

微囊藻毒素-RR 对烟草细胞活力及营养生理的影响

黄文敏^{1,2}, 邢伟^{1,2}, 李敦海¹, 刘永定^{1*} (1.中国科学院水生生物研究所,湖北 武汉 430072 ;2.中国科学院研究生院,北京 100049)

摘要: 采用0.1,1.0,10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的微囊藻毒素-RR(MC-RR)处理烟草BY-2悬浮细胞,测定了细胞活力、细胞内蛋白质含量、可溶性糖含量、硝态氮含量及总磷含量,并且检测了酸性磷酸酶(ACP)的活力变化情况.结果表明,中、高浓度毒素处理细胞2d后,细胞活力及蛋白质含量与对照相比均显著下降.高浓度MC-RR处理降低了胞内可溶性糖的含量,暴露2d后仅为对照的45.57%;低浓度MC-RR处理在后期增加了胞内可溶性糖含量.高浓度毒素处理细胞4d后,细胞内硝态氮含量显著低于对照;中、低浓度毒素处理细胞7d后降低了胞内硝态氮含量.3组毒素处理均降低了胞内总磷含量.到实验结束时,低、中、高浓度处理组的胞内磷含量分别为对照的74.98%、76.47%和84.00%.3组处理组ACP活力与对照相比呈现先降低后升高的趋势.

关键词: 微囊藻毒素-RR;烟草BY-2悬浮细胞;细胞活力;营养生理

中图分类号: X503.23 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2007)03-0382-05

Effect of microcystin-RR on cell viability and nutrient physiology of tobacco BY-2 suspension cells. HUANG Wen-min^{1,2}, XING Wei^{1,2}, LI Dun-hai¹, LIU Yong-ding^{1*} (1.Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China ; 2.Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China). *China Environmental Science*, 2007,27(3) : 382~386

Abstract : Adopting 0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ microcystin-RR (MC-RR) to treat tobacco BY-2 suspension cells, the cell viability, contents of protein, soluble sugar, nitrate-nitrogen, and total phosphorus in cells were determined; and the viability change condition of acid phosphatase (ACP) was detected. The cell viability and protein content after the cells were treated by middle and high concentration toxin for 2d decreased markedly compared with the contrast. The soluble sugar content decreased by treating of high concentration MC-RR, after exposure of 2d, it was only 45.57% of the contrast. The soluble sugar content increased in the later period of low concentration MC-RR treating. After the cells were treated by high concentration toxin for 4d, the content of nitrate-nitrogen in cells were lower markedly than the contrast, after the cells were treated by middle and low concentration toxin for 7d, the content of nitrate-nitrogen in cells were lowered. 3 groups of toxin treating all lowered the total phosphorus content. At the end of test, the phosphorus contently of low, middle, high concentration treating groups were 74.98%, 76.47% and 84.00% of the contrast respectively. The ACP activity of 3 treating groups compared with the contrast appeared the tendency of first lowering then raising.

Key words : microcystin-RR ; tobacco BY-2 suspension cell ; cell viability ; nutrient physiology

藻毒素的产生是蓝藻水华污染的主要危害之一.在已发现的藻毒素中,微囊藻毒素(MC)的毒性较大,危害也最严重.MC具有60多种变体,其中以MC-LR、MC-RR和MC-YR为主,滇池微囊藻水华产生的MC主要为MC-RR^[1].研究表明,微囊藻水华可以减少沉水植物的生物量^[2],并导致水生植物的群落减小^[3].在植株个体水平上,MC能抑制陆生^[4]及水生植物^[5]的生长,减少其叶绿素含量^[6].但MC对植物营养生理的影响未见报道.

烟草BY-2悬浮细胞作为模式生物检测藻毒素的毒性机理,具有细胞颗粒细小且分散均匀,并且培养条件严格一致的优点,这样既保证了实验中细胞与毒素的充分接触,重复样品间较好的平行性,也保证了批次实验间的可对比性及可重复

收稿日期: 2006-09-18

基金项目: 国家“973”项目(2002CB412300);国家“863”项目(2005AA601010)

* 责任作者, 研究员, liuyd@ihb.ac.cn

性.目前有关MC-RR的毒性机理研究在烟草BY-2细胞中已展开了相关工作,尹黎燕等^[1,7-8]研究发现,MC-RR可对烟草BY-2细胞造成氧化胁迫,并激发细胞内抗氧化系统的响应;此外,MC-RR还可诱导烟草细胞的凋亡.本实验从营养代谢的角度着手,研究了MC-RR暴露后,烟草细胞活力、细胞内蛋白质含量、可溶性糖含量及硝态氮、总磷和与磷代谢相关的酶等若干指标的变化情况,探讨了MC对烟草悬浮细胞中与营养代谢相关的生理态势的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

烟草悬浮细胞(*Nicotiana. tabacum* L. cv. Bright Yellow 2)由中国科学院武汉植物园尹黎燕博士提供.细胞在改良的MS液体培养基[MS盐,0.5mg/L肌醇,1.3mg/L维生素B1,200mg/L KH_2PO_4 和3%(W/V)蔗糖,0.2mg/L 2,4-D和0.1mg/L激动素]中培养,并调节培养基pH值至5.8.将细胞放置在摇床中120r/min振荡培养,温度(25±1),24h黑暗.

藻毒素的制备:称取一定量的滇池微囊藻水华干藻粉,加入5%冰醋酸,室温下搅拌抽提3h,提取液以8000r/min离心30min,取上清液置瓶中待用.残渣按上述方法重复提取2次,将3次提取上清液合并,过自制 C_{18} 柱,将90%甲醇洗脱液在旋转蒸发仪上蒸发至干,所得干粉即为微囊藻毒素粗提物,用一定体积纯甲醇溶解后由HPLC进行检测.

毒素标样购自Sigma公司,其他试剂均为分析纯.

1.2 仪器

高速冷冻离心机(GL-10LM,湖南星科科学仪器有限公司);旋转蒸发仪(RV 06-ML 1-B,IKA公司,德国);制备型高效液相色谱(Waters 600,waters公司,美国);超声波细胞破碎仪(SANYO-MSE SONIPREP 150,MSE公司,英国);TECAN酶标仪(SUNRISE,瑞士);Millipore超纯水制备仪(Millipore公司,美国).

1.3 实验方法

因本试验旨在探讨室内条件下MC-RR对烟草细胞的短期急性生理毒性效应,故试验浓度的选择比野外水体一般情况下的浓度要高,分别为0.1,1.0,10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

取处于对数生长期的烟草细胞接种于新鲜的KCMS液体培养基,在培养基中加入经抽滤灭菌的MC-RR,使终浓度分别为0.1,1.0,10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并设对照,每处理3个平行.分别在培养的第2,4,5,7,9d收集适量细胞,检测细胞活力,测定细胞内蛋白质、可溶性糖、硝态氮、总磷含量及酸性磷酸酶(ACP)活力.

1.4 测定方法

细胞活力的测定采用TTC法^[9],单位以每g细胞鲜重在485nm处的OD值表示(A_{485});可溶性蛋白质含量采用Bradford^[10]法测定,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白;可溶性糖含量的测定采用Kochert^[11]的方法;细胞内硝态氮含量的测定采用李合生^[12]的方法;细胞内磷含量的测定采用磷钼蓝分光光度法;ACP活性的测定采用南京建成试剂盒.

1.5 统计分析

实验结果表示为平均数±标准误差,使用SPSS统计软件和One-Way ANOVA法对组间数据进行差异显著性分析.

2 结果与讨论

2.1 MC-RR对烟草细胞活力的影响

由图1可见,处理组的细胞活力在毒素暴露的第2d即被抑制,且随毒素浓度的增加,细胞活力逐渐下降,高浓度处理组细胞活力显著低于对照.低、中浓度处理组细胞活力分别在第4,6d恢复正常,高浓度处理组细胞活力也有所恢复,但仍略低于对照.本实验中采用TTC法测定的细胞活力,代表的是细胞新陈代谢的能力^[13].处理组细胞活力的降低表明毒素处理削弱了细胞新陈代谢的能力,而新陈代谢减慢会导致细胞分裂减慢并促进有毒代谢产物聚集,对细胞将产生不利影响.

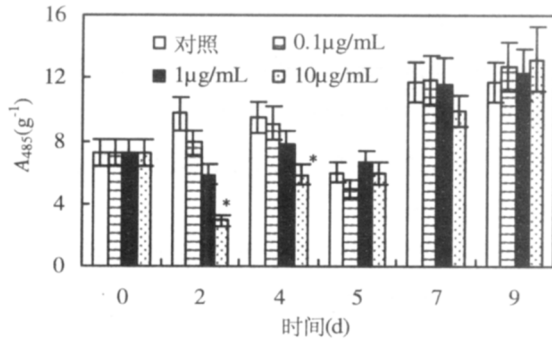


图 1 MC-RR对细胞活力的影响

Fig.1 Effect of MC-RR on the viability of BY-2 cells
与对照相比,* P<0.05, 下同

2.2 MC-RR对烟草细胞可溶性蛋白质含量的影响

研究表明,MC胁迫下细长聚球藻蛋白质含量明显下降^[14].由图2可见,中、高浓度毒素处理细胞2d后即降低了细胞内蛋白质的含量,仅分别为对照的57.89%和53.59%,后期有所恢复.低浓度处理对细胞内蛋白质含量没有明显影响.蛋白质作为结构蛋白,是组成细胞的重要成分;作为调控蛋白,在生理代谢中发挥着重要作用.蛋白质含量的降低,可能是毒素抑制了蛋白质的合成或某些蛋白质分解以助细胞度过逆境.蛋白质含量的降低可能会直接影响到细胞的重要生理功能,最终抑制细胞生长甚至导致细胞死亡.

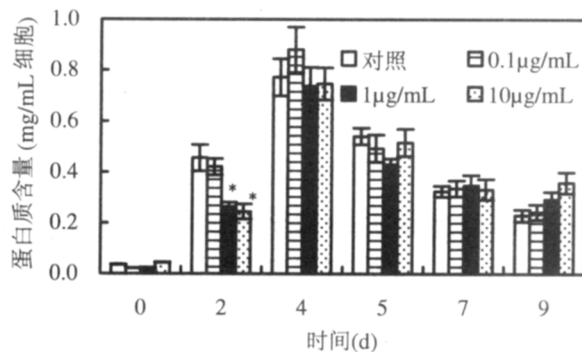


图 2 MC-RR对细胞内可溶性蛋白质含量的影响
Fig.2 Effect of MC-RR on the content of protein in the BY-2 cells

2.3 MC-RR对烟草细胞可溶性糖含量的影响

糖类是生物获取能量的主要来源,其中可溶

性糖含量反映了体内作为有效态营养物的糖类和能量水平.由图3可见,在整个实验周期中,各处理组与对照组的糖含量变化趋势一致,均呈现为先降低再升高又降低的趋势.在实验周期的0~2d,细胞内可溶性糖含量有一个骤降的过程,可能是细胞刚接种到新鲜培养基中,细胞为适应新环境消耗了胞内大量的可溶性糖的缘故.当细胞进入对数生长期后,胞内可溶性糖的含量逐渐上升,这可能是因为细胞从培养基中吸收了大量的蔗糖,第5d后可溶性糖的含量逐渐下降,这可能是因为到了后期细胞吸收蔗糖的能力下降,而细胞因能量需求又消耗了大量的可溶性糖.高浓度MC-RR处理细胞2d后,胞内的可溶性糖含量仅为对照的45.57%,第2d后糖含量有所回升,但仍略低于对照.可溶性糖含量的降低会直接导致细胞内能量来源不足,会使细胞内许多重要生理活动减慢甚至无法进行,最终表现为细胞生长减慢或停滞.低浓度处理组糖含量在处理7d后开始上升,到第9d时胞内糖含量高出对照49.62%.以上结果说明,对于一定浓度范围内的MC胁迫,烟草细胞表现出主动适应,而当毒素浓度过高时,烟草细胞需要不断消耗可溶性糖以提供能量来维持细胞基本的生理功能,表现为对毒素胁迫的被动适应.

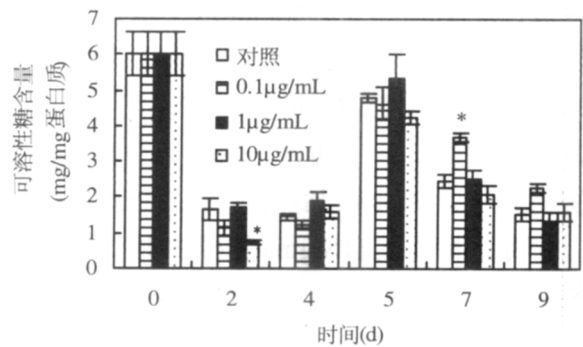


图 3 MC-RR对细胞内可溶性糖含量的影响
Fig.3 Effect of MC-RR on the content of soluble sugar in the BY-2 cells

2.4 MC-RR对烟草细胞硝态氮含量的影响

氮被称为生命的元素,它的多寡会直接影响细胞的分裂和生长.硝态氮是植物最重要的氮源,植物体内的硝态氮含量反映了植物的氮素营养

状况.在本实验中,高浓度毒素处理4d后即显著降低了细胞内硝态氮含量,仅为对照的71.86%.中、低浓度毒素在暴露7d后降低了胞内硝态氮含量(图4).硝态氮含量的降低意味着受胁迫细胞内氮素积累的不充分,可能是MC-RR处理抑制了细胞对外界培养基中氮素的吸收.而氮素缺乏,会导致蛋白质的合成受阻,而蛋白质形成的减少,又会导致细胞小而壁厚,致使细胞分裂减少.

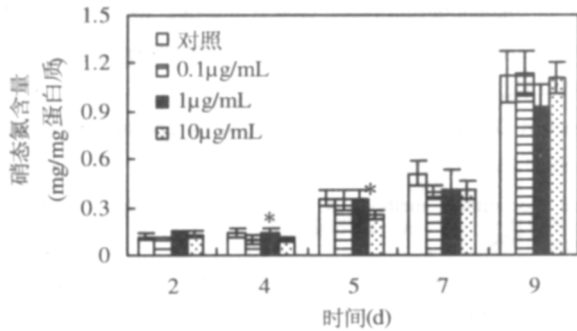


图 4 MC-RR对细胞内硝态氮含量的影响

Fig.4 Effect of MC-RR on the content of nitrate-N in the BY-2 cells

2.5 MC-RR对烟草细胞总磷含量的影响

磷是核酸、核蛋白和磷脂的主要成分,它与蛋白质合成、细胞分裂、细胞生长有密切关系.缺磷会影响细胞分裂,蛋白质合成下降等.

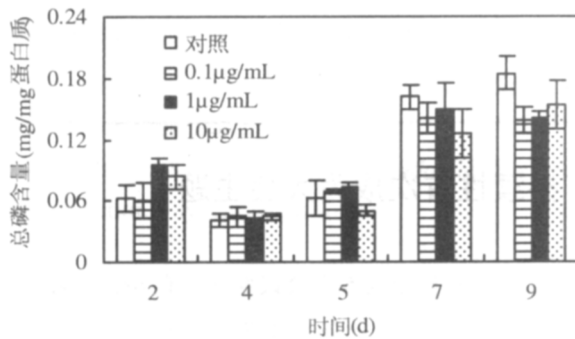


图 5 MC-RR对细胞内总磷含量的影响

Fig.5 Effect of MC-RR on the content of phosphorus in the BY-2 cells

由图5可见,在毒素处理的前4d,各处理组细胞内磷含量能维持在对照水平;处理5d后,高浓度处理组细胞内磷含量与对照相比开始下降;暴露7d后,各浓度处理组细胞内磷含量均降低;到实验

结束时,低、中、高浓度处理组的磷含量分别为对照的74.98%、76.47%和84.00%.MC-RR抑制了细胞对外界培养基中磷素的吸收.

2.6 MC-RR对烟草细胞ACP活性的影响

ACP是磷代谢的关键酶^[15].由图6可见,在0~5d时,低浓度处理组ACP活性基本保持在对照水平;中、高浓度处理组ACP活性明显低于对照,第7d后,各处理组ACP活性开始上升,到第9d时,低、中、高浓度处理组ACP活性分别比对照高出73.82%、53.19%和68.25%.ACP为诱导酶,受植物体内磷水平制约.磷饥饿时植物细胞内部ACP活性的增长是植物对磷缺失现象的一种响应^[15].本实验中,在MC处理的前5d,毒素处理组细胞内磷含量能维持在对照水平,此期间对应的ACP活性是被抑制的,毒素暴露7d后,处理组细胞内磷含量与对照相比开始下降,ACP活性反而上升.ACP活性的被显著诱导,说明了MC胁迫下的细胞存在严重的缺磷现象,而磷含量的下降也说明了这个问题.

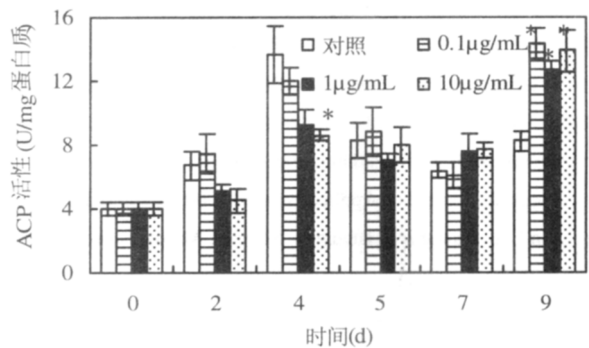


图 6 MC-RR对细胞内ACP活性的影响

Fig.6 Effect of MC-RR on the activity of ACP in the BY-2 cells

3 结论

3.1 浓度为1,10μg/mL的MC-RR在暴露2d后显著降低烟草细胞的活力,并减少细胞内蛋白质和可溶性糖的含量,暴露4d后显示出抑制细胞氮、磷吸收的毒性效应.

3.2 0.1μg/mL MC-RR处理引起细胞可溶性糖含量上升,10μg/mL MC-RR处理导致细胞内可溶性糖含量下降.可溶性糖含量的变化趋势反映了

烟草细胞对不同浓度MC-RR有不同的响应模式.

3.3 实验中检测了烟草细胞内蛋白质、可溶性糖、硝态氮和总磷各指标的变化情况,这些生理指标作为一个整体,共同衡量了毒素暴露下细胞营养态势的变化.本研究表明,1,10 μ g/mL的MC-RR暴露可以降低烟草细胞的正常生理态势.

参考文献:

- [1] 尹黎燕,黄家权,沈 强,等.烟草悬浮细胞抗氧化系统对微囊藻毒素的响应 [J]. 中国环境科学,2005,25(5):576-580.
- [2] Abe T, Lawson T, Weyers J D B, *et al.* Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice [J]. New Phytologist, 1996,133(4):651-658.
- [3] Casanova M T, Burch M D, Brock M A, *et al.* Does toxic *Microcystis aeruginosa* affect aquatic plant establishment [J]. Environmental Toxicology, 1999,14(1):97-109.
- [4] Márta M, Csaba M, Erika M, *et al.* Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings [J]. Aquatic Toxicology, 2003,62(1):1-9.
- [5] Pflugmacher S, Wiegand C, Beattie K A, *et al.* Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis*(CAV.) trin. exsteud [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001,20(4):846-852.
- [6] Weiss J, Liebert H P, Braune W. Influence of microcystins-RR on growth and photosynthetic capacity of the duckweed *Lemna minor* [J]. Journal of Applied Botany, 2000,74:100-105.
- [7] Yin L Y, Huang J Q, Huang W M, *et al.* Microcystin-RR-induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in tobacco BY-2 cells [J]. Toxicol, 2005,46(5):507-512.
- [8] Yin L Y, Huang J Q, Li W, *et al.* Microcystin-RR-induced apoptosis in tobacco BY-2 cells [J]. Toxicol, 2006,48(2):204-210.
- [9] Iborra J L, Guardiola J, Montaner S, *et al.* 2, 3,5-Triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for immobilized plant cells [J]. Biotechnology Techniques, 1992,6(4):319-322.
- [10] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976,72(2):248-254.
- [11] Kochert G. Carbohydrate determination by phenolsulfuric acid methods[A]. Handbook of physiological methods: physiological and biochemical methods [C]. London: Cambridge University Press, 1978.
- [12] 李合生.植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京:高等教育出版社,2003.123-124.
- [13] 刘 华.悬浮培养红豆杉细胞活力及存活率与生长周期的关系 [J]. 生物学杂志,2002,18(1):19-20.
- [14] 胡智泉,刘永定.微囊藻毒素对细长聚球藻生长及生理生化特性的影响 [J]. 水生生物学报,2004,28(2):155-158.
- [15] Dracup M N H, Barrett-Lennard E G, Geenway H, *et al.* Effect of phosphorus deficiency on phosphatase activity of cell walls from roots of subterranean clover [J]. Journal of Experimental Botany, 1984,35(4):466-480.

作者简介:黄文敏(1982-),女,湖北天门人,中国科学院水生生物研究所博士研究生,主要从事微囊藻毒素的毒理学研究.发表论文4篇.

2007 年美国化学会年会盛况空前,可持续性首次成为大会主题

2007 年美国化学会(ACS)第 233 届年会 3 月 25~29 日在芝加哥召开,规模空前.5 天会议期间共有 682 场为时半天的口头报告会和 96 场大字报(posters)会场.共有超过 9400 篇论文在大会上交流.此外,大会期间还有各类活动如短期培训课程、专业开发项目、工作讨论会、就业市场活动和学生活动等.同时举办的展览会有 250 多家公司参加,展位数超过 500 个.

年会的主题是:“能源、食物和水的可持续性”,共有 47 个单元活动,覆盖了许多重要专题,有“现代核反应堆:改进现有技术和第 4 代开发”、“捕集和隔离温室气体”、“纳米技术促进可持续性”以及“通过基础化学和生物化学研究充分实现太阳能转换的潜力”.可以看到,在一个非常短的时间内,可持续性概念已经成为化学家们的动力,别 ACS 通过确定 2007 年的主题表明了它对可持续性的重视.