线粒体的自由基代谢水平或呼吸链的电子漏程度的。当生物体受伤、环境胁迫或发生肿瘤等疾病时, 线粒体即参与细胞的凋亡和坏死过程, 线粒体的电子传递链持续产生超氧自由基并伴有呼吸链电子漏偏高的现象^[17]。Abeles^[3]发现, 当生物体处于上述情况时, 其UWL也有明显的变化。苏震等^[18]发现损伤后的大豆种子发光强度是损伤前的2倍以上。杨起简等^[19]发现在盐胁迫下豌豆幼苗的呼吸和线粒体氧化磷酸化能力受到损害, 同时, 幼苗的UWL强度也明显降低。研究植物UWL动力学和植物抗逆性的结果表明, 在极限逆境条件下细胞死亡或解体时, 不论致死原因如何, 在死亡前都有发光增强的现象^[20]。癌变细胞与正常细胞、受毒与未受毒细胞的超弱发光也有明显的差异。例如, 肿瘤病人的血清和尿液的UWL强度明显高于正常人^[21]。张仲伦等^[22]在动物脏器官的实验中也发现, 10种正常的脏器官的发光值没有明显的差异, 每分钟计数约为497; 而荷瘤之后各种脏器官发光值明显增加, 每分钟计数达到2 479, 增强近5倍。很明显, 上述生物体UWL的变化部分是因逆境和疾病影响了线粒体内正常的生物氧化过程所致。

虽然生物的UWL受多种因素的影响, 目前对其来源与机制有多种推测, 但从线粒体的功能与UWL的变化与影响因素来看, 线粒体对生物的超弱发光应当有一定的贡献。有人从线粒体与

UWL之间关系的角度对此问题进行了探索。例如, 毛大璋^[23]用电子传递链的抑制剂NaN₃处理萌发绿豆, 观测到NaN₃对UWL的抑制率高达72%, 说明萌发绿豆至少有72%的UWL和呼吸作用等氧化过程相关联。Bon等^[24]发现牛心脏的线粒体可产生UWL, 向线粒体中加入乙醛、ATP或抗霉素A时, UWL即增强。Gorlanov和Churmasov^[25]用X-射线处理菜豆线粒体, 看到线粒体最大发光值与线粒体的氧化磷酸化系统的活跃程度密切相关。李光林和杨亚玲^[26]用电磁场处理绿豆后, 也观测到绿豆萌芽时的UWL和ATP含量的变化趋势一致, 并指出电场、磁场对生物UWL强度和ATP含量的影响在于种子萌发中存在与生物膜密切相关的电子传递和酶促反应, 它们受电磁场作用后可产生激化电荷和磁化电流, 因而线粒体内膜上的电子传递速度加快。同时, 由于电荷运动状态的变化, 所以磷酸化效率增加, 从而导致ATP含量增加和UWL强度增强。Lippman^[27]向老鼠肝脏线粒体中加入发光诱导剂鲁米诺后, 发现其发光强度明显提高。以上实验均证明线粒体与UWL之间确实有一定的联系。

4 结束语

人们对UWL已进行了近一个世纪的探索, 但对生物超弱发光的机制仍未形成一致的认识。通常认为, 生物UWL来自活性氧发光、DNA发光和能量转换发光三个方面。前二者研究的比较多, 但在亚细胞水平上进行的研究并不多。至于叶绿体、线粒体与UWL关系的研究多数是根据一些发光现象作出的推测。叶绿体与线粒体对生物UWL的贡献有多大, 它们是怎样影响UWL变化; 细胞凋亡和癌变发生时, 生物的UWL增强, 这是否与线粒体参与的信号转导、细胞凋亡有关, 细胞间是否也存在着借助光子的“物理通信”, 即细胞之间是否存在通过电磁场或光子相互作用实现信息传递等, 都还不清楚。从两细胞器的结构及所参与的生命活动来看, 它们对生物UWL确实有着不可忽视的贡献。今后尚需从亚细胞水平上进行如下的研究: (1) 外界因素对UWL的影响及其对两细胞器影响的关系; (2) UWL与叶绿体、线粒体所参与的生理生化过程的关系; (3) 在亚细胞水平上探讨影响与控制发

光的因素; (4) 组织、细胞、亚细胞水平上的UWL光谱特征; (5) 线粒体参与的信号转导、细胞凋亡与UWL变化的关系等。总之, 要彻底弄清UWL的发光机制, 不但要从亚细胞水平还要从分子水平上进行探索。这不仅对揭示生命现象的物理本质有一定的科学意义, 且在农业、医学、食品和环境科学等领域也有广阔的潜在应用前景。

参考文献

- Slawinska D, Slawinski J. Biological chemiluminescence. *Photochem Photobiol*, 1983, 37(6):709~715
- Popp FA, Li KH, Gu Q. Recent Advances in Biophoton Research and its Application. Singapore / New Jersey / London / Hong Kong: World Scientific Press, 1992
- Abeles FB. Plant chemiluminescence. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1986, 37:49~72
- 王维江, 韩俊英. 生物超弱发光机制及其检测方法研究进展. *广东工业大学学报*, 2000, 17(1):49~54
- Boveris A, Puntarulo SA, Roy AH et al. Spontaneous chemiluminescence of soybean embryonic axes during imbibition. *Plant Physiol*, 1984, 76:447~451
- Triglia A, Lamalfa G, Musumeci F et al. Delayed luminescence as an indicator of tomato fruit quality. *J Food Sci*, 1998, 63: 512~515
- 邢达. 生物光子检测技术展望. *光明日报*, 2002-03-15
- 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. *细胞生物学*. 北京: 高等教育出版社, 2000. 149~170
- 谭石慈, 邢达, 唐永红等. 植物叶片超微弱发光光谱研究. *光子学报*, 2000, 29(11):961~965
- Eva H, Humio T. Dark adapted leaves of paraquat-resistant tobacco plants emit less ultraweak light than susceptible ones. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 178(2):438~443
- 王维江, 邢达, 谭石慈等. 生物样品超弱发光图象的探测与分析. *生物物理学报*, 1997, 13(4):677~682
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979, 59(3):527~605
- 李韶山, 潘瑞炽. 蓝光对水稻幼苗叶绿体发育的影响. *中国水稻科学*, 1994, 8(3):185~188
- 李德红, 邓江明, 邢达. 光质对水稻幼苗超弱发光和谷氨酰胺合成酶活性的影响. *生命科学研究*, 1998, 2(2):109~112, 117
- 李德红, 邢达, 谭石慈等. 绿豆和花生的超弱发光. *植物生理学报*, 1998, 24(2):177~182
- 李德红, 唐永红, 何永红等. 白菜叶绿体的超弱发光机理初探. *激光生物学报*, 2002, 11(1):64
- 陈良怡, 邹寿彬, 康华光. 线粒体和细胞内钙自稳平衡. *生物化学和生物物理进展*, 2000, 27(5):483~488
- 苏震, 徐文英, 张仲伦等. 大豆脂肪氧化酶同工酶缺失体的超弱发光研究. *大豆科学*, 1997, 16(3):245~251
- 杨起简, 周禾, Погосьян С. И. 等. 盐胁迫下豌豆幼苗的超弱发光. *激光生物学报*, 2001, 10(4):265~268
- 张仲伦. 微弱发光分析技术应用实例(四). *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(1):102~104
- 王红霞, 袁润英, 相东等. 骨肿瘤病人血清和尿液超微弱发光强度的研究. *中华肿瘤杂志*, 1993, 15(2):108~111
- 张仲伦, 郑雁珍, 苏震等. 单片微机化微弱发光测量仪及其在肿瘤研究中的初步应用. *生物医学工程学杂志*, 1994, 11(1):24~30
- 毛大璋, 沈恂, 张月敬等. 代谢抑制剂对萌发绿豆超弱发光的影响. *生物物理学报*, 1988, 4(2):116~120
- Boh EE, Baricos WH, Bernofsky C et al. Mitochondrial chemiluminescence elicited by acetaldehyde. *J Bioenerg Biomembr*, 1982, 14: 115~133
- Gorlanov NA, Churmasov AV. Influence of x-rays on the ultraweak chemiluminescence of the mitochondria of kidney bean plants. *Radiobiology*, 1974, 14:185~187
- 李光林, 杨亚玲. 电磁场对绿豆萌芽的超弱发光和腺苷三磷酸的影响. *西南农业大学学报*, 1995, 17(2):176~178
- Lippman RD. Chemiluminescent measurement of free radicals and antioxidant molecular-protection inside living rat-mitochondria. *Exp Gerontol*, 1980, 15:339~351