

外源氯化胆碱可提高小麦线粒体膜的流动性

刘世名¹, 季玉龙¹, 陈靠山¹, 彭正华¹, 张举仁¹, 张长铠¹, 梁 峥²

(1. 山东大学生命科学学院, 山东 济南 250100; 2. 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要: 分别用 ANS、DPH 及 16-NS 三种不同的标记物标记小麦黄化苗的线粒体, 研究氯化胆碱 (choline chloride, CC) 对线粒体膜的荧光光谱、平均微粘度($\bar{\eta}$)及 ESR 图谱的影响。结果表明 0.21-1.79mmol·L⁻¹ 的 CC 均能显著降低线粒体膜的荧光强度、 $\bar{\eta}$ 值及 ESR 图谱的序参数 (S) 和旋转相关时间(τ_c)。表明 CC 可增加线粒体膜的流动性。为揭示 CC 的提高植物抗冷机制提供依据。

关键词: 氯化胆碱; 小麦; 线粒体; 膜流动性

中图分类号: Q73 文献标识码: A 文章编号: 1000-6737(2002)01-0019-04

氯化胆碱 (choline chloride, CC) 是一种季胺盐。近年来, 有不少研究均表明 CC 对植物具有一定的生理活性。Konaka^[1]报道 CC 促进甘薯生根及根的生长。Hyeon 等^[2]发现 CC 能刺激小麦原生质体光合作用中氧的释放。陈以锋等^[3]以 CC 处理玉米、小麦和盐棉后, 叶片电解质的渗出率降低, 抗冷性增强。李伶俐等^[4]证明 CC 影响棉苗的抗氧化保护酶系 SOD、POD、CAT 的活性。梁焯周^[5,6]报道 CC 可提高烟草和水稻的抗寒性。在日本已将 CC 列入植物生长调节物质范畴。但是, 迄今对 CC 的作用机制研究甚少。线粒体是一种重要的细胞器, 杨福愉等^[7]提出线粒体的膜流动性较大时, 水稻的抗冷性也较强。植物激素脱落酸被认为是一种抗逆激素, 也能降低线粒体的相变温度, 提高线粒体的膜流动性^[8-10]。可见, 线粒体是一种研究外源物质对膜结构影响的较好的研究模式系统。本文以小麦黄化苗为材料, 分别用 ANS、DPH 和 16-NS 三种标记物标记线粒体膜, 探讨外源 CC 对离体植物线粒体的膜生物物理相关参数影响, 以为揭示 CC 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 植物材料的培养

小麦 (*Triticum aestivum*) 种子 (山东农科院 91-3) 用 10% NaClO 消毒 10min 后, 在湿润滤纸上暗中萌芽 (20℃), 7d 后收获黄化苗, 制备线粒体。

1.2 植物线粒体的分离

参照 Lin 等^[11]的方法。呼吸控制测定结果表明

所提取的线粒体完整。线粒体提取后, 用含不同浓度 CC 的清洗介质悬浮。

1.3 荧光光谱的测定

按杨福愉等^[7]的方法进行。ANS 为 Sigma 产品。用日立 850 荧光分光光度计于 20℃测定。扫描图谱显示激发峰和发射峰分别为 393nm 和 482nm。线粒体的浓度为 0.8mg 蛋白·ml⁻¹。

1.4 膜微粘度($\bar{\eta}$)的测定

按朱明宴等^[12]的方法进行。DPH 为 Sigma 产品。用日立 850 荧光分光光度计于 20℃测定。激发波长和发射波长分别为 360nm 和 430nm。线粒体的浓度为 0.8mg 蛋白·ml⁻¹。

1.5 电子顺磁共振 (ESR) 波谱的测定

参照杨福愉等^[7]的方法。线粒体的浓度为 0.8mg 蛋白·ml⁻¹。用 16NS (Sigma 产品) 标记线粒体膜, 在 BRUKER-200 型顺磁共振波谱仪上进行测试。测试条件: X 波段, 微波功率 20mW, 调制 100KHz, 调制幅度 0.2mT, 时间常数 0.128s, 20℃记录波谱, 计算 S 和 τ_c 值。

1.6 蛋白质含量的测定

按 Lowry 法^[13]测定。

收稿日期: 2001-04-21

基金项目: 863 计划资助项目 (863-819-07-07)

作者简介: 刘世名, 1970 年生, 博士, 副教授, 电话: (0531) 8363791, E-mail: smliu@life.selu.edu.cn.

缩写: ANS: 8-苯氨基-1-萘酸; DPH: 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯; 16NS: 16-氮氧硬脂酸

所有处理均设3次重复,并计算标准差。

2 结果与分析

2.1 CC对ANS标记的植物线粒体膜荧光光谱的影响

图1表明单纯的ANS溶液、线粒体溶液及含CC的线粒体溶液的荧光均微弱,且均没有激发峰和发射峰,而用ANS和线粒体孵育后,其激发光谱和发射光谱的荧光强度显著增大,并出现激发峰和发射峰(分别为393nm和482nm)。表明ANS已结合到线粒体膜的双分子层中。ANS标记线粒体后的荧光光谱的荧光强度变化能反映出线粒体的膜流动性状态。荧光强度越大,膜的流动性越小^[7]。

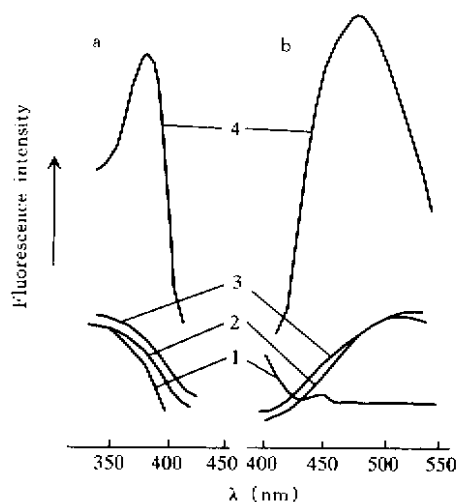


Fig.1 Fluorescence spectra of ANS, CC, mitochondria and ANS + mitochondria. 1, ANS; 2, mitochondria; 3, CC + mitochondria; 4, ANS + mitochondria. a, Fluorescence excitation spectra (ex:393nm); b, Fluorescence emission spectra (em:482nm)

用0, 0.21, 0.43, 0.64和1.07mmol·L⁻¹的CC处理小麦黄化苗的线粒体后,用ANS标记线粒体测定荧光光谱。结果表明(荧光激发光谱:图2a;荧光发射光谱:图2b),CC降低了用ANS标记的线粒体的荧光强度,且随CC浓度的增大,荧光强度下降越多。即CC能提高小麦黄化苗线粒体的膜流动性。

2.2 CC对DPH标记的植物线粒体膜的微粘度($\bar{\eta}$)的影响

分别用0, 0.21, 0.43, 0.64, 0.84和1.07mmol·L⁻¹的CC处理小麦黄化苗的线粒体,用DPH标记线粒体,检测荧光偏振度,并计算平均微粘度($\bar{\eta}$)值。结果表明(图3),0.21-

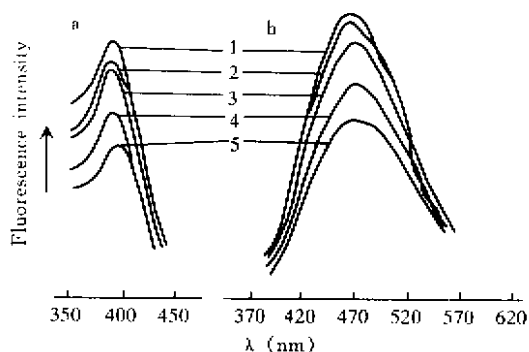


Fig.2 Effect of CC at different concentration on fluorescence spectra of mitochondria labeled with ANS. 1, 0 mmol·L⁻¹; 2, 0.21 mmol·L⁻¹; 3, 0.43 mmol·L⁻¹; 4, 0.64 mmol·L⁻¹; 5, 1.07 mmol·L⁻¹

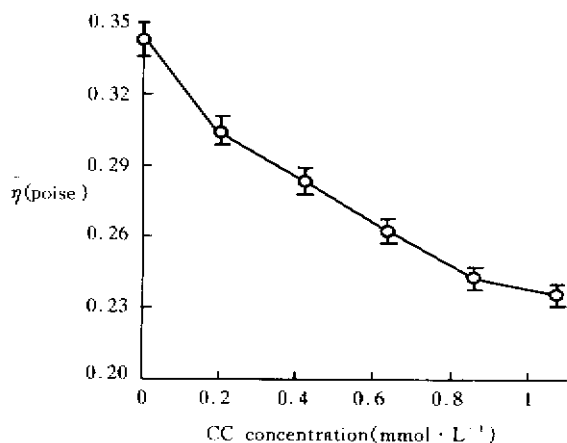


Fig.3 Effect of CC on micro-viscosity ($\bar{\eta}$) of mitochondria membrane

1.07mmol·L⁻¹CC均能显著降低用DPH标记线粒体的 $\bar{\eta}$ 值,且随CC浓度增大 $\bar{\eta}$ 下降越明显。对照的值为0.342泊(poise),而经1.07mmol·L⁻¹CC处理过的 $\bar{\eta}$ 值仅为0.235泊,下降31.3%。微粘度越小,膜的流动性越大。所以,该结果同样表明CC能提高小麦黄化苗线粒体的膜流动性。与上述用ANS荧光法检测的结果相符。

2.3 CC对16-NS标记植物线粒体的ESR图谱的影响

自旋标记物插入生物膜后,通过其所带的自由基给出的信号可反应膜的流动性。用16-NS标记线粒体,测定ESR波谱(图4),并根据ESR波谱计算出序参数S和旋转相关时间 τ_c 。结果表明,0.36-1.79mmol·L⁻¹均能显著降低用16-NS标记小麦黄化苗线粒体的ESR波谱中的S和 τ_c 值,且随浓度增大,下降幅度越大。经

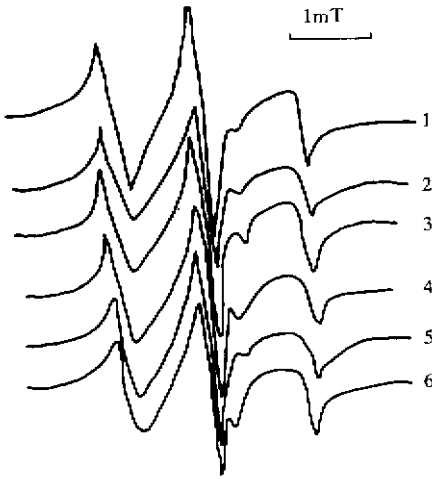


Fig.4 Effect of CC on ESR spectra of wheat mitochondria labeled by 16-NS. 1, 0 mmol · L⁻¹; 2, 0.36 mmol · L⁻¹; 3, 0.71 mmol · L⁻¹; 4, 1.07 mmol · L⁻¹; 5, 1.43 mmol · L⁻¹; 6, 1.79 mmol · L⁻¹

1.79mmol · L⁻¹ CC 处理线粒体, 线粒体膜的 S 和 τ_c 值分别为 0.291 和 5.74×10^{-9} s, 比对照(分别为 0.498 和 18.4×10^{-9} s) 分别降低 41.5% 和 68.6%(表 1)。表明, CC 处理后的小麦黄化苗线粒体的膜流动性变化与前述两方法(ANS 荧光法和 DPH 荧光偏振法)所得结果相符。同样证明 CC 能提高小麦黄化苗线粒体膜的流动性。

Table 1 Effect of CC in different concentration on sequence parameter (S) and rotating correlative time (τ_c) of ESR spectra of wheat mitochondria labeled with 16-NS

Concentration of CC (mmol · L ⁻¹)	S	τ_c (10 ⁻⁹ s)
0	0.498 ± 0.008	18.40 ± 0.82
0.36	0.482 ± 0.004	20.40 ± 0.98
0.71	0.473 ± 0.003	16.9 ± 0.78
1.07	0.393 ± 0.004	15.60 ± 0.72
1.43	0.379 ± 0.004	9.73 ± 0.54
1.79	0.291 ± 0.003	5.74 ± 0.50

3 讨 论

前人的研究已证明外源 CC 对植物具有一定生理效应, 主要表现在, 能够促进作物生长, 提高作物的抗冷性^[1-6]。CC 被用于提高若干作物的产量在生产实践上也有应用。本文分别以 ANS、DPH 及 16-NS 作标记物, 经荧光光谱、荧光偏振及 ESR

测定, 表明, CC 离体处理小麦黄化苗线粒体后, 降低了被标记的线粒体的荧光强度、微粘度 ($\bar{\eta}$) 及 ESR 序参数 (S) 和旋转相关时间 (τ_c), 且随 CC 浓度增大, 这些参数的下降幅度越大。根据荧光光谱和 ESR 波谱理论, 可证实外源 CC 在毫摩尔浓度范围内, 即可显著提高线粒体膜的流动性。这可能是外源 CC 提高植物抗冷性的直接原因。胆碱进入植物细胞后, 有可能代谢为甜菜碱和磷酸胆碱, 而磷酸胆碱再进一步代谢生成磷脂酰胆碱。但 Che 等^[14]认为, 代谢为上述物质的胆碱的类似物也具有胆碱的作用。我们研究在水分胁迫情况下 CC 对小麦叶片细胞膜的保护作用, 也发现仅 CC 在喷施 48h 内效果较为明显(另文发表)。本文用胆碱处理离体的线粒体, 即对线粒体膜产生明显的效应。表明, 胆碱可能是通过直接与膜类脂作用, 影响其缔合方式而增加膜的流动性的。CC 对膜保护酶系统 SOD、CAT 和 POD 等的效应可能是一种间接效应。胆碱对膜流动性影响的有效浓度较大, 在毫摩尔级, 而一般植物激素的作用浓度则在微摩尔级, 因此, 胆碱不属于植物激素, 是一种可调节膜生物物理状态的物质。本文结果提示, 如能筛选到对细胞膜结构有直接或间接调节作用的物质, 并处理植物有可能改善农作物的抗逆性。

参考文献:

- [1] Konaka N. Effects of choline chloride on sweet potato[J]. *Zasso to Sono Boiyo*, 1978, 15:54-56.
- [2] Hyeon SB, Cho C, Che FS, et al. Effects of choline chloride and its analogues on photosynthesis in wheat protoplasts[J]. *Agr Biol Chem*, 1987, 51:917-919.
- [3] 陈以峰, 周燮. 氯化胆碱对多种逆境下作物膜稳定性的影响[J]. 华北农学报, 1997, 12(2):54-58.
- [4] 李伶俐, 李文, 马宗斌. 氯化胆碱对棉苗生长及某些生理特性的影响[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(1):18-20.
- [5] 梁煜周, 何若天. 氯化胆碱对冷胁迫下的烟草幼苗的保护性效应[J]. 广西农业大学学报, 1998, 17(3):227-232.
- [6] 梁煜周, 何若天. 氯化胆碱对低温胁迫下稻苗的保护性效应[J]. 中国水稻科学, 1999, 13(1):31-35.
- [7] 杨福愉, 蔡同茂, 邢菁如, 等. 抗冷与不抗冷水稻线粒体膜流动性的比较[J]. 科学通报, 1983, 26(3):370-372.
- [8] Chen KS, Zhou X, Liang HG, et al. Evidence for ABA effect on the character of biomembrane[J]. *Chin Sci Bull*, 1994, 39:1033-1036.
- [9] 陈靠山, 刘世名, 周燮. 脱落酸对植物线粒体膜生物物理特性的影响[J]. 生物物理学报, 1995, 11(3):312-318.
- [10] 陈靠山, 刘世名, 夏凯, 等. 用 ANS 研究脱落酸提高植物线粒体膜的流动性[J]. 生物物理学报, 2000, 16(2):237-242.

- [11] Lin TY, Marhart AH. Temperature effect on mitochondrial respiration in *Phaseolus acutifolius*, A. Gray and *Phaseolus vulgrise L* [J]. *Plant Physiol*, 1990,54-58.
- [12] 朱明宴, 宋立群, 初建设, 等. 小鼠心肌线粒体内, 外膜磷脂动态结构的研究[J]. *生物物理学报*, 1993,9(2):220-225.
- [13] Lowry OH, Resebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with Folinphenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 195:265-275.
- [14] Che FS, Cho C, Hyeon SB, et al. Metabolism of choline chloride and its analogs in wheat seedlings[J]. *Plant Cell Physiol*, 1990,31(1):45-50.

EFFECT OF CHOLINE CHLORIDE ON MEMBRANE FLUIDITY OF MITOCHONDRIA ISOLATED FROM ETIOLATED SEEDLINGS OF WHEAT

LIU Shi-ming¹, JI Yu-long¹, CHEN Kao-shan¹, PENG Zheng-hua¹,
ZHANG Ju-ren¹, ZHANG Chang-kai¹, LIANG Zheng²

(1. School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China;

2. Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Effects of choline chloride (CC) on fluorescence intensity, micro-viscosity ($\bar{\eta}$) and ESR spectra of mitochondria from wheat etiolated seedlings were studied with the fluorescence labels, ANS and DPH and a spin label, 16NS. Results indicated that the concentration of CC from 0.21 to 1.79 mmol · L⁻¹ decreased fluorescence intensity, micro-viscosity ($\bar{\eta}$), sequence parameter (S) and rotating correlative time (τ_c) of mitochondria from etiolated wheat seedlings. CC could therefore increase the fluidity of mitochondrial membrane. All these results suggested that CC could affect the biophysical characteristics and functions of mitochondria, which shed some light on the mechanism of increased resistances against stresses in plants by CC.

Key Words: Choline chloride; Wheat; Mitochondria; Membrane fluidity