

高温和 H_2O_2 诱导酵母细胞产生活性衍生物的研究*

路福平 杨华 王玉 杜连祥

(天津科技大学食品科学与生物工程学院 天津 300222)

摘要: 对高温和 H_2O_2 应激条件下产生活性酵母细胞衍生物 (Live Yeast Cell Derivative, 简称 LYCD) 进行了研究。结果表明: 低剂量的预处理 (37℃ 和 0.2 mmol/L H_2O_2) 能够增加细胞内谷胱甘肽 (GSH) 含量, 提高超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性。两种预处理均可以诱导对致死浓度 H_2O_2 的抗性。通过 37℃ 和 0.2 mmol/L H_2O_2 处理酵母细胞后, 提取 LYCD 并添加到酵母细胞培养液中, 发现细胞在致死浓度 H_2O_2 作用下的存活率明显提高, 说明温度和 H_2O_2 刺激酵母细胞形成的 LYCD 对细胞氧化具有抵抗作用。

关键词: 活性酵母细胞衍生物, 氧化应激, 热应激, 抗氧化作用

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0028-05

Studies on Live Yeast Cell Derivative Induced by High Temperature and H_2O_2

LU Fu-Ping YANG Hua WANG Yu DU Lian-Xiang

(College of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222)

Abstract: This study was based on live yeast cell derivative (LYCD), which was produced by live yeast cell stressed with high temperature and H_2O_2 . The results showed that pretreating of low dose (37℃ and 0.2 mmol/L H_2O_2) could increase the content of GSH and the activity of SOD and CAT. These pretreatment could induce the resistance to lethal concentration of H_2O_2 . LYCD was produced by yeast treated with 37℃ and 0.2 mmol/L H_2O_2 . And it was found that the survival of yeast treated with lethal concentration of H_2O_2 obviously increased, while LYCD was added in yeast culture. It indicated that LYCD could have resistance to oxidative condition.

Key words: LYCD, Oxidative stress, Heat stress, Anti-oxidative effect

在研究应激反应的过程中, 人们发现酵母细胞有很强的应激反应能力^[1]。当它受到光、热、化学损伤等刺激时, 酵母细胞很快就会合成许多具有自我修复性的保护性物质, 以抵御这些不良的条件。人们把活的酵母细胞在人为控制的刺激条件下产生的保护性物质, 称为活性酵母细胞衍生物 (Live Yeast Cell Derivative, 简称 LYCD)^[2]。

酿酒酵母作为最简单的真核细胞, 是研究极端环境下真核细胞应激反应的最佳材料。本文以酿酒酵母为材料, 通过比较其热应激与氧化应激的关系, 分析细胞内主要抗氧化剂的变化, 以探讨极端环境下酵母细胞的应激机制, 从而制备出 LYCD, 并对 LYCD 在细胞抗氧化中的保护作用进行测试, 力求开发出能够在极端环境下有效消除细胞衰老的活性物质。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养条件

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 于 YEPD 培养基 (葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 20206025)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 20206025)

收稿日期: 2003-10-23, 修回日期: 2003-11-18

母膏 1%) 中, 30℃, 100 r/min 摇床培养至对数生长期, 约 8 h。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母细胞悬浮液的制备: 取培养至对数期的酵母细胞培养液于 4,000 r/min 离心 5 min, 然后将菌体混悬于 100 mmol/L (pH = 7.4) 的磷酸缓冲液中, 细胞浓度为 $(1 \sim 2) \times 10^7$ 个/mL。

1.2.2 氧化应激: 用 10 mmol/L 的 H_2O_2 处理 5 mL 的细胞悬液, 作用不同时间, 处理过的样品采用平板活菌计数法, 稀释到适当浓度, 涂布于 YEPD 培养基上, 30℃ 培养 2 d。存活率通过与对照 (相同条件下未处理样品的菌落数) 相比而获得。

1.2.3 热应激: 将 5 mL 的细胞悬浮液放入 50℃ 水浴摇床, 作用不同时间, 计算存活率。

1.2.4 适应性实验: 收集菌体, 混悬于新鲜的 YEPD 培养基中, 用较低浓度的 H_2O_2 (0.2 mmol/L) 处理 60 min 或在较低温度 37℃ 下处理 60 min, 再离心收集菌体, 混悬于磷酸缓冲液中。然后分别用 10 mmol/L 的 H_2O_2 和 50℃ 处理不同时间, 计算存活率。

1.2.5 抗氧化剂的测定方法: 分别对不同方式处理过的酵母细胞进行破壁处理, 离心提取上清液, 采用荧光光度法测定 GSH 含量, 采用邻苯三酚自氧化法测定 SOD 比活力, 采用紫外分光光度法测定 CAT 活力^[3,4]。

1.2.6 活性酵母细胞衍生物 (LYCD) 和酵母提取物 (YE) 的制备: 培养至对数期的酵母细胞, 用 0.2 mmol/L H_2O_2 处理 1 h 后, 离心收集菌体, 破壁后提取胞内物质, 得到氧化刺激的 LYCD₁; 培养至对数期的酵母细胞, 用 37℃ 处理 1 h 后, 离心收集菌体, 破壁后提取胞内物质, 得到温度刺激的 LYCD₂; 未经处理, 直接离心收集菌体, 破壁后提取胞内物质, 得到 YE^[5]。

1.2.7 LYCD 保护细胞抗氧化能力的测试: 将 LYCD 和 YE 添加到 5 mL 的酵母细胞培养液中, 同时用 10 mmol/L 的 H_2O_2 处理一定时间, 计算存活率。

2 结果与讨论

2.1 酵母细胞的氧化应激及其适应性实验

机体进行有氧代谢均能产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS), ROS 对大多数细胞都具有毒性作用。正常情况下 ROS 的产生和抗 ROS 水平是平衡的, 当 ROS 产生大于抗 ROS 水平时, 会攻击机体, 即所谓的氧化应激^[6,7]。本实验以 H_2O_2 (10 mmol/L) 作为氧化条件, 检测酵母细胞的氧化应激反应及其适应性。实验结果见图 1。

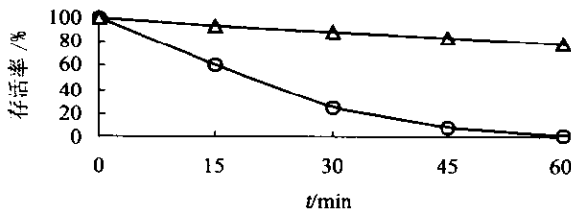


图 1 不同状态酵母细胞对 H_2O_2 的抗性

○—10mmol/L 过氧化氢直接处理,

△—0.2mmol/L 过氧化氢预处理后再用 10mmol/L 过氧化氢处理

由图1可知,用10 mmol/L的H₂O₂处理酵母细胞,随着时间的延长,其存活率逐渐下降,当H₂O₂作用60 min时酵母细胞的存活率仅为1.6%,说明该浓度的H₂O₂已对酵母细胞造成氧化损伤。而通过较低浓度0.2 mmol/L H₂O₂预处理后的酵母细胞,再用10 mmol/L H₂O₂处理60 min,细胞的存活率仍能维持78.2%,对H₂O₂的抗性明显增强,说明氧化剂预处理能够使酵母细胞产生对氧化致死剂量的适应性。

2.2 酵母细胞的热应激及其适应性实验

热应激也是生物界普遍存在的生理性防御反应,在高温的刺激下可诱导细胞合成一组高度保守的应激蛋白,提高细胞对伤害性刺激的耐受力^[8]。本实验选择50℃作为极端温度,观察酵母细胞的热应激反应及其适应性。实验结果如图2所示。

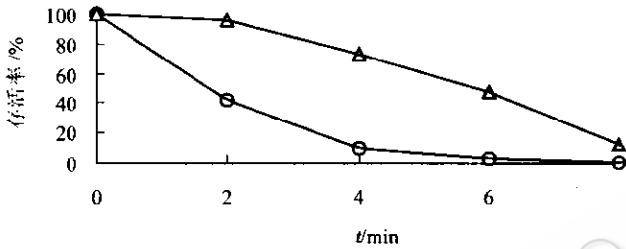


图2 不同状态的酵母细胞对热的抗性
 ○—50℃直接处理, ▲—37℃预处理后再用50℃处理

实验结果显示,用极端温度50℃处理酵母细胞,随着时间的延长,细胞的存活率迅速下降,作用8 min时,细胞的存活率已小于1%,说明该温度已经对酵母细胞造成损伤。当用较低温度37℃预处理酵母细胞1 h后,再用50℃处理,细胞的存活率显著增加,8 min时细胞的存活率仍能够达到12%,说明预处理能够提高酵母细胞对热的抗性,显示了酵母细胞对极端温度的适应性。

2.3 交叉适应性实验

为了检测不同预处理方式间是否存在一定的相关性,进行了交叉适应性实验。以37℃预处理酵母细胞1 h后,再用10 mmol/L的H₂O₂处理不同时间,观察热预处理对氧化应激的适应性。结果见图3。

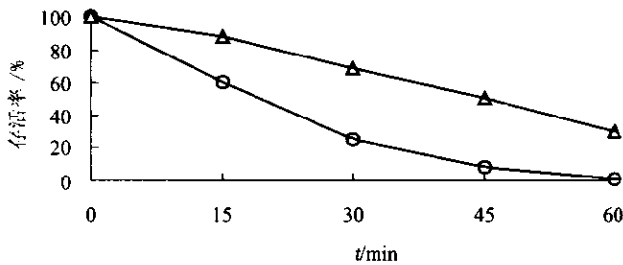


图3 热预处理酵母细胞对H₂O₂的耐受性
 ○—10mmol/L过氧化氢直接处理,
 ▲—37℃预处理后再用10mmol/L过氧化氢处理

从图3可知,酵母细胞经37℃预处理后,可以增加其对10 mmol/L H₂O₂的抗性,在60 min时存活率为30.5%,明显高于不经预处理的细胞。说明热预处理可以在一定程度上诱导细胞对氧化应激的适应性。

此外,以 0.2 mmol/L H_2O_2 预处理酵母细胞 1h 后,再在 50℃ 下作用一定时间,观察氧化预处理对热应激的适应性。结果表明酵母细胞经 0.2 mmol/L H_2O_2 预处理后,不能增加其对 50℃ 的抗性,与未经预处理的细胞存活率一致,说明氧化预处理并不能诱导细胞对热应激的适应性(数据省略)。

2.4 预处理对细胞内抗氧化水平的影响

由交叉适应性实验可知,低剂量的热预处理和 H_2O_2 预处理都可以诱导对氧化应激的适应性,说明这两种预处理的作用机制有一定的相似性。在正常机体内,有一套有效的抗氧化防御系统,来防止氧及其代谢物对机体的损伤,使细胞能够应付致死的氧化环境,这些抗氧化剂包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)某些能够解毒氧化剂的物质和谷胱甘肽(GSH)、维生素 C、维生素 E 等非酶类保护因子^[9]。为了研究这种适应性机制,检测了两种方式预处理前后酵母细胞内几种抗氧化剂含量的变化,结果见表 1。

表 1 预处理前后 GSH、SOD、CAT 活性的变化

	GSH (mg/g cell)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)
对照组	6.14	12.9	13.4
37℃ 预处理	9.51	16.2	19.5
0.2 mmol/L H_2O_2 预处理	9.42	17.6	21.8

从表 1 可以看出,两种预处理后 GSH 的含量都增加,SOD 和 CAT 的活性也比对照组明显增强,说明两种预处理都能够提高细胞内的抗氧化水平,解释了对氧化应激产生适应性的原因。酵母细胞经过和氧化无关的温度以及和氧化直接相关的 H_2O_2 两种刺激方式预处理后均可以启动其抗氧化防御系统,说明细胞体内同时存在和抗氧化水平相当的 ROS,如果细胞在不经预处理时由于细胞内诱导合成抗氧化活性物体系不存在,使细胞内因产生过量的 ROS 而快速死亡。因此可以说明,无论温度还是 H_2O_2 ,均可以造成细胞内 ROS 水平提高,细胞的死亡和氧化关系密切。

此外,对于只有 37℃ 预处理才能诱导对致死温度的抗性,而经 0.2 mmol/L H_2O_2 预处理却不能诱导这种适应性的现象,可能是由于在热应激反应中起重要作用的热应激蛋白只能通过亚高温特异性诱导出,不能通过其它的方式诱导合成。

2.5 LYCD 保护细胞抗氧化能力的测试

将 LYCD₁ 和 LYCD₂ 添加到酵母对数期培养液中,添加剂量为 1 mL,同时用添加 YE 组作对比,并以未添加组作空白对照,全部用致死浓度 H_2O_2 (10 mmol/L) 处理不同时间,检测细胞存活率。实验结果如图 4 所示。

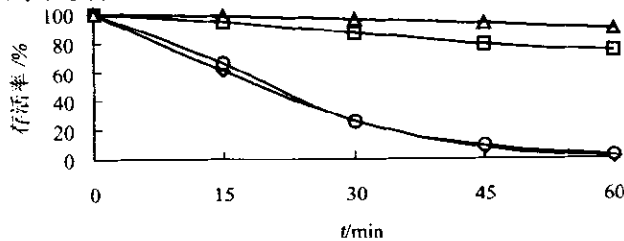


图 4 LYCD 对细胞抗氧化的保护作用

◇ 空白对照组, □ YE, △ LYCD1, ○ LYCD2

从图4可知,添加LYCD后,细胞的存活率明显高于空白对照组和添加YE组。分别用致死浓度 H_2O_2 (10 mmol/L)作用60 min后,空白对照组细胞存活率仅为1.6%,添加LYCD₁的细胞存活率高达89.3%,添加LYCD₂的细胞存活率达到74.6%,而添加YE的细胞存活率仅为2.4%,说明LYCD与YE相比可以对细胞的氧化致死起到保护作用。其中以 H_2O_2 诱导制备的LYCD₁的效果最明显,而37℃诱导制备的LYCD₂也能相当高地对细胞起到保护作用。

综上所述,氧化应激和热应激都可以通过相应低剂量预处理而获得适应性,这种适应性存在部分交叉性。通过胞内几种重要抗氧化剂的分析,发现两种预处理都可以使GSH、SOD、CAT的活性增加,说明这两种细胞损伤的作用机理都是与氧化有关的。通过细胞抗氧化能力的测试,证明0.2 mmol/L H_2O_2 和37℃处理1 h后制备的LYCD,对细胞具有保护作用,说明酵母细胞经过低剂量的氧化和热预处理后,在基因水平和翻译水平发生了相应调节,表现在各种抗氧化剂的合成上,使机体形成了有效的抗氧化防御系统,并直接构成了LYCD对细胞抗氧化的保护活性。以上研究对开发LYCD作为高效、抗衰老、增加细胞活力等多重功效的新型活性制剂具有重要的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Lods L., Scholz I., *Cosmet Toil*, 2000, 12 (115): 71~74.
- [2] Brooks L., *Cosmet Toil*, 1995, 7 (110): 65~68.
- [3] 马超颖, 戚薇, 路福平, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (3): 26~28.
- [4] 仓一华, 陆玲, 王刚. 菌物系统, 2002, 21 (1): 84~91.
- [5] 马超颖, 戚薇, 路福平, 等. 生物技术, 2003, 13 (1): 6~7.
- [6] 薛丽君, 金中初. 国外医学卫生学分册, 1997, 24 (4): 207~210.
- [7] 马超颖, 戚薇, 路福平, 等. 发酵工程学科的进展, 2002, 417~420.
- [8] 秦晓群, 孙秀泓, 张长青. 中国应用生理学杂志, 1996, 12 (3): 243~246.
- [9] 马超颖, 戚薇, 杜连祥. 天津轻工业学院学报, 2002, 42 (4): 1~5.