

外源 DMSO 和 ASA 对微囊藻毒素胁迫下烟草细胞 ROS 生成和抗氧化系统的影响

黄文敏^{1,2} 邢伟³ 李敦海¹ 刘永定¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 采用 2 $\mu\text{g/mL}$ 微囊藻毒素-RR(MC-RR)、2 $\mu\text{g/mL}$ MC-RR + 0.5% 二甲基亚砜(DMSO)和 2 $\mu\text{g/mL}$ MC-RR + 2 mmol/L 抗坏血酸(ASA)分别处理烟草悬浮细胞, 研究上述各处理对烟草悬浮细胞活性氧(ROS)产生和抗氧化系统的影响。结果表明, 与对照相比, MC-RR 单独处理后烟草悬浮细胞中 ROS、膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)和细胞内源 ASA 的含量及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)的活性明显升高, 还原型谷胱甘肽(GSH)的含量有一个先降后升的变化过程。在分别加入外源抗氧化剂 DMSO 或 ASA 后, 细胞内 ROS 和 MDA 含量下降, ASA、GSH 含量和 SOD、POD 酶活性基本可恢复到对照水平。以上结果说明, 微囊藻毒素单独处理细胞可造成氧化胁迫, 其所诱导的 ROS 的大量积累很可能是其产生细胞毒害的关键因子, 外源抗氧化剂 ASA 和 DMSO 可缓解 MC-RR 对细胞的毒害作用, 对细胞起一定保护作用。

关键词: 微囊藻毒素-RR; 烟草悬浮细胞; 活性氧; 抗氧化系统; ASA; DMSO

中图分类号: Q26 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)06-0869-05

近年来水体富营养化已成为一个备受关注的环境问题, 过量的氮、磷营养使藻类过度增殖而形成水华。藻毒素的产生是蓝藻水华污染所带来的主要危害之一。在已发现的各种藻毒素中, 微囊藻毒素的毒性较大, 危害也最严重。铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、鱼腥藻(*Anabaena*)和颤藻(*Oscillatoria*)等是产生微囊藻毒素的主要藻类^[1]。在淡水中目前已发现了 60 多种微囊藻毒素(MC), 其基本结构是由 7 个氨基酸组成的环状多肽。目前对微囊藻毒素作用高等植物的毒性机制的比较经典的解释是, MC 可抑制蛋白磷酸酶 1 和 2A (PP1 和 PP2A) 的活性, 从而解除 PP1 和 PP2A 对细胞增殖的正常的制动作用^[2]。但近年来, 有研究发现, MC 毒性作用与生物体内活性氧水平及其诱发的脂质过氧化水平相关^[3]。Pflugmacher 等研究发现 MC-LR 可以对大型水生植物金鱼藻产生氧化胁迫^[4]; 尹黎燕等研究发现 MC-RR 处理烟草悬浮细胞后可以显著提高细胞内活性氧(ROS)的含量^[5]; 胡智泉等研究发现用 MC-RR 处理细长聚球藻后, ROS 含量在整个测试阶段都维持较高水平^[6]。

目前已经陆续见到外源抗氧化剂处理可提高微囊藻毒素胁迫下动物体内活性氧清除能力的报道。Pinho 等发现用维生素 E 预处理螃蟹后, 可以减轻微囊藻毒素对螃蟹腮的氧化压力^[7]; Žegura 等研究发现还原型谷胱甘肽(GSH)可以抑制 MC 处理后 HepG2 细胞内 ROS 的形成和 DNA 损伤^[8]。但外源抗氧化剂对微囊藻毒素胁迫下的植物细胞的影响, 至今尚未见报道。抗坏血酸(ASA)作为生物体内一种重要的抗氧化剂, 它可与单线态氧、超氧化物、 H_2O_2 等自发反应, 缓解氧化压力。二甲基亚砜(DMSO)在细胞中可与内源性的羟自由基靶分子相竞争, 从而减轻羟自由基的危害。本实验用外源抗氧化剂 ASA、DMSO 分别处理烟草悬浮细胞, 比较毒素胁迫下加入与缺失外源抗氧化剂时细胞内 ROS 生成及活性氧清除系统的变化, 以明确外源抗氧化剂对毒素胁迫下烟草细胞的作用, 并进一步论证 MC 对烟草细胞的氧化胁迫机制。

1 材料与方法

1.1 烟草悬浮细胞的培养 烟草悬浮细胞

收稿日期: 2005-12-05; 修订日期: 2007-01-22

基金项目: 973 项目 2002CB412300; 863 项目 2005AA601010; 淡水生态与生物技术国家重点实验室资助

作者简介: 黄文敏(1982—), 女, 湖北天门人; 在读博士研究生; 主要从事微囊藻毒素与植物相互作用关系的研究。E-mail: huangwm@ihb.ac.cn

通讯作者: 刘永定, E-mail: liuyd@ihb.ac.cn

(*Nicotiana. tabacum* L. cv. Bright Yellow 2)在改良的MS液体培养基(MS盐, 0.5 mg/L肌醇, 1.3 mg/L维生素B1, 200 mg/L KH_2PO_4 和3%(W/V)蔗糖, 0.2 mg/L 2, 4-D和0.1 ng/L激动素)中培养, 调节培养基pH至5.8. 将细胞放置在摇床中振荡培养, 摇床设置为振荡速度130 r/min, 温度(25±1)℃, 24h黑暗.

1.2 微囊藻毒素 MC-RR 的获得 称取一定量的干藻粉, 加入5%冰醋酸室温下搅拌抽提3h, 所得提取液8000 r/min离心30min, 取出上清液置瓶中待用. 残渣按上述方法重复提取2次, 将3次提取上清液合并, 过自制C18柱, 将90%甲醇洗脱液在旋转蒸发仪上蒸发至干, 所得干粉即为微囊藻毒素粗提物, 用一定体积纯甲醇溶解后由制备型HPLC进行纯化, 然后分析定量.

1.3 实验设计 实验共设以下3个处理和正常对照. 实验处理1: 2 μg/mL MC-RR, 具体染毒方式为: 在改良MS液体培养基中加入经抽滤灭菌的MC-RR, 使其终浓度为2 μg/mL. 处理2: 0.5% DMSO + 2 μg/mL MC-RR, 具体染毒方式为: 在改良MS液体培养基中加入经抽滤灭菌的MC-RR和经高压灭菌的DMSO, 使其终浓度分别为2 μg/mL和0.5%. 处理3: 2 mmol/L ASA + 2 μg/mL MC-RR, 具体染毒方式为: 在改良MS液体培养基中加入经抽滤灭菌的MC-RR和ASA, 使其终浓度分别为2 μg/mL和2 mmol/L. 以正常的培养基为对照. 各处理及对照分别设置3个平行. 取对数生长期的烟草细胞接种于上述各处理及对照培养基中, 按上述1.2中的方法进行培养, 每天取样对下述指标进行测定.

1.4 检测方法 ROS含量测定利用荧光探针DCFH-DA进行检测^[9]; 膜脂过氧化产物MDA含量测定采用TBA法^[10]; SOD酶活测定参照Prochazkova^[11]和李合生^[12]的方法; POD酶活测定参照李合生^[12]的方法; ASA含量的测定参照陈建勋等^[13]的方法; GSH含量的测定参照Griffith^[14]和李合生^[12]的方法; 可溶性蛋白质含量的测定使用考马斯亮蓝G-250法, 以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白.

1.5 数据处理 实验结果表示为平均数±标准误差. 采用SPSS统计软件对数据进行One-Way ANOVA检验分析.

2 结果

2.1 各处理对烟草悬浮细胞 ROS 生成的影响

由图1可见, 在整个实验周期期间, 各处理ROS的含量变化很相似, 都呈先降低再升高的趋势. 四

组ROS含量在处理的0—4d相差不大, 到第五天时, MC-RR组ROS含量开始明显上升, 而对照组、MC-RR+DMSO组和MC-RR+ASA组ROS含量则维持在较低水平.

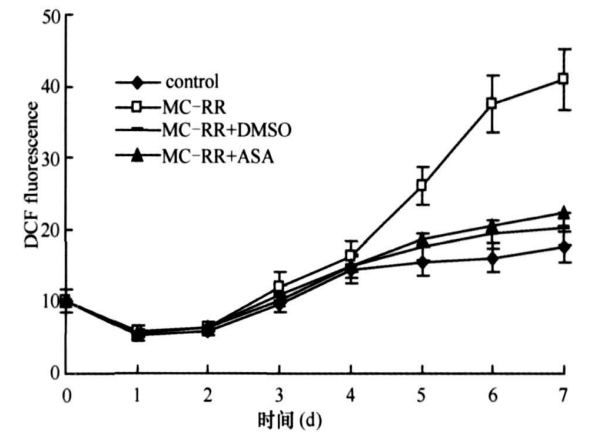


图1 各处理对烟草悬浮细胞 ROS 含量的影响
Fig 1 Effects of different treatments on ROS content in tobacco BY-2 suspension cells

2.2 各处理对烟草悬浮细胞 MDA 含量的影响

由图2可见, 在实验周期的0—3d, 各处理组间MDA含量相差不大, 到第五天时, MC-RR组MDA含量开始急剧增加, MC-RR+DMSO组和MC-RR+ASA组的MDA含量也有所上升, 但低于MC-RR组MDA含量. 到实验结束时, MC-RR组MDA含量显著高于MC-RR+DMSO组和MC-RR+ASA组的MDA含量.

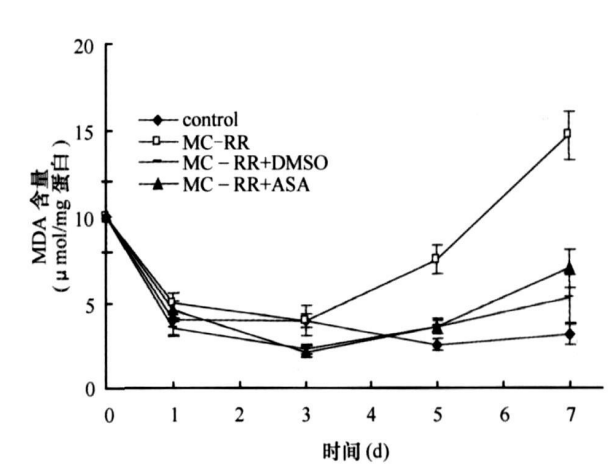


图2 各处理对烟草悬浮细胞 MDA 含量的影响
Fig 2 Effects of different treatments on MDA content in tobacco BY-2 suspension cells

2.3 各处理对烟草悬浮细胞 SOD 酶活性的影响

由图3可见, 各处理组在0—5d时酶活性相差很小, 到第六天时, MC-RR组SOD酶活性与对照组

相比大幅度升高,MC-RR+ASA 组和 MC-RR+DMSO 组 SOD 酶活性与对照相比也略有所上升,但活性最终低于 MC-RR 处理组 SOD 酶活性。

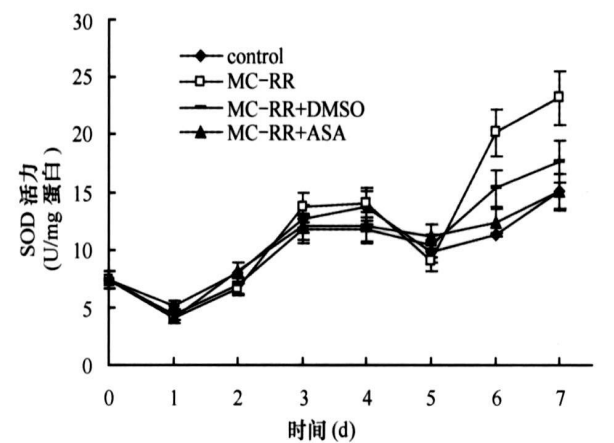


图3 各处理对烟草悬浮细胞 SOD 酶活性的影响
Fig. 3 Effects of different treatments on SOD activity in tobacco BY-2 suspension cells

2.4 各处理对烟草悬浮细胞 POD 酶活性的影响

在整个实验周期中,MC-RR 组 POD 酶活性一直高于对照,到第六天时表现出显著性差异(图 4)。MC-RR+DMSO 组和 MC-RR+ASA 组 POD 活性在 0—5d 时与对照组接近,第六天开始略有升高,不过与对照组相比,没有显著性差异。到实验结束时,加入外源抗氧化剂的两组 POD 酶活性仍低于 MC-RR 处理组。

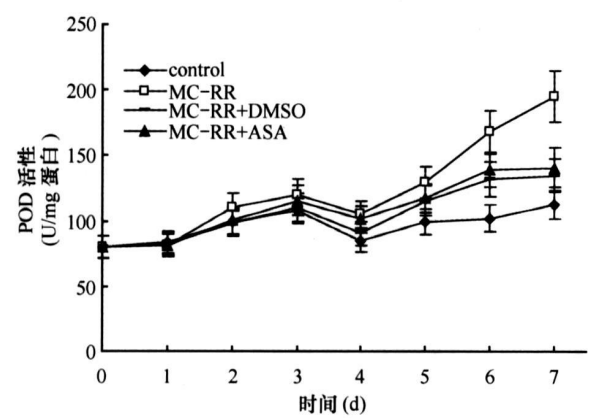


图4 各处理对烟草悬浮细胞 POD 酶活性的影响
Fig. 4 Effects of different treatments on POD activity in tobacco BY-2 suspension cells

2.5 各处理对烟草悬浮细胞 GSH 含量的影响

由图 5 可见,各组 GSH 含量变化都呈现出先降低再升高又降低再升高的变化趋势。四组 GSH 含量到第五天时开始出现差异,MC-RR 组 GSH 含量大

幅度上升,第六天时显著高于对照;MC-RR+DMSO 组和 MC-RR+ASA 组的 GSH 含量略高于对照组(无显著性差异),远低于 MC-RR 组 GSH 含量。

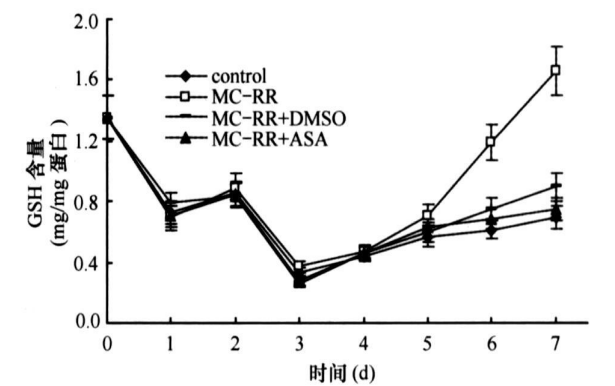


图5 各处理对烟草悬浮细胞 GSH 含量的影响
Fig. 5 Effects of different treatments on GSH content in tobacco BY-2 suspension cells

2.6 各处理对烟草悬浮细胞内源 ASA 含量的影响

由图 6 可见,到第五天时,MC-RR 组内源 ASA 含量开始上升,远高于对照组;MC-RR+ASA 组内源 ASA 含量一直维持在较稳定水平;MC-RR+DMSO 组 ASA 含量在实验结束时有小幅度上升,不过在实验结束时仍远低于 MC-RR 组 ASA 含量。

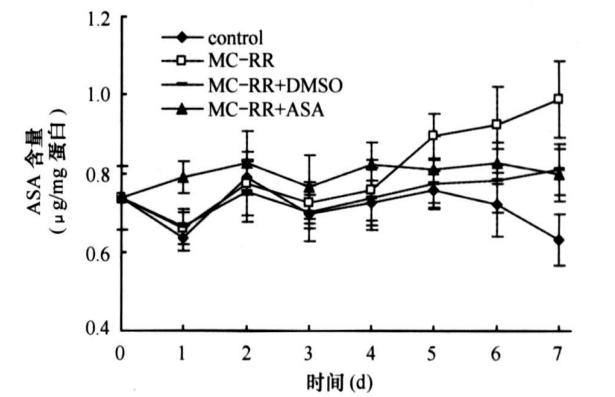


图6 各处理对烟草悬浮细胞内源 ASA 含量的影响
Fig. 6 Effects of different treatments on ASA content in tobacco BY-2 suspension cells

3 讨论

在正常情况下,植物细胞内 ROS 的产生和清除是平衡的。但是,当植物体遭受外来胁迫时,ROS 的产生和清除则失去平衡,会产生过量的 ROS,导致氧胁迫^[15]。在本实验中,当刚接种时,ROS 含量很高,可能是由于环境的变化,细胞还不能适应,胞体内代谢失去平衡产生了较多 ROS。第二天后,ROS

含量略有下降,此后对照组 ROS 含量缓慢升高,MC-RR 处理组细胞从第四天时 ROS 含量急剧上升。这表明细胞内氧化与抗氧化失去平衡,ROS 开始大量积累。ROS 能与细胞内各种生物大分子起反应,导致 DNA、蛋白质的伤害和脂质的过氧化。MC-RR+DMSO 组和 MC-RR+ASA 组 ROS 含量在实验后期也有小幅度上升,不过最终含量低于 MC-RR 组,表明 ASA 和 DMSO 可以一定程度的清除掉过量积累的 ROS,维持细胞内 ROS 在较低水平,缓解 MC-RR 诱导的氧化胁迫,避免细胞内 DNA、蛋白质受到伤害,使细胞可以正常的生长分裂。膜脂过氧化是毒素诱导氧化损伤的另一个表征^[19]。本实验中对照组 MDA 含量一直在较低范围内波动,MC-RR 组 MDA 含量在第五天时开始大幅度升高,其出现增长高峰的时间要慢于 ROS 的积累高峰,这与 Ding 报道的一致^[7],MC 先诱导了 ROS 的生成,随后 ROS 导致膜脂过氧化,促使 MDA 大量生成。MC-RR+DMSO 组和 MC-RR+ASA 组 MDA 含量基本可恢复到对照组水平,表明一定浓度的外源抗氧化剂 ASA、DMSO 能减轻氧化胁迫导致的膜脂过氧化作用。

针对 MC-RR 诱导产生的大量 ROS,细胞也做出了氧化应激反应,启动了抗氧化防御系统。在本实验中作者主要检测了两种抗氧化酶 SOD 和 POD 及两种抗氧化剂 GSH 和 ASA 的变化情况。SOD 主要催化两分子的 O_2^{2-} 形成一个分子 H_2O_2 和 1 个分子 O_2 ,POD 是清除 H_2O_2 的重要保护酶。它们的共同作用是把体内具有潜在危害的 O_2^{2-} 和 H_2O_2 转化为无害的 H_2O 和 O_2 ,从而有效地阻止 H_2O_2 在体内积累,使细胞内自由基维持在较低水平,防止细胞受自由基的毒害。在本实验后期,MC-RR 组 SOD 和 POD 酶活性都显著上升,远高于对照,分析原因为细胞暴露于微囊藻毒素之后,活性氧被诱导大量产生,膜脂过氧化作用增强,胞内过氧化物浓度增加,SOD、POD 的底物浓度增加,从而诱导 POD 酶、SOD 酶活性上升。MC-RR+DMSO 组和 MC-RR+ASA 组 SOD 和 POD 酶的活性在实验后期也有小幅度上升,不过与对照相比无显著差异。与前面分析结果相联系,加入的外源抗氧化剂 ASA 和 DMSO 清除了胞内一部分 ROS,使胞内过氧化物的积累相应减少,酶作用底物浓度降低,酶活也相应降低。

GSH 是细胞内重要的抗氧化剂,它具有多重生物学功能。一方面,GSH 可直接与 OH^\cdot 、 $HOCl$ 等自由基反应,另一方面,GSH 还可在 GST 转移酶的作用下与有毒物质结合进而解毒。ASA 可与单线态

氧、超氧化物、 H_2O_2 自发反应,维持体内活性氧的平衡。本实验中从刚接种到第一天 GSH 含量有一个快速下降的过程,与 ROS 变化情况相联系,我们可推测 GSH 是由于参与了 ROS 的清除活动而导致其含量快速减少。MC-RR 处理组细胞 GSH 含量在第五天时急剧上升,远高于对照,推测是细胞在应激状态下主动产生大量 GSH 来清除 MC-RR 诱导产生的高浓度 ROS。MC-RR+DMSO 组和 MC-RR+ASA 组的 GSH 和 ASA 含量介于对照组和 MC-RR 组之间,推测加入外源抗氧化剂后,细胞可能不用应激产生大量的内源抗氧化剂来清除活性氧。总之,从细胞活性氧的产生和抗氧化系统的反应来看,一定浓度的 MC-RR 确实对烟草细胞产生了氧化胁迫,而适当浓度的外源抗氧化剂 ASA 和 DMSO 可减少 ROS 的积累并减弱细胞的氧化应激反应,这更进一步地说明了微囊藻毒素的毒性氧化损伤是相关的,其中 ROS 可能是 MC-RR 导致细胞氧化损伤的重要因素。致谢:

在提取毒素的过程中得到本所陈伟博士、武汉植物所尹黎燕博士的帮助和指导,在仪器使用时得到本所宋立荣老师和周炳升老师的支持和帮助,在此一并表示感谢!

参考文献:

- [1] Yan H, Pan G, Zhang M M. Advances in the study of microcystin toxin [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(11): 1968—1975 [闫海, 潘纲, 张明明. 微囊藻毒素研究进展. 生态学报, 2002, 22(11): 1968—1975]
- [2] Mackintosh C, Beattie K A, Klunpp S, *et al*. Cyanobacterial microcystin-LR is a protein and specific inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A from both mammals and higher plants [J]. *FEBS Letters*, 1990, 264: 187—192
- [3] Ding W X, Shen H M, Zhu H G, *et al*. Hepatotoxicity and formation of reactive oxygen species induced by microcystin aeruginosa toxin [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 1998, 32(5): 278—280 [丁文兴, 沈汉明, 朱惠刚, 等. 铜绿微囊藻毒素的肝细胞毒性及活性氧生成作用. 中华预防医学杂志, 1998, 32(5): 278—280]
- [4] Pflugmacher S. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 70(3): 169—78
- [5] Yin L Y, Huang J Q, Shen Q, *et al*. Responses of antioxidant systems in tobacco BY-2 suspension cells to the toxicity of microcystin-LR [J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(5): 576—580 [尹黎燕, 黄家权, 沈强, 等. 烟草悬浮细胞抗氧化系统对微囊藻毒素的响应. 中国环境科学, 2005, 25(5): 576—580]
- [6] Hu Z Q, Liu Y D. Accumulation of microcystin-LR in *Synechococcus elongatus* and its toxic effects [J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(1): 23—27 [胡智泉, 刘永定. 微囊藻毒素在细长聚球

- 藻中的积累及其毒性效应. 中国环境科学, 2005, **25**(1): 23—27]
- [7] Pinho G L L, Moura da Rosa C, Maciel F E, *et al.* Antioxidant responses after microcystin exposure in gills of an estuarine crab species pre-treated with vitamin E [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, **61**(3): 361—365
- [8] Žegura B, Tamara T L and Filipic M. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage [J]. *Toxicology*, 2004, **200**(1): 59—68
- [9] He Y Y and 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]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2002, **66**(2): 115—124
- [10] Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test [J]. *Analytical Biochemistry*, 1978, **86**(1): 271—278
- [11] Prochazkova D, Sairam R K, Srivastava G C, *et al.* Single oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves [J]. *Plant Science*, 2001, **161**(4): 765—771
- [12] Li H S. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000, 260—261, 167—169 [李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000, 260—261, 167—169]
- [13] Chen J X, Wang X F. Guides of plant physiological experiment [M]. Guang Zhou: South China University of Technology Press, 2002, 125—126 [陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导. 广州: 华南理工大学出版社, 2002, 125—126]
- [14] Griffith O. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine [J]. *Analytical Biochemistry*, 1980, **106**(1): 207—212
- [15] Neill S J, Desikan R, Clarke A, *et al.* Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, **53**: 1237—1247
- [16] Ferrat L, Pergent-Martini C, Roméo M. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: applications to seagrasses [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, **65**(2): 187—204
- [17] Ding W X, Ong C N. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, **220**(1): 1—7

EFFECTS OF EXOGENOUS DMSO AND ASA ON FORMATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND ANTIOXIDANT SYSTEMS OF TOBACCO SUSPENSION CELLS UNDER MC-RR STRESS

HUANG Wen-Min^{1,2}, XING Wei³, LI Dun-Hai¹ and LIU Yong-Ding¹

(1. *Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039*
3. *Wuhan Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074*)

Abstract: Microcystins are a family of toxins produced by freshwater cyanobacteria. They are cyclic heptapeptides, composed of seven amino acids. They exert a toxic effect by being specific inhibitors of the protein phosphatases 1 and 2A (PP1 and PP2A), but recent evidences also indicate its potential to generate oxidative stress. Oxidative stress is a general term used to describe the steady state level of oxidative damage in cells, tissues, or organs, caused by the reactive oxygen species (ROS). In this experiment, the toxic mechanism of MC-RR inducing oxidative stress was evaluated in tobacco BY-2 suspension cells. Changes of ROS formation and antioxidant system of tobacco BY-2 suspension cells were studied under the treatment of 2 μ g/mL MC-RR, 2 μ g/mL MC-RR + 0.5% DMSO and 2 μ g/mL MC-RR + 2 mmol/L ASA. Under the treatment of 2 μ g/mL MC-RR, the contents of ROS, MDA and ASA as well as the activities of SOD and POD were higher than those in control after 5 days treatment. GSH content first decreased and then increased, and at the 6th day of treatment GSH content significantly increased compared with the control. The abundant accumulation of ROS and the change of antioxidant system both indicated that the cells suffered from oxidative stress induced by MC-RR. ROS may play an important role in its toxic effect on the cells. The MC-RR-induced oxidative stress in cells was further confirmed by exposing the cells to MC-RR in the presence of two ROS scavengers, ASA or DMSO. ASA has significant capacity of scavenging O_2^- and H_2O_2 , and DMSO is a kind of hydroxyl radical scavengers. When tobacco BY-2 suspension cells were exposed to 2 μ g/mL MC-RR with 0.5% DMSO or 2 mmol/L ASA, the formation of ROS and MDA were prevented and the contents of GSH, ASA and activities of SOD and POD all decreased in contrast to MC-RR treatment. It concluded that tobacco BY-2 suspension cells suffered oxidative stress after MC-RR treatment and the exogenous ASA and DMSO can protect the cells from MC-RR induced oxidative stress.

Key words: Microcystin-RR; Tobacco BY-2 suspension cells; Reactive oxygen species; Antioxidant system; ASA; DMSO