

文章编号:1001-5132 (2008) 04-0474-05

富勒醇对四膜虫的紫外防护作用

赵群芬, 童丽娟

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:为探讨富勒醇对紫外光的辐射防护作用,运用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测了紫外辐照后四膜虫细胞的存活率,并测定了经紫外辐照后,富勒醇对细胞内丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽酶(GSH)、谷胱甘肽还原酶(GR)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的影响.结果显示:富勒醇能提高受紫外辐照后细胞的存活率,并且能通过刺激细胞内抗氧化酶的活性,减少脂质过氧化产物,从而减小紫外辐射对细胞的损伤,说明富勒醇对紫外光辐射有防护作用.

关键词:富勒醇;四膜虫;紫外防护

中图分类号:Q691

文献标识码:A

碳纳米材料富勒烯家族,特别是C60,由于在光-、电-化学和物理方面的性质,可将其运用在许多不同的生物学领域.有研究表明:水溶性的C60和它的衍生物能够抑制酶和HIV的活性、抑制细菌和细胞的生长、吸收过量的自由基,具抗氧化作用^[1,2].在各种各样的C60衍生物中,富勒醇作为富勒烯衍生物的一种重要的水溶性衍生物,其分子结构上保留着一半的共轭双键(约10~15个电子组成的共轭体系),与其母体C60分子相比大大降低了它的毒性,而分子结构上共存有适中电子亲和性基团和烯丙基结构,该特点可使其在生物体系中作为自由基清除剂和水溶性抗氧化剂.

紫外辐射是一种重要的氧化应激因素,多种生物分子因紫外辐射而产生的一些活性氧中间物是导致生物体辐射损伤的主要原因.活性氧,如 $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 能损伤细胞的脂质、蛋白质、

DNA和其他大分子,但加入抗氧化物能改变生物体的辐射敏感性,对生物体起到一定的辐射防护作用.本文选用单细胞动物——四膜虫(*Tetrahymena pyriformis*)为研究对象,研究了富勒醇是否能通过清除活性氧和减少脂质过氧化反应来对紫外光辐射引起的损伤起到保护作用.

1 材料与方法

1.1 材料

富勒醇由中国科学院上海应用物理研究所核分析国家重点实验室李文新研究员馈赠.

四膜虫由中国科学院武汉水生生物研究所原生动物分类与生态实验室馈赠.

无菌蛋白胨培养液(2%蛋白胨,0.5%酵母粉,0.1%葡萄糖,pH 7.2),25、110 r·min⁻¹下在全温

振荡器中振荡培养。

1.2 方法

1.2.1 紫外辐照

实验中紫外辐照采用 500 W 的汞灯,照射距离 27.5 cm,照射时间为 15 min,照射时采用能透过波长为 300~400 nm 的滤光片。

1.2.2 四膜虫的处理

取对数生长期的四膜虫,调整密度为 1×10^4 个·mL⁻¹,吸 1.5 mL 放入 4 mL 的离心管中,设对照组(不辐照组)、辐照组、加富勒醇辐照组和加富勒醇不辐照组,每个实验组均设 3 个平行试样,每个试样总体积为 3 mL,辐照前加富勒醇,当富勒醇与四膜虫细胞作用 2 h 后,将其吸入 24 孔细胞培养板中,每个浓度 3 孔,每孔 1 mL,辐照组盖上滤光片辐照。

1.2.2.1 富勒醇对紫外辐照四膜虫生长影响测定

该实验中各组富勒醇浓度分别为 0 mg·mL⁻¹, 0.06 mg·mL⁻¹, 0.1 mg·mL⁻¹, 0.15 mg·mL⁻¹, 0.20 mg·mL⁻¹ 和 0.25 mg·mL⁻¹,辐照结束后,辐照和不辐照组均继续培养 48 h,每 24 h 用 MTT 法检测细胞存活率。

1.2.2.2 酶的活性和脂质过氧化物的测定

该实验分(1)不辐照组:A 为对照组,B 为富勒醇浓度为 0.1 mg·mL⁻¹组,C 为富勒醇浓度为 0.25 mg·mL⁻¹组;(2)辐照组:D 为不加富勒醇组,E 为富勒醇浓度为 0.1 mg·mL⁻¹组,F 为富勒醇浓度为 0.25 mg·mL⁻¹组。辐照结束后,立即将各组虫液吸入离心管中,用冰的 PBS (pH=7.4)离心洗涤 3~5 次,以 4 000 r·min⁻¹离心沉淀虫体,将收集的细胞在 4

下离心 20 min(3 000 r·min⁻¹),去上清液,再加入 1 mL 4 匀浆介质(pH=7.4, 0.01 mol·L⁻¹蔗糖, 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCL, 0.000 1 mol·L⁻¹ EDTA- 2Na)离心 10 min(4 000 r·min⁻¹),冰水中低速匀浆,约 6~8 min,将细胞裂解液以 4 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液按南京建成生物医学工程研究所的试剂盒提供的方法用紫外分光光度计(Tu1800 北京普

析通用仪器有限公司)测定丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(Glutathione, GSH)的含量及超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD),过氧化氢酶(Catalase, CAT),谷胱甘肽还原酶(Glutathione Reductase, GR)和谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-PX)的活力。

MDA 含量用 pmol·mg 蛋白质⁻¹表示,GSH 含量用 nmol·mg 蛋白质⁻¹,其余酶的活力用活力单位(U)·mg 蛋白质⁻¹表示。

1.2.3 数据处理

实验数据均用 Origin 6.1 软件处理,T 检验法检验。

2 结果与讨论

2.1 富勒醇对紫外辐照四膜虫生长的影响

MTT 法所测得的紫外辐照 15 min 后,四膜虫继续培养 24 h(A 组)、48 h(B 组)的存活率见图 1。从图 1 中可看出加富勒醇辐照组中细胞的存活率均显著高于未加富勒醇辐照组中细胞的存活率($p < 0.05$),并且培养 48 h 的存活率比培养 24 h 的高。

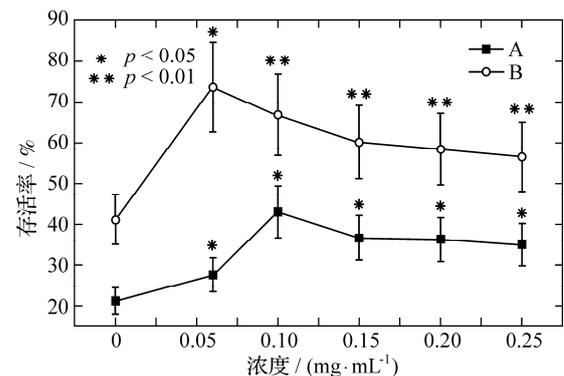


图1 MTT 法所测得的紫外辐照 15 min 后,四膜虫继续培养 24 h(A 组)、48 h(B 组)的存活率

紫外辐射作用于细胞后,至少可以通过下述途径对细胞造成损伤:(1)直接导致 DNA 的损伤;(2)通过和细胞膜、线粒体膜或细胞内某些组分的作用产生自由基、活性氧物种等,继而发生脂质过氧化反应,再通过使一些蛋白质包括酶类的过氧化或者

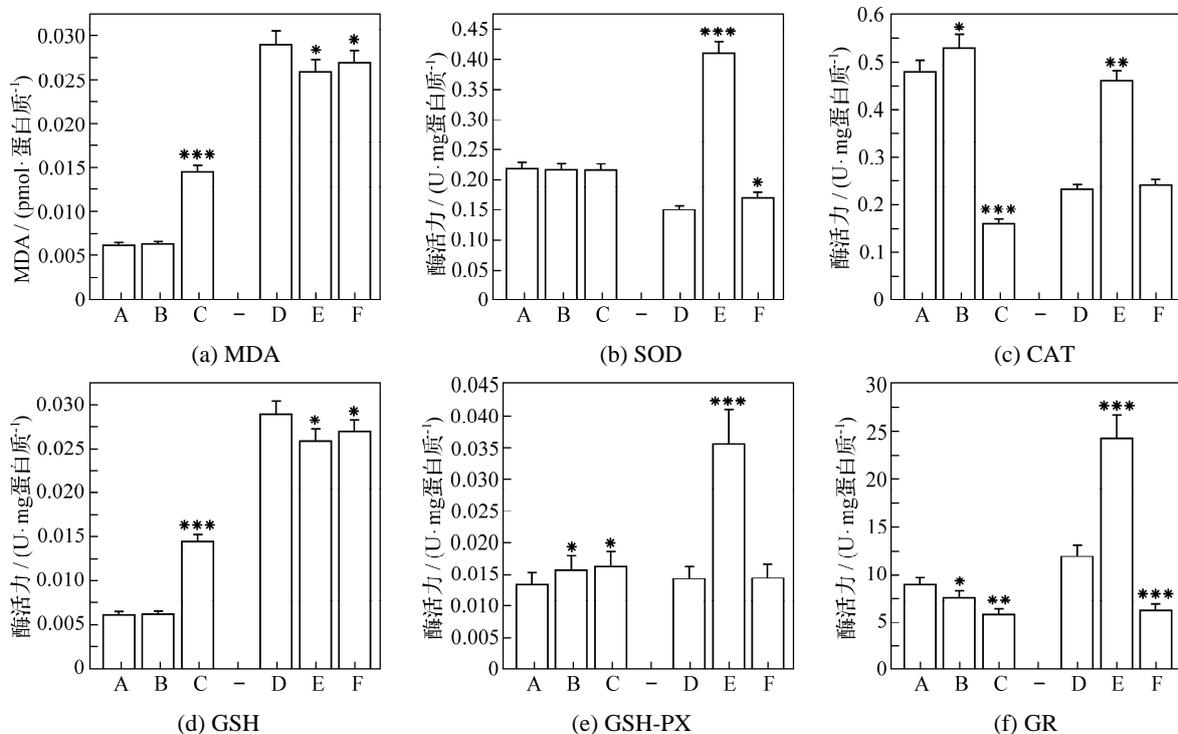
经一系列信号的转导激活一些分子如 NF- κ B 等,最终影响细胞的功能;(3)激活神经鞘磷脂酶从而导致神经酰胺及其衍生物水平的升高,再经过一系列的信号转导过程激活不同的信号途径来调节细胞的功能,包括细胞的增殖、分化和死亡等。从实验结果可以看到紫外辐射导致四膜虫有明显损伤,与不辐照组相比,辐照后第 1 d 和第 2 d 的存活率分别降到 21% 和 41%。说明富勒醇的加入对四膜虫紫外辐射损伤有一定的保护作用,且与富勒醇浓度相关,对于辐照后第 1 d 的存活率,最大的保护作用在富勒醇的浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,存活率增加到 42%;对于第 2 d 的存活率,最大的保护作用在 $0.06 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,对应的存活率为 73%。随着富勒醇浓度继续增加,四膜虫的存活率反而下降,其下降的原因与富勒醇本身的化学毒性有关,这在富勒醇对四膜虫的毒性研究中已得到证实^[3]。

2.2 富勒醇对酶和脂质过氧化物的影响

由紫外光照射所产生的活性氧(Reactive Oxy-

gen Species, ROS),如 $\cdot\text{O}_2^-$ 和 $\cdot\text{OH}$,能使生物体致死或发生突变^[4-6]。紫外光能刺激线粒体上的脂质过氧化反应,同时延长自由基的寿命。MDA 是脂质过氧化反应的产物之一。如图 2(a)所示,在不辐照组中,B 组中 MDA 的量与 A 组没有差别,而 C 组中 MDA 的量与 A 组中 MDA 的量却存在极显著差异($p<0.001$),表明较低浓度的富勒醇对四膜虫中 MDA 的量没有影响,而浓度增加时会刺激脂质过氧化反应,结果使 MDA 的量增加。辐照组中,E 组和 F 组中 MDA 的量显著少于 D 组中 MDA 的量($p<0.05$),说明在紫外光照射下,一定浓度范围内的富勒醇可能通过吸收自由基,减少自由基对细胞膜的攻击,从而减少脂质过氧化反应,起到保护细胞免受辐射损伤的作用。

紫外辐射产生的超氧离子能自发的(在 $\text{pH}=4.8$ 的环境中)或通过 SOD 的歧化作用(在中性或碱性的环境中)转换成 H_2O_2 , H_2O_2 在 CAT 或 GSH-PX 酶的作用下分解并转化为 H_2O 。有报道表明,SOD



不辐照组:A 对照组,B 富勒醇浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组,C 富勒醇浓度为 $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组;辐照组:D 不加富勒醇,E 富勒醇浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组,F: 富勒醇浓度为 $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组。*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

图 2 富勒醇对酶和脂质过氧化物的影响

和 CAT 活性在紫外照射下会降低^[7,8]。如图 2(b)显示,没有紫外光辐照时,所有组中 SOD 的活性没有显著差异($p>0.05$)。紫外辐照时,E,F 组中 SOD 的活性均显著高于 D 组(分别为: $p<0.001$, $p<0.05$)。对于 CAT 的活性(图 2(c)),未辐照组中,B 组中 CAT 的活性显著大于 A 组($p<0.05$),而 C 组中 CAT 的活性却远远低于 A 组($p<0.001$),说明低浓度的富勒醇能刺激 CAT 活性,使之升高,而高浓度的富勒醇却抑制 CAT 的活性。紫外辐照组中,E 组中 CAT 的活性显著高于 D 组($p<0.01$),F 组中 CAT 的活性与 D 组没有明显差异($p>0.05$),表明紫外辐照时,一定浓度的富勒醇能刺激四膜虫中 SOD、CAT 的活性,以抵抗辐射带来的氧化损伤,对细胞起到一定的保护作用。

谷胱甘肽(GSH)是细胞自身合成的抗氧化剂、生物体内非蛋白性含 SH 基化合物中含量最多的物质,也是细胞内重要的水溶性抗氧化剂。它的水平与紫外辐射的敏感性有直接的关系。现在认为谷胱甘肽在保护培养的细胞抵抗 UVA 和 UVB 的致死损伤时起着主要的作用^[9]。从图 2(d)可看出在没有紫外辐照时,C 组中谷胱甘肽的量极显著高于其余 2 组($p<0.001$),A 组与 B 组中谷胱甘肽的量没有显著差异($p>0.05$),表明高浓度的富勒醇能刺激细胞内 GSH 的生成,而低浓度的富勒醇不会引起细胞内 GSH 含量的显著改变。紫外辐照时,E,F 组中 GSH 的量均显著低于 D 组($p<0.05$),说明在紫外辐射过程中,由于富勒醇的存在可能会增加四膜虫对紫外辐射的敏感性,表现为 GSH 的含量减少,从而起到保护作用。

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶。它特异的催化还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢的还原反应,可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。Fuchs^[4]和 Shindo^[7]等在他们的研究中分别发现在紫外光的照射下,GSH-PX 的活性会减弱。本实验结果显示(图 2(e))在没有紫外光照射的条件下,

富勒醇的加入会使 GSH-PX 的活性显著增加($p<0.05$)。紫外照射组中,E 组中 GSH-PX 的活性明显高于其余 2 组($p<0.001$),其余 2 组之间没有明显差异,该结果说明在紫外光照射下,一定浓度的富勒醇能刺激 GSH-PX 的活性,使其活性增加,从而增强生物体抗紫外氧化的能力。

谷胱甘肽还原酶(GR)是一种黄素酶,每分子酶蛋白含有一分子的 FAD,由辅酶 NADPH 供氢,催化氧化型谷胱甘肽(GSSG),还原成还原型谷胱甘肽(GSH)。还原型谷胱甘肽(GSH)可使含巯基(-SH)的酶处于还原状态及活性状态,维持红细胞膜的完整性。防止血红蛋白氧化。GR 在机体的氧化还原反应中有举足轻重的地位。从试验结果看(图 2(f)),B,C 2 个组中谷胱甘肽还原酶的活性均显著低于 A 组($p<0.05$, $p<0.01$)。辐照组中,E 组中谷胱甘肽还原酶的活性显著高于 D 组($p<0.001$),而 F 组中谷胱甘肽还原酶的活性却显著低于 D 组($p<0.001$)。这一结果表明,在没有紫外光的刺激下,富勒醇对 GR 活性的影响较小,而当紫外光辐照时,富勒醇反而能刺激 GR 的活性,使 GR 的活性增加。

3 结论

富勒醇能提高受紫外辐照后细胞的存活率,并且能通过刺激细胞内抗氧化酶的活性,减少脂质过氧化产物来减小紫外辐射对细胞的损伤,富勒醇对紫外光辐射有防护作用。

致谢:感谢中国科学院上海应用物理研究所核分析重点实验室的李文新研究员、李晴暖博士、诸颖博士等提供的帮助。

参考文献:

- [1] Elisabetta S, Benedetto N, Daniela M, et al. C₃-fullerol-tris-methanodicarboxylic acid protects epithelial cells from radiation-induced anoikia by influencing cell

- adhesion ability [J]. FEBS, 1999, 454:335-340.
- [2] Fumelli Cristiana, Marconi Alessandra, Salvioli Stefano, et al. Carboxyfullerenes protect human keratinocytes from ultraviolet-B-induced apoptosis[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2000, 115(5):835-841.
- [3] ZHAO Qun-Fen, Zhu Ying, RAN Tie-Cheng, et al. Cytotoxicity of fullereneols for *Tetrahymena pyriformis* [J]. Nuclear Science and Techniques, 2006, 17(5):280-284.
- [4] Fuchs J, Huflejt M E, Rothfuss L M, et al. Packer acute effects of near ultraviolet and visible light on the cutaneous antioxidant defense system[J]. Photochem Photobiol, 1989, 50(6):739-744.
- [5] Hillebrand G G, Winslow M S, Benzinger M J, et al. Acute and chronic ultraviolet radiation induction of epidermal ornithine decarboxylase activity in hairless mice[J]. Cancer Res, 1990, 50:1 580-1 584.
- [6] Nishi J, Ogura R, Sugiyama M, et al. Involvement of active oxygen in lipid peroxide radical reaction of epidermal homogenate following ultraviolet light exposure[J]. Journal of Investigative Dermatology, 1991, 97:115-119.
- [7] Shindo Y, Witt E, Packer L. Antioxidant defence mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light[J]. Journal of Investigative Dermatology, 1993, 100:260-265.
- [8] Evelson P, Ordonez C, Nicol M F, et al. Oxidative stress and antioxidant response in mouse skin exposed to ultraviolet light[M]. VIII. Barcelona, Spain: Abstract Book, 1996.
- [9] 丁振华, 范建中. 紫外辐射生物学与医学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.

Radioprotection of Fullereneols for *Tetrahymena pyriformis* Exposed to Ultraviolet Radiation

ZHAO Qun-fen, TONG Li-juan

(Faculty of Life Science and Bioengineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To study the protective effects of fullereneols on *Tetrahymena pyriformis* cells exposed to ultraviolet radiation and the probable protective mechanisms, the survival rate of the cells is measured using MTT(methyl thiazolyl tetrazolium) after irradiation. With the conventional methods, also measured are the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), Guguangantai (GSH), glutathione reductase (GR), and glutathione peroxidase (GSH-PX) for *Tetrahymena pyriformis*. The results show that fullereneols can act to enhance the survival rate for the *Tetrahymena pyriformis* exposed to ultraviolet radiation. The protection of the damaged fullereneols induced by ultraviolet radiation seems to be effective through stimulating the activity of enzymic antioxidant, and reducing the production of the lipid surpoxidationd.

Key words: fullereneols; *tetrahymena pyriformis*; ultraviolet radioprotection

CLC number: Q691

Document code: A

(责任编辑 史小丽)