

文章编号: 1007-4627(2010)02-0197-05

低能 N^+ 注入 *E. coli* 诱发的 HRS/IRR 与抗氧化物酶关系的初探

杨天佑^{1,2}, 王铁固¹, 田静¹, 常景玲¹, 秦广雍²

(1 河南科技学院生命科技学院, 河南 新乡 453003;

2 郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 研究了 30 keV N^+ 注入 *E. coli* 诱发的辐射超敏感效应/增强的辐射性(HRS/IRR)及该效应诱发时 *E. coli* 细胞内抗氧化物酶(SOD 和 CAT)的诱导表达, 探讨了细胞内抗氧化物酶的诱导与 HRS/IRR 诱发之间的关联。研究结果显示, HRS 诱发剂量范围内($0-5 \times 10^{14} N^+/cm^2$), *E. coli* 细胞内超氧化物歧化酶(SOD)的酶活基本维持在 $10 U_s/mg$ 的较低水平, 过氧化氢酶(CAT)酶活也都低于 $8 U_s/mg$; IRR 诱发的剂量范围内($5 \times 10^{14}-10 \times 10^{14} N^+/cm^2$), SOD 和 CAT 活性升高并分别达到了 $58 U_s/mg$ 和 $26 U_c/mg$ 的最高水平。研究结果初步表明, 低能离子注入 *E. coli* HRS/IRR 的诱发与细胞内抗氧化物酶的诱导关系密切。

关键词: N^+ 注入; 辐射超敏感效应; 增强的辐射性; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶

中图分类号: O53; Q93

文献标识码: A

1 引言

20 世纪 90 年代末, 国内学者余增亮利用 keV 能量范围的低能离子注入微生物^[1, 2]、植物组织以及种子^[3, 4]等时, 发现随着辐照剂量的增大, 生物存活率呈现“马鞍型”, 这种先降后升再降的存活现象完全不同于辐射中常见的指数性和肩性下降的剂量存活效应。英国 Gray 实验室和 Jioner 等^[5]以细胞为材料系统研究低剂量电离辐射对细胞存活率的影响时, 发现在小于 1 Gy 的剂量范围内, 随剂量的增加, 细胞存活率急剧下降, 而随后细胞存活率有所上升, 他们将低剂量范围内的这种现象称为 HRS/IRR, 即低剂量辐射超敏感效应(low-dose hyperradio-sensitivity, 简称 HRS)及增强的辐射抗性(increased radioresistance, 简称 IRR)^[6, 7]。目前, HRS/IRR 已经成为辐射生物学中研究的热点。然而, 至今国内外对 HRS/IRR 的诱发机制认知有限, 特别是国内对该效应分子机理的研究甚少, 相关研究亟待开展。

目前, 国内外辐射生物学家对 HRS/IRR 效应

的分子机理还没有明确定论, 只是存在种种的猜测^[5]: (1)与 DNA 损伤修复作用有关; (2)与细胞凋亡和细胞周期延滞有关; (3)与 DNA 链的松弛结构状态有关; (4)存在特殊的细胞修复途径相关等等。越来越多的研究结果证实辐射产生的自由基及其清除与细胞的辐射损伤及辐射抗性之间存在关联, Lee 等^[8]研究表明活性氧(指 $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2 等)是电离辐射引起细胞损伤的重要因素, 而抗氧化系统, 包括超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等在保护细胞抵御辐射损伤过程中具有重要作用。Fisher^[9]的研究同样证实了自由基清除剂或抗氧化剂能够有效地干预或减轻辐射损伤的效应。近几年来, *D. radiodurans* 耐辐射机理研究的深入开展, 越来越证实了它的超强耐辐射能力与其清除自由基的能力存在密切联系^[10]。

作者前期研究已发现低能离子注入 *E. coli* 可诱发 HRS/IRR, 并发现 *recA* 基因在其诱发中发挥一定作用^[11], 抗氧化物酶与 HRS/IRR 诱发是否存

收稿日期: 2009-06-19; 修改日期: 2009-08-14

* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2004CB719604); 国家自然科学基金资助项目(10505018)

作者简介: 杨天佑(1978-), 男(汉族), 河南安阳人, 博士, 讲师, 从事生物工程领域相关研究;

E-mail: yangtianyou2004@163.com

在一定关联,至今未见相关报道。本文拟研究低能离子注入 *E. coli* 时 HRS/IRR 的诱发情况,重点研究 HRS/IRR 诱发剂量范围内细胞内抗氧化物酶(SOD 和 CAT)的诱导表达情况,以探讨细胞内抗氧化物酶诱导与 HRS/IRR 诱发之间的内在关联。

2 实验材料和方法

2.1 实验材料

大肠杆菌菌株(*Escherichia coli* MG1655),美国密西西比大学生命科学系 Justin courcelle 提供。

2.2 试剂和仪器

总过氧化歧化酶(T-SOD)活力测定试剂盒(南京建成公司),过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(南京建成公司),蛋白测定试剂盒(南京建成公司),PBS 缓冲液(pH7.2),TU-1901 双光束分光光度计(北京普析),超声波破碎仪(美国 SONICS 公司),低温离心机(美国 BECKMAN COULTER),ProtoCOL 菌落计数系统(英国 SYNOBIOSIS),超净工作台(安泰公司),Titan 离子注入装置(俄罗斯)。

2.3 实验方法

(1) 低能离子束辐照 *E. coli* 的剂量存活效应

分别取 100 μl MG1655 的菌悬液均匀涂于洁净无菌的载玻片上置于超净工作台中,自然风干后进行离子注入处理。注入参数:离子种类为 N 离子,能量为 30 keV,注入剂量为 $1 \times 10^{14} - 300 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$;将注入处理后的样品洗脱,适当稀释后涂于 LB 平板上,每个稀释度做 3 个平行,涂平板,37 $^\circ\text{C}$ 培养 14 h,通过 ProtoCOL 菌落计数系统计数菌落。

存活率的计算方法:

$$\text{注入处理样品的存活率} = \frac{\text{注入处理后的活菌数}}{\text{真空处理后的活菌数}}。$$

(2) 粗酶的提取

将 30 keV N^+ 处理后 *E. coli* 样品(每个剂量同时处理 3 个平行样品)转入 5 ml 的 LB 培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 培养 3 h 后 5000 rotations/min 离心 5 min 沉淀菌体,用 PBS 缓冲液漂洗后重悬于 3 ml PBS 缓冲液;将样品置于冰上进行超声波破碎,参数:振幅为 25%,辐射时间为 4 s、间隙时间为 6 s,辐射总时间 10 min 的效果;4 $^\circ\text{C}$,12000 rotations/min 离心 10 min,上清为酶的粗提液,立即测定粗提液

中 SOD, CAT 和总蛋白的含量。

(3) SOD 活力的测定

SOD 测定采用单胺氧化法,测定方法参照 T-SOD 活力测定试剂盒说明书中的方法。

SOD 活力单位定义:反应液每毫克蛋白在 1 ml 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_s)。其活力计算公式:

$$\begin{aligned} \text{T-SOD 活力}(U_s/\text{ml}) = & \frac{\text{对照管吸光值} - \text{测定管吸光值}}{\text{对照管吸光值}} \times \\ & 2 \times \frac{\text{反应体系稀释倍数}}{\text{粗酶液中蛋白量}(\text{mg}/\text{ml})}。 \end{aligned}$$

(4) CAT 活力的测定

CAT 测定采用钼酸铵法测定方法,参照 CAT 测定试剂盒说明书中方法。

CAT 活力单位定义:每毫克蛋白每秒钟分解 1 μmol 的 H_2O_2 的量为一个活力单位(U_c)。CAT 活力计算公式:

$$\text{CAT 活力}(U_c/\text{ml}) = (\text{对照管吸光值} - \text{测定管吸光值}) \times 271 \times \frac{1.0 \text{ ml}}{60 \text{ s} \times \text{取样量}(\text{ml})} \times \frac{\text{测试前样品稀释倍数}}{\text{粗酶液中蛋白量}(\text{mg}/\text{ml})}。$$

(5) 蛋白含量的测定

蛋白质含量测定采用 Brad-ford 法,使用南京建成生物工程研究所的蛋白测定试剂盒测试,方法参照试剂盒说明书。

3 实验结果

3.1 30 keV N^+ 注入 *E. coli* 的 HRS/IRR 效应

低能 N^+ 注入对 *E. coli* 存活的影响,30 keV N^+ 注入 *E. coli* 的剂量存活效应曲线见图 1。由图 1 可见,30 keV N^+ 注入 *E. coli* 时,在小于 $5 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 的剂量范围内,随剂量的增加细胞存活率急剧下降,当剂量增至 $5 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时,*E. coli* 的存活率只有 0.45,*E. coli* 表现出对 30 keV N^+ 极为敏感,呈现 HRS 效应。随着剂量的增加在 $5 \times 10^{14} - 10 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 的范围内,*E. coli* 的存活率又有所回升。当剂量升至 $10 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时其存活约为 0.87,*E. coli* 表现出对 30 keV N^+ 具有了一定抗性,呈现 IRR 效应。 $10 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 细胞的辐射抗性表现为最大。在大于 10×10^{14} 的剂量范围内 *E. coli* 的存活率随剂量的增加逐渐下降。从 0—

300 N⁺/cm² 整个剂量范围来看, 30 keV N⁺ 注入 *E. coli* 的剂量存活效应曲线呈现出“马鞍”形状, 马鞍峰大致位于 10×10¹⁴ N⁺/cm²。

图 1 插图中 α 线和 β 线斜率绝对值表示随低能离子注入剂量增加 *E. coli* 存活率的下降趋势, 其大小反映了细胞对 N⁺ 注入敏感性的大小, 即按单位剂量计 N⁺ 注入对细胞致死效应的大小。斜率越大说明细胞对 N⁺ 注入越敏感, 反之, 越不敏感。统计结果显示 α 线和 β 线的斜率分别为 -0.1041 和 -0.0112, |α 斜率| 与 |β 斜率| 比值约为 10, 说明, *E. coli* 对 10×10¹⁴—60×10¹⁴ N⁺/cm² 剂量的 N⁺ 注入耐受能力比低剂量 0—5×10¹⁴ N⁺/cm² 时高大约 10 倍。可见, 在较低的剂量范围内 0—5×10¹⁴ N⁺/cm² *E. coli* 表现出对 30 keV 的 N⁺ 注入极为敏感, 随着剂量增加存活率急剧下降。当剂量增加达到一定阈值 5×10¹⁴ N⁺/cm² 时, 细胞内可能被诱导产生了某种抗辐射机制, 使得 *E. coli* 对 N⁺ 注入的抵抗力增加了 10 倍。

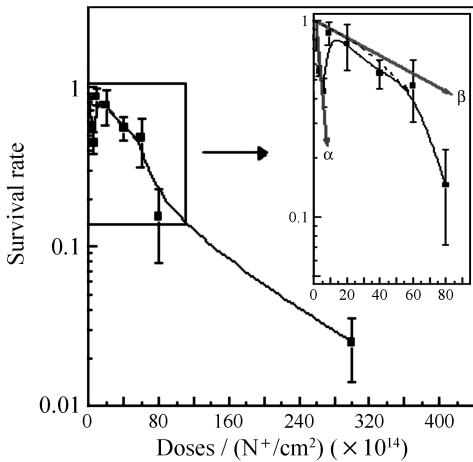


图 1 30 keV N⁺ 注入 *E. coli* 的存活情况

在低能离子注入 *E. coli* 诱发 HRS/IRR 的剂量范围内, 各剂量点上 *E. coli* 的存活率相差不是很大, 为说明峰点和谷点的存活率数值是否具有统计学上的意义, 我们对存活曲线中谷和峰的存活率数值进行了差异显著性分析(见表 1)。

用 *t* 检验法对 5×10¹⁴ 和 3×10¹⁴ N⁺/cm² 两个剂量点的 *E. coli* 存活率进行假设检验, 计算得 |*t*| = 4.066, 查表得 *t*_{0.01}(8) = 2.896。|*t*| > *t*_{0.01}(8), 故 *P* < 0.01。说明在 1% 的检验水平上 3×10¹⁴ N⁺/cm² 剂量点的 *E. coli* 存活率显著高于 5×10¹⁴ N⁺/cm² 剂量点的存活率; 对 5×10¹⁴ 和 10×

10¹⁴ N⁺/cm² 两个剂量点的 *E. coli* 存活率进行假设检验, 计算得 |*t*| = 9.736, 查表得 *t*_{0.01}(8) = 2.896。|*t*| > *t*_{0.01}(8), 故 *P* < 0.01。说明在 1% 的检验水平上 10×10¹⁴ N⁺/cm² 剂量点的 *E. coli* 存活率显著高于 5×10¹⁴ N⁺/cm² 剂量点的存活率。可见, 低能离子束与生物体相互作用诱发的 HRS/IRR 峰点和谷点存活率数值具有统计学意义。

表 1 3×10¹⁴, 5×10¹⁴ 和 10×10¹⁴ N⁺/cm² 3 个剂量点 *E. coli* 存活率

Dose/(N ⁺ /cm ²)	Mean sur. rate	RSD(%)
3×10 ¹⁴	0.566	0.033
5×10 ¹⁴	0.442	0.06
10×10 ¹⁴	0.88	0.081

3.2 不同剂量 30 keV N⁺ 离子注入 *E. coli* 细胞内 SOD 酶活变化

30 keV N⁺ 离子注入 *E. coli* 诱发剂量范围为 0—100×10¹⁴ N⁺/cm², 研究着重考察了该剂量范围辐照时, N⁺ 注入对 *E. coli* 细胞内 SOD 酶活的影响见图 2。从图 2 可见, 在剂量 0—5×10¹⁴ N⁺/cm² 范围内时, *E. coli* 细胞内 SOD 酶活基本维持在 10 U/mg 的较低水平, 随剂量基本无太大变化。当注入剂量高于 5×10¹⁴ N⁺/cm² SOD 酶活开始急剧上升, 说明 SOD 酶开始诱导表达酶活增强, 10×10¹⁴ N⁺/cm² 剂量时酶活达到最高 58 U/mg 左右。随后, 随剂量增加酶活逐渐降低, 剂量大于 60×10¹⁴ N⁺/cm², SOD 酶活大小随剂量变化很小, 基本维持在 20 U/mg 左右。

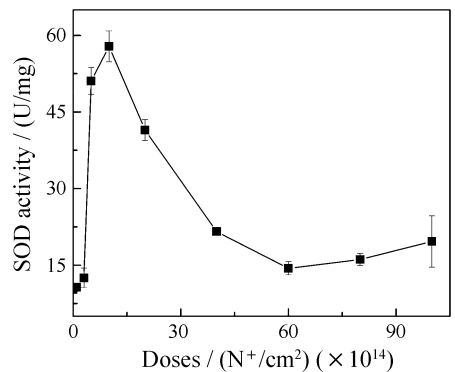


图 2 30 keV N⁺ 离子注入对 *E. coli* SOD 酶活的影响

3.3 不同剂量 30 keV N⁺ 离子注入 *E. coli* 细胞内 CAT 酶活变化

低能 N⁺ 离子注入对 *E. coli* CAT 酶活的影响见图 3。从图 3 可见, N⁺ 离子注入 *E. coli* 的 CAT 酶活变化趋势与 SOD 基本相似, 小于 5×10^{14} N⁺/cm² 剂量时, *E. coli* CAT 酶活变化很小, 5×10^{14} — 10×10^{14} N⁺/cm², 随剂量增加 CAT 酶活开始升高, 在 10×10^{14} N⁺/cm² 剂量 CAT 酶活达到最高; 随后, 随剂量增加酶活逐渐降低, 剂量大于 40×10^{14} N⁺/cm², CAT 酶活维持在 10 U/mg 左右的较低水平。

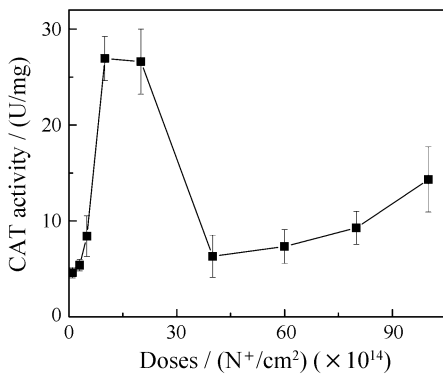


图 3 30 keV N⁺ 离子注入对 *E. coli* CAT 酶活的影响

4 讨论

4.1 低能离子注入 *E. coli* 细胞内抗氧化酶活的诱导

30 keV N⁺ 离子注入对 *E. coli* 抗氧化酶活影响的实验结果显示, 在 0— 100×10^{14} N⁺/cm² 的剂量范围, 随着注入剂量的增加, *E. coli* 内抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性变化存在一个先无太大变化, 随后逐渐上升, 而后下降的趋势, 这种变化趋势在低能离子注入彩棉种子、*D. radiodurans* 以及 *E. coli* B 菌株^[12] 也曾经被观察到, 只是峰值位置有所差异。另外, 陈剑等^[13] 也发现当受到不同剂量的 γ 射线作用后, *D. radiodurans* 中这两种酶的活性随着剂量的增加也出现先升高后降低的趋势。可见, 当小于 5×10^{14} N⁺/cm² 剂量的低能离子注入 *E. coli* 时, 注入离子对细胞刺激很小, 产生的活性氧自由基很少, 无法诱导抗氧化酶系 SOD 和 CAT 大量表达或者刺激胞内固有的 SOD 和 CAT 酶活提高。随剂量增加, 达到 10×10^{14} N⁺/cm² 注入离子对合成 SOD 基因调控系统产生了激励作用, 或是

激活了胞内固有的 SOD 酶活。对于 CAT 酶活 10×10^{14} N⁺/cm² 的剂量对其酶活刺激作用最大。对于 SOD 大于 60×10^{14} 和 CAT 大于 40×10^{14} N⁺/cm² 的注入剂量, 会造成细胞严重损伤, 尤其是 DNA 的损伤, 致使代谢紊乱, SOD 和 CAT 合成受阻、分解加强及胞内固有 SOD 和 CAT 空间结构(尤其是活性中心)被破坏等^[9], 致使细胞内 SOD 和 CAT 的酶活变得较低。

4.2 抗氧化酶活诱导与 HRS/IRR 诱发的关系

作者的研究结果显示, 30 keV N⁺ 时 *E. coli* 的抗氧化酶活变化情况与其存活率变化趋势基本吻合。较低剂量注入时, 细胞内抗氧化酶活较低无太大变化, 离子注入引起细胞内水分解形成的活性氧自由基无法及时被清除, 其攻击生物大分子特别是 DNA, 导致细胞死亡, 随着剂量增加产生的活性氧自由基越来越多, 对 DNA 的损伤以及细胞致死作用也越来越严重。稍高剂量注入时, 离子注入刺激诱导细胞内抗氧化酶系 SOD 和 CAT 表达增加。另外, 越来越多的注入离子沉积和电荷交换有可能使得细胞内固有的 SOD 和 CAT 酶活提高, 氧化酶系活性的诱导提高, 使得细胞可以及时清除掉离子注入产生的活性氧自由基, 减少活性氧对 DNA 的损伤作用导致了存活的细胞越来越多。在高剂量注入时, 细胞损伤严重, 过氧化物酶的以及酶的活性中心被破坏等^[14] 原因造成了细胞内 SOD 和 CAT 的酶活变得较低, 其结果是细胞的存活降低。

可见, 低能离子注入 *E. coli* HRS/IRR 的诱发过程与细胞内抗氧化酶的诱导酶活变化过程关系密切。

参考文献 (References):

- [1] Song Daojun, Wang Ji, Yao Jianming, *et al.* Laser Biology, 1999, **8**(1): 19(in Chinese).
(宋道军, 王纪, 姚建铭等. 激光生物学报, 1999, **8**(1): 19.)
- [2] Du Yanhua, Qiu Guangyin, Li Guohong, *et al.* Acta Biophysica Sinica, 1997, **13**(2): 267(in Chinese).
(杜严华, 丘冠英, 李国红等. 生物物理学报, 1997, **13**(2): 267.)
- [3] Chen Xi, Zhou Jiheng, Shi Ronghua, *et al.* Tobacco Science, 1999, (02): 35(in Chinese).

- (陈曦, 周冀衡, 施荣华等. 烟草科技, 1999, (02): 35.)
- [4] Shao Chunlin, Yu Zengliang. Nuclear Techniques, 1997, (07): 423 (in Chinese).
(邵春林, 余增亮. 核技术, 1997, (07): 423.)
- [5] Joiner M C, Marples B, Lambin P, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, **49**: 379.
- [6] Krueger S A, Joiner M C, Weinfeld M, *et al.* Radiat Res, 2007, **167**(3): 260.
- [7] Jin Xiaodong, Li Qiang. Nuclear Physics Review, 2007, **24**(3): 228(in Chinese).
(金晓东, 李强. 原子核物理评论, 2007, **24**(3): 228.)
- [8] Lee J H, Choi Y, Kil I S, *et al.* Biochim Biophys Acta, 2001, **15**(26): 191.
- [9] Fisher B J. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997, **38**(3): 541.
- [10] Chou F I, Tan S T. Journal of Bacteriology, 1990, **172**(4): 2029.
- [11] Yang Tianyou, Li Peirui, Tian Jing, *et al.* Nuclear Physics Review, 2008, **25**(4): 397(in Chinese).
(杨天佑, 李培睿, 田静等. 原子核物理评论, 2008, **25**(4): 397.)
- [12] Song Daojun, Li Hong, Yu Zengliang. Acta Biophysical Sinica, 1998, **14**(2): 325(in Chinese).
(宋道军, 李红, 余增亮. 生物物理学报, 1998, **14**(2): 325.)
- [13] Chen Jian, Liu Fangju. Suzhou University Journal of Medical Science, 2004, **24**(1): 15(in Chinese).
(陈剑, 刘芬菊. 苏州大学学报(医学版), 2004, **24**(1): 15.)
- [14] Sasaki M S. Int J Radiat Biol, 1995, **68**: 281.

Research on Relation of HRS/IRR and Anti-oxidases in *E. coli* Implanted by 30 keV N^+ *

YANG Tian-you^{1, 2, 1)}, WANG Tie-gu¹, TIAN Jing¹, CHANG Jing-ling¹, QING Guang-yong²

(1 Life Science and Technology College, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China;
2 Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: The inducement of hyperradiosensitivity/increased radioresistance(HRS/IRR) and activities of anti-oxidases in *Escherichia coli* implanted by 30 keV N^+ and relationship between them were investigated. The results showed the change trend of the survival rate and the activity of superoxide dismutase(SOD) and Catalas(CAT) of *E. coli* K12 was consistent. The activity of SOD and CAT of *E. coli* were lower, less than 10 and 8 U/mg, when the HRS was induced at $0-5 \times 10^{14} N^+ / cm^2$ doses. And the activity of SOD and CAT of *E. coli* increased and reached highest rate, were 58 and 26 U/mg respectively, when the IRR was induced at $5 \times 10^{14} - 10 \times 10^{14} N^+ / cm^2$ doses. It could be concluded that the change of SOD and CAT activity was related with the HRS/IRR.

Key words: N^+ implantation; hyperradiosensitivity; increased radioresistance; superoxide dismutase; catalas

* Received date: 19 Jun. 2009; Revised date: 14 Aug. 2009

* Foundation item: Major State Basic Research Development Program of China(2004CB719604); National Natural Science Foundation of China(10505018)

1) E-mail: yangtianyou2004@163.com