

The Effect of Uranium Stress to Yeast Cell Antioxidant Enzymes Activities under Acute Conditions

ZHANG Dong¹, LIU Ming-xue^{2,3}, KANG Hou-jun¹, ZHANG Wei³, LI Ye¹, GOU Qing-bi², DONG Fa-qin^{3,*}

¹ Institute of Nuclear Physics and Chemistry, China Academy of Engineering Physics, Mianyang, Sichuan 621900, China

² Life Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan, 621010, China

³ National Defense Key Discipline Laboratory of the Nuclear Waste and Environmental Safety of the Commission of Science, Technology and Industry for National Defense, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, China

Email: dragonmx@126.com

Abstract: The malonaldehyde(MDA) and three antioxidant enzymes activity changes of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) have been investigated under uranium acute stress to explore the cell tolerance mechanism to uranium stress in this research. The results showed that yeast cell may be affected by oxidative stress and lead to oxidative damage of membrane lipid as a results of the increase of MDA contents under low uranium concentration short time stress conditions, then the cell would be induced to increase the antioxidant enzyme activity to scavenge the oxidative stress as a result of decrease of MDA contents with the culture time prolonging. While the high concentration uranium stress may inhibit the antioxidant enzyme activity and lead to irreversible oxidative damage as a result of invariable increase of MDA contents. We suggested that yeast cell tolerance mechanism to uranium under acute stress conditions were: 1) the low uranium stress may induce cell to increase the antioxidant enzyme activity to scavenge oxidative damage and 2) the high concentration uranium may form precipitate or crystal with the cell wall or cell secretion substance outside of the cell to avoid acute lethal action to yeast cell under acute stress conditions but it yet will lead to irreversible oxidative damage.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; Uranium acute Stress; MDA; Antioxidant enzymes

急性条件下铀对酵母菌抗氧化酶活性的影响

张东¹, 刘明学^{2,3}, 康厚军¹, 张伟³, 李焯¹, 苟清碧², 董发勤^{3,*}

¹ 中国工程物理研究院核物理与化学研究所, 四川绵阳, 621900;

² 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳, 621010;

³ 西南科技大学核废物与环境安全国防重点学科实验室, 四川绵阳, 621010

Email: dragonmx@126.com

摘要: 本研究通过对酵母菌在铀急性胁迫作用下丙二醛(MDA)含量及三种抗氧化酶活性的变化来探讨细胞铀耐受机制。结果表明: 低浓度铀作用下, 细胞首先会受到氧化胁迫的影响, 造成氧化损伤, MDA含量会大幅升高, 同时细胞会启动抗氧化酶活性, 使活性氧得到清除, 降低膜脂过氧化, MDA含量随着降低。中高浓度, 特别是高浓度铀会抑制细胞的抗氧化酶活性, 使细胞无法完全恢复对氧化胁迫的适应, 最后造成MDA含量维持在一定水平。结果表明在急性条件下酵母细胞对铀的耐受机制存在两个方面: 一是在低浓度下短时间作用内迅速启动抗氧化酶系统来清除铀氧化胁迫带来的危害; 二是高浓度下, 细胞壁及细胞分泌物等可与铀作用形成沉淀或结晶于胞外, 降低高浓度铀的急性致死作用, 但中高浓度铀仍然会抑制抗氧化酶的活性, 造成膜脂的不可逆过氧化损伤。

关键词: 酵母菌; 铀胁迫; 丙二醛; 抗氧化酶

1 引言

铀对生物的毒性已有很长的研究历史, 但主要限于

对人体、动物、动物模型、植物等^[1], 对微生物的影响报道较少, 而铀胁迫对微生物氧化酶系统的影响研究更鲜见报道。

我们前期研究^[2]发现在短时间(18 h)内培养条件下酵母菌对铀有较强的耐受能力, 通过生长曲线分析发

资助信息: 国家自然科学基金委员会—中国工程物理研究院联合基金资助项目《微生物对放射性核素的吸附富集研究》(10776027)

现只有当铀浓度超过 300 mg L^{-1} 的浓度下才会对酵母菌生长起显著的抑制作用。Hu 等人^[3]报道 *Caulobacter crescentus* 菌在 1 mM (约 238 mg L^{-1}) 铀浓度条件下对其生长没有影响。Ruggiero 等人^[4-5]研究表明铀在 2.5 mmol L^{-1} (约 670 mg L^{-1}) 时才会抑制 *Deinococcus radiodurans* 的生长。这些研究表明微生物对铀有较强的耐受能力。然而对于微生物耐受机制却还未完全阐明。由于重金属等与非有毒金属结构、价态等方面的相似性, 重金属经常可以通过正常的转运途径转运进细胞内^[6], 与细胞内的分子发生相互作用^[7]而产生细胞氧化胁迫^[8]。

重金属使生物体内抗氧化酶(如 SOD)活性下降, 造成活性氧自由基(ROS)的过量积累。在正常代谢中, 尽管生物体内也能产生一定量的 ROS, 但由于体内抗氧化系统的作用, 使产生的 ROS 得以清除, 从而使 ROS 的含量维持在非危水平^[9]。这种平衡对细胞的生长等正常生理功能带来了巨大的影响。因此本研究将对微生物细胞在急性条件下不同作用时间段不同铀浓度胁迫下的抗氧化酶活力进行测定, 分析急性条件下铀胁迫对微生物抗氧化酶活性的影响, 探讨微生物细胞可能的铀耐受酶学机制。

2 材料与方法

2.1 实验菌株与培养基

酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*), 由西南科技大学生命科学与工程学院实验中心提供。培养基: 葡萄糖 50 g , 尿素 1 g , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g , Na_2HPO_4 0.5 g , 酵母膏 0.5 g , 水 1000 mL , $\text{pH} = 4.5$ 。

2.2 急性实验方法

配制酵母菌生长培养基, 取锥形瓶分装, 接菌 30°C 振荡培养至对数生长期, 按铀(醋酸双氧铀: 分子式 $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 分析纯)浓度 0 mg L^{-1} (对照组), 100 mg L^{-1} (低浓度组), 200 mg L^{-1} (中浓度组), 400 mg L^{-1} (高浓度组) 共 4 个梯度三个平行编号, 加入相应试剂继续常规培养。在加入铀培养 2h (细胞生长刺激期), 6h (细胞生长高速期), 16h (细胞生长迟滞期) 后取 10 mL 菌液 5000 rpm 离心 5 min 分离上清和沉淀, 弃取上清, 沉淀洗涤后用于超声破碎备用。

2.3 样品液的制备

在收获的菌体(各组调整湿重一致)中加入超声缓冲液(20 mM Tris-HCl $\text{pH} 8.0$, 2.5 mM EDTA $\text{pH} 8.0$, 0.5% Triton X-100)至离心管刻度 1.5 mL , 用超声波细胞破碎仪在冰浴中破碎菌体 $1-2 \text{ min}$ 至菌液澄清, 菌体破碎后用高速离心机在 12000 rpm 高速离心 40 min 分离上清和沉淀, 上清液即为样品液, 将样品液转移至空离心管中备用。

2.4 MDA 含量和抗氧化酶活力测定^[10]

MDA 含量的测定用分光光度计法; 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定用抑制氮蓝四唑(NBT)光化学还原法; 过氧化氢酶(CAT)活性的测定用紫外吸收法; 过氧化物酶(POD)活性的测定用愈疮木酚法。所有指标的测定均重复 3 次, 最终结果取 3 次试验的平均值。

2.5 数据处理

所得数据利用 EXCEL 2003 进行可重复双因素方差分析与绘图。

3 结果与分析

3.1 MDA 含量变化

细胞内 ROS 物质的累积会造成膜脂的过氧化, MDA 含量通常作为衡量细胞抗逆性的重要指标^[11]。由图 1 可以看出, 在加入铀后与对照组相比, MDA 含量均有一定幅度的上升(平均增幅在 60% 以上)。低浓度下, MDA 含量增长低于高浓度条件下, 且会随时间的延长而降低, 表明细胞对氧化胁迫有较好的清除或适应作用。在铀含量增加的情况下, MDA 含量有较大幅度的增加。在中浓度下, MDA 含量均随作用时间的延长而降低, 表明酵母菌对铀有一定的适应, 但在高浓度下, MDA 含量增长后基本不变, 可能是铀对细胞造成了一定的不可逆影响, 原因可能是持续胁迫形成的过氧化损伤。从统计学上方差分析结果来看, 各浓度对 MDA 含量的影响 $P = 5.72\text{E}-5 < 0.01$, 达到极显著, 各时间段对 MDA 含量影响 $P = 0.016956 < 0.05$, 达到显著水平。但浓度与时间交互作用 $P = 0.664763 > 0.05$, 不具显著水平。综合来说, 铀浓度是决定铀氧化胁迫的主要因素, 且会随时间的延长而减轻, 说明细胞对铀氧化胁迫有一定的适应或清除机制。

3.2 SOD 活性变化

许多细胞内的 SOD 是清除活性氧的第一道防线。从图2可以看出SOD酶活性随培养时间的延长而活性逐渐升高。铀的加入会抑制酶的活性，这种抑制作用在低中浓度表现较为相似，而在高浓度时抑制作用更显著。在低浓度短时间作用条件下，SOD酶活力增加了68.7%，但随时间的延长，酶活力又分别降了18%-23%。在中高浓度下，酶活力受到抑制，最高降幅达到38.6%。从统计学上方差分析结果来看，各浓度对SOD酶活力的影响 $P = 1.34E-6 < 0.01$ ，达到极显著，各时间段对SOD酶活力影响 $P = 8.08E-17 < 0.01$ ，达到极显著水平。浓度与时间交互作用 $P = 2.34E-10 < 0.01$ ，具极显著水平。以上结果表明低浓度铀短时间作用对细胞SOD酶活力有诱导作用，而高浓度铀会极显著抑制酶的活性。

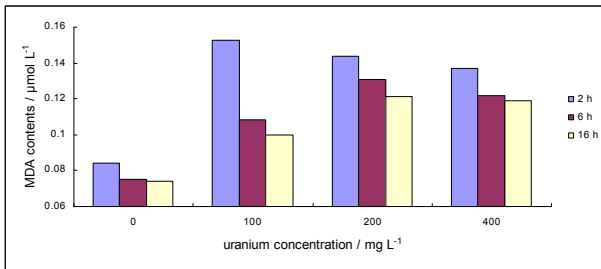


Figure 1. *Saccharomyces cerevisiae* cell MDA contents changes under uranium acute stress conditions

图 1. 铀急性胁迫下酵母细胞 MDA 含量变化

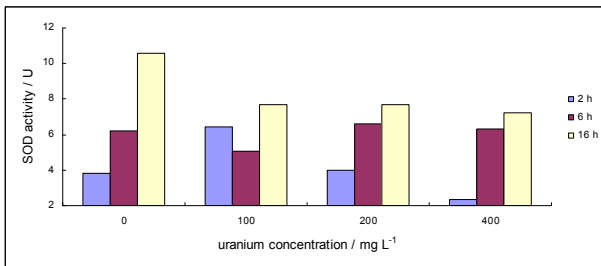


Figure2. *Saccharomyces cerevisiae* cell SOD activity changes under uranium acute stress conditions

图 2. 铀急性胁迫下酵母细胞 SOD 活力变化

3.3 CAT 活性变化

CAT 酶是清除 H₂O₂ 的酶。从图 3 可以看出，在急性胁迫条件下，铀对 CAT 活性影响最显著。与 SOD 活性变化相反，CAT 活性随培养时间延长而降低。从时间上分析，可能是随着培养时间的延长，细胞逐渐

进入衰亡期，CAT 酶活性逐渐降低。在加入铀后，低浓度铀对细胞对氧化胁迫不显著，使 CAT 酶活性与对照组相比几乎无变化 ($P > 0.05$)，表明低浓度铀对细胞毒性较小，氧化胁迫较低，未能启动 CAT 活性。但中高浓度的铀会显著抑制 CAT 的活性，这种抑制作用与浓度、时间呈正相关关系。与对照相比，最高酶活性抑制达到 83%。从统计学上方差分析结果来看，各浓度对 CAT 酶活力的影响 $P = 6.5E-15 < 0.01$ ，达到极显著，各时间段对 CAT 酶活力影响 $P = 6.23E-12 < 0.01$ ，达到极显著水平。浓度与时间交互作用 $P = 1.51E-6 < 0.01$ ，具极显著水平。以上结果表明低浓度铀短时间作用对细胞 CAT 酶活力影响不大，而高浓度铀、长时间作用会极显著抑制酶的活性。

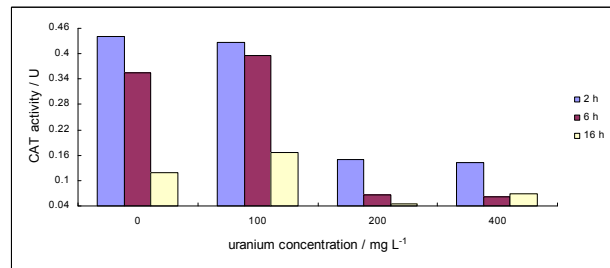


Figure3. *Saccharomyces cerevisiae* cell CAT activity changes under uranium acute stress conditions

图 3. 铀急性胁迫下酵母细胞 CAT 活力变化

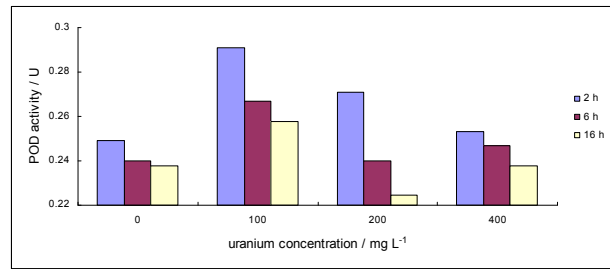


Figure4. *Saccharomyces cerevisiae* cell POD activity changes under uranium acute stress conditions

图 4. 铀急性胁迫下酵母细胞 POD 活力变化

3.4 POD 活性变化

POD 是氧化胁迫的标志酶，可以清除 H₂O₂ 等 ROS。由图 4 可以看出，在加入铀后与对照组相比，POD 酶活力均有一定幅度的上升。低浓度铀作用下，POD 酶活力升高显著 (16%)，特别是在短时间接触后会迅速刺激 POD 酶活力。POD 活力随培养时间的

延长而降低,表明铀进入细胞后会抑制细胞 POD 的活性或随细胞年龄的增长 POD 活性降低。在中高铀浓度情况下, POD 活力变化趋势与在低浓度铀胁迫下相似,但酶活力较低,表明高浓度铀会抑制酶的活力,特别是在较长时间作用条件下。从统计学上方差分析结果来看,各浓度对 POD 酶活力的影响 $P = 1.35E-7 < 0.01$, 达到极显著,各时间段对 POD 酶活力影响 $P = 1.45E-7 < 0.01$, 达到极显著水平。浓度与时间交互作用 $P = 0.017582 < 0.05$, 具显著水平。结果表明铀短时间接触可诱导 POD 酶活力的升高,而长时间作用会抑制酶的活性。

4 讨论

细胞内的抗氧化酶是诱导酶,在细胞受到氧化胁迫时随 ROS 含量的升高而活性升高^[11]。从前面的结果可以看出,接触铀后,细胞首先会受到氧化胁迫的影响,造成氧化损伤胁迫,MDA 含量升高 80% 以上,随着氧化胁迫的产生,细胞会启动抗氧化酶活性,使 ROS 得到清除,降低膜脂过氧化,MDA 含量随着降低。也就是说低浓度铀刺激后细胞会逐渐产生适应机制。但中高浓度,特别是高浓度铀会破坏细胞的抗氧化酶活性,使细胞无法完全恢复对氧化胁迫的适应,最后造成 MDA 含量维持在一定水平。Hu 等人^[3]的研究发现 1mM 铀胁迫只能诱导 *Caulobacter crescentus* 菌 SOD 活性升高 3 倍,而相同条件下镉诱导 SOD 活性升高 19 倍,造成这种活性变化的原因是大部分重金属进入细胞诱导细胞内 SOD 活性升高,而铀很容易在细胞外沉淀。我们研究也发现铀在培养条件下在胞外会形成铀沉淀或结晶物,这种晶体可能是变钙铀云母 ($Ca[UO_2PO_4] \cdot 6H_2O$)^[2-3]。在高浓度下铀还容易与培养基成份发生非特异沉淀反应^[2,13]。

因此在急性条件下酵母细胞对铀的耐受机制存在两个方面。一是在低浓度下短时间作用内迅速启动抗氧化酶系统来清除铀氧化胁迫带来的 ROS 危害,随时间的延长,酶活性得到稳定的表达,从而使细胞能适应低浓度铀胁迫;二是高浓度下,细胞外及细胞分泌物等可与铀作用形成沉淀或结晶于胞外,降低高浓度

铀的急性致死作用,但中高浓度铀仍然会抑制抗氧化酶的活性,造成膜脂的不可逆过氧化损伤,因此在长时间作用下可能会造成细胞的严重损伤,但具体的影响有待进一步在铀长时间作用下进行分析。

References (参考文献)

- [1] Craft E.S., Abu-Qare A.W., Flaherty M.M., *et al.* Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects [J]. *J. Toxic. Envir. Heal. Part B: Critical Reviews*, 2004, 7: 297-317.
- [2] Liu M.X., Dong F.Q., Yan X.Y., *et al.* Biosorption of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and surface interactions under culture conditions [J]. *Bioresour. Technol.* 2010, in press.
- [3] Hu P., Brodie E.L., Suzuki Y., *et al.* Whole-Genome Transcriptional Analysis of Heavy Metal Stresses in *Caulobacter crescentus* [J]. *J. Bacteriol.* 2005, 187(24): 8437-8449.
- [4] Ruggiero C.E., Boukhalfa H., Forsythe J.H., *et al.* Actinide and metal toxicity to prospective bioremediation bacteria [J]. *Environ. Microbiol.*, 2005, 7: 88-97.
- [5] Khijniak, T.V., Slobodkin, A.I., Coker, V., *et al.* Reduction of uranium(VI) phosphate during growth of the thermophilic bacterium *Thermoterrabacterium ferrireducens* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 6423-6426.
- [6] Nies, D.H. Microbial heavy-metal resistance [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 51:730-750.
- [7] Rensing, C., Mitra B., Rosen B.P. Insertional inactivation of dsbA produces sensitivity to cadmium and zinc in *Escherichia coli* [J]. *J. Bacteriol.* 1997, 179:2769-2771.
- [8] Kachur A.V., Koch C.J., Biaglow J.E. Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione [J]. *Free Radic. Res.* 1998, 28:259-269.
- [9] Choudhary M., Jetley U.K., Abash Khan M., *et al.* Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5 [J]. *Ecotoxic. Envir. Safety*, 2007, 66: 204-209.
- [10] Liu M.X., Li B.F., Wang X.D. Drought Stress Effects On The Antioxidant Enzymes Of Wheat Varieties With Different Senescence Types [J]. *Anhui Agric. Sci.*, 2008,36(18):9851-9853 (Ch).
刘明学,李邦发,王晓东.干旱胁迫对不同抗衰老类型小麦抗氧化酶活性的影响[J].安徽农业科学,2008,36(18):9851-9853
- [11] Yang Y., Guo Z.H., Gen M.J., *et al.* Active oxygen metabolism differences and Al tolerance of different Al-tolerant wheat under aluminum stress [J]. *Ecol. Environ. Sci.*, 2010, 19(1): 177-182 (Ch).
杨野,郭再华,耿明建,王伟,宁大伟,赵竹青.铝胁迫下不同耐铝小麦品种活性氧代谢差异及与小麦耐铝性的关系[J].生态环境学报,2010,19(1):177-182.
- [12] Tang C.F., Liu Y.G., Zeng G.M., *et al.* Effects of exogenous spermidine on antioxidant system responses of *Typha latifolia* L. under Cd²⁺ stress [J]. *J. Intergr. Plant Biol.*, 2005, 47: 428-434.
- [13] Liu M.X., Pang X.F., Dong F.Q., *et al.* The Interaction between Uranium and Bovine Serum Albumin [C]. *EPPH2010*, PID1008704.