

目 录

绪 论	1
一、衰老的概念	1
二、衰老研究的发展简史	2
三、衰老问题研究的重要性	3
第一章 总论	4
一、生命期	4
二、植物衰老类型及衰老曲线	5
三、植物衰老的研究方法	7
四、几种衰老的理论	16
第二章 细胞衰老	19
一、引言	19
二、魏斯曼的种质不死与 Hayflick 界限	19
三、细胞的寿命	21
四、衰老细胞的一般特征	21
五、衰老时细胞结构的改变	22
六、生物膜与衰老	23
七、细胞死亡	29
第三章 活性氧与衰老	30
一、氧毒性	30
二、活性氧产生的位点	35
三、植物体内活性氧的防御体系	41
四、衰老组织活性氧的产生	50
五、SOD 基因表达和植物的衰老及胁迫伤害	55
第四章 植物激素与衰老调控	58
一、衰老的激素和营养学说	58
二、促进衰老激素——乙烯	59
三、脱落酸——抵御胁迫和衰老的激素	71
四、延迟衰老的激素	71
五、叶片中衰老促进剂和延迟剂水平的相关变化	74
六、光敏素与衰老	76
七、死亡激素	76
八、植物衰老时的激素作用和信息传递	80
第五章 植物衰老时的物质分解代谢	86
一、蛋白质	86

二、脂类	103
第六章 果实成熟生理	113
一、引言	113
二、果实的生长及成熟的标志	113
三、氧化反应	116
四、果实成熟时细胞壁的变化	118
五、成熟的调控	123
六、膜和组织抵抗力	126
第七章 植物成熟和衰老的基因调控	127
一、衰老的遗传调节	127
二、叶片衰老时叶绿体光合作用基因的表达	128
三、自然和暗诱导衰老叶片中特异基因的克隆分析	129
四、果实成熟的基因表达调控	131
五、花瓣衰老的分子生物学	136
第八章 植物的脱落	139
一、脱落的解剖学特征	139
二、壁分离的生物化学	140
三、叶片脱落	141
四、花的脱落	142
五、果实脱落	143
六、植物器官脱落的激素调控	143
七、衰老和脱落的关系	146
第九章 果蔬贮藏和切花保鲜	147
一、果实和蔬菜采后生理	147
二、果蔬采收后的生理失调	148
三、果蔬贮藏的方法	151
四、切花衰老	152
五、切花保鲜	153
参考文献	161
后记	180

绪 论

在生命的长河中,每一类生物都生生不息,永无休止地繁衍着它们的种群后裔。然而,对每一个具体的生命来说,都有生老病死的过程,这是生命发展的必然规律。

一、衰老的概念

随着生物的生长,生命经过发育、生长、成熟、衰老直至死亡。衰老 (senescence) 是机体各个部分功能的衰退和老化的过程。Sirehler 认为衰老的概念是^[1]:

(1) 原发性:老化是随发育而出现的变化,是原发性改变;

(2) 障碍性:衰老是机体异常状态,必须伴有某种机能障碍;

(3) 渐进性:衰老是随着机体发育而出现的进行性较为明显变化,具有积累的性质,是一种不可逆的变化;

(4) 普遍性:衰老是生命发展的普遍规律,是任何生物也都逃脱不了的变化。因此衰老是普遍出现于机体、组织、细胞内部的代谢改变。也是直线的,缓慢进行的个体和组织功能低下,而导致机体内环境稳定性减退。

著名的植物生理学家 Thimann, K. V.^[2] 在他主编的《植物的衰老》一书中给植物衰老下的定义为:“导致植物自然死亡的一系列衰退过程 (deterioration)。”即成熟细胞有序降解,并导致这些细胞的死亡。它可能是遗传控制,也可能是环境诱导的。这包括:第一,衰老是植物生长发育的最后一个阶段;第二,这是一个走下坡路的正常阶段,是不可逆的;第三,这一阶段包括一系列代谢变化,错综复杂。所以 Thimann 又将这些复杂的衰退过程称为“衰老综合症” (senescence syndrome)。衰老常常发生在植物成熟转向生殖期。衰老普遍特征之一就是蛋白质的迅速丧失,伴以 RNA 的水解以及绿色植物组织中的叶绿素迅速破坏。其中以蛋白质水平的下降最明显 (图 1),也就是说衰老过程总的表现为氮的负平衡”,这与动物衰老是一

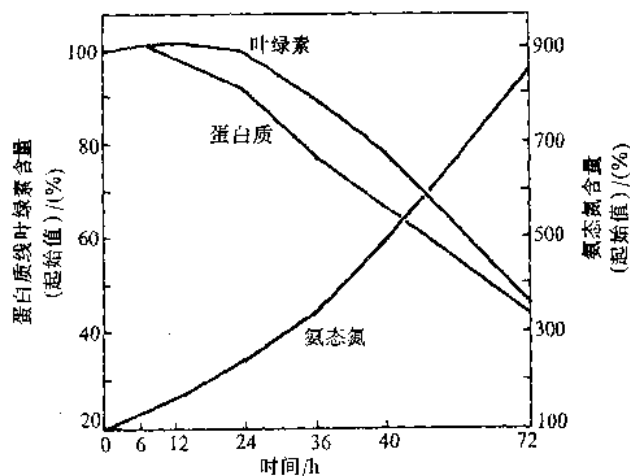


图1 离体燕麦胚芽鞘在诱导衰老(暗中, 25°C)过程中叶绿素、氨基酸和蛋白质的变化(引自 Martin 和 Thimann, 1972^[3])

致的。与此同时,在植物中还有呼吸速率的变化及乙烯的产生。

衰老在动物体内通常是逐渐发生的,占整个寿命相当大一部分。但是在植物体内衰老既能逐渐进行,也能迅速发生。因此,植物衰老所需要的“时间过程”(lapse of time)不是一个明显特征,它随不同植物种类和不同环境条件而发生变化。在自然界,植物衰老所需时间变异幅度通常很宽。一些树木和人一样可跨越多年,一年生植物可以在一个季节完成其生命过程,果实成熟和衰老常常只有几个星期,而离体叶片和花朵仅几天。外界条件对衰老影响最显著的是光和水分、逆境。暗中引起叶片衰老更为迅速。

控制单个器官或整个有机体衰老的概念常分成两类:“损耗”(wear and tear)和遗传编定的程序。损耗可解释为随时间进行衰退积累导致衰老。这些变化包括微小突变、膜结构和功能的丧失,核酸和蛋白质分解等,它们或多或少依赖于时间。遗传控制衰老也许是指即使叶片处于生长最适条件,在其生活周期内,仍按预定的时间衰老。也可能是环境诱导,如水和营养的限制,从而使植物适应变化的环境条件。

衰老起始变化在植物中比在动物中变化更大,实验更为直接。第一个方面,可以研究离体器官叶片、花和果实(离体和连体材料差异将在第一章介绍),因此可以补充普通生理学和生物化学的研究。第二个方面,衰老在植物不同的生活阶段出现,表现的方式也就不同。在一些植物开花和种子形成之后,植物迅速衰老;而另外一些植物没有这种时间限制,具有更大范围的变异,因而许多植物根或茎的衰老具有不同的时间常数。

有些植物衰老完全不可测定,例如:一些果树,尤其是葡萄藤,通过嫁接繁殖可达几个世纪。很明显,幼嫩植物正在进行的衰变,在行为上没有明显的变化。Redwood 树在它根部可以长出许多休眠芽。

二、衰老研究的发展简史

健康与长寿是人类共同向往的一个愿望。所以揭开衰老的奥秘,控制衰老的过程,以延长寿命,是自古以来人们为之奋斗的目标。

我国对抗老延寿的研究,具有悠久的历史。早在 2000 多年前的《黄帝内经》上,已把老年医学的内容列于卷首。近代抗衰老的研究是从 18 世纪末、19 世纪初开始的,由于当时细菌学和内分泌学等学科的建立,使抗衰老的研究转向了寻找生物的物质基础。

植物衰老的研究晚于人类衰老的研究。1928 年德国著名学者 Molisch 曾做过一个研究植物衰老的著名实验,发现去花及豆荚可延迟植株衰老。他在 1938 年出版的“The Longevity of Plants”中提出了“一年生植物因结实饥饿而死亡”的看法,他当时没有注意到多年生植物可以结实多次而不死^[4]。Molisch 的学生 Leopold 在 60 年代比较了雌雄植株的衰老,一个结实,一个不结实,二者同样死亡,说明植物并非出于开花结实植株营养缺乏而致死^[9]。

1967 年国际实验生物学会在英国举行了衰老生物学诸方面的讨论会,同时出了一本有关植物衰老的论文集:“Aspects of the Biology of Aging”^[6],文集中收集了 12 篇关于植物衰老的综述文章。《当前植物学进展》将衰老作为三级索引标题说明植物衰老研究已纳入一般生物学的领域,此后 20 余年加速了植物衰老的研究,有关文献大量出现,世界性的衰老学会也发表了许多新成果。

1978 年 Thimann, K.V. 在日本植物学杂志(增刊)上撰写了一篇有关衰老的专题,大体总

总结了1967~1977年在植物衰老研究方面的进展^[7]。随后,1982年英国出版了一套有关植物生长调节物质的丛书,丛书中有一部专门的衰老文集“Growth Regulators in Plant Senescence”^[8]。在植物生理学年评中亦出现了植物衰老的评述^[9]。1986年以色列Y.Y.Leshem等人写了一本《植物衰老过程和控制》^[10],已被译成中文。同时,Nooden和Leopold也编辑了一本关于植物衰老的文集^[11]。此后文献量和信息量不断积累,将植物衰老的研究大大向前推进。目前,已开始利用现代生物学技术,探索植物衰老的奥秘。

我国植物衰老的研究起步较晚,1983年有一篇介绍植物叶片衰老的论文^[12],之后北京大学、兰州大学、华南植物所和河南大学等先后开展了这方面的研究工作,取得了一些成果。

三、衰老问题研究的重要性

人类寿命的延长与社会财富有很大关系。有人预测2000年发达国家近20%的人超过60岁。各个国家老人数量迅速增加。再过15年,我国也将进入老龄化的国家。如何延迟衰老,以增加有效工作年限,就显得特别重要。一个人从出生到独立自主为社会服务,一般需要十几年到20年,科技工作者需要到25~30年,这个阶段属消费期。如果到60岁退休,那么他为社会服务和社会为他服务的时间比接近1:1;如能把工作时间延迟到80~90岁,那么这种比例就是2:1,这是一笔极大的人力和智力资源。

对植物衰老的研究,可有助于解决许多与人类生活关系密切的大问题。如抗衰老品种的选育与早期鉴定;控制外因以提高农作物的抗逆性;果品、蔬菜、花卉以及延存器官的贮藏与保鲜的新技术开发,种子与种质的保存;生物圈与环境科学中需要解决的问题,如环境保护、草原及森林的更新和保护等等。所以研究植物衰老问题不仅仅从植物科学本身着眼,更重要的是为了人类的生存与未来。

第一章 总 论

多细胞的有机体一生大致可分为三个阶段:发育期(生长期)、生殖期和衰老期。各种生物的生命大致是固定的。人类平均寿命为70岁,最大为120岁。某些水生生物,如乌龟,其寿命可超过180岁;而大鼠只能活到3岁。植物的寿命与人类和哺乳动物不同,有着很大的变化范围(表1-1)。根据计算年轮和 ^{14}C 资料表明,生长在台湾阿里山神木——台湾扁柏树的树龄为5000多年,它们也许是地球上最老的生物种类。据《徐霞客游记》和《嵩阳书院志》记载,嵩阳书院“将军柏”为西周时代的柏树,树龄达3000年。而某些短命植物从种子萌发到果实形成仅几周。

表 1-1 高等种子植物寿命举例(引自吉穆仁,1983)¹¹⁾

树 名	树龄/a	树 名	树龄/a
石榴	80	橙子树	500
木兰	100	栗子树	1000
葡萄树	130	松树	1000
梨树	300	中国樟树	1000
桑树	400	橡树	1000
柳树	400	杉树	2000
梧桐树	400	非洲木樟树	5000 ~ 6000
枫树	400		

一、生命期

有机体的生命期一般分为三个阶段:生长发育期、生殖期和衰老期。

1. 生长发育

发育期包括细胞数量和大小的增加,细胞发生分化以执行其特殊的功能并形成器官。与此同时,器官及机体的大小及机体发挥功能的能力也都在增加。这些变化赋予机体以生殖能力。然而,即使在达到生殖成熟期后,有机体仍然继续生长。

2. 生殖

生殖期的特点是有机体繁殖同类。达不到生殖期的有机体对物种的延续和进化是没有意义的。

生殖期是以有机体结构和功能的改变为标志的。这一时期的另一特点是开始时生殖率很高,然后就逐渐下降。通常生殖子代数越多或者生殖率越高,则其最高寿命越长。

3. 衰老

一旦生物体发育完成,整个生物就开始衰老。其标志是机体功能发生衰退。这种衰退在

生殖后期便可觉察到。在分子和细胞水平上发生的种种变化,终于导致整个机体以及器官功能的衰退。

因此,发育、生殖和衰老是顺次出现的,衰老开始的时间、持续时间和速率取决于生殖期,而生殖的开始又取决于发育。这三个时期是相互关联的,所以不能将老化或衰老视为生命中一个孤立或独立的阶段。图 1-1 是植物生活史简图,它反映了一株植物的生命的全过程。

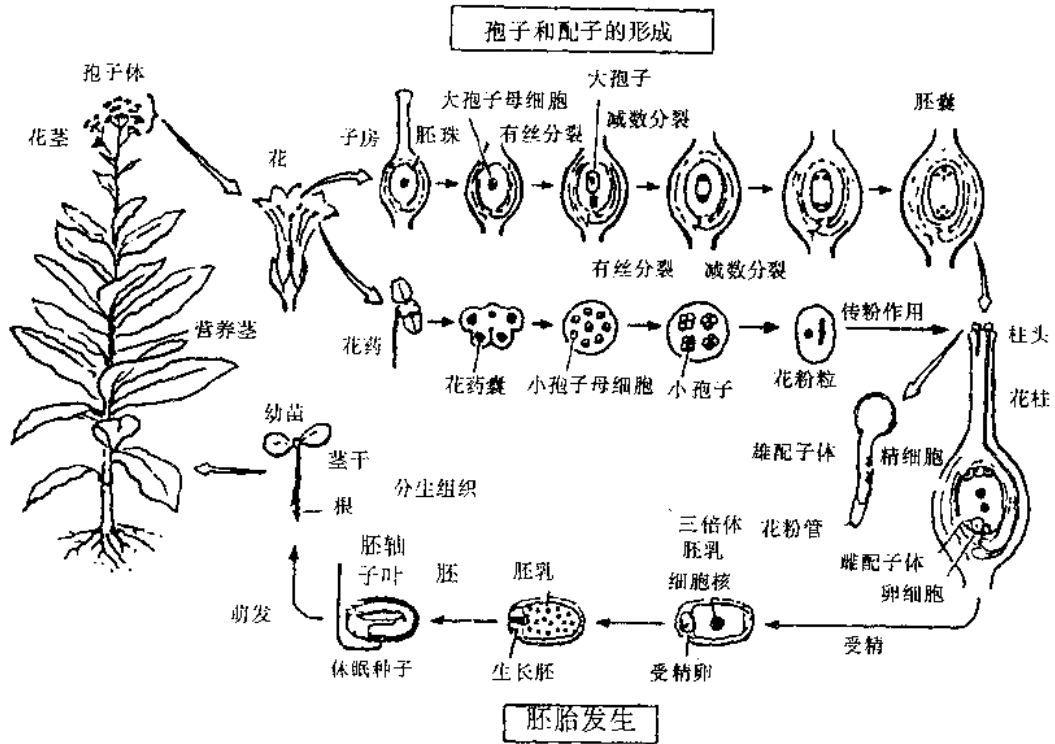


图 1-1 植物生活史图(引自 Goldberg,1987)^[2]

二、植物衰老类型及衰老曲线

1. 植物衰老类型

动物衰老通常是逐渐发生的,衰老过程经历了相当长的生命历程。但在植物中衰老既能逐渐地发生,也能够突然地到来。因为对植物的衰老来说,时间的推移不是唯一因素,而它更多是受到不同种类或环境条件的影响。在自然界中多种植物种之间,寿命的长短相差甚为悬殊。树木经千百年而存活;一年生单子叶植物在一个生长季节内死亡;十字花科的拟南芥菜从萌发到死亡只有 6~7 周;果实的成熟和衰老通常在几周之内;而离体叶片和花朵则在几天之内衰败。另外,环境因素对植物衰老影响也十分显著。至于花药培养和组织培养,则大大延长了这些组织的寿命。

Leopold (1975)^[3]将植物衰老分为四种类型(图 1-2):

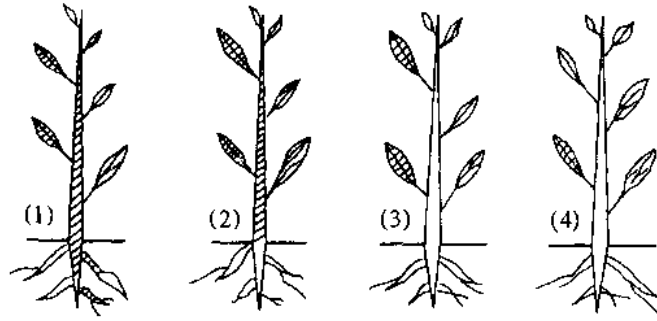


图 1-2 植物衰老的类型^[3]

(1)整体衰老; (2)地上部分衰老; (3)脱落衰老; (4)渐进式衰老

(1) 整体衰老(overall senescence):如一年生草本。

(2) 地上部分衰老(top senescence):如多年生及球茎、鳞茎等。

(3) 脱落衰老(deciduous senescence):如季节性落叶树木,果树在秋冬落叶,有的旱生品种如霸王(*Zygophyllum*)在炎热而干燥的夏季落叶。

(4) 渐进式衰老(progressive senescence):如多年生木本植物,老的器官和组织逐渐被新的器官和组织所取代。

实际情况比上述四种类型更复杂些,有时不同的衰老形式会在同一植物上存在:叶片衰老为脱落式,枝条衰老为渐进式,而生殖器官则又是另一种衰老方式。

2. 衰老曲线

植物群体可以有多种衰老曲线,或叫死亡曲线(death curves),如图 1-3所示。

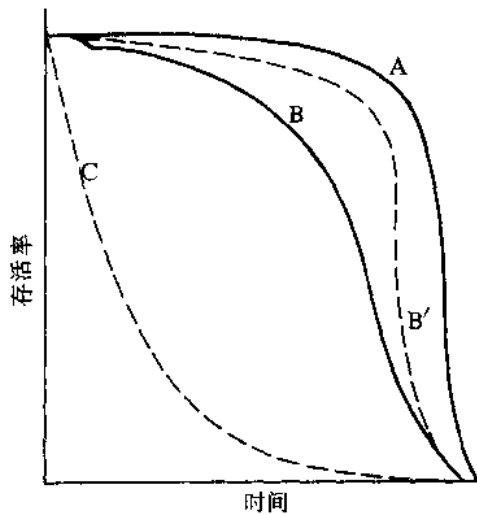


图 1-3 各种生物群体的死亡曲线(引自 Leshem, Y. Y., 1986^[4])

A—正方形的死亡曲线(以死亡率%计),一年生单子叶植物例如小麦田,一有信号,全田死亡。

B及 B'—典型的家畜与人的死亡曲线,社会越进步,越向 B'靠近。

C—多年生、多次结实
的木本、灌木型植物等,例如森林(松)和草原都是 C 型曲线。动物学家 Bodenheimer 曾称这种曲线为野生动物的“生态学死亡曲线”

三、植物衰老的研究方法

植物衰老是一个复杂的生物学课题,是研究生命现象的重要方面。近 20 年来,研究者运用生物化学、生物物理和分子生物学的手段,探索植物衰老的本质和机理,对植物衰老时的结构和功能的改变及代谢的变化积累了许多有价值的资料。但由于所用的方法不同,研究对象的差异,使用的指标也多种多样,而任一种指标似乎只能说明衰老变化的某一方面。现就近年来该领域研究中所选用的材料和使用生理生化、生物物理及分子生物学的方法及其局限性作一简要介绍。

1. 连体和离体器官

提出衰老机理时,一定要考虑现已知的衰老症状中其因果关系链的变化,但对这种因果关系可能性了解远远不够。许多实验都是在离体(detached)水平进行的,其衰老进程要比完整连体(attached)叶片更为迅速。同时,将离体叶片置于已知溶液里,也更容易解释某些因素对衰老作用的实验结果。离体叶片导致衰老过程与自然条件连体叶片的衰老是一致的。离体器官受伤细胞部分非常少,与衰老过程叶片总的生成成分相比相对较小。但是离体叶片接近伤口的细胞代谢的改变以及维管系统水分状态的变化,能强烈地影响到叶片非受伤部分的行为。事实上,离体和连体叶片衰老时,细胞器降解顺序存在着差异^[5]。尽管存在这种不同的意见,但是离体和连体叶片衰老症状的许多方面却有很多相似性。就两种体系来讲,离体状态更有利于进行衰老的研究。事实表明,在研究外界因子和激素等对衰老作用时,离体状态更容易研究,且比连体状态更不受干扰。研究激素对离体叶片衰老的影响,可提供衰老机理许多重要信息,但对结果的解释要谨慎。

然而,用离体器官研究衰老的实验仍存在一些问题。我们尚不知道,为什么离体叶片衰老症状显示更快的进程。因此,如果发现激素对离体叶片发生效应(加速或延迟衰老)时,就不能完全断定体内激素的作用是否也是如此。或许是由于离体叶片未知因素加速了衰老。有时可比较体内(in vivo)或离体叶片的激素作用效应,以确定它们之间的关系。可是,由于其他原因,离体叶片可能不同于连体叶片的衰老诱导过程。

一个生物材料是相当复杂的,包括叶肉、表皮(包括气孔细胞)和不同维管细胞,很难断定是激素直接作用于叶肉细胞引起衰老,还是由于作用其他叶肉细胞的原初效应。

通过研究与衰老有关的不同结构和代谢随时间改变而呈现顺序,提出衰老过程的机理的某些观点,可能会得出衰老时发生不同过程的因果关系。通过激素等处理是否影响衰老过程,可演绎出激素水平控制的衰老。然而,有时激素对衰老叶片产生的效应不一定与衰老过程有关。如细胞分裂素(CK)刺激叶肉细胞蛋白质的合成^[6],如果在衰老叶片中出现这种效应,那么CK延迟衰老,就不意味着提高蛋白质合成的速率。

2. 植物衰老时的生理变化

(1) 叶绿素

叶绿素的逐渐消失是植物衰老的最明显的表现之一(图 1-4)。叶绿素的丧失可导致体内超氧化物自由基产量升高,但是这种伴随黄化的叶绿素丧失是否就触及衰老的机理

呢？现已知在一些情况下，叶绿素含量和衰老之间存在着明显的负相关，而白化叶片或花瓣等缺乏叶绿素的组织，在诱导叶片衰老的同样条件下也一样衰老。另外也发现叶片的黄化是可逆的。细胞分裂素 (CK) 处理黄化和衰老叶片时，可诱导再绿，因这不仅反映这种向青绿幼嫩的转化，而同时膜相也从凝胶态转向液晶态。叶绿体衰老的顶峰是双层膜中外膜脱落，这时细胞器内的结构已全部解体，而 CK 处理衰老的叶绿体可被修复^[7]。由再绿和叶绿体修复现象，引伸出衰老概念的一个基本问题——如果一个明显的衰老现象，如叶绿体降解，是可逆的话，这是否为真正的衰老呢？

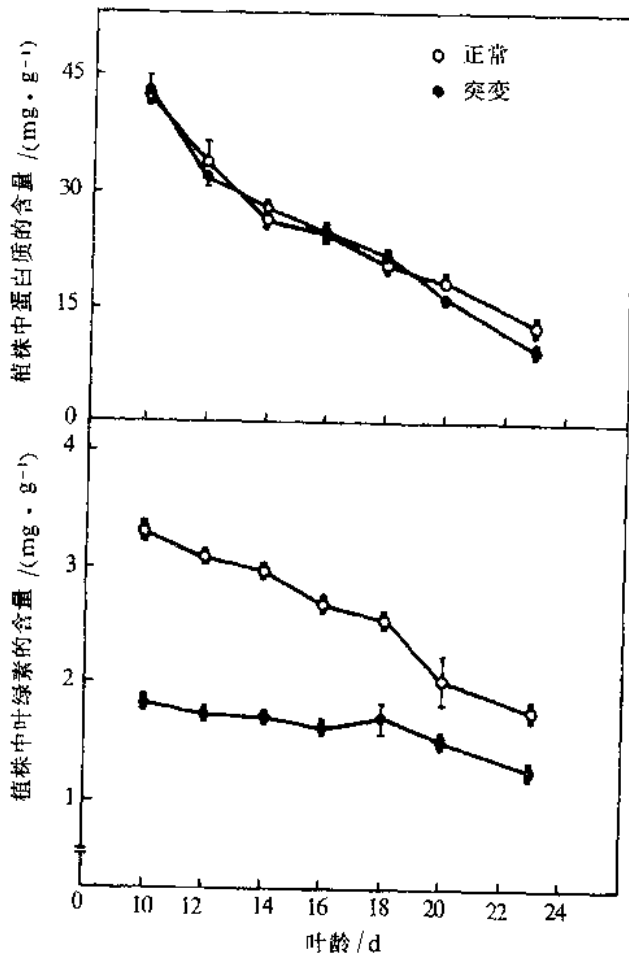


图 1-4 正常和突变植株中叶绿素和蛋白质含量的变化^[8]

(2) 蛋白质

蛋白质是衰老研究经常测定的指标。许多人认为，以蛋白质含量的变化表示衰老的程度较以叶绿素丧失所表示的更为真实。从图 1-4 也可看出，无论正常和突变植株，蛋白质下降有相同趋势，而叶绿素在突变株中的变化不明显。蛋白质控制衰老有两方面的含义：一方面降低蛋白质周转，它是蛋白质合成机理丧失的结果；另一方面蛋白质含量通过蛋白质水解而

降低¹⁹。

在现代生物学中,确定生活细胞如何通过较少蛋白酶调节蛋白质水解,是非常关键的问题。因此有关衰老时蛋白质降解的研究,包括植物蛋白酶的定位、衰老过程中蛋白质水解酶的活动以及叶绿体内本身成分的消化、新合成叶绿体蛋白的消失、未装配的 RuBP 羧化酶小亚基分解的研究都进行得比较深入和广泛,这将在第五章讨论。蛋白质破坏靶蛋白研究揭示了蛋白水解的调控因素。如在哺乳动物、鱼类、昆虫和植物中发现蛋白质降解的泛素(ubiquitin)途径,且已取得了有关发育和衰老调控的有价值结果。

至于被分解的蛋白质,可能是进行光合作用的 RuBP 羧化酶,也可能是其他酶和非酶结构蛋白。从测定结果来看,衰老时蛋白质有逐渐下降的趋势,但也观察到了某个阶段几种蛋白含量有上升的现象。这方面的研究在不久的将来会有令人兴奋的发现,科学家从而可能在科学研究和生产实践中着手构建转基因植物。

(3) 脂类过氧化作用

脂类过氧化作用是衰老的固有特征,是自由基的来源,尤其是烷氧自由基、过氧化自由基和单线态氧。因此测定脂类过氧化就显得很重要。此反应进行可用下述几种方法监控:

- 233 nm 光吸收的增加: 不饱和脂肪酸发生过氧化时,其分子结构出现共轭双键,后者对 233 nm 呈最大吸收。此法简便,但由于生物样品中存在较多的吸收类似波长的紫外光物质,如叶绿素、嘌呤、嘧啶等,因此广泛应用不太可能。

- 氧的吸收和化学发光法: 脂类过氧化会消耗或发出化学光(chemiluminescence),根据氧的消耗量或者化学发光的强度,可以判断脂类氧化的程度。但是这两种方法不是专一反映脂类氧化的方法。

- 酶法: 在 GSH 存在下,谷胱甘肽过氧化物酶可使 ROOH 还原为 ROH,同时 GSH 氧化为 GSSG。因此,在谷胱甘肽还原酶的作用下,与 NADPH 还原 GSSG 偶联在一起,就可根据 340 nm 光吸收,检验出 ROOH。此法专一性强,操作简便,可准确定量,但需要谷胱甘肽过氧化物酶,其提纯较为麻烦,产量偏低,难于适应多种样品常规分析的要求。

- 丙二醛(MDA)的测定: 脂类过氧化最终产物之一是丙二醛,它的含量通常以其硫代巴比妥酸(TBA)颜色反应产物来定量,称为 TBA 试验。该反应很灵敏,被广泛应用。但在解释 TBA 试验结果时,也要特别谨慎。不少方面提到 TBA 试验在酸性溶液中加热,但都没有排除氧的步骤,这就很难肯定所测定的丙二醛的值哪一部分是试验操作形成的,哪一部分是测试以前形成的。因而有人在 TBA 反应混合物中加入抗氧化剂丁基化羟基甲苯(BHD),以阻止试验时不饱和脂类的过氧化。

- 自动氧化速率: 膜脂类氧化能否代表体内状况呢? 由于机体中清除自由基体系很复杂,其中某一种酶或某一物质的变化并不能代表机体的总保护能力的变化。为了表示机体总的清除自由基能力,Cutler (1984)¹⁰⁰ 在动物衰老中采用“自动氧化”的方法,即将组织在生理 pH 下匀浆,在生理温度下暴露于空气中,振荡一段时间,然后测定 MDA 积累的速率。在此过程中 MDA 积累受三种因素的影响: 氧浓度、不饱和脂肪酸含量(底物)和组织总的清除自由基能力。在上述条件下,前两者均为限制因子,因此 MDA 积累速率即可代表组织总清除自由基能力的大小。自动氧化速率越大,MDA 积累越多,表明组织保护能力越弱。一般认为在正常机体中也存在着这一氧化过程,但进行得较慢,因此用自动氧化速率可估计出体内的状况。表 1-2 表示在燕麦旗叶衰老过程中自动氧化速率增加。

表 1-2 燕麦旗叶衰老过程中 MDA 的含量和自动氧化速率的变化^[11]

旗叶叶龄 d	MDA 含量*		自动氧化速率**	
	mol · g ⁻¹	%	mmol · g ⁻¹ · h ⁻¹	%
17	24.2 ± 1.8	100	1.4 ± 0.2	100
26	26.7 ± 3.1	188	2.1 ± 0.3	150
43	33.0 ± 4.1	232.4	3.1 ± 0.4	221.4

* 燕麦旗叶以干重计, ** 自动氧化速率以单位时间生成的 MDA 量表示。

(4) 与代谢有关的酶类变化

当生物机体逐渐进入衰老时,体内新陈代谢逐渐有所变化,甚至发生紊乱,这主要是由于参与代谢有关酶性质的变化所致。就高等植物而言,这种变化有四种:

● **酶水平的改变:**不少研究者曾企图把衰老植物的酶活力水平,与幼嫩植物相比较。但要从这些数据中分析出有意义的结论是较困难的,这主要是因为:不同作者对同一种酶使用不同的测定方法,因而得到不同的数据;通常在底物浓度饱和时测定酶的活性,因此,在不同时间测定它们的活力时,会得出不同的结果;不同的作者用不同的参数表示酶活单位,如 g (湿重),g (干重),mg (蛋白),mg (DNA);大多数酶活性在匀浆状态测定,而匀浆会影响反应速率,与衰老状态体内酶的反应有差异。

由于大部分因子的水平是作为年龄的函数而改变的,因而不可能比较不同年龄植物酶的活力。同样也无法从一条代谢途径的一种酶活力,以每毫克蛋白表示,而与同一途径另一种却以每克干重来表示的酶活力相比较,并得出有意义的结论。由于上述原因,对于任何植物器官还不能对所有酶甚至对一条代谢途径中所有的酶,作为其年龄函数,而得出可比较的数据。一般说来,在衰老阶段,由于代谢功能逐渐衰退,因而其酶的水平也趋于下降。但有时也不尽然,在衰老过程中,有一种组织某一酶水平却反而有所升高,如 PG (多聚半乳糖醛酸酶)和大麦蛋白水解酶。因此确定这些变化规律或类型也比较困难。

● **同工酶型的改变:**在植物趋于衰老时,其体内同工酶的改变也可作为衰老时酶性质改变的一个方面。如将反义聚半乳糖醛酸酶 (PG) 基因导入番茄后,明显减低番茄果实的 PG 活性。在检测的含单个反义 PG 拷贝基因的植物中,成熟果实 PG 活性降低到正常的 5% ~ 50%。自交纯合后,PG 基因表达可抑制到 99% 以上。这一性状稳定遗传到二代。由反义基因转变植株分析表明,在 PG 表达仅为正常植株 1% 的转化植物中,仅有 PG 同工酶 PGI 与果胶溶解有关,PG2 与果胶的解聚有关^[12]。许多植物组织都有脂氧合酶 (Lox) 的同工酶,了解比较清楚的是大豆种子的四种同工酶: L-1, L-2, L3a 和 Lb。这些酶有不同的最适 pH、等电点和底物位点特异性。同时,一些同工酶的免疫分析特性,如大豆 L-1 和 L-3 免疫特性表明, L-2 多克隆抗体可和 L-1 和 L-3 发生交叉反应^[13]。也有证据表明大豆三种同工酶由不同的基因编码,与人类的白细胞克隆基因存在同源序列。同时,番茄果实与微粒体膜有关的可溶性 Lox 可与大豆 Lox-1 多克隆抗体发生交叉反应^[14]。

总之,研究各种酶的同工酶的变化,可得到在基因组水平上发生各种类型改变的信息。基因组不但与同工酶的转移有关,也与酶活力有关。这种同工酶转移由于它们对底物效应物的差异,可损伤代谢途径的精细控制,从而引起代谢途径酶活性的重大改变,并导致机体功能性的变化。

● **酶的诱导变化:**酶可通过其底物或其他物质来提高其水平,称为酶的诱导。诱导酶的

酶水平的增高可由一些诱导物或效应剂来引起。诱导是对专一刺激物或诱导物的专一反应，这种专一刺激物可以是底物、激素、代谢物，甚至是一种外来因子，如温度，因而这也是一种适应过程。在衰老阶段机体对环境的适应能力降低，因而在研究酶的适应性时把诱导能力作为年龄的函数是有意义的，如 IAA 处理可诱导 ACC 合成酶活性增加，促进 SAM 转化成 ACC。

● 酶分子性质的改变：测定一个酶的 K_m 、 K_i 、相对分子质量、电泳迁移率及抗原性，可得出其分子方面有价值的信息。对从幼嫩植物或衰老植物提纯的酶进行这样的研究，就有可能确定幼嫩植物合成的酶结构是否同衰老植物一样。如果不能找出结构上的差异，就表明整个植物生命的全过程是由同一基因控制着酶的功能，而没有任何结构上的改变；如果有差异，就意味着在生命过程的不同时期，有不同的基因操纵。如 ACC 合成酶：Tsai 从绿豆胚轴提取的 ACC 合成酶在 Bio-胶上相对分子质量为 125 000，在变性聚丙烯酰胺胶上相对分子质量为 65 000，说明 ACC 合成酶以二聚体的形式存在。Dong 从苹果中提取的 ACC 合成酶不能与 Blecker 等从番茄得到的该酶抗体发生交叉反应。更有甚者，Imaseki 用 IAA 诱导和逆境诱导 ACC 合成酶抗体也不能发生交叉反应^[5]。这似乎意味着植物体内不止一个 ACC 合成酶基因，因此这方面的研究可导致一些酶的基因定位。

3. 分子生物学方法

近年来，由于分子克隆和 DNA 顺序分析技术的发展，有可能对基因的一级结构进行研究。研究基因的结构，除了要了解基因组外，还要了解基因转录的调控。在比较基因结构时，还能阐明不同种之间在进化上的相关性。

研究基因结构的技术是分子克隆。分子克隆根据从一个异质 DNA 分子群，经体外重组分子的构成、选择和扩增，得一个所需同质分子的原则，使我们过去想从真核生物庞大的基因组 (10^9 数量级核苷酸) 分离出一个特定 DNA 片段 (基因) 来进行研究成为可能。克隆编码蛋白质结构基因，可从分离提纯 mRNA 开始，经反转录合成 cDNA，与合适的载体构成重组分子，转化大肠杆菌，选择包含有这种重组分子的转化体，即得到 cDNA 克隆。

构建 cDNA 克隆有几点好处：其一，可直接进行内切酶图谱学结构分析，与以后基因组 DNA 克隆的结构分析相印证，可以确定插入顺序的有否与位置；其二，经扩增与缺口翻译，制备成探针，从基因组 DNA 库中印影选择与 cDNA 顺序互补基因组 DNA 克隆；其三，研究真核基因在原核细胞中表达。cDNA 是 mRNA 的反转录产物，与经剪切加工后编码顺序互补，不带具有调控作用的 5' 末端和 3' 末端邻接顺序，也不带内含子，因此为研究基因组中得到的单拷贝基因或基因簇的组成基因，就必须将整个基因组由限制性内切酶切成一定长度的重叠片段，完全克隆于 λ 噬菌体载体，这就是构建基因库的方案。从基因库中印影选择某种基因的克隆所需的放射性探针，可通过 mRNA 反转录合成放射性标记 cDNA 或通过克隆 cDNA 的缺口翻译获得。cDNA 克隆或基因组克隆都可用来测定基因组中所含的某种编码的序列的拷贝数，方法是比较克隆 DNA 与总 DNA 杂交的速率和单拷贝 DNA 顺序与总 DNA 杂交速率。基于克隆的序列在基因组的拷贝越多，杂交速率就越快的原理。目前常用的另一种方法即“构成分析”，则基于 Southern 法杂交，克隆 DNA 与基因组总 DNA 的限制酶酶切片段杂交，用杂交带的数目与强度与标准杂交曲线相比较。后者可从同样的探针与相当于单倍基因组上 1, 2, 4, 10... 基因拷贝的克隆 DNA 量所杂交的强度测得。最后，通过克隆 DNA 的序列分析结合蛋白质氨基酸顺序，就可确定基因的精细结构。

至于编码顺序在基因组上的排列方式,一方面根据分子杂交测定重复频度;另外,通过克隆 DNA 的结构分析测定基因的物理连锁,然后与遗传分析的连锁关系或放射性标记探针对于中期染色体制备物的原位杂交综合起来加以确定。植物衰老和成熟的基因调控已有了相当的工作积累,将在第七章讨论。

4. EPR自旋标记和捕捉

(1) 自旋标记技术

电子自旋共振技术是研究衰老自由基作用和膜变化的一个重要工具,近几年来发展快,应用很广。有些物质含有顺磁性金属离子,可直接用顺磁共振研究。然而大部分物质的成分都是抗磁性的,不能直接用顺磁共振技术,自旋标记技术的出现解决了这一矛盾。美国的 McConnell 等人于 1965 年首创自旋标记法,他们将一种稳定的自由基结合到单个分子或一个复杂体系内的一个分子上的特定部位,其 EPR 波谱将能提供有关该自由基所处环境的信息。

对上述这种自由基曾有二种命名:① 凡是与被标记的分子或大分子以共价结合的,称为自旋标记物 (spin label);② 凡与被标记的分子或大分子不是以共价结合的称为自旋探针 (spin probe)。自旋探针可通过疏水键、离子键或氢键与蛋白质相互作用而变为固定化,它们能以简单的在各环境中分溶的方式反映出体系内不同的分子环境。上述两个名词之间的区别实际上并不明确,因为在用于研究复杂体系时,被自旋标记的分子本身常成为自旋探针。所以对被引入生物体系的一切稳定自由基,大多数作者均使用自旋标记物这个名称。

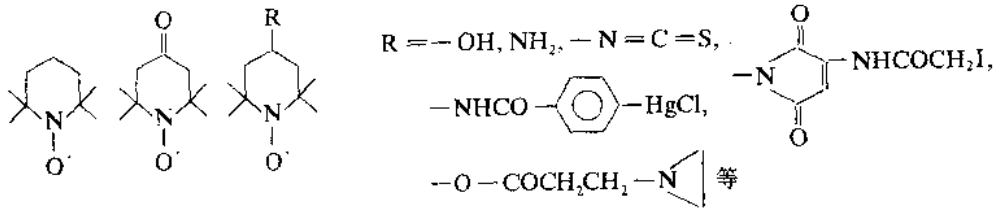
能用作自旋标记物的自由基必须具有一定的特性或符合一系列的要求:① 足够的稳定性,无论在固态,还是在溶液中,它应对光(实验室中一般光亮条件)和空气中的氧稳定。又按研究生物分子时所需条件,在水溶液中应对 pH 2 ~ 10、高的和低的盐浓度和 20 ~ 70 °C 的温度稳定。② 良好的溶解性,即在极性不同的各种溶剂中基本上都能溶解。③ 对分子环境的高度敏感性,特别是对极性、酸度、空间限制和流动性敏感。例如由于它对溶剂的极性敏感,得以探究标记物周围环境的疏水性或亲水性,又由于它对溶剂粘度从而对分子转动的速率敏感,得以测定在标记物环境内所容许的活动程度,特别是测定由某种生化过程引起生物分子构型的改变。④ 高度的专一性,即标记物在生物分子上的结合部位是专一的,在 EPR 测试中并不存在抗磁性环境的干扰。⑤ EPR 波谱较简单而易于解析,从而能提供许多有价值的信息。为了便于记忆起见,这五种特性可用 5 个以 s 起头的英文字来概括: stability, solubility, sensitivity, specificity, simplicity。

氮氧自由基能完全符合上述要求而中选为最常用的自旋标记物,至今大约已合成了 100 多种这类自由基以适用于不同的标记对象。主要有以下四类,见图 1-5。

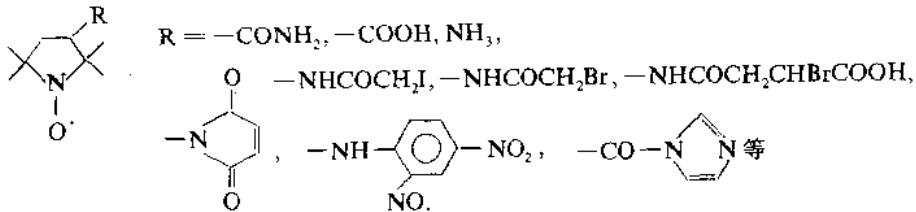
为能更好地解释从自旋标记物的对象中所得的结果,应先了解这些氮氧自由基的结构特性和 EPR 特性。它们的分子由三部分组成:① 带有单电子的氮氧基团是产生顺磁性的根源;② 六员或五员环是氮氧基团安身所在,而与氮原子邻近的 2 个碳原子连接的 4 个烷基则起着摒除外来干扰而使单电子稳定的作用;③ 活性基团 R 用于将本自由基引向合适的目标而与之结合使在氮氧自由基中的 N-O 基团具有三电子键的结构,由于氧电子不具有磁性,只有氮原子与单电子起作用而对 EPR 波谱的超精细结构作出贡献。由于氮原子的核自旋量子数 $I=1$,氮氧自由基在稀溶液中 ($<10^{-3}$ mol/L) 通常显示三峰波谱。从波谱中可直接得出四种参数,即三

峰高度 (h_{+1}, h_0, h_{-1} , 各表示低场峰、中央峰及高场峰的高度)、中央峰的线宽 ΔH_0 , 中央峰的 g 值 (以 g_0 表示) 和超精细分裂常数 $^a N$. 还可根据已有公式计算另外两种参数: 旋转相关时间和各向异性参数.

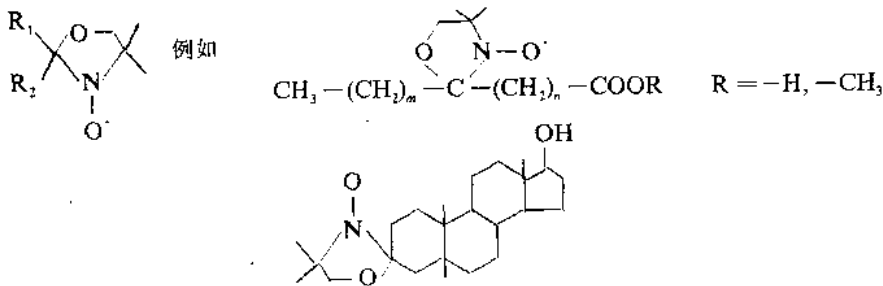
① 哌啶氮氧自由基



② 吡咯烷氮氧自由基



③ 噁唑烷 (oxazolidine) 氮氧自由基



④ 取代基吡咯烷氮氧自由基

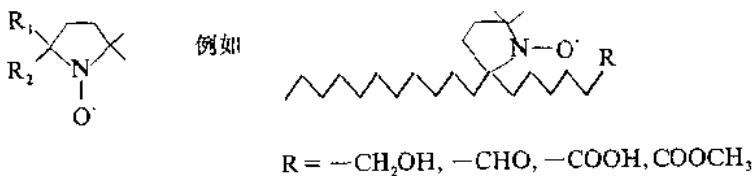


图 1-5 四种自旋标记物结构图式

● 旋转相关时间 (rotational correlation time), 指自由基绕其轴旋转 1 周所需的时间, 用 τ_c 或 τ 表示, τ_c 的倒数称为旋转频率, 即

$$\tau_c = c \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} + \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} + 2 \right)$$

式中 c 为常数, 约为 $5 \times 10^{-16} \sim 7 \times 10^{-10} \text{ s/G}$.

● 各向异性参数 (the parameter of anisotropy), 以 ϵ 表示, 在 ϵ 从正值变为负值和低场峰在 EPR 波谱中成为最强的谱线之时, 出现较大程度的各向异性.

氮氧自由基显示的 EPR 波谱内容极为丰富多变, 反映它们对各种环境因素的高度敏感性, 因而能提供许多有价值的信息, 这正是它们所以成为最常用的自旋标记物的主要原因

之一。

在结合到标记对象以后,标记物的旋转运动受到一定程度的压制,此称为标记物的固定化(immobilization)。反映在 EPR 波谱方面,原来在低粘度溶液中能自由旋转的标记物所显示的三条窄的谱线起了变化,高场峰首先增宽,且低场峰各自逐渐移位到更低的和更高的磁场;与此平行的是 $\tau_c = 10^{-10} \sim 2 \times 10^{-9} \text{s}$, 强固定化相当于 $\tau_c \geq 10^{-8} \text{s}$ 。对共价结合物的标记物的环境施加影响的大分子构型变化即被反映在标记物的固定化程度中。一般认为弱固定化的标记物结合在标记分子的表面,结合松弛;强固定化的标记物结合在其分子内部,结合较紧密。由此能提供有关标记分子在不同条件下构型变化的更有价值的信息。自旋标记法应用到衰老研究已有很多文献,可以研究衰老时酶的动力学及催化作用的速率、变性作用的机理、酶分子中不同基团之间的距离、标记物结合位点的极性、酶的活性部位的几何学和由配位体结合或蛋白水解作用所引起的活性部位构象的变化等。

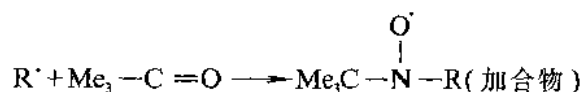
另外一个就是衰老时膜性质的改变,我们可以标记生物膜的脂质或蛋白质组分。引入标记物的方法是使自旋标记的脂质或磷脂嵌入到双层中,或以共价修饰常用方法之一去标记蛋白质。在酰基链上被自旋标记而用于膜双层探测的脂质给出一种特殊的粉末 EPR 波谱,由此可测定波谱的各向异性。已有人设计出一种用于测定膜内甾类自旋标记物的长轴旋转速率的简单方法,借助于测量相对的谱线高度和线宽并利用计算机产生的校准曲线。这是用于测定流体生物膜内脂质旋转运动的唯一可行的方法。用自旋标记法对衰老时种种膜脂质组成和膜的流动性变化进行研究,更能阐明膜内蛋白质与脂质的相互作用。膜蛋白构象的变化可用能与巯基和氨基成共价结合的自旋标记物(最常用者为顺丁烯二酰亚胺、碘乙酰胺和溴乙酰胺的氮氧自由基衍生物)。如果蛋白质能影响膜内脂质的物理状态,则已有许多证据说明脂质流动性可影响膜内酶的结构和功能,脂质相的结构变化亦可更改膜蛋白的构型,所以在—个与脂质的相转变相应的温度下,会出现酶活力的突变。

(2) 自旋捕捉法

本方法最突出的优点是能解决短寿命自由基检测的问题。短寿命自由基一般是快速自由基反应的瞬间产物,极易衰变,其稳态浓度难于达到 EPR 波谱仪检测阈值所要求的水平,所以用普通的 EPR 方法不能予以检测。曾采用过关于直接研究液相中的短寿命自由基的一些改进方法,如用连续流动法使在波谱仪的谐振腔内保持足够高的自由基浓度,或通过降温以增长自由基的寿命。但这些方法却有如下缺点:在第一种情况,需要大量的原料;在第二种情况,必须考虑随着温度升高自由基过程会按不同方式进行,例如在 -100°C 所得结果不一定与常温或更高温度的反应机理符合,且操作复杂,不易掌握。

在溶液中使短寿命的自由基与一种称为自旋捕捉剂 (spin trapping agent) 的抗磁性化合物加成反应,而变成一种寿命较长的自由基产物,叫做自旋加合物 (spin adduct)。后者要比原来的自由基稳定得多,可以在常温下按常规的 EPR 方法进行研究。这种方法称为自旋捕捉技术 (technique of spin trapping)。它不仅解决了短寿命自由基的检测问题,而且还大大拓宽了 EPR 技术的应用范围,近年来获得了迅速的发展。

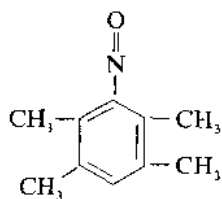
最初使用的捕捉剂是 2-甲基-2-硝基丙烷,经过以下的加成反应而形成加合物:



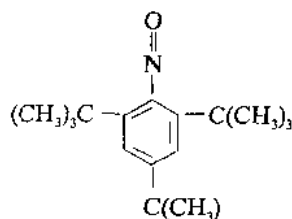
后来加拿大的 Janzen 和 Blackburn 研究了用硝酮 (nitron) 作为反应的自旋捕捉剂, 并首创“自旋捕捉”的名称。

如何判断一个自旋捕捉剂的实用价值呢? 既要根据捕捉剂本身的性质, 也要依据它与短寿命自由基反应所生成的自旋加合物的状况, 两者缺一不可。对捕捉性的要求是: ① 在一般实验条件下稳定; ② 在特定的溶剂中具有良好的溶解性; ③ 对捕捉对象——短寿命的自由基有较大的亲和力, 并能迅速与之反应, 即有较高的捕捉效率。而对自旋加合物的要求是: ① 在特定的溶剂中易于溶解; ② 对一般的化学反应和光化学反应是惰性, 而且尽可能保持较长时间的稳定; ③ EPR 的波谱特征应对捕捉的自由基的性质敏感。

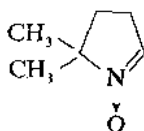
常用的自旋捕捉剂主要是一些含氮的羧基和亚硝基化合物, 如下列化合物都是常用的自旋捕捉剂。



2,3,5,6-四甲基亚硝基苯



2,4,6-三特丁基亚硝基苯 (TNB)



5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (DMPO)

这些捕捉剂与活泼的自由基反应, 可以形成具有未成对电子的氮氧化合物, 后者可用 EPR 方法检测。自旋捕捉技术在研究生物学过程中和各种生物样品经光解或辐射分解后产生的短寿命自由基的检测和鉴定中十分重要, 因而得到了蓬勃的发展。如在许多涉及 O_2^- 的研究中正在广泛地应用, 并取得了显著的成果。我们用 Tiron 测定了小麦叶绿体衰老时 O_2^- 的产量^[10]。

以上介绍了在衰老研究中所使用的技术和指标。衰老的生物学方面的研究在于寻找衰老的原因, 它需要各种学科如生理学、生物化学、生物物理学、分子生物学、化学和物理学相互渗透, 这些研究具有巨大的理论和实用价值。通过上述研究, 人们希望达到以下目的: ① 衰老是一种普遍现象, 找出衰老原因, 它有助于回答下述问题: 物种寿命为什么不同? 衰老从什么时候开始, 什么因素启动衰老? 如何启动衰老? 衰老是否与发育过程一样是编定的程序? ② 上述问题的答案会有助于设计出推迟或防止老化过程开始的科学方法, 因而可控制衰老过程, 为果蔬贮藏保鲜、寻找抗衰老的品种以及草原的更替等问题解决提供依据。