

## 光照和温度胁迫下通过 PS II 的氧自由基产生的分子机理研究进展

祝香芝 (湖北中医药大学检验学院, 湖北武汉 430065)

**摘要** 分别从 PS II 电子供体端和受体端能量和电子的转移过程综述了高光和高温下通过 PS II 的氧自由基产生的分子机理研究进展, 为了解植物如何在变化的环境条件下生存提供了新视野。

**关键词** 光抑制; 热失活; 氧自由基

**中图分类号** S-3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)30-0010-05

### Research Progress on Molecular Mechanism of Production of Reactive Oxygen Species by Photosystem II as a Response to Light and Temperature Stress

ZHU Xiang-zhi (School of Laboratory Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430065)

**Abstract** We introduced research progress in the molecular mechanism of ROS produced by PS II under high light and high temperature from energy and electron transfer on the PS II electron acceptor and donor sides, respectively. The results provide new insights into how plants survive under adverse environmental conditions.

**Key words** Photoinhibition; Heat inactivation; Reactive oxygen species

PS II 是嵌入类囊体膜中的水-质体醌氧化还原酶类, 催化光驱动的  $H_2O$  氧化成  $O_2$ , 质体醌(PQ)还原成  $PQH_2$ 。光驱动的过程包含能量转移和电子转移, 同时伴随着氧自由基(reactive oxygen species, 简称 ROS)的产生。在能量转移上, 单线态氧是能量从三线态叶绿素转移到  $O_2$  形成的。在电子转移上, ROS 是对  $O_2$  连环的单电子还原和分别在 PS II 电子受体端和供体端协调  $H_2O$  的双电子氧化形成的。 $O_2$  的单电子还原形成超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ ), 它发生歧化作用生成过氧化氢( $H_2O_2$ ), 然后在芬顿反应中被还原成羟自由基( $HO\cdot$ )。 $H_2O$  的双电子氧化形成  $H_2O_2$ , 它分别被氧化成  $O_2^{\cdot-}$ 、被还原成  $HO\cdot$ 。酶类和非酶类的清除系统都参与到清除 ROS 和维持在各种非生物(环境条件的改变, 如高光强、高温和低温等)和生物(食草动物和致病菌, 如病毒、细菌和真菌等)胁迫下的 ROS 水平。

研究表明, 在高光强<sup>[1]</sup>和高温<sup>[2]</sup>条件下, PS II 中的蛋白会受到 ROS 造成的氧化损伤。PS II 中的蛋白受到的氧化修饰主要是由 $^1O_2$  这类 ROS 造成的。 $H_2O_2$  不太会氧化 PS II 蛋白, 而  $OH\cdot$  会氧化其产生部位的蛋白。通过体外试验分析发现, 由 ROS 造成的 PS II 蛋白的氧化修饰发生在细胞内, 被 ROS 抑制的蛋白的重新合成是在高光强<sup>[3]</sup>和高温<sup>[4]</sup>条件下进行的。PS II 蛋白质氧化的研究较多, 而 PS II 附近的脂质过氧化物的研究较少。研究表明, 在 PS II 附近形成的 $^1O_2$  会启动类囊体膜的脂质过氧化<sup>[5]</sup>。笔者主要综述了近年来在高光强和高温胁迫下 ROS 形成的分子机理的研究进展, 旨在为研究植物如何在变化的环境条件下生存提供新的视野。

#### 1 高光胁迫下活性氧的产生

在高光下, 能量转移和电子转移的过程中会产生 ROS。叶绿素吸收的光能通过 PS II 捕光天线复合体转移到 PS II 反应中心<sup>[6]</sup>。

**1.1 高光胁迫下 $^1O_2$  的形成** 能量从三线态叶绿素或者三线态羰基转移到  $O_2$  形成 $^1O_2$ 。能量从叶绿素转移到  $O_2$  发生在 PS II 捕光天线复合体和反应中心两处。在 PS II 捕光天线复合体处, 三线态叶绿素是通过光敏反应形成的; 而在 PS II 反应中心处, 三线态叶绿素是通过三线态自由基 $^3[P680^+\text{Pheo}_{Di}^-]$ 电荷重组形成的。三线态羰基能量转移到  $O_2$  形成 $^1O_2$ , 是在光下由 ROS 起始脂质过氧化的过程中发生的。能量从三线态叶绿素转移到  $O_2$  形成 $^1O_2$ , 是高光下 $^1O_2$  的主要来源; 而能量从三线态羰基转移到  $O_2$  形成 $^1O_2$ , 目前试验证据较少, 对 $^1O_2$  的总量贡献极少。

PS II 捕光复合体中的叶绿素吸收的多余能量不能被 PS II 反应中心完全利用时, 能量转移就会受限。在这种情况下, 单线态叶绿素可能会转变为有害的三线态叶绿素。当单线态叶绿素能量淬取不充分时, 单线态叶绿素会转变为三线态叶绿素, 三线态叶绿素作为光敏剂, 将能量转移给  $O_2$  形成 $^1O_2$ <sup>[7]</sup>。为了阻止 $^1O_2$  的形成, 叶绿素和类胡萝卜素相结合, 而类胡萝卜素可以淬灭三线态叶绿素的能量。类胡萝卜素包括胡萝卜素( $\beta$ -胡萝卜素)和它们的含氧衍生物叶黄素类(叶黄素、玉米黄质)<sup>[8]</sup>。在 PS II 捕光天线复合体中, 叶黄素和玉米黄质在三线态叶绿素的淬灭中起了很重要的作用<sup>[9-10]</sup>。叶黄素是永久地与 Lhcb 蛋白相协调, 而玉米黄质在高光强下通过紫黄素可逆的脱-环氧化作用而积累。玉米黄质可能游离在类囊体膜中, 也可能与 Lhcb 蛋白相结合<sup>[11-12]</sup>。4 个叶黄素类的结合位点存在于 PS II 中单体(Lhcb4 到 Lhcb 6)的和三聚物(LHC II)的天线蛋白处。叶黄素类结合在 L1(叶黄素)和 L2(叶黄素结合在 Lhcb, 叶黄素或者玉米黄质结合在单体的 Lhcb4 到 Lhcb6 蛋白)位点能高效地捕获三线态叶绿素的能量。叶黄素在 L1(Lut620)和 L2(Lut621)位点分别是与叶绿素 Chl610 到 Chl614 和 Chl602 到 Chl604 相结合的。结合于 L2 的叶黄素对三线态叶绿素 602 和 603 能量的淬灭效率很高, 而结合于 L1 的叶黄素对三线态叶绿素 612 能量的淬灭不起作用<sup>[13]</sup>。为了维持有效的三线态叶绿素能量的淬灭, 类胡萝卜素跟叶绿素之间必须有适

**作者简介** 祝香芝(1985—), 女, 湖北武汉人, 讲师, 博士, 从事蓝藻抗寒的分子机理研究。

**收稿日期** 2017-09-06

当的距离和方向。当类胡萝卜素和叶绿素之间的距离和方向改变时,类胡萝卜素对三线态叶绿素能量的淬灭就会减弱<sup>[14]</sup>。在这些条件下,当 O<sub>2</sub> 在三线态叶绿素附近时,激发能就会从三线态叶绿素转移到 O<sub>2</sub> 而形成<sup>1</sup>O<sub>2</sub>。比较 PS II 中单体和三聚体的天线蛋白,显示单体的天线蛋白(Lhcb6 > Lhcb5 > Lhcb4)相比三聚体的天线蛋白(LHCII)会产生更多的<sup>1</sup>O<sub>2</sub><sup>[13]</sup>。

当由慢速电子转移到 Q<sub>A</sub> 和 Q<sub>B</sub> 电子造成电子转移在 PS II 电子受体端受限时,几种类型的电荷重组 [P680<sup>+</sup> Q<sub>A</sub><sup>-</sup>] 和 <sup>1</sup>[P680<sup>+</sup> Pheo<sub>D1</sub><sup>-</sup>] 激进电子对就会出现。当 [P680<sup>+</sup> Q<sub>A</sub><sup>-</sup>] 电子对单独地结合到 P680 的基态,电子反转的从 Q<sub>A</sub><sup>-</sup> 转移到 Pheo<sub>D1</sub> 就会形成初级的激进电子对<sup>1</sup>[P680<sup>+</sup> Pheo<sub>D1</sub><sup>-</sup>], 自旋方向改变后要么重组到基态的 P680, 要么转变为三线态自由基<sup>3</sup>[P680<sup>+</sup> Pheo<sub>D1</sub><sup>-</sup>]。三线态自由基<sup>3</sup>[P680<sup>+</sup> Pheo<sub>D1</sub><sup>-</sup>] 的重组会形成三线态叶绿素<sup>3</sup>P680\*, 使其不受弱耦合的叶绿素二聚体 P<sub>D1</sub> 和 P<sub>D2</sub> 的束缚<sup>[15-16]</sup>。试验数据表明,在低温下三线态叶绿素位于 Chl<sub>D1</sub> 处<sup>[17]</sup>。3Chl<sub>D1</sub> 要么直接由三线态自由基<sup>3</sup>[P680<sup>+</sup> Pheo<sub>D1</sub><sup>-</sup>] 的电荷重组而形成, 要么由三线态能量从<sup>3</sup>P680\* 转移到 Chl<sub>D1</sub> 而形成。由于 2 种 β-胡萝卜素 (Car<sub>D1</sub> 和 Car<sub>D2</sub>) 都远离叶绿素二聚体 P<sub>D1</sub> 和 P<sub>D2</sub>, β-胡萝卜素没法淬灭三线态叶绿素<sup>3</sup>P680\* 的能量。

**1.2 高光胁迫下 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的形成** O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的形成是在 PS II 电子受体端发生的, 由 O<sub>2</sub> 减少 1 个电子而形成。脱镁叶绿素 (Pheo<sub>D1</sub><sup>-</sup>) 紧密地结合质体半醌 Q<sub>A</sub>, 与质体半醌 Q<sub>B</sub> 或 Q<sub>C</sub> 松散结合, 质体醌和形成细胞色素 b<sub>559</sub> 的亚铁作为 O<sub>2</sub> 的电子供体<sup>[18]</sup>。由于 Pheo<sub>D1</sub><sup>-</sup> 有非常强的消极的氧化还原的潜力, O<sub>2</sub> 极易被 Pheo<sub>D1</sub><sup>-</sup> 还原; 然而, 其极短的半衰期使得扩散对 O<sub>2</sub> 还原的限制变得不太合理。然而, 由于 O<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的浓度不同, O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> 电子对的标准氧化还原电位由根据能斯特方程向更正值的转变, 而 O<sub>2</sub> 被质体醌受体变得可行<sup>[19]</sup>。对暴露在高光下的缺少 QA 的 D1/D2/cyt b559 复合体体外分离产生的一个有意义的细胞色素 (III) 还原率的观察显示 Pheo<sub>D1</sub><sup>-</sup> 有能力去还原 O<sub>2</sub>。用伏安法对分离的类囊体膜中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的检测显示 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产生是通过紧密结合质体半醌 QA 进行的<sup>[20]</sup>。而目前的试验证据又显示 O<sub>2</sub> 的还原是通过松散结合质体半醌进行的。有作者证实质体半醌是通过质体醌在 QB 处减少 1 个电子而形成的, 质体醌在 QC 位点由 cyt b559 进行一电子氧化。把涉及在电子线性运输中的辅助因子分离开, cyt b559 的 LP 形式的亚铁血红素显示可以还原 O<sub>2</sub> 形成 O<sub>2</sub><sup>-</sup><sup>[21]</sup>。

研究表明, PS bS 的缺失会导致在高光下产生更多的 O<sub>2</sub><sup>-</sup>。PS bS 的缺失可能导致 Q<sub>A</sub>/Q<sub>A</sub><sup>-</sup> 氧化还原电子对由中间氧化还原电位向更负的值转变, 从而增强由 Q<sub>A</sub><sup>-</sup> 产生的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产量<sup>[22]</sup>。与受损伤的 PS II 复合体在 D1 蛋白修复循环期间从基粒迁移到基质片层有关联的 D1 蛋白磷酸化显示降低了 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产生<sup>[23]</sup>。D1 蛋白磷酸化导致 D1 蛋白构象改变, 进而修饰质体半醌与 Q<sub>B</sub> 位点的松散结合。因此, Q<sub>B</sub> 位点的改变会带来由松散结合的质体半醌 Q<sub>B</sub><sup>-</sup> 所产生的 O<sub>2</sub><sup>-</sup>

的减少。关于这个理论, Poudyal 等在 2016 年又做了证实。他们研究证实在高光下, 在 STN8 激酶被敲除的小鼠中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产生增强了<sup>[24]</sup>。O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产生增强是由于缺乏由 STN8 激酶诱导的磷酸化导致的构象改变。

**1.3 高光胁迫下 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的形成** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是由 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的单电子还原和 H<sub>2</sub>O 在 PS II 电子受体端和供体端的双电子氧化分别独立形成的。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 由 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的单电子还原形成是发生歧化作用或者被质体半醌所维持。在歧化作用中, 2 个 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 同时被还原、氧化形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub>。在自发的歧化作用中, 2 个分子的负电荷的排斥作用使得 2 个 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的相互作用受限制, 而质子化形式的超氧化物、超氧化氢自由基 (HO<sub>2</sub><sup>-</sup>), 无论是和 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 还是和 HO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的相互作用都是可行的。在酶的歧化作用中, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的还原和氧化是由氧化还原活性金属中心的氧化还原态的改变引起的, 而氧化还原活性中心的金属离子分别服务于超氧化物氧化酶 (SOO) 和超氧化物还原酶 (SOR)。研究表明, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 与非血红素铁相互作用导致亚铁的氧化和过氧三价铁的形成, 过氧三价铁质子化成铁氧过氧化物种 (结合过氧化氢)<sup>[25]</sup>。cyt b559 的铁和亚铁血红素分别显示了 SOO 和 SOR 的活性<sup>[26-27]</sup>。除了歧化作用, PQ 库中游离的 PQ<sup>-</sup> 被认为也参与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的形成。游离的 PQ<sup>-</sup> 还原 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[28]</sup>。研究证实在质体醌库中形成的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 调控高光下 PS II 捕光天线复合体的大小。此外, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能是由光敏剂产生的<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 与 PQH<sub>2</sub> 相互作用形成的。在类囊体膜处由 PQH<sub>2</sub> 还原<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 所形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能会导致蛋白激酶 STN7 的二聚化, 从而激活该酶。

当 H<sub>2</sub>O 的四电子完全氧化成 O<sub>2</sub> 有限时, 由 H<sub>2</sub>O 的双电子氧化形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 这种途径是由 Mn<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Ca 簇来维持的。然而, 在 H<sub>2</sub>O 的四电子氧化成 O<sub>2</sub> 的过程中, 所有的 4 个锰都有氧化还原活性, H<sub>2</sub>O 不完全氧化成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 涉及 2 个有氧化还原活性的锰。H<sub>2</sub>O 的双电子氧化被提出涉及到 S<sub>2</sub> 向 S<sub>0</sub> 态的转换或者 S<sub>1</sub> 向 S<sub>-1</sub> 态的转换。有研究表明, 结合于 Mn<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Ca 簇氯化物的释放能增强 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的形成<sup>[29]</sup>。对桥氧基的配位羟离子的亲核攻击被提出来作为氢过氧化物形成的一个有吸引力的模型。对羟离子的亲核攻击协调 Mn(4) 和 Cl(2), 桥氧基协调 Ca 形态的氢过氧化中间物。配位羟离子是由 H<sub>2</sub>O 基质的双去质子化协调 Ca 形成的。锰协调的配位羟离子亲核攻击 Ca 协调的亲电子的桥氧基, 形成过氧化氢中间物替代 Cl(2) 来与 Mn(4) 协调。Cl(2) 控制 H<sub>2</sub>O 基质对 Mn(4) 的接近以及配位羟离子的亲核性, 进一步控制配位羟离子和桥氧基的相互作用。H<sub>2</sub>O 基质, 作为配位羟离子的前体物质, 当 Cl(2) 结合位点因释放水而对溶剂水开放时, 进入催化中心。

**1.4 高光胁迫下 HO· 的形成** 羟自由基 (HO·) 是由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 PS II 的电子受体端和供体端的单电子还原形成的。游离 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 单电子还原形成, 在 PS II 电子受体端绑定过氧化物, 这 2 个过程显示分别由游离铁离子和非血红素铁来维持<sup>[25]</sup>。

研究证实由  $O_2^{\cdot-}$  与亚铁非血红素铁相互作用形成的过氧化物的还原可通过含氧亚铁离子中间物形成  $HO\cdot$ 。

在 PS II 的电子供体端的单电子还原形成羟自由基可能是被 Mn 维持的。从热力学的观点来看,通过 Mn 的  $H_2O_2$  的还原是不可行的。有人提出通过 Mn 的  $H_2O_2$  的还原可通过以下 2 点变得在热力学上更为有利:①Mn 氧化还原电位的减少导致的 Mn 与蛋白的协调;② $H_2O_2/HO\cdot$  氧化还原电对标准氧化还原电位的增加导致腔体中 pH 的降低<sup>[30]</sup>。现已证实由 Cl 导致的 PS II 膜耗尽相比正常的 PS II 膜显示更高的  $HO\cdot$  形成<sup>[29]</sup>。PS II 电子供体端不完全的水氧化产生  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$  还原形成  $HO\cdot$ 。

## 2 高温胁迫下活性氧的产生

当 PS II 暴露在高温胁迫下时,PS II 活性的减少表示为热失活的发生<sup>[31]</sup>。热失活发生在 PS II 电子受体端和供体端。在 PS II 电子供体端,热失活与水氧化抑制相联系,伴随着结合位点处的 PSbO、PSbP 和 PSbQ 蛋白以及 Ca、Cl、Mn 的释放<sup>[32]</sup>。在 PS II 电子受体端,热失活与电子从  $Q_A$  到  $Q_B$  转移的抑制相关联<sup>[33]</sup>。研究证实  $Q_A/Q_A^{\cdot-}$  氧化还原电对氧化还原中间电位的增加会抑制从  $Q_A$  到  $Q_B$  的电子转移。相对于高光胁迫,在高温胁迫下 ROS 的形成并不是由叶绿素吸收的能量驱动的;而是与热诱导的类囊体膜处结构和功能的改变有关。在 PS II 电子受体端,由脂质过氧化形成的高能量的中间物分解就形成了  $^1O_2$ 。在 PS II 电子供体端,不完全的  $H_2O$  氧化形成  $H_2O_2$ , 在芬顿反应中  $H_2O_2$  被 Mn 还原形成  $HO\cdot$ 。

**2.1 高温胁迫下  $^1O_2$  的形成**  $^1O_2$  是由三线态能量转移从  $^3L^*$  到  $O_2$ ,  $O_2$  是在脂质过氧化的过程中由高能量的中间物二氧杂环丁烷或者四氧化物分解而产生的<sup>[34]</sup>。观察发现由甘露醇形成的  $HO\cdot$  的消除不会抑制  $^1O_2$  的形成,显示脂质过氧化不太可能由  $HO\cdot$  起始<sup>[35]</sup>。有研究证实,在衣藻细胞中由邻苯二酚和咖啡酸对脂肪氧合酶的抑制阻止了  $^1O_2$  的形成<sup>[36]</sup>。单线态氧被认为是在脂质阶段、 $Q_B$  位点的附近形成的<sup>[2]</sup>。由基质复合物的减少导致的 PQ 还原形成的  $PQH_2$  可能产生 ROS, 进而损伤 D1 蛋白<sup>[37]</sup>。

**2.2 高温胁迫下  $H_2O_2$  的形成**  $H_2O_2$  是在 PS II 电子供体端  $H_2O$  的双电子氧化形成的。现提出外源性蛋白 (PSbO、PSbP 和 PSbQ) 的释放最终导致  $H_2O_2$  的形成<sup>[38]</sup>。应用 amplex 红色荧光分析证实 PS II 膜暴露在高温 (40 °C) 会导致  $H_2O_2$  的形成<sup>[39]</sup>。研究证实氯化物竞争性试剂——醋酸盐与  $Mn_4O_5Ca$  簇结合以及水通道的阻塞,会阻碍  $H_2O_2$  的形成。基于这些观察,在与  $Mn_4O_5Ca$  簇结合位点附近的氯化物的释放会导致水不可控的与  $Mn_4O_5Ca$  簇的易接近。维持对  $H_2O$  的四电子氧化生成  $O_2$  的控制,  $H_2O$  与  $Mn_4O_5Ca$  簇的接近才能被控制。氯化物协调  $Mn_4O_5Ca$  簇附近的氨基酸控制  $H_2O$  与金属中心的接近,然后维持适当的  $H_2O$  的四电子氧化生成  $O_2$ 。然而,当氯化物从它的结合位点释放,  $H_2O$  转移到  $Mn_4O_5Ca$  簇是自由的,  $O_2$  不完全氧化生成  $H_2O_2$  就会发生。蓝细菌 (*Thermosynechococcus vulcanus*) 的 PS II 晶体结构显示

2 个氯化物分别在距离  $Mn_4O_5Ca$  簇 6.67 Å 和 7.40 Å 的位置<sup>[40]</sup>。为了避免氧化周围的氨基酸,扩散到内腔的  $H_2O_2$  被限制在通道中。 $H_2O_2$  作为类似于  $H_2O$  的一个较大的极性分子,  $H_2O_2$  扩散到内腔很有可能是通过水通道。当  $H_2O_2$  通过水通道渗出,它可能与 Mn 相互作用而形成  $HO\cdot$ 。

**2.3 高温胁迫下  $HO\cdot$  的形成** 羟自由基是在 PS II 电子供体端由  $H_2O_2$  的单电子还原形成的。应用 EPR 自旋捕获光谱学证实 PS II 膜暴露在高温下会导致  $HO\cdot$  的形成<sup>[35]</sup>。研究证实  $HO\cdot$  的产生能完全被外源的过氧化氢酶和金属螯合剂抑制,显示  $HO\cdot$  的形成是通过金属催化的芬顿反应进行的。此外,对外源钙和氯化物的添加阻止了  $HO\cdot$  形成,  $HO\cdot$  是通过  $Mn_4O_5Ca$  簇产生的。亦有研究证实,没有  $Mn_4O_5Ca$  簇的 PS II 膜不会有  $HO\cdot$  产生<sup>[2]</sup>。在  $Mn_4O_5Ca$  簇的结合位点附近用醋酸盐代替氯化物以及水通道的堵塞以与  $H_2O_2$  一样的形式阻碍了  $HO\cdot$  的形成,根据这些提出了氯化物在  $HO\cdot$  的形成过程中有重要作用的假设<sup>[39]</sup>。研究者提出由不完全的  $H_2O$  氧化形成的  $H_2O_2$ , 通过芬顿反应、在从  $Mn_4O_5Ca$  簇释放的游离 Mn 调解下被还原成  $HO\cdot$ 。在高温下, Mn 从它的结合位点的释放是利用原子吸收作用<sup>[41]</sup> 和 EPR 光谱学<sup>[42-43]</sup>。用 X 射线吸收光谱的研究表明,  $Mn_4O_5Ca$  簇的分解发生在 2 个步骤<sup>[43]</sup>: 第 1 步, 2 个 Mn 从它们的结合位点释放进入内腔, 留下 2 个 Mn 通过 1 个双- $\mu$ -含氧的桥连接; 第 2 步留下的 2 个 Mn 从 PS II 释放。

## 3 ROS 在氧化损伤中的作用

在高温下,蛋白质和脂类可能被在 PS II 形成的 ROS 所氧化。PS II 蛋白被证实按以下顺序被氧化修饰:  $D1 > D2 > Cyt\ b559 > CP43 > CP47 > Mn_4O_5Ca$  簇<sup>[44]</sup>。内腔中氨基酸的氧化暴露了 D1 蛋白的 AB 环,形成了 24 kD 的 C 末端和 9 kD N 末端碎片,然而,基质中氨基酸氧化暴露 D1 蛋白的 D-de 环形成 23 kD N 末端和 9 kD C 末端碎片<sup>[45]</sup>。用质谱分析法对 D1 蛋白中氨基酸的自然氧化的鉴定显示是在 ROS 产生位点附近发生的<sup>[46-47]</sup>。D1 蛋白的氧化是在体外研究的,关于体内 D 蛋白的氧化证据有限<sup>[48]</sup>。D1 蛋白的一个有效的修复循环包括损伤 D1 蛋白的水解和新合成的 D1 蛋白替换原来损伤的 D1 蛋白,这对于维持 PS II 的可行性是必需的<sup>[49-50]</sup>。参与高光下 PS II 蛋白损伤的 ROS 会抑制蛋白的重新合成,以翻译的延伸因子为其攻击的初始靶位点<sup>[3]</sup>。然而,考虑到有限的 ROS 的扩散,更可能的是在基质中产生的 ROS 可能在 D 修复循环中氧化翻译的延伸因子。由于类胡萝卜素缺乏有效的三重态能量激发的捕获,因而在 PS II 蛋白损伤过程中从结合位点释放到基质的叶绿素或者是叶绿素合成过程中的叶绿素前体是  $^1O_2$  合成的可能“候选者”。为了避免  $^1O_2$  的形成,没有束缚的叶绿素可能暂时协调光诱导的蛋白。已有研究证实小的 CAB 相似蛋白在 PS II 损伤的过程中可以阻止  $^1O_2$  的形成,很可能是通过与从受损伤的 PS II 复合体释放的叶绿素相结合而进行的<sup>[51]</sup>。与膜蛋白结合的脂类会被 ROS 氧化。 $^1O_2$  起始的脂质过氧化包含  $^1O_2$  嵌入到多不饱和脂肪酸的双键中,然而  $HO\cdot$  起始的脂质过氧化

是通过从多不饱和脂肪酸的抽氢反应进行的。初级(LOOH)和二级(LOH、RCS 和激发态分子)的脂质过氧化产物都是在高光下形成的。在植物拟南芥中羧脂肪酸的形成证实了这点<sup>[5]</sup>。<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 对多不饱和脂肪酸的氧化导致 LOOH 的形成,进一步形成 LOH 的同分异构体(10-HOTE 和 15-HOTE)。

在高温下,ROS 氧化蛋白质和脂类。已有研究表明,类囊体膜暴露在高温下会导致 D1 蛋白的剪切,形成 9 kD C 末端和 23 kD N 末端碎片,FtsH 蛋白酶涉及到高温下 D1 蛋白的剪切中<sup>[52]</sup>。有研究表明,通过在 QB 位点与在脂质过氧化中形成的 LOO· 结合形成的<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, 通过与 D1 蛋白的 D-de 环以一种与在高光下相似的方式相互作用导致 D1 蛋白的降解<sup>[2]</sup>。虽然内源 ROS 对 PS II 蛋白的氧化损伤的试验证据已在体外获得,但是高温下体内 PS II 蛋白损伤情况尚不明确。除了涉及到 PS II 蛋白氧化损伤中的 ROS,也提出 ROS 抑制高温下蛋白的重新合成。脂质过氧化与 RCS 相关<sup>[4]</sup>。在高温胁迫下,植物拟南芥中会有丙二醛形成。

#### 4 结语

植物在自然界中经常会遭受各种胁迫,从而影响它们的生存和生长。由于光合作用的光反应被抑制会在其他细胞功能被损伤前发生,因此研究高光对光合作用的影响具有重要意义。在自然界中,植物会同时受到多种胁迫,高光强胁迫又与造成全球变暖的高温胁迫相关。已有研究主要集中在高光、高温或者这 2 个胁迫下光合复合体结构和功能的改变。研究通过 PS II 的 ROS 形成的分子机制有助于了解植物在高温和高光胁迫下对环境的适应过程。

#### 参考文献

- [1] ARO E M, VIRGIN I, ANDERSSON B. Photoinhibition of photosystem II: Inactivation, protein damage and turnover[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 1993, 1143(2): 113–134.
- [2] YAMAMOTO Y, AMINAKA R, YOSHIOKA M, et al. Quality control of photosystem II: Impact of light and heat stresses[J]. *Photosynthesis research*, 2008, 98(1/2/3): 589–608.
- [3] NISHIYAMA Y, ALLAKHVERDIEV S I, MURATA N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II[J]. *biochimica et biophysica acta*, 2006, 1757(7): 742–749.
- [4] ALLAKHVERDIEV S I, KRESLAWSKI V D, KLIMOV V V, et al. Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis[J]. *Photosynthesis research*, 2008, 98(1/2/3): 541–550.
- [5] TRIANTAPHYLIDES C, KRISCHKE M, HOEBERICHTS, et al. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants[J]. *Plant physiology*, 2008, 148(2): 960–968.
- [6] RABERTA CROCE H V A. Light harvesting in photosystem II[J]. *Photosynthesis research*, 2013, 116(2/3): 251–263.
- [7] RUBAN A V, JOHNSON M P, DUFFY C D P. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, 1817(1): 167–181.
- [8] DOMONKOS I, KIS M, GOMBOS Z, et al. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis[J]. *Progress in lipid research*, 2013, 52(4): 539–561.
- [9] DALL'OSTO L, HOLT N E, KALIGOTLA S, et al. Zeaxanthin protects plant photosynthesis by modulating chlorophyll triplet yield in specific light-harvesting antenna subunits[J]. *Journal of biological chemistry*, 2012, 287(50): 41820–41834.
- [10] DALL'OSTO L, LICO C, ALRIC J, et al. Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHC II antenna complex of higher plants and effective photoprotection in vivo under strong light[J]. *BMC plant biology*, 2006, 6(1): 32.
- [11] HAVAUX M, NIYOGI K K. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 1999, 96(15): 8762–8767.
- [12] PINNOLA A, DALL'OSTO L, GEROTTO C, et al. Zeaxanthin binds to light-harvesting complex stress-related protein to enhance nonphotochemical quenching in *Physcomitrella patens*[J]. *Plant cell*, 2013, 25(9): 3519–3534.
- [13] BALLOTTARI M, MOZZO M, GIRARDON J, et al. Chlorophyll triplet quenching and photoprotection in the higher plant monomeric antenna protein Lhcb5[J]. *The journal of physical chemistry B*, 2013, 117(38): 11337–11348.
- [14] CUPELLINI L, JURINOVICH S, PRANDI I G, et al. Photoprotection and triplet energy transfer in higher plants: The role of electronic and nuclear fluctuations[J]. *Physical chemistry chemical physics*, 2016, 18(16): 11288–11296.
- [15] FISCHER B B, HIDEG É, KRIEGER-LISZKAY A. Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms[J]. *Antioxidants and redox signaling*, 2013, 18(16): 2145–2162.
- [16] TELFER A. Singlet oxygen production by PS II under light stress: Mechanism, detection and the protective role of beta-carotene[J]. *Plant cell physiology*, 2014, 55(7): 1216–1223.
- [17] NOGUCHI T, TOMO T, KATO C. Triplet formation on a monomeric chlorophyll in the photosystem II reaction center as studied by time-resolved infrared spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(7): 2176–2185.
- [18] YADAV D K, PRASAD A, KRUK J, et al. Evidence for the involvement of loosely bound plastoquinones in superoxide anion radical production in photosystem II[J]. *Plos one*, 2014, 9(12): 1–15.
- [19] POSPÍŠIL P. Production of reactive oxygen species by photosystem II[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2009, 1787(10): 1151–1160.
- [20] CLELAND R E, GRACE S C. Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II[J]. *FEBS letters*, 1999, 457(3): 348–352.
- [21] POSPÍŠIL P, SNYRYCHOVA I, KRUK J, et al. Evidence that cytochrome b559 is involved in superoxide production in photosystem II: Effect of synthetic short-chain plastoquinones in a cytochrome b559 tobacco mutant[J]. *Biochemical journal*, 2006, 397(2): 321–327.
- [22] ZULFUGAROV I S, TOVUU A, EU Y J, et al. Production of superoxide from Photosystem II in a rice (*Oryza sativa* L.) mutant lacking PS bS[J]. *Bmc plant biology*, 2014, 14(1): 242.
- [23] CHEN L B, JIA H Y, TIAN Q, et al. Protecting effect of phosphorylation on oxidative damage of D1 protein by down-regulating the production of superoxide anion in photosystem II membranes under high light[J]. *Photosynthesis research*, 2012, 112(2): 141–148.
- [24] POUDYAL R S, NATH K, ZULFUGAROV I S, et al. Production of superoxide from photosystem II-light harvesting complex II supercomplex in STN8 kinase knock-out rice mutants under photoinhibitory illumination[J]. *Journal of photochemistry & photobiology B biology*, 2016, 162: 240–247.
- [25] POSPÍŠIL P, ARATÓ A, KRIEGER-LISZKAY A, et al. Hydroxyl radical generation by Photosystem II[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(21): 6783–6792.
- [26] TIWARI A, POSPÍŠIL P. Superoxide oxidase and reductase activity of cytochrome b559 in photosystem II[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2009, 1787(8): 985–994.
- [27] POSPÍŠIL P. Enzymatic function of cytochrome b<sub>559</sub> in photosystem II[J]. *Journal of photochemistry & photobiology B biology*, 2010, 104(1/2): 341–347.
- [28] BORISOVA-MUBARAKSHINA M M, IVANOV B N, VETOSHKINA D V, et al. Long-term acclimatory response to excess excitation energy: Evidence for a role of hydrogen peroxide in the regulation of photosystem II antenna size[J]. *Journal of experimental botany*, 2015, 66(22): 7151–7164.
- [29] ARATÓ A, BONDARAVA N, KRIEGER-LISZKAY A. Production of reactive oxygen species in chloride- and calcium-depleted photosystem II and their involvement in photoinhibition[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2004, 1608(2/3): 171–180.
- [30] POSPÍŠIL P. Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, 1817(1): 218–231.
- [31] MATHUR S, AGRAWAL D, JAJOO A. Photosynthesis: Response to high temperature stress[J]. *Journal of photochemistry & photobiology b biology*, 2014, 137(8): 116–126.
- [32] BARRA M, HAUMANN M, DAU H. Specific loss of the extrinsic 18 kDa

- protein from Photosystem II upon heating to 47 degrees C causes inactivation of oxygen evolution likely due to Ca release from the Mn-complex [J]. *Photosynthesis research*, 2005, 84(1/2/3): 231 - 237.
- [33] POSPÍ ŠIL P, TYYSTJARVI E. Molecular mechanism of high-temperature-induced inhibition of acceptor side of Photosystem II [J]. *Photosynthesis research*, 1999, 62(1): 55 - 66.
- [34] POSPÍ ŠIL P, PRASAD A. Formation of singlet oxygen and protection against its oxidative damage in Photosystem II under abiotic stress [J]. *Journal of photochemistry & photobiology b biology*, 2014, 137(8): 39 - 48.
- [34] POSPÍ ŠIL P, ŠNYRYCHOVÁ I, NAU Š J. Dark production of reactive oxygen species in photosystem II membrane particles at elevated temperature: EPR spin-trapping study [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2007, 1767(6): 854 - 859.
- [36] PRASAD A, FERRETTI U, SEDLÁ RROVÁ M et al. Singlet oxygen production in *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress [J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 1 - 3.
- [37] MARUTANI Y, YAMAUCHI Y, KIMURA Y, et al. Damage to photosystem II due to heat stress without light-driven electron flow: Involvement of enhanced introduction of reducing power into thylakoid membranes [J]. *Planta*, 2012, 236(2): 753 - 761.
- [38] THOMPSON L K, BLAYLOCK R, STURTEVANT J M, et al. Molecular-basis of the heat denaturation of photosystem III [J]. *Biochemistry*, 1989, 28(16): 6686 - 6695.
- [39] YADAV D K, POSPÍ ŠIL P. Role of chloride ion in hydroxyl radical production in photosystem II under heat stress: Electron paramagnetic resonance spin-trapping study [J]. *Journal of bioenergetics & biomembranes*, 2012, 44(3): 365 - 372.
- [40] UMENA Y, KAWAKAMI K, SHEN J R, et al. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å [J]. *Nature*, 2011, 473(7345): 55 - 60.
- [41] NASH D, MIYAO M, MURATA N. Heat inactivation of oxygen evolution in photosystem II particles and its acceleration by chloride depletion and exogenous manganese [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 1985, 807(2): 127 - 133.
- [42] COLEMAN W J, GOVINDJEE, GUTOWSKY H S. The effect of chloride on the thermal inactivation of oxygen evolution [J]. *Photosynthesis research*, 1988, 16(3): 261 - 276.
- [43] POSPÍ ŠIL P, HAUMANN M, DITTMER J, et al. Stepwise transition of the tetra-manganese complex of photosystem II to a binuclear Mn<sub>2</sub>(μ-O)<sub>2</sub> complex in response to a temperature jump: A time-resolved structural investigation employing X-ray absorption spectroscopy [J]. *Biophysical journal*, 2003, 84(2): 1370 - 1386.
- [44] KOMENDA J, MARTÍNKOVÁS, LUPÍNKOVÁ L et al. Biogenesis and structural dynamics of the photosystem II complex [M] // GIARDI M T, PILETSKA E. *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: BiochIPS, Biosensors and Biodevices* [M]. New York, NY: Springer, 2006: 32 - 45.
- [45] EDELMAN M, MATTOO A K. D1-protein dynamics in photosystem II: The lingering enigma [J]. *Photosynthesis research*, 2008, 98(1/2/3): 609 - 620.
- [46] FRANKEL L K, SALLANS L, LIMBACH P A, et al. Identification of oxidized amino acid residues in the vicinity of the Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> cluster of Photosystem II: Implications for the identification of oxygen channels within the photosystem [J]. *Biochemistry*, 2012, 51(32): 6371 - 6377.
- [47] FRANKEL L K, SALLANS L, LIMBACH P A, et al. Oxidized amino acid residues in the vicinity of QA and PheoD1 of the photosystem II reaction center: Putative generation sites of reducing-side reactive oxygen species [J]. *Plos one*, 2013, 8(2): 1 - 7.
- [48] LUPÍNKOVÁ L, KOMENDA J. Oxidative modifications of the Photosystem II D1 protein by reactive oxygen species: From isolated protein to cyanobacterial cells [J]. *Photochemistry & photobiology*, 2004, 79(2): 152 - 162.
- [49] KOMENDA J, SOBOTKA R, NIXON P J. Assembling and maintaining the photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria [J]. *Current opinion in plant biology*, 2012, 15(3): 245 - 251.
- [51] MULO P, SAKURAI I, ARO E M. Strategies for PS bA gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: From transcription to PS II repair [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, 1817(1): 247 - 257.
- [52] SINHA R K, KOMENDA J, KNOPPOVÁ J, et al. Small CAB-like proteins prevent formation of singlet oxygen in the damaged photosystem II complex of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Plant cell environment*, 2012, 35(4): 806 - 818.
- [53] YOSHIOKA M, UCHIDA S, MORI H, et al. Quality control of photosystem II. Cleavage of reaction center D1 protein in spinach thylakoids by FtsH protease under moderate heat stress [J]. *Journal of biological chemistry*, 2006, 281(31): 21660 - 21669.

(上接第9页)

- [39] LI M F, JI L S, YANG X H, et al. The protective mechanisms of CaHSP26 in transgenic tobacco to alleviate photoinhibition of PSII during chilling stress [J]. *Plant cell reports*, 2012, 31(11): 1969 - 1979.
- [40] MOON B Y, HIGASHI S, GOMBOS Z, et al. Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants [J]. *Proceedings of the national academy of sciences of USA*, 1995, 92(14): 6219 - 6223.
- [41] UKAJI N, KUWABARA C, KANNO Y, et al. Endoplasmic reticulum-localized small heat shock protein that accumulates in mulberry tree (*Morus bombycis* Koidz.) during seasonal cold acclimation is responsive to abscisic acid [J]. *Tree physiology*, 2010, 30(4): 502 - 513.
- [42] SUI N, LI M, ZHAO S J, et al. Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase gene improves chilling tolerance in tomato [J]. *Planta*, 2007, 226(5): 1097 - 1108.
- [43] MARANGONI A, SMITH A, YADA R, et al. Ultrastructural changes associated with chilling injury in mature-green tomato fruit [J]. *Journal of the american society for horticultural science*, 1989, 114(6): 958 - 962.
- [44] LIU J X, SRIVASTAVA R, CHE P, et al. Salt stress response in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling [J]. *Plant journal*, 2007, 51(5): 897 - 909.
- [45] LIU J X, SRIVASTAVA R, CHE P, et al. An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28 [J]. *The plant cell*, 2007, 19(12): 4111 - 4119.
- [46] BALDWIN A J, HILTON G R, LIOE H, et al. Quaternary dynamics of αB-crystallin as a direct consequence of localised tertiary fluctuations in the C-terminus [J]. *Journal of molecular biology*, 2011, 413(2): 310 - 320.

## 科技论文写作规范——讨论

着重于研究中新的发现和重要方面,以及从中得出的结论。不必重复在结果中已评述过的资料,也不要模棱两可的语言,或随意扩大范围,讨论与文中无多大关联的内容。