

# The Effect of Strontium Stress to Yeast Cell Antioxidant Enzyme Activities under Acute Conditions

LIU Ming-xue<sup>1,3</sup>, ZHANG Dong<sup>2</sup>, KANG Hou-jun<sup>2</sup>, ZHANG Wei<sup>3</sup>, LI Ye<sup>2</sup>, GOU Qing-bi<sup>1</sup>, DONG Fa-qin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Life Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan, 621010, China

<sup>2</sup>Institute of Nuclear Physics and Chemistry, China Academy of Engineering Physics, Mianyang, Sichuan 621900, China

<sup>3</sup>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: dragonlmx@126.com

**Abstract:** The malonaldehyde (MDA) and three antioxidant enzymes activity changes of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) have been investigated under strontium acute stress to explore the cell tolerance mechanism to strontium stress in this research. The results showed that: 1) The low concentration strontium did not lead visible oxidative damage. 2) 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 middle strontium 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. The antioxidant enzymes induce mode was different to other heavy metals. 3) The high concentration strontium stress may inhibit the antioxidant enzyme activity and lead to irreversible oxidative damage as a result of great increase of MDA contents. We suggested that yeast cell tolerance mechanism to strontium under acute stress conditions were: 1) the low strontium stress may induce cell to increase the antioxidant enzyme activity to scavenge oxidative damage and 2) the high concentration strontium may form precipitate with cell membrane or culture medium 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*; Strontium acute Stress; MDA; Antioxidant enzymes

## 急性条件下锶对酵母菌抗氧化酶活性的影响

刘明学<sup>1,3</sup>, 张东<sup>2</sup>, 康厚军<sup>2</sup>, 张伟<sup>3</sup>, 李焯<sup>2</sup>, 苟清碧<sup>1</sup>, 董发勤<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳, 621010;

<sup>2</sup>中国工程物理研究院核物理与化学研究所, 四川绵阳, 621900;

<sup>3</sup>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: dragonlmx@126.com

**摘要:** 本研究通过对酵母菌在锶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锶耐受机制。结果表明: 低浓度锶对细胞氧化胁迫不明显。中浓度锶作用下, 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。但锶对抗氧化酶的诱导模式与其他重金属不同。高浓度锶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 含量急剧升高。结果表明在急性条件下酵母细胞对锶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铯氧化胁迫带来的危害; 二是高浓度下, 细胞膜及培养基成分等可与锶作用形成沉淀, 降低高浓度锶的急性致死作用, 但高浓度锶仍然会抑制抗氧化酶的活性。

**关键词:** 酵母菌; 锶胁迫; 丙二醛; 抗氧化酶

## 1 引言

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)

放射污染会造成严重的环境问题。其中放射性锶是污染环境中毒性最强的核素之一<sup>[1]</sup>。放射性锶的半衰期为 28 年, 为裂变产物之一。由于其与 Ca 化学性质接近,

放射性铯容易进入人体并在骨、牙齿等处沉积并通过放射性影响周围组织严重的可导致骨癌、白血病等<sup>[2]</sup>。铯对人体、动物等的影响已有研究<sup>[3-4]</sup>，但对微生物的影响研究较少。

我们前期研究<sup>[5]</sup>发现在培养条件下酵母菌对铯有较强的耐受能力，在胁迫诱导驯化和大剂量冲击驯化条件下，超过 500 mg L<sup>-1</sup> 的铯仍然不能显著抑制酵母菌的生长。其他人<sup>[6]</sup>的研究发现一些微藻可耐受约 200 mg L<sup>-1</sup> 的铯胁迫。一种微生物 *Shewanella oneidensis* 甚至可以在含有 180 mmol L<sup>-1</sup> 的铯离子的培养基中生长<sup>[7]</sup>。这些研究表明一些微生物对铯有超强的耐受能力。我们<sup>[5]</sup>和其他人<sup>[7-9]</sup>的研究发现细胞在高浓度铯中的耐受与细胞外形成含铯沉淀有一定的关系。但急性条件下细胞的生理变化特别是在铯形成的氧化胁迫下细胞自身的抗氧化酶的变化及其在抗氧化胁迫中的作用还未见报道。因此本研究通过对微生物细胞在急性条件下不同作用时间段不同铯浓度胁迫下的抗氧化酶活力进行测定，分析急性条件下铯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铯耐受酶学机制。

## 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 50g，尿素 1g，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g，Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g，酵母膏 0.5g，水 1000 mL，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前期，按铯（硝酸铯：分子式 Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>，分析纯）浓度 0 mg L<sup>-1</sup>（对照组），100 mg L<sup>-1</sup>（低浓度组），200 mg L<sup>-1</sup>（中浓度组），400 mg L<sup>-1</sup>（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。在加入铯培养 2h, 6h, 16h 后取 10mL 菌液 5000 rpm 离心 5min 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 pH8.0, 2.5 mM EDTA pH8.0, 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 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<sup>[10]</sup>

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（P < 0.05）与绘图。

## 3 结果与分析

### 3.1 MDA 含量变化

由图 1 可以看出，在加入铯后与对照组相比，MDA 含量均有一定幅度的上升。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。在铯含量增加的情况下，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增加。在作用前期，MDA 含量增加 81%，随后 MDA 含量有所降低，与对照比只增加了 66%，但在作用末期 MDA 含量增加了 95.9%。这些结果表明细胞对中浓度铯的氧化胁迫有有限的适应能力。但在高浓度下，MDA 含量在作用初期大幅增长约 450%，表明高铯浓度下氧化胁迫严重。从统计学上方差分析结果来看，各浓度、不同时间段及交互作用对 MDA 含量影响的 P 值分别为 4.04E-21、3.02E-7、2.97E-20，均小于 0.01，达到极显著。综合来说，铯浓度是决定铯氧化胁迫的主要因素，低铯浓度下会随时间的延长而减轻，说明细胞对铯氧化胁迫有一定的适应或清除机制，但高浓度铯对细胞氧化胁迫较严重。

### 3.2 SOD 活性变化

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。铯的加入会诱导 SOD 酶的活性。在低浓度短时间作用条件下，SOD 酶活力增加了 72.7%，但随时间的延长，酶活力又分别降了 46%-54%。在中

浓度下，酶活力大幅升高，升高幅度在 70%左右。但高浓度下与对照相比，酶活性变化不大，但与低浓度相比，活性相对受到抑制。从统计学上方差分析结果来看，各浓度、各时间段及交互作用对 SOD 酶活力影响的 P 值分别为 9.39E-12、1.31E-10、7.65E-5 均小于 0.01，具极显著水平。以上结果表明低浓度镉作用对细胞 SOD 酶活力有诱导作用，而高浓度镉会极显著抑制酶的活性。

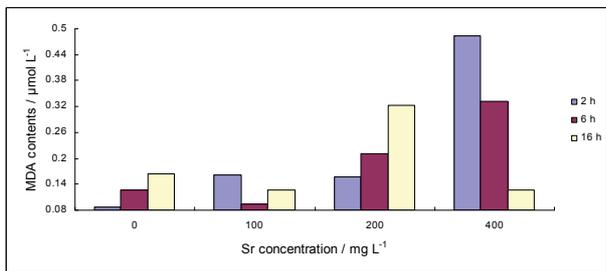


Figure 1. *Saccharomyces cerevisiae* cell MDA contents changes under strontium acute stress conditions

图 1. 镉急性胁迫下酵母细胞 MDA 含量变化

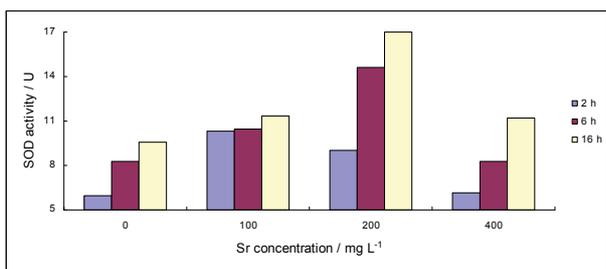


Figure 2. *Saccharomyces cerevisiae* cell SOD activity changes under strontium acute stress conditions

图 2. 镉急性胁迫下酵母细胞 SOD 活力变化

### 3.3 CAT 活性变化

从图 3 可以看出，在急性胁迫条件下，镉对 CAT 活性影响较为显著。与 SOD 活性变化相反，CAT 活性随培养时间延长而降低。在加入镉后，低浓度镉对细胞对氧化胁迫不显著，使 CAT 酶活性与对照组相比降低 8%-49%，表明低浓度镉对细胞 CAT 有轻微的抑制作用。中高浓度的镉会显著抑制 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 85.8%。从统计学上方差分析结果来看，各浓度及各时间段对 CAT 酶活力影响的 P 值

分别为 1.18E-12、2.0E-5 均小于 0.01，达到极显著水平。浓度与时间交互作用  $P = 0.088026 > 0.05$ ，不具极显著水平。以上结果表明低浓度镉短时间作用对细胞 CAT 酶活力影响不大，而高浓度镉、长时间作用会极显著抑制酶的活性。

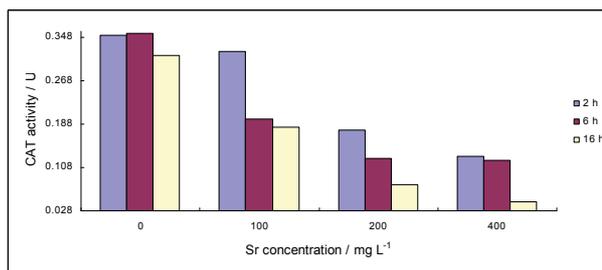


Figure 3. *Saccharomyces cerevisiae* cell CAT activity changes under strontium acute stress conditions

图 3. 急性胁迫下酵母细胞 CAT 活力变化

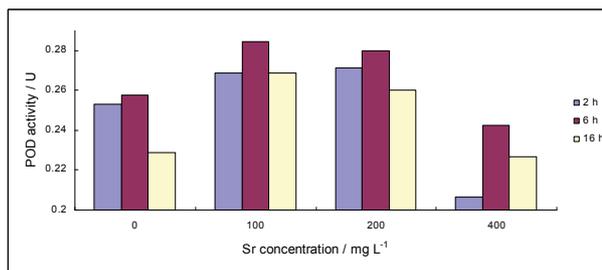


Figure 4. *Saccharomyces cerevisiae* cell POD activity changes under strontium acute stress conditions

图 4. 镉急性胁迫下酵母细胞 POD 活力变化

### 3.4 POD 活性变化

由图 4 可以看出，在加入镉后与对照组相比，中低浓度胁迫下 POD 酶活力均有一定幅度的上升。低浓度镉作用下，POD 酶活力升高明显（17.5%），这种升高具有延迟效应，落后于 SOD 活力升高的时间。由于许多细胞 SOD 是氧化胁迫的第一道防线，SOD 催化超氧阴离子形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的积累可以诱导 CAT、POD 等的活性<sup>[1]</sup>。因此推测 POD 活力升高的延迟是对 SOD 酶活力升高的响应。在高镉浓度情况下，POD 活力变化趋势与在低浓度镉胁迫下相似，但酶活力较低，与对照比降低约 10%，表明高浓度镉会抑制酶的活力，特别是在急性作用条件下。从统计学上方差分

析结果来看,各浓度、各时间段及交互作用对 POD 酶活力影响的 P 值分别为 3.7E-15、2.86E-8、5.62E-5 均小于 0.01, 具极显著水平。结果表明镉短时间接触后在诱导 SOD 活性后可次级激活 POD 的活力而呈现延迟效应。高浓度镉在急性条件下会抑制酶的活性。

## 4 讨论

从前面的结果可以看出,在中浓度镉胁迫下,细胞首先会受到氧化胁迫的影响,造成氧化损伤,MDA 含量会升高 60% 以上。随着氧化胁迫的产生,细胞会启动抗氧化酶活性,首先受到诱导的是 SOD, SOD 活性升高后,又会启动 POD 的活性<sup>[11]</sup>,从而呈现滞后活性升高效应。由于抗氧化酶活性的升高使 ROS 得到清除,降低膜脂过氧化,MDA 含量随着降低。也就是说中浓度镉刺激后细胞会逐渐产生适应机制。而低浓度镉的氧化胁迫不明显。但高浓度镉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。在镉胁迫过程中,CAT 活性会受到较大的影响,使其活性受到抑制。段学军等<sup>[12]</sup>研究在微生物镉胁迫时也发现细胞通过提高 SOD 活性来适应胁迫环境,后期、高浓度时抑制 SOD 活力。叉鞭金藻受镉胁迫时,CAT 活性在低镉浓度时差别不大,但高浓度时升高显著<sup>[13]</sup>。而在本研究与前述研究结果不同,CAT 活性显著受到抑制而 SOD 活性受到激活并次级激活 POD 活性。

Brown 等<sup>[7]</sup>的研究发现细胞耐超高浓度镉的一种方式是在胞外形成含镉沉淀。我们研究中也发现镉在培养条件下会与培养基成份形成  $\text{SrSO}_4$  沉淀,这种原因是在培养基成份中含有  $\text{SO}_4^{2-}$  离子,而高  $\text{Sr}^{2+}$  容易与  $\text{SO}_4^{2-}$  形成沉淀。而在低浓度下形成  $\text{Sr}_3(\text{PO}_4)_2$  沉淀,可能与细胞膜磷脂成份相关<sup>[5]</sup>。这种沉淀物的形成可降低对细胞的镉氧化胁迫。

因此在急性条件下酵母细胞对镉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镉氧化胁迫带来的 ROS 危害,随着时间的延长,酶活性得到稳定的表达,从而使细胞能适应低浓度镉胁迫。二是高浓度下,细胞外膜及培养基等可与镉作用形成沉淀,降低高浓度镉的急性致死作用,但高浓度镉仍然会抑制抗氧化酶的活性。长时间

高镉胁迫并不造成细胞的致死而只是抑制生长,除了形成沉淀<sup>[7]</sup>,还有无其他机制有待进一步研究。

## References (参考文献)

- [1] Mosquera, B., Carvalho, C., Veiga, R., et al. <sup>137</sup>Cs distribution in tropical trees after soil contamination [J]. *Environ. Exp. Bot.* 2006, 55: 273-281.
- [2] Chen, J.P. Batch and continuous adsorption of strontium by plant root tissues [J]. *Bioresour. Technol.*, 1997, 60(3): 185-189.
- [3] Meunier P. J., Roux C., Seeman E. et al. Effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis [J]. *New Engl. J. Med.*, 2004, 350 (5): 459-468.
- [4] Reginster J.Y., Seeman E., De Vernejoul M.C., et al. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: treatment of peripheral osteoporosis (TROPOS) study [J]. *J Clin Metab.* 2005, 90 (5): 2816-2822.
- [5] Liu M.X., Pang X.F., Dong F.Q., et al. The Ashing and volume decreasing analysis of Biosorption of Strontium by Yeast (*Saccaromyces cerevisiae*) Cell [C]. *EPPH2010*, PID1009652.
- [6] Li M., Xu J., Liu Z.L., et al. Strontium stress on marine microalgae *Dicrateria inomata* grow and antioxidant enzymes activities [J]. *Ocenol. et Limnol. Sinica.*, 2004,35(5): 467-472.
- [7] Brown S.D., Martin M., Deshpande S., et al. Cellular response of *Shewanella oneidensis* to strontium stress [J]. *Appl Environ Microbiol.*, 2006, 72(1):890-900.
- [8] Parmar N., Warren L.A., Roden E.E., et al. Solid phase capture of strontium by the iron reducing bacteria *Shewanella alga* strain BrY [J]. *Chem. Geol.* 2000, 169:281-288.
- [9] Roden, E.E., Leonardo M.R., Ferris F. Immobilization of strontium during iron biomineralization coupled to dissimilatory hydrous ferric oxide reduction. *Geochim. Cosmochim. Acta.*, 2002, 66:2823-2839.
- [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 Agricul. 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,等. 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] Dun X.J., Min H. Response of bacteria in oxidative stress by Cd[J]. *J. Safety Environ.*, 2005, 5(2):50-53.  
段学军, 闵航. 稻田土壤细菌对重金属镉的氧化应激反应研究[J]. 安全与环境学报, 2005, 5(2):50-53.
- [13] Li M., Xu J., Liu Z.L., et al. Strontium stress on marine microalgae *Dicrateria inomata* grow and antioxidant enzymes activities[J]. *Ocenol. et Limnol. Sinica.*, 2004,35(5): 467-472.  
李梅,徐瑾,刘志礼,等. 镉诱导的氧化胁迫对叉鞭金藻 (*Dicrateria inornata*) 的影响 [J]. 海洋与湖泊 2004,35(5): 467-472.