

UV-B 辐射对海洋微藻抗氧化系统的影响

于娟 唐学玺 李永祺 王晨 刘文明

(青岛海洋大学生命学院 266003)

摘要 研究了 UVB 辐射对两种海洋微藻——小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)和亚心形扁藻(*Platymonas subcondiformis*)的抗氧化系统的影响。结果表明:在本实验的辐射剂量范围内,随着 UVB 辐射剂量的增强,两种藻的抗氧化防御系统的非酶性组分还原型谷胱甘肽(GSH)和类胡萝卜素(CAR)的含量随之下降;抗氧化防御系统的酶性组分超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性逐渐降低。加入外源性抗氧化剂 GSH 可减轻 UVB 辐射对藻的伤害。分析表明海洋微藻的 UVB 伤害是由于抗氧化防御系统遭到破坏而导致活性氧积累的结果。

关键词 UVB 辐射,海洋微藻,抗氧化系统

20 世纪以来,由于氯氟烃等的大量使用和航空航天飞行器数量的急剧增加,导致了平流层臭氧层的减薄,使到达地球表面 UV 辐射呈增强趋势。紫外线 B 的增强影响到植物的许多生理生化过程。大量的模拟试验结果表明:在增强的 UVB 辐射下,许多植物(在检测的近 300 种植物中有 2/3 的植物)的生长和生物量有明显的降低,这可能与活性氧代谢的紊乱有关^[1]。Hader 等研究了 UVB 对衣藻属的一种植物(*Chlamydomonas nitralis*)和变形藻属的一种植物(*Atasia longa*)运动的效应时,发现 UVB 能使它们移动现象减弱,辨向本能削弱,从而妨碍能动的浮游生物对变化中的环境条件和可能危险的情况不断作必要的适应。齐雨藻等^[1]研究了紫外光对有毒甲藻塔玛亚历山大藻的生态学效应,表明紫外辐射使该藻的存活率和生长率大幅下降。目前普遍认为,抗氧化系统是高等植物清除活性氧的重要防御系统,植物对逆境胁迫抗性的大小与其有效性密切相关。但 UVB 辐射对海洋微藻的抗氧化防御系统的影响尚缺乏系统研究。本文选用两种海洋微藻——小新月菱形藻和亚心形扁藻,研究 UVB 辐射对其酶性组分 SOD、CAT 活性和非酶性组分 CAR、GSH 含量的变化进行研究,为进一步了解海洋微藻抗氧化防御系统对 UVB 辐射的反应,发展有关的分子生态毒理学生化指标提供基础研究资料。

1 材料和方法

1.1 实验藻种与培养条件

实验藻种选用青岛海洋大学水产学院微藻中心提供的硅藻门的小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)和绿藻门的亚心形扁藻(*Platymonas subcondiformis*)为实验藻种。

培养条件参照唐学玺等 1997 年^[2]的方法进行,藻类培养的明暗周期为 12:12。

1.2 UVB 处理

采用北京曙光电源厂生产的紫外 B 灯处理实验材料,北京师范大学生产的 UVB 型紫外辐射强度仪测定辐射强度。紫外 B 灯外用乙酸钠纤维素薄膜包被,以除去小于 280 nm 的短波照射,整个装置在实验前需连续照射 72 h,以减少薄膜的滤过作用的不稳定性。

由于 UVB 穿透力很弱,实验中,量取 30 ml 藻液倒于直径为 15 cm 表面皿中,根据齐雨藻等^[1]的方法,将藻液置于紫外灯中央正下方 30 cm 处。照射一定时间后,转移至 100 ml 三角瓶中,完全黑暗条件下培养 24 h,然后转移至光强为 2 500~3 000 lx 温度为 20±1 °C 的光照培养箱中培养 24 h,每一实验剂量设一平行组。

第一作者:于娟,出生于 1973 年,博士在读。研究方向:生态毒理学。E-mail:yu820@263.net

收稿日期:2001-06-21;修回日期:2001-07-11

表 1 两种海洋微藻的 UV-B 辐射时间和辐射剂量

Tab.1 UV-B radiative time and doses of two species of marine microalgae

藻名	小新月菱形藻						亚心形扁藻					
UV-B 强度($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)	1.2						1.2					
辐射时间(s)	0	45	90	135	180	225	0	105	210	315	420	525
辐射剂量(J/m^2)	0	0.54	1.08	1.62	2.16	2.7	0	1.26	2.52	3.78	5.04	6.3

1.3 类胡萝卜素(CAR)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量测定

CAR 含量测定参照 Jensen^[8]1978 年的方法进行,90%丙酮提取,721 型分光光度计测定。

GSH 含量测定按 Ellman 等 1959 年和曾韶西等 1990 年的方法进行测定,以 DTNB 显色,在 412 nm 波长下检测,用 GSH 作标准曲线。

1.4 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性测定

SOD 活性采用 Beauchamp^[9]1971 年建立的,Be wley 等 1979 年改进的氮蓝四唑(NBT)光化学反应法来测定。一个 SOD 酶活力单位定义为能引起反应初速度(指不加酶提取液时)半抑制时的酶用量,即

$$\text{SOD 单位} = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{样品 OD 值}}{50\% \text{对照组 OD 值}} \times \text{样品}$$

稀释倍数。

CAT 活性采用南京大学生物系^[3]的方法测定。过氧化氢酶催化分解 H_2O_2 ,以单位时间内 H_2O_2 的消耗量来表示过氧化氢酶的活力。

1.5 外源性抗氧化剂对微藻生长的影响

本实验选用的外源性抗氧化剂为还原型谷胱甘肽(GSH),实验浓度为 0.1 mmol/L。具体实验时,将 0.1 mmol/L 的 GSH 预先加入培养液中,经 UVB 辐射后,一次性培养 48 h,统计细胞密度的变化。以不加 GSH 的 UVB 辐射为相应对照。

2 结果

2.1 UVB 辐射对活性氧清除系统的影响

2.1.1 UVB 辐射对 CAR 和 GSH 含量的影响

由图 1 可以看出,随着 UVB 辐射剂量的增加,两种藻的 CAR 含量逐渐降低,但存在种的差异性。首先,亚心形扁藻的 CAR 含量明显高于小新月菱形藻,亚心形扁藻在小于 1.26 J/m^2 的范围内,CAR 含量下降速度比较快,此后有所减缓;亚心形扁藻在其处

理的最大剂量 6.3 J/m^2 处,CAR 含量比对照组降低了 8.10%,小新月菱形藻在其处理的最大剂量 2.7 J/m^2 处,CAR 含量比对照组降低了 14.1%。图 2 表明两种藻的 GSH 含量受 UVB 辐射的影响而减少,亚心形扁藻在 1.26 J/m^2 处,GSH 含量稍有所增加,随后缓缓降低。亚心形扁藻在其处理的最大剂量 6.3 J/m^2 处,GSH 含量比对照组降低了 14.3%,小新月菱形藻在其处理的最大剂量 2.7 J/m^2 处,GSH 含量比对照组降低了 5.7%。

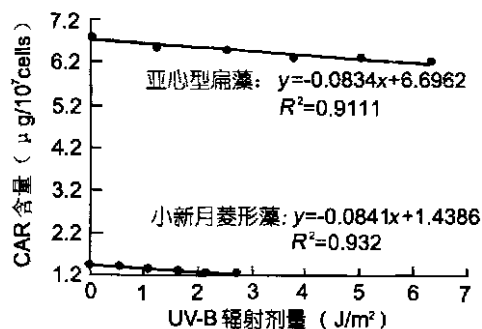


图 1 UVB 辐射对两种海洋微藻 CAR 含量的影响
Fig.1 The effect of UVB radiation on CAR content of two species of marine microalgae

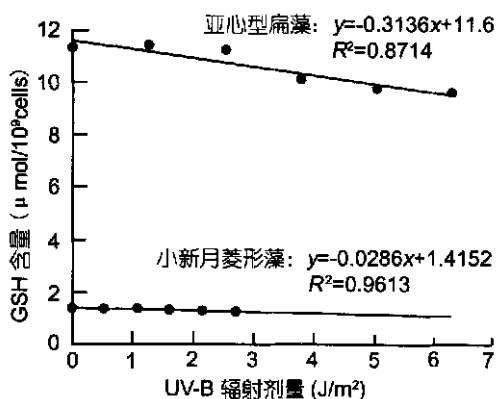


图 2 UVB 辐射对两种海洋微藻 GSH 含量的影响
Fig.2 The effect of UVB radiation on GSH content of two species of marine microalgae

图1和图2表明,增强的UVB辐射使抗氧化剂含量降低,而抗氧化剂可以清除活性氧,抵抗生物体的氧化伤害,因此,UVB辐射处理,可使过剩的活性氧积累,对微藻造成氧化伤害。

2.1.2 UVB辐射对SOD和CAT活性的影响

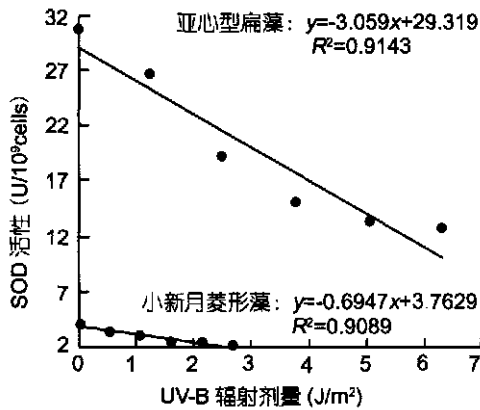


图3 UVB辐射对两种海洋微藻SOD活性的影响
Fig.3 The effect of UVB radiation on SOD activity of two species of marine microalgae

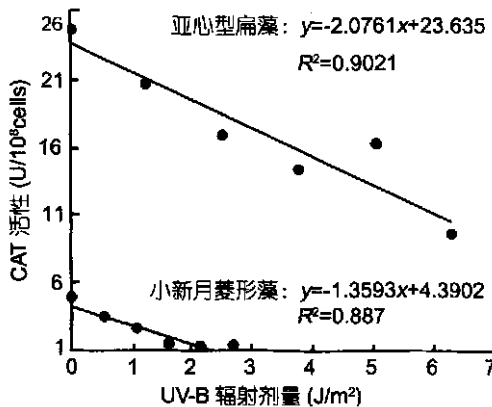


图4 UVB辐射对两种海洋微藻CAT活性的影响
Fig.4 The effect of UVB radiation on CAT activity of two species of marine microalgae

图3、图4表明,受UVB辐射的影响两种藻的SOD和CAT活性普遍降低,且辐射剂量越大,降低越多。另外从图中还可以看出,亚心形扁藻的SOD和CAT活性明显比小新月菱形藻的大。图3中,亚心形扁藻在3.78 J/m²的辐射剂量之前SOD活性下降迅速,之后下降缓慢;小新月菱形藻在1.62 J/m²的辐射剂量之前SOD活性下降迅速,之后下降缓慢。在最大剂量6.3 J/m²处,亚心形扁藻的降低幅度为

58.6%,在2.7 J/m²处,小新月菱形藻的降低幅度为48.0%;UVB辐射对亚心形扁藻SOD活性的48 h半数有效抑制剂量(48 h · EG₅₀)为3.654 J/m²,UVB辐射对小新月菱形藻SOD活性的48 h半数有效抑制剂量(48 h · EG₅₀)大于2.7 J/m²。图4中,在各自的最大剂量下,小新月菱形藻和亚心形扁藻的CAT活性分别降低了72.8%和60.3%;UVB辐射对小新月菱形藻CAT活性的48 h半数有效抑制剂量(48 h · EG₅₀)为0.864 J/m²,UVB辐射对亚心形扁藻CAT活性的48 h半数有效抑制剂量(48 h · EG₅₀)为5.796 J/m²。表明抗氧化系统的酶促系统的清除活性氧的重要的两种酶的活性因UVB辐射而大大降低。

2.2 外源性抗氧化剂(GSH)对微藻生长的影响

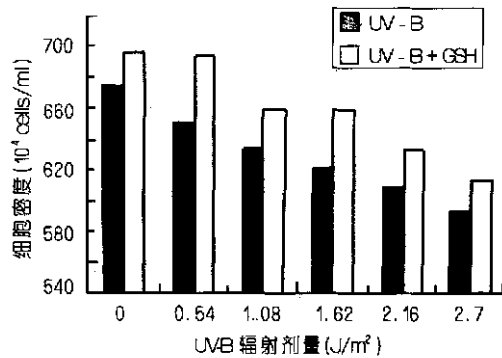


图5 GSH减轻UVB辐射对小新月菱形藻生长的伤害作用
Fig.5 GSH ease UVB radiation injury to the growth of *Nitzschia closterium*

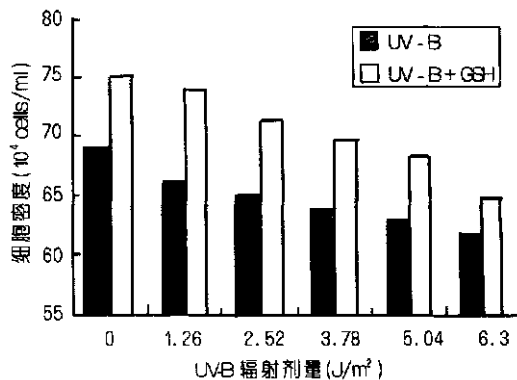


图6 GSH减轻UVB辐射对亚心形扁藻生长的伤害作用
Fig.6 GSH ease UVB radiation injury to the growth of *Platymonas subcordiformis*

由图 5 和图 6 可知, UVB 辐射抑制两种海洋微藻的生长, 且随着辐射剂量的不断增加而抑制作用加强, 而加入浓度为 0.1 mmol/L 的外源性抗氧化剂 GSH 时, 却可以减轻 UVB 对两种海洋微藻的抑制作用。加入 GSH 后, 在 UVB 为 0 时, 两种海洋微藻处理组的细胞密度比对照组有所增加, 说明 GSH 有刺激微藻生长的作用。小新月菱形藻在 0.54 J/m² 处有刺激生长的作用, 细胞密度比对照组增长了 2.8%, 其余 4 个处理组的细胞密度随着辐射剂量的增加而依次降低; 亚心形扁藻在 1.26 和 2.52 J/m² 处有刺激生长的作用, 细胞密度分别比对照组增长了 7.2% 和 3.6%, 其余 3 个处理组的细胞密度随着辐射剂量的增加而依次降低。说明 GSH 在减轻 UVB 的伤害作用的同时, 可能有刺激细胞生长的作用。但随着 UVB 辐射的增强, 对微藻的抗氧化系统的伤害也不断加强, 使抗氧化防御系统清除活性氧的动态平衡遭到破坏, 因此 GSH 只能减轻 UVB 辐射对海洋微藻的伤害程度, 却不能使其恢复到对照组的水平。

3 讨论

有氧生物在长期的进化过程中, 为了防止体内过多活性氧对机体伤害发展了抗氧化防御系统, 它除了包括起重要作用的酶性系统(如 SOD、GPx 和 CAT) 以外, 还包括直接与体内过多活性氧反应、降低体内活性氧含量的非酶系统, 还原型谷胱甘肽(GSH)、甘露醇、类胡萝卜素(CAR) 等就是其中的重要组份, 并且发挥着重要的作用。

氧自由基学说认为, 植物在正常条件下的新陈代谢也产生膜脂过氧化, 但在环境因子, 如光、温、水、缺乏矿质元素、有毒元素、大气污染胁迫下, 植物体内的活性氧(reactive oxygen species, ROS) 如超氧自由基($Q^{\cdot -}$)、氢氧自由基($\cdot OH$)、单态氧(1O)、过氧化氢(H_2O_2) 等产生会显著增加, 进而导致和加剧膜脂过氧化和降解, 使植物膜系统受到伤害。非酶系统中的 GSH 是植物体内普遍存在的还原物质, 能还原 S-S 键, 稳定蛋白质中的 SH 基团, 在维持膜结构的完整性和防御膜脂被自由基和膜脂过氧化物过氧化中起重要作用。UVB 辐射使清除活性氧的抗氧化剂 GSH 和 CAR 含量降低, 因而导致清除活性氧的能力降低, 可能积累大量的活性氧, 使微藻受到伤害, 加入外源性抗氧化剂 GSH 可以减轻 UVB 辐射对微藻生长的抑制作用, 进一步表明了 GSH 作为抗氧化剂具有清除活性氧的作用。UVB 辐射还降低了抗氧化系统的酶促系统的关键性酶——SOD 和 CAT 的活性。近几年来, 许多研究者都将 SOD、CAT 作为防御活性氧或其

他过氧化物自由基对细胞膜系统伤害的酶来研究。SOD 可清除 $Q^{\cdot -}$ 形成 H_2O_2 , CAT 可催化 H_2O_2 形成 H_2O 。研究者认为二者能清除超氧化物自由基, 抑制膜脂过氧化水平, 在减轻膜的伤害上可能起着一种保护性作用, 在增强的 UVB 辐射下, 使其酶系统产生破坏, 导致 SOD、CAT 活性下降, 清除活性氧的抗氧化系统功能下降, 活性氧迅速累积, 也加速了 $Q^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 通过 Fenton 和 Haber Weiss 反应向毒性更强的 $\cdot OH$ 转化, 对微藻的生长产生不利的影响。谢荣^[4]发现高浓度的丙溴磷对微藻的生长有抑制作用, 脂质过氧化程度过量提高, SOD 活性显著下降, 加入抗氧化剂可缓解高浓度丙溴磷对微藻的毒害作用。唐学玺^[5]研究表明, 久效磷胁迫下, 扁藻细胞产生过量的活性氧, 活性氧引起膜脂过氧化, 导致扁藻的伤害, 抗氧化剂(Vc、Ve、GSH) 能有效地抑制久效磷对扁藻的毒害效应。这与本文的实验结果类似。

紫外线具有比可见光更高的能量, 在照射微藻细胞时可能会产生更多的活性氧, UVB 的伤害可能也是通过活性氧的破坏作用而造成的^[6]。随着 UVB 辐射剂量的加强, 使海洋微藻的防御活性氧有关的酶促和非酶促保护系统能力降低, 因而清除能力下降, 提高了体内自由基浓度, 使活性氧在体内生成与清除的动态平衡遭到破坏, 导致体内活性氧水平的提高, 过量的活性氧会攻击防御系统中的生物功能分子, 从而使酶损伤。

参考文献

- 1 齐雨藻、黄长江、应浙鸿等。紫外光对有毒甲藻塔玛亚历山大藻的生态学效应, 海洋与湖沼, 1997, 28(2): 113~119
- 2 唐学玺等。有机磷农药对海洋微藻致毒性的生物学研究 II. 久效磷胁迫下扁藻和三角褐指藻脂质过氧化伤害的研究, 海洋学报, 1997, 19(1): 139~143
- 3 南京大学生物系组编。环境生物学实验技术与方法。南京: 南京大学出版社, 1989。85~89
- 4 谢荣、唐学玺、李永祺等。丙溴磷影响海洋微藻生长机理的初步研究, 环境科学学报, 2000, 20(4): 472~477
- 5 唐学玺、李永祺。抗氧化剂对扁藻久效磷毒害的抑制效应, 环境科学, 2000, 21(1): 87~89
- 6 陈拓、任红旭、王勋陵。UVB 对小麦叶抗氧化系统的影响, 环境科学学报, 1999, 19(4): 453~455
- 7 Tevini M., Teramura A. H.. UVB effects on terrestrial plants, Photochem. Photobiol., 1998, 40: 479~487
- 8 Jensen A.. Handbook of Physiological Methods. New York: Cambridge University Press, 1978. 59~70

研究报告 *REPORTS*

THE EFFECT OF UV-B RADIATION ON THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF MARINE MICROALGAE

YU Juan TANG Xue-xi LI Yong-qi WANG Chen LIU Wen-ming

(*College of Marine Life Science, Ocean University of Qingdao, 266003*)

Received : Feb., 21, 2001

Key Words : UVB radiation, Marine microalgae, Antioxidant system

Abstract

The effect of UVB radiation on the antioxidant system of two marine microalgae *Nitzschia closterium* and *Platymonas subcondiformis* was studied in this paper. With increasing the dose of UVB radiation, the nonenzymic components carotenoids (CAR) content and reductive glutathione (GSH) content in two species of marine microalgae declined; the enzymic components superoxide dismutase (SOD) activity and catalase (CAT) activity declined. When extrinsic GSH was added, the injury was reduced. The analysis indicates that the effect of UVB radiation on marine microalgae makes antioxidant system destroyed, so active oxygen is accumulated.

(本文编辑 :张培新)