

增强 UV-B 辐射对大豆胚轴 DNA 损伤、修复和蛋白质含量的影响

强维亚¹, 汤红官¹, 侯宗东², 安黎哲^{1,3}, 王勋陵^{1*}

(1. 兰州大学生命科学学院干旱农业生态国家重点实验室, 兰州 730000; 2. 兰州大学资源环境学院, 环境科学与工程系, 兰州 730000;
3. 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所, 兰州 730000)

摘要:大气平流层臭氧层减薄引起到达地表的 UV-B 辐射增强。为探讨在增强 UV-B 辐射下植物细胞 DNA 的损伤修复和蛋白质含量的关系, 利用³H-TdR 掺入法, 研究了在 8.22 kJ/(m²d) 和 12.42 kJ/(m²d) UV-B 辐射 (相当于兰州地区大气平流层臭氧减薄约 12% 和 20%) 胁迫下, 大豆胚轴细胞 DNA 合成和非按期合成 (UDS) 变化, 并测定了胚轴蛋白质含量变化, 结果显示, UV-B 辐射导致 DNA 损伤, 并诱导了 DNA 损伤的修复, 胚轴细胞 UDS 效应增强, UDS 指数增大。低 UV-B 辐射强度下, 胚轴蛋白质含量增加, 可能是 UV-B 诱导了一些与抗性有关的基因表达, 导致一些新的与抗性有关的蛋白质合成; 在高强度 UV-B 辐射下, UDS 指数与低强度辐射下无显著差异 ($P=0.05$), 但蛋白含量较低强度辐射下显著下降 ($P=0.05$), 说明高强度 UV-B 辐射加重了 DNA 损伤, 而修复并未加强, 并且高强度辐射抑制基因的正常表达和蛋白质合成。这些蛋白质的合成可能与大豆对 UV-B 辐射的抗性有关。

关键词:大豆; 紫外线-B (UV-B); 辐射; 镉 (Cd); DNA 损伤修复; DNA 非按期合成 (UDS); 蛋白质

Effect of enhanced UV-B radiation on DNA damage, repair and protein content in soybean hypocotyls

QIANG Wei-Ya¹, TANG Hong-Guan¹, HOU Zong-Dong², AN Li-Zhe^{1,3}, WANG Xun-Ling^{1*} (1. School of Life Science State Key Laboratory of Arid Agroecology, Lanzhou University, Lanzhou 730000 China; 2. Faculty Resources and Environment, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3. State Key Lab. of Frozen Soil Engineering, Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(4): 852~856.

Abstract: Ozone depletion in the upper atmosphere cause increasing doses of UV-B on the earth's surface and understanding how plants protect themselves against this exposure is important to maintain crop productivity. Soybean hypocotyls were treated with doses of UV-B at 8.22 kJ/(m²d) and 12.42 kJ/(m²d) UV-B radiation, corresponding to depletions in the stratospheric ozone of about 12 % and 20%, respectively, for a clear solstice day at Lanzhou city (36.04°N, 1550m), China. DNA synthesis and unscheduled DNA synthesis was assessed by measuring the incorporation of ³H-TdR into DNA along with changes in hypocotyls protein content. Repair of induced DNA damage, unscheduled DNA synthesis and protein synthesis was increased in response to the lower dose of UV-B radiation. At higher UV-B dose, there was no significant difference ($P=0.05$) in unscheduled DNA synthesis but a significant decrease ($P=0.05$) in protein contents in the exposed hypocotyls. Higher UV-B irradiation could have caused DNA damage that could not be repaired because the relevant protective proteins were not synthesized. Resistance to UV-B in soybean may be highly dose dependent due to limitation in the induction of protective proteins.

Key words: soybean (*Glycine max* L.); ultraviolet-B (UV-B) radiation; DNA damage and repair; unscheduled DNA synthesis (UDS); protein.

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目 (ZS031-A25-040-D); 国家自然科学基金资助项目 (30170083, 30170168)

收稿日期: 2003-01-06; **修订日期:** 2003-09-13

作者简介: 强维亚 (1958~), 男, 博士, 讲师, 主要从事环境生物学研究。E-mail: qiangwy@lanzhou.cnbg.com

* **通讯作者** Author for correspondence, E-mail: Qiangwy@lanzhou.cnbg.com

Foundation item: Natural Science Foundation of Gansu Province (No. ZS031-A25-040-D); National Natural Science Foundation of China (No. 30170083, 30170168)

Received date: 2003-01-06; **Accepted date:** 2003-09-13

Biography: QIANG Wei-Ya, Ph. D., mainly engaged in environment biology.

文章编号:1000-0933(2004)04-0852-05 中图分类号:Q948 文献标识码:A

人类使用氯氟烃类化合物(CFCs)引起了大气平流层臭氧层减薄,并导致到达地表紫外线-B(UV-B 280~320nm)辐射增强,对生态系统和动植物生长造成了深远的影响,甚至对人类健康构成了威胁^[1]。报道表明增强 UV-B 辐射会引起细胞 DNA 形成嘧啶二聚体(CPDs)^[2],影响细胞正常代谢和分裂^[3],导致黄瓜(*Cucumis sativus*)子叶^[4],欧芹(*Petroselinum crispum*)叶片^[5],小麦(*Triticum aestivum*)叶片^[6]细胞分裂速度减慢。UV-B 胁迫对 DNA 的损伤还会影响基因的表达,改变细胞蛋白质组成和含量^[7,8],这与 DNA 受到损伤,DNA 复制受到抑制有关^[9]。

DNA 损伤的修复在生物体内普遍存在,这种机制是生物体消除或减轻 DNA 损伤、保持遗传稳定性的重要途径^[10,11]。在研究中,细胞非按期 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis, UDS)常被作为研究 DNA 损伤修复的重要指标^[12~15]。但在以往 DNA 损伤修复的研究中,用于高等植物体细胞研究并不多见。Syomov^[12]报道了 γ -射线诱导 *Vicia cracca* 根分生组织细胞 UDS 效应。Jackson and Linskens^[13,14]利用植物花粉的 UDS 变化研究了 DNA 损伤的修复机制。常学秀和王焕校^[15]报道了低浓度的 Cd^{2+} 、 Al^{3+} 对大豆胚细胞 UDS 的促进作用。而韩榕等^[16]研究结果表明 He-Ne 激光与 UV-B 辐射复合处理可使小麦种胚细胞非按期 DNA 合成期提前。

增强 UV-B 辐射不仅引起 DNA 的损伤,影响 DNA 修复过程,而且可能影响基因表达,从而导致细胞中蛋白质含量和组成变化。鉴于此,本文研究了不同 UV-B 辐射强度下,大豆胚轴细胞 UDS 的变化特性,以及与蛋白质含量变化的关系。为高等植物对增强 UV-B 辐射抗性的研究提供相关依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

1.1.1 材料 种子经 5% 次氯酸钠(NaClO)溶液消毒 5min,置于 30℃ 温箱中预萌发 24h。选择萌发一致的种子种在装满洁净石英砂大烧杯中,每杯种 8 株,1/2 Hoagland 营养液培养,待胚轴长到 4~5cm 时,进行增强 UV-B 辐射处理。以无增强 UV-B 辐射培养为对照。每一处理重复 3 次。

1.1.2 UV-B 处理 参照 Feng 等^[17]方法,增强的 UV-B 辐射由悬挂于培养室中的紫外线-B 辐射灯管(秦牌,30W,波长峰值 305nm,宝鸡光源研究所生产)提供,发射的紫外线经 0.08mm 乙酸纤维素膜过滤后照射大豆幼苗胚轴,每天照射 7h(10:00~17:00),辐射剂量用 UV-B 辐射计(北京大学光学仪器厂生产)测定,再经 Caldwell^[18]公式转换,获得生物有效辐射(Biologically effective radiation, UV-B_{BE})。实验的 UV-B 辐射强度分别设置为 8.22 kJ/(m²·d) (UV-B₁) 和 12.42 kJ/(m²·d) (UV-B₂),根据 Green 等^[19]的模型,分别相当于兰州地区(36.04°N,1550m)夏季晴天大气臭氧减薄约 12% 和 20%。以无增强 UV-B 辐射为对照。培养室内补充光照(Photosynthetically Active Radiation, PAR, 400nm-700nm)(240 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$),温度 20℃~30℃;湿度 55%~75%。

1.1.3 恢复培养 处理 7d 后,将各种处理材料全部分为 2 组,一组恢复培养 12h,另一组移入含有 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ 羟基脲营养液中同步培养 12h。

1.2 ³H-TdR 标记、DNA 合成速率和非按期 DNA 合成(UDS)测定

1.2.1 标记液

A 液 ³H-TdR 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$,青霉素 G 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,硫酸链霉素 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。用于测定 DNA 合成速率。

B 液 ³H-TdR 2 $\mu\text{Ci} \cdot \text{ml}$,青霉素 G 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,硫酸链霉素 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,羟基脲 10 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 。用于测定 UDS。羟基脲是 DNA 半保留复制的抑制剂,但对胁迫诱导的 UDS 几乎没有作用。

1.2.2 标记 参照常学秀等^[21]方法,分别称取各处理材料胚轴 0.2g,切成均匀(约 0.5mm)小段,置于分别盛有 1ml A、B 标记液的小瓶中(将恢复培养的材料投入 A 液中;含羟基脲营养液培养的材料投入 B 液中),每样重复 3 次,24±1℃ 下震荡培养 4h。震荡培养后用蒸馏水冲洗 3 次,再用预冷无水乙醇冲洗 3 次,冷气吹干。置于 -20℃ 冰冻 24h,终止细胞活动。然后用冷乙醇在 0~4℃ 下研磨,定容至 3.0ml,2000r/min 离心 30min,弃上清,沉淀用无水乙醇冲洗、离心 3 次,加入 2.0ml 5% 的高氯酸(HClO_4),于 70℃±2℃ 水解 40min,然后在 50±2℃ 水解过夜,再加入 1mol/L NaOH 中和,2000r/min 离心 30min,取上清液,进行放射性闪烁计数测定。

1.2.3 测定 180 μl 闪烁液(Optiphase Supermix)中加入 20 μl 标记样品上清液,用 Wallac Oy1450 型(Wallac Holand)液频闪烁仪测定标记物掺入量的闪烁计数值(Count Per Minute CPM),作为 ³H-TdR 对 DNA 的掺入指标,表示 DNA 合成和 UDS 效应的水平。

1.2.4 蛋白质含量数据 蛋白质提取参照 Kemp 和 Sutton^[20]方法,蛋白质含量根据 Bardford^[21]方法测定,以牛血清蛋白(电泳纯, Sigma)作标准曲线。

2 实验结果

2.1 UV-B 辐射对 UDS 指数的影响

UDS 指数(UDS index)是指有羟基脲存在时 DNA 的合成速率与无羟基脲时 DNA 合成速率的百分比^[22]。在 UV-B 辐射下,UDS 指数显著增大(图 1),但在两个不同强度辐射剂量之间无显著差异($p>0.05$)。

2.2 UV-B 辐射对 DNA 合成的影响

图 2 显示,增强 UV-B 辐射引起胚轴细胞 DNA 中³H-TdR 掺入量明显增加,CPM 值明显升高。并且随 UV-B 辐射强度增大,DNA 中的³H-TdR 掺入量增加,在高强度 UV-B 辐射下,CPM 值增大达到显著水平($p<0.05$)。

2.3 UV-B 辐射对 UDS 效应的影响

实验强度下,UV-B 辐射引起 UDS 增大,UV-B 辐射增强,UDS 效应也增大,但在两个辐射强度之间无显著差异($p>0.05$) (图 3)。说明 UV-B 辐射诱导了大豆 UDS 升高,但高强度 UV-B 辐射对 DNA 损伤的修复不利。

2.4 UV-B 辐射对蛋白质含量的影响

图 4 显示,低辐射强度导致蛋白质含量显著增加;高辐射强度下,蛋白质含量显著低于低辐射强度。 $8.22\text{kJ}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ UV-B 辐射下,胚轴蛋白质含量较对照显著升高($p<0.05$)。但在 $12.42\text{kJ}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ UV-B 辐射下,蛋白质含量显著降低($p<0.05$)。对照图 1 可以发现,低强度 UV-B 辐射下,UDS 指数与蛋白含量变化一致;但在高强度 UV-B 辐射下,蛋白质含量明显下降。低 UV-B 辐射强度可能诱导了相关蛋白质基因的表达,而高 UV-B 辐射强度则有可能抑制基因的表达和蛋白质合成。

3 讨论

细胞非按期 DNA 合成(UDS)的发生是 DNA 分子损伤修复的表现^[23]。一些胁迫条件(如辐射,重金属等)对动物离体培养细胞 UDS 影响的研究已多有报道^[22,24]。但 UDS 作为 DNA 损伤修复的重要指标用于植物细胞尤其是用于高等植物体细胞的研究则很少见报道^[18]。Jackson 等^[19]利用 UDS 技术研究植物花粉在金属离子胁迫下的 DNA 损伤,证明了不同重金属离子可不同程度地诱导矮牵牛花粉 UDS 发生。在更早些时候 Jackson and Linskens^[14]还报道了紫外线 C(200~280nm)辐射诱导花粉中 UDS 增加。

羟基脲(HU)是正常 S 期 DNA 合成的抑制剂,利用 HU 抑制 DNA 的合成,并通过³H-TdR 掺入方法测定 UV-B 辐射下大豆胚轴的 DNA 合成和 UDS 效应。结果表明 UV-B 辐射导致大豆胚轴细胞 DNA 损伤,引起胚轴细胞 UDS 指数升高(图 1)。同时,UV-B 辐射刺激大豆胚轴细胞 DNA 合成中的³H-TdR 掺入量增加,提取物中标记物掺入量的闪烁计数值(CPM)升高(图 2)。在低辐射强度下,UV-B 辐射虽然造成 DNA 的损伤,但 UDS 效应的增大(图 3)也表明同时诱导了细胞 DNA 损伤的修复加强。在 UV-B 辐射下,DNA 中³H-TdR 掺入量增加主要是 UV-B 辐射引起的损伤修复所致。与对照相比,UV-B 辐射导致 UDS 在细胞中的比例(UDS 指数)显著增大($p<0.05$) (图 1),在高强度 UV-B 辐射下,UDS 指数与低辐射强度下无显著差异,说明高强度辐射下 DNA 损伤加重,而修复并未较低辐射下加强。测定结果表明,伴随着细胞 UDS 的增大,胚轴蛋白质含量在低强度辐射下增加,但在高强度辐射下比低强度辐射下显著下降(图 4)。Tevini 和 Iwanzik^[15]曾经报道了 UV-B 辐射可使植物蛋白质含量增加,Nedunchezian^[25]的研究也表明 UV-B 辐射促进了植物细胞蛋白质合成。同时,也有研究表明 UV-B 辐射降低了植物可溶性蛋白质含量^[26]。UV-B 辐射下蛋白质含量的增减,决定于辐射强度和不同植物对 UV-B 辐射的敏感程度差异。低 UV-B 辐射强度下,胚轴蛋白质含量的增加可能与 UV-B 诱导了一些与抗性相关的基因表达有关,导致一些新的与抗性有关的蛋白质合成^[14,27],蛋白质含量与 UDS 指数同时升高;强 UV-B 辐射

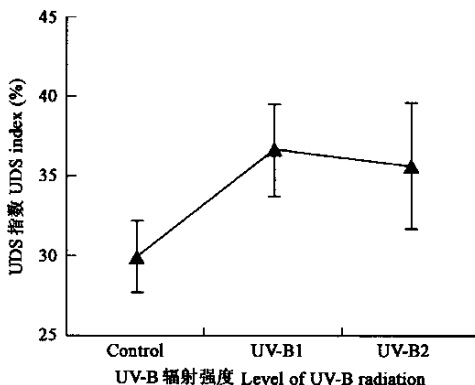


图 1 不同 UV-B 辐射强度下,UDS 指数的变化

Fig. 1 Changes in UDS index under different level of UV-B radiation

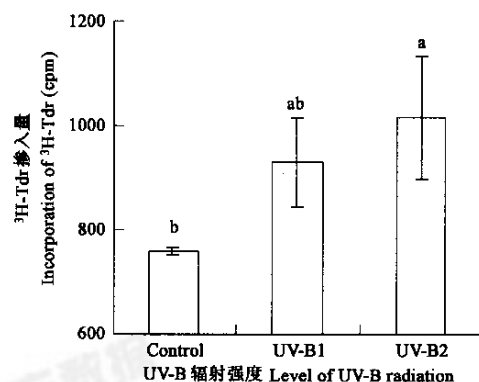


图 2 不同强度 UV-B 辐射下,DNA 合成中³H-TdR 掺入量变化

Fig. 2 Changes in incorporation of ³H-TdR in DNA synthesis of soybean hypocotyl exposed to different level of UV-B radiation

不同字母表示显著性差异水平($p<0.05$) The different letters show the significance with one way variance analysis (ANOVA) at $p<0.05$ level

抑制基因的正常表达和蛋白质的合成^[28],蛋白质含量比低强度 UV-B 辐射下显著降低,并且较 UDS 指数更显著地降低(图 4),表明基因表达水平和蛋白质合成对强 UV-B 辐射更为敏感。

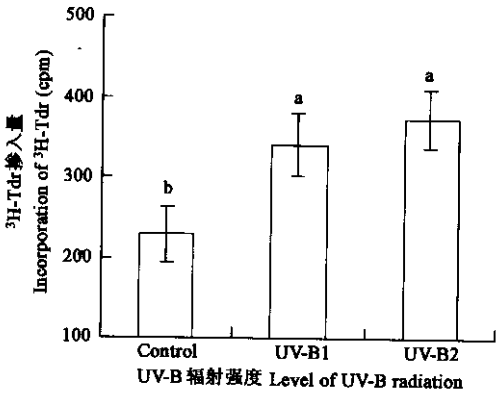


图 3 不同强度 UV-B 辐射下,大豆胚轴细胞 UDS 变化

Fig. 3 Changes in UDS of soybean hypocotyl exposed to different level of UV-B radiation

不同字母表示显著性差异水平 ($p<0.05$) The different letters show the significance with one way variance analysis (ANOVA) at $p<0.05$ level

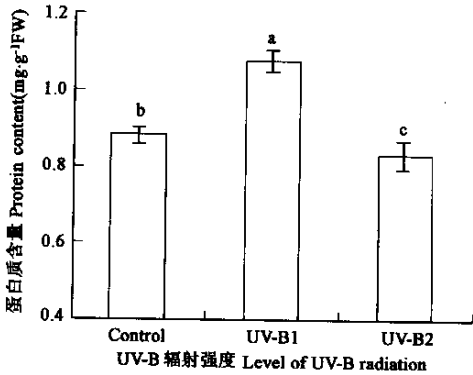


图 4 不同强度 UV-B 辐射下,大豆胚轴蛋白质含量变化

Fig. 4 Changes in protein content of soybean hypocotyl exposed to different level of UV-B radiation

不同字母表示显著性差异水平 ($p<0.05$) The different letters show the significance with one way variance analysis (ANOVA) at $p<0.05$ level

References:

[1] Caldwell M M, Teramura A H, Tevini M, *et al.* Effect of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial plants. *Ambio.*, 1995, **24**: 166~173.

[2] Kang H S, Hidema J, Kumagai T. Effects of light environment during culture on UV-induced cyclobutyl pyrimidine dimers and their photorepair in rice (*Oryza sativa* L.). *Photochem Photobiol.*, 1998, **68**:71~77.

[3] Ballare C J, Barnes P W, Flint S D, Inhibition of hypocotyls elongation by ultraviolet radiation in de-etiolated tomato seedlings II. Time-course, comparison with flavonoid response, and adaptative significance. *Physiol Plant*, 1995, **93**:953~601.

[4] Tevini M, Iwanzik W. Effects of UV-B radiation on growth and development of cucumber seedlings. IN: Worrest, R. C. and Caldwell, M. M. eds. *Stratospheric Ozone Reduction, Solar Ultraviolet Radiation and plant Life*. Springer-Verlag Berlin, 1986. 271~285.

[5] Logemann E, We S C, Schroder J, *et al.* Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle- related genes. *The Plant Journal*, 1995, **8**:865~876.

[6] Hopkins L. The effects of elevated ultraviolet-B radiation on the growth and development of the ptimary leaf of wheat (*Triticum aestivum* L. Cv. Maris Huntsman). Ph.D. thesis. University of St Andrews, St Andrews, UK. 1997.

[7] Tevini M, Iwanzik W, Thoma U. Some effects of enhanced UV-B irradiation on the growth and composition of plants. *Planta*, 1981, **153**:388~394.

[8] Feng G N, An L Z, Feng H Y, *et al.* Effects of enhanced UV-B radiation on protein metabolism of bean leaves. *Acta Botanica Sinica*, 1999, **41**(8):833~836.

[9] Staxen I, Bergounioux C, Bornman J F. Effect of ultraviolet radiation on cell division and microtubule organization in *Petunia Hybrida* protoplasts. *Protoplasma*, 1993, **173**:70~76.

[10] Britt A B. DNA damage and repair in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec Biol.*, 1996, **47**:75~100.

[11] Taylor R M, Nikaido O, Jordan B R, *et al.* Ultraviolet-B-induced DNA lesions and their removal in wheat (*Triticum Aestivum* L.) leaves. *Plant, Cell Environ.*, 1996, **19**:171~181.

[12] Syomov A B. Unscheduled DNA synthesis in plant populations exposed to chronic irradiation. *Mutat. Res.*, 1996, **363**:163~169.

[13] Jackson J F, and Linskens H F. Metal ion induced unscheduled DNA synthesis in *Petunia* Pollen. *Mol. Gen. Genet.*, 1982, **187**:112~115.

[14] Jackson J F, and Linskens H F. Evidence for DNA repair after ultraviolet irradiation of *Petunia hybrida* Pollen. *Molec Gen. Genet.*, 1978, **160**:19~20.

[15] Chang X X and Wang H X. Effects of Cd²⁺, Al³⁺ on the synthesis and DNA repair in *Vicia faba*. *Acta Ecologica Sinica*, 1999, **19**(6): 1000~1004.

855~859.

- [16] Hang R, Wang X L, Yue M. Influence of He-Ne laser irradiation on the damage and repair of wheat seedling by enhanced UV-B radiation. *Chinese J. Lasere*, 2002, **29**(9):859~863.
- [17] Feng H Y, An L Z, Tan L L, *et al.* Effect of enhanced ultraviolet-B radiation on pollen germination and tube growth of 19 taxa in vitro. *Environ. Exp. Bot.*, 2000, **43**: 45~53.
- [18] Caldwell M M. Solar UV-B irradiation and the growth and development of higher plant. In: Giess, A.C. ed. *Photophysiology*. vol. 6. Academic Press, New York, 1971. 131~137.
- [19] Green A E S, Cross K R, Smith L S. Improved analytic characterization of ultraviolet skylight. *Photochem Photobiol.*, 1980, **31**:59~65.
- [20] Kemp J W, Sutton D W. Protein metabolism in cultured plant tissues calculation of an absolute rate of protein synthesis: accumulation and degradation on tobacco callus in vivo. *Biochemistry*, 1971, **10**:81~88.
- [21] Bardford M N. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**:248~254.
- [22] Mori M, Kobayashi H, Sugiyama C, *et al.* Effect of aging on unscheduled DNA synthesis induction by UV-B irradiation in hairless mouse epidermis. *J. Toxicol. Sci.*, 2000, **25**:181~188.
- [23] Pinkel D, Straume T, Gray J W. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**:2934~2938.
- [24] Korr H, Schultze B. Unscheduled DNA synthesis in various types of cells of the mouse brain in vivo. *Exp. Brain. Res.*, 1989, **74**:573~578.
- [25] Nedunchezian N. Induction of heat short-like proteins in *Vigna Sinensis* seedlings growing under UV-B enhanced radiation. *Physiol Plant*, 1992, **85**:503~506.
- [26] Stantos I, Almeida J M, Salema R. Plants of *Zea mays* L. Developed under enhanced UV-B radiation 1. Some ultrastructural and biochemical aspects. *J. Plant Physiol.*, 1993, **141**:450~456.
- [27] Willeken H, Van Camp W, Van Montagu M, *et al.* Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant gene in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiol.* 1994, **106**: 1007~1014.
- [28] Jordan B R, Chow W S, Strid A, *et al.* Radiation in cab and psb A RNA transcripts in response to supplemental UV-B radiation. *FEBS Lett.*, 1991, **284**:5~8.

参考文献:

- [9] 冯国宁, 安黎哲, 冯虎元, 等. 增强 UV-B 辐射对菜豆蛋白质代谢的影响. *植物学报*, 1999, **41**(8):833~836.
- [15] 常学秀, 王焕校. Cd^{2+} 、 Al^{3+} 对蚕豆 (*Vicia faba*) DNA 合成及修复的影响. *生态学报*, 1999, **19**(6):855~859.
- [16] 韩榕, 王勋陵, 岳明. He-Ne 激光对小麦 DNA UV-B 损伤修复的影响. *中国激光*, 2002, **29**(9): 859~863.