

超导强磁场对小麦抗氧化酶的诱导表达

张萍萍^{1,2}, 吴丽芳¹, 汤明礼¹, 吴跃进¹, 余增亮^{1*} (1.中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程中心, 安徽 合肥 230031; 2.安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230039)

摘要: 研究了 7T 超导稳态强磁场在不同处理时间条件下对小麦幼苗的抗氧化系统(SOD、CAT 活性和 MDA 含量)的影响,并对不同金属辅基 SOD 酶的诱导表达模式进行了探讨.结果表明,强磁场诱导了 T-SOD 活性和 CAT 酶活性的提高,在峰值之前 SOD 和 CAT 的活性随着剂量的增大逐渐提高,但随着强度的增加和处理时间的延长,酶活激活作用会有所下降.低剂量下,T-SOD 活性的提高来自于 CuZn-SOD 的活性的提高,中、高剂量下,主要诱导 Mn-SOD 的活性提高.低场强和短时间的磁场处理能使 MDA 的含量降低,但随着处理时间的延长和磁场强度的增加,MDA 含量逐渐升高.各种酶在不同的处理条件下,其酶活的变化峰值处于 3~5T 之间.

关键词: 超导强磁场; 小麦; 抗氧化酶; 诱导; SOD

中图分类号: X123,R594.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-6923(2006)01-0082-05

Induction of antioxidative enzymes in wheat exposed to high static magnetic fields (SMFs). ZHANG Ping-ping^{1,2}, WU Li-fang¹, TANG Ming-li¹, WU Yue-jin¹, YU Zeng-liang^{1*} (1.Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China; 2.School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China). *China Environmental Science*, 2006,26(1): 82~86

Abstract: The effects of superconducting SMFs up to 7-tesla on antioxidation system of wheat seedling (SOD, CAT activity and MDA content) and the expression pattern of SOD isoenzyme with different metal prosthetic groups were investigated. Increasing total SOD activity and CAT activity were induced by HSMFs. These activities were enhanced gradually with magnetic flux density and reached the highest at 3 and 5T under 1 and 5h exposing time, respectively. The enhancement of T-SOD activity under low intensity was mainly due to the increase of CuZn-SOD activity, while at the moderate and high intensity, the increase of T-SOD was mainly attributed to the high expression of Mn-SOD activity. Malondialdehyde (MDA) content varied apparently with different magnetic flux density, showing that it decreased at low density and shorter treating time, but increased gradually with prolonging treat time and increasing magnetic flux density. Under different treating conditions, the peak values of antioxidative enzymes varied between 3~5T.

Key words: high static strong magnetic fields; wheat; antioxidative enzymes; induction; SOD

现代社会中,随着电子通讯技术的飞速发展和各种工业及民用电器的广泛应用,出现了日益严重的电磁污染,如高压输电线及各种电机设备产生的频率为 50~60Hz 的工频磁场和电台、雷达和移动通讯设备产生的频率高达 100kHz 以上的射频电磁场.近年来,随着人们对全球环境的关注,磁场的生物学效应的研究正在成为一个热点.有关研究表明,生活环境中的电(磁)场、磁场的存在与人类疾病的发生没有直接的、必然的联系^[1].但是,长期或频繁暴露于电磁场或强磁场环境中会影响生物体的多种生化和生理过程,如影响酶(鸟氨酸脱羧酶^[2]、酪氨酸蛋白激酶^[3])的

活性;细胞的信号传导^[4]及激素的水平(减弱褪黑激素的作用,改变胰岛素的含量^[5]);改变正常的钙循环^[6];干扰基因的表达及蛋白质的合成^[7];改变膜脂结合的状态,影响膜的流动性,甚至能引起一些难以治愈的包括肿瘤在内的疾病^[8].

目前,关于电磁场非热效应的机理研究多集中于动物细胞,对植物影响的报道较少,还仅限于对植物种子的预处理方面,所用的也多为电场或低强磁场,磁感应强度小于 0.5T,至于强磁场(一

收稿日期: 2005-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50207009)

* 责任作者, 研究员, zlyu@ipp.ac.cn

般认为大于 10mT),尤其是超导稳态强磁场,由于其产生条件限制,其引起的生物学效应及机理研究一直很少.本实验采用磁场强度高达 7T 的超导磁体,以小麦为研究材料,研究了极端磁感应环境对小麦的抗氧化酶系统的影响,并对超导强磁场的磁生物效应机理进行了探讨.

1 材料与方法

1.1 超导磁体装置(7T 杜瓦)

辐照地点为中国科学院等离子体物理研究所强磁场实验室,超导磁体参数为内径 54mm,外径 170mm,高度 162mm,中心场 0~8.8T,运行电流 0~51A,磁场均匀度 $2 \times 10^{-3}/\text{cm}^3$ (图 1).温度可控在 $-269 \sim 30^\circ\text{C}$,精度为 $\pm 0.5^\circ\text{C}$,除了无电磁辐射外,对照组与实验组所处环境相同.

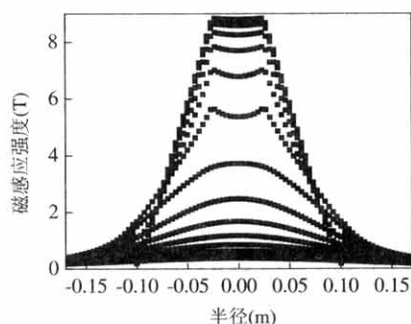


图 1 7T 杜瓦磁场分布

Fig.1 Magnetic distribution

1.2 供试材料、试剂与仪器

小麦品种为扬麦 158 自交系,由安徽省农业科学院提供.

所用试剂均为进口和国产分析纯;分光光度计为 BECKMAN DU640;2K15 型 4°C 低温离心机为 Sigma 公司产品;CAT 测定试剂盒、MDA 测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供.

1.3 磁场处理

选取颗粒饱满、大小均一的风干种子,经 0.1% 升汞表面消毒 15min 后,于 23°C 培养箱中蒸馏水浸种 6h,再置于铺有滤纸的培养皿中预培养 9h,将萌动露白的种子于超导强磁场中进行

处理.

磁感应强度选用 0,1,3,5,7T 共 5 个剂量,处理时间为 1,5h 2 种时间段,共计 10 个处理.每处理 100 粒种子.磁场处理温度控制在 $16 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下进行.

处理后的萌动种子于 23°C 培养箱中培养 7d 后,将幼苗按处理移栽到大田中,单粒点播.三叶期取植株的第一片叶对其 SOD、CAT 活性、MDA 的含量进行分析测定,各种不同处理的材料均同时随机取样.

1.4 酶的提取和活性测定

酶液的制备:取小麦叶片,于液氮中研磨成粉末状,加入 3 倍于样品量经预冷、浓度为 50mmol/L pH7.8 的磷酸缓冲液(含 0.1mmol/L EDTA, 0.3% (W/V) Triton X-100, 4% (W/V) 聚乙烯吡咯烷酮),于冰浴中浸提 2h,于 4°C , 10500r/min 离心 20min,上清为酶粗提液.

酶活性测定:总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性的测定参照文献[9]黄嘌呤氧化酶-羟胺法.以每 μg 可溶性蛋白在 1mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量,为一个 SOD 活力单位(U).

过氧化氢酶(CAT)活性测定采用紫外可见分光光度法^[10].以每 mg 可溶性蛋白中 CAT 每 s 分解吸光度为 0.50~0.55 的底物中的 H_2O_2 相对量,为一个 CAT 活力单位(U).

丙二醛(MDA)含量的测定采用硫代巴比妥酸法(TBA 法)^[11].

SOD 组成成分的鉴定:CuZn-SOD 酶活测定参照文献[12]SDS-KCl 法进行.

Mn-SOD 酶活测定参照文献[13]的方法进行.取各处理的酶提取液加入 H_2O_2 使其终浓度为 5mmol/L,反应 40min 后,离心取上清测 Mn-SOD 酶活变化.

2 结果与分析

2.1 超导稳态强磁场对小麦 SOD 酶活性的影响

2.1.1 超导稳态强磁场对小麦 T-SOD 活性的影响 由图 2 可见,处理时间为 5h,当磁感应强

度 $<5\text{T}$ 时,小麦中总 T-SOD 活性随着剂量的增大逐渐提高,当磁感应强度 $>5\text{T}$ 时,总 T-SOD 活性随着强度的增加逐渐降低;当磁场处理时间为 1h 时,也呈现出相似的剂量曲线关系,但其峰值变化提前,位于 3T 处.在场强相同的情况下(5T 时除外),随着处理时间的延长,活性略有下降(5T 时除外).各项处理 T-SOD 均较对照组有所提高.这表明,强磁场诱导了 T-SOD 活性的提高,在 $3\sim 5\text{T}$ 达到最高点,活性提高了 46% .

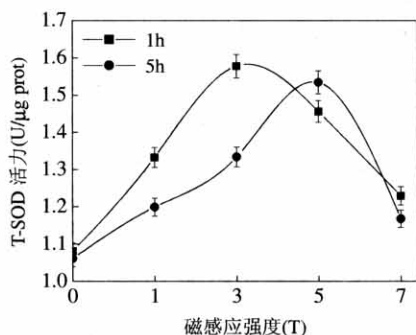


图2 超导强磁场对小麦 T-SOD 活性的影响

Fig.2 Effect of high static magnetic fields on T-SOD activity of the wheat

2.1.2 SDS-KCl、 H_2O_2 处理后超导磁场对小麦 CuZn-SOD、Mn-SOD 酶活的诱导 各种处理加入 SDS-KCl 处理后,Mn-SOD 活力丧失,而 CuZn-SOD 活力不变,此时所测 SOD 酶活性为 CuZn-SOD 活性;用 H_2O_2 处理各酶的提取液, CuZn-SOD 在 H_2O_2 作用下会失活,而 Mn-SOD 活力不变,则此时所测 SOD 酶活为 Mn-SOD 活性.

由图 3 可见,当磁场处理时间为 1h 时,场强 $<1\text{T}$,Mn-SOD 比对照略低(0T)有下降(11%),而 CuZn-SOD 的活性比对照提高了 39% ,由此可见,低剂量条件下,T-SOD 活性的提高主要来自于 CuZn-SOD 的活性的提高,低场强诱导的主要是 CuZn-SOD.当场强 $>1\text{T}$ 时,CuZn-SOD 活性随着剂量的增加呈下降趋势,而 Mn-SOD 的活性则比对照明显提高. $3, 5, 7\text{T}$ 场强下,Mn-SOD 活性分别比对照提高了 81% 、 74% 、 42% ,分别占 T-SOD 总酶活提高的 56% 、 67% 、 96% .由此推测,中、

高剂量下主要诱导 Mn-SOD 活性的提高.

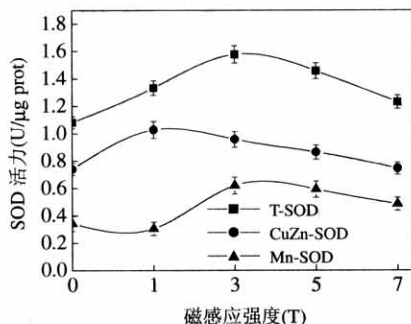


图3 强磁场处理 1h 对小麦 SOD 各组分酶活的影响

Fig.3 Effect of high static magnetic fields on SOD activity of the wheat (1h)

同样,磁场处理时间为 5h ,场强 $<1\text{T}$ 时,CuZn-SOD 活性呈上升趋势,而 Mn-SOD 则有所下降,可以推测,低场强诱导的是 CuZn-SOD 活性的提高.当场强 $>1\text{T}$ 时,CuZn-SOD 和 Mn-SOD 两种酶活性都随着剂量的增大而逐渐上升, 5T 达到最高点.其中,Mn-SOD 活性在 3T 和 5T 场强下,分别比对照提高了 42% 和 114% , CuZn-SOD 活性则提高了 20.4% 和 35.1% ,表明中剂量场强能诱导 Mn-SOD 和 CuZn-SOD 的产生,而高剂量则主要诱导 Mn-SOD 活性的提高.这一结果与对 CHO 细胞^[14]、耐辐射球菌^[15]的研究结果是一致的.

由图 4 可见,Mn-SOD 酶活在低剂量下(1T) 较对照略低,而中、高剂量下被强烈诱导,在 $3\text{T}(1\text{h})$ 和 $5\text{T}(5\text{h})$ 达到峰值,分别比对照提高了 81% 和 114% .在相同场强的条件下,随着处理时间的延长,Mn-SOD 酶活呈现下降趋势.

2.2 超导稳态强磁场对小麦 CAT 酶活的影响

由图 5 可见,强磁场处理下的 CAT 酶活均较对照组有所提高.当磁场处理时间为 1h 时, CAT 酶活随着剂量的增加而呈上升的趋势;当磁场处理时间为 5h 时,在剂量小于 3T 时,CAT 酶活随着剂量的增加而逐渐上升;当大于 3T 时,则逐渐下降.不同的处理时间之间,随着处理时间的延长,酶活略有下降.可见,强磁场有刺激 CAT 酶活提高的作用,但随着场强的增加和处理时间的

延长,酶活激活作用会有所下降.

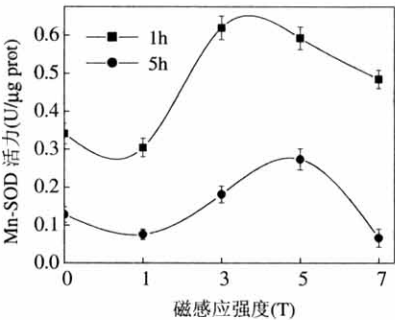


图4 超导强磁场对小麦 Mn-SOD 酶活的影响
Fig.4 Effect of high static magnetic fields on Mn-SOD activity of the wheat

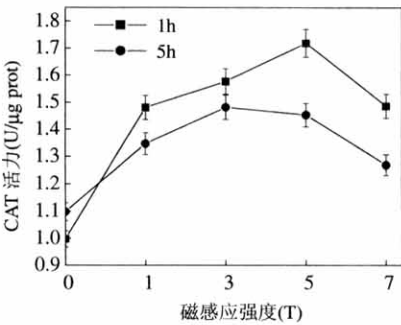


图5 超导强磁场处理对小麦 CAT 酶活的影响
Fig.5 Effect of high static magnetic fields on CAT activity of the wheat

2.3 超导稳态强磁场对小麦 MDA 含量的影响

MDA 是细胞中自由基引起不饱和脂质过氧化作用的特征产物,其含量的多少是脂质过氧化作用强弱的一个重要指标.由图 6 可见,处理后 MDA 的含量随磁场强度变化明显,低场强和短时间的处理可使 MDA 含量降低,这一结果与在该条件下,SOD、CAT 等抗氧化保护酶活性的提高相一致,也与肖岗等人^[16]对低磁场(小于 0.2T)的研究结果相同.但随着磁感应强度的增加,MDA 的含量迅速提高,并在 5T,5h 处理条件下达到最高点,比对照的 MDA 含量提高了 47%,此后,随着场强的升高,MDA 的含量不再上升,而是达到一种饱和状态.并且,随着处理时间的延长,

MDA 含量明显提高(7T 处两值趋于相等).

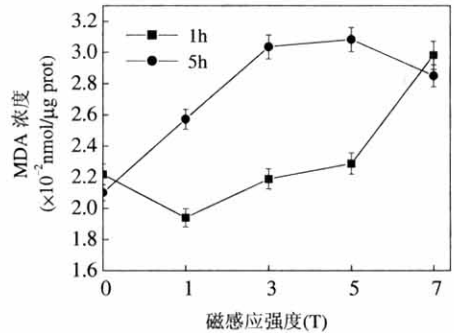


图6 超导强磁场处理对小麦 MDA 含量的影响
Fig.6 Effect of high static magnetic fields on the content of MDA of the wheat

3 讨论

在本研究中,超导强磁场诱导了 CAT 酶活和 SOD 活性的提高,其酶活的变化峰值处于 3~5T 之间.通过加入 SDS-KCl 和 H₂O₂ 两种不同金属辅基的 SOD 同工酶的抑制剂后,实验表明,低剂量条件下 T-SOD 活性的提高来自于 CuZn-SOD 活性的提高;中、高剂量下主要诱导 Mn-SOD 活性的提高;这与文献^[14]中 Mn-SOD 在抗辐射中的作用比 CuZn-SOD 强的观点是一致的.强磁场作用下酶活的提高与生物体在受到逆境胁迫时的变化规律一致,被认为是作物在受到逆境后的一种适应性反应.随着场强的增大和磁场处理时间的延长,则酶活激活作用会有所下降,而 MDA 的含量明显增高,这可能是高场强对生物体造成某种损伤效应,从而使膜脂过氧化程度加重,MDA 含量上升,进而可能导致细胞的损伤,尤其是 DNA 的损伤,染色体发生畸变.这与高剂量下 γ -射线和 N⁺等辐射对生物体的作用相同^[17].

磁生物效应的机理复杂,与磁场类型、场强、场均匀性、磁场方向、作用时间和生物阈值等多种因素有关.生物在正常的生理过程中会通过酶系统与非酶系统多种途径产生 O₂⁻、OH⁻、HO₂⁻、¹O₂ 等活性氧自由基,自由基分子具有未被抵消的电子自旋磁矩,表现出顺磁性.在强磁场中,磁场对具有顺磁性的自由基产生作用,改

变其在单一态和三重态之间的转换率,进而影响那些以自由基为中介进行电子转移的生化反应过程及参与这些反应的酶类的活性.SOD 和 CAT 是自由基链式反应中的 2 个关键酶,分别催化超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的歧化作用和 H_2O_2 的降解,其活性的大小必将受到磁场条件下体内活性氧自由基的反馈调节.同时,磁场对含有 Fe、Mn、Co、Cu、Mo 等金属离子的酶类和蛋白质中的这些顺磁性离子可直接产生影响(如 SOD 的活性中心为 Cu、Mn、Fe; CAT 的活性中心为 Fe),进而可能改变这些酶类的活性中心的空间构象和固有酶结构,从而影响酶活性,并最终导致这些酶所催化的生理、生化反应受到影响^[10].另有资料表明,磁场对抗氧化酶合成从转录^[18]到翻译^[16]等不同水平的基因调控系统产生激励作用,从而导致酶活性的改变和酶谱的变化.强磁场对生物体的这些影响相互渗透、共同作用,从而表现出复杂的生物学效应.

4 结论

4.1 超导强磁场对小麦幼苗自由基清除系统(Mn-SOD,CuZn-SOD,CAT)产生显著的影响.并且不同的剂量条件下,诱导的 SOD 同功酶不同.

4.2 小麦幼苗中的 MDA 含量随剂量和处理时间的增加而升高,表明高强度磁场可能引起细胞脂质过氧化损伤.

参考文献:

- [1] Repacholi M H, Greenebaum B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems [J]. *Bioelectromagnetics*, 1999,20(3):133-160.
- [2] Krewski D, Byus C V, Glickman B W, *et al.* Recent advances in research on radiofrequency fields and health [J]. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, 2001,4(1):145-149.
- [3] Sun W J, Yu Y N, Chiang H, *et al.* Effects of 50 Hz magnetic field exposure on protein tyrosine phosphorylation in cultured cells [J]. *Electro-and Magnetobiology*, 2001,20:207-214.
- [4] Ewa L, Maria S, Mats-Olof M, *et al.* ELF magnetic fields initiate protein tyrosine phosphorylation of the T cell receptor complex [J]. *Bioelectrochemistry*, 2001,52(1):73-78.
- [5] Noda Y, Mori A, Liburdy R P, *et al.* Magnetic fields and lipoic acid influence the respiratory burst in activated rat peritoneal neutrophils [J]. *Pathophysiology*, 2000,7(2):137-141.
- [6] Aldinucci C, Garcia J B, Palmi M, *et al.* The effect of exposure to high flux density static and pulsed magnetic fields on lymphocyte function [J]. *Bioelectromagnetics*, 2003,24(6):373-379.
- [7] Lin H, Head M, Blank M, *et al.* Myc-mediated transactivation of HSP70 expression following exposure to magnetic fields [J]. *J. Cell Biochem.*, 1998,69(2):181-188.
- [8] Paul J V, David A A, Kenneth C J, *et al.* Brain cancer and occupational exposure to magnetic fields among men: results from a Canadian population-based case-control study [J]. *Int. J. of Epidemiology*, 2002,31:210-217.
- [9] Marklund S. Spectrophotometric study of spontaneous disproportion of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase [J]. *J. Biol. Chem.*, 1976,251(23):7504-7510.
- [10] 丘冠英,彭银祥.生物物理学 [M]. 武汉:武汉大学出版社,2000. 205-206,233-245.
- [11] 赵世杰,许长成,邹琦,等.植物组织中丙二醛测定方法的改进 [J]. *植物生理学通讯*,1994,30(3):207-210.
- [12] Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity [J]. *Analytical Biochemistry*, 1984,142(2):290-296.
- [13] 罗广华,王爱国,付爱根.鉴别超氧化物歧化酶类型的定位染色法 [J]. *生物化学与生物物理进展*,1996,23(4):356-359.
- [14] 孙娟,陈瑗,周玫,等.Mn-SOD 对 CHO 细胞电离辐射敏感性的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*,1997,24(1):48-52.
- [15] 宋道军,李红,王纪.氮离子注入对耐辐射异常球菌 SOD 活性的影响及其对 Mn-SOD 的诱导 [J]. *微生物学报*, 1999,39(4): 278-282.
- [16] 习岗,杨运径.作物细胞耐旱保护酶系统对外磁场的反应 [J]. *生物物理学报*,1999,15(4):792-797.
- [17] 宋道军,李红,余增亮.氮离子注入对不同辐射敏感性微生物超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性的影响 [J]. *生物物理学报*, 1998,14(2):325-329.
- [18] 李凌,蔡素雯,钱凯先.磁处理对番茄幼苗 MDH 合成的影响 [J]. *浙江大学学报(工学版)*, 2001,35(4):374-379.

作者简介: 张萍萍(1970-),女,安徽合肥市人,中国科学院等离子体物理所博士研究生,主要从事生物物理学研究.发表论文 4 篇.