

贻贝棘尾虫年轻与衰老无性系 抗氧化能力的比较*

邱子健 单志新 史新柏 付桂荣

(哈尔滨师范大学生物系 哈尔滨 150080)

摘要 贻贝棘尾虫采自黑龙江省帽儿山南山水库附近水塘,于1995年9月在本系实验室通过接合生殖得到的接合后体,克隆培养作为年轻无性系;采用1988年9月以来实验室保存培养的去小核无性系为衰老无性系。测定了在相同条件下培养的贻贝棘尾虫年轻(约200代分裂)和衰老(约2000代分裂)无性系消除 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的能力、脂质过氧化程度及脂褐素含量。结果表明,贻贝棘尾虫年轻无性系消除 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的能力($p < 0.01$)显著高于衰老无性系,脂质过氧化程度($p < 0.001$)和脂褐素含量($p < 0.001$)显著低于衰老无性系,即年轻无性系抗氧化能力显著高于衰老无性系。

关键词 贻贝棘尾虫 衰老 自由基 抗氧化能力

学科分类号 Q25

自Harman(1956)提出关于衰老的自由基学说后,有关自由基的研究进展迅速。研究表明,在衰老的家蝇、鼠、人体红细胞等细胞内,自由基含量增高,消除自由基的能力降低(高福鸿等,1992;吴可等,1994;陈晓光等,1991;姜招峰等,1990;董伟等,1986;翁其亮等,1987)。纤毛原生动物既是一个单细胞,也是一个能完成全部生命活动的独立个体,有关其细胞衰老的研究已有报道(史新柏等,1994),但涉及自由基方面的研究,只有关于衰老四膜虫消除 $\cdot OH$ 自由基能力的报道(李荫蓁等,1996),而关于其它纤毛原生动物自由基方面的研究工作目前未见报道。本文对贻贝棘尾虫年轻和衰老无性系消除 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的能力、脂质过氧化程度及脂褐素含量进行研究,以期验证这些衰老的生化指标在原生动物中的普遍适用性,并从抗氧化能力方面解释贻贝棘尾虫衰老的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用贻贝棘尾虫(*Styloynchia mytilus*)年轻无性系于1995年9月使用两个与衰老无性系为同一繁殖群(Syngen)的互补接合型接合后无性繁殖而来;衰老无性系起始于1988年9月有性生殖后的一个接合后体,无性繁殖不久摘除小核,将摘除后成活的一个无小核

* 国家自然科学基金资助项目,39370099号;黑龙江省自然科学基金资助项目。邱子健,男,出生于1948年4月,硕士,教授,E-mail: sdkjc@ems.dragron.net.cn

收稿日期:1997-09-01,收修改稿日期:1998-08-24

虫体,繁殖成的去小核无性系,至1996年12月已无性分裂2000次以上。因此年轻与衰老无性系的遗传基础一致,具有可比性。本文的实验做了分裂约200次的年轻无性系和分裂约2000次的衰老无性系之间的对比。贻贝棘尾虫的培养以 Pringsheim's 液为培养液,以麦汤繁殖的唇鞭虫 (*Chilomonas* sp.) 为食物。

1.2 方法

1.2.1 贻贝棘尾虫消除 O_2^- 自由基能力的测定 消除 O_2^- 自由基的能力以一定量虫体中的超氧化物歧化酶(SOD)的活力表示。SOD在机体内的功能是消除 O_2^- 自由基,SOD活力越高,消除自由基能力越强, O_2^- 自由基水平就越低;反之,SOD活力越低,消除自由基能力越低, O_2^- 自由基水平就越高。

1.2.1.1 贻贝棘尾虫 SOD 粗酶液的制取 制取时,年轻与衰老的虫体处于细胞间期,虫体大小一致,基本处于饥饿状态。将虫体以 500r/min 离心约 1min,用微量取液器吸取摇匀的虫体,用卢格氏液固定,在解剖镜下计数。再以 1000r/min 离心沉淀虫体,取出虫体上清液,加入虫体体积一半的 0.05mol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.8),在冰浴中破胞,加乙醇-氯仿(5:3, V/V)抽提液(用以消除 SOD 以外的杂蛋白),充分摇匀。3000r/min 离心 10min,吸取上清液,此即为贻贝棘尾虫 SOD 粗酶液,于低温冰箱中保存备用。

1.2.1.2 测定方法 测定方法及酶单位定义参照邹国林等(1986),并有所改进。取 0.1ml 贻贝棘尾虫 SOD 粗酶液(来自 1500个虫体),加 1.5ml 50mmol/L 的磷酸钾缓冲液(pH = 8.3)、1.3ml 蒸馏水,混匀后在 25℃ 水浴保温 20min,取出后立即加入经 25℃ 预热的 0.1ml 3mmol/L 邻苯三酚溶液(以 10mmol/L HCl 配制),迅速摇匀后倒入 1cm 光径的比色杯,用岛津 UV-265型紫外分光光度计在波长为 319.5nm(张伯科等,1990)下测其吸光值。另设一对照组,以 0.1ml 0.05mmol/L 的磷酸二氢钾缓冲液(pH = 7.8)代替 SOD 粗酶液,其它成分不变。

酶活力单位定义为:在 1ml 反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 时的酶量定为一个活力单位。

单位活力(U/样液体积) = $(A_0 - A_s) / A_0 \times 0.5^{-1} \times 3 \times \text{加样量}(\text{ml})^{-1} \times \text{样液稀释倍数}$

单位活力(U/10³个虫体) = 单位活力(U/样液体积) ÷ 样液中虫体数 × 1000

式中, A_0 为自氧化速率, A_s 为加样后自氧化速率。

1.2.2 贻贝棘尾虫消除 ·OH 自由基能力的测定

1.2.2.1 贻贝棘尾虫消除 ·OH 自由基粗酶液的制取 与贻贝棘尾虫 SOD 粗酶液的制取步骤相似,但所用磷酸缓冲液的 pH = 7.4,不用氯仿-乙醇抽提液(因其可使消除 ·OH 自由基的酶失活)。

1.2.2.2 测定方法 参照李荫葵等(1996)。反应体系为 2ml,其中含抗坏血酸 100μmol/L、CuSO₄ 100μmol/L、水杨酸 2mmol/L、细胞色素 C 100μmol/L、磷酸二氢钾缓冲液(pH = 7.4) 0.15mol/L、粗酶液样品 0.3ml(来自 2000个虫体)。经 25℃ 温育 90min 后加入 1ml 18mmol/L 硫脲,混匀,在 550nm 波长下测定其光密度值。对照组以磷酸二氢钾缓冲液取代样品,其它成分和浓度不变。粗酶液样品消除 ·OH 自由基能力的大小以样品的光密度值与对照组的光密度值之差(ΔA)表示。

1.2.3 贻贝棘尾虫脂质过氧化程度的测定 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 是脂质氧化的最终分解产物, 其含量的大小可以反映出机体发生脂质氧化的程度。

1.2.3.1 贻贝棘尾虫丙二醛样液的制取 与贻贝棘尾虫 SOD 粗酶液制取步骤相似, 但目的不是为提取酶, 而是获取含足够量丙二醛的测试样本。以蒸馏水代替缓冲液, 最后一次离心前再加 1 / 10 体积的蒸馏水。

1.2.3.2 测定方法 参照董伟等 (1986)。取 0.5ml 贻贝棘尾虫丙二醛样液, 加入 1.2ml 20% 的醋液、1.3ml 1% 硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 作为显色剂, 经 100℃ 煮沸 40min, 冷却后加 3ml 正丁醇, 振荡 3—5min, 3 000r / min 离心 10min, 在 532nm 波长下测定 MDA-TBA 复合物的光密度 (A)。丙二醛含量大小以样品的的光密度值 (A) 表示。

1.2.4 贻贝棘尾虫脂褐素含量的测定 脂褐素 (Lipofusion, LIP) 是自由基诱导的不饱和脂肪酸和蛋白质、核酸等大分子氧化的终产物, 其含量被认为是发生在组织及细胞中过氧化伤害的衡量尺度, 与衰老程度相对应 (Rajindar *et al*, 1979)。

1.2.4.1 贻贝棘尾虫脂褐素样液的制取 开始步骤与贻贝棘尾虫 SOD 粗酶液制取步骤基本相同, 但不加磷酸缓冲液, 加相当于一半虫体体积的氯仿-甲醇 (2:1, V/V), 去除杂蛋白, 制匀浆。

1.2.4.2 测定方法 参照 Fletcher 等 (1973)。取脂褐素样液在 40℃ 温育 5min, 经 3 000r / min 离心 10min, 取上清液于岛津 RF-540 荧光分光光度计测定脂褐素的含量。测定参数为: 发射波长 365nm、激发波长 435nm、狭缝 10nm, 灵敏度为 1, 测 0.1μg / ml 硫酸奎宁校准荧光强度为 50。

2 结果与讨论

2.1 实验结果

贻贝棘尾虫年轻与衰老无性系消除 O_2^- 自由基和 $\cdot OH$ 自由基的能力、脂质过氧化程度及脂褐素含量结果见表 1。

表1 贻贝棘尾虫年轻与衰老无性系抗氧化能力的比较¹⁾

Tab.1 Comparison of the antioxidative capacity in the young *S. mytilus* and the aged

	SOD(U/1 000cells)	$\cdot OH(\Delta A/3\ 000\text{cells})$	丙二醛 ($A/5\ 000\text{cells}$)	脂褐素 ($\mu\text{g}/1\ 000\text{cells}$)
年轻无性系	31.230±1.650	0.503±0.025	0.012±0.001	0.007 8±0.000 4
衰老无性系	23.760±2.740	0.125±0.009	0.038±0.001	0.013 1±0.000 5
p	<0.01	<0.01	<0.001	<0.001

1) 表中数值为平均值±标准差, $n=4$

由表 1 可知, 贻贝棘尾虫衰老无性系消除 O_2^- 自由基及 $\cdot OH$ 自由基能力显著低于年轻无性系 ($p < 0.01$)。丙二醛浓度的高低反映出机体发生脂质氧化的程度, 表 1 中的结果表明衰老无性系细胞脂质过氧化程度显著高于年轻无性系 ($p < 0.001$), 这是细胞抑制脂质过氧化反应能力降低的结果。衰老无性系细胞的脂褐素含量显著高于年轻无性系 ($p < 0.001$), 这是衰老无性系细胞代谢过程中积累增加的结果, 与前 3 项指标的测定结果具有一致性。以上结果表明, 衰老无性系与年轻无性系相比, 细胞抗氧化能力降低。

2.2 讨论

Harman(1956, 1962, 1968, 1981)提出衰老的自由基理论,认为衰老是细胞代谢过程中产生的自由基起毒害作用的结果。自由基对生物体具有多种损害作用,直接或间接地引起生物衰老。 O_2^- 自由基的损伤主要是使核酸链断裂(Lesko *et al*, 1980)。 $\cdot OH$ 自由基是化学性质最活泼的活性氧,它几乎与细胞内的每一类有机物(如糖、氨基酸、磷脂、核苷酸和有机酸等)反应,当其与细胞膜反应时,可引起膜脂质过氧化,进而导致细胞内的蛋白质、酶、DNA等生物分子的结构和功能的改变,造成细胞酶活性变化、代谢紊乱、DNA损伤和细胞死亡(Cacciutolo *et al*, 1993; Prise *et al*, 1992)。脂质过氧化是不饱和脂肪酸氧化降解的链式反应过程,在其延伸阶段产生多种自由基如 R^+ 、 RO^+ 、 RO_2^+ ,最后产生如丙二醛等多种小分子产物。脂质过氧化可以引起DNA损伤(Hruszkewycz, 1988; Fraga, 1988),它的中间产物自由基和最终分解产物丙二醛能与DNA交联,导致突变(Mukai *et al*, 1976),还能损伤使细胞表面的激素受体(Muakkassah-Kelly *et al*, 1982)。

细胞内的多种自由基以及脂质过氧化对机体的毒害作用都加速了细胞的衰老,但细胞也具备相应的抗氧化防御系统来减弱其危害。该防御系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-POD)、过氧化氢酶(CAT)等酶促系统,维生素E、尿酸、维生素C、 β -胡萝卜素、谷胱甘肽等非酶促反应系统(Mehlhorn, 1988),以及DNA修复机制(Hart *et al*, 1979)。在正常机体中,自由基氧化作用与抗氧化防御作用处于动态平衡状态,但当平衡失调时,机体消除自由基的能力降低,从而消除不了多余的自由基。当过剩的自由基对细胞的氧化损伤超过修复能力时,细胞、组织及器官的机能就逐步发生紊乱及障碍,表现出机体逐步趋于衰老。

本文采用贻贝棘尾虫年轻和衰老无性系所做的抗氧化能力测定结果表明,随无性系代龄的增加,细胞抗氧化能力显著降低。该结果与前人的工作结论一致(高福鸿等, 1992; 吴可等, 1994; 陈晓光等, 1991; 姜招峰等, 1990; 董伟等, 1986; 翁其亮等, 1987),支持了Harman的衰老的自由基理论,证明该理论既适用于多细胞的高等动物,也适用于单细胞的原生动物;也表明随无性系代龄的增加,防御系统抗氧化能力的降低是导致贻贝棘尾虫衰老的重要原因之一。

哈尔滨师范大学生物系实验室以前的工作在其它衰老指标上证明了棘尾虫三个无小核系的衰老,如分裂速度减慢,接之以无性系细胞的死亡,大核核膜褶皱化, DNA含量减少,复制速度减慢,染色质体密度降低,与核膜的接触脱离,核仁膨大及其内部结构变模糊,细胞质内脂褐素增加,胞质的疏松区变大,食物泡内酸性磷酸酶(ACP)酶量减少等。这些衰老变化与本文证明的衰老个体自由基消除能力减低之间关系如何,尚有待更深入的实验证明。但可肯定许多衰老变化与自由基的损害作用有关。

Harman(1968)用能消除自由基的2,6-二丁基羟基甲苯和巯基乙胺喂小鼠,可将小鼠的寿命延长30%—40%,作者认为,凡能消除自由基的其它药物,只要对细胞无其它毒害,都会有抗衰老作用,作者曾用灵芝所做的抗衰老实验已证明了这一点。今后在筛选其它抗衰老药物时,只要检测其对自由基的消除效果,就可快速作出其有无抗衰老作用的结论。这能为测定原生动物细胞的衰老程度,以及衡量药物抗细胞衰老效果,增添一系列重要的测定指标及测定方法。

参 考 文 献

- 史新柏, 施心路, 邱子健等, 1994. 磁化水促进原生动细胞分裂及抗衰老的研究. *中华生物磁学*, 8(2): 5—7
- 李荫葵, 高崇明, 陈阅增, 1996. 上海四膜虫 Si 的克隆老化. *动物学报*, 42(1): 60—67
- 吴可, 金道山, 胡小明等, 1994. 用顺磁共振研究家蝇衰老过程蝇头自由基特征的改变. *生物技术*, 4(6): 28—29
- 张伯科, 郑荣梁, 1990. 改进的 SOD 的邻苯三酚自氧化测定法. *兰州大学学报*, 26(3): 99—102
- 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌等, 1986. 一种 SOD 的测活方法——邻苯三酚自氧化法的改进. *生物化学与生物物理进展*, 4: 71—73
- 陈晓光, 崔志勇, 常一丁等, 1991. 何首乌对老年小鼠衰老指标的影响. *中草药*, 22(8): 357—359
- 姜招峰, 周翔, 1990. 老年大鼠自由基代谢的研究. *老年学杂志*, 10(5): 308—310
- 高福鸿, 刘树森, 1992. 家蝇飞翔肌线粒体超氧化物歧化酶活性及荧光衰老色素含量的年龄变化的研究. *动物学报*, 38(4): 443—445
- 翁其亮, 万田郎, 朱晓明, 1987. 幼虫期至青春期中红细胞中自由基 O_2^- 水平的变化. *生物化学与生物物理进展*, 5: 53
- 董伟, 李新建, 陶国枢等, 1986. 人红细胞脂质过氧化及超氧化物歧化酶的研究. *生物化学与生物物理进展*, 6: 35—36
- Cacciuto M A, Loctrinh J A, Lumpkin-Govind R, 1993. Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Radical Biol Med*, 14(3): 267—276
- Fletcher B L, Dillard C J, Tappel A L, 1973. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal Biochem*, 52(1): 1—9
- Fraga C G, 1988. Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices. *Biochemistry*, 25(3): 893—896
- Harman D, 1956. A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11: 298—300
- Harman D, 1962. Role of free radicals in mutation, aging and maintenance of life. *Rad Res*, 16: 752—763
- Harman D, 1968. Free radical theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice. *J Gerontol*, 23: 476—482
- Harman D, 1981. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 7124—7128
- Hart R W, D'Ambrosio S M, Ng K J *et al*, 1979. Longevity, stability and DNA repair. *Mech Ageing Dev*, 9: 203—223
- Hruszkewycz A M, 1988. Evidence for mitochondrial DNA damage by lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, 153(1): 191—197
- Lesko S A, Lorentzen R J, Ts'o P P *et al*, 1980. Role of superoxide in DNA strand scission. *Biochemistry*, 19(3): 3023—3028
- Mehlhorn R J, 1988. Oxygen Radical Generation and Protective System: Assessment of Their Involvement in Aging. In: Timiras P S ed. *Physiological Basis of Geriatrics*. New York: Macmillan Publishing Company, 87—89
- Muakkassah-Kelly S F, Andersen J W, Shin J C, 1982. Decreased tritium-labeled serotonin and tritium-labeled spiperone binding consequent to lipid peroxidation in rat cortical membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 104(30): 1003—1010
- Mukai F H, Godstein B D, 1976. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science*, 191: 868—869
- Prise K M, Davies S, Stratford M R L, 1992. The role of non-protein sulphhydryls in determining the chemical repair rates of free radical precursors of DNA damage and cell killing in Chinese hamster V79 cells. *Int J Radiat Biol*, 62(3): 297—306
- Rajindar S S, Henry D, 1979. Effect of experimental prolongation of life span on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly. *J Gerontol*, 34(4): 489—496

COMPARISON OF THE ANTIOXIDATIVE CAPACITIES BETWEEN YOUNG CLONE AND AGED CLONE OF *STYLONYCHIA MYTILUS*

QIU Zi-jian, SHAN Zhi-xin, SHI Xin-bai, FU Gui-rong

(Department of Biology, Harbin Normal University, Harbin, 150080)

Abstract The *Stylonychia mytilus* was collected from Maoershan Hill in Heilongjiang Province. The clone which is raised from a new cell after conjugation in lab in September 1995 is used as the young group; the clone which has been raised in lab from September 1988 without micronucleus in cell is used as the aged one. Both groups are syngen with the same hereditary condition, so they can be compared. The young clone reached 200 fissions, and the aged one obtain 2 000 fissions at the time of experiment, according to the demands of experiment. In order to obtain the difference in the antioxidative capacity of the young and the aged *S. mytilus*, the capacities of scavenging the superoxide free radical (O_2^-) and the hydroxyl radical ($\cdot OH$), the level of lipid peroxidation and the contents of lipofusion are determined of the young *S. mytilus* and the aged *S. mytilus* in this study. The results show that the capacities of scavenging free O_2^- radical and free $\cdot OH$ radical ($p < 0.01$) of the young *S. mytilus* are evidently higher than those of the aged ones and the level of lipid peroxidation ($p < 0.001$) and the content of lipofusion ($p < 0.001$) are evidently lower for the young *S. mytilus* than those for the aged; the antioxidative capacity of the aged *S. mytilus* is significantly lower than that of the young one. According to the free radical theory of aging advanced by Harman (1956, 1962, 1968, 1981), the aging is the result of a poisonous effect of the free radicals produced during the cell metabolism. The poisonous effect of the free radicals in cell and the lipid peroxidating accelerates cell aging; however, the cell has an antioxidative system to reduce the harm. The system includes enzymes such as SOD, GSH-POD, CAT, and nonenzyme antioxidants such as V_E , Uric acid, V_C , β -carotene, GSH and the DNA repair system. The results in this paper are in accord with the conclusions that the free radical theory of aging is applicable not only to the higher multicellular animals but also to the single cell protozoa, showing that the reduction of the antioxidative capacity is one of the most important reasons for the cell aging in term of cell fission number as the fission increases.

Key words *Stylonychia mytilus* Aging Free radical Antioxidative capacity

Subject classification number Q25