

C₃、C₄ 型植物叶绿体超微结构的电镜观察

王 美 琪

(中国科学院上海植物生理所)

已经知道 C₄ 植物具有特殊的叶构造和高光合强度^[1]，它的叶解剖特征是维管束周围有一层富有叶绿体的维管束鞘细胞，围绕维管束排列形成独特的“花冠形”结构^[2]。

70 年代人们用电镜观察到 C₄ 植物叶片内具有两种不同类型的叶绿体^[3]，从而揭示 C₄ 植物具有高光合强度的机理方面深入了一步。

1980 年我们曾用免疫荧光研究了双磷酸核酮糖(RuBP)羧化酶在 C₃、C₄ 植物叶片内的不同分布^[4]，以实验证实了 C₄ 植物叶片内 RuBP 羧化酶分布在维管束鞘细胞内，支持了 C₄ 植物具有一个 CO₂ 浓缩机制^[5]。

为进一步揭示 C₄ 植物高光合效率的机理，我们下一步试图用免疫电镜技术研究在 C₃、C₄ 植物内当微环境改变下 RuBP 羧化酶在叶绿体类囊体内的分布情况以及对光合作用的调节控制。为配合这项工作，我们比较观察了澳大利亚 C₃ 型和 C₄ 型的植物的叶绿体的超微结构。

材 料 和 方 法

澳大利亚植物 C₃ 型的 *Serradella* (*Ornithopus sativus*)，C₄ 型玉米(*Zea mays*)，两者均种植在温室土壤里，播种二月后从上部取其已展开的叶片作为实验材料；澳大利亚野生型的 C₄ 植物水牛草(*Stenotaphrum secundatum*) 在开花前，取其上部已展开的叶片为材料。采用常规戊二醛和锇酸的双固定，Spurr's 树脂包埋。用 LKB 超薄切片机切片，醋酸铅和柠檬酸铅双染。Philips 201 透射电镜观察和照相。

结 果 和 讨 论

一、用 Spurr's 树脂包埋的 C₃ 植物 *Serradella*，C₄ 植物玉米和水牛草的叶组织切片，经染色后在电镜下呈现出清晰的超微结构(见图

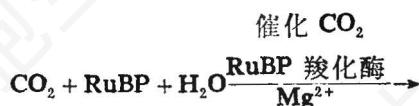
1 A、B、D、)，图 1 A 显示 C₃ 植物 *Serradella* 叶肉细胞的叶绿体结构，它反映出 C₃ 植物的共同特征，即叶绿体的片层结构中具有明显的基粒片层。图 1 B 是 C₄ 植物玉米叶片的两个细胞，图的上部为叶肉细胞，其内的叶绿体与 C₃ 植物一样有基粒片层和基质片层的分化，基粒片层很发达；图的下部为维管束鞘细胞，其中的叶绿体无基粒片层的分化。澳大利亚野生型的 C₄ 植物水牛草叶片细胞的叶绿体与玉米完全一致，叶肉细胞的叶绿体有发育良好的基粒片层(图 1 D)，维管束鞘细胞中的叶绿体则无基粒片层的分化(图 1 E)。

玉米和水牛草维管束鞘细胞与叶肉细胞之间存在胞间连丝 P(图 1 B、1 C)。

C₄ 植物的特殊叶解剖结构及酶系的分布是具有高光合强度的结构基础，在维管束鞘细胞的叶绿体内含有 RuBP 羧化酶，该酶有双重功能，当周围 CO₂ 浓度高时，它进行羧化作用，固定 CO₂；当周围 O₂ 浓度高时，它进行氧化作用，固定 O₂。在叶肉细胞内有 PEP 羧化酶，它对 CO₂ 有很强的亲和力，即使在 CO₂ 浓度很低的情况下，也能将 CO₂ 固定在 C₄ 双羧酸中，这些双羧酸输送到维管束鞘细胞内，经脱羧后放出 CO₂，使得维管束鞘细胞内的 CO₂ 浓度增大，人们把这种 C₄ 途径看成是一个用 ATP 推动的 CO₂ 泵，由于 PEP 羧化酶不断地作用，使 CO₂ 不断地输入维管束鞘细胞，使得维管束鞘细胞内的 RuBP 羧化酶有足够的 CO₂ 底物，进行如下的羧化作用，产生 3-磷酸甘

本文承细胞生物学所电镜室周美云同志补作了两张切片，又承本所谢勤东同志放大照片，特此一并致谢。

油酸:



2(3-磷酸甘油酸)

然后三磷酸甘油酸(PGA)进入光合碳循环, 这就是C₄植物在CO₂很低的情况下, 仍能获得高光合效率的原因。

在C₄植物的CO₂泵运转的过程中, 叶肉细胞和维管束鞘细胞之间存在着NADPH和PGA等物质的频繁交换, 这些物质交换是借助这两种细胞之间的胞间连丝通道进行的^[6]; 在水牛草和玉米的叶切片电镜图中, 均呈现出这种胞间连丝通道(见图1B、C)。

二、C₃、C₄植物的叶解剖结构有显著的差别: 在C₄植物水牛草的叶横切片电镜图1C中, 我们看到C₄型的叶解剖结构, 恰如Laetsch所指出的^[2], 维管束组织处于叶切片中间部位, 环绕在其周围的维管束鞘细胞形成花环结构, 而C₃植物Serradella的叶横切片电镜观察中, 则未见这种情况。

我们曾作了C₃C₄叶片内RuBP羧化酶的免疫荧光定位研究^[4], 曾观察到C₃植物(大麦、小麦)叶横切片内, 没有特殊的花环结构, 而C₄植物(玉米)叶横切片内具有明显的花环结构。

这些正是C₃植物在结构上不同于C₄植物之处, 也是C₃植物光合效率较低的结构上的原因。

由于RuBP羧化酶是唯一连接C₂光合还原循环和C₃光呼吸碳氧化循环的关键酶, 在光合碳同化中起着主要作用, 当CO₂浓度高时, 它进行羧化作用, 以固定CO₂, 提高光合效率。弄清RuBP羧化酶在C₄植物叶绿体类囊体内的精细分布, 探明它在微环境改变下的分布规律, 对揭示C₄植物的高光合效率的机理是至关重要的。本文对C₃和C₄植物叶结构特征和叶绿体精细结构作了电镜观察, 为今后对RuBP羧化酶在类囊体内的分布的免疫电镜

研究打下了基础。

摘 要

用电镜对比研究了C₃植物Serradella, C₄型玉米和C₄型水牛草的叶组织切片的超微结构。

结果表明C₃型Serradella和C₄型玉米和水牛草叶绿体超微结构的区别: C₄型叶内有维管束鞘细胞和叶肉细胞, 分别具有不同类型的叶绿体, 其维管束鞘细胞的叶绿体没有基粒结构, 在叶肉细胞的叶绿体具有明显的基粒结构; C₃型叶内只有叶肉细胞和一种具有基粒结构的叶绿体。这种超微结构的不同, 决定了它们在光合效率上的差异。

图 版 说 明

细胞壁(CW), 线粒体(M), 叶绿体(C), 被膜(EV), 基粒(g), 间质类囊体(ST), 脂滴与钨酸形成的颗粒(Og), 叶肉细胞(MC), 维管束鞘细胞(BSC), 胞间连丝(P), 间质片层(SL), 淀粉粒(Sg), 间质(S), 维管组织(VT)。

图1 A. C₃植物Serradella的叶切片电镜图显示出CW, M, C及其精细结构, EV, g, ST和Og。×17495。

图1 B. C₄植物玉米叶切片的电镜图×17495 MC, BSC, 以及两种不同类型的C和P。

BSC的C的超微结构, 可见SL, Sg, Og。

MC的C的超微结构, 显示出EV, g, S, ST。

图1 C, D, E. C₄植物水牛草的叶横切片电镜图, 可见在BSC和MC内的两种不同类型的C结构。

C. MC, BSC, 花环结构(Kranze), VT, CW, C及P。×5,000。

D. 在MC中的C的超微结构, 有明显的g, S, ST, Og×15,000。

E. BSC的C的超微结构: C不具有g结构, 只有SL, Sg, Og。×15,000。

参 考 文 献

- [1] W. M. Laetsch., 1968. *Am. J. Bot.*, 55: 875.
- [2] W. M. Laetsch., 1974. *A. Rev. Plant Physiol.*, 25: 27-52.
- [3] D. G. Bishop et al, 1971, In *Photosynthesis and Photorespiration* (ed.) by M. D. Hatch et al. P. 372.
- [4] 王美琪, 1980. *实验生物学报*, 13(3): 249-255.

[5] Berry, 1978. The CO₂ concentrating function of C₄ photosynthesis: A biochemical model. Proceeding of the Fourth International Congress on Photosynthesis.

P. 120.

[6] W. M. Laetsch, 1971. In Photosynthesis and Photorespiration. (ed.) by M. D. Hatch et al, P. 323.

激活 T 细胞的培养上清液对肝癌细胞毒性作用的电镜观察

林学颜

(卫生部武汉生物制品研究所细胞工程室)

概 论

致有丝分裂素刺激的 T 淋巴细胞释放出一组可溶性因子称为淋巴因子, 其中的细胞毒因子称为淋巴毒素(Lymphotoxin, LT)^[1-3], 在体外有毁坏靶细胞的性能^[4,5]。最近, Onozaki 等人^[6]已经报告, 人的大单核细胞或巨噬细胞衍生的白细胞介素-1(IL-1)是几种肿瘤细胞的细胞毒因子, 本研究为了避免由大单核细胞衍生的 IL-1 的混淆效应, 用 E-玫瑰花环阳性的血液淋巴细胞与植物血凝素一起培养而制备激活 T 细胞的培养上清液。通常用于体外细胞毒试验的靶细胞为 L-929 和 HeLa 细胞^[8-8]。

Russel 和 Rosenau 等人曾应用电子显微镜研究淋巴毒素对 L-929 细胞的作用^[9,10], 但是在体外淋巴毒素杀伤大鼠肝癌细胞的电镜图像尚未见报告。在本研究中, 我们经多次实验发现, 在体外大鼠肝癌细胞对激活 T 细胞培养上清液的细胞毒效应敏感, 致使形态改变, 活细胞数明显降低, 电镜图像指出当肝癌细胞与激活 T 细胞培养上清液一起培养后, 细胞浆内有明显的空泡形成并有灶性细胞膜溶解现象。

材 料 和 方 法

激活 T 细胞培养上清液制备

应用含肝素钠的注射器抽取静脉血液, 加等量 Hank's 平衡盐溶液缓慢地加于 Ficoll-Hypaque(密度为 1.077 g/ml)液上层, 然后在室温 400 g 离心 35 分钟, 吸取两液界面单个核的细胞, 用无血清培养液

(RPMI 1640)洗 2 次, 并再悬浮于含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 调整细胞数量为 2×10^6 个细胞/ml, 加等量用 2,5-Aminoethylisothiouromium bromide(AET) 处理的 0.5% 绵羊红细胞悬浮液^[15], 混合物置于 37℃ 水浴箱 20 分钟, 每 5 分钟混和一次, 离心 200 g, 10 分钟, 然后置 4℃ 45 分钟, 轻轻地抖动细胞团, 把细胞悬浮液如上述加于 Ficoll-Hypaque 上层, 收集底层玫瑰花环细胞, 用 0.38% NH₄Cl 溶解 RBC, 上清重复洗一次, 然后以 RPMI 1640 培养液(含 10% 小牛血清)将淋巴细胞浓度调至 5×10^6 细胞/ml, 加 PHA-P, 置 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱中培养 4 天^[3,7,11-14], 离心收集上清液并用 0.2 μm 滤器过滤, 滤液贮存于 -80℃。

靶细胞

大鼠肝癌细胞株(H-4-II-E)由美国 ATCC(American Type Culture Collection)提供, 大鼠肝癌细胞以 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)含 10% 小牛血清, 制成细胞悬液, 浓度为 2×10^6 细胞/ml, 0.5 ml 加于培养孔中, 置 37℃ 培养 48 小时, 细胞生长成单层片状时, 用作激活 T 细胞培养上清液的靶细胞。

细胞毒测定

大鼠肝癌细胞置 37℃ 培养 48 小时, 倾去培养液, 加入新鲜培养液与丝裂霉素 C(最终浓度为 0.1 μg/ml)置 37℃ 培养 30 分钟, 倾去丝裂霉素 C, 用无血清培养液洗细胞 2 次, 加不同稀释度的激活 T 细胞的培养上清液(用 DMEM 稀释)0.5 ml, 在 37℃ 培养 24 小时后, 弃去培养液, 加 0.25% 胰酶 0.2 ml/孔, 置 37℃ 3 分钟后加 DMEM 0.3 ml/孔, 用巴氏吸管轻轻吹吸混合, 吸取 10 μl 细胞悬液, 加等量 0.4% 台盼蓝溶液, 置血球计数室中计算活细胞数。

T 淋巴细胞不加 PHA-P 的培养上清液加入肝癌