

溴化 1-己基-3-甲基咪唑对斜生栅藻谷胱甘肽及其代谢酶的影响

马剑敏^{1,2} 蔡林林¹ 胡灵卫¹ 靳同霞¹ 李效宇¹ 王键吉²

(1. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007; 2. 河南省环境污染控制重点实验室, 新乡 453007)

摘要:研究了浓度为 0、1、5、10、15、20 mg/L 的新兴离子液体溴化 1-己基-3-甲基咪唑 ($[C_6mim]Br$) 在 24h、48h、72h 和 96h 对斜生栅藻还原型谷胱甘肽 (GSH) 及其代谢酶 谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX)、谷胱甘肽转硫酶 (GST) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 的影响。结果表明: GSH 含量在 24h、48h 和 72h 时, 在最低处理浓度下不变, 其他处理浓度下随胁迫浓度增加而降低, 96h 时则与对照无差异或较小; GPX 和 GST 的活性在 72h 之前明显升高 (最高浓度组的 GST 活性有波动), 96h 时均降低至对照水平; GR 活性在 24h 时, $[C_6mim]Br = 1$ mg/L 时升高, 之后降低, 在 48h 增高至对照水平, 72h 时, $[C_6mim]Br \geq 10$ mg/L 的处理组高于对照水平, 96h 时, 除最低处理组外, 均降至对照水平以下。GR 是 GSH 系统中的限速酶, GST 则是该系统中活性和灵敏性最高的酶, 可作为 $[C_6mim]Br$ 胁迫时的敏感的生物标志物。1 mg/L 的 $[C_6mim]Br$ 可引起藻细胞的氧化胁迫, 具有环境毒性。

关键词:离子液体; 斜生栅藻; 还原型谷胱甘肽; 谷胱甘肽转硫酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 谷胱甘肽还原酶

中图分类号: X171.5; Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)04-0696-06

传统的化学反应和分离过程涉及大量的有毒、易挥发有机溶剂, 容易造成严重的环境污染。一种新型的“绿色溶剂”离子液体因具有极低的蒸汽压、不挥发、导电性强、对许多无机盐和有机物有良好的溶解性等诸多优点使之在分离过程、电化学和化学反应等领域显示出了广阔的应用前景^[1,2]。但人们也逐渐认识到, 它对环境并非没有威胁^[3-6]。

藻类作为水生生态系统的初级生产者, 是监测评价水环境质量的重要指标^[7,8]。斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 对毒物敏感、易获得、个体小、繁殖快、培养方便, 是一种常用的测试生物^[9-11]。另外, 生物内源还原型谷胱甘肽 (GSH) 与应激反应有密切的关系^[12], 它是细胞环境中一个重要的非酶抗氧化剂, 可以维持受胁迫细胞抗氧化体系的完整性。由 GPX 和 GST 参与、GSH 氧化产生的氧化型谷胱甘肽 (GSSG), 在 ATP 提供能量的情况下, 可以由 GR 还原重新产生 GSH, 从而维持细胞内 GSH 库的稳定^[13]。在这个循环中活性氧 (ROS) 可以由 GPX 和 GST 在 GSH 作为底物的前提下清除, 因此 GPX、GST 和 GR 也是抗氧化防御系统的重要成员。因此研究 GSH 代谢及循环中酶活性变化对于揭示

化学物质的环境毒性很有必要。

目前关于离子液体的环境毒性与毒理的研究仅有少量报道^[14-16], 对生物体的抗氧化系统的影响, 尤其是对 GSH 及其代谢酶的研究尚未见报道。咪唑基离子液体是一类已经实现了较大规模的生产和应用的新兴绿色溶剂, 其环境毒性迫切需要研究。目前 Cho, *et al.* 已证明离子液体对羊角月牙藻的毒性比传统的有机溶剂甲醇、N,N-二甲基甲酰胺、2-丙醇的毒性大^[17]。本试验以斜生栅藻为受试生物, 研究了溴化 1-己基-3-甲基咪唑 ($[C_6mim]Br$) 对其 GSH 含量以及 GST、GPX 和 GR 活性变化的影响, 初步探讨了谷胱甘肽循环酶对离子液体胁迫作出的反应, 以期在生物大分子水平上探讨离子液体对生物机体的影响及其产生毒害的机制, 并为评价离子液体的环境毒性积累科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 斜生栅藻由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供。离子液体: 溴化 1-己基-3-甲基咪唑 ($[C_6mim]Br$) 由河南师范大学化学与环境科学学院参照 Bonhôte 的方法合成^[18]。其他试剂

收稿日期: 2008-10-16; 修订日期: 2009-04-02

基金项目: 国家自然科学基金 (20273019, 20573034); 河南省高校杰出人才计划 (2006KYCX021); 河南省科技攻关计划 (0624440039) 资助

作者简介: 马剑敏 (1964—), 男, 河南偃师人; 博士; 主要从事污染与修复生态和环境生物学研究。E-mail: mjm6495@sina.com

通讯作者: 王键吉, E-mail: jwang@henannu.edu.cn

均为分析纯。

1.2 藻的培养 斜生栅藻在无菌条件下转移至 BG-11人工培养液中,于光照培养箱中培养一周,至对数生长期进一步扩大培养。培养条件为:温度 (28 ±0.5) ,光暗比 12h 12h,光强为 4000 lx,静置培养,每天定时摇动三次。

1.3 处理方法 用处于对数生长期的斜生栅藻接种于灭菌的 BG-11 培养基中,接种浓度为 10⁶个/mL,加入离子液体 [C₆mim]Br,使其最终处理浓度分别为 0、1、5、10、15和 20 mg/L,该浓度梯度是根据预试验、由直线内插法确定^[19];培养 96h,培养条件同上;每个处理设四个平行。

1.4 生化指标的测定 样品制备:在 96h的处理期中,每间隔 24h取样一次,常温离心 10min (4000 r/min)收集藻体,共取样 4次。称取藻体 0.2 g,加入磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH7.8)与适量石英砂充分研磨 (冰浴),样品 缓冲液为 1 5。15000 r/min、4 离心 15min,上清液储藏于 -20 备用。

可溶性蛋白用 Bradford 法^[20]测定,以 μg/mL 表示样品的蛋白含量。GST (EC 2.5.1.8)、GPX (EC 1.11.1.9)和 GR (EC 1.6.4.2)均采用南京建成生物公司提供的检测试剂盒测定,用 U/mg蛋白表示酶活性;GST和 GPX的酶活力单位定义为:每毫克蛋白每分钟在 37 扣除非酶促反应,使反应体系中 GSH浓度降低 1 μmol/L 为一个酶活力单位;GR的酶活力单位定义为:每毫克蛋白每分钟在 37 扣除非酶促反应后,使 NADPH 浓度减少 1 μmol/L为一个酶活力单位。还原型谷胱甘肽

(GSH)参照庞占军等的方法测定^[21],通过标准曲线计算其含量 (单位:μg/100mg FW)。

1.5 统计分析 所有数据均采用 SPSS11.5 for Windows软件进行单因素方差分析 (ANOVA),多重比较采用 Tukey法进行,其结果以标记字母法表示^[22],用小写字母表示不同处理之间的差异达到显著水平 (p<0.05),用大写字母表示差异达到极显著水平 (p<0.01),同时标记在柱形图上方。数据结果表示为:平均数 ±均数的标准误 (用误差线显示在图上)。

2 结 果

2.1 [C₆mim]Br对斜生栅藻 GSH的影响

GSH含量在 24h、48h和 72h时,在最低处理浓度下不变,其他处理浓度下随胁迫浓度增加而降低,但随着时间的延长,降低幅度减小,96h时则与对照组无差异或较小 (图 1)。

2.2 [C₆mim]Br对斜生栅藻 GPX的影响

GPX活性在 [C₆mim]Br处理 24—72h时,比对照组明显升高,但在 96h时各浓度组的 GPX活性下降至正常水平,除 1和 5 mg/L 浓度组之间有差异外,其他浓度组间无显著差异 (图 2)。

2.3 [C₆mim]Br对斜生栅藻 GST的影响

经 [C₆mim]Br处理 24h时,各浓度组的 GST活性均显著高于对照组,但各组之间无显著差异;48h和 72h时,随处理浓度的提高,GST活性先升后降;96h时各浓度处理组 GST活性与前期相比,均有大幅度下降,与对照组无差异或较小 (图 3)。

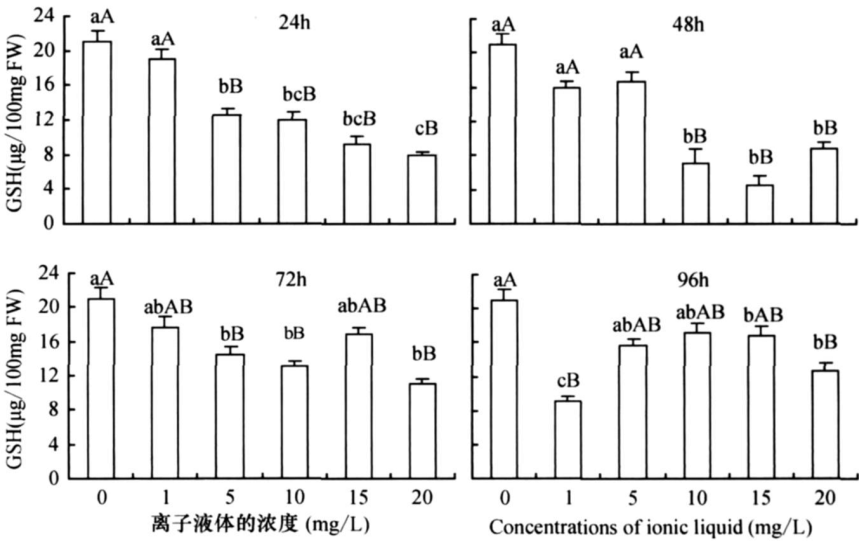


图 1 不同时间 [C₆mim]Br处理对斜生栅藻 GSH含量的影响

Fig. 1 Effect of [C₆mim]Br on the content of GSH of *S. obliquus* after exposure for different times(mean ±S. E.)

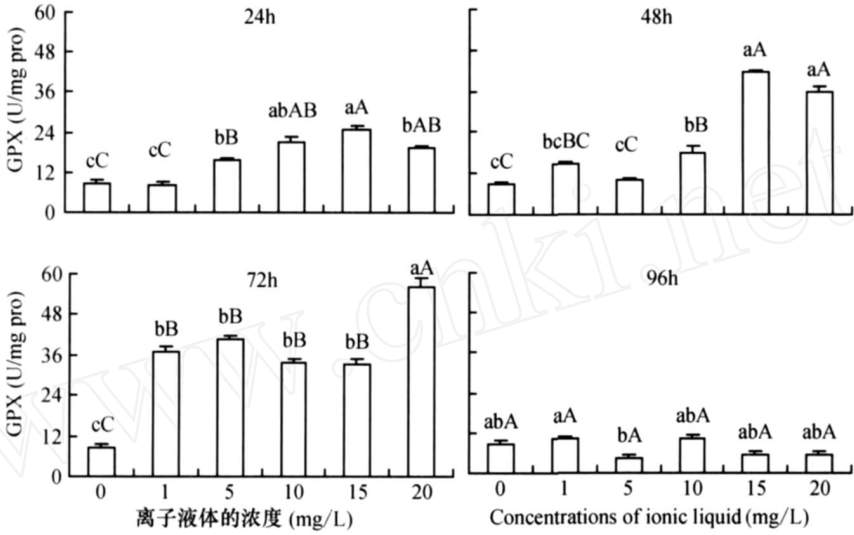


图2 不同时间[*C₆mim*]Br处理对斜生栅藻 GPX 活性的影响
Fig. 2 Effect of [*C₆mim*]Br on GPX activities of *S. obliquus* after exposure for different times(mean ± S. E.)

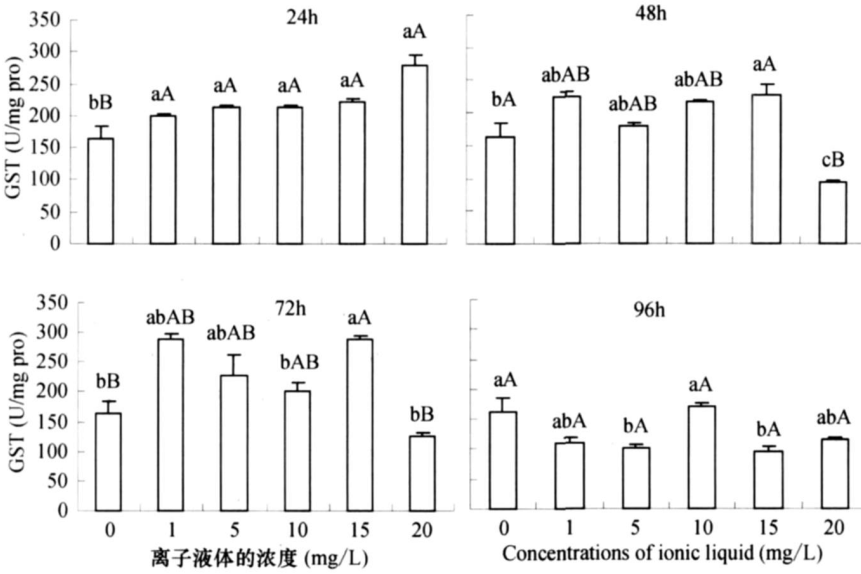


图3 不同时间[*C₆mim*]Br处理对斜生栅藻 GST 活性的影响
Fig. 3 Effect of [*C₆mim*]Br on GST activities of *S. obliquus* after exposure for different times(mean ± S. E.)

2.4 [*C₆mim*]Br对斜生栅藻 GR的影响

[*C₆mim*]Br处理 24h时, GR的活性在 1 mg/L 的处理浓度下已显著高于对照组,但之后随着处理浓度的增高波动中下降,但在 48h时又升至对照组水平;72h时, [*C₆mim*]Br ≥ 10 mg/L 的处理组的 GR 活性开始显著高于对照组;96h时, GR 的活性除在 [*C₆mim*]Br = 1 mg/L 时显著高于对照组外,之后随着处理浓度的升高而降低 (图 4)。

3 讨论

3.1 [*C₆mim*]Br胁迫前期 GSH循环系统的作用机制

GSH循环系统是细胞中重要的抗氧化防御系统之一,作为 GSH系统重要成员之一的 GSH,因含有巯基而被用作还原剂,在维持细胞内环境的氧化还原平衡中有重要的作用^[23,24]。本研究表明,24h 的

[C₆mim]Br处理,引起了斜生栅藻的 GSH 含量显著降低,且表现出明显的剂量效应关系,说明随着 [C₆mim]Br胁迫强度的增加,藻细胞内发生了强烈的氧化反应。有文献指出在逆境条件下 GSH 的氧化产物 GSSG有显著的升高现象^[25],这是氧化应激的一个极为敏感的反应^[26],可引起 GSH 含量的降低,这与本试验的结果吻合。同期的 GPX和 GST活性均显著高于对照组,说明 [C₆mim]Br对斜生栅藻已造成了氧化胁迫,诱导了抗氧化酶 GPX和 GST活性的显著升

高和其底物 GSH 含量的降低;该期 GST活性最高,对氧化胁迫的敏感性最大,表明它是斜生栅藻抗氧化防御系统中的重要酶。高的 GSH /GSSG比率是维持最佳的蛋白质合成条件所必需的^[24]。本试验中 GSH 含量的减少显然对藻细胞不利,在一定程度上诱导 GR活性的增加,但 24h时的 GR活性总体上是最低的,说明 GR活性的诱导在氧化与抗氧化反应中有一定的延迟性。

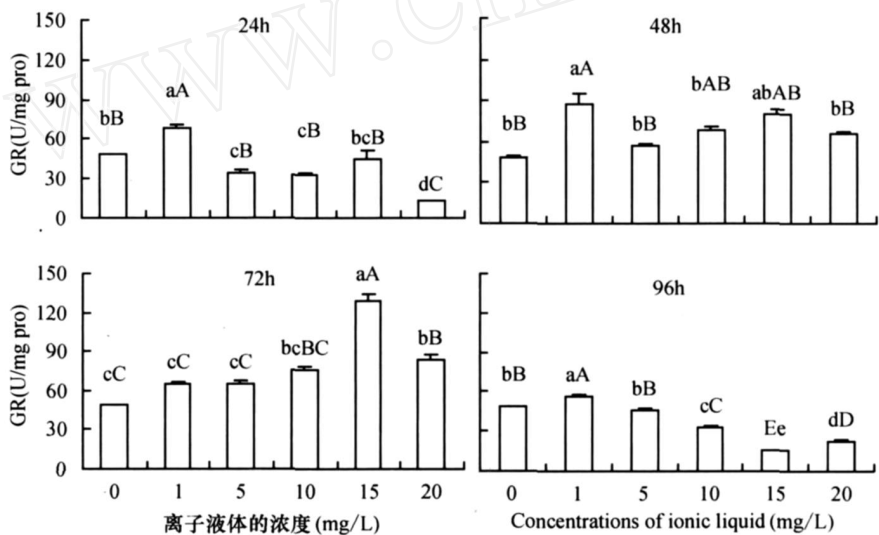


图 4 不同时间 [C₆mim]Br处理对斜生栅藻 GR活性的影响

Fig. 4 Effect of [C₆mim]Br on GR activities of *S. obliquus* after exposure for different times(mean ±S. E.)

3.2 [C₆mim]Br胁迫中期 GSH循环系统的作用机制

逆境胁迫可引起 ROS的显著增高^[27]。GPX、GST和 GR的活性在 [C₆mim]Br处理 48h和 72h时均明显增大,并在 72h时达到最高。表明此时藻细胞因胁迫而引起的氧化胁迫已经达到了较高的水平,消耗 GSH的 GST和 GPX与形成 GSH的 GR均处在高度活跃状态,但该期 GSH 含量仍处于降低趋势,说明 GR的作用仍不足以弥补藻细胞抗氧化反应所动员的 GSH 总量,此时藻细胞中的氧化与抗氧化系统处于平衡略偏氧化的状态。

3.3 [C₆mim]Br胁迫后期 GSH循环系统的作用机制

96h时 GPX和 GST活性较前期均显著降低,恢复至正常水平或略低于正常值,而 GR在低浓度胁迫 (1 mg/L)时显著高于对照,但随胁迫浓度的增高而显著降低, GSH 水平维持在较高的水平,说明

[C₆mim]Br的胁迫已经造成抗氧化防御系统的损伤,产生的大量氧自由基,已超出了抗氧化酶的解毒能力,从而改变了细胞内环境的氧化还原电位或者调节了酶的活性中心^[28,29];同时也表明 GR对 [C₆mim]Br具有较强的耐性。综合酶活性在各个时间段及各处理浓度下的变化可知: GR是 GSH 循环系统中的限速酶。

以上说明:面对 [C₆mim]Br的胁迫, GSH的循环酶对斜生栅藻的抗氧化防御做出了重要的贡献,但仍未完全阻止实质性损伤的发生。这与 [C₆mim]Br对斜生栅藻的急性毒性结果 (EC₅₀) (另文发表)以及对初级生产力、SOD、CAT、MDA 的影响是一致的^[30]。

本实验从谷胱甘肽循环酶及其动态变化 (抗氧化系统)的角度出发,证明了 1 mg/L 的 [C₆mim]Br在 96h内可对斜生栅藻造成一定程度的氧化损伤,显示出其环境毒性。故在使用时应采取有效的措施,尽量避免或减少其在环境中的排放。

4 结 论

综合以上的结果可知：(1)斜生栅藻在受到 [C₆mim]B 的作用时,在 72h 之前, GST 和 GPX 活性先期均明显升高,略后 GR 的活性也明显升高, 96h 时三种酶的活性均下降至对照水平上下, GSH 含量始终低于对照,藻细胞受到氧化胁迫; (2) GST 是斜生栅藻抗氧化系统中活性和灵敏性最高的酶,在斜生栅藻抵御 [C₆mim]Br 引起氧化损伤的初期发挥重要作用,可作为 [C₆mim]Br 胁迫时的敏感的生物标志物; (3) GR 是 GSH 循环系统中的限速酶,并且对 [C₆mim]Br 胁迫表现出较强的耐性。 (4) [C₆mim]Br 具有一定的环境毒性。

参考文献:

- [1] Brennecke J F, Maginn E J. Ionic Liquids: Innovative Fluids for Chemical Processing [J]. *AIChE J*, 2001, **47**: 2384—2389
- [2] Swatoski R P, Holbrey J D, Menon S B, *et al* Using *Caenorhabditis elegans* to probe toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride based ionic liquids [J]. *Chem Commun*, 2004, 668—669
- [3] Stepnowski P, Skladanowski A C, Ludwiczak A, *et al* Evaluating the cytotoxicity of ionic liquids using human cell line Hela [J]. *Human Exp Toxicol*, 2004, **23**: 513—517
- [4] Ranke J, Mölter K, Stock F, *et al* Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WT-1 cell viability assays [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2004, **58**: 396—404
- [5] Docherty KM, Kulpa C F Jr. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids [J]. *Green Chem*, 2005, **7**: 185—189
- [6] Couling D J, Bemot R J, Docherty KM, *et al* Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure-property relationship modeling [J]. *Green Chem*, 2006, **8**: 82—90
- [7] EN. Water quality, freshwater algal growth-inhibition tests with *Senedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum* (ISO 10253, 1993). European Committee for Standardization, Brussels
- [8] Kobraei M E, White D S. Effects of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid on Kentucky algae: simultaneous laboratory and field toxicity testings [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1996, **31**: 571—580
- [9] Lewis M A. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review [J]. *Environ Pollut*, 1995, **87**: 319—336
- [10] Ma J Y, Zheng R, Xu L, *et al* Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* to 12 pesticides [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2002, **52**: 57—61
- [11] Xiong L, Wu Z B, Kuang Q J, *et al* Studies on the toxicity of cypemethrin to *Scenedesmus obliquus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(1): 66—73 [熊丽, 吴振斌, 况琪军, 等. 氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性研究. 水生生物学报, 2002, **26**(1): 66—73]
- [12] Rennenberg H, Brunold C. Significance of glutathione metabolism in plants under stress [J]. *Prog Bot*, 1994, **55**: 142—156
- [13] Venugopal N B R K, Ramch S T V D D, Reddy D S, *et al* Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, *Barytelphisa nuerini* [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1997, **59**: 132—138
- [14] Gensemer R W, Dixon D G, Greenberg B M. Using chlorophyll a fluorescence to detect the onset of anthracene photoinduced toxicity in *Lemna gibba*, and the mitigating effects of a commercial humic acid [J]. *Limnol Oceanogr*, 1999, **44**(322): 878—888
- [15] Parr L B, Perkins R G, Mason C F. Reduction in photosynthesis efficiency of *Chladophora glomerata* induced by overlying canopies of *Lemna sp1* [J]. *Water Res*, 2002, **36**: 1735—1742
- [16] Pemak J, Goc I, Mirska I. Antimicrobial activities of protic ionic liquids with lactate anion [J]. *Green Chem*, 2004, **6**: 323—329
- [17] Cho C W, Jeon Y C, Pham T P T, Vijayaraghavan K, Yun Y S. The ecotoxicity of ionic liquids and traditional organic solvents on microalga *Selenastrum capricornutum* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008, **71**: 166—171
- [18] Bonhôte P, Dias A P, Papageorgiou N, *et al* Hydrophobic highly conductive ambient-temperature molten salts [J]. *Inorg Chem*, 1996, **35**: 1168—1178
- [19] Fawell J K, Mitchell R E, Everett D J, *et al* The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR [J]. *Human Exp Toxicol*, 1999, **18**: 162—167
- [20] Bradford M N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248—255
- [21] Pang Z J, Zhou M, Chen Y. Research method of free radical iat-rology [M]. Beijing: People Sanitation Press 2000, 168—169 [庞占军, 周玫, 陈媛. 自由基医学研究方法. 北京: 人民卫生出版社. 2000, 168—169]
- [22] Li C X, Jiang L N, Shao Y, *et al* Biostatistics (the third edition) [M]. Beijing: Science Press 2005, 100 [李春喜, 姜丽娜, 邵云, 等. 生物统计学 (第三版). 北京: 科学出版社. 2005, 100]
- [23] Potter D W, Tran T B. Apparent rates of glutathione turnover in rat tissues [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993, **120**: 186—192
- [24] Nagalakshmi N, Prasad M N V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus* [J]. *Plant Science*, 2001, **160**: 291—299
- [25] Ziong X, Shijun B. Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2007, **67**: 89—94
- [26] Sen C K. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements [J]. *Mol Cell Biochem*, 1999, **196**: 31—42

- [27] Wang Y, Chen Y G, Ge Z Z, *et al* Influence of TBT on ROS, antioxidant enzymes and detoxification system enzyme in rat liver [J]. *China Environmental Science*, 2005, 25 (4): 428—431 [王燕, 陈永刚, 葛郑增, 等. TBT对大鼠 ROS、抗氧化酶和解毒系统酶的影响. 中国环境科学, 2005, 25 (4): 428—431]
- [28] Ji L, Stratan FW, Lardy H A. Enzymatic down regulation with exercise in rat skeletal muscke [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1988, 263: 137—145
- [29] Haberland A, Mader K, Stösser R, *et al* Comparison of malondialdehyde and hydrogen peroxide modified CuZnSOD by EPR spectroscopy [J]. *Agents Actions*, 1993, 40: 166—170
- [30] Ma JM, Cai L L, Jin T X, *et al* Effects of 1-hexyl-3-methylimidazolium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Scenedesmus obliquus* [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2008, 26 (5): 509—513 [马剑敏, 蔡林林, 靳同霞, 等. 溴化 1-己基-3-甲基咪唑对斜生栅藻抗氧化酶和膜脂过氧化的影响. 武汉植物学研究, 2008, 26 (5): 509—513]

RESPONSES OF GLUTATHIONE CYCLE ENZYMES AND GLUTATHIONE METABOLISM TO 1-HEXYL-3-METHYLIMIDAZOLIUM STRESS IN SCENEDESMUS OBLIQUUS

MA Jian-Min^{1,2}, CAI Lin-Lin¹, HU Ling-Wei¹, JIN Tong-Xia¹, LI Xiao-Yu¹ and WANG Jian-Ji²

(1. School of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Henan Key Laboratory for Environmental Pollution Control, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The effects of ionic liquid 1-hexyl-3-methylimidazolium ($[C_6mim]Br$), with the concentrations of 0, 1, 5, 10, 15 and 20 mg/L and exposed for the 24, 48, 72 and 96h respectively, on glutathione (GSH) and the enzymes in glutathione metabolism of *Scenedesmus obliquus* such as glutathione peroxidase (GPX), glutathione S-transferases (GST) and glutathione reductase (GR) were studied in the present study. The results indicated that the GSH contents decreased with the concentration of $[C_6mim]Br$ increasing at the 24, 48 and 72h, but it did not change when $[C_6mim]Br = 1mg/L$. The GSH contents were similar to or lower than that of the control level at the 96h. The activities of GPX and GST increased markedly before 72h except for the activity of GST at the highest concentration (20 mg/L), but they both decreased to the control level at the 96h. The activities of GR increased at the concentration of 1 mg/L and then decreased with the concentration increasing at the 24h, increased to the control level at the 48h, and then reached its peak at the 72h (when $[C_6mim]Br \geq 10 mg/L$ the GR activities exceeded the control level), but at the 96h, it decreased markedly even weaker than the control level. GR was the enzyme that limited the reaction velocity in the system of glutathione cycle and the GST was the most active and sensitive enzyme. It could be used as sensitive biomarkers under the stress induced by $[C_6mim]Br$. $[C_6mim]Br$ induced oxidative stress of *S. obliquus* at the concentration of 1 mg/L and had environmental toxicity.

Key words: Ionic liquid; *Scenedesmus obliquus*; Glutathione; Glutathione S-transferases; Glutathione peroxidase; Glutathione reductase