

## 乙烯促进线粒体呼吸过程中活性氧的作用

柯德森 王爱国 罗广华

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

**摘要** 外源乙烯能促使绿豆 (*Phaseolus radiatus* L.) 黄化幼苗下胚轴线粒体呼吸高峰提前出现及峰值的提高, 它对抗氰途径的促进作用比对细胞色素途径的更加显著。外源乙烯作用下绿豆线粒体的超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )产生速率迅速提高, 同时外源  $O_2^-$  的加入使线粒体呼吸高峰的出现明显提前, 这从一个侧面表明乙烯对线粒体呼吸的促进作用可能是通过提高线粒体  $O_2^-$  的产生速率而实现的。SOD 活性随乙烯处理时间延长而下降, 但乙烯作用下  $O_2^-$  的产生并非仅由 SOD 的活性所决定。

**关键词** 乙烯; 线粒体; 呼吸; 氧自由基

**中图分类号** Q942.5

## THE EFFECT OF ACTIVE OXYGEN ON MITOCHONDRIAL RESPIRATION INDUCED BY EXOGENOUS ETHYLENE

Ke Deshen Wang Aiguo Luo Guanghua

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

**Abstract** When etiolated seedlings of mung bean (*Phaseolus radiatus* L.) were treated with exogenous ethylene at 25 °C, the respiratory peak of hypocotyl mitochondria appeared earlier, the maximum of the respiration was higher than the control, and the rate of cyanide-resistant electron transport pathway increased more rapidly than that of the cytochrome pathway. After the respiratory rate was decreased for a long time (15 h), the rate of production of superoxide radical ( $O_2^-$ ) still kept rising. To test the role of superoxide radical in accelerating respiration, the effect of exogenous superoxide radical which was generated from the system of xanthine and xanthine oxidase on respiration was examined. It was found that the respiratory peak also appeared earlier than the control. According to the above result, we draw a conclusion that ethylene stimulates the rate of mitochondrial respiration that is due to the increase of the  $O_2^-$  production rate, through stimulating the rate of electron leak of respiratory chain. This may be one of the mechanisms of the effect of ethylene on mitochondrial respiration.

**Key words** Ethylene; Mitochondria; Respiration; Oxygen radical

外源乙烯对植物的呼吸作用及内源乙烯的释放均有促进作用<sup>[1-3]</sup>, 但乙烯对呼吸的主要细胞器线粒体的呼吸作用机制却不甚清楚。我们先前的实验证明, 乙烯促进植物花瓣的脱落是氧自

由基作用的结果<sup>[4]</sup>, 这说明乙烯的一些生理作用机制与氧自由基是密切相关的。植物的呼吸跃变与内源乙烯的产生是同步的<sup>[5]</sup>, 内源乙烯的产生本身就有 $O_2^-$ 的参与<sup>[6]</sup>, 所以在乙烯对植物线粒体呼吸的影响过程中氧自由基可能起着重要的作用。生物体中 $O_2^-$ 的主要来源是线粒体电子传递链的电子漏<sup>[7]</sup>, 线粒体的 $O_2^-$ 产生速率事实上也是反映了电子漏的效率<sup>[8]</sup>。为此, 我们从呼吸链电子漏产生氧自由基这一角度, 研究乙烯对植物线粒体呼吸作用的影响机制, 为进一步认识植物呼吸作用的机制并为植物呼吸的调控开辟一条新的途径, 即通过调节氧自由基的水平影响植物呼吸作用, 为乙烯在农业生产上的广泛应用提供新的依据。

## 1 材料和方法

培养7 d的绿豆黄化幼苗下胚轴, 利用低温差速离心法制备线粒体<sup>[9]</sup>, 测定蛋白质含量<sup>[10]</sup>。取20 ml的线粒体提取液, 平铺于一个100 ml的三角瓶中, 密封三角瓶并在瓶中注入乙烯, 使三角瓶中的乙烯浓度达到 $10 \mu\text{mol/L}$ , 振荡培养一定时间, 测呼吸速率及 $O_2^-$ 产生速率等生理指标。

**线粒体呼吸速率的测定** 参照朱广廉等的方法<sup>[11]</sup>, 利用氧电极记录 $25^\circ\text{C}$ 下线粒体的耗氧来测定线粒体的呼吸速率。

**超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )产生速率的检测** 利用羟胺反应来检测<sup>[12]</sup>: 1 ml线粒体提取液, 加入0.1 ml 10 mmol/L的盐酸羟胺( $\text{NH}_2\text{HCl}$ )反应20 min, 加入1%的 $\alpha$ -萘胺和0.33%的对氨基苯磺酸各1 ml, 显色15 min, 用3 ml正丁醇萃取,  $6000 \times g$ 离心10 min, 取正丁醇2 ml在530 nm测光吸收, 以亚硝酸钠( $\text{NaNO}_2$ )作标准曲线。

**SOD的检测** 利用氮蓝四唑(NBT)的光化还原反应方法<sup>[13]</sup>: 3 ml反应液含核黄素 $1.3 \mu\text{mol/L}$ , 甲硫氨酸13 mmol/L, NBT  $63 \mu\text{mol/L}$ 和0.05 mol/L pH7.8的磷酸缓冲液。

以上所有实验均同时以同一材料在同样条件下重复四次, 以平均值作为结果。

## 2 实验结果

### 2.1 外源乙烯对线粒体呼吸的影响

线粒体在 $25^\circ\text{C}$ (对照)时, 6 h呼吸开始跃升, 11 h达到高峰后开始下降, 从图1 a可见, 以氰化钾(KCN, 1 mmol/L, 以下实验浓度同此)抑制细胞色素途径的抗氰呼吸及以水杨基羟肟酸(Salicylhydroxamic acid, SHAM, 2 mmol/L, 以下实验浓度同此)抑制抗氰途径的细胞色素呼吸速率变化趋势与对照的呼吸速率相似, 单独的抗氰呼吸或单独的细胞色素呼吸速率在处理初期明显低于对照的呼吸速率, 但6 h后抗氰呼吸大幅度上升, 接近对照, 细胞色素途径呼吸速率的上升稍为缓慢, 但细胞色素途径和抗氰途径呼吸速率的和明显高于对照, 可见两条电子传递途径在对照条件下都是没有全部开动的, 抑制了其中的一条可能有利于另一条的更充分开动。10  $\mu\text{mol/L}$ 外源乙烯处理使线粒体的呼吸高峰明显提前出现, 由图1b的结果看, 不论对照的呼吸, 还是抗氰途径或者细胞色素途径的呼吸均在外源乙烯处理后2 h出现跃升, 很快达到高峰并且迅速下降, 峰值也明显较高, 并且不象对照的线粒体那样在呼吸高峰有一个滞留期(图1a)。外源乙烯处理后的抗氰呼吸速率甚至超过了对照的呼吸, 而细胞色素途径呼吸速率的上升还是

比较缓慢, 可见外源乙烯对抗氧途径呼吸的促进作用明显高于对细胞色素途径的。

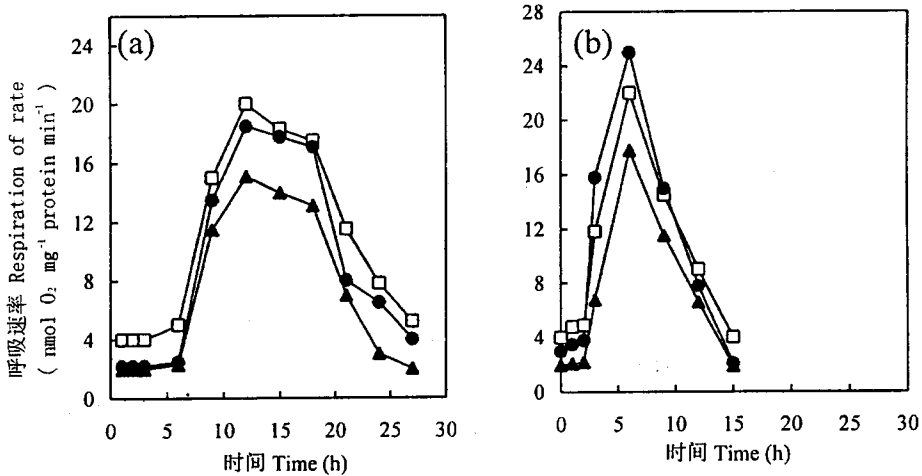


图1 外源乙烯处理对线粒体呼吸速率的影响

Fig. 1 Effect of exogenous ethylene on mitochondrial respiration rate

(a) 不经外源乙烯处理 Treated without exogenous ethylene; (b) 经外源乙烯处理 Treated with exogenous ethylene

—□— Control; —●— KCN; —▲— SHAM (图2, 3同。Same for Figs. 2, 3)

## 2.2 外源乙烯处理对线粒体 $O_2^-$ 产率的影响

由图2可见, 随着时间的延长, 不经外源乙烯处理的线粒体呼吸、抗氧呼吸及细胞色素呼吸过程的  $O_2^-$  的产生速率均迅速上升, 说明  $O_2^-$  的产生速率随线粒体呼吸的加强而升高, 由于  $O_2^-$  主要来源于线粒体呼吸链电子漏<sup>[7]</sup>, 可见呼吸链电子漏速率也是随呼吸的上升而升高。外源乙烯 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理的线粒体呼吸、抗氧呼吸和细胞色素呼吸的  $O_2^-$  产生速率在 2 h 都已出现跃升, 比未经处理的线粒体  $O_2^-$  产生速率出现跃升的时间 (6 h) 明显提前, 这与外源乙烯对线粒体呼吸的促进作用基本相同 (图 1b)。说明乙烯对呼吸跃变的促进作用与其提高线粒体呼吸链电子漏效率, 增进了氧分子的单电子还原, 从而加快了  $O_2^-$  的产生速率是密切相关的。从图 2b 还可以看出, 外源乙烯处理的抗氧途径电子传递过程中  $O_2^-$  的产生速率明显比细胞色素途径的高, 这点与乙烯处理的抗氧呼吸的上升明显快于细胞色素途径是一致的, 造成这种现象的原因可能与抗氧氧化酶对  $O_2$  的亲合力较高有关<sup>[14]</sup>。另外,  $O_2^-$  作为一种活性很强的自由基, 当它积累到一定的水平后, 必然会对植物生理活动造成伤害<sup>[15]</sup>, 这也是乙烯处理的线粒体在出现呼吸高峰后即迅速下降的原因之一 (图 1)。

## 2.3 外源 $O_2^-$ 对线粒体呼吸的影响

以黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统 (8 mmol/L 黄嘌呤, 0.25 unit  $\text{ml}^{-1}$  黄嘌呤氧化酶) 作为外加  $O_2^-$  源处理绿豆线粒体, 第一小时呼吸速率即迅速上升, 呼吸高峰比不经处理的线粒体明显出现的早, 这与外源乙烯的作用相似, 说明  $O_2^-$  不仅是呼吸链电子漏的产物, 而且反过来对线粒体呼吸具有明显的促进作用 (图 3)。

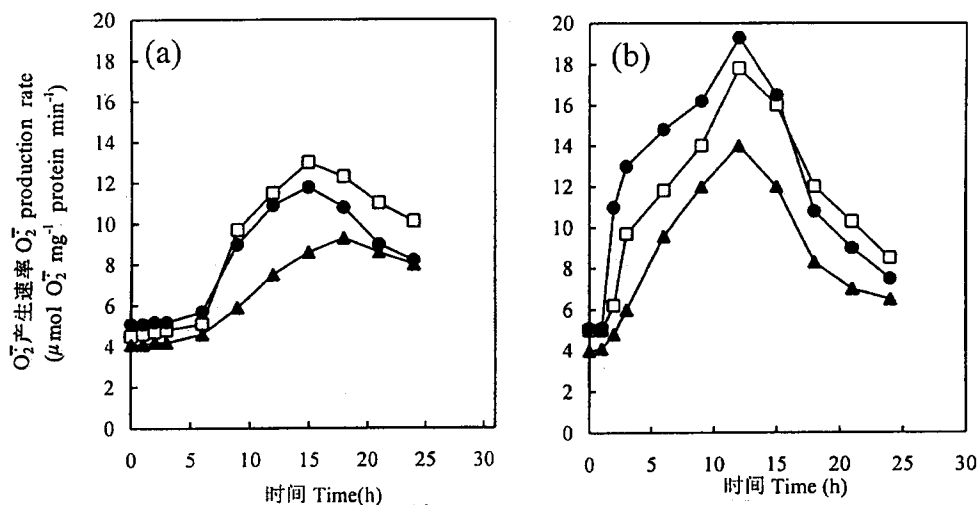


图 2 外源乙烯处理对线粒体  $O_2^-$  产生速率的影响  
 Fig. 2 Effect of exogenous ethylene on mitochondrial  $O_2^-$  production rate

作为外加  $O_2^-$  源的黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统从加入的第一小时起就开始促进线粒体的呼吸 (图 3), 而外源乙烯的作用却需要 2-3 h 的诱导期 (图 1b), 可见  $O_2^-$  是比乙烯更直接的呼吸促进剂。外源乙烯处理线粒体, 有可能在较短时间内首先诱导  $O_2^-$  的少量增加, 从而引起呼吸的轻微上升, 呼吸的增长同时又促进  $O_2^-$  的产生, 如此反复, 经过 2 个小时的相互促进, 最后表现出  $O_2^-$  产生速率及呼吸速率在外源乙烯处理后 2 个小时同时出现跃升 (图 1、2)。

另外, 外源  $O_2^-$  处理使呼吸达到的高峰明显低于外源乙烯处理的 (图 1b、图 3), 可能是外源加入的  $O_2^-$  更容易造成损伤的缘故。外源  $O_2^-$  处理的抗氧呼吸比对照的高, 这与外源乙烯的处理结果是相似的, 原因也与抗氧呼吸氧化酶对氧的亲合力较强有关。

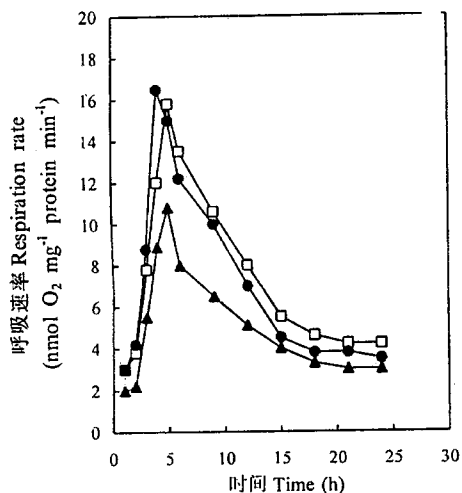


图 3 外源超氧自由基对线粒体呼吸的影响  
 Fig. 3 Effect of exogenous superoxide radical on mitochondrial respiration rate

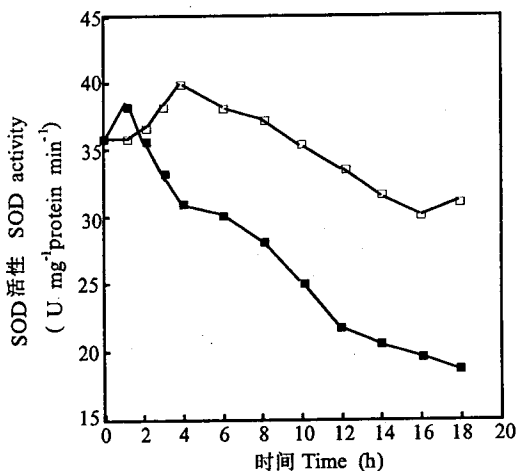


图 4 外源乙烯对线粒体 SOD 活性的影响  
 Fig. 4 Effect of exogenous ethylene on the activities of SOD  
 —□— Control; —■— Exogenous ethylene

## 2.4 外源乙烯作用下 SOD 活性的变化

SOD 是线粒体内清除  $O_2^-$  的专一性酶, 从图 4 可以看到, 对照的线粒体 SOD 的活性在前 4 h 稍有上升, 6 h 后开始下降, 幅度比较平缓, 乙烯处理后 SOD 的活性在 1 h 后即开始大幅度下降, 可见乙烯对呼吸的促进与其促使 SOD 活性的下降是有关的。然而 SOD 活性的变化与  $O_2^-$  的产生及呼吸速率的变化并非完全对应的, 乙烯处理 18 h 后, SOD 的活性已经很低, 但此时  $O_2^-$  的产生速率反而下降(图 2b), 乙烯作用下线粒体  $O_2^-$  的产生并非仅由 SOD 的活性决定, 线粒体内部  $O_2^-$  的产生水平决定于产生和清除之间的平衡, 乙烯作用下 SOD 活性的下降是  $O_2^-$  水平升高的原因之一, 但处理后期 SOD 活性下降的时候, 此时由于线粒体本身已经受到破坏, 由电子漏产生的  $O_2^-$  也减少, 所以此时的  $O_2^-$  产生速率反而下降。

## 3 讨论

在生理条件下, 通过呼吸链传递的电子, 并非全部都能最终传递到细胞色素 C 氧化酶上, 以 4 个电子还原  $O_2$  生成两分子水, 而是在途中有部分单电子漏出, 使一部分氧发生单电子还原组成  $O_2^-$ , 这种现象称为“电子漏”。我们的实验显示, 外源乙烯处理提高了电子漏效率及  $O_2^-$  的产生速率, 从而提高了线粒体的呼吸速率, 这就从“电子漏”、自由基的角度为阐明乙烯对呼吸的作用机制提供了佐证。

$O_2^-$  作为一种活性很强的氧自由基, 一般认为它通过直接或间接破坏蛋白质及各种酶而对呼吸起抑制作用, 但上述结果却证明, 由乙烯处理线粒体产生的  $O_2^-$  及外源加入的  $O_2^-$  在处理初期对线粒体呼吸具有明显的促进作用, 表明在线粒体呼吸过程中,  $O_2^-$  既是一种呼吸的促进因素, 同时也对呼吸有一定的抑制作用, 具有明显的“双重性”。在呼吸初期,  $O_2^-$  的伤害作用不明显, 表现出来的是对呼吸的促进作用, 到后期由于  $O_2^-$  的积累达到一定的程度, 伤害程度加剧, 所以在乙烯处理后期线粒体呼吸迅速下降。从目前的研究现状看,  $O_2^-$  对呼吸具有促进作用的机理还不是非常明确, 可能的原因是  $O_2^-$  作为乙烯形成酶的一种激活因子<sup>[16]</sup>, 激活了乙烯形成酶, 引起内源乙烯连环倍增而促进线粒体的呼吸。

KCN 与 SHAM 在电子传递过程中的抑制位点不同, KCN 抑制了细胞色素途径的最后一步, 而 SHAM 抑制了从泛醌分岔的抗氰途径中电子向  $O_2$  的传递, SHAM 的抑制位点比 KCN 前四步<sup>[17]</sup>。从电子漏的角度看, KCN 由于其抑制位点比 SHAM 靠后, 在抑制点之前就有更多形成电子漏的可能位点, 这可能是造成用 KCN 抑制形成的抗氰途径在  $O_2^-$  产生速率及呼吸速率, 都比以 SHAM 抑制形成的细胞色素途径较大的原因, 另外, 外源乙烯促进的呼吸速率和  $O_2^-$  产生速率, 都是抗氰途径比细胞色素途径更高, 这可能也与 KCN 的抑制位点比 SHAM 靠后有关。

## 参考文献

- 1 张丽欣, 宋汝静. 四种叶菜衰老期间呼吸、乙烯产生、IAA 和过氧化物酶的变化及相互关系. 植物生理学报, 1988, 14(1):81-87
- 2 罗云波, 刘先舜. 乙烯诱导下草莓果实采后 RNA 代谢与蛋白质合成活性的变化. 植物生理学报, 1994, 20(3):235-239

- 3 McMurchie E J, McGlasson W B, Eaks I L. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature*, 1972, 237:235-241
- 4 柯德森, 王爱国, 罗广华. 花的脱落与乙烯、生长素类似物及超氧自由基的关系. *植物生理学通讯*, 1995, 31:18-21
- 5 Solomos T, Laties G G. Effects of cyanide and ethylene on the respiration of cyanide-sensitive and cyanide-resistant plant tissues. *Plant Physiol*, 1976, 58:47-50
- 6 Liberman M. Biosynthesis and action of ethylene. *Ann Rev Plant Physiol*, 1979, 30:533-591
- 7 刘树森, 焦选茂, 王孝铭等. 线粒体呼吸链电子漏与质子漏的相互作用. *中国科学(B辑)*, 1995, 25(6):596-603
- 8 Cross A R, Jones C T G. Enzymic mechanism of superoxide production. *Biochem Biophys Acta*, 1991, 1057(3): 281-292
- 9 罗广华, 王爱国, 邵从本等. 超氧化物歧化酶(SOD)在大豆下胚轴线粒体内的定位. *植物学报*, 1987, 29(2):171-177
- 10 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biol Chem*, 1976, 72:248-254
- 11 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. *植物生理学实验*. 北京: 北京大学出版社, 1990, 23-24
- 12 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. *植物生理学通讯*, 1990, (6):55-57
- 13 王爱国, 罗广华, 邵从本等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. *植物生理学报*, 1983, 9(1):77-84
- 14 Bendall D S, Bonner W D. Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. *Plant Physiol*, 1971, 47:236-245
- 15 Wilson D O, McDonald N B. The lipid peroxidation model of seed aging. *Seed Sci Technol*, 1996, 14:269-282
- 16 McRae D G, Baker J E, Thompson J E. Evidence for involvement of the superoxide radical in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by pea microsomal membranes. *Plant Physiol*, 1982, 23:375-383
- 17 Douce R ed. *Mitochondria in higher plants*. Academic Press, Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. 1985, 77