

UV-B 辐射对蚕豆叶膜脂过氧化的影响及其机制

陈 拓^{1,2}, 安黎哲^{1,2}, 冯虎元², 杨景宏², 王勋陵^{2*}

(1. 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所, 兰州 730000; 2. 兰州大学生命科学院, 兰州 730000)

摘要: 温室种植的蚕豆在 0(CK)、8.82 kJ/m²(T₁)和 12.6 kJ/m²(T₂)3 种剂量的紫外线 B(UV-B)辐射引起膜脂变化及其机制的研究结果表明, UV-B 处理后, 蚕豆叶片中丙二醛(MDA)和 H₂O₂ 含量升高, 膜脂脂肪酸饱和度指数(IUFA)降低, 脂氧合酶(LOX)活性升高, 超氧歧化酶(SOD)活性稍有波动, 而 3 种多胺——腐胺(Put)、精胺(Spd)和尸胺(Spn)在照射 7d 后均有积累, 但在处理后期(21d)有所回落。推测由 LOX 主导的酶促膜脂过氧化作用和氧自由基引起的非酶促过氧化作用在膜结构的破坏中起重要作用, SOD 活性和多胺含量的变化是蚕豆对 UV-B 胁迫的一种适应性生理反应。

关键词: UV-B 辐射; 蚕豆; 膜脂过氧化; 多胺

The effect of UV-B radiation on membrane lipid peroxidation and mechanisms in broad bean leaves

CHEN Tuo^{1,2}, AN Li-Zhe^{1,2}, FENG Hu-Yuan², YANG Jing-Hong², WANG Xun-Ling²

(1. Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute CAS, Lanzhou 730000, China; 2. College of Life Laboratory Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The changes and mechanism of membrane lipids in the broad bean leaves exposed to 0(CK), 8.82 kJ/m²(T₁) and 12.6 kJ/m²(T₂) of UV-B radiation were observed respectively. The results showed that the contents of malonaldehyde (MDA) and H₂O₂ were increased, and that of index of unsaturated fatty acid (IUFA) was decreased, lipoxygenase (LOX) activity was enhanced and superoxide dismutase (SOD) activity was slightly changed after UV-B radiation treatment. The diamine putrescine (Put), the polyamine spermidine (Spd) and spermine (Spn) were accumulated in the broad bean leaves after 7 days of UV-B radiation treatment and they were returned to normal after 21 days. Those results indicate that the membrane lipid peroxidation catalyzed by LOX and caused by oxygen radicals, play an important role in the damage of the membrane structure. The changes of SOD activity and polyamine content in the broad bean leaves may be an adaptive physiological response to the UV-B radiation treatment.

Key words: UV-B radiation; broad bean; membrane lipid peroxidation; polyamine

文章编号: 1000-0933(2001)04-0579-05 中图分类号: 945.1 文献标识码: A

因大量使用作为致冷剂的氟氯烷烃和氮氧化物的排放, 平流层臭氧层衰减(如我国的青藏高原出现臭氧异常低值中心), 因而导致到达地表的紫外辐射大为增强, 特别是波段为 280~320 nm 的 UV-B 辐射。在模拟的增强 UV-B 辐射下, 多种重要作物产量降低, 如模拟臭氧层减薄 40%, 则马铃薯减产 41%, 菠菜减产 66%, 豆类减产 75%^[1]。故探明 UV-B 辐射对植物的影响效应及机理为人们所关注。前人指出, 植物产量的降低与植物膜的损伤有关^[2], 膜脂过氧化应对其负责^[3]。通常, 膜脂过氧化作用可分为由 LOX 主导的

基金项目: 国家自然科学基金(批号: 39970126)和中国科学院知识创新工程重大(KZCX1-10-02)资助项目

* 通讯联系人

收稿日期: 1999-01-28; 修订日期: 1999-06-04

作者简介: 陈 拓(1971~), 男, 湖南岳阳人, 博士。主要从事全球变化研究。

酶促过氧化和活性氧(如 H_2O_2)主导的非酶促过氧化。而目前关于 UV-B 诱导的膜脂过氧化起因的研究主要集中在活性氧,关于 LOX 未有直接的证据。本文研究了 UV-B 辐射对蚕豆叶膜脂过氧化的影响及有关的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

蚕豆(*Vicia faba* L.)种子经 5%次氯酸钠消毒 30min,用自来水冲洗,浸泡过夜后,种植温室内。昼夜温度 30℃/15℃,光照 PAR400~600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$,相对湿度 70%。待长出 3 片真叶后将材料分为 3 组,一组作为对照,不进行 UV-B 处理,另两组保证在相同 PAR 下增加 UV-B 辐射。每隔 7d 剪取同一叶位的叶片测定各项生理指标,除特别标明外,每项测定重复 2~3 次,每次测定设 3 个重复,数据为各处理的平均值。

1.2 UV-B 处理

紫外灯管(秦牌,波长峰值 310nm,宝鸡光源研究所研制)发射的紫外线经 0.08mm 乙酸纤维素膜过滤后照射植物,以消除 UV-C 辐射的干扰。不断调整灯管与植物冠层之间的距离以保证植物接受一定剂量的 UV-B 辐射。每天处理 8h(9:00~17:00)。UV-B 辐射剂量由北师大制造的便携式 UV-B 测定仪测得的读数经 Caldwell 公式^[4]转换后获得:UV-B=140.2×(读数)-4.283。

1.3 MDA 含量的测定

参照 Raeri 等的方法^[5]。反应系统含 0.2mL 提取液、1.3mL 0.2M 磷酸钾缓冲液(pH 7.6)、2.5mL 0.5%TBA(溶于 5%三氯乙酸中)。反应混合液在沸水浴中加热 20min,迅速冷却,于 300×g 下离心 5min,取上清液于 532nm、600nm 处测定消光值。含量按 $155 \times (\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600})$ 计算。

1.4 膜脂肪酸组成的分析

参照 Norberg 等的方法^[6]。取 1 体积提取液,加入 2 倍体积氯仿:甲醇(2:1 V/V)和 2 倍体积氯仿,最后加入 1 体积的蒸馏水。充分振荡至相分离后,移去水相且用 2 倍体积氯仿洗涤 2 次,将所得氯仿相合并后真空干燥,甲基化后在岛津气相色谱仪上分析。柱温 220℃,进样口及检测器温度分别为 220℃、260℃,氢火焰离子检测器流速 40~50mL/min。利用面积归一化法计算各脂肪酸含量。

1.5 H_2O_2 含量的测定

参照 Patterson 等的方法^[7]。1mL 冷丙酮提取液加 0.2mL 浓氨水、0.1mL 20% TiCl_4 。碱性条件下形成 Ti-过氧化物复合物沉淀,3000×g 离心,弃上清液,沉淀用冷丙酮悬浮洗涤几次。最后在沉淀中加入 3.0mL 2.0mol/L H_2SO_4 溶解。于 508nm 处测定光吸收值。

1.6 SOD 和 LOX 活性的测定

SOD 活性的测定按照 Giannopolitis 等的方法^[8]。1 酶活单位定义为抑制 NBT 还原 50%所需的酶量。LOX 活性的测定参照 Surrey 的方法^[9]。以溶解在乙醇中的亚麻酸为底物。测定 234nm 的光密度,反应混合液包括:3mL 0.1mol/L, pH6.3 的磷酸钾缓冲液,30 μL 10 mmol/L 的底物反应液和一定量的酶提取液。取消光系数为 28.0/nM·cm 进行酶活性的计算。

1.7 多胺含量的测定

参照 Flores 等的方法^[10]并稍加修改。取处理植株的叶片 1g 加入预冷的 5% HClO_4 中匀浆,冰浴提取 1.5h。28,000rpm 低温离心 20 min,取上清液 0.5mL 与 1mL 2 mol/L NaOH 混合,加入 10 μL 苯甲酰氯,强烈振荡后,加盖 25℃下保温 1 h,再加入 2 mL 饱和 NaCl 和 2 mL 乙醚萃取苯甲酰多胺,振荡后 1500×10 离心 5min,收集 1mL 乙醚相,50℃蒸干,-80℃保存。在高压液相色谱(gilson)上测定之前,用 100 μL 甲醇溶解样品。用相同的方法制备多胺标准样。 C_{18} -ODS 反相柱,4.6 mm×250 mm,柱温 $30 \pm 1^\circ\text{C}$,检测波长为 254nm,洗脱液为:甲醇:水:乙腈=64:33.5:2.5。流速为 0.5mL/min。

2 结果

2.1 UV-B 处理对蚕豆叶片膜脂的影响

UV-B 辐射下 MDA 含量显著增加,并具剂量效应(图 1)。在 UV-B 处理 21d 后,MDA 含量与对照相比分别升高了 86.2%和 165.5%。

对膜脂脂肪酸组分的检测表明,膜脂脂肪酸组成没有改变,但配比变化,与对照相比,经UV-B处理后棕榈酸和硬脂酸含量明显升高,亚麻酸含量明显降低,因而不饱和度指数降低(表1)。

2.2 与脂质过氧化相关的H₂O₂含量和LOX活性的变化

UV-B辐射引起了H₂O₂的积累。21d后,处理组的量分别为对照组的148.8%和178%(图2)。
LOX利用膜磷脂组分(主要为亚油酸和亚麻酸)为底物能加快膜脂过氧化作用,并在这个过程中伴随有活性自由基的产生。图3显示了UV-B辐射对LOX活性的影响。在UV-B辐射下LOX活性升高,28d后处理组比对照组分别增加了39.6%和47.9%。

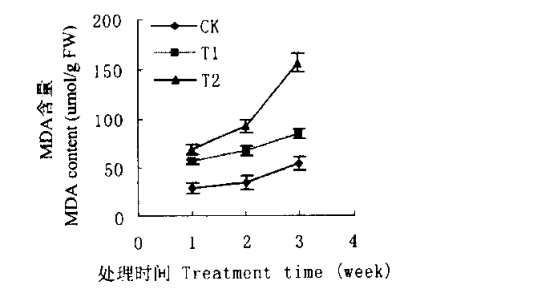


图1 UV-B辐射对MDA含量的影响

Fig.1 Effect of UV-B radiation on MDA content

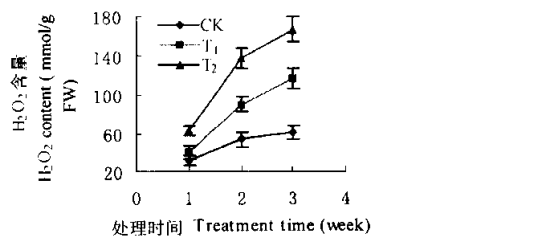


图2 UV-B辐射对H₂O₂含量的影响

Fig.2 Effect of UV-B radiation on H₂O₂ content

表1 UV-B辐射对蚕豆叶片膜脂脂肪酸组成的影响

脂肪酸组成						
Fatty acid composition (mol %)						
处理	棕榈酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	亚麻酸	IUFA *
Treatment	Palmitic	Stearic	(Oleic)	Linoleic	Linolenic	
	(16:0)	(18:0)	(18:1)	(18:2)	(18:3)	
CK	27.03±2.0**	1.87±0.4	4.78±0.1 ^{NS}	20.87±1.2**	45.45±2.2**	182.88
T1	31.58±0.2**	3.40±0.1**	5.93±0.1 ^{NS}	27.89±0.9*	31.21±1.1**	155.34
T2	31.73±0.7 ^{NS}	3.82±0.7**	7.37±1.0**	33.07±0.8**	24.07±0.2**	145.72

* IUFA=[18:1 mol%+(18:2 mol%)×2+(18:3 mol%)×3]×100%。Asterisks indicate significant differences between the treatment (* P≤0.05, ** P≤0.01; NS_{not} significant with student t-test)

表2 UV-B辐射对多胺含量的影响(nmol/g FW)

多胺含量						
Polyamine content (nmol/g FW)						
处理	UV-B 辐射 7d			UV-B 辐射 21d		
Treatment	Put	Spd	Spn	Put	Spd	Spn
CK	1340±62*	97.80±23 ^{NS}	10700±122*	931±58**	175±48*	3316±77**
T1	2630±71**	392±45*	9340±86*	2970±36**	466±92**	3330±89 ^{NS}
T2	5060±103*	1076±52 ^{NS}	21900±49**	3230±73**	225±54**	2530±71*

Asterisks indicate significant differences between the treatment (* P≤0.05; ** P≤0.01; NS_{not} significant with student t-test)

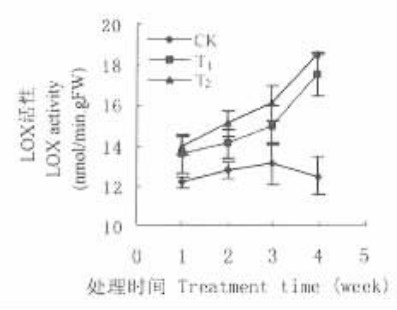


图 3 UV-B 辐射对 LOX 活性的影响

Fig. 1 Effect of UV-B radiation on LOX activity

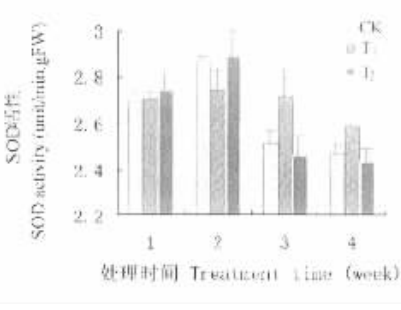


图 4 UV-B 辐射对 SOD 活性的影响

Fig. 2 Effect of UV-B radiation on SOD activity

2.3 与植物抗性相关的 SOD 活性和多胺含量的变化

SOD 具有清除超氧自由基从而减轻膜脂过氧化的作用^[11]。多胺能通过离子的交互作用而与膜表面结合,从而抑制膜脂过氧化^[12]。UV-B 胁迫下 SOD 活性仅略有波动(图 4),而植物体内的 3 种多胺(Put、Spd 和 Spn)含量变化明显(表 2)。UV-B 处理下 Put 和 Spd 含量有不同程度的累积,Spn 呈波动变化,但处理后期三者含量相对来说均有所回落(图 4)。

3 讨论

Teramura^[13]和 Caldwell 等^[14]分别详细地分析了前人的研究结果,他们均发现 UV-B 使约 2/3 的被检测植物种的生物量出现不同程度的下降。Murphy^[2]认为,植物生物量的降低与 UV-B 对植物膜的破坏密切相关,其中膜脂过氧化起着至关重要的作用。本试验对 MDA 含量的测定和膜脂脂肪酸组成的分析结果证实了 UV-B 处理下膜脂过氧化作用的发生。通常,膜脂过氧化作用可分为由 LOX 主导的酶促过氧化和氧自由基(如 H₂O₂)主导的非酶促过氧化。本文中 UV-B 辐射下 LOX 活性升高,28d 后处理组比对照组分别增加了 39.6%和 47.9%,同时亚麻酸的含量明显降低(表 1);并且 UV-B 处理期间 H₂O₂ 含量明显升高(图 2),与晏斌等^[3]和 Murphy 等^[15]的结果一致,说明 LOX 和 H₂O₂ 均可能参与了 UV-B 诱导的膜脂过氧化作用。但 Vanhassels 等^[16]认为氧自由基没有直接参与 UV-B 诱导的膜脂过氧化。这可能跟不同试验人员使用的试验材料和试验条件不同有关,因为不同植物种对 UV-B 的响应不同,不同环境下植物种的响应也不一样^[17]。

SOD 可通过清除氧自由基而减轻膜脂过氧化的作用^[11]。多胺通过离子的交互作用而与膜表面结合或通过清除氧自由基来抑制膜脂过氧化^[12]。Tanaka 等^[18]和晏斌等^[3]均认为逆境胁迫下 SOD 活性的降低是植物体内氧自由基积累的主要原因。本试验中 SOD 活性只稍有波动(图 4),这与 Willekens 等^[19]的结果一致。这也许是正常情况下植物体内存在的 SOD 对于清除 UV-B 辐射期间产生的超氧自由基是足够的, H₂O₂ 在植物体内的积累可能与其清除系统的有效性的降低有关,如抗坏血酸-谷胱甘肽循环系统(数据未给出)。表 2 显示多胺在 UV-B 处理下有所累积(Spn 除外),但长期的处理下其含量相对来说均有所回落,处理后期多胺的相对回落可能是植物对 UV-B 诱导的多胺需要减少而降低了多胺的合成代谢活性,这种降低可能会加强植物其他适应性生理生化反应,如活性氧清除系统、类黄酮含量的变化等^[12]。这些结果说明, SOD 活性和多胺含量的变化可能是植物对 UV-B 辐射的一种适应性的生理生化反应,但它们的大小并不能决定植物对 UV-B 辐射诱导的膜脂过氧化的抵抗能力。

参考文献

[1] Tevini M, Teramura A H. UV-B effects on terrestrial plants. *Photochem. Photobiol.*, 1989, **40**(4): 479~487.
[2] Murphy T J. Lipopigments as targets of ultraviolet radiation. *Physiol. Plant.*, 1983, **58**(2): 381~388.
[3] 晏斌, 戴秋杰. 紫外线 B 对水稻叶组织中活性氧代谢及膜系统的影响. *植物生理学报*, 1996, **22**(4): 373~378.

- [4] Caldwell M M. Solar ultraviolet radiation and the growth and development of higher plant. In: AC Glese ed. *Photo-physiology*, Academic Press, New York, 1971. **6**:131~177.
- [5] Raeri A, Lencioni L, Schenone G, *et al.* Glutathione-ascorbic acid cycle in pumplein plants grown under polluted air in open-up chambers. *J. Plant Physiol.*, 1993, **142**(3):286~290.
- [6] Norberg P, Liljenberg C. Lipids of plasma membranes prepared from oat root cells. *Plant Physiol.*, 1991, **96**(4):1136~1141.
- [7] Patterson B D, MacRae E A, Fergnson I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extract using titanium (IV). *Anal. Biochem.*, 1984, **139**(2):487~492.
- [8] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*, 1997, **59**(2):309~314.
- [9] Surrey K. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.*, 1964, **39**(1):65~70.
- [10] Flores H E, Galston A W. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.*, 1982, **69**(3):701~706.
- [11] 曾福礼, 张明风, 李玉峰. 干旱胁迫下小麦叶片微粒体活性氧自由基的产生及其对膜的伤害. *植物学报*, 1997, **39**(12):1105~1109.
- [12] Kramer G F, Norman H A, Krizek D T, *et al.* Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Photochemistry*, 1991, **30**(7):2101~2108.
- [13] Teramura A H. Implications of stratospheric ozone depletion upon plant production. *HortScience*, 1990, **25**:1557~1560.
- [14] Caldwell M, Teramura A H, Tevini M, *et al.* Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial plant. *Ambio*, 1995, **24**(3):166~173.
- [15] Murphy T M. Effect of broad-band ultraviolet and visible radiation on hydrogen peroxide formation by cultural rose cell. *Physiol. Plant.*, 1990, **80**(1):63~68.
- [16] Vanhasselt P R, Chow W S, Anderson J M. Short-term treatment of pea leaves with supplementary UV-B at different oxygen concentrations: impacts on chloroplast and plasma membrane bound processes. *Plant Sci.*, 1996, **120**(1):1~9.
- [17] Yuan L, Ming Y, Xunling W. Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on crop structure, growth and yield components of spring wheat under field conditions. *Field Crops Res.*, 1998, **57**(2):253~263.
- [18] Tanaka K, Suda Y, Kondo N, *et al.* O₃ toerance and the ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 1985, **26**(7):1425~1431.
- [19] Willekens H, Camp W V, Monmtagu M V, *et al.* Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet-B have similar effects on mRNA acumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.*, 1994, **106**(3):1007~1014.