

螺旋藻抗辐射的研究

阮继红 庞启深 郭宝江

(仲恺农业技术学院, 广州)

随着工农业和平利用原子能事业的不断发展, 各种射线和化合物被广泛应用于生产、科研和医疗保健中, 因而人类和其它生物与放射性物质、化学诱变剂发生接触而受遗传损伤的可能性也在增大。在这样的情况下, 寻找抗辐射或增强遗传损伤修复能力的物质, 有着重要的价值。为此, 我们对螺旋藻进行了实验研究。

材料与方 法

螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 是蓝藻门、颤藻纲、螺旋藻属, 来源于非洲乍得湖^D。采用 Zarrouk 氏培养基^[2], 接种于 500ml 三角锥形瓶中静置培养, 连续光照, 光照强度为 4000 Lux 左右, 培养温度为 25—28℃。

辐照选用生长至对数中期 (即藻培养液在 560nm 处的光吸收值约为 0.8) 的藻体, 用细目铜网过滤后收集, 得到的糊状藻体用新鲜培养液冲洗 3 次, 然后重新悬浮于新鲜培养液中, 分别装入 10cm × 1.5cm 的透明玻璃试管 (管壁厚 0.7mm), 每管 10ml。分 6 组, 每组 2 管。⁶⁰Co- γ 射线的剂量率为 540rad/分, 各组的剂量分别为: 20、40、60、80 和 100k rad, 另设不经照射的一组为对照 (CK)。照射是借广东省农科院的钴源在室温 (25℃) 下进行的。照射后的藻液分别置于 200ml 新鲜培养液中按上述条件培养 (此时各组的细胞密度在 560nm 处的 OD 值均为 0.02)。每隔两天用 721 型分光光度计测定一次细胞生长情况。

螺旋藻提取物的纯化主要参考 Martin 等^[3]的方法稍加改进, 主要做法是: 收集鲜藻 200 克, 水洗 3 次, 置于圆底烧瓶中, 加 500ml

95% 酒精, 加热回流 4 小时, 离心 (4000 rpm, 15 分钟), 弃去上清液。用 Sevaga 法除去蛋白, 经丙酮洗涤, 真空干燥后得灰白色多糖提取物。用 DEAE-纤维素柱层析, 硫酸-苯酚比色法测定多糖, 再经 Sephadex G-200 柱层析纯化, 即得白色粉末的水溶性多糖纯化物。

抗辐射的细胞学检测是以蚕豆根尖细胞的微核细胞率为分析指标, 处理液为粗提物和纯化物的水溶液, 浓度均为 0.05%、0.10%、0.15% (W/V)。设同等体积蒸馏水浸种的照射组为溶剂对照 (CK₁) 和不经任何处理的为空白对照 (CK₂)。处理方法分照射前处理和照射后处理, 前处理是先用蒸馏水浸种 12 小时, 继而用不同浓度的提取物处理 12 小时, 冲洗后在 25℃ 下催芽 24 小时, 然后进行照射; 后处理是先照射干种子, 然后按上述方法进行浸种催芽。用于作光修复试验的材料是照射后马上转入黑暗条件下进行后处理。⁶⁰Co- γ 射线的照射剂量是: 萌动种子为 2k rad, 剂量率为 250rad/分; 干种子为 30k rad, 剂量率为 500rad/分。照射温度为: 20 ± 4℃, 经 3 次重复。各组根尖用 Carnoy 液固定 12 小时, 然后转入 70% 酒精中保存。根尖细胞 (RTC) 按常规改良品红染色压片法制片。每组统计 10 条根尖, 每个根尖观察统计 1000 个细胞, 以根尖细胞的微核细胞率 (MN-RTC) 作为遗传损伤的细胞学指标。

上述各试验数据均采用 Feinstein^[8] 的 t

Ruan Jihong et al.: Studies on the Radioresistance of *Spirulina platensis*

本文于 1987 年 4 月 20 日收到。

1) 原种由华南师范大学生物系莫熙穆教授提供, 在此致谢。

测验法分析各处理组与对照组的差异程度,并假设微核的发生符合于泊松分布 (poisson distribution)。

结果与分析

1. 螺旋藻的辐射抗性 从 20 krad 到 100krad 各照射组对螺旋藻的生长均看不到抑制效应;而且 5 个剂量照射组在照射后 8 天(对数生长期) 不同照射量的各个组合之间也不显示剂量-效应关系(图 1)。

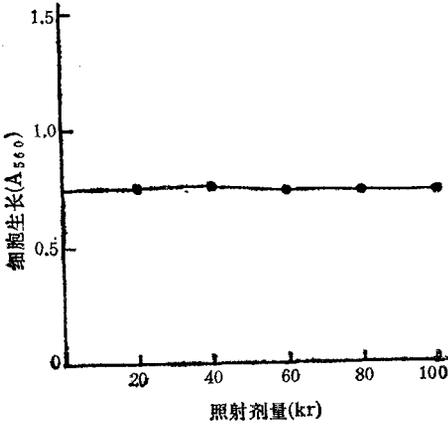


图 1 γ 辐射对螺旋藻生长的影响

从图 2 可看到,当辐射剂量高达 100krad 时,其细胞生长速率与对照组基本相同,经培养 24 天后,两者最终的细胞浓度也大体相同。这说明 *S. platensis* 对辐射有很强的抗性。

2. 螺旋藻水溶性多糖对蚕豆根尖细胞辐射遗传损伤的影响 在照射剂量为 2krad 的情

况下,较高浓度(0.15%)的粗提取物和纯化物的 3 个处理浓度(0.05%、0.10%、0.15%)都能明显减轻 γ 辐射引起的遗传损伤(表 1)。

通过 t 值测定法,上述 4 个处理组与对照组比较均达到差异极显著水平(t 值分别为 6.718、3.573、8.080、6.385)。这说明螺旋藻提取物在进入植物细胞后,同样具有辐射的防护效应。

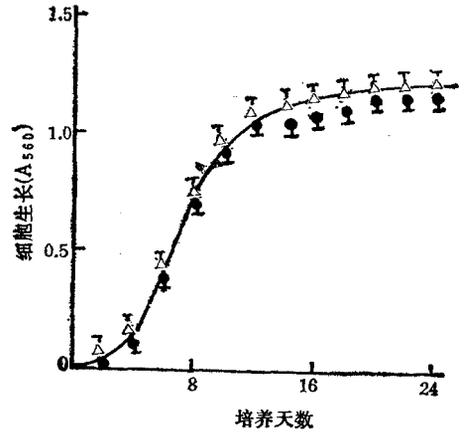


图 2 γ 辐射对螺旋藻生长速率的影响

● 对照组; Δ 辐照组。

蚕豆干种子经 30krad γ -射线辐照后,再用不同浓度的螺旋藻提取物作后处理,可得出与前处理基本一致的效应曲线(表 2)。

如分别以辐照前处理和后处理对照组的微核细胞率为 100% 计,则明显可见用提取物作后处理比前处理更为有效(图 3)。

辐射生物学的研究已表明,电离辐射主要通过两个基本途径使细胞 DNA 造成损伤:

表 1 前处理提取物浓度与微核细胞率的关系

处理浓度 (%)	溶剂纯度	观察根尖数	观察细胞数	微核细胞均值 \pm 标准误	t 值
0(CK)	蒸馏水	10	10076	0.308 \pm 0.035	—
0(2kr)	蒸馏水	10	10104	30.162 \pm 0.876	—
0.05	粗提物 纯化物	10	10107	29.472 \pm 1.081	0.673
		10	10048	23.530 \pm 1.856	3.573**
0.10	粗提物 纯化物	10	10103	27.548 \pm 1.304	2.005
		10	10071	21.581 \pm 1.061	8.080***
0.15	粗提物 纯化物	10	10125	22.255 \pm 1.177	6.718***
		10	10010	21.510 \pm 1.354	6.385***

表 2 后处理提取物浓度与微核细胞率的关系

处理浓度 (%)	溶剂纯度	观察根尖数	观察细胞数	微核细胞均值±标准误	t 值
0(CK)	蒸馏水	10	10100	0.338±0.048	—
0(30kr)	蒸馏水	10	10014	22.452±1.041	—
0.05	粗提物	10	10015	21.150±0.654	1.991
	纯化物	10	10087	16.406±1.362	4.680**
0.10	粗提物	10	10049	20.549±1.231	1.510
	纯化物	10	10059	13.519±0.927	9.209***
0.15	粗提物	10	10051	14.991±1.336	5.518***
	纯化物	10	10135	13.220±1.033	8.937***

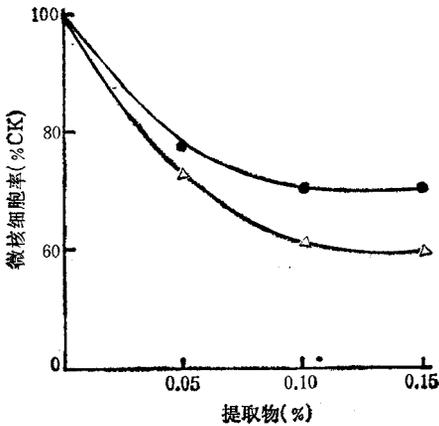


图 3 前处理后处理防护效应的比较

● 前处理; △ 后处理。

(1) DNA 分子的直接离子化; (2) 水射解产生 OH 自由基作用于 DNA^[49]。因此,可以设想螺旋藻提取物可能通过至少两种机制增强细胞对 γ 辐射的抗性:一是使细胞对活性自由基的清除得到短暂的增强,从而减少 DNA 的原初损伤;二是增强了细胞的 DNA 修复能力。如果是第一种情况,则前处理的防护效应应该更为有效,或者至少与后处理一样有效。但结果恰恰相反,说明提取物的防护效应并非来自对辐射产生活性自由基清除活性的增强,而可能与对细胞中某些修复系统的作用有关。

3. 螺旋藻水溶性多糖对光修复的影响

分别对 *S. platensis* 水溶性多糖的后处理组与对照组作不同时间的遮光处理,阻抑光修复作用,应用 t 值分析法,将各个不同时间遮光处理组的 MN-RTC 分别与对照组进行比较(见表

3)。

从表 3 可见,无论是用水溶性多糖的处理组,还是未经处理的对照组,阻断光复活途径后,遗传损伤有所加重,但并未达到显著水平。这说明在蚕豆根尖细胞中,光复活作用不是修复辐射损伤的主要途径;同时也表明 *S. platensis* 的水溶性多糖在根尖细胞中不参与这一修复过程。

表 3 螺旋藻纯化物对蚕豆根尖细胞光复活作用的影响

遮光时间 (小时)	纯化物 (%)	根尖数 (条)	观察 RTC 数 (个)	微核 RTC 率 (%)	t 值
0 (CK)	0	10	10014	22.452±1.041	
	0.05	10	10087	16.406±1.362	
6	0	10	10115	23.307±1.076	0.795
	0.05	10	10075	16.685±0.918	0.350
12	0	10	10090	24.191±1.631	1.066
	0.05	10	10032	17.245±0.823	1.019
18	0	10	10178	23.550±1.183	0.928
	0.05	10	10147	17.421±1.227	0.828
24	0	10	10226	24.702±1.208	1.862
	0.05	10	10221	17.754±1.236	1.091
30	0	10	10215	23.391±1.022	0.918
	0.05	10	10177	16.808±1.887	1.213

a. 经 γ -射线 (30kr) 照射后用 *S. platensis* 的纯化提取物 (Sp-1 0.05%) 或蒸馏水处理蚕豆种子。P > 0.05

讨 论

蓝藻的一个重要生物学特征是对紫外线和各类电离辐射有很强的抗性^[1,7]。还发现只有当辐射与某些 DNA 修复抑制剂处理相结合

时,才能抑制生长和收到较好的诱变效果^[16,17]。因而提出蓝藻的抗辐射特性是由于其细胞内存在一套较为完整的 DNA 损伤修复系统^[17,29]。本试验也证明螺旋藻对 γ -射线确有很强的抗性,在 100k rad 的高剂量急性照射下对其生长和最终的细胞浓度基本无影响。同时用其提取物——水溶性多糖作辐照前与辐照后处理,均能显著减轻辐射所产生的遗传损伤,而且两者无显著的差别。苏联学者斯维尔德洛夫曾提出^[3],在照射前应用化合物来减轻损伤叫防护,其本质是,化合物的存在改变了物质吸收能量后最初阶段发生的一些过程,从而导致损伤的减轻;而在照射后应用某些物质来减轻辐射损伤称为改善,其本质是化合物对上述这些原初过程无影响,但与照射后的修复与酶活性的恢复正常有关。故从本试验的初步结果说明螺旋藻具有对辐射较强的抗性,除了与其细胞内存在有天然辐射防护物质外,还存在除光复活外的修复系统。故进一步研究螺旋藻提取物对修复酶活性的影响,无疑是十分重要的。

70 年代以来,多糖作为广谱免疫促进剂而引起人们极大的兴趣。不少的研究证明,多糖不但能治疗机体的免疫系统受到严重损伤的癌症,又能治疗多种免疫缺损的疾病,有的还能诱导干扰素的产生^[18]。已经知道体细胞突变和癌变之间有着密切的关系;对致癌基因活化过程的大量研究也表明癌的发生和形成与某些 DNA 损伤和染色体畸变有关^[11]。近年来,尽管许多化学合成的药物已被广泛用于抗辐射和抗突变的研究,但往往由于其细胞毒性或遗传毒性,尚难付诸实际应用^[5]。故寻找天然抗辐射、抗突变的物质已引起国内外学者广泛的兴趣和

重视。螺旋藻水溶性多糖,属多价醇,能使低浓度的修复酶的空间构象保持稳定^[4],从而保护酶的活性。由于其不仅具有显著的抗辐射、抗突变的效应,同时这种天然防护物也没有遗传毒性,故在实践应用上具有诱人的前景。

参 考 文 献

- [1] 刘嘉炼: 1980. 应用微生物. 华香出版社, 台湾, pp. 74—75.
- [2] 郭宝江等: 1984. 植物学报, 26(2): 134—138.
- [3] 斯维尔德洛夫著, 王珏译: 1981. 中子的生物学效应和化学防护. 原子能出版社, 北京, pp. 183—184.
- [4] 清水样一等著, 陈石根译: 1982. 酶分析法的原理和应用. 上海科学技术文献出版社, 上海.
- [5] Benova, D. K.: 1986. *Mutation Res.*, 159: 75—81.
- [6] Brent, T. P.: 1983. *Biochemistry*, 22: 4507—4512.
- [7] Carr, N. G. et al.: 1982. *Jn: The Biology of Cyanobacteria*, Blackwell Scientific Publications, London, pp. 263—305.
- [8] Feinstein, A. R.: 1981. *In: Clinical Biostatistics, LV. The t -test and the Basic Ethos of Parametric Inference, Part 1, Elementary Statistical Reasoning*, Clin. Pharmacol. Ther., 29: 549—560.
- [9] Katcher, H. L. et al.: 1983. *Biochemistry*, 22: 4071—4081.
- [10] Martin, C. C. et al.: 1962. *Microbiol.*, 10: 153—156.
- [11] Ramel, C. et al.: 1986. *Mutation Res.*, 168: 47—65.
- [12] Riccard, G. et al.: 1981. *Bacteriology*, 147: 1002—1007.
- [13] Sancer, A. et al.: 1983. *Cell*, 33: 249—260.
- [14] Schafer, g. et al.: 1980. *Radiat. Biol.*, 37: 11—37.
- [15] Shestakov, S. V. et al.: 1975. *Molecular Biology Reports*, 2: 89—94.
- [16] Singh, H. N. et al.: 1969. *Radiat. Bot.*, 9: 105—110.
- [17] Srivastva, B. C. et al.: 1971. *Arch. Microbiol.*, 78: 139—144.
- [18] Wagner, H. et al.: *In: Progress in Medicinal and Economic Plat. Resseract, Academic Press, London, in press.*
- [19] Ward, J. F.: 1985. *Radiat. Res.*, 104: 103—111.
- [20] Witkin, E. M.: 1969. *Genet.*, 3: 225—245. 110.