

# 栅藻对金属离子的异质敏感性与其细胞周期的关系

于洋<sup>1,2</sup>, 孔繁翔<sup>1\*</sup>, 史小丽<sup>1</sup>

(1. 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008; 2. 南京大学环境学院环境污染与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093)

**摘要:** 研究同一种群中不同状态的藻细胞对毒物的应答对理解生物体敏感性以及毒物的致毒机理十分重要. 应用流式细胞技术研究了栅藻对重金属元素( $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$ ) 的敏感性. 将同一种群的栅藻细胞按其体积大小(FSC 参数) 分为不同组分, 在暴露于毒物后分析不同组分细胞的酯酶活性. 结果显示随着细胞体积的增加, 其对 2 种金属离子的抗性逐渐增强. 在分析各组分细胞的 DNA 量时发现栅藻的细胞大小与其所处的细胞周期具有一定关系: 随着体积的增大, 栅藻细胞逐渐从  $G_1$  期进入  $G_2/M$  期, 其中,  $G_2/M$  期的藻细胞对金属离子具有较强的抗性. 进一步表明处于不同的细胞周期可能是决定同一种群中栅藻细胞对金属离子具有不同敏感性的重要原因.

**关键词:** 栅藻; 异质敏感性; 酯酶活性; 细胞周期; 流式细胞技术

中图分类号: X524 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)06-1197-04

## Relationship of Heterogeneous Sensitivity to Metal Ion and Its Cell Cycle in *Scenedesmus obliquus*

YU Yang<sup>1,2</sup>, KONG Fan-xiang<sup>1</sup>, SHI Xiao-li<sup>1</sup>

(1. Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract:** It is important to investigate the effect of contamination on the heterogeneous cells characteristically observed within single algae species, which can be helpful to understand the sensitivity of organism and the toxicity mechanism. Flow cytometry was used to assess sensitivity to metal ion ( $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ ) in *Scenedesmus obliquus*. By determination of esterase activity in cell fractions gated by FSC (an indicator of the cell volume), it was shown that the resistance to metal ion was improved as the cell volume increased. By simultaneously examining FSC and DNA content, a relationship between the cell volume and the cell cycle stage was observed: as the cell volume increased, the *S. obliquus* cells changed from  $G_1$  phase to  $G_2/M$  phase. The cells in  $G_2/M$  phase had more resistance to metal ion. Thus, this observation indicate that the difference of cell cycle may be the important cause of heterogeneous sensitivity to metal ion in *S. obliquus*.

**Key words:** *Scenedesmus obliquus*; heterogeneous sensitivity; esterase activity; cell cycle; flow cytometry

藻类毒性试验被广泛的应用于评估水生态系统中污染物对生物的潜在影响. 目前标准测试方法所检测的往往是同一批细胞对污染物的综合效应, 对细胞间的差异几乎没有考虑. 在实验中其实存在着这样一个假设: 处于对数期的实验细胞均处于同样的生理状态及毒物敏感性, 尽管这样的假设事实上并不成立(例如不同细胞可能处于细胞的不同周期)<sup>[1,2]</sup>. 然而由于现有的检测条件限制, 很难将同一种群中具有异质性的藻细胞有效区分, 进而研究不同状态的藻细胞对毒物的应答机制, 国内外还未见此类的研究报道.

流式细胞技术(FCM)是一种对处在液流中的单个细胞同时进行多参数的快速定量分析和分选的方法, 操作过程简单且重复性好, 近来也逐渐应用于生态毒理学研究<sup>[3~6]</sup>. 传统毒性试验往往在整体水平上检测生物体对污染物的应答, 其结果可能是靶

细胞整体水平的变化信息只是来自于其中一部分靶细胞. 而 FCM 可以在单细胞水平上检测靶细胞在生理生化上细微的变化, 同时获得到数万个细胞的样本数据, 为研究种群异质性提供了基础. 本文应用流式细胞技术, 并以常用的毒性标志物酯酶作为指标, 对  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  暴露下栅藻种群中不同类型细胞的毒物敏感性进行了初步研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种及培养

实验所用斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)取自

收稿日期: 2005-06-16; 修订日期: 2005-07-19

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB412300); 中国科学院南京地理与湖泊研究所所长基金项目(S250016)

作者简介: 于洋(1976~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为分子生态毒理学, E-mail: nju\_yuyang@yahoo.com

\* 通讯联系人, E-mail: kongfx@jlonline.com

中国科学院南京地理与湖泊研究所, 采用水生 4 号培养基, 在 250 mL 的三角瓶中加入体积为 100 mL 的培养液, 培养温度为  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 光照为白色日光灯, 光照强度为  $1500\text{lx} \pm 500\text{lx}$ , 光暗比为 12/12, 静置培养, 每天定时振荡数次。

## 1.2 暴露实验

实验中所用的  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  为分析纯,  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  的浓度约为预实验中酯酶活性  $\text{EC}_{50}$  的浓度, 分别为:  $160\mu\text{g/L}$  和  $400\mu\text{g/L}$ , 无菌条件下取对数期细胞 2.5 mL,  $2500\text{r/min}$  离心 7 min, 重蒸馏水洗涤, 反复 3 次, 接入培养基中, 每个处理为 3 个平行。初始藻细胞密度为  $10^5$  个/mL, 于暴露后 4 h 定时取样用流式细胞仪测定。

## 1.3 藻细胞的体积、酯酶活性及细胞周期分析

### 1.3.1 藻细胞计数与细胞大小检测

应用流式细胞仪, 将非藻类颗粒或聚集细胞通过固有参数及叶绿素荧光 (FL3) 的差异去除。藻细胞在流式细胞图中的位置以侧向光散射 (SSC) 和叶绿素荧光确定。细胞计数使用双组分绝对计数小球 (CALTAG Counting Beads, Caltag Laboratories Inc., CA), 通过计算 2 种小球的比例判断其与藻细胞的混合均匀度, 以保证计数的精度。藻细胞体积大小以前向光散射 (FSC) 参数表征, 按细胞大小平均分为 8 个组分, 每个组分的细胞数不少于 1 000 个。

### 1.3.2 藻细胞的酯酶活性检测染色

通过 FDA (Fluorescein diacetate, Sigma) 染色方法对栅藻酯酶活性进行检测。将 FDA 用丙酮稀释到  $1\text{mmol/L}$ ,  $-18^{\circ}\text{C}$  保存。染色条件为: 温育时间 8~9 min, FDA 浓度为  $25\mu\text{mol/L}$ , 并加相同浓度丙酮作空白对照。细胞在暴露 4 h 后取样, 经 300 目滤膜过滤, 上流式细胞仪检测。单个细胞的平均酯酶活性以 FDA 荧光强度均值 (mean fluorescence intensity, MFI)<sup>[6,7]</sup> 表示。

### 1.3.3 藻细胞 DNA 检测染色

SYBR Green I (Molecular Probes) 用来对藻细胞的细胞周期进行分析<sup>[8,9]</sup>。1 mL 固定样品加入  $0.1\text{g/L}$  RNase (1:1 RNase A 和 B 的混合物, Sigma), 在  $37^{\circ}\text{C}$  下温育 30 min。加入  $0.9\text{mL}$  的柠檬酸钾 ( $30\text{mmol/L}$ ), 及  $20\mu\text{L}$  的 SYBR Green I ( $1\%$ , 溶于 DMSO), 黑暗避光 20 min。上流式细胞仪检测 SYBR Green I 荧光。对酯酶及 DNA 含量的检测为 2 次独立的过程。

## 1.4 流式细胞仪分析

应用 FACSVantage SE 流式细胞仪 (Becton

Dickinson) 对藻细胞进行测定。激光器为 Coherent 水冷氩离子激光器, 激发波长为  $488\text{nm}$ 。产生的固有信号包括前向光散射 (FSC) 及侧向光散射 (SSC), 分别表征细胞大小和颗粒性质。其荧光信号通过 2 个检测通道被收集: FL1 ( $530/30\text{nm}$ ), 接收 FDA 荧光及 SYBR Green I 荧光, 分别表征酯酶活性及 DNA 含量; FL3 ( $675/20\text{nm}$ ), 表征叶绿素 a 含量。样品的收集量为 30 000 个细胞, 分析流速为  $1\mu\text{L/s}$ , 单样耗时为 40 s。

## 2 结果与讨论

### 2.1 金属敏感性与细胞大小的关系

毒物对生物体的效应往往最早表现为生物大分子和生物化学水平上 (如酯酶活性) 的变化<sup>[6]</sup>, 进而影响种群的代谢过程与生长。藻细胞生长后期还会分泌胞外物质进入培养基, 从而对生物的生长环境造成一定影响<sup>[10,11]</sup>。因此试验在金属离子短期暴露 (4 h) 的后, 以细胞的酯酶活性作为指标分析栅藻对重金属元素毒性的敏感性。见图 1, 在  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  暴露 4 h 后, 将近一半比例的栅藻细胞 FDA 荧光强度明显下降, 显示出其酯酶活性受到了一定的抑制。单个细胞平均酯酶活性的抑制率分别为健康细胞的 53% ( $\text{Cd}^{2+}$  处理) 和 67% ( $\text{Ni}^{2+}$  处理)。

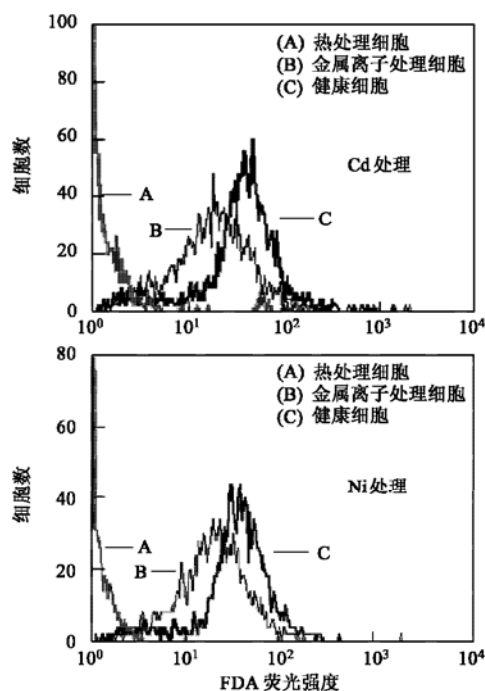


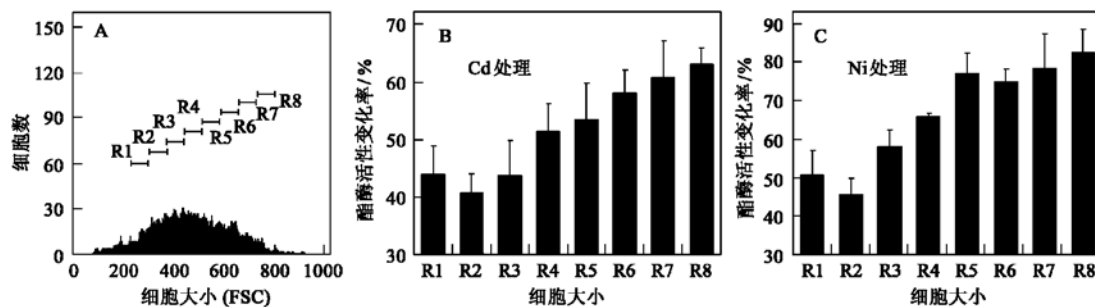
图 1 4h  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  暴露对栅藻酯酶活性的影响

Fig. 1 Effect of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  on esterase activity of *S. obliquus* after 4h exposure

将栅藻种群按细胞大小(FSC 参数)平均分为 8 个组分(见图 2A, R1~ R8), 每个组分中细胞数不少于 1 000, 计算各组分中单个细胞的平均酯酶活性. 结果显示同一种属对金属离子的敏感性并非一致(如图 2B, C). 在  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  暴露下, 各组分中单

个细胞的平均酯酶活性变化范围分别为 41% ~ 63% (R2, R8) 及 46% ~ 82% (R2, R8), 且这种变化与其细胞大小呈相关性: 随着细胞体积的增加, 对金属离子的抗性逐渐增强.

## 2.2 金属敏感性与细胞周期的关系



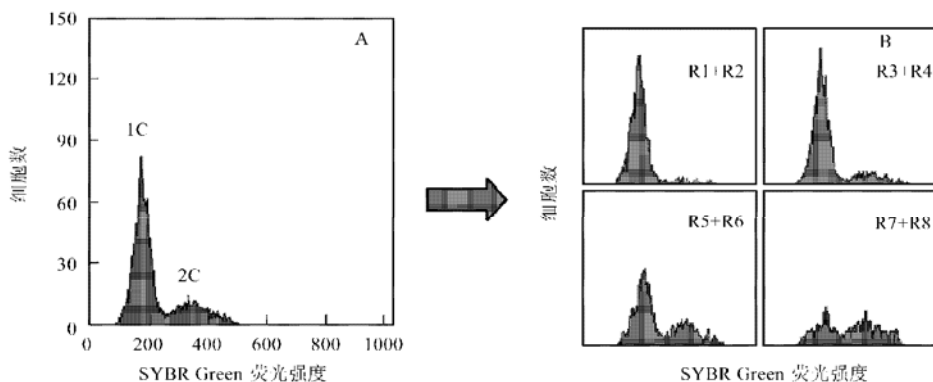
A 为栅藻细胞的 FSC 流式图, 按 FSC 参数平均设置 8 个区域(R1~ R8); B 和 C 分别为  $\text{Cd}^{2+}$  (160 $\mu\text{g/L}$ ) 和  $\text{Ni}^{2+}$  (400 $\mu\text{g/L}$ ) 处理 4h 后各区域藻细胞酯酶活性变化率

图 2 4h 暴露后栅藻细胞大小(FSC)与金属离子敏感性的关系

Fig. 2 Relationship between the cell volume (FSC) and susceptibility to metal ion toxicity in *S. obliquus* after 4h exposure

目前, 流式细胞技术在细胞周期方面的研究主要集中在医学领域, 而水生微生物的生物膜可能具有不同的通透性和摄取动力学<sup>[12]</sup>, 加之存在细胞壁的影响, 其单个细胞 DNA 的测定较为困难. 本文在优化了栅藻的 DNA 检测方法后, 对细胞大小和其细胞周期的关系也进行了分析. 在分析中试验采用未暴露的健康细胞, 这是因为重金属离子可能会不同程度的改变细胞膜的通透性, 从而对渗透性染料 SYBR Green I 的染色效果产生一定影响, 且重金属离子( $\text{Cd}^{2+}$ : 160 $\mu\text{g/L}$ ;  $\text{Ni}^{2+}$ : 400 $\mu\text{g/L}$ )暴露 4h 后, 根据 FSC 参数确定毒物对细胞的大小并未造成明显的(< 5%)影响.

按照同样的方法(图 2A), 通过 FSC 参数(细胞大小)将细胞分为 4 个组分(R1+ R2, R3+ R4, R5+ R6, R7+ R8). 对各组分中单个栅藻细胞的 DNA 含量进行分析. 如图 3, 由于细胞分裂的不同步, 细胞大小和其所处周期并非严格对应. 在 R1~ R4 区的细胞主要表现 1C DNA 峰, 为 DNA 合成前期(G1 期); 而 R5~ R6 区域的细胞逐渐出现明显的 2C 峰, 增殖期( $\text{G}_2/\text{M}$  期)细胞增多, R8 区域细胞中 2C 的比例达 63%. 这表明栅藻的细胞大小与其细胞周期具有一定相关性: 随着体积的增大, 栅藻细胞逐渐进入增殖期. 对照上一节的分析, 进一步反映了栅藻的毒物敏感性与其所处细胞周期的关系, 即增殖期的



A 为 SYBR Green I 染色后种群的 DNA 量分布图, 1C 和 2C 分别代表 G1 期和 G2/M 期;

B 为各分区的 DNA 量分布图(R1~ R8, 区域设置见图 6A)

图 3 栅藻细胞大小与其细胞周期(DNA 量)的关系

Fig. 3 Relationship between the cell size and cell cycle stage (DNA content) in *S. obliquus*

藻细胞对金属离子表现出较明显的抗性,而 DNA 合成前期的藻细胞则较为敏感.金属离子透过细胞膜进入细胞产生毒性反应,最显著的表现是限制细胞增殖能力和破坏 DNA, RNA 的合成<sup>[13]</sup>. 本研究表明这 2 种离子主要是在藻细胞合成前期产生毒性作用,这可能与 G1 期细胞的新陈代谢能力较低、解毒功能较弱有关.而 Howlett 和 Avery 等在研究酵母细胞的 Cu 敏感性时报道了相反的结果<sup>[2]</sup>,他们发现 G2/M 期的细胞具有较强的 Cu 敏感性,认为这是与细胞初始的氧化还原性质所决定的,该类细胞内源性活性氧自由基(ROS)的含量较高.目前相关研究较少,这种现象发生的机理还有待进一步分析.

在藻类毒性试验中,研究者往往采用进入同步生长的对数期细胞评估其所承受的环境压力.然而不同批次的对数期细胞在细胞周期的各个阶段分布仍然具有较大的随机性,而本实验结果表明,各个阶段的细胞对污染物的敏感性具有明显的差异,这就导致了在测定污染物 EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>值时可能会出现较大误差.因此本研究试验提供的证据还表明:在毒性测试中有必要进一步完善目前的毒性实验步骤,例如,对出发种群进行 DNA 分析,以保证试验种群细胞周期分布的稳定性,并进一步加以规范,从而提高化学品的环境安全指标和污染物风险评价的精确性.

### 3 结论

重金属离子 Cd<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 对栅藻种群细胞的急性毒性实验中,不同体积以及不同周期的栅藻细胞的酯酶活性变化检测表明栅藻种群所有细胞对重金属离子的敏感性并非一致,随着细胞体积的增加,其对重金属离子的抗性逐渐增强.进一步分析表明,增殖期的藻细胞对重金属离子的抗性较强,而 DNA 合成前期的藻细胞则对重金属离子表现出明显的敏感性.说明细胞对金属离子的敏感性与其所处细胞周期的不同阶段有关.建议在毒性测试中,对出发种群

的细胞周期分布加以规范以提高评估的精确性.

#### 参考文献:

- [1] Marue D, Partensky F, Jacquet S. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain syber green I [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997, **63**(1): 186~ 193.
- [2] Howlett N G, Avery S V. Flow cytometric investigation of heterogeneous copper-sensitivity in asynchronously grown *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS Microbiol. Lett., 1999, **176**: 379~ 386.
- [3] 于洋,孔繁翔,钱蕾蕾,等.流式细胞术在铜对藻类生理生态毒理研究中的应用[J].环境化学,2004, **23**: 525~ 528.
- [4] 于洋,孔繁翔.流式细胞技术应用于生态毒理学的方法及进展[J].应用与环境生物学报,2006, **12**(1): 131~ 134.
- [5] 何学佳,彭兴跃.应用流式细胞仪研究 Pb 对海洋微藻生长的影响[J].海洋环境科学,2003, **22**: 1~ 5.
- [6] Franklin N M, Adams M S, Stauber J L, et al. Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry [J]. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 2001, **40**: 469~ 480.
- [7] Arsenault G, Cvetkovic A D, Popovic R. Toxic effects of copper on *Selenastrum capricornutum* measured by a flow cytometry based method [J]. Water Pollut. Res. J. Can., 1993, **28**(4): 757~ 765.
- [8] Marie D, Partensky F, Jacquet S, et al. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green II [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997, **63**: 186~ 193.
- [9] Jochem F J. Morphology and DNA content of bacterioplankton in the northern Gulf of Mexico: analysis by epifluorescence microscopy and flow cytometry [J]. Aquat. Microb. Ecol., 2001, **25**: 179~ 194.
- [10] Ahner B A, Morel F M M. Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals [J]. Limnol. Oceanogr., 1995, **40**: 658~ 665.
- [11] Ahner B A, Kong S, Morel F M M. Phytochelatin production in marine algae. 1. An inetrspecies comparison [J]. Limnol. Oceanogr., 1995, **40**: 649~ 657.
- [12] Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe Von et al. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, **24**(4): 429~ 448.
- [13] 阮建明, Grant M H, 黄伯云.金属毒性研究( II) [J].中国有色金属学报, 2002, **12**(1): 14~ 19.