

# UV-B 辐射对 2 种海洋微藻膜脂过氧化和脱酯化伤害

王军<sup>1</sup>, 肖慧<sup>1</sup>, 冯蕾<sup>1,2</sup>, 蔡恒江<sup>1</sup>, 唐学玺<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生态实验室, 山东 青岛 266003; 2. 东营职业学院, 山东 东营 257091)

**摘要:** 研究海洋生态系统在调节全球变化中的作用, 采用生态毒理学的方法研究了 UV-B 辐射增强对 2 种海洋微藻膜的损伤及其差异性。结果表明, 随着 UV-B 辐射剂量的增加, 叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.)和三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)的光合速率降低。同时, 膜相对透性增大, 细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量上升, 微粒体膜中磷脂减少, 游离脂肪酸增加。表明 UV-B 辐射增强使 2 种微藻的膜受到了严重伤害, 而且膜伤害的加剧与活性氧的积累和由此引发的膜脂脱酯化有关。2 种微藻细胞匀浆中丙二醛(MDA)含量无显著变化, 而微粒体膜的 MDA 含量随着 UV-B 辐射剂量的加大显著提高。这表明 UV-B 辐射增强对 2 种海洋微藻膜的损伤可能是由膜脂过氧化和脱酯化作用共同引起的。

**关键词:** UV-B 辐射增强; 膜脂过氧化; 脱酯化; 海洋微藻

**中图分类号:** Q936; Q949.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-5174(2006)05-763-04

臭氧层变薄是当今最引人注目的全球变化现象之一。根据联合国世界气象组织的报告, 1995 年南极臭氧洞比以往任何时候都大, 而且臭氧层的侵蚀和破坏仍在日渐加重, 我国青藏高原上空也出现季节性的臭氧低值中心。臭氧层的减薄使到达地面的紫外线, 尤其是对生物具严重损伤作用的紫外线 B 波段(UV-B)的辐射增强, 从而对全球产生明显的生态学和生物学效应。研究表明: 北海海水表面紫外线辐射率的 10% 能够穿透到 6 m 深的水层, 而在北冰洋的清澈水域, 其表面 10% 的辐射率可到达 30 m 的水层。因此, 海洋生物, 尤其是海洋浮游生物受紫外线辐射伤害的潜在危险性不断增加。海洋微藻对紫外线辐射增强的响应研究国内外已有不少报道<sup>[1-3]</sup>。Chaturvedi 等报道, 紫外线辐射增强可抑制藻细胞某些与光合作用有关的基因的表达, 引起光系统 II (PS II) 反应中心蛋白(D1 和 D2)的降解, 限制光系统 II 的损伤修复, 从而导致光合速率的下降<sup>[4]</sup>。Lesser 的工作同样证明, UV-B 辐射的增强能够抑制藻细胞的生长, 引起叶绿素的降解和光合速率的下降等<sup>[5]</sup>。迄今的研究工作主要是围绕 UV-B 辐射增强对海洋微藻的生长、生理和种群动态影响展开的<sup>[6-8]</sup>。

在整个海洋食物网中, 海洋微藻是 UV-B 辐射增强最直接的响应者之一。海洋微藻是海洋的主要初级生产者, 是海洋食物链的基础, 它不仅驱动着整个海洋生态系统的能流和物流, 直接和间接地养育着几亿吨的海洋动物, 而且对调节全球变化起着重要的作用。

海洋微藻具有取材方便、种类繁多、易于培养和操作的特点。因此, 本文以海洋微藻为材料, 研究 UV-B 辐射增强条件下活性氧引起膜脂过氧化和脱酯化伤害作用, 这对揭示 UV-B 辐射增强对海洋微藻的影响机理和阐明海洋生态系统在调节全球变化中的作用有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻种来源

实验所用的叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.)和三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)取自中国海洋大学微藻培养中心, 作为鱼、虾、贝育苗中常用的饵料微藻, 在生物学分类上分别隶属于金藻和硅藻 2 个门。

### 1.2 培养方法和条件

培养液采用 f/2 营养盐配方, 在指数生长期接种。接种密度均为  $0.2 \times 10^4$  cell · mL<sup>-1</sup>, 培养温度(19 ± 1)℃, 光照强度 3 000 lx, 光暗周期 12:12。每组实验同时设 4 个平行样。用于微藻培养的三角瓶预先用 1 mol/L 的盐酸浸泡 24 h, 消毒海水冲洗干净后待用。

### 1.3 UV-B 辐射体系

采用北京曙光电源厂生产的紫外 B 灯, 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。紫外 B 灯外用乙酸纤维素薄膜(上海生化试剂公司, 厚度为 0.12 mm)包被, 以除去 280 nm 的短波辐射。整个体系在正式实验前需连续照射 72 h, 以减小薄膜滤过作用的不稳定性。所用薄膜每隔 1 周更换 1 次, 防

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270258); 新世纪优秀人才支持计划奖励基金项目(NCET-05-0597)资助

收稿日期: 2006-05-22; 修订日期: 2006-06-21

作者简介: 王军(1976-), 女, 博士生, 主要从事生态毒理学研究。E-mail: fairy317@163.com

通讯作者: E-mail: tangxx@ouc.edu.cn

止薄膜的老化作用。

#### 1.4 UV-B 辐射处理

辐射强度一定 ( $1.25 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ), 通过调整辐射时间控制辐射剂量。在预备实验的前提下, 设计 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 和  $2.0 \text{ J}/\text{m}^2$  的辐射剂量, 每天以紫外 B 灯取代日光灯管照射处理。

#### 1.5 光合作用的测定

采用黑白瓶定氧法测定, 黑白瓶中用虹吸的方法装满不同剂量 UV-B 辐射处理的藻液, 藻液加入之前充分暴气, 以使  $\text{CO}_2$  和空气中  $\text{CO}_2$  处于平衡状态, 然后塞紧瓶塞, 使之进行光合作用。光源为 40 W 的白色日光灯, 光强为 3 000 lx, 温度为  $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 反应时间为 50 min, 反应终了后测氧, 计算单位水体中氧的增加, 以此表示单位水体中藻的净光合速率。

#### 1.6 微粒体膜的提取

微粒体膜的制备按照 Kendall 等<sup>[9]</sup>的方法进行。

#### 1.7 生理指标分析

电导率法测定膜的相对透性,  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量的测定采用比色法, 丙二醛 (MDA) 含量的测定按照 Dhindsa 等<sup>[10]</sup>的方法进行, 磷脂含量测定采用超微量法<sup>[11]</sup>, 游离脂肪酸含量的测定按照 Sims 等<sup>[12]</sup>的方法。上述实验均重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 UV-B 辐射增强对微藻光合作用的影响

图 1 反映了不同剂量的 UV-B 辐射对 2 种海洋微藻光合作用的影响。低剂量的 UV-B 辐射 ( $< 0.8 \text{ J}/\text{m}^2$ ) 处理对三角褐指藻和叉鞭金藻的光合作用没有明显的影响。随着辐射剂量的进一步加大, 二者光合速率逐渐降低。显示高剂量的 UV-B 辐射 ( $> 0.8 \text{ J}/\text{m}^2$ ) 处理抑制了微藻的光合作用, 并将会对其生长产生间接的影响。

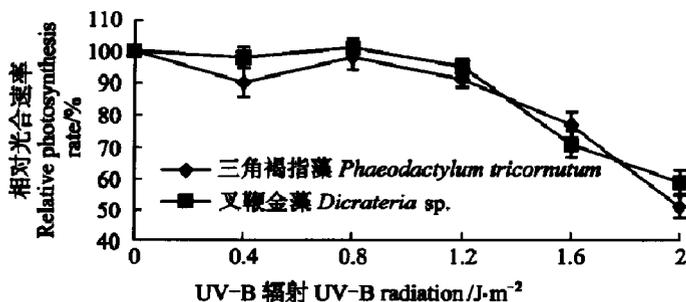


图 1 UV-B 辐射增强对微藻光合作用的影响

Fig. 1 The effect of UV-B radiation enhancement on photosynthesis in microalgae

### 2.2 UV-B 辐射增强引起微藻膜的损伤

随着 UV-B 辐射处理剂量的加大, 三角褐指藻和叉鞭金藻膜的通透性呈现出上升趋势 (见图 2)。表明 UV-B 辐射增强引起了二者膜的损伤, 并且随着辐射剂量的加大, 伤害越来越严重。

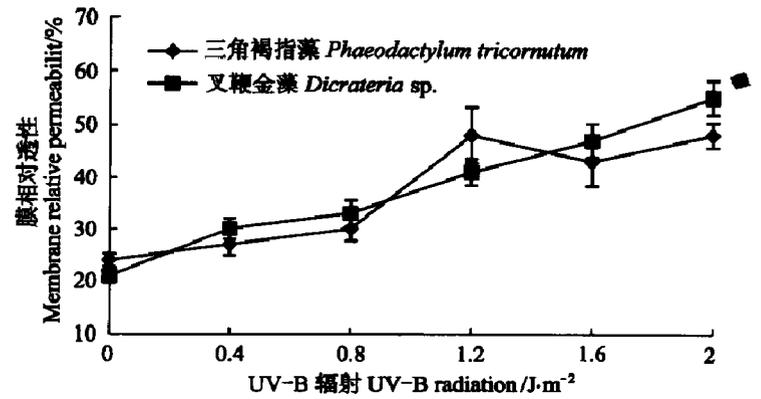


图 2 UV-B 辐射增强对微藻膜通透性的影响

Fig. 2 The effect of UV-B radiation enhancement on membrane permeability in microalgae

### 2.3 UV-B 辐射增强对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量的影响

在 UV-B 辐射增强作用下, 2 种海洋微藻在膜透性不断增大的同时, 伴随有  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量的上升 (见图 3)。二者的变化呈显著正相关性 ( $r_1 = 0.991, p_1 < 0.01$ ;  $r_2 = 0.994, p_2 < 0.01$ )。指示 UV-B 辐射增强导致膜的损伤是通过活性氧来完成的。

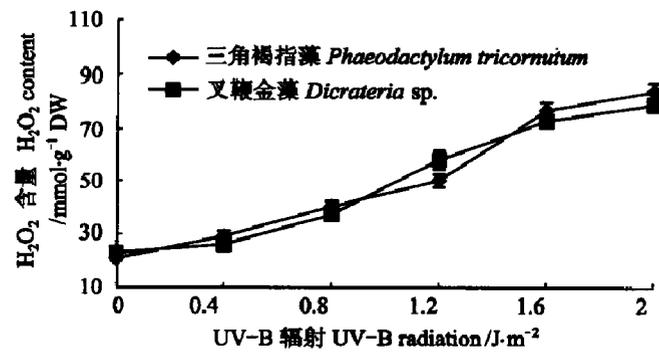


图 3 UV-B 辐射增强对微藻  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量的影响

Fig. 3 The effect of UV-B radiation enhancement on  $\text{H}_2\text{O}_2$  content in microalgae

### 2.4 UV-B 辐射增强对膜脂过氧化物的影响

MDA 含量是膜脂过氧化程度的 1 个重要指标, 随着 UV-B 辐射剂量的加大, 三角褐指藻和叉鞭金藻匀浆中 MDA 含量变化不明显, 而微粒体 MDA 含量急剧升高 (见图 4, 图 5)。这说明 UV-B 辐射增强引起了微藻膜脂过氧化作用的加强。

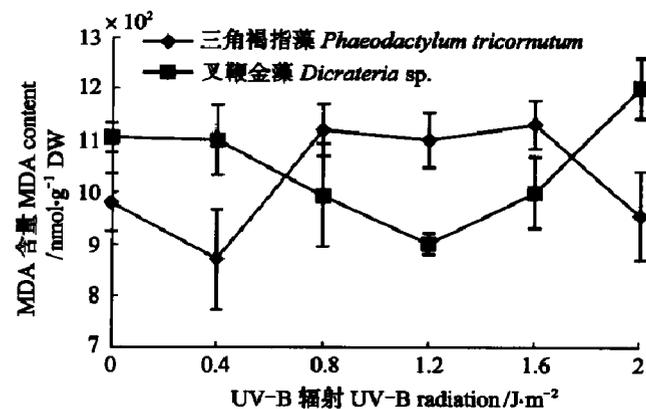


图 4 UV-B 辐射增强对微藻匀浆 MDA 含量的影响

Fig. 4 The effect of UV-B radiation enhancement on MDA content in homogenate

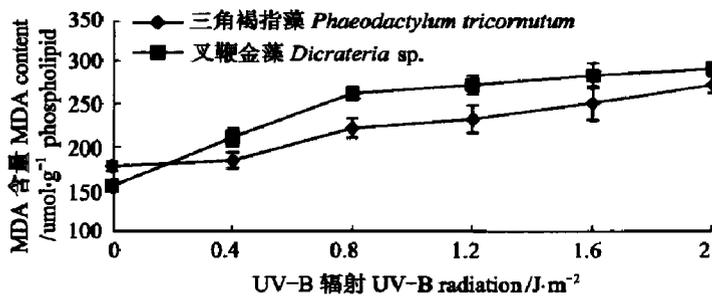


图 5 UV-B 辐射增强对微藻微粒体膜 MDA 含量的影响

Fig. 5 The effect of UV-B radiation enhancement on MDA content in microsomal membrane

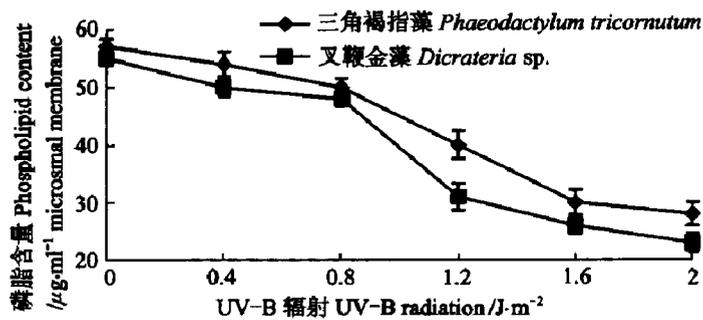


图 6 UV-B 辐射增强对微粒体磷脂含量的影响

Fig. 6 The effect of UV-B radiation enhancement on phospholipid content in microsomal membrane

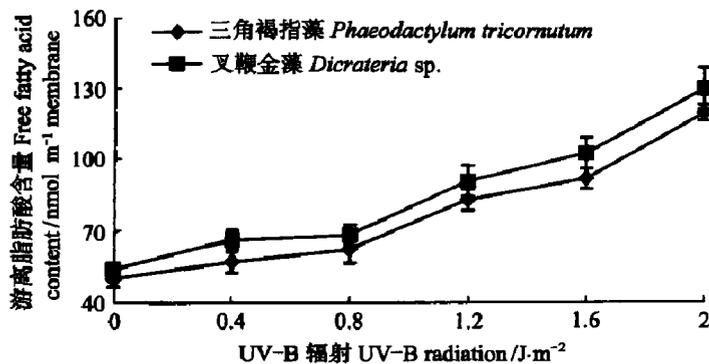


图 7 UV-B 辐射增强对微粒体游离脂肪酸含量的影响

Fig. 7 The effect of UV-B radiation enhancement on free fatty acid content in microsomal membrane

### 2.5 UV-B 辐射增强引起微粒体膜脂脱酯化

2 种海洋微藻在低剂量臭氧处理下,微粒体磷脂的含量降低,游离脂肪酸的含量上升,但二者的变化都比较平缓。随着 UV-B 辐射剂量的进一步加大,磷脂的含量迅速下降,游离脂肪酸的含量明显上升(见图 6,图 7)。显然,UV-B 辐射增强使微粒体膜脂发生了脱酯化,且随着辐射剂量的加大,脱酯化作用越来越加剧。

## 3 讨论

光合作用是植物体重要的生理活动之一,光合速率的高低直接影响着植物的发育、生长和繁殖。本文对 2 种海洋微藻的研究表明,低剂量的 UV-B 辐射处理对微藻的光合速率并不产生明显的影响,但是当 UV-B 辐射达到一定的剂量时,微藻的光合速率明显降

低,这说明 UV-B 辐射增强已引起了微藻光合系统的伤害,导致光合速率的下降。这与前人报道的结果一致<sup>[13]</sup>。

对 UV-B 辐射增强引起微藻伤害的进一步研究表明,随着辐射剂量的加大,2 种海洋微藻膜的相对透性增加。由此可见,膜受到了 UV-B 辐射增强的伤害。在膜透性不断增大的同时,伴随有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的明显上升。二者呈显著的正相关,表明膜损伤的加重与活性氧的积累和由此引发的伤害密切相关。

以往的研究<sup>[13]</sup>曾报道细胞微粒体中 MDA 含量比细胞匀浆中多 100 倍,指出微粒体是研究脂质过氧化作用的理想材料。细胞匀浆中成分复杂,有些成分具有抗氧化能力,有些成分会干扰 MDA 的测定。因此,用成分比较单纯,以不饱和脂肪酸为主的微粒体测定 MDA 要比用细胞匀浆准确得多<sup>[14]</sup>。这一结论在三角褐指藻和叉鞭金藻的实验中也得到了证实。在 UV-B 辐射增强作用下,2 种微藻细胞匀浆中 MDA 含量都没显示明显的变化。相反微粒体 MDA 含量随着 UV-B 辐射的增强呈现出明显上升的趋势。说明无论是以高等植物细胞还是低等植物细胞(单细胞藻类)为研究对象,微粒体都是用来研究脂质过氧化作用的理想材料,同时也说明 2 种微藻在 UV-B 辐射增强作用下发生了由活性氧介导膜脂过氧化。

UV-B 辐射增强引起 2 种海洋微藻微粒体膜脂脱酯化,这与前人用 UV-B 辐射和其它多种污染物胁迫处理海洋微藻得出的结论相一致<sup>[14-17]</sup>,显示在逆境胁迫下海洋微藻发生膜脂脱酯化伤害作用具有一定的普遍性。吕庆等指出逆境胁迫引起的膜损伤由膜脂过氧化和脱酯化共同作用的结果<sup>[13]</sup>。本文用三角褐指藻和叉鞭金藻为材料在测定膜脂脱酯化的同时,分别测定了匀浆和微粒体的 MDA 含量。进而发现 2 种海洋微藻在 UV-B 辐射增强作用下,在发生膜脂过氧化的同时,也发生了脱酯化。这表明,UV-B 辐射增强引起微藻膜的损伤可能主要是由活性氧介导的膜脂脱酯化与膜脂过氧化共同作用的结果。

## 参考文献:

- [1] Ekelund N G. Interactions between photosynthesis and light-enhanced dark respiration (LEDR) in the flagellate *Euglena gracilis* after irradiation with ultraviolet radiation [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2000, 55(1): 63-69.
- [2] Scheuerlein R. Evidence for UV-B induced DNA degradation in *Euglena gracilis* mediated by activation of metal-dependent nucleases [J]. *J Photochem Photobiol B*, 1995, 31(3): 113-123.
- [3] Ryan K G. UV radiation and photosynthetic production in Antarctic sea ice microalgae [J]. *J Photochem Photobiol B*, 1992, 13(3-4): 235-240.

- [4] Chaturvedi R. Degradation and de novo synthesis of D1 protein and psbA transcript levels in green algae during UV-B inactivation of photosynthesis and its reactivation [J]. *J Biosci*, 2000, 25(1): 65-71.
- [5] Lesser M P. Elevated temperature and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates [J]. *Limnology and Oceanography*, 1996, 41(2): 271-283.
- [6] Xiao H, Tang X X, Zhang P Y, et al. The effect of UV-B radiation enhancement on the interspecific competition between *Skeletonema costatum* and *Heterosigma akashiwo* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005, 24(2): 77-84.
- [7] Zhang P Y, Yu J, Tang X X. UV-B radiation suppresses the growth and antioxidant systems of two marine microalgae, *Platymonas subcordiformis* (Wille) Hazen and *Nitzschina closterium* (Ehrenb.) W. Sm [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2005, 47(6): 683-691.
- [8] Yu J, Tang X X, Zang P Y. Physiological and ultrastructural changes of *Chlorella* sp. induced by UV-B radiation [J]. *Progress in Natural Science*, 2005, 15(8): 678-683.
- [9] Kendall E J, Mckersie B D. Free radical and freezing injury to cell membrane of winter wheat [J]. *Physiol Plant*, 1989, 78(1): 86-94.
- [10] Dhindsa R S, Matowe W. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation [J]. *J Expt Botany*, 1981, 32: 79-91.
- [11] 李琳, 焦新之. 应用孔雀石绿染料比色测定毫克分子量水平无机磷和磷脂的超微量方法 [J]. *植物生理学通讯*, 1982(2): 52-54.
- [12] Sims R P, Larose J A G. The use of iodine vapor as a general detection agent in the thin layer chromatography of lipids [J]. *The J of Amer Oil Chemists Society*, 1962, 39: 232.
- [13] 吕庆, 郑荣梁. 干旱及活性氧引起小麦膜脂过氧化和脱酯化 [J]. *中国科学(C辑)*, 1996, 26(1): 26-30.
- [14] 唐学玺, 李永祺. 三种有机磷农药对三角褐指藻伤害的差异性研究 [J]. *环境科学学报*, 1999, 19(5): 579-581.
- [15] 唐学玺, 李永祺, 黄健. 对硫磷对扁藻和杜氏藻膜脂的过氧化和脱酯化伤害 [J]. *海洋与湖泊*, 1999, 30(3): 295-299.
- [16] 徐达, 唐学玺, 张培玉. UV-B 辐射对 2 种海洋微藻的生理效应 [J]. *青岛海洋大学学报*, 2003, 33(2): 240-244.
- [17] 蔡恒江, 唐学玺, 张培玉, 等. UV-B 辐射和久效磷对三角褐指藻 DNA 共同伤害效应 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2004, 34(6): 993-996.

## Studies on Damage of Membrane Lipid Peroxidation and Deesterification Caused by UV-B Radiation in Two Species of Marine Microalgae

WANG Jun<sup>1</sup>, XIAO Hui<sup>1</sup>, FENG Lei<sup>1,2</sup>, CAI Heng-Jiang<sup>1</sup>, TANG Xue-Xi<sup>1</sup>

(1. Marine Ecology Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Dong Ying Vocation College, Dongying 257091, China)

**Abstract:** The membrane damage and its differences caused by UV-B radiation enhancement to two species of marine microalgae were studied using ecotoxicology methods. The results showed that the membrane relative permeability and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content increased, and the photosynthesis rate decreased in *Dicrateria* sp. and *Phaeodactylum tricornerutum* with the UV-B radiation enhancement. Meanwhile, phospholipid content decreased and free fatty acid content promoted in microsomal membrane. These indicated that the membrane damage in the two species of marine microalgae was seriously induced by UV-B radiation enhancement, and the exacerbation of membrane damage was really relative to the accumulation of active oxygens which initiated deesterification. Although malondialdehyde(MDA) content in homogenate of two species of marine microalgae did not show significant change, it exhibited obvious increment in microsomal membrane. So it was concluded that the membrane damage under UV-B radiation enhancement was caused by membrane lipid peroxidation in combination with membrane lipid deesterification.

**Key words:** UV-B radiation enhancement; membrane lipid peroxidation; deesterification; marine microalgae

责任编辑 于卫