

# UV-B 辐射对发菜细胞活性氧及抗氧化酶活性的影响

撒玉霞, 于海峰, 杨蕾

(山东轻工业学院食品与生物工程学院, 山东济南 2503531)

**摘要:**以液体悬浮培养的发菜细胞为研究对象,测定 UV-B 辐射处理后发菜细胞中活性氧含量和抗氧化酶活性的变化,探讨 UV-B 辐射对发菜细胞活性氧代谢的影响。实验结果表明,在  $1\text{ W/m}^2$  和  $5\text{ W/m}^2$  UV-B 辐射下,处理时间延长,发菜细胞中的超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )与过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )的含量显著增加,  $\text{O}_2^-$  的含量在辐射处理 6 h 时达到最大值 480.62、510.34 nmol/g DW, 分别为对照的 160.09% 和 169.99%,  $\text{H}_2\text{O}_2$  的含量是持续增加,在 48 h 达到 210.24 和 229.89 nmol/g DW。丙二醛(MDA)含量在 48 h 时达到 0.085 和 0.147  $\mu\text{mol/g DW}$ , 分别为对照的 251.70% 和 413.72%。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性先升高后降低,在辐射 12 h 时均达到最大;抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性在辐射初期(0~6 h)呈增长趋势,随后经  $1\text{ W/m}^2$  UV-B 辐射处理的 APX 活性变化不稳定,  $5\text{ W/m}^2$  UV-B 辐射处理的 APX 活性迅速降低。

**关键词:**发菜细胞; UV-B 辐射; 活性氧; 抗氧化酶

文章编号: 1673-9078(2013)2-247-250

## Effect of UV-B radiation on Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes of *Nostoc flagelliforme* Cells

SA Yu-xia, YU Hai-feng, YANG Lei

(School of Food & Bioengineering, Shandong Polytechnic University, Jinan 250353, China)

**Abstract:** In order to explore the impact of ultraviolet-B (UV-B) radiation on reactive oxygen species (ROS) metabolism, the changes of reactive oxygen species(ROS) content and antioxidant enzyme activities were determined in liquid suspension cultivation of *Nostoc flagelliforme* cells. The results indicated that the superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) production and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) content of *Nostoc flagelliforme* cells were increased under 1 and 5  $\text{W/m}^2$  UV-B treatment, and the maximum of  $\text{O}_2^-$  production reached under UV-B treatment for 6 h, that were 480.62 and 510.34 nmol/g DW, respectively. The  $\text{H}_2\text{O}_2$  content was increased at all times and reached 210.24 and 229.89 nmol/g DW under UV-B treatment for 48 h. The malondialdehyde (MDA) content attained 0.085 and 0.147  $\mu\text{mol/g DW}$ , which were 251.70% and 413.72% of the control exposure to UV-B for 48 h. The activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) reached the maximum at 12 h at both intensities. The ascorbate peroxidase (APX) activity was increased in the early radiation (0~6 h), then APX activity was unstable under  $1\text{ W/m}^2$  UV-B treatment and declined rapidly under  $5\text{ W/m}^2$  UV-B treatment.

**Key words:** *Nostoc flagelliforme* cells; UV-B radiation; reactive oxygen species; antioxidant enzymes

近年来,工业化和城市化的迅速发展导致了空气中氟氯烃(CFCs)、氯烃(CC<sub>s</sub>)、有机氯化物(OB<sub>s</sub>)等化合物的大量释放,引起了平流层臭氧的快速消耗,从而使到达地面的 UV-B 强度增大。高强度 UV-B 辐射对光合生物体的影响已引起了人们的普遍关注<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2012-10-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20806047); 中国博士后科学基金面上资助项目(20090450116); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2011SW029)

作者简介: 撒玉霞(1987-),女,硕士研究生,研究方向:藻类生物技术,功能性食品加工配料开发

通讯作者: 于海峰(1975-),女,博士,副教授,研究方向:功能性食品与食品添加剂

其中活性氧是光合生物体进行有氧代谢的必要产物,光合生物体在非生物胁迫(高温、UV、高盐等)下,细胞内会产生大量的活性氧,高浓度的活性氧会对生物体产生毒害作用,清除细胞内过量的活性氧是生物体应对紫外胁迫的一项重要机制。

发菜是一种光合自养的固氮蓝细菌,主要分布在我国内蒙古、宁夏等干旱半干旱地区,高海拔、强太阳辐射的生存环境已对其进行正常生理活动造成影响。目前关于发菜的研究主要集中在人工培养条件的优化、多糖和盐胁迫<sup>[2-5]</sup>等方面,而对 UV-B 辐射的研究很少。本文以液体悬浮培养的发菜细胞为研究对象,研究了不同 UV-B 辐射下发菜细胞内活性氧含量、脂质过氧化程度以及各种抗氧化酶活性的变化,在活性

氧代谢方面探索了发菜细胞对 UV-B 辐射的响应, 为发菜的抗逆性研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

发菜(*Nostoc flagelliforme*)单体细胞种由本实验室分离保存。实验前经平板划线多次纯化, 镜检和平板检测不再有杂菌为止, 挑取发菜细胞纯培养菌落, 接入 BG-11<sub>0</sub> 培养基中培养, 得到发菜细胞种备用。

### 1.2 UV-B 辐射处理

取对数期生长的发菜细胞转移到已灭菌的培养皿中(直径为 90 mm), 在 UV-B 灯管下进行紫外辐射, 辐射强度为 1 W/m<sup>2</sup> 和 5 W/m<sup>2</sup>, 辐射时间为 3、6、12、24、36、48 h, 空白对照在 60 μM photon/m<sup>2</sup>·s 光照强度下培养。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 O<sub>2</sub><sup>-</sup>含量的测定

O<sub>2</sub><sup>-</sup>含量的测定根据王爱国等人<sup>[6]</sup>的方法进行测定。

#### 1.3.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的测定

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量根据 Patterson 等人<sup>[7]</sup>的方法进行测定。

#### 1.3.3 MDA含量的测定

MDA含量根据 Heath and Packer 描述<sup>[8]</sup>的方法进行测定。

#### 1.3.4 抗氧化酶的测定

酶液的提取及测定

取 5 mL 对数期的发菜细胞悬浮液 3000 r/min 离心 5 min, 去上清加入 4 mL 0.05 mol/L (pH=7.0) 磷酸缓冲液冰浴研磨, 3000 r/min、4 °C 离心 5 min, 收集上清液, 用以测定 CAT、SOD 和 APX 酶的活性。

SOD 活性测定根据 Atef<sup>[9]</sup> 描述的方法进行测定。

CAT 活性根据 Kato 等<sup>[10]</sup> 人的方法进行测定。

APX 活性参照 Jiménez<sup>[11]</sup> 的方法进行测定。

## 2 实验结果

### 2.1 UV-B 辐射下发菜细胞内 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的变化

UV-B 辐射对发菜细胞内 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量的影响如图 1, 随着培养时间的延长, 对照组发菜细胞内的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量几乎无变化, 而经强度为 1 W/m<sup>2</sup> 和 5 W/m<sup>2</sup> 的 UV-B 辐射处理后发菜细胞内 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的含量增加, 在 6 h 时达到最大为 480.62 和 510.34 nmol/g DW, 是对照的 160.09% 和 169.99%, 随后平稳下降。

发菜细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量随着培养时间的延长, 对照组 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量变化不显著(图 2)。在强度为 1 W/m<sup>2</sup> 和 5 W/m<sup>2</sup> 的 UV-B 辐射处理 0-12 h, 发菜细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

含量迅速增加, 随后缓慢增长, 在辐射 48 h 时 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量分别达到了 210.24 和 229.89 nmol/g DW, 是对照的 148.93% 和 162.19%。

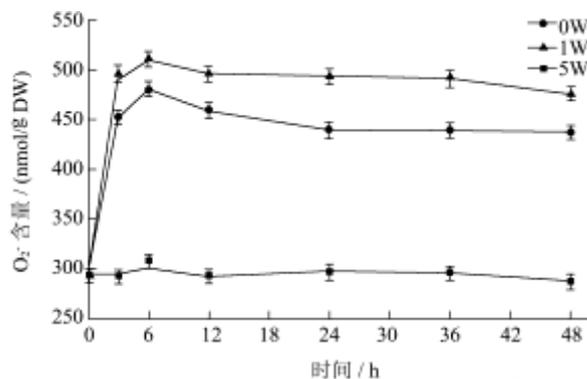


图 1 UV-B 辐射对发菜细胞内 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量的影响

Fig.1 Effect of UV-B radiation on O<sub>2</sub><sup>-</sup> content of *Nostoc flagelliforme* cells

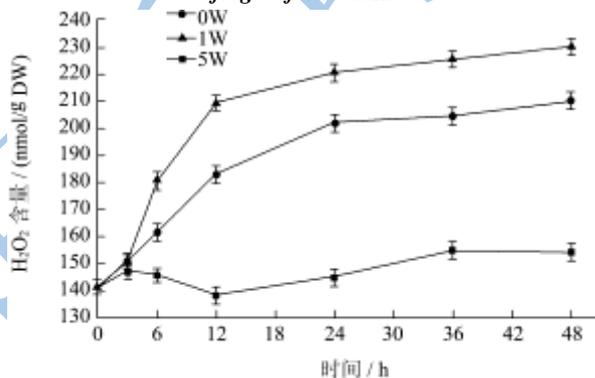


图 2 UV-B 辐射对发菜细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响

Fig.2 Effect of UV-B radiation on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content of *Nostoc flagelliforme* cells

### 2.2 UV-B 辐射下发菜细胞膜脂过氧化程度的变化

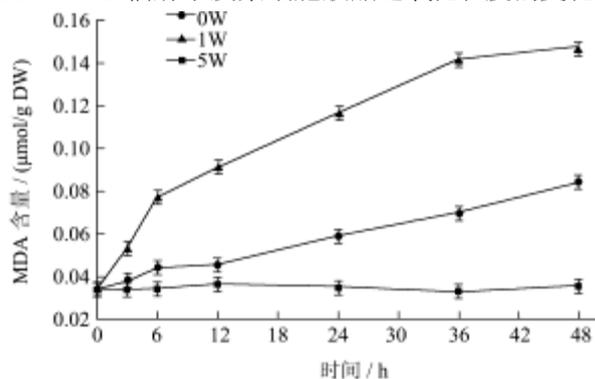


图 3 UV-B 辐射对发菜细胞内 MDA 含量的影响

Fig.3 Effect of UV-B radiation on MDA content of *Nostoc flagelliforme* cells

丙二醛是膜脂氧化的主要产物之一, 其含量的高低反映了膜脂过氧化和膜损伤的程度。UV-B 辐射下发菜细胞内 MDA 含量的变化如图 3, 对照组发菜细胞内 MDA 含量几乎无变化, 暴露在 1 W/m<sup>2</sup> 和 5 W/m<sup>2</sup> UV-B 辐射下发菜细胞内的 MDA 含量随着辐射

时间的延长而增加,在辐射处理 48 h 后 MDA 含量分别达到 0.085 和 0.147  $\mu\text{mol/g DW}$ , 是对照的 251.70% 和 413.72%。

### 2.3 UV-B 辐射对发菜细胞抗氧化酶活性的影响

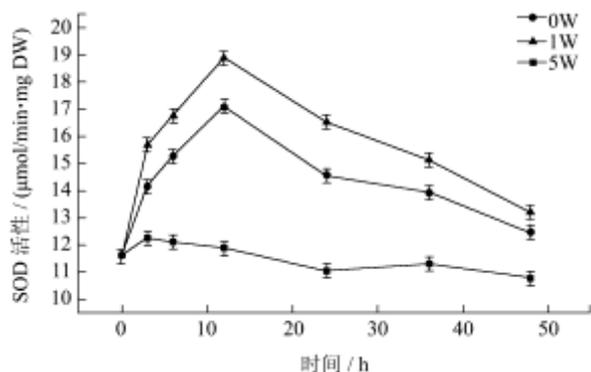


图 4 UV-B 辐射对发菜细胞内 SOD 活性的影响

Fig.4 Effect of UV-B radiation on SOD activity of *Nostoc flagelliforme* cells

UV-B 辐射下发菜细胞内 SOD 活性的变化如图 4, 随着处理时间的延长, 对照组发菜细胞内 SOD 活性变化不明显,  $1 \text{ W/m}^2$  UV-B 辐射处理后发菜细胞内 SOD 活性先升高后降低, 在辐射 12 h 时达到最大为  $17.11 \mu\text{mol/min}\cdot\text{g DW}$ , 是对照的 144.03%, 随后 SOD 活性快速下降, 但在处理 48 h 后 SOD 活性仍高于对照组。  $5 \text{ W/m}^2$  UV-B 辐射处理的发菜细胞内 SOD 活性变化与前者类似, 在处理 12 h 时活性达到最大为  $18.87 \mu\text{mol/min}\cdot\text{g DW}$ , 是对照的 158.88%。相同辐射处理时间,  $5 \text{ W/m}^2$  UV-B 辐射的发菜细胞 SOD 活性均高于  $1 \text{ W/m}^2$  UV-B 辐射处理和对照组。

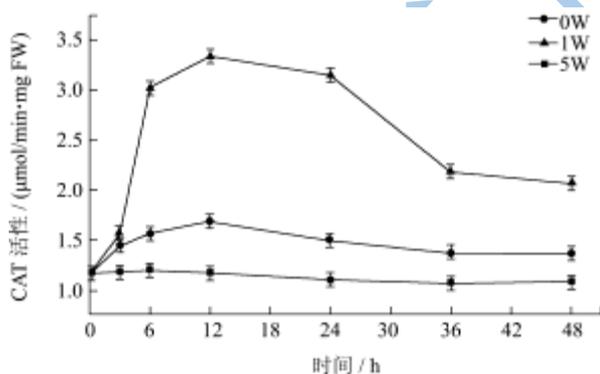


图 5 UV-B 辐射对发菜细胞内 CAT 活性的影响

Fig.5 Effect of UV-B radiation on CAT activity of *Nostoc flagelliforme* cells

UV-B 辐射下发菜细胞内 CAT 活性的变化如图 5, 随着处理时间的延长, 对照组发菜细胞内 CAT 活性几乎无变化,  $1 \text{ W/m}^2$  和  $5 \text{ W/m}^2$  UV-B 辐射处理发菜细胞内 CAT 活性变化趋势基本相似, 都是先升高后降低, 在 UV-B 辐射处理 12 h 时, 发菜细胞内 CAT 活性达到最大为 1.69 和  $3.33 \mu\text{mol/min}\cdot\text{g DW}$ , 分别是对照的

143.61% 和 283.58%。UV-B 辐射处理后发菜细胞中 CAT 活性变化的趋势与 SOD 活性变化的趋势相似。

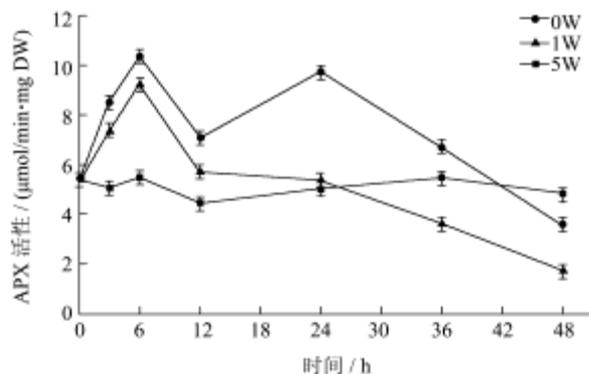


图 6 UV-B 辐射对发菜细胞内 APX 活性的影响

Fig.6 Effect of UV-B radiation on APX activity of *Nostoc flagelliforme* cells

UV-B 辐射下发菜细胞内 APX 活性的变化如图 6, 随着处理时间的延长, 对照组发菜细胞内 APX 活性变化不明显,  $1 \text{ W/m}^2$  UV-B 辐射处理的发菜细胞在 0~6 h 阶段, APX 活性迅速上升, 在 6 h 达到最大为  $10.36 \mu\text{mol/min}\cdot\text{g DW}$ , 是对照的 189.23%, 在处理 6~48 h 阶段, APX 活性变化不稳定。  $5 \text{ W/m}^2$  UV-B 辐射处理的发菜细胞内 APX 活性先升高后下降, 辐射处理 6 h 时活性达到最大为  $9.20 \mu\text{mol/min}\cdot\text{g DW}$ , 是对照的 167.99%, 且比  $1 \text{ W/m}^2$  UV-B 辐射处理后的活性低。

### 3 讨论

植物的生长过程中会产生一些活性氧, 这些活性氧包括单线氧( $\text{O}_2^{\cdot}$ )、超氧阴离子( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )等。UV-B 辐射会增加植物组织中活性氧的产量并产生氧化胁迫。在我们的实验中 UV-B 辐射强度升高,  $\text{O}_2^{\cdot}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的含量增加, 而随着 UV-B 辐射处理时间的延长  $\text{O}_2^{\cdot}$  的变化与  $\text{H}_2\text{O}_2$  变化也不尽相同,  $\text{O}_2^{\cdot}$  的含量在辐射处理 6 h 后达到最大, 随后缓慢下降; 而  $\text{H}_2\text{O}_2$  的含量一直增加, 这表明 UV-B 辐射可引起发菜细胞内活性氧的大量积累。活性氧水平过高可导致脂质过氧化, 引起膜损伤, 最终导致细胞死亡。

丙二醛是膜脂过氧化的主要产物之一, 其含量的高低反映了膜脂过氧化和膜损伤的程度。实验中 MDA 含量随着 UV-B 辐射强度的增大和处理时间的延长显著增加, 这主要是由膜上的多不饱和脂肪酸氧化降解引起的, 说明 UV-B 辐射引起的过氧化胁迫导致了发菜膜脂的过氧化程度加深。类似情况在南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4<sup>[2]</sup>, 蓝细菌 *Anabaena sp.*<sup>[3]</sup> 和 *Chlorococcum sp.*<sup>[4]</sup> 等藻类植物中都出现过, 说明 UV-B 辐射引起发菜的氧化胁迫与大多数藻类相似。

植物通过抗氧化防御机制来抵抗活性氧造成的伤害, 这些氧化防御机制主要包括酶和非酶机制。清除植物活性氧的酶主要包括超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和抗坏血酸酶过氧化物酶 (APX)。SOD、CAT、APX 活性三者之间的平衡是确保细胞内  $O_2$  和  $H_2O_2$  保持平衡的关键因素。SOD 是植物抗氧化防御体系的第一道防线, 能催化  $O_2$  发生歧化作用, 生成  $H_2O_2$  和  $O_2$ , CAT 和 APX 主要负责清除  $H_2O_2$ <sup>[15]</sup>。我们的研究表明发菜细胞内的 SOD、CAT 活性在不同辐射强度的初期显著增加, 但随着辐射处理时间的延长, 酶活均出现了下降。可见短时间 UV-B 辐射处理, SOD、CAT 活性升高有利于清除发菜细胞内大量积累的  $O_2$  和  $H_2O_2$ , 长时间 UV-B 辐射处理, 会导致 SOD、CAT 活性降低, 这可能是由于 UV-B 辐射强度及处理时间超出了 SOD、CAT 的承受极限而失活, 或一些非酶机制的调节所致。SOD、CAT 活性下降, 致使发菜细胞内活性氧的产生与清除处于失衡状态, 细胞损伤严重。而经  $1\text{ W/m}^2$  UV-B 处理发菜细胞内 APX 在辐射之初呈现增长趋势, 随后变化不定, 这可能是由于 APX 为了确保细胞内  $O_2$  和  $H_2O_2$  达到平衡, 适应环境变化做出的相应调节。 $5\text{ W/m}^2$  UV-B 处理的发菜细胞内 APX 活性低于  $1\text{ W/m}^2$  UV-B 处理的, 这说明高强度的 UV-B 辐射抑制了 APX 活性。

#### 4 结论

发菜在不同 UV-B 辐射强度及处理时间下表现出不同程度的氧化损伤。发菜细胞暴露在 UV-B 辐射下, 活性氧大量积累, 导致了细胞内产生氧化胁迫, 对发菜细胞膜造成伤害, MDA 含量增加, 膜脂过氧化严重。为了抵御 UV-B 辐射造成的活性氧损伤, 发菜细胞内的抗氧化酶 SOD、CAT、APX 通过调节其活性来清除细胞内的活性氧, 从而减缓 UV-B 辐射伤害。我们的实验结果提供了发菜细胞对 UV-B 辐射响应的基础数据。然而, 我们还需要更多的实验来评价在臭氧损耗情况下 UV-B 辐射对发菜细胞的长期影响。

#### 参考文献

- [1] McKenzie R L, Aucamp P J, Bais A F, et al. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the earth's surface [J]. Photochem. Photobiol. Sci., 2007, 6: 212-217
- [2] Haifeng Yu, Shiru Jia, Yujie Dai. Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation [J]. J Appl Phycol.,

2009, 21: 127-133

- [3] 林永贤,于海峰,许鹏等.发菜多糖的提取及性质研究[J].现代食品科技,2007,23(5):34-36
- [4] 贾梦瑶,戴玉杰,贾士儒等.液体悬浮培养产发菜多糖的质量分析[J].现代食品科技,2010,26(10):1076-1080
- [5] 贺韵雅,于海峰,杨蕾.盐胁迫下发状念珠藻膜脂的过氧化及抗氧化响应[J].青岛科技大学学报(自然科学版), 2011, 32:626-629
- [6] 王爱国,罗广.植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J].植物生理学通讯,1990,6:55-57
- [7] Patterson B D, E A Macrae, I B Ferguson. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV) [J]. Anal. Biochem., 1984, 139: 487-492
- [8] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. Arch. Biochem. Biophys., 1968, 125: 189-198
- [9] Kato M, Shimizu S. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing Tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation [J]. Can. J. Bot., 1987, 65(4): 729-735
- [10] Kato M, Shimizu S. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing Tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation [J]. Can. J. Bot., 1987, 65(4): 729-735
- [11] Jiménez A, Hemández JA, del Río LA, et al. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves [J]. Plant Physiol, 1987,114: 275-284
- [12] 缪锦来,王波,阚光锋等.南极冰藻 *Chlorophyceae*-L-4 抗氧化酶活对 UV-B 辐射增强的响应.海洋科学进展[J].2004,22: 313-319
- [13] He Y Y, Häder D P. UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp: Protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine [J]. J. Photochem. Photobiol. B: Biol, 2002, 66: 115-124
- [14] Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, et al. Catalase is a sink for  $H_2O_2$  and is indispensable for stress defence in C-3 plants [J]. EMBOJ, 1997, 16: 4806-4816
- [15] Ron Mittler. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. TRENDS in Plant Science, 2002, 7: 405-410