

紫外辐射对孔石莼抗氧化酶活性及其同工酶表达的影响

李丽霞, 王秀静, 赵吉强

(烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 潮间带海藻不可避免地要遭受 UV-B 的胁迫。本研究以孔石莼(*Ulva pertusa*)为试材, 研究了 UV-B 胁迫对其抗氧化酶体系中 SOD、CAT、POX、APX、GR、GPX 活性及前 4 种酶的同工酶表达的影响。结果显示: SOD、CAT、POX 酶活性应激反应较为迅速; APX 活性始终保持较稳定水平; GR、GPX 酶应激表达启动稍晚, 酶活高峰在处理中期 6d 时出现。SOD 同工酶谱有 4 条酶带, 在 UV-B3 种剂量处理下, SOD I 及 SOD II 同工酶活性有所增加; POX II 同工酶活性呈小幅增加; 在 UV-B 诱导下, CAT 产生了 2 条新的同工酶谱带 CAT I 及 CAT II; APX 同工酶仅有 1 条谱带, 在 UV-B 处理下与对照差异不大。抗氧化成分 AsA 及 GSH 含量在处理前中期与对照相近。孔石莼的特定增长率(SGR)在 1.6 kJ/(m²·d)、4.8 kJ/(m²·d)和 9.6 kJ/(m²·d)3 种剂量 UV-B 辐射处理下均呈下降趋势, 且在后两种剂量处理下降低尤为显著, 而相应的 H₂O₂ 及 TBARS 含量呈不同程度增加。上述结果表明: 孔石莼对 UV-B 辐射具有一定程度的耐受性, 可以通过提高酶促过氧化体系活性来应答 UV-B 导致的氧化胁迫, 并且酶活性变化体现出剂量和时间效应。

关键词: UV-B 辐射; 孔石莼(*Ulva pertusa*); 抗氧化体系; 同工酶

中图分类号: X171.5 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2017)04-0001-09

DOI: 10.11759/hyxx20160528002

平流层中臭氧层的减薄是当今最引人注目的全球重大环境问题之一。由于臭氧层的侵蚀和破坏使到达地面的紫外线, 尤其是对生物具有显著作用的紫外线 B 波段(ultraviolet-B, UV-B, 280-320nm)的辐射增强^[1-2]。在我国, 总臭氧层也呈现显著的降低趋势^[3-4]。近年来, 尽管导致臭氧降解的化学物质排放已受到控制, 但由于温室气体效应, 臭氧层的完全恢复将被延滞, 而基于一个全球气候变化的模型预测, 最严重的臭氧层衰减将在 2010~2019 年发生^[5]。

潮间带是陆地生态系统和海洋生态系统的交错地带, 属生物圈中最敏感的生态系统之一。生活于潮间带的大型海藻要经受波动范围最大的光辐射环境, 尤其在低潮时, 干露的大型海藻必将暴露于全光照条件下, 因而受到的 UV-B 辐射的直接危害将比淹没时更加严重^[6-7]。迄今, 关于 UV-B 辐射对潮间带大型海藻的影响, 研究多集中在紫外辐射对海藻的生长^[8]、光合作用^[9]、DNA 伤害^[7, 10]、单一抗氧化酶活性^[11]等方面, 而迄今对潮间带大型绿藻体内抗氧化保护体系及其同工酶对 UV-B 辐射增强时的响应尚缺乏系统研究。已经证明, 大量活性氧(Reactive oxygen species, ROS)在细胞内的生成及滞留是 UV-B 辐射对海藻产生毒性与伤害作用的主要

缘故之一^[12-13], 而当遭受到紫外胁迫时, 海藻中能够诱导产生适应及修复的机制, 因此, 紫外辐射的危害在一定程度上是可忍受、可抵消、可避免的^[14]。抗氧化系统是植物抗胁迫保护机制的一个主要组成部分, 其整体活性高低决定其对活性氧自由基的清除能力, 而这一能力与植物适应或抵抗胁迫能力的增加息息相关^[13]。

孔石莼(*Ulva pertusa*)又名海白菜, 是潮间带大型海藻的 1 种常见类型, 在我国各沿海地区分布广泛, 具备生长快、适应环境能力强、营养丰富、方便易得等特性, 因而具有良好的综合应用价值和经济发展前景^[15]。本文中, 笔者测定了孔石莼中各种重要的抗氧化酶(剂)活性及同工酶类型的增减规律, 结合过氧化氢(Hydrogen peroxide, H₂O₂)及硫代巴比妥酸活性物质(Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)的动态变化, 分析了 UV-B 辐射程度与同工酶表达趋势及调控的相关性, 以期为进一步了解潮

收稿日期: 2016-07-05; 修回日期: 2016-11-13

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31300326)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.31300326]

作者简介: 李丽霞(1975-), 女, 河北行唐人, 副教授, 博士, 主要从事海藻抗逆性研究, 电话: 0535-6902638, E-mail: lilixianet@126.com

间带大型海藻有效应对紫外光胁迫的生化机制及保护机理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 海藻和处理

孔石莼采集自青岛太平角中潮带, 采样后立刻用消毒海水反复冲洗去除可见的附生物及沉积物。新鲜海藻用打孔器制备成直径约 1 cm 的圆片, 约 20 g 鲜质量作为一个处理, 预培养于盛有 2.5 L 灭菌海水的玻璃缸中, 缸直径为 50 cm。海水持续充气并每日更换。

经过 3 d 的预培养后, 海藻材料置于 6 个直径为 18 cm 平皿内接受紫外辐射处理。采用北京师范大学生产的 UV-B 型紫外辐射强度仪测定辐射强度。在预试验的基础上, 设计 3 种不同辐射剂量的处理组: 1.6 kJ/(m²·d) 为轻度剂量 (Luv), 4.8 kJ/(m²·d) 为中度剂量 (Muv), 9.6 kJ/(m²·d) 为高度剂量 UV-B 辐射 (Huv)^[6]。对照(ck)采用正常日光灯管照射, 光强为 3 500 lx, 培养温度保持在 20~25℃, 光周期为 12 h : 12 h。试验周期为 12 d。

1.2 生长测定

为测定生长情况, 20 片新鲜海藻另培养于装有 300 mL 海水的规格为 500 mL 的锥形瓶中, 每个处理 3 次重复组。按照 2 种海藻的最终湿质量来计算其特定生长率(specific growth rate, R_{SG}), 计算公式为:

$$R_{SG} (\%/d) = (\ln W_T - \ln W_0) / t \times 100\%$$

式中, W_T 和 W_0 分别表示藻体的最终湿质量和初始湿质量(g); t 为试验周期(d)。

1.3 抗氧化酶活性测定

取 1 g 藻体材料用 5 mL 提取缓冲液(构成为 0.05 mol/L pH=7.0 的磷酸缓冲液 PBS 中包含 1%PVP, 0.001 mol/L EDTA)在冰浴条件下研磨提取后, 14 000 r/min 离心 15 min, 立即取上清液用于测定超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)及过氧化物酶(Peroxidase, POX)活性。酶液保存及相应的活性测定都在 0~4℃ 条件下进行, 设置 3 次重复, 每 3 d 测定 1 次。

SOD 活性测定波长为 560 nm, 依据氮蓝四唑(Nitro blue tetrazolium, NBT)的光抑制反应^[16]进行。CAT 活性测定依据 Chance 等^[17] 的方法, 测定 H₂O₂ 在 240 nm 下的降解速度。POX 测定由于愈创木酚的形成导致 470 nm 下光吸收的增加^[18]。

抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase, APX)的提取缓冲液包含 0.05 mol/L PBS (pH7.0), 0.001 mol/L EDTA, 0.002 mol/L AsA 及 1% PVP。APX 的活性测定是检测 290 nm 下基于抗坏血酸的氧化而使光吸收降低的速度^[19]。

谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)及谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase, GR)的提取缓冲液中包含(0.055 mol/L pH=7.0 PBS; 0.001 mol/L EDTA-Na₂; 1%PVP; 0.005 mol/L MgCl₂; 0.001 mol/L AsA)。取适量材料加入提取液冰浴研磨匀浆, 4℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清酶液用于酶活测定。GPX 测定基本参照黄爱纓等^[20]的方法并略作改进, 测定反应酶液在 412 nm 的光吸收值。GR 测定方法参照 Knörzer^[21]的方法并作改进, 此方法是基于还原型辅酶 的氧化反应在 340 nm 下的吸光度的减少来测量。

1.4 H₂O₂ 含量的测定

H₂O₂ 含量测定参照沙爱华等^[22]的方法进行, 并加以改进。提取液为预冷的冷丙酮液研磨匀浆后 14 000 r/min 离心 20 min, 取上清加入反应物后测定吸光值 A_{410} 。同样方法制作 H₂O₂ 标准曲线。

1.5 TBARS 含量测定

取冷冻的海藻材料 0.3 g 用 1%TCA 溶液 3 mL 研磨提取, 14 000 r/min 离心 10 min。TBARS 含量计算参照 Health 及 Packer^[23]方法, 基于 535 nm 和 600 nm 的光吸收值来计算。

1.6 电泳及同工酶谱分析

电泳试验均于处理 12 d 时进行, 采用非变性不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 4℃ 下 20 mA/gel 稳流电泳。SOD 同工酶染色方法参照 Laemmli^[24]的方法, 将凝胶在黑暗条件下于 0.25 mmol/L NBT 中浸泡 20 min 后, 置于含 8 mmol/L EDTA 的 0.05 mmol/L 核黄素溶液中 20 min, 曝光至蓝紫色背景上出现透明条带, 根据其对 KCN 及 H₂O₂ 不同的敏感性进一步确认其同工酶谱带的 3 种类型^[25]。CAT 同工酶染色根据 Woodbury 等^[26]的方法, 将凝胶于 0.003 3 mol/L H₂O₂ 中浸没 25 min 后, 再放置于 1% FeCl₃ 和 1% K₃Fe (CN)₆ 溶液中染色, 直至绿色条带出现。POX 同工酶染色时将凝胶在包含 0.3% H₂O₂ 和 0.002 mol/L 联苯胺的 0.2 mol/L 的醋酸溶液中染色 20 min 后, 褐色条带显现^[27]。用于 APX 电泳检测的条件与上述条件均相同, 但需在电泳缓冲液中包含 0.002 mol/L 的 AsA, 以便使预电泳 30 min 让 AsA 进入胶内。APX 活

性染色按照以下方式进行: 将凝胶浸没于含 0.002 mol/L AsA 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)中 30 min 后, 于含 0.004 mol/L AsA 及 0.002 mol/L H_2O_2 的 0.05 mol/L PBS (pH7.0)中温育 20 min。最后转移至包含 0.002 5 mol/L NBT 及 0.03 mol/L TEMED 的 0.05 mol/L PBS (pH7.8) 溶液中 10 min 左右, 直至 APX 谱带显现^[28]。采用凝胶成像系统照相保存。

1.7 抗氧化成分抗坏血酸(Ascorbate, AsA)及谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量测定

参照 Marschner 等^[29]的方法稍加改进测定 AsA 含量, 海藻材料用 5%偏磷酸研磨提取, 24 000 r/min 离心 15 min, 取上清测定。GSH 提取液为 50 mmol/L pH=7.0 的 PBS 溶液, 其中加入适量 AsA, 测定反应体系在 412nm 处的光吸收值^[30]。

1.8 数据分析

研究结果采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析, 处理结果之间的多重比较采用 Duncan's 检验方法。图表采用 Sigma Plot 10.0 软件绘制, 图中的误差棒表示基于 3 次重复值的均值标准差。

2 结果

2.1 特定增长率的变化

UV-B 对孔石莼生长的影响见图 1。轻度剂量下 SGR 值呈下降趋势, 但与对照并未达到差异显著水平($P>0.05$); 中度剂量照射下的 SGR 值显著下降($P<0.05$), 高度剂量辐射处理下降低更为显著, 与对照之间的差异达到极显著水平($P<0.01$)。

2.2 孔石莼抗氧化体系对 UV-B 辐射的响应

图 2 显示出孔石莼抗氧化体系的几种关键酶对 UV-B 辐射的响应变化。在 UV-B 辐射诱导下, 前期 SOD 酶应激反应迅速, 其活性呈大幅度上升, 其中中度剂量处理下的酶活在 3~6 d 时均与对照组达到极显著差异($P<0.01$); 轻度剂量胁迫下 SOD 活性也始终高于对照水平; 高度剂量处理下酶活性初期显著升高, 随胁迫时间进一步延长, 酶活明显回落 (图 2a)。POX 酶活性见图 2b。由图可知, 在 UV-B 辐射处理初期, 轻度及中度剂量胁迫下 POX 活性增加显著, 分别与对照达到极显著($P<0.01$)及显著水平($P<0.05$); 在处理中后期, 轻度胁迫下 POX 仍然与对照活性水平相近, 而中度及高度处理水平的酶活性显著降低($P<0.05$); 在试验期间对照的 POX 活性

也表现出较大的变化幅度, 中期时(6 d) 酶活性最高。CAT 活性在 UV-B 处理初期即诱导出较高的活性表达, 与对照值均达到显著以上水平($P<0.05$); 在处理中期 6 d 时, 中度剂量 UV-B 处理下 CAT 活性达到峰值, 随后明显下降; 在处理后期, 不同剂量 UV-B 处理水平下的 CAT 酶仍维持较高活性水平, 与对照值之间差异显著或极显著($P<0.05$; $P<0.01$, 图 2c)。图 2d 显示出孔石莼 APX 活性与上述酶活性变化规律不同, 除在 9d 时轻度剂量 UV-B 处理下活性短暂增加外($P<0.05$), 其他时间始终保持较稳定水平, 对照与 3 种辐射处理间差异皆不明显($P>0.05$)。

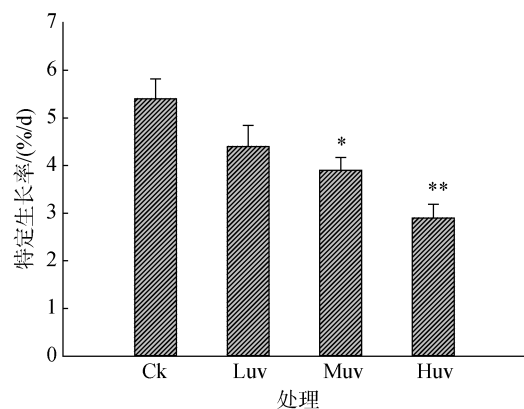


图 1 UV-B 处理下孔石莼的特定增长率

Fig.1 SGR of *Ulva pertusa* following exposure to different doses of UV-B radiations

Luv、Muv、Huv 分别表示轻度、中度及高度剂量 UV-B 辐射, Ck 为对照, 下同

Luv, Muv, and Huv indicate mild, moderate, and high doses of UV-B radiation, respectively; Ck is the control, the same below

GR 酶活性在处理中期 6 d 时有较大幅度的升高, 但其中仅有轻度 UV-B 胁迫下的 GR 酶活性与对照相比差异达到显著水平($P<0.05$), 随后呈现出缓慢下降的趋势; 高度剂量 UV-B 处理下 GR 酶活性下降较多, 至试验期末 12 d 时活性显著低于对照的相应值($P<0.05$, 图 2e)。UV-B 处理下 GPX 酶活性变化见图 2f。轻度及中度 UV-B 辐射诱导 GPX 酶活性先表现上升趋势, 轻度 UV-B 辐射水平下上升幅度更大, 在处理 6d 时出现峰值 ($P<0.05$); 中度剂量 UV-B 处理下后期 GPX 酶活急剧下降, 与对照差异显著($P<0.05$); 而重度 UV-B 胁迫使 GPX 酶活性始终保持在较低水平。

2.3 UV-B 辐射对孔石莼 AsA 及 GSH 含量的影响

孔石莼体内抗氧化成分 AsA 及 GSH 含量在不同剂量 UV-B 辐射时的变化状况如图 3 所示。从图 3a

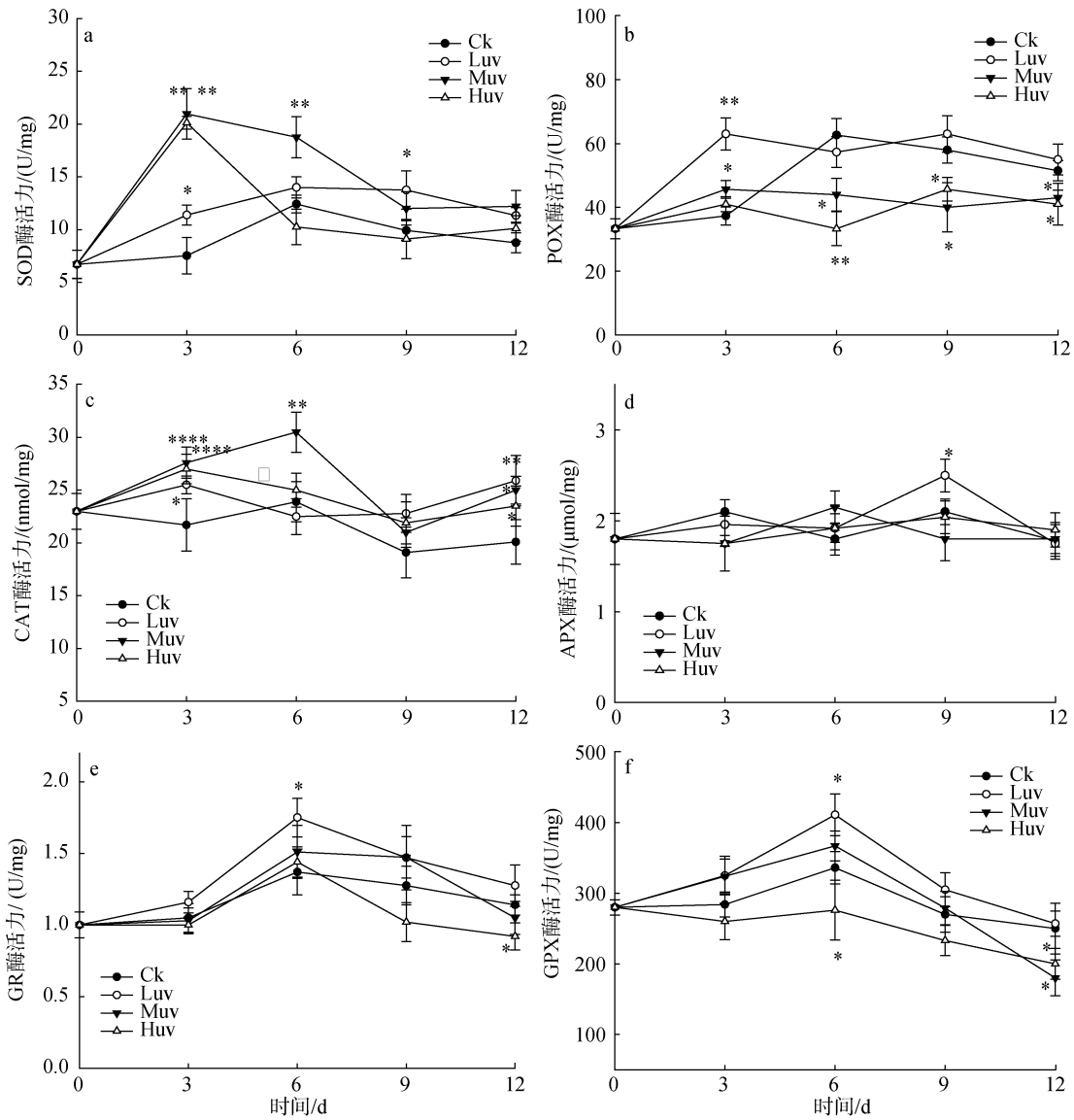


图2 不同剂量 UV-B 辐射下孔石莼 SOD(a)、POX(b)、CAT(c)、APX(d)、GR(e)及 GPX (f)酶的活性变化

Fig. 2 Activities of SOD(a), POX(b), CAT(c), APX(d), GR(e), and GPX(f) in *Ulva pertusa* following exposure to different doses of UV-B radiation

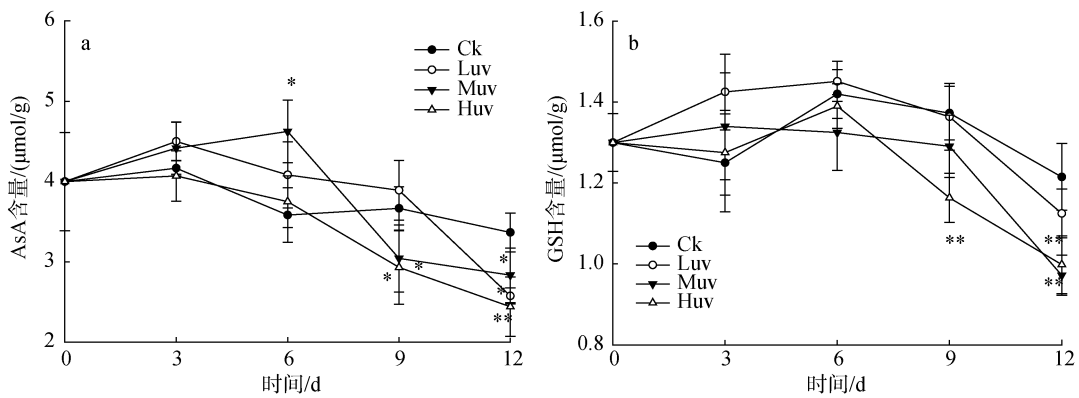


图3 UV-B 辐射下孔石莼的 AsA(a)及 GSH(b)含量

Fig. 3 AsA (a) and GSH (b) contents in *Ulva pertusa* following exposure to different doses of UV-B radiation

可以看出,处理初期及中期(3~6 d)时,轻度及中度胁迫水平下 AsA 水平均呈上升趋势,并且中度处理的 AsA 含量升高幅度较大,在 6 d 时与对照间的差异达到显著水平($P<0.05$);随胁迫时间的延长,各个处理下的孔石莼 AsA 水平均显著降低($P<0.05$; $P<0.01$)。由图 3b 可知,UV-B 辐射初始阶段,孔石莼体内 GSH 活性水平变化不明显,至处理 9 d 时,高度剂量下处理的 GSH 含量明显下降($P<0.01$);至试验期末 12 d 时,中度 UV-B 辐射处理的 GSH 含量亦显著地低于对照水平($P<0.01$),而轻度 UV-B 处理的孔石莼的 GSH 含量虽然低于对照值,但其差异并未达到显著水平($P>0.05$)。

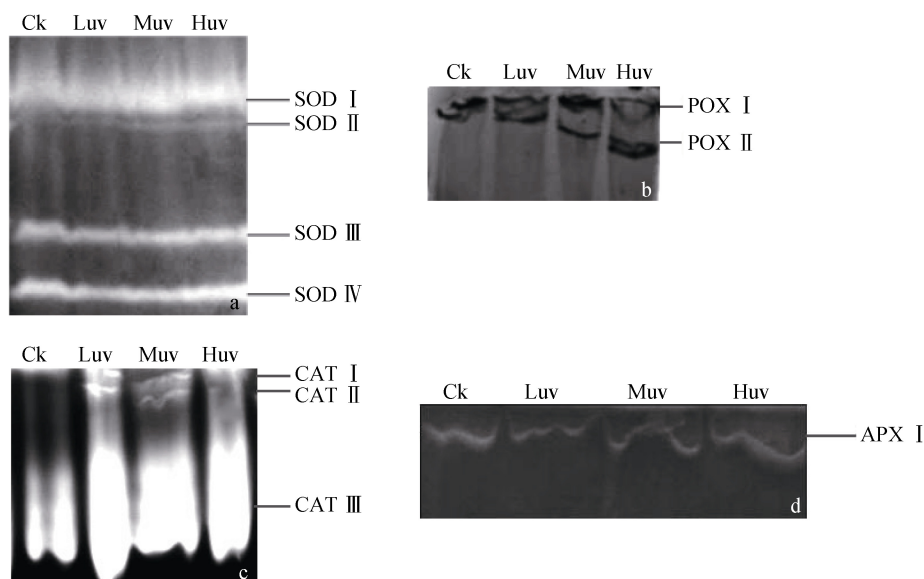


图 4 孔石莼的 SOD (a), POX (b), CAT (c) 及 APX (d) 同工酶对 UV-B 辐射的响应

Fig. 4 SOD (a), POX (b), CAT (c), and APX (d) isoforms in *Ulva pertusa* in response to exposure to UV-B radiation

孔石莼具有较高的 CAT 酶活性,在同工酶谱上即表现为高亮度的条带(图 4c)。在 UV-B 诱导条件下,除 CAT III 谱带比相应对照明显增强外, CAT 酶还出现 2 条新的、较细的同工酶谱带 CAT I 及 CAT II,且在低度及中度剂量下其活性高于高度剂量下相应的同工酶活性。

图 4d 显示出孔石莼 APX 同工酶的活性状态,在 UV-B 处理下 APX 酶仅有 1 条谱带,且与对照的 APX 活性差异不大。

2.5 UV-B 辐射对孔石莼 H_2O_2 及 TBARS 含量的影响

由图 5a 可知,在不同剂量 UV-B 处理下孔石莼体内的 H_2O_2 含量并未快速积累,处理后期 9~12 d 时,

2.4 同工酶检测

从图 4a 可以看出孔石莼 SOD 同工酶有 4 条酶带,分别表示为 SOD I、SOD II、SOD III、SOD IV。本研究进一步鉴定 SOD I、SOD III 及 SOD IV 谱带类型均为 Mn-SOD,而 SOD II 排除为 Mn-SOD 的可能,而未能准确鉴定为 Fe-SOD 或者 CuZn-SOD。与对照组相比较,3 种 UV-B 剂量处理下孔石莼的 SOD 及 SOD 2 条同工酶活性有所增加;而 SOD 与 SOD

同工酶活性与对照组相比,无明显变化。由图 4b 可知,POX 同工酶主要有 2 条酶带。轻、中度及重度 UV-B 照射使 POX 同工酶活性呈小幅增加;同时在重度 UV-B 胁迫下 POX 同工酶活性有所下降。

中度及高度剂量下的 H_2O_2 水平比对照显著增加($P<0.05$),而轻度 UV-B 辐射条件下 H_2O_2 含量始终与对照值差异不明显($P>0.05$)。由图 5b 可知, TBARS 含量变化与 H_2O_2 水平的变化规律相似,在试验前期时,3 种剂量水平处理下的 TBARS 含量与相应对照差异不大,随处理时间延长, TBARS 含量逐步升高,6 d 时高度剂量处理下 TBARS 含量与对照差异已达显著水平($P<0.05$),至 12 d 时,轻度及中度剂量处理的 TBARS 含量也比对照显著增加($P<0.05$)。

3 讨论

活性氧(ROS)是植物生理生化代谢过程中不可避免的副产物。近年来研究表明,ROS 清除系统的各组分之间存在共调节机制,抗氧化酶的活性平衡对

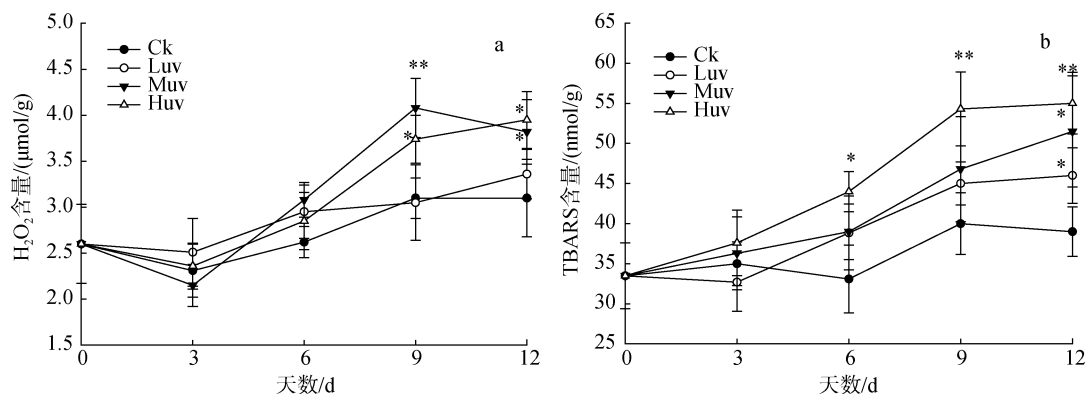

 图 5 UV-B 辐射下孔石莼 H₂O₂(a)及 TBARS(b)含量

 Fig. 5 H₂O₂ and TBARS contents in *Ulva pertusa* following exposure to different doses of UV-B radiation

细胞内 ROS 的稳定水平起着关键作用, 改变这些酶的平衡就会诱发补偿机制, 海藻抗 UV-B 辐射的能力与抗氧化系统间协同作用、基础活性、应激性和敏感性差异等因素均有密切关系^[31-32]。如在胁迫条件下, 抗坏血酸(AsA)减少, APX 由于缺乏底物而失活或活性降低, 此时 CAT 会增加防止 H₂O₂ 过度累积, 同样, CAT 活性降低时, APX 和 GPX 的转录水平增加使表达提高^[33]。Kono 等^[34]指出因为 O₂^{•-} 会抑制 CAT 活性, 而 SOD 在活性氧清除反应过程中第一个发挥作用, 可以歧化 O₂^{•-}, 故而 SOD 活性高的个体 CAT 活性也应该高。本研究结果基本符合这一结论。孔石莼 SOD、CAT 与 POX 活性应激反应较为迅速, 均在处理的前期显著增加(图 2a、图 2b、图 2c), 而 APX、GPX 及 GR 等酶活性高峰在中后期出现(图 2d、图 2e、图 2f), 且低度及中度剂量下酶活性增加尤其明显。这是 UV-B 辐射胁迫诱导的结果, 可能是孔石莼细胞为了适应逆境胁迫条件的一种调节性应激梯度反应, 产生类似的“毒物兴奋效应”。此种效应具有低剂量促进高剂量抑制特征, 是机体内稳态受到外界胁迫条件扰动后的响应, 即生物体在最初的抑制反应之后会出现补偿效应, 这个补偿效应可能会逐渐超过控制行为, 从而导致一种净刺激效应^[35]。该效应能够在一定程度上使酶系统活性增加, 抑制活性氧在短期内爆发性累积, 从而增强孔石莼对 UV-B 胁迫的抵抗力; 但伴随着辐射剂量的增加及辐射时间继续延长, 藻体细胞内活性氧分子如 H₂O₂ 会过量生成(图 5a), 最终超越了防御系统的清除能力, 此时, 作为表示脂质过氧化程度的有效指示器 TBARS 含量亦显著增加(图 5b), 表明细胞脂质过氧化程度加剧, 酶活部分丧失, 机体生长代谢受损。

进一步对连续测定的 H₂O₂ 及 TBARS 含量与各类型、不同处理下酶活性相关分析表明, CAT 活性与 TBARS 含量之间存在显著的负相关关系(相关系数 $r = -0.9296$); 高度剂量处理下 GPX 活性与 H₂O₂ 含量之间亦存在显著的负相关关系(相关系数 $r = -0.8924$), 其他抗氧化酶活性与活性氧之间的相关性并未达到显著水平。解析其原因, 一方面在试验期间内连续 5 次测定, 这些指标均表现为一定阈值内的动态性变化, 另一方面也同时印证孔石莼通过多种抗氧化酶协同作用来控制细胞内活性氧水平, 而并非由某一种酶发挥绝对核心作用。

作为抗氧化体系的另一主要成分, AsA 具有多种抗氧化功能, 可以还原 O₂^{•-}, 清除 ·OH, 猝灭 ¹O₂ 及 H₂O₂ 等从而使植物体内的活性氧维持在较低范围^[36]。此外, 海藻藻体内 GSH 含量能够受到 UV-B 辐射的显著影响, 并且其变化情况与辐射剂量及辐射时间的改变关系密切, 如海洋绿藻 *Ulva fasciata* 随辐射剂量加大, AsA 从较小值跃升至峰值并一直保持在较高水平; GSH 含量随辐射剂量加大, GSH 含量也逐渐增大, 但超过一定范围后, GSH 含量反而又降至较低水平^[11]。本文的研究结果与前人稍有不同。本试验发现孔石莼具有较高的 AsA 及 GSH 基础含量, 在低、中剂量时, 二者在处理的初中期均会被诱导升高, 但高度剂量及较长时间的辐射胁迫又会使含量呈下降的必然趋势(图 3a, 图 3b), 这可能是由于试验中辐射剂量不同及种间差异性导致。Roleda 同样指出对紫外线的敏感性取决于海藻的种类及生态型^[37]。进一步相关性分析表明, 高度剂量处理下 AsA 含量与 H₂O₂ 水平之间存在极显著的负相关关系(相关系数 $r = -0.9848$), 与 TBARS 含量之间则相关显著(相

关系数 $r = -0.9381$ 。

同工酶是催化反应相同而结构及理化性质不同的酶的分子类型,是植物细胞代谢的重要调节成分。本研究中,孔石莼不但表现出较高的SOD应激活性,并且SOD同工酶也在UV-B作用下发生了一定的改变。SOD是一种金属蛋白酶,根据其金属辅基的不同又分为3种类型,分别为Mn-SOD、Cu/Zn-SOD及Fe-SOD,分布于细胞中的不同部位^[38]。在本研究中,孔石莼中鉴定出SOD、SOD及SOD谱带类型均为Mn-SOD(图4a)。有的研究者曾经报道O₃及UV-B处理能够诱导Cu/Zn-SOD,但不能影响Mn-SOD^[39]。然而,本研究结果显示Mn-SOD(SODI)在UV-B诱导下活性显著增加,这些实验结果的差异,亦可能为SOD同工酶的种间差异所导致。此外,上述结果同时表明海藻中SOD同工酶对不同剂量紫外辐射的响应可以在转录及转录后水平。Sano等^[40]研究发现,一种海藻*Galdieria partita*中至少含有两种APX同工酶,这是海藻细胞中关于APX同工酶的最早报道。本研究中,孔石莼APX同工酶变化相对稳定(图4d),而CAT酶同工酶活性相对较高,在电泳图上表现为高亮度的谱带(图4c),表明藻体细胞具有一定的紫外保护能力,能在一定程度上降低对藻体的伤害。笔者推测,某些SOD或CAT保留或加强的同工酶与孔石莼对紫外的抗性紧密相关。

生长速率的变化亦被普遍用于衡量胁迫水平^[41]。在本研究中,轻度剂量导致轻微胁迫,而中、高度剂量导致中度及严重胁迫。与中、高度剂量相比,海藻在轻度剂量下SGR相对较高(图1),表明孔石莼能在较温和的胁迫下保持一定生长速度,而在更严重的胁迫下受到伤害。

综上所述,孔石莼中抗氧化系统在紫外处理下表现出不同程度的响应。SOD、POX、CAT及在紫外处理初期均有不同程度增加,GR、GPX、APX酶活性应激反应滞后,在处理中、后期活性上升,尤其在低度及中度剂量下上升幅度较大;然而,随着紫外剂量的加大,保护酶活性亦受抑,正常代谢受阻,脂质过氧化产物累积,SGR不可避免呈降低趋势。因此,孔石莼通过提高抗氧化系统活性作为一种生化防御机制来应对紫外辐射所产生的氧化胁迫,仅可在一定程度及一定范围内发挥作用。

参考文献:

[1] Madronich S, McKenzie R L, Björn LO, et al. Changes

in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface[J]. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology*, 1998, 46(1-3): 5-19.

- [2] Roleda M Y. Photosynthetic response of Arctic kelp zoospores exposed to radiation and thermal stress[J]. *Photochemical & Photobiological Science*, 2009, 8(9): 1302-1312.
- [3] 王晶, 侯红英. 青岛地区太阳紫外线辐射研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(4): 671-676.
Wang Jing, Hou Hongying. Research of solar ultraviolet radiation in the Qingdao region[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(4): 671-676.
- [4] Li G, Gao K S, Gao G. differential impacts of solar uv radiation on photosynthetic carbon fixation from the coastal to offshore surface waters in the South China Sea[J]. *Photochemistry & Photobiology*, 2011, 87(2): 329-334.
- [5] Shindell D T, Rind D, Loneragan P. Increased polar stratospheric ozones losses and delayed eventual recovery owing to increasing greenhouse-gas concentrations[J]. *Nature*, 1998, 392: 589-592.
- [6] Li L X, Zhao J Q, Tang X X. Ultraviolet irradiation induced oxidative stress and response of antioxidant system in an intertidal macroalgae *Corallina officinalis* L[J]. *Journal of Environment Sciences*, 2010, 22(5): 716-722.
- [7] Van de Poll W H, Eggert A, Buma A G J, et al. Effects of UV-B-induced DNA damage and photoinhibition on growth of temperate marine red macrophytes: habitat-related differences in UV-B tolerance [J]. *Journal of Phycology*, 2001, 37(1): 30-38.
- [8] Han T, Han YS, Kim K Y, et al. Influences of light and UV-B on growth and sporulation of the green alga *Ulva pertusa* Kjellman[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, 290(1): 115-131.
- [9] Roleda M Y, Nyberg C D, Wulff A. UVR defense mechanisms in eurytopic and invasive *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariiales, Rhodophyta)[J]. *Physiologia Plantarum*, 2012, 146(2): 205-216.
- [10] Roleda, M Y, Hanelt D, Wiencke C. Growth and DNA damage in young *Laminaria* sporophytes exposed to ultraviolet radiation: implication for depth zonation of kelps on Helgoland (North Sea) [J]. *Marine Biology*, 2006, 148(6): 1201-1211.
- [11] Shiu C T, Lee T M. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate-glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005. 56(421): 2851-2865.
- [12] Rijstenbil J W. Assessment of oxidative stress in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana* in response to UVA and UVB radiation[J]. *Journal of Plankton*

- Research, 2002, 24(12): 1277-1288.
- [13] Schweikert K, Burritt D J. The organophosphate insecticide coumaphos induces oxidative stress and increases antioxidant and detoxification defences in the green macroalgae *Ulva pertusa*[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 122-123(3): 86-92.
- [14] Larkum A W D, Wood W F. The effect of UV-B radiation on photosynthesis and respiration of phytoplankton, benthic macroalgae and seagrasses [J]. Photosynthesis Research, 1993, 36(1): 17-23.
- [15] 吕冬伟, 刘峰, 李兴佐. 大型海藻孔石莼在工厂化海水养殖中的生物修复及其应用前景[J]. 海洋科学, 2012, 36(12): 95-98.
Lǚ Dongwei, Liu Feng, Li Xingzuo. The integrated development and application of macro algae *Ulva pertusa* on factory marine aquaculture[J]. Marine Sciences, 2012, 36(12): 95-98.
- [16] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants[J]. Plant Physiology, 1977, 59(2): 309-314.
- [17] Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs[J]. Physiological Reviews, 1979, 59(3): 527-605.
- [18] Dias M A, Costa M M. Effect of low salt concentrations on nitrate reductase and peroxidase of sugar beet leaves [J]. Journal of Experimental Botany, 1983, 34(5): 537-543.
- [19] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. Plant & Cell Physiology, 1981, 22(5): 867-880.
- [20] 黄爱纓, 吴珍岭. 水稻谷胱甘肽过氧化物酶的测定法[J]. 西南农业大学学报, 1999, 21(4): 324-327.
Huang Aiyong, Wu Zhenling. Determination of glutathione peroxidase in rice seedlings[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 1999, 21(4): 324-327.
- [21] Knörzer O C, Durner J, Böger P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress[J]. Physiologia Plantarum, 1996, 97(2): 388-396.
- [22] 沙爱华, 黄俊斌, 林兴华, 等. 水稻白叶枯病成株抗性与过氧化氢含量及几种酶活性变化的关系[J]. 植物病理学报, 2004, 34(4): 340-345.
Sha Aihua, Huang Junbin, Lin Xinghua, et al. The change in hydrogen peroxide content and enzyme activity related to adult plant resistance to Rice bacterial blight[J]. Acta Phytopathologica sinica, 2004, 34(4): 340-345.
- [23] Heath R L, Packer G. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968, 125(1): 189-198.
- [24] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [25] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1): 276-287.
- [26] Woodbury W, Spencer A K, Stahmann M A. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1): 301-305.
- [27] Van Loon L C. Tobacco polyphenoloxidases: A specific staining method indicating non-identify with peroxidases[J]. Phytochemistry, 1970, 10(3): 503-507.
- [28] Mittler R, Zilinskas B A. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium[J]. Analytical Biochemistry, 1993, 212(2): 540-546.
- [29] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves[J]. Plant Physiology, 1992, 98(4): 1222-1227.
- [30] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1959, 82(1): 70-77.
- [31] Rautenberger R, Wiencke C, Kai B. Acclimation to UV radiation and antioxidative defence in the endemic Antarctic brown macroalga *Desmarestia anceps* along a depth gradient[J]. Polar Biology, 2013, 36(12): 1779-1789.
- [32] Zhao J Q, Li L X. Effects of UV-B irradiation on isoforms of antioxidant enzymes and their activities in red alga *Grateloupia filicina* (Rhodophyta)[J]. Chinese Journal of Oceanology and limnology, 2014, 32(6): 1364-1372.
- [33] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55(1): 373-399.
- [34] Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(10): 5751-5754.
- [35] Calabrese E J, Baldwin L A. Toxicology rethinks its central belief-Hormesis demands a reappraisal of the way risks are assessed [J]. Nature, 2003, 421(6924): 691-692.
- [36] Buckland S M, Price A H, Hendry G A F. The role of ascorbate in drought-treated *cochlearia atlantica* Poved. and *Armeria maritima* (Mill) willd[J]. New Phytologist, 1991, 119(1): 155-160.
- [37] Roleda M Y. Photosynthetic response of Arctic kelp zoospores exposed to radiation and thermal stress[J].

- Photochemical & Photobiological Sciences, 2009, 8(9): 1302-1312.
- [38] Bowler C, Camp W V, Montagu M V, et al. Superoxide dismutase in plants[J]. Critical Reviews in Plant. Sciences, 1994, 13(3): 199-218.
- [39] Rao M V, Paliyath G, Ormrod D P. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology, 1996, 110(1): 125-136.
- [40] Sano S, Ueda M, Kitajima S, et al. Characterization of ascorbate peroxidases from unicellular red alga *Galdieria partita*[J]. Plant & Cell Physiology, 2001, 42(4): 433-440.
- [41] 凌晶宇, 梁洲瑞, 王飞久, 等. 温度胁迫对掌状海带幼苗生长、抗氧化系统及叶绿素荧光的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(12): 39-45.
- Ling Jingyu, Liang Zhourui, Wang Feijiu, et al. Effects of temperature stress on the growth, antioxidant system, and chlorophyll fluorescence of *Laminaria digitate*[J]. Marine Sciences, 2015, 39(12): 39-45.

Effect of UV radiation on the activities of antioxidant enzymes and their isoforms in *Ulva pertusa* (Chlorophyta)

LI Li-xia, WANG Xiu-jing, ZHAO Ji-qiang

(College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Jul. 5, 2016

Key words: UV-B radiation; *Ulva pertusa*; antioxidant system; isoenzyme

Abstract: The marine ecosystem inevitably undergoes stress because of exposure to enhanced UV-B radiations. The response of the antioxidant defense system, including that of SOD, CAT, POX, APX, GR, and GPX, of the intertidal macroalgae *Ulva pertusa* to different doses of UV-B radiation and the first four isoenzyme patterns were investigated. SOD, CAT, and POX rapidly responded to UV-B radiation. The response significantly increased during the initial stage of UV-B treatments. The APX activity remained at a more stable level throughout the exposure. The responses of GR and GPX to UV-B stress were observed later, and an activity peak appeared on day 6. The enzymatic assay revealed four distinct bands of SOD, and SOD₁ and SOD₂ activities increased following exposure to UV-B radiation. The activity of POX₁ isoenzyme slightly increased following the exposure to UV-B radiation. In addition, new bands of CAT₁ and CAT₂ were detected in response to UV treatments. Only one APX band was detected, and there was no significant difference with respect to Ck. The concentrations of antioxidants such as AsA and GSH were similar to those in the control during the early-to-medium term. SGR reduced following exposure to all three doses, including 1.6, 4.8, and 9.6 kJ/(m²·d), and significantly decreased in the latter two treatments. H₂O₂ and TBARS concentrations significantly increased compared with those in the control. These data suggested that the protection mechanisms of the antioxidant defense system are partly inducible by UV-B to prevent damage and that the enzyme activities change in response to UV-B radiation in a time- and dose-dependent manner.

(本文编辑: 梁德海)