

抗氧化剂对扁藻久效磷毒害的抑制效应*

唐学玺, 李永祺(青岛海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

摘要: 利用急性毒性实验和生化分析法对扁藻细胞的久效磷毒害效应进行了研究。结果表明, 久效磷胁迫下, 扁藻细胞产生了过量的活性氧。活性氧引起膜脂过氧化导致扁藻的伤害。培养基中添加15mg/L 维生素 C, 能将介质中的丙二醛(MDA)含量从 $0.081\mu\text{mol}\cdot 10^{-9}\text{cells}$ 降到 $0.052\mu\text{mol}\cdot 10^{-9}\text{cells}$; 维生素 E 及谷胱甘肽(GSH) 也能降低膜脂过氧化产物丙二醛的含量, 而人为发生的活性氧能够引起 MDA 含量的升高。另外, 活性氧参加了久效磷对扁藻的毒害, 而抗氧化剂(Vc、Ve、GSH) 均能有效地抑制这种毒害效应。

关键词: 抗氧化剂, 久效磷, 活性氧, 膜脂过氧化, 扁藻。

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2000)01-0087-03

Inhibition of Antioxidants on Monocrotophos Damage to *Platymonas* sp.*

Tang Xuexi, Li Yongqi(Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

Abstract: The toxic effect of monocrotophos on *Platymonas* sp. was studied with acute toxicity and biochemistry methods. The excess active oxygens were produced in algal cells, and the product of membrane lipid peroxidation malondialdehyde (MDA) content increased under monocrotophos stress. The 15mg/L of Vitamin C in medium could decrease the MDA content from $0.081\mu\text{mol}\cdot 10^{-9}\text{cells}$ to $0.052\mu\text{mol}\cdot 10^{-9}\text{cells}$, Vitamin E and reduced glutathione could also decreased MDA content obviously. While riboflavin could promote MDA content. It was indicated that active oxygens participated in the damage of monocrotophos to *Platymonas* sp.; the Vitamin C, Vitamin E and reduced glutathione could effectively inhibit membrane lipid peroxidation and further alleviated algal damage, while riboflavin could promote membrane lipid peroxidation and facilitate algal damage.

Keywords: antioxidant, monocrotophos, active oxygen, membrane lipid peroxidation, *Platymonas* sp.

近10年来, 随着有机氯农药的禁用和停产, 有机磷农药以其毒效大, 易分解等优点在农林业生产上得到了广泛的应用。但它对近岸水域的污染已危及到了生物资源及水产养殖业, 引起了人们的高度重视。大多数学者认为, 有机磷农药对昆虫和淡水鱼类的致毒机理主要是抑制乙酰胆碱酯酶的活性, 从而导致神经系统的紊乱和伤害。笔者以单细胞藻为材料, 研究有机磷农药的毒性机理已有初步结果^[1]。本文开展了抗氧化剂对扁藻久效磷毒害抑制作用的研究, 这对消除海洋有机磷农药污染, 保护海洋生物资源有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验藻种及毒性实验

实验选用的扁藻(*Platymonas* sp.) 来自本院微藻培养室。海水取自青岛鲁迅公园附近海滨, 经孔径 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜煮沸消毒, 冷却后配制培养液。培养液选用 f/2 营养盐配方。

用于扁藻培养的三角瓶, 预先在 1mol/L 的

* 国家“攀登 B”计划资助项目(The Project Supported by the National Climbing Programme), 编号: PDB6-7-1
作者简介: 唐学玺(1965~), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为生态毒理学。
收稿日期: 1999-03-08

稀盐酸中浸泡数日,再分别用含有相应久效磷浓度的培养液平衡2次,每次平衡时间为1d,以消除实验过程中容器壁对久效磷的吸附作用。

将扁藻接入含有0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0及2.5mg/L久效磷的培养液中,培养72h,其72h半抑制剂量为1.46mg/L。

扁藻于指数生长期接种,接种浓度为 5×10^5 个/mL,光照为2500~3000lx,光暗比为14:10, pH 值为 8.0 ± 0.1 ,盐度为 30.0 ± 1.0 ,温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

将含有半抑制剂量久效磷的培养液作为基本培养液,添加不同浓度的抗氧化剂。扁藻在此培养液中培养72h,用于丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的测定。

1.2 MDA 含量的测定

参照Heath等(1981)^[2]和林植芳(1984)^[3]的方法进行,重复3次,取平均值。

1.3 超氧阴离子自由基的测定

参照Ishii(1987)^[4]的肾上腺素氧化法测定。培养液中1组不含久效磷,1组含有1.46mg/L的久效磷,扁藻在上述2种培养液中培养72h,进行对肾上腺素氧化强度的测定,重复3次,取平均值。

2 结果

2.1 久效磷处理后扁藻对肾上腺素氧化强度的变化

实验结果显示,在无久效磷的培养液中培养72h的扁藻对肾上腺素的氧化强度微弱,而在1.46mg/L久效磷胁迫下,其对肾上腺素的

氧化强度大大加强。若在测试液中加入 $35\mu\text{g}/\text{m l}$ 的超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)时,便完全失去了氧化能力;当在测试液中添加煮沸灭活的SOD时,其氧化能力又恢复到原来的水平(表1),这说明久效磷的胁迫引起扁藻活性氧的过量产生。

表1 久效磷处理后扁藻对肾上腺素氧化强度的变化

处理方法	肾上腺素氧化强度(OD ₄₈₀)
对照组(不含久效磷)	0.036
处理组(含1.46mg/L久效磷)	1.136
对照组+35μg/ml SOD	0.000
处理组+35μg/ml SOD	0.000
对照组+35μg/ml 灭活 SOD	0.031

2.2 久效磷胁迫下扁藻MDA含量的变化

MDA是膜脂过氧化的产物,其含量可指示膜脂过氧化水平的高低。结果表明,在无久效磷的培养液中培养72h的扁藻MDA含量为 $0.039\mu\text{mol} \cdot 10^{-9}\text{cells}$,而在1.46mg/L久效磷胁迫下培养72h的扁藻MDA含量提高到 $0.081\mu\text{mol} \cdot 10^{-9}\text{cells}$,说明胁迫处理下过量的活性氧引起了膜脂过氧化水平的提高,这无疑会对扁藻细胞造成膜脂过氧化伤害。

2.3 维生素C、维生素E和谷胱甘肽对MDA含量的影响

维生素C能够降低扁藻MDA的含量(表2)。维生素C浓度由0增加到15mg/L时,MDA含量由 $0.081\mu\text{mol} \cdot 10^{-9}\text{cells}$ 降至 $0.052\mu\text{mol} \cdot 10^{-9}\text{cells}$,15mg/L左右的V_c为其最佳作用浓度。

表2 维生素C、维生素E、谷胱甘肽和核黄素对扁藻MDA含量的影响

V _c 浓度/mg·L ⁻¹	0	10	15	20	25
MDA 含量/μmol·10 ⁻⁹ cells	0.081	0.079	0.052	0.069	0.075
V _e 浓度/mg·L ⁻¹	0	15	30	45	60
MDA 含量/μmol·10 ⁻⁹ cells	0.081	0.072	0.058	0.050	0.069
GSH 浓度/mg·L ⁻¹	0	20	40	60	80
MDA 含量/μmol·10 ⁻⁹ cells	0.081	0.076	0.053	0.047	0.057
核黄素浓度/mg·L ⁻¹	0	10	20	30	40
MDA 含量/μmol·10 ⁻⁹ cells	0.081	0.084	0.087	0.092	0.093

维生素 E 对 MDA 含量的影响如表 2 所示。培养液中 V_e 的加入能够减轻久效磷对扁藻的伤害, 使膜脂过氧化水平降低, MDA 含量下降, V_e 的最佳作用浓度为 45 mg/L 左右。

与 V_c 和 V_e 比较, GSH 更能有效地降低 MDA 含量, 减轻扁藻的膜脂过氧化伤害(表 2)。若将以上 3 种抗氧化剂联合使用时, MDA 含量的降低更加显著。根据 3 种抗氧化剂单独使用时的结果, 选用了添加 15 mg/L V_c 、40 mg/L V_e 和 55 mg/L GSH 并含 1.46 mg/L 久效磷的培养液, 结果 MDA 含量由仅加 1.46 mg/L 久效磷时的 $0.081 \mu\text{mol} \cdot 10^{-9} \text{ cells}$ 降低到了 $0.042 \mu\text{mol} \cdot 10^{-9} \text{ cells}$ 。

2.4 核黄素对 MDA 含量的影响

表 2 显示, 培养液中加入一定浓度的核黄素并经紫外线照射后, 扁藻的 MDA 含量增加, 并随着核黄素浓度的不断提高, MDA 含量不断上升, 表明核黄素的加入提高了膜脂过氧化水平, 并加剧了扁藻的伤害。

3 讨论

在逆境(干旱、盐害、冻害、病害、污染)胁迫下, 植物体内固有的活性氧产生及清除间的平衡被打破, 造成活性氧的过量产生和积累^[5]。过量的活性氧会攻击生物膜的不饱和脂肪酸的双键, 造成膜脂过氧化水平的提高, 进而引起植物体的膜脂过氧化伤害。本实验结果也充分证实了这一观点。扁藻在久效磷的胁迫下, 超氧阴离子自由基(O_2^-)大量产生, 引起了膜脂过氧化产物 MDA 含量的上升, 导致扁藻的伤害。

植物体内存有清除活性氧的 2 种机制: ①酶促机制, 即植物体依靠某些酶(如 SOD、POD 和 CAT 等)的作用来消除多余的活性氧; ②非酶促机制, 即植物体依靠一些抗氧化剂(也称活性氧清除剂, 如 V_c 、 V_e 及 GSH 等)来完成活性氧的清除。本实验中, 培养液中单独添加 V_c 、 V_e

和 GSH 时, 都不同程度地降低了扁藻 MDA 的含量, 这反映出 3 种抗氧化剂对超氧阴离子自由基(O_2^-)的清除作用, 有效地减轻了扁藻的膜脂过氧化伤害。

3 种抗氧化剂联合使用时, 作用效果更加明显。其原因可能是: V_c 和 GSH 是水溶性的抗氧化剂, 而 V_e 为脂溶性的抗氧化剂; 水溶性和脂溶性抗氧化剂的联合作用, 对整个细胞体系内的活性氧都能够有效地清除^[6], 从而减轻了由此而引发的膜脂过氧化伤害。

紫外线的照射能激发氧分子分解成高能态的活性氧, 而核黄素经紫外线照射也能产生超氧阴离子自由基 O_2^- ^[7]。培养液的照射处理, 实际上是人为诱发并提高了培养液中活性氧的含量, 使扁藻的 MDA 含量上升, 膜脂过氧化伤害加重。显然, 活性氧参加了久效磷对扁藻的伤害, 而某些抗氧化剂能程度不同地减轻这种伤害作用。

参考文献

- 1 唐学玺, 李永祺等. 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
- 2 Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem. Biophys., 1981, 125(4): 189~198
- 3 林植芳. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶及脂质过氧化作用的关系. 植物学报, 1984, 26(3): 605~612
- 4 Ishii S. Generation of active oxygen species during enzymic isolation of protoplast from oat leaves. In Vitro, 1987, 23(6): 653~657
- 5 王建华. 超氧化物歧化酶在植物逆境和衰老中的作用. 植物生理学通讯, 1989, (1): 1~7
- 6 Thompson J E, Legge R L et al. The role of free radicals in senescence and wounding. New Phytol., 1987, 105(2): 317~344
- 7 Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. Anal. Biochem., 1971, 44(5): 276~287