

文章编号:1009-038X(2004)06-0043-04

活性氧对河岸葡萄叶圆片抗氧化酶活性的影响

张峰, 廖祥儒, 唐蕾

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:研究了离体处理下活性氧对河岸葡萄叶圆片抗氧化酶活性的影响. 结果表明, 外源 H_2O_2 和 $Fe^{2+} + H_2O_2$ 处理 4 h 可引起河岸葡萄叶圆片细胞膜透性明显增加, 引起 APOD, GPOD 和 SOD 活性明显下降, 但低浓度活性氧可不同程度引起叶圆片 CAT 活性增加; 细胞膜透性与活性氧浓度呈显著正相关.

关键词: 活性氧; 细胞膜透性; 抗氧化酶; 葡萄

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Effect of Reactive Oxygen Species on Activity of Antioxidant Enzymes in Leaf Disks of *Vitis vulpina*

ZHANG Feng, LIAO Xiang-ru, TANG Lei

(The Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214063, China)

Abstract: Effect of reactive oxygen species on the activity of antioxidant enzymes in leaf disks of *Vitis vulpina* was investigated. The data revealed that cell membrane permeability of the leaf disks was obviously enhanced by in vitro treatment with hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus Fe^{2+} . Activity of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and superoxide dismutase was significantly reduced by the treatment of reactive oxygen species, but H_2O_2 with low concentrations could enhance catalase activity to certain degree. The cell membrane permeability was related to the concentration of reactive oxygen species and positively significantly.

Key words: reactive oxygen species; cell membrane permeability; antioxidant enzyme; *Vitis*

活性氧是生物体许多正常代谢或生理过程的副产物, 在植物物质代谢和抗病过程中参与讯号传导, 因而也有重要的调节作用^[1,2]. 但在逆境条件下, 由于活性氧的产生受到刺激和抗氧化能力的下降, 也引起植物体活性氧累积、导致氧化胁迫^[3~6].

生物体产生的活性氧主要有 O_2^- 和 H_2O_2 , 它

们可引起脂质过氧化、导致生物膜透性增加. 在微量过度元素存在下, O_2^- 和 H_2O_2 还易转化为羟自由基^[1,2], 有很强的破坏蛋白质、脂类和核酸等大分子结构的作用. 关于外源活性氧的效应, 隋建丽等报道 H_2O_2 加 Fe^{3+} 可引起 DNA 断裂^[7]; Desimone 等证明活性氧能促进植物细胞 Rubisco 降解^[8];

收稿日期: 2004-07-02; 修回日期: 2004-09-19.

基金项目: 河北省科技厅 2004~2006 年指导性研究计划资助课题.

作者简介: 张峰(1960-), 男, 浙江绍兴人, 工程师.

McAinsh 等发现活性氧影响植物叶片保卫细胞行为^[3];Chen 等则证明,活性氧参与诱导植物的防护反应^[9,10]。但在逆境条件下,植物抗氧化酶活性的变化是否与活性氧的作用有关还不清楚。分别用 H_2O_2 , $Fe^{2+} + H_2O_2$ 和 O_2^- 处理了河岸葡萄叶圆片,以探讨外源活性氧对植物抗氧化酶活性的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

材料为河岸葡萄(*Vitis vulpina* L.),取材及培养方法同前^[11]。

1.2 活性氧处理

活性氧处理温度为 25 ℃,处理时间为 4 h。 H_2O_2 处理浓度分别为:0,1,4,8,16,32,64 mmol/L。 $Fe^{2+} + H_2O_2$ 处理组合浓度分别为:20 μ mol/L $FeSO_4$, 20 μ mol/L $FeSO_4 + 1$ mmol/L H_2O_2 , 40 μ mol/L $FeSO_4 + 2$ mmol/L H_2O_2 , 60 μ mol/L $FeSO_4 + 3$ mmol/L H_2O_2 , 80 μ mol/L $FeSO_4 + 4$ mmol/L H_2O_2 , 100 μ mol/L $FeSO_4 + 5$ mmol/L H_2O_2 , 120 μ mol/L $FeSO_4 + 6$ mmol/L H_2O_2 。

1.3 细胞膜透性

细胞膜透性的测定参照文献[12]的方法。

1.4 酶活定义及酶活测定

过氧化氢酶(CAT)(EC 1.11.1.6)活性测定参照 Jablonski 和 Anderson 的方法^[13]。1 个酶活单位(U)定义为每分钟催化 0.1 纳摩尔过氧化氢(0.1 nmol H_2O_2 /min)所需的酶量。

抗坏血酸过氧化物酶(APOD)(EC 1.11.1.11)和愈创木酚过氧化物酶(GPOD),(EC 1.11.1.7)活性按 Amako 等的方法测定^[14]。1 个 APOD 酶活单位(U)定义为每分钟催化 25 纳摩尔过氧化氢(25 nmol H_2O_2 /min)所需的酶量,1 个 GPOD 酶活单位(U)定义为每分钟催化 2 微摩尔过氧化氢(2 μ mol H_2O_2 /min)所需的酶量。

超氧化物歧化酶(SOD)(EC 1.15.1.1)活性按文献[15]的方法测定,用 5 mmol/L KCN 抑制 Cu, Zn SOD 测 Mn SOD 活性,以抑制 NBT 光还原 50%的酶量为一个活性单位。

蛋白质质量按 Bradford 方法测定^[1]。所有数据均来自 3 个独立实验,并各有 4 个重复。采用 SPSS8.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 活性氧对细胞膜透性的影响

H_2O_2 和 $Fe^{2+} + H_2O_2$ 处理 4 h 均引起河岸葡

萄叶圆片细胞膜透性显著增加(见表 1),细胞膜透性与 H_2O_2 浓度呈显著正相关。在 H_2O_2 处理中,细胞膜透性与 H_2O_2 浓度的关系为: $Y=9.00+0.29X$ ($r=0.949$);而在 $Fe^{2+} + H_2O_2$ 处理中,细胞膜透性与 H_2O_2 浓度的关系为: $Y=2.50+3.46X$ ($r=0.971$)。从回归系数可以看出, $Fe^{2+} + H_2O_2$ 处理(即羟自由基)对细胞膜的损伤远大于 H_2O_2 处理。

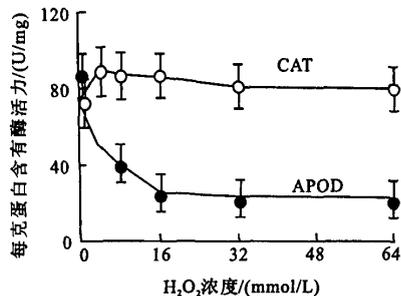
表 1 活性氧处理对河岸葡萄叶细胞膜透性的影响

Tab.1 Effect of hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus Fe^{2+} on cell membrane permeability of *Vitis vulpina* leaf disks

H_2O_2 mmol/L	膜透 性/%	$H_2O_2 + FeSO_4$		膜透 性/%
		H_2O_2 (mmol/L)	$FeSO_4$ (μ mol/L)	
0	6.0 \pm 1.0	0	20	4.3 \pm 1.0
1	7.1 \pm 0.9	1	20	6.5 \pm 0.8
4	10.8 \pm 1.4	2	40	8.0 \pm 1.0
8	14.7 \pm 2.5	3	60	9.4 \pm 0.9
16	15.3 \pm 1.9	4	80	17.1 \pm 2.0
32	19.3 \pm 2.3	5	100	21.0 \pm 1.8
64	26.5 \pm 4.9	6	120	23.9 \pm 3.4

2.2 H_2O_2 处理对抗氧化酶活性的影响

在 64 mmol/L 浓度范围内, H_2O_2 处理对河岸葡萄叶圆片 CAT 活性具有一定的刺激作用(见图 1),但明显降低其 APOD, GPOD 和 SOD 活性($P < 0.05$)。其中 GPOD 活性随 H_2O_2 浓度的增加而下降, APOD 的活性在 H_2O_2 浓度上升到 16 mmol/L 时降到最低并维持在较低水平,而 SOD 活性在 H_2O_2 浓度升至 8mmol/L 时降至最低并维持在较低水平。叶圆片细胞膜透性与其 APOD, GPOD 和 SOD 活性呈显著负相关,其回归方程分别为: $MP=27.2-103APOD$ ($r=-0.907$, $P < 0.01$), $MP=23.7-0.092GPOD$ ($r=-0.941$, $P < 0.01$), 和 $MP=68.5-0.66SOD$ ($r=-0.963$, $P < 0.01$);说明 H_2O_2 处理下叶圆片细胞膜透性的增加,可能也与这 3 种酶活性的降低有关。



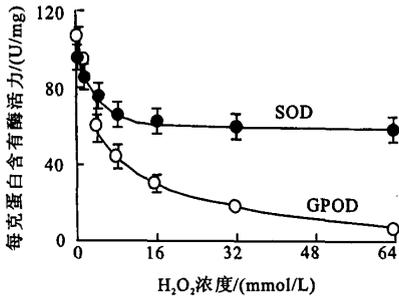


图 1 过氧化氢对河岸葡萄叶圆片抗氧化酶活性的影响
Fig. 1 Effect of hydrogen peroxide on activity of antioxidant enzymes in leaf disks of *Vitis vulpina* L.

2.3 Fe²⁺ + H₂O₂ 处理对抗氧化酶活性的影响

低浓度 Fe²⁺ + H₂O₂ 处理 (小于 2 mmol/L H₂O₂) 使河岸葡萄叶圆片 CAT 活性增加 (P < 0.05), 对 APOD 活性也无明显影响, 但在较高浓度下 CAT (P < 0.05) 和 APOD (P < 0.01) 活性明显下降 (见图 2). SOD 活性随 Fe²⁺ + H₂O₂ 处理浓度的增加而降低. 在 Fe²⁺ + H₂O₂ 处理下, 叶圆片细胞膜透性与其 APOD, GPOD 和 SOD 活性呈显著负相关, 其回归方程分别为: MP = 25.1 - 102APOD (r = -0.915, P < 0.01), MP = 29.3 - 0.828GPOD (r = -0.941, P < 0.01), 和 MP = 72.0 - 0.657SOD (r = -0.975, P < 0.01); 说明 Fe²⁺ + H₂O₂ 处理下叶圆片细胞膜透性的增加, 可能也与这 3 种酶活性的降低有关.

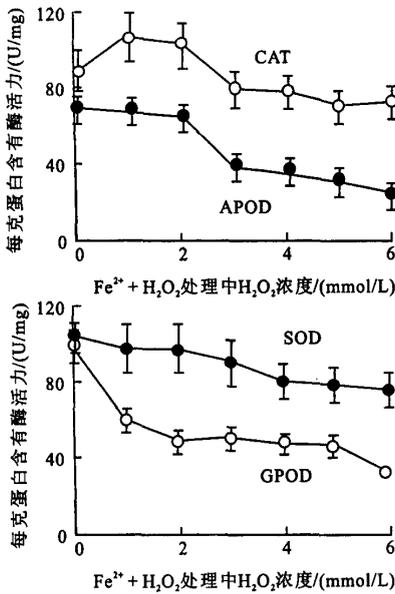


图 2 Fe²⁺ + H₂O₂ 处理对河岸葡萄叶圆片抗氧化酶活性的影响
Fig. 2 Effect of Fe²⁺ + H₂O₂ on activity of antioxidant enzymes in leaf disks of *Vitis vulpina* L.

2.4 活性氧处理对 SOD 同工酶活性的影响

较低浓度的 H₂O₂ (4 mmol/L) 处理 4 h 明显降低葡萄叶 Cu, Zn SOD 活性 (P < 0.05), 但随着 H₂O₂ 浓度的升高其活性又有回升, Mn SOD 活性随处理中 H₂O₂ 浓度的升高而降低 (P < 0.05, 见图 3); 在 H₂O₂ 浓度小于 6 mmol/L 的范围内 Fe²⁺ + H₂O₂ 处理对葡萄叶 Cu, Zn SOD 无明显影响, H₂O₂ 浓度小于 2 mmol/L 时 Mn SOD 活性也无明显变化, 但随着 H₂O₂ 浓度的进一步增加 Mn SOD 活性迅速降低 (P < 0.05). 说明河岸葡萄叶 SOD 同工酶的不同类型对不同活性氧的敏感性是有差异的, 不同活性氧对同一类型 SOD 活性的影响也有所不同.

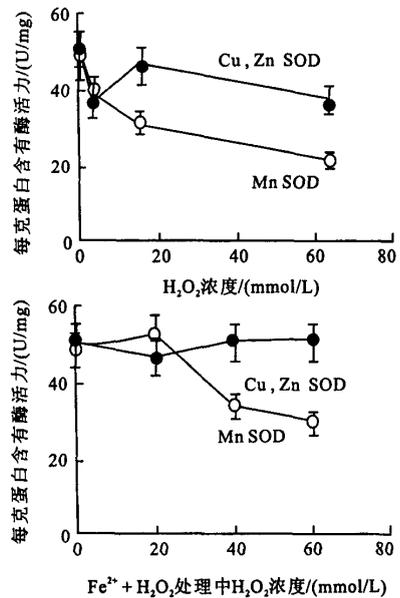


图 3 活性氧对河岸葡萄叶圆片 SOD 同工酶活性的影响
Fig. 3 Effect of reactive oxygen on activity of SOD isozymes in leaf disks of *Vitis vulpina* L.

3 讨论

抗氧化酶活性增加, 是植物适应逆境的方式之一, 然而严重的逆境胁迫多引起植物体抗氧化酶活性降低, 导致活性氧积累 [1-6, 12, 15, 17]. 本实验结果表明, 外源活性氧处理 4 h 可引起河岸葡萄叶圆片 APOD, GPOD 和 SOD 活性明显下降, 但低浓度活性氧可不同程度引起叶圆片 CAT 活性增加. 因此, 在逆境条件下, 植物体抗氧化酶活性的下降可能是活性氧积累的结果之一, 并进一步导致活性氧浓度

增加。

羟自由基对蛋白质结构有很强的破坏的作用,直接影响抗氧化酶活性;而 H_2O_2 则抑制 Cu, Zn SOD. Gomez 等报道活性氧能够刺激蛋白质的酶促降解^[18]。因此,在逆境条件下,植物体抗氧化酶活性的下降也可能与活性氧刺激的酶蛋白的酶促降解有关。不过我们的结果显示,16 mmol/L H_2O_2 处理 Cu, Zn SOD 明显高于 4 mmol/L 的,可能此时 H_2O_2 参与了讯号传导,诱导 Cu, Zn SOD 表达,但还缺少直接证据。

从抗氧化酶对活性氧的反应来看,GPOD 对活性氧最为敏感,APOD 对 H_2O_2 和羟自由基处理较为敏感。而羟自由基对抗氧化酶活性的影响最大。不同类型活性氧处理对 SOD 同工酶的影响也有差别, H_2O_2 和 $Fe^{2+} + H_2O_2$ 处理都不同程度引起 Cu,

Zn SOD 和 Mn SOD 活性下降;但河岸葡萄叶 SOD 同工酶的不同类型对不同活性氧的敏感性是有差异的,不同活性氧对同一类型 SOD 活性的影响也有所不同。其中 Cu, Zn SOD 对 $Fe^{2+} + H_2O_2$ 处理不太敏感,说明羟自由基浓度与 H_2O_2 对 Cu, Zn SOD 的作用机制是有区别的。

综上所述,活性氧处理可明显引起河岸葡萄叶 APOD, GPOD 和 SOD 活性下降,但在一定浓度范围内也使 CAT 活性增加。因此,低浓度的活性氧或一些类型的活性氧可能具有传递逆境信号的作用,并因此调节植物的逆境反应。然而,有关活性氧对 APOD, GPOD, CAT 和 SOD 同工酶的影响以及活性氧对抗氧化酶活性的具体作用机制都还待深入研究。

参考文献:

- [1] 方允中,李文杰. 自由基与酶基础理论及其在生物学和医学中的应用[M]. 北京,科学出版社,1994.
- [2] Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine[M]. UK: Oxford University Press, 1989.
- [3] McAinsh MR, Clayton H, Mansfield TA, *et al.* Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress[J]. *Plant Physiol*, 1996, 111: 1031-1042.
- [4] Singha S, Choudhuri MA. Effect of salinity (NaCl) stress on H_2O_2 metabolism in vigna and oryza seedlings[J]. *Biochem Physiol Pflanzen*, 1990, 186: 69-74.
- [5] 宴斌,戴秋杰,刘晓忠,等. 玉米叶涝渍伤害过程中超氧自由基的积累[J]. *植物学报*, 1995, 37: 738-744.
- [6] 王以柔,曾韶西,刘鸿先. 冷锻炼对水稻和黄瓜幼苗 SOD, GR 活性及 GSH, AsA 含量的影响[J]. *植物学报*, 1995, (37): 776-780.
- [7] 隋建丽,吕星,周平坤,等. H_2O_2 - Fe^{2+} 所致人淋巴细胞 DNA 双链断裂损伤[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1976, (23): 59-62.
- [8] Desimone M, hewke A, Wagner E. Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley[J]. *Plant Physiol*, 1996, 111: 789-796.
- [9] Chen ZX, Malamy J, Henning J, *et al.* Induction Modification and transcription of salicylic acid signal in plant defence responses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4134-4137.
- [10] Chen ZX, Silva H, Klessig DF. Active oxygen species in the induction of plant systematic acquired resistance by salicylic acid[J]. *Science*, 1993, 262: 1883-1886.
- [11] 廖祥儒,贺普超,朱新产. 盐渍对葡萄光合色素含量的影响[J]. *园艺学报*, 1996, 23: 300-302.
- [12] 廖祥儒,贺普超,朱新产. 玉米素对盐渍下葡萄叶圆片 H_2O_2 清除系统的影响[J]. *植物学报*, 1997, 39: 641-646.
- [13] Jablonski PP, Anderson JW. Light dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chloroplasts[J]. *Plant Physiol*, 1981, 67: 1239-1244.
- [14] Amako K, chen G-X, Asada K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants[J]. *Plant Cell Physiol*, 1994, 35: 497-504.
- [15] Zhang J, Kirkham MB. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorgham seedlings[J]. *New Phytol*, 1996, 132: 361-373.
- [16] Bradford MM. A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [17] Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiol*, 1996, 110: 125-136.
- [18] Gomez LD, Casano LM, Trippi VS. Effect of cell wall associated proteins in growing bean hypocotyls[J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 1259-1264.

(责任编辑:杨萌)