

紫外线诱导刺参自溶氧化损伤及体内抗氧化应答

奚倩^{1,2}, 董秀芳¹, 李楠¹, 傅卉¹, 张警予¹, 启航¹

(1. 大连工业大学食品学院, 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁大连 116034)

(2. 塔里木大学生命科学学院, 新疆阿拉尔 843300)

摘要: 本研究以活刺参为原料, 经紫外线 (1.5 W/m^2) 照射不同时间后, 检测刺参体壁和肠中的组织蛋白酶 L (CL)、乙酰胆碱酯酶 (AChE)、蛋白质羰基、过氧化氢 (H_2O_2)、caspase-3、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx) 的活力变化和酸性谷胱甘肽(GSH)的变化。研究表明, 活刺参经 UV 照射 6 h, 体壁和肠中 CL 活力提高了 69.27%、52.37%, AChE 活力下降了 55.70%、36.16%, 蛋白质羰基量都是对照组的 1.30 倍左右, H_2O_2 量提高了 2.44 倍、3.57 倍, Caspase-3 活力提高了 4.09 倍、2.81 倍, 而体壁和肠中 SOD、CAT、GPx 的酶活随着 UV 照射时间的延长而降低, 分别为 38.79%、24.70%、44.27%、36.18% 和 79.54%、33.79%, GSH 含量增加 75.31%、66.71%, 说明刺参在 UV 照射下在发生自溶的同时伴随了氧化损伤和细胞凋亡现象, UV 诱导的自溶途径中 ROS 以及相关氧化产物对于刺参自溶起到了作用, 研究结果对于丰富海参自溶机理具有一定的意义。

关键词: 刺参; UV; 自溶; ROS; 抗氧化酶; 氧化损伤

文章编号: 1673-9078(2015)9-74-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.013

Oxidative Damage and *in vivo* Antioxidant Responses during UV-induced

Autolysis in the Sea Cucumber, *Stichopus japonicus*

XI Qian^{1,2}, DONG Xiu-fang¹, LI Nan¹, FU Hui¹, ZHANG Jing-yu¹, QI Hang¹

(1.School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, China) (2.Collage of Life Science, Tarim University, Alar 843300, China)

Abstract: Live sea cucumbers (*Stichopus japonicus*) were irradiated under ultraviolet (UV) radiation (1.5 W/m^2) for different times. Cathepsin L (CL), acetylcholinesterase (AChE), caspase-3, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), acid glutathione (GSH), protein carbonyl, and hydrogen peroxide (H_2O_2) contents in the intestinal tissue and body wall of the sea cucumber were analyzed. The results showed that after 6-h UV irradiation, the CL activities, H_2O_2 contents, and caspase-3 activities in the body wall and intestinal tissue increased by 69.27 and 52.37%, 2.44- and 3.57-fold, and 4.09- and 2.81-fold, respectively. The AChE decreased by 55.70 and 36.16%, respectively and the protein carbonyl contents in both body wall and intestinal tissue was 1.30-fold that of the control group. With increasing UV radiation time, SOD, CAT, and GPx activities in the body wall and intestinal tissue decreased by 38.79 and 24.70%, 44.27 and 36.18%, and 79.54 and 33.79%, respectively. The GSH contents increased by 75.31 and 66.71%, respectively. The results indicate that oxidative damage and apoptosis occurred with autolysis in *S. japonicus* under UV irradiation. ROS and related oxidation products played a fundamental role in the UV-induced autolysis pathway. This finding may improve the understanding of autolysis in *S. japonicus*.

Key words: sea cucumber; *Stichopus japonicus*; ultraviolet (UV); autolysis; reactive oxygen species (ROS); antioxidant enzymes; oxidative damage

刺参 (*Stichopus japonicus*) 属棘皮动物 (Echinodermata), 海参纲 (Holothuroidea), 是海参中品质最好的一种^[1]。2013 年, 中国海参产量达到了

收稿日期: 2014-12-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31201299)

作者简介: 奚倩 (1988-), 女, 讲师, 研究方向水产品加工贮藏及生理活性物质的研究与开发

通讯作者: 启航 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向水产品加工贮藏及生理活性物质的研究与开发

19.4 万 t^[2], 居世界第 1 位, 海参具有极强的自溶能力, 特别是受到紫外线照射后自溶更为明显, 这种独特的生理现象给海参的加工、贮藏和运输带来了极大的不便^[3-4]。研究人员从海参中分离、纯化并鉴定出多种内源酶, 包括组织蛋白酶 L、组织蛋白酶 B、乙酰胆碱酯酶、碱性磷酸酶等, 并且针对海参体壁自溶过程中蛋白质降解途径, 证明了半胱氨酸蛋白酶参与非胶原蛋白的降解过程。这些研究为深入探讨海参自溶机理奠定了基础^[3]。

紫外线能够引起自由基的产生,从而导致细胞凋亡,黑色素生成,皮肤损伤和光老化等现象已经在多种细胞和动物模型中报道^[5]。2010年 Lister 等考察了 UVB 对海胆卵细胞的氧化损伤,检测了超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、蛋白质羰基化等指标,表明海胆卵细胞在 UVB 照射条件下体内生成活性氧(ROS),并引起形态的异常化^[6]。2013年 Chuang 等用不同剂量的 UVB 照射蚯蚓,测定体内、外 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、CAT 等酶活力的变化、谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢(H₂O₂)的含量和脂质的氧化,表明蚯蚓体内出现氧化应激反应,ROS 升高,蛋白质羰基化,最终引起蚯蚓死亡^[7]。而 ROS 能引发机体的损伤,当 ROS 过多时,会激发体内的抗氧化系统,如 SOD、CAT 和 GPx 能共同清除机体中的 ROS,以减轻和阻止 ROS 的过氧化作用^[8]。

本研究以活刺参为原料,采用紫外线照射诱导刺参自溶,检测刺参的自溶氧化损伤相关指标及体内抗氧化应答,以考察刺参自溶体内变化的相关因素,为从光氧化途径上揭示海参与自溶机理奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

活刺参:购于大连市长兴水产品市场;胃蛋白酶、EDTA、DTT、GSH、EGTA、DTNB、谷胱甘肽还原酶、硫酸链霉素、2,4-二硝基苯肼、水溶毛地黄皂苷、抑肽酶(Aprotonin)购于生工生物工程(上海)股份有限公司;CAT 试剂盒、T-SOD 试剂盒,购于南京建成生物工程研究所;CHAPS、HEPES、NADPH 购于 Sigma-Aldrich Co. LLC;其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器设备

M200 酶标定量测定仪,瑞士 Tecan Infinite; F-2700 荧光分光光度计,日立高新技术公司; Z323 型冷冻离心机,德国 HERMLE; JY92-II DN 超声波细胞破碎机,宁波新芝生物及科技股份有限公司; T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司; HH-4 型数显恒温水浴锅,常州智博瑞仪器制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原料处理

将活刺参放入装有海水的托盘中,在 UV 灯(250~260 nm, 1.5 w/m²)下照射 0.5、1、2、6 h,每组

照射条件下 9 只海参。照射结束后,分别取其体壁和肠,按 1:3 (m/V) 的比例加入 50 mM pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液(含 1 mM EDTA 和 0.1% 曲拉通),用组织研磨器在冰浴条件下研磨,10,000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 得酶液待用。对于测定 caspase-3 活力、酸性 GSH、蛋白质羰基含量和 H₂O₂ 含量,按照测定要求采用不同提取方法。

1.3.2 组织蛋白酶 L (CL) 的测定

取 50 μL 酶液,加入 25 μL 反应缓冲溶液(含 4 mM 乙二胺四乙酸二钠、60 mM 乙酸、340 mM 乙酸钠、8 mM DTT), 25 μL 20 mM 底物(N-Carbobenzoxy-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin Z-Phe-Arg-MCA), 混匀后 37 °C 水浴保温 15 min, 加入 100 μL 终止液(含 0.1 M 氯乙酸的 0.1 M HAc-NaAc 缓冲液, pH 4.3) 终止反应,采用荧光分光光度计测定荧光值,激发波长为 380 nm, 发射波长为 460 nm。空白组,即先加入终止液后再加入酶液,其余步骤相同。酶活力定义:每毫克蛋白质中所含的酶活力单位(U/mg protein),其中 1 个酶活力单位定义为在 37 °C 下,反应 15 min,与空白组相比增加 1 个荧光值定义为 1 个酶活力单位,即 1 U。

计算公式:

$$CL \text{ 活力(U/mg protein)} = (\text{测定值} - \text{空白值}) \div \text{待测样品蛋白浓度(mg/mL)} \quad (1)$$

1.3.3 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的测定

取 5 μL 酶液,放入 1.5 mL 离心管中,再加入 300 μL 100 mM 的磷酸盐缓冲液(pH 8.0)、2 μL 75 mM 的底物 AcSCHL 和 10 μL 10 mM 的 DTNB, 震荡混匀, 30 °C 孵育 5 min 后取 200 μL 待测液置于 96 孔板,用酶标仪在 412 nm 处测得吸光值,读取反应 5、10、15、20、25、30 min 后的吸光值。AChE 活力的定义:每毫克蛋白质中所含的酶活力单位(U/mg protein),其中,1 个酶活力单位定义为在 30 °C 下 30 min 内,随着时间的增长,吸光值增加 0.01 个速率为 1 U。

计算公式:

$$AChE \text{ 活力(U/mg protein)} = (K/0.01) \div \text{待测样品蛋白浓度(mg/mL)} \quad (2)$$

注: K 为 AChE 反应 30 min, 其吸光度值的变化速率。

1.3.4 蛋白质羰基含量的测定

将处理过的刺参体壁和肠按 1:2 (m/V) 的比例加入 50 mM pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液(含 0.1% 洋地黄皂苷、40 μg/mL PMSF、5 μg/mL 亮抑肽酶、7 μg/mL 胃蛋白酶抑制剂、5 μg/mL 抑肽酶、1 mM EDTA), 在冰浴条件下研磨,室温孵育 15 min 后,10,000 r/min 离心 10 min, 得上清液后,测定吸光度值 A₂₈₀、A₂₆₀。

若 $A_{280}/A_{260} < 1$, 则进一步用 1% 的链霉素去除核酸。

样品的测定: 在两个 4 mL 离心管中分别加入 100 μL 样品提取蛋白, 其中一只管加入 400 μL 10 mM 的 DNPH, 另一只加入 400 μL 2.5 M 的盐酸, 共同避光放置 1 h, 每隔 15 min 漩涡一次。加入 500 μL 20% TCA 后, 冰浴 10 min, 2,500 r/min 离心 15 min, 弃上清。用 400 μL 10% TCA 洗涤沉淀, 2,500 r/min 离心 15 min, 弃上清。用 400 μL 乙醇和乙酸乙酯混合物 (1:1) 洗涤沉淀 3 次, 去除自由基 DNPH 和油脂污染物。最后沉淀用 2 mL 6 M 盐酸胍稀释溶解, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 12,000 r/min 离心 15 min, 取上清, 于 370 nm 处比色。

羰基相对含量: 羰基浓度用摩尔消光系数 22 mmol/(L cm) 来计算, 用每毫克蛋白中含有的微摩尔羰基来表示 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$), 以对照组为参照, 计算出每个样品的相对含量。

1.3.5 过氧化氢(H_2O_2)浓度的测定

将处理过的刺参体壁和肠, 按 1:3 (m/V) 的比例加入 5% 的 TCA 溶液, 在冰浴条件下研磨, 取上清液 100 μL 加入 2,300 μL 去离子水和 100 μL 5 g/L 的钼酸铵, 室温放置 15 min 后, 于 330 nm 处测吸光度值, 依据标准曲线, 算出 H_2O_2 的含量。

1.3.6 Caspase-3 相对酶活力的测定

将处理后的刺参肠和体壁按 1:3(m/V)的比例加入提取液 (含 25 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 1 μM 胃蛋白酶抑制剂)冰浴浸提 20 min, 再将 100 mM PMSF 按 1:100 的比例加入到提取液中, 混匀后用超声波细胞破碎机破碎细胞, 10,000 r/min, 离心 10 min, 得上清液。取上清液加入反应体系 (含 25 mM HEPES (pH 7.4)、1% CHAPS、50 mM DTT、5 mM EDTA), 与 10 μM 底物 (Ac-DEVD-pNA) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 2 h, 测 405 nm 吸光度值。

Caspase-3 的酶活力定义: 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下, 反应 2 h 增加 1 个吸光度值定义为 1 个酶活力单位, 即 1U。

计算公式:

$$\text{Caspase-3} = \frac{\text{测定OD} - \text{样品对照OD}}{\text{样品对照OD}} \quad (3)$$

1.3.7 总超氧化物歧化酶 (SOD) 与过氧化氢酶 (CAT) 活力的测定

分别采用羟胺法总超氧化物歧化酶测试盒进行测定与可见光法过氧化氢酶试剂盒测定。

1.3.8 谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活力的测定

取 5 μL 酶液和 175 μL 反应缓冲液 (含 100 mM pH

7.0 PBS、10 mM EDTA、10 mM NaN_3 、20 mM GSH、1.2 mM NADPH、1U/ μL 谷胱甘肽还原酶溶液) 混匀, 再加入 20 μL 6 mM H_2O_2 启动反应, 同时迅速用酶标仪在 340 nm 处测吸光值, 读取反应 0 s、30 s、60 s、90 s、120 s、3 min、4 min、5 min 后的吸光值。GPx 活力的定义: 每毫克蛋白质中所含的酶活力单位 (U/mg protein), 其中 1 个酶活力单位定义为反应体系反应 5 min, 减少 0.1 个吸光值定义为 1 个活力单位 (1U)。

计算公式:

$$\text{GPx 活力(U/mg protein)} = (K/0.1) \div \text{待测样品蛋白浓度(mg/mL)} \quad (4)$$

注: K 为谷胱甘肽过氧化物酶反应 5 min 内, 其吸光度值的变化速率。

1.3.9 酸性谷胱甘肽 (GSH) 含量的测定

将处理后的刺参肠和体壁, 按 1:3 (m/V) 的比例加入 5% 的三氯乙酸, 在冰浴条件下研磨提取, 10,000 r/min, 离心 10 min, 得上清液。用 100 mM 的磷酸盐缓冲液 (含 5 mM EDTA, pH 7.5) 稀释样品 10 倍后, 再取样 20 μL 、1.5 mM DTNB 200 μL , 用酶标仪测定 412 nm 处的吸光值, 记录加入 DTNB 后 0 min, 10 min, 20 min 的吸光值。最后根据样液的吸光值, 参照 GSH 标准曲线求酸性 GSH 的含量 (μM)。

计算公式:

$$\text{GSH 相对含量} = [(\text{反应后含量} - \text{反应初含量}) / \text{样品对照}] \times 10 \div \text{待测样品蛋白浓度(mg/mL)} \quad (5)$$

1.3.10 统计分析方法

用 SPSS 软件对数据进行统计分析, 使用单向方差分析, $p < 0.05$ 被认为是显著。

2 结果与讨论

2.1 UV 照射对刺参体内 CL 与 AChE 活力的影响

CL 与 AChE 都是与自溶相关的两种酶类, 已经在课题组之前的研究中有所报道, 本研究考察 UV 诱导下 2 种酶的变化, 如图 1a 所示, 经 UV 照射 6 h 时, 刺参肠中的 CL 的活力显著高于对照组, 升高了 52.37% ($p < 0.05$), 而刺参体壁中的 CL 活力则在 UV 照射 0.5 h 时开始显著升高, 照射至 6 h 时, 升高了 69.27% ($p < 0.05$), 这与 Dong 等^[9]报道的海参肠经 UVC 照射引起 CL 和 AChE 活力的变化结论相一致, 同时也支持了 CL 与 AChE 对刺参自溶相关这一结论。如图 1b 所示, 活刺参经 UV 照射 0.5 h 后, 刺参体壁和

肠中的 AChE 的酶活力均呈显著的下降趋势,照射 6 h 时, 与其对照组相比分别下降了 55.70%、36.16% ($p < 0.05$)。其中, 刺参体壁中的 AChE 的活力高于肠中酶活力, 可能是由于刺参体壁直接受到 UV 的照射的原因。这与 2012 年, Souza^[10]等研究出短期 UV 照射抑制 AChE 活力的结论相一致。Forget 等^[11]研究表明, UV 可以破坏 AChE 的酶端点, 使其对乙酰胆碱的催化效率降低, 导致乙酰胆碱不能被及时清除, 而和其他胆碱受体结合破坏细胞结构, 从而引起凋亡以及机体的损伤。本结果表明在 UV 照射不同条件下, CL 和 AChE 的活力都发生变化, 并且随着 UV 照射时间的延长而呈现相应的变化。

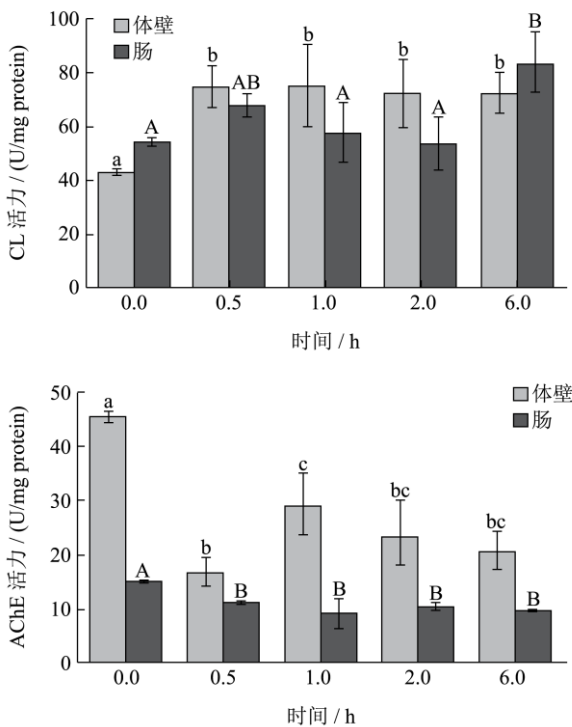


图 1 UV 照射对刺参中 CL 和 AChE 活力的影响

Fig.1 Effects of UV irradiation on CL and AChE activities in *Stichopus japonicus*

注: 不同的大、小写字母表示数据间存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.2 UV 对刺参体内蛋白质羰基含量的影响

有机体的光照氧化损伤在一些细胞、皮肤组织、小鼠等模型中都有报道, 本研究检测了 UV 照射条件下引起刺参的氧化损伤, 丙二醛 (MDA) 的生成和蛋白质的羰基化都是衡量有机体氧化损伤的指标, 研究中分别检测了 MDA 的生成与蛋白质羰基的含量, 然而并未得到 MDA 生成的相应数据, 分析主要原因在于刺参中脂质含量较低, 脂质氧化后生成的 MDA 并未达到检测限。而蛋白质的羰基化研究得到了相应的

结果, 如图 2 所示, 刺参体壁和肠的蛋白质羰基含量随 UV 照射时间增加, 呈上升趋势, 并有一定的量效关系。当 UV 照射 6 h 时, 刺参体壁和肠中的蛋白质羰基含量都是对照组的 1.30 倍左右。这个趋势与 Lister 等研究的海胆卵细胞在 UVB 照射条件下, 蛋白质羰基含量随照射时间延长而增加的变化趋势相一致^[6]。本结果表明, UV 照射引起了刺参体内氧化损伤的出现, 说明 UV 诱导海参自溶的同时伴随有机体氧化损伤的现象。

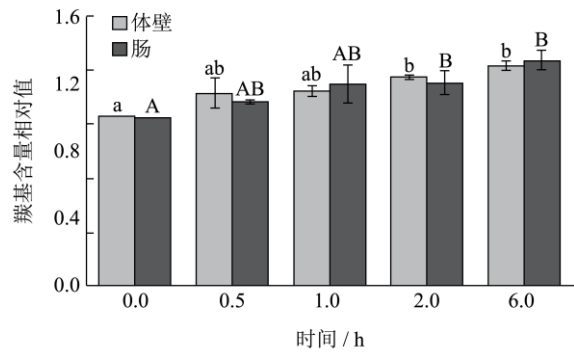


图 2 UV 照射对刺参蛋白质羰基的影响

Fig.2 Effects of UV irradiation on production of protein carbonyl in *Stichopus japonicus*

注: 不同的大、小写字母表示数据间存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.3 UV 对刺参体内过氧化氢 (H₂O₂) 的影响

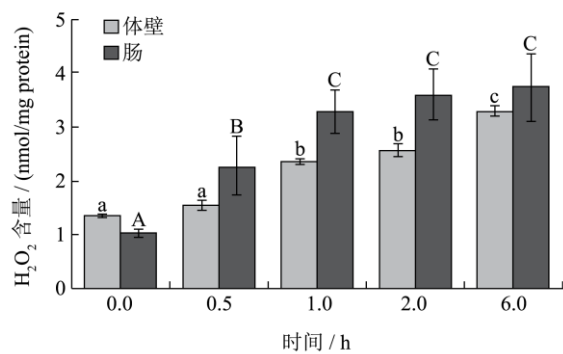


图 3 UV 照射对刺参中 H₂O₂ 生成的影响

Fig.3 Effects of UV irradiation on H₂O₂ production in *Stichopus japonicus*

注: 不同的大、小写字母表示数据间存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

机体氧化损伤的出现, 离不开体内初级过氧化物的生成, 特别是 ROS 的生成。H₂O₂ 是生物细胞代谢过程中产生的一种活性氧, 一般机体内的 ROS 清除系统会与其含量保持一定的动态平衡。当机体受到外界条件刺激时, 其产生量会超过系统清除能力, 而对机体造成氧化损伤。如图 3 所示, 随着 UV 照射时间的

延长,刺参体壁和肠中 H_2O_2 浓度逐渐升高。经 UV 照射 6 h 时,刺参体壁和肠中的 H_2O_2 浓度分别为 3.25 nmol/mg protein, 3.75 nmol/mg protein, 相对于对照组分别提高了 2.44 倍和 3.57 倍。该结果与 Chuang^[7]等报道的紫外线照射蚯蚓,引起其体内 H_2O_2 含量增加的结果相一致。说明刺参经 UV 照射后,引起机体氧化损伤的原因是来源于体内过量 ROS,特别是 H_2O_2 的生成可能成为刺参氧化损伤的主要因素之一。

2.4 UV 照射对刺参体内 caspase-3 的影响

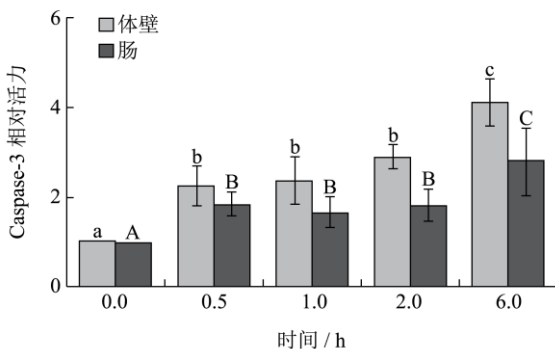


图 4 UV 照射对刺参中 caspase-3 酶活力的影响

Fig.4 Effects of UV irradiation on caspase-3 activity in *Stichopus japonicus*

注: 不同的大、小写字母表示数据间存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

UV 照射诱导 ROS 生成,进而诱导 caspase-3 激活在多种细胞、小鼠模型中已有报道,因而本研究考察了 UV 照射对刺参体内 caspase-3 的影响,如图 4 所示,刺参体壁和肠中 caspase-3 的活力与 UV 照射时间均呈现明显的正相关关系。当 UV 照射 6 h 时,刺参体壁和肠中 caspase-3 的相对酶活力分别是对照组的 4.09、2.81 倍 ($p < 0.05$)。刺参体壁中 caspase-3 的相对酶活力的变化要快于肠,主要是由于体壁受到 UV 直接照射,对 UV 的反应速度高于肠。Caspase-3 是细胞凋亡直接相关的酶,可以用来反应细胞凋亡现象,本结果也说明了海参在自溶的同时伴随有细胞凋亡的出现。2010 年 Menze^[12]等报道了紫外线是促进细胞凋亡的最重要的因子之一,支持了 UV 照射引起刺参体内 caspase-3 活力的变化,进而引起刺参的细胞凋亡现象。

2.5 UV 对刺参体内抗氧化酶活力及 GSH 的影响

SOD、CAT 和 GPx 是细胞内清除 O_2^- 等自由基以及分解 H_2O_2 的重要酶类,已有的研究表明这些酶的活性水平与细胞防御氧化损伤能力密切相关。如图 5a

所示,经 UV 照射 0.5 h 后,刺参体壁和肠中的 SOD 活力均显著下降,随着 UV 照射时间的延长,SOD 活力的下降趋势趋于平缓,至 6 h 时,刺参体壁和肠中的 SOD 活力分别下降 38.79%、24.70% ($p < 0.05$),其中刺参肠中 SOD 的活力始终高于体壁,分别为 28.99 U/mg protein 和 14.80 U/mg protein。由于 UV 的诱导, O_2^- 的水平升高,使得细胞处于氧化应激状态,抑制了 SOD 的活性,SOD 在照射过程中发挥了抗氧化的作用。这与 Lesser^[13]等报道的紫外线照射可破坏海胆的抗氧化系统,从而诱发海胆损伤的结论一致。如图 5b 所示,刺参经 UV 照射 6 h 时,其体壁和肠中 CAT 活力均有显著降低,分别下降了 44.27%、36.18% ($p < 0.05$),刺参肠中的活力高于刺参体壁的活力,刺参体壁中的 CAT 活力经 UV 照射 0.5 h 时,开始显著下降 ($p < 0.05$),而刺参肠中的 CAT 则是在照射 6 h 后显著下降,表明 UV 照射先对刺参体壁起作用,使之产生大量的 ROS,从而抑制了 CAT 的活力。如图 5c 所示,在 UV 照射 2 h 时,刺参体壁和肠中的 GPx 活力均开始显著降低,随着 UV 照射时间的延长,下降趋势趋于平缓,至 6 h 时分别下降了 79.54%、33.79% ($p < 0.05$),至 6 h 时,刺参肠中的 GPx 活力高于刺参体壁,分别为 36.63 U/mg protein 和 13.85 U/mg protein。UV 照射,使刺参体壁和肠中产生了大量的 ROS,从而抑制了 GPx 的活力。刺参体内 GPx 酶活力的降低,说明刺参体内作为自由基防御的 GPx 由于大量 ROS 生成而丧失了防御能力,使刺参体内产生了一定程度的氧化损伤和大量 ROS 的生成。如图 5d 所示,UV 照射时间与刺参体壁和肠中的酸性 GSH 含量在一定程度上呈正相关,至 UV 照射 6 h 时,分别增加了 75.31%、66.71% ($p < 0.05$)。酸性 GSH 作为一种抗氧化肽,可以将 H_2O_2 还原为水和氧气,从而起到抗氧化作用。GSH 含量的增加很有可能是海参体内 ROS 增多,促进海参体内产生 GSH 以抵抗体内的过量氧化物质。该结果与 Souza^[9,14]等报道的 UV 照射引起桡足类体内 GSH 下降的结果不一致,但是与 Chuang^[6]等报道的 UVB 引起蚯蚓体内 GSH 升高的结果相一致,这可能是不同物种之间的差异所形成。

基于以上研究结果,本研究得出简单的 UV 诱导刺参自溶相关信息传递途径,如图 6 所示,刺参在受到 UV 照射后,引起体内 ROS 水平的提升,特别是 H_2O_2 的提升。同时伴随 ROS 的生成,刺参体内作为氧化防御的抗氧化酶活力发生不同程度的变化并引起体内 GSH 含量的增加,从而侧面证明了刺参在受到 UV 照射下体内氧化水平的升高。刺参体内氧化水平的提升进而通过一些途径可能引起 caspase-3 的激活,

引起以蛋白质羧基升高为标志的氧化损伤以及 CL、AChE 活力的变化, 这些相关酶的变化都与刺参自溶存在着一定的联系, 详细的作用机理及相关途径将在下一步研究中展开。

($p < 0.05$)。

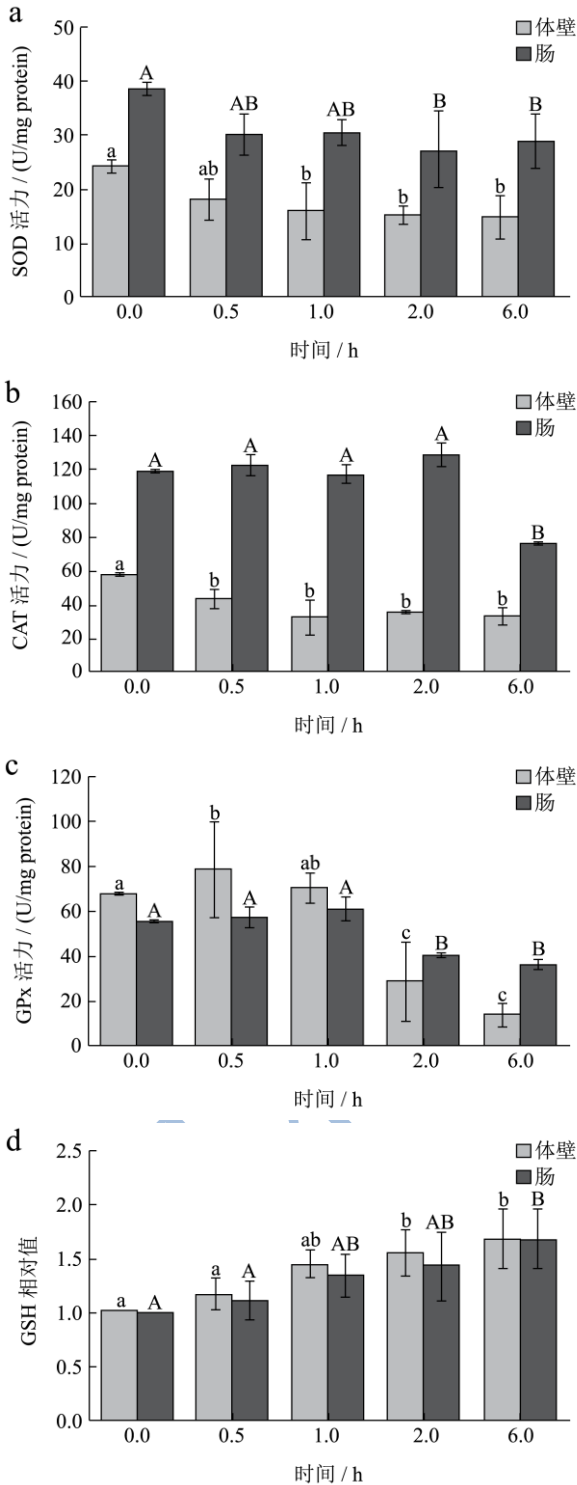


图 5 UV 照射对刺参抗氧化酶活力及 GSH 的影响

Fig.5 Effects of UV irradiation on antioxidant enzyme activities and GSH contents in *Stichopus japonicus* (A) SOD, (B) CAT, (C) GPx, (D) GSH.

注: 不同的大、小写字母表示数据间存在显著性差异

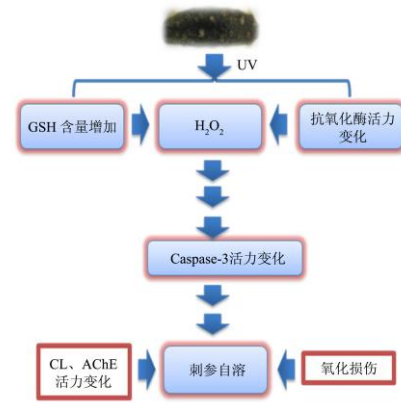


图 6 UV 诱导刺参自溶相关途径

Fig.6 Related pathway of UV-induced *Stichopus japonicus* autolysis

3 结论

活刺参经 UV 照射后, 体内的 AChE 活力下降; CL 和 caspase-3 活力上升; 蛋白质羧基和 H₂O₂ 含量增加; SOD、CAT、GPx 的活力都有不同程度下降; 酸性 GSH 的含量增加。刺参在 UV 照射下在发生自溶的同时伴随了氧化损伤和细胞凋亡现象, 同时 UV 诱导的自溶途径中 ROS 以及相关氧化产物对于刺参自溶起到了一定的作用, 研究结果对于丰富海参自溶机理具有一定的意义。

参考文献

- [1] 朱蓓薇. 海珍品加工理论与技术的研究[M]. 北京: 科学出版社, 2010
- [2] ZHU Bei-wei. Reserch on Theory and Technology of Precious Seafood Processing [M]. Beijing: Science Press, 2010
- [3] 农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴[Z]. 北京: 中国农业出版社, 2013
- [4] Bureau of Fisheries in Ministry of Agriculture. China Fishery Statistical Yearbook [Z]. China Agriculture press, Beijing, 2013
- [5] 杨洋, 孙进健, 朱祉默, 等. 紫外线诱导海参体壁基因表达的研究[J]. 现代食品科技, 2015, 网络版
- [6] YANG Yang, SUN Jin-jian, ZHU Zhi-mo, et al. Changing of genes expression in the autolysis of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) Body Wall [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, Web edition
- [7] Rappa L M, Ghalayini A J. Influence of UVA light stress on photoreceptor cell metabolism: decreased rates of rhodopsin regeneration and opsin synthesis [J]. Experimental Eye Research, 1999, 68(6): 757-764

- [5] Zhu B W, Zheng J, Zhang Z S, et al. Autophagy plays a potential role in the process of sea cucumber body wall "melting" induced by UV irradiation [J]. Wuhan University Journal of Natural Sciences, 2008, 13(2): 232-238
- [6] Lister K N, Lamare M D, Burritt D J. Sea ice protects the embryos of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* from oxidative damage due to naturally enhanced levels of UV-B radiation [J]. Journal of Experimental Biology, 2010, 213 (11): 1967-1975
- [7] Chuang S C, Chen J H. Photooxidation and antioxidant responses in the earthworm *Amyntas gracilis* exposed to environmental levels of ultraviolet B radiation [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2013, 164: 429-437
- [8] Campanale J P, Tomanek L, Adams N L, et al. Exposure to ultraviolet radiation causes proteomic changes in embryos of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2011, 397: 106-120
- [9] Dong X, Zhang J, Xi Q, et al. Photooxidation and antioxidant responses in the gut of sea cucumber *Stichopus japonicus* autolysis exposed to UVC radiation [J]. Journal of Food, Agriculture & Environment 2014, 12 (2): 207-211
- [10] Souza M S, Hansson L A, Samuel H, et al. Rapid Enzymatic Response to Compensate UV Radiation in Copepods [J]. Plos One, 2012, 7(2): 1-6
- [11] Forget J, Beliaeff B, Bocquene G, et al. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants [J]. Aquatic Toxicology, 2003, 62(3): 195-204
- [12] Menze M A, Fortner G, Nag S. Mechanisms of apoptosis in Crustacea: what conditions induce versus suppress cell death [J]. Apoptosis, 2010, 15: 293-312
- [13] Lesser M P. Depth-dependent effects of ultraviolet radiation on survivorship, oxidative stress and DNA damage in sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) embryos from the gulf of maine [J]. Photochemistry and Photobiology, 2010, 86: 382-388
- [14] Souza M S, Balseiro E, Laspoumaderes C. Effect of ultraviolet radiation on acetylcholinesterase activity in freshwater copepods [J]. Photochemistry and Photobiology, 2010, 86: 367-373