

# 不同活性氧胁迫下 *Bacillus* sp. F26 以抗氧化物酶合成为特征的应激响应

燕国梁<sup>1</sup>, 华兆哲<sup>2,3</sup>, 堵国成<sup>2,3</sup>, 陈坚<sup>2,3</sup>

1 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

2 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

3 江南大学生物工程学院, 无锡 214122

**摘要:** 采用不同的活性氧发生源, 研究了  $O_2^- \cdot$ 、 $H_2O_2$  和  $OH \cdot$  胁迫下 *Bacillus* sp. F26 以抗氧化物酶合成为特征的应激响应。结果表明, 细胞对氧胁迫的应激响应程度取决于活性氧种类、胁迫程度和形式(瞬时和持续)。*Bacillus* sp. F26 对  $H_2O_2$  胁迫的响应程度最高, 过氧化氢酶的快速合成对细胞抵抗  $H_2O_2$  胁迫至关重要, 当细胞及时分解进入胞内的  $H_2O_2$ , 胁迫对细胞的氧化损伤程度并不高, 相反会刺激细胞的生长和底物消耗, 当胁迫超过过氧化氢酶的分解能力时,  $H_2O_2$  会迅速抑制细胞生长和过氧化氢酶合成; 由于  $O_2^- \cdot$  与细胞作用的方式和效果与  $H_2O_2$  不同, 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的快速合成并不能保证细胞及时有效地清除胞内的活性氧, 因此, 细胞对  $O_2^- \cdot$  胁迫的响应程度要低于  $H_2O_2$  胁迫; 在所考察的 3 种活性氧中,  $OH \cdot$  胁迫(Fenton 反应体系)对细胞的氧化损伤程度最大, 胁迫强烈地抑制了细胞生长和抗氧化物酶的合成。由此表明, 由于不同活性氧的化学性质有所不同, 细胞对不同种类、程度和形式的活性氧胁迫会表现出不同的生物学效应, 为了提高自身对氧胁迫的抵抗能力, 微生物会通过自身的代谢调节适应新的环境, 包括调整抗氧化物酶合成水平、改变生长速度以及底物消耗速率等。

**关键词:** *Bacillus* sp. F26, 活性氧, 氧化胁迫, 应激响应, 抗氧化物酶

## Response of *Bacillus* sp. F26 to Different Reactive Oxygen Species Stress Characterized by Antioxidative Enzymes Synthesis

Guoliang Yan<sup>1</sup>, Zhaozhe Hua<sup>2,3</sup>, Guocheng Du<sup>2,3</sup>, and Jian Chen<sup>2,3</sup>

1 College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China

3 School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** The oxidative response of *Bacillus* sp F26 to different forms of reactive oxygen species (ROS) stress including  $H_2O_2$ ,  $O_2^- \cdot$  and  $OH \cdot$  were investigated by using diverse generating source of ROS, which were characterized by synthesis of antioxidative enzymes. It was shown that the responses of cells to oxidative stress are largely dependent on species, mode (instantaneous and continual) and intensity of stress. Higher synthesis rate of catalase (CAT) is crucial for *Bacillus* sp F26 to resist  $H_2O_2$  stress. The damage of  $H_2O_2$  to

**Received:** August 14, 2007; **Accepted:** September 29, 2007

**Supported by:** the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2007CB714306).

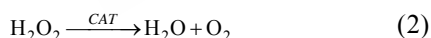
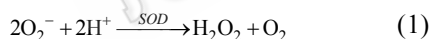
**Corresponding author:** Zhaozhe Hua. Tel: +86-510-85918309; Fax: +86-510-85918309; E-mail: huazz@jiangnan.edu.cn

国家重点基础研究发展规划 973 项目 (No. 2007CB714306)资助。

cell was minor if CAT can efficiently decompose  $H_2O_2$  entering into cell, furthermore, the response can stimulate cell growths and sugar consumption. Conversely, cell growth and synthesis of antioxidative enzymes are greatly inhibited when the intensity of  $H_2O_2$  stress overwhelms the cell capability of clearing  $H_2O_2$ . Due to the difference in mode and effect on cells between  $O_2^{\cdot -}$  and  $H_2O_2$ , higher synthesis rates of CAT and superoxide dismutase (SOD) couldn't guarantee cells to eliminate  $H_2O_2$  and  $O_2^{\cdot -}$  efficiently. Therefore, the toxicity to cells induced by intracellular  $O_2^{\cdot -}$  is more severe than  $H_2O_2$  stress. Unlike response to  $H_2O_2$  and  $O_2^{\cdot -}$ ,  $OH^{\cdot}$  stress significantly inhibited cell growth and synthesis of antioxidative enzymes due to the fact  $OH^{\cdot}$  is most active ROS. Our results indicated that *Bacillus* sp. F26 will show diverse biological behaviour in response to  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$  and  $OH^{\cdot}$  of stress due to the discrepancy in chemical property. In order to survive in oxidative stress, cells will timely adjust their metabolism to adapt to new environment including regulating synthesis level of antioxidative enzymes, changing rates of cells growth and substrate consumption.

**Keywords:** *Bacillus* sp. F26, reactive oxygen species, oxidative stress, response, antioxidative enzymes

活性氧(Reactive oxygen species)是好氧微生物进行氧化代谢时产生的一类化学性质非常活泼的物质,主要包括超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot -}$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )和羟基自由基( $OH^{\cdot}$ )。活性氧极易与DNA、蛋白质和酯类等生物分子发生反应,对微生物细胞造成伤害,甚至引起细胞死亡。当细胞受到辐射或环境中存在金属离子时,活性氧浓度会迅速升高,对细胞形成氧化胁迫(Oxidative stress)作用。研究表明抗氧化物酶(主要包括超氧化物歧化酶,过氧化氢酶)是细胞抵抗活性氧胁迫(攻击)最直接也是最有效的方式(式1和2为超氧化物歧化酶,过氧化氢酶清除 $O_2^{\cdot -}$ 和 $H_2O_2$ 的反应式)<sup>[1,2]</sup>,因此其活性的变化是最能够直接反映微生物细胞对氧化胁迫应答水平的指标<sup>[3]</sup>。



研究微生物对活性氧胁迫的应答可以揭示生物体的应激反应机制,有助于了解人体许多疾病形成的原因<sup>[4]</sup>,已有的研究表明活性氧对生物体的生理作用主要取决于活性氧的种类和胁迫方式(添加方式)<sup>[5,6]</sup>。但由于活性氧的活泼性和易变性,目前在对以抗氧化物酶合成为特征的氧化胁迫应激研究中一般都是在区分活性氧种类的条件考察酶的合成情况<sup>[7,8]</sup>,没有把活性氧种类之间的差别作为考察生物体应答机制的条件,特别是对不同种类和形式的活性氧胁迫下微生物抗氧化物酶的合成规律还没有得到充分的研究。

本实验室在前期的研究中,从内蒙古呼伦贝尔草原的盐碱湖中分离得到一株低度嗜盐嗜碱细菌芽孢杆菌 *Bacillus* sp. F26,发现该菌株对活性氧胁迫具有良好的应答特性,表现为过氧化氢酶的高水平

合成<sup>[9]</sup>。为了深入了解不同活性氧胁迫下微生物的应激响应特征,本文以微生物细胞中最重要的抗氧化物酶,超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)为主要目标酶,利用不同的活性氧发生源研究了不同种类活性氧( $O_2^{\cdot -}$ 、 $H_2O_2$ 和 $OH^{\cdot}$ )和不同形式(瞬间和持续)胁迫下微生物细胞以抗氧化物酶合成为特征的应激响应。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

枯草杆菌(*Bacillus* sp. F26),从内蒙古呼伦贝尔草原的盐碱湖中分离得到,属低度嗜盐嗜碱细菌(Slight halophilic alkaliphile),江南大学环境生物技术研究室保存。

#### 1.1.2 培养基

斜面培养基(g/L): 聚蛋白胨 15, 葡萄糖 15, 酵母膏 5,  $KH_2PO_4$  1,  $MgCl_2$  0.2, NaCl 50,  $Na_2CO_3$  10(分消), 琼脂 20, 初始 pH 9.5。

种子和发酵培养基(g/L): 葡萄糖 15, 牛肉膏 15, 酵母膏 5,  $KH_2PO_4$  1,  $MgCl_2$  0.2, NaCl 50,  $Na_2CO_3$  10(分消), 初始 pH 9.5。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 培养方法

摇瓶培养: 接两环生长良好的斜面培养物至装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中培养 24 h。吸取种子培养液,按 5%的接种量接种于发酵培养基中(装液量同上)培养 20 h,培养温度都为 37°C,摇瓶转速 200 r/min。

发酵罐培养: 5 L 全自动控制发酵罐(KFT-7 L, 韩国)中装液量 3.0 L,接种量 5%,温度 37°C,搅拌

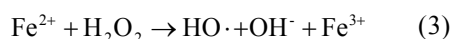
转速 300 r/min(12 h 前), 350 r/min(至发酵结束), 通气量 3.0 L/min, 培养时间 24 h。pH 通过自动流加 3 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  和 3 mol/L  $\text{NaOH}$  溶液进行调节。培养 16 h 后向发酵罐中按要求流加一定浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  和甲萘醌溶液。

### 1.2.2 不同种类和浓度活性氧的获得

$\text{H}_2\text{O}_2$ : 外加不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$ (30%, V/V) 溶液( $\text{H}_2\text{O}_2$  可以自由进入细胞)。

$\text{O}_2^{\cdot -}$ : 添加不同浓度的甲萘醌(Menadione)溶液。甲萘醌是一种醌类物质(Quinine)当其进入细胞后, 很快接受一个电子变为半醌(Semiquinone), 半醌极不稳定, 立即将电子传递给  $\text{O}_2$  产生  $\text{O}_2^{\cdot -}$ 。

$\text{OH}^{\cdot}$ : 利用  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  体系, 产生机制如式 3 所示



### 1.2.3 测定方法

CAT 酶活测定: 采用分光光度法在 30°C 下测定<sup>[10]</sup>。

酶活力定义为: 在 30°C 下, 每分钟分解 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  所需的酶量为 1 个酶活力单位(u)。

SOD 酶活测定: 邻苯二酚法<sup>[11]</sup>。

SOD 酶活力单位定义为: 每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50 % 的酶量为 1 个活力单位(u)。

$\text{H}_2\text{O}_2$  浓度测定: 碘化钾碘蓝分光光度法<sup>[12]</sup>。

丙二醛含量测定: 采用丙二醛试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所。所用方法为 TBA 法(硫代巴比妥酸法)<sup>[13]</sup>。

粗酶液中总蛋白质含量的测定: 考马斯亮兰法<sup>[14]</sup>, 以牛血清蛋白作为标准。

生物量测定: 取 25 mL 发酵液离心、蒸馏水洗涤 2 次后置 60°C 下恒温干燥至恒重称重。

还原糖测定: 3, 5-二硝基水杨酸法<sup>[15]</sup>。

实验结果为 3 组平行对照样的平均值, 每组测定结果的相对偏差不超过 5 %。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\text{H}_2\text{O}_2$ 胁迫下 *Bacillus* sp. F26 的应激响应

在研究微生物氧化胁迫应激响应时一般都以对数生长期的细胞为研究对象<sup>[16]</sup>。这是因为活性氧对处于这时期细胞的抗氧化物酶的诱导效果较好。前期的研究表明处于对数期的 *Bacillus* sp. F26 对活性

氧胁迫的应激响应程度要高于稳定期细胞, 表现为  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2^{\cdot -}$  对 CAT 和 SOD 的诱导程度最高<sup>[17]</sup>。因此, 在以下的研究中主要以对数生长期(16 h)的细胞为研究对象, 首先在摇瓶中通过一次性添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  考察了  $\text{H}_2\text{O}_2$  瞬时胁迫下细胞的应激响应, 结果如图 1 所示。

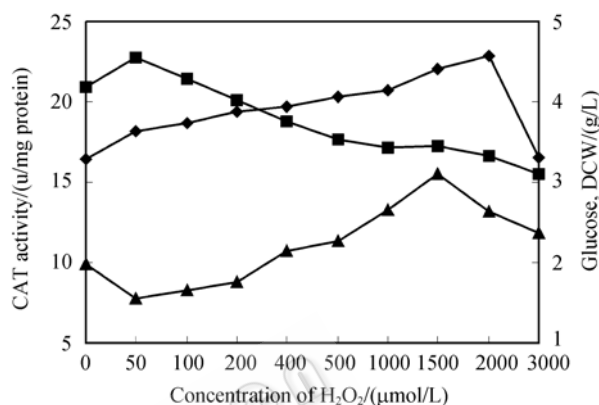


图 1 不同程度  $\text{H}_2\text{O}_2$  瞬时胁迫对细胞生长和 CAT 合成的影响

Fig. 1 Effects of instantaneous stress of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on cell growth and synthesis of CAT  
■ biomass; ◆ CAT activity; ▲ Glucose concentration

可以看出,  $\text{H}_2\text{O}_2$  瞬时胁迫对细胞的影响存在着浓度效应。低程度胁迫(100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ )能够刺激细胞生长和对糖的利用, 当  $\text{H}_2\text{O}_2$  添加浓度超过 2 mmol/L 时, CAT 酶活迅速下降, 表明此胁迫已超过了细胞的承受能力, 影响了抗氧化物酶的合成。由于 *Bacillus* sp. F26 具有不同的活性氧应激转录因子 OxyR(CAT 转录因子, 对应于  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫)和 SoxRS(SOD 转录因子, 对应于  $\text{O}_2^{\cdot -}$  胁迫)<sup>[17]</sup>, 因此  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫对 SOD 活性的影响不大(具体数据未列出)。

图 2 所示为 *Bacillus* sp. F26 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  持续胁迫下生长、营养物质消耗和 CAT 合成的情况。根据以前的研究结果, 确定  $\text{H}_2\text{O}_2$  的流加速度分别为 0.25、1、2、4 mmol/L/h(即每小时进入发酵罐的  $\text{H}_2\text{O}_2$  为 0.25、1、2、4 mmol/L)。对照为流加同等质量的无菌水。可以看出, 细胞对  $\text{H}_2\text{O}_2$  持续胁迫的应激响应规律除了与胁迫程度有关外, 还与胁迫时间相关。除了 4 mmol/L/h 的情况, 胁迫前期(20 h 前), 细胞对葡萄糖的利用速度提高(A), 同时细胞生长出现先促进(18 h 前)后抑制(18 h 后)的现象(B)。  $\text{H}_2\text{O}_2$  持续胁迫极大地促进了 CAT 合成, 以 1 mmol/L/h 和 2 mmol/L/h

速度流加时,最高酶活(20 h 时)与对照相比分别提高了 147.8%和 170.2%,以 4 mmol/L/h 的速度流加  $H_2O_2$  时,胁迫显然已超过了细胞的承受能力,表现为流加初期生物量和 CAT 合成水平就开始降低(与 1 mmol/L/h 和 2 mmol/L/h 相比)。

图 3(A)所示为不同流加速度下发酵液中  $H_2O_2$  浓度变化曲线。可以看出,除了 4 mmol/L/h 的情况,不同流加速度下发酵液中  $H_2O_2$  浓度差异并不大,呈现先上升后下降的趋势(22 h 后开始降低),表明 22 h 后  $H_2O_2$  的分解速率大于  $H_2O_2$  进入发酵液的速率。需要注意的是当流加速度为 4 mmol/L/h 时,24 h 时发酵液中已经检测不到  $H_2O_2$ 。镜检发现,此时有部分的细胞已开始自溶,自溶开始时间与对照相比提前了 2 h 左右。这可能是细胞在氧胁迫环境下采取的一种自我保护措施,通过菌体自溶释放出体内的 CAT,降低了环境中的  $H_2O_2$  浓度,即所谓的细胞自

杀(Cell suicide)现象<sup>[18]</sup>。

在研究活性氧对细胞的氧化损伤时,一般以脂质过氧化反应的终产物丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量为指标。图 3 (B)所示为不同程度  $H_2O_2$  持续胁迫下 MDA 浓度的变化情况。可以看出,MDA 浓度随着  $H_2O_2$  流加速度的增加和时间逐渐升高,但胁迫前期(18 h 前)由于胞内 CAT 合成水平较高,MDA 含量与对照相比差异并不显著。

## 2.2 $O_2^- \cdot$ 胁迫下 *Bacillus sp.* F26 的应激响应

通过一次性添加不同浓度的甲萘醌考察了  $O_2^- \cdot$  瞬时胁迫对细胞生长和抗氧化物酶合成的影响,结果如表 1 所示。可以看出,在所考察的浓度范围内,甲萘醌强烈地刺激了 SOD 和 CAT 的合成,但也不同程度地抑制了细胞生长和糖的消耗。当甲萘醌浓度增加到 80  $\mu\text{mol/L}$  时, SOD 和 CAT 酶活水平开始下降(与 60  $\mu\text{mol/L}$  的情况相比)。表 1 最后一行为添加

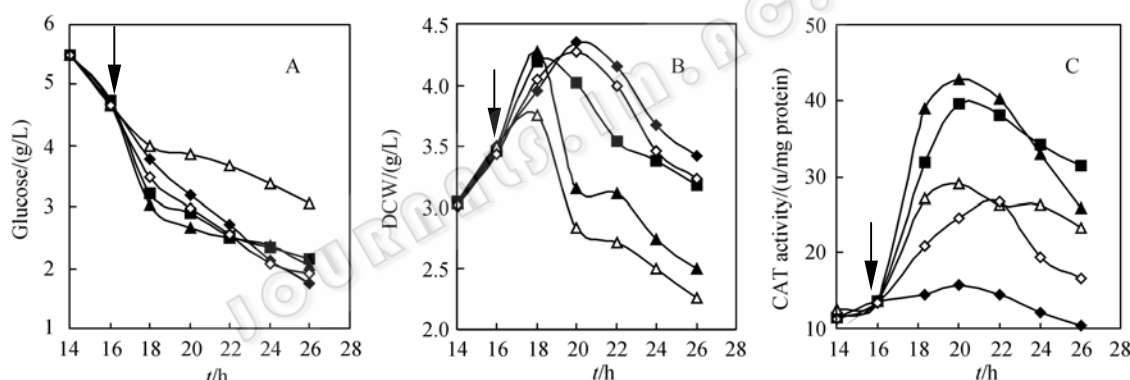


图 2  $H_2O_2$  持续胁迫下葡萄糖消耗(A),细胞生长(B)和 CAT 合成(C)随时间变化曲线  
Fig. 2 Time-courses of glucose consumption (A), cell growth (B), CAT production (C) under durative  $H_2O_2$  stress  
◆ Control; ◇ 0.25 mmol/L/h; ■ 1 mmol/L/h; ▲ 2 mmol/L/h; △ 4 mmol/L/h

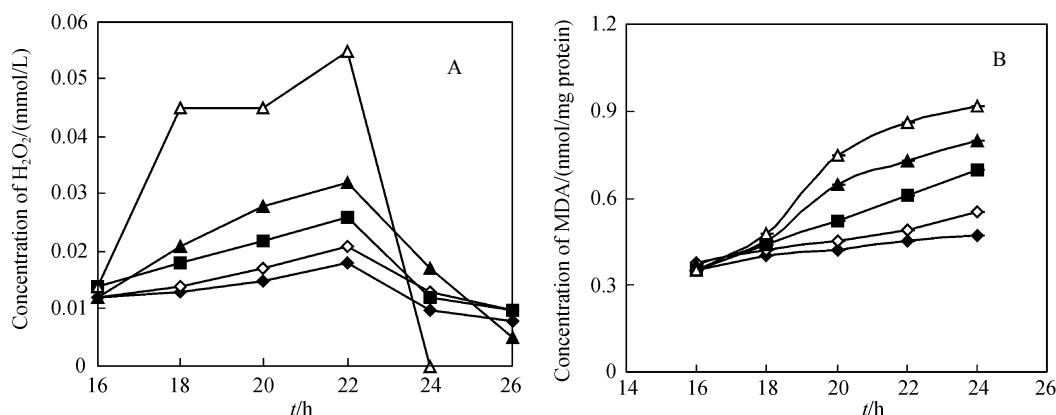


图 3  $H_2O_2$  持续胁迫下发酵液中  $H_2O_2$  浓度(A)与丙二醛浓度(B)随时间变化曲线  
Fig. 3 Time-courses of  $H_2O_2$  (A) and malondialdehyde concentration (B) under durative  $H_2O_2$  stress  
◆ Control; ◇ 0.25 mmol/L/h; ■ 1 mmol/L/h; ▲ 2 mmol/L/h; △ 4 mmol/L/h

1.5 mmol/L  $H_2O_2$  时抗氧化酶的合成情况, CAT 酶活(24.6 u/mg protein)与添加 40  $\mu\text{mol/L}$ (25.8 u/mg protein)和 60  $\mu\text{mol/L}$ (23.7 u/mg protein)甲萘醌时的水平相当, 但后者的生物量与前者相比却分别降低了 10.3%和 17.6%。由于 CAT 酶活水平能够在一定程度上反映细胞所受到的  $H_2O_2$  胁迫程度<sup>[19]</sup>, 这表明在胞内  $H_2O_2$  浓度相近的情况下  $O_2^{\cdot-}$  胁迫对细胞的毒性要高于  $H_2O_2$ 。

$O_2^{\cdot-}$  持续胁迫对 *Bacillus* sp. F26 生长和抗氧化物

酶合成的影响如图 4 所示, 甲萘醌的流加速度分别为 50  $\mu\text{mol/L/h}$ 、100  $\mu\text{mol/L/h}$  和 200  $\mu\text{mol/L/h}$ 。由结果可见, 甲萘醌加入后细胞的生长立即受到了抑制, 这一点与  $H_2O_2$  胁迫有所不同;  $O_2^{\cdot-}$  持续胁迫极大地刺激了 SOD 和 CAT 合成, 当流加速度为 100  $\mu\text{mol/L/h}$  时, SOD 和 CAT 酶活在 19 h 和 18 h 分别达到最大值(47.9 u/mg 和 30.2 u/mg 蛋白), 与对照相比分别提高了 53.0%和 87.4%。流加速度为 200  $\mu\text{mol/L/h}$  时, 胁迫已超过了细胞的承受能(SOD 和 CAT 的最高酶活与

表 1 添加不同浓度甲萘醌对细胞生长、SOD 和 CAT 合成的影响

Table 1 Effect of different concentration of menadione on cell growth and synthesis of SOD and CAT

Menadione/( $\mu\text{mol/L}$ )	Dry biomass/(g/L)	Residual glucose/(g/L)	SOD Act/(u/mg protein)	CAT Act/(u/mg protein)
0	4.36	2.05	15.3	16.5
20	4.08	2.53	25.3	21.0
40	3.58	2.98	36.1	25.8
60	3.36	3.08	38.3	23.7
80	3.15	3.28	31.2	16.5
100	2.68	3.83	26.5	9.0
200	2.46	4.53	22.9	11.4
1.5mmol/L $H_2O_2$	3.95	3.11	17.2	24.6

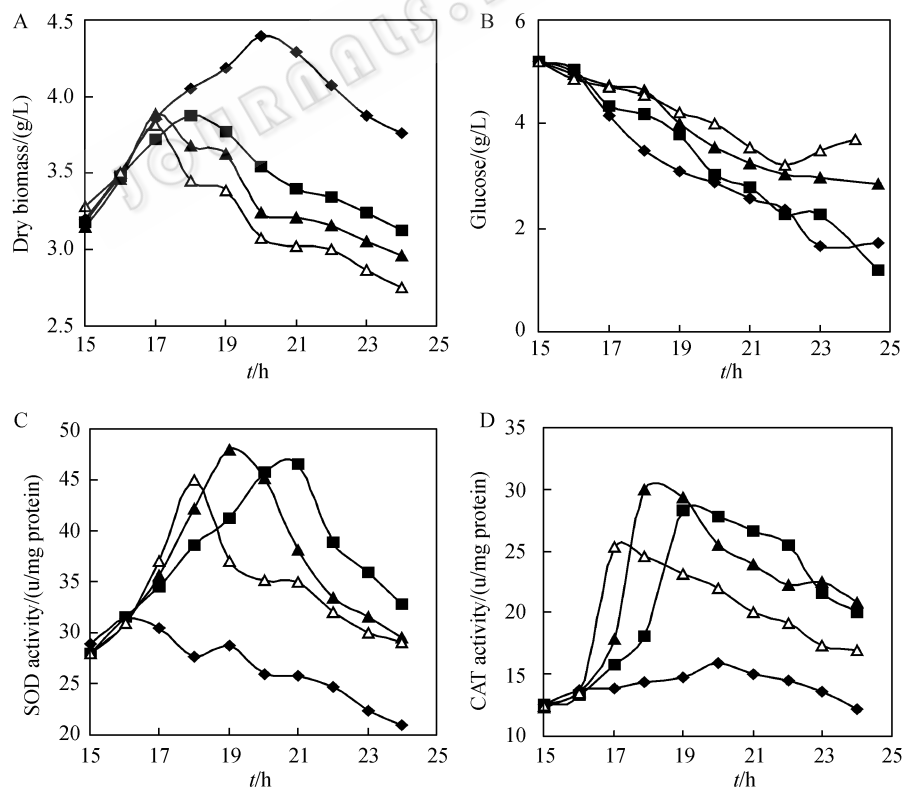


图 4 不同甲萘醌流加速度下 *Bacillus* sp. F26 细胞生长(A), 葡萄糖消耗(B), SOD 酶活(C)和 CAT 酶活(D)随时间变化曲线

Fig. 4 Time-courses of cell growth (A), glucose consumption (B), SOD activity (C) and CAT activity (D) under different feeding rate of menadione

◆ Control; ■ 50  $\mu\text{mol/L/h}$ ; ▲ 100  $\mu\text{mol/L/h}$ ; ▽ 200  $\mu\text{mol/L/h}$

100  $\mu\text{mol/L/h}$  相比分别降低了 6.8%和 21.3%)。需要注意的是在  $\text{O}_2^- \cdot$  胁迫下 CAT 到达最高酶活的时间与  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫相比都提前了 1~3 h, 表明胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$ (SOD 歧化反应产生)在很短时间内就达到了较高浓度。图 5 所示为甲萘醌流加 2 h 和 8 h 后丙二醛的浓度,  $\text{O}_2^- \cdot$  胁迫 2 h 和 8 h 后的 MDA 浓度相差不多, 但都高于  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫时的水平(图 3 B)。

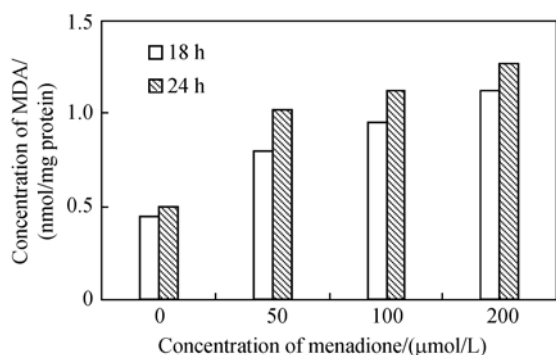


图 5 不同甲萘醌流加速度下丙二醛浓度  
Fig. 5 Changes of concentrations of MDA (malonedialdehyde) under different feeding rate of menadione

### 2.3 $\text{OH} \cdot$ 胁迫下 *Bacillus* sp. F26 的应激响应

表 2 所示为不同程度  $\text{OH} \cdot$  胁迫下细胞生长、抗氧化物酶合成以及细胞氧化损伤的情况。实验中采用固定  $\text{Fe}^{2+}$  浓度而改变  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的方法以获得不同水平的  $\text{OH} \cdot$  [20]。当菌体培养 16 h 后加入 10  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Fe}^{2+}$ , 继续培养 30 min 后加入 0.5、1、1.5 mmol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1.5 h 后取样测定。

可以看出, 当有  $\text{Fe}^{2+}$  存在时, 随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  添加浓度的升高, 生物量和抗氧化物酶活性迅速降低, MDA 浓度与只添加  $\text{H}_2\text{O}_2$ (0.5、1.0、1.5 mmol/L)相比分别提高了 28.9%、25.4%和 57.1%, 表明细胞受到的氧化

损伤程度逐渐加剧, 引起了细胞代谢的紊乱。

## 3 讨论

本文初步研究了 *Bacillus* sp. F26 在  $\text{O}_2^- \cdot$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{OH} \cdot$  三种活性氧胁迫下以抗氧化物酶(SOD 和 CAT)合成为特征的应激响应。结果表明, 细胞对不同种类、不同程度和形式(瞬时和持续)的活性氧胁迫会表现出不同的生物学效应。

$\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫程度直接影响着胞内 CAT 合成水平, 而 CAT 的合成水平又决定了细胞对  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫的抵抗能力。当胁迫超过细胞抗氧化物酶的清除能力时,  $\text{H}_2\text{O}_2$  不可避免的会对细胞产生毒害作用。研究表明,  $\text{H}_2\text{O}_2$  除本身对细胞有毒害作用外, 还可在胞内游离  $\text{Fe}^{2+}$  的参与下, 通过 Fenton 反应生成毒性更强的  $\text{OH} \cdot$ , 引起蛋白质和脂类等物质的失活, 从而影响细胞生长和抗氧化物酶的合成 [21]。对于低程度  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫( 100  $\mu\text{mol/L}$ )刺激细胞糖耗速率增加的现象(图 1), 这可能是因为细胞可承受胁迫范围内细胞需要消耗更多的能量以合成抗氧化物酶、DNA 修复酶等保护分子来抵抗活性氧的攻击, 因此需要消耗更多的葡萄糖 [22]。对于持续胁迫前期(18 h 前)出现的细胞快速生长的现象(图 2 B), 可能是由于 CAT 分解  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生的  $\text{O}_2$  引起溶氧浓度增加的缘故 [23]。

与  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫相比,  $\text{O}_2^- \cdot$  胁迫对细胞的氧化损伤作用更加强烈, 作者认为主要有以下两个方面的原因:

(1) $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2^- \cdot$  与细胞作用的方式不同。 $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫下, 由于细胞(器)膜的作用,  $\text{H}_2\text{O}_2$  在胞内的浓度要远低于胞外浓度。Antunes 等 [24] 的研究显示在  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫下,  $\text{H}_2\text{O}_2$  在细胞外、细胞质和过氧化物酶体中的浓度比例为 21:3:1, 表明细胞能够通过生物膜的

表 2  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  体系中不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  初始浓度对抗氧化物酶合成和细胞氧化损伤的影响  
Table 2 Effect of changing  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration in Fenton system on antioxidative enzymes and oxidative damage

Treatments	Biomass/(g/L)	CAT activity /(u/mg protein)	SOD activity /(u/mg protein)	MDA concentration /(nmol/mg protein)
Control	4.48	15.4	14.4	0.40
10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Fe}^{2+}$	4.38	16.3	16.9	0.47
0.5 mmol/L $\text{H}_2\text{O}_2$	4.12	18.6	15.3	0.45
1.0 mmol/L $\text{H}_2\text{O}_2$	4.02	20.1	14.2	0.51
1.5 mmol/L $\text{H}_2\text{O}_2$	3.95	22.8	13.2	0.56
10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Fe}^{2+}$ +0.5 mmol/L $\text{H}_2\text{O}_2$	3.74	15.9	11.5	0.58
10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Fe}^{2+}$ +1.0 mmol/L $\text{H}_2\text{O}_2$	3.46	15.1	11.2	0.64
10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Fe}^{2+}$ +1.5 mmol/L $\text{H}_2\text{O}_2$	2.89	12.2	9.3	0.88

“拦截”作用降低进入胞内的  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度, 作为一种保护机制降低了活性氧对细胞的毒性。而甲萘醌是进入细胞后才产生  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , 并生成  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{OH}^{\cdot}$ , 因此产生的活性氧更接近于各种细胞器;

(2)  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2^{\cdot-}$  与细胞作用的效果不同。进入细胞的  $\text{H}_2\text{O}_2$  大部分被 CAT 迅速分解, 来不及被分解的  $\text{H}_2\text{O}_2$  通过 Fenton 反应产生了  $\text{OH}^{\cdot}$ , 但由于胞内  $\text{Fe}^{2+}$  主要以结合态形式存在, 因此 Fenton 反应效率并不高。而在  $\text{O}_2^{\cdot-}$  存在时, 胞内  $\text{Fe}^{2+}$  浓度 ( $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ ) 会迅速增加, 极大地提高了 Fenton 反应速率<sup>[25]</sup>。另外由于 SOD 催化产生了  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 这就需要 SOD 和 CAT 共同作用才能最终清除活性氧, 但由于两种酶所处的位置不同, 其协同作用的效率势必会受到影响。从这种意义上讲  $\text{O}_2^{\cdot-}$  引起的胁迫实际上是  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{OH}^{\cdot}$  三种活性氧共同作用的结果。因此要降低  $\text{O}_2^{\cdot-}$  对细胞的毒性, 实际上就是要及时消除由  $\text{O}_2^{\cdot-}$  通过 SOD 产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[26]</sup>。

$\text{OH}^{\cdot}$  是已知的氧化能力最强、也是化学性质最为活泼的一种自由基(在水溶液中的存在时间仅为  $10^{-6}$  秒), 它几乎可以和所有的细胞成分发生反应, 包括抗氧化物酶的活性中心<sup>[21]</sup>。因此  $\text{OH}^{\cdot}$  被认为是毒性最大的氧自由基。在微生物体内, 没有特异的酶类来消除  $\text{OH}^{\cdot}$ , 细胞主要通过减少 Fenton 反应的底物浓度( $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{Fe}^{2+}$ )来降低  $\text{OH}^{\cdot}$  浓度, 即利用 CAT 分解  $\text{H}_2\text{O}_2$  和某些金属螯合剂或铁硫蛋白的结合降低  $\text{Fe}^{2+}$  浓度<sup>[27]</sup>。本研究的结果表明,  $\text{OH}^{\cdot}$  胁迫强烈地抑制了细胞生长和抗氧化物酶的合成。

本文初步的研究结果表明, 由于  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  和  $\text{OH}^{\cdot}$  的化学性质不同, 细胞对不同氧胁迫的应激响应规律存在很大的差异。为了提高自身对氧胁迫的抵抗能力, 微生物会通过自身的代谢调节适应新的环境, 包括改变生长速度、抗氧化物酶合成水平以及底物的消耗速率等。由于氧化胁迫能够极大提高抗氧化物酶的合成水平, 本文的研究结果对于提高 SOD 和 CAT 合成水平的研究具有很好的参考价值。

## REFERENCES

- [1] Farr S, Kogoma T. Oxidative stress response in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol rev*, 1991, **55**: 561–585.
- [2] Barbara CA, Dowds. The oxidative stress response in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **124**: 255–264.
- [3] Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Bio Med*, 2000, **28**: 463–499.
- [4] Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology, and medicine. Oxford: Oxford Science Publications, 1999.
- [5] Englert RP, Shacter E. Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 20518–20526.
- [6] Watts RJ, Washington D, Howsaweng J. Comparative toxicity of hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and superoxide anion to *Escherichia coli*. *Adv Environ Res*, 2003, **7**: 961–968.
- [7] Kreiner M, McNeil B, Harvey LM. Oxidative Stress response in submerged cultures of a recombinant *Aspergillus niger* (B1-D). *Biotechnol Bioeng*, 2000, **70**: 661–669.
- [8] Dowds BCA. The oxidative stress response in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **124**: 255–264.
- [9] Zhang XQ, Xue YF, Zhao AM. Purification and characterization of a monofunctional catalase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. F26. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(1): 71–77.
- [10] Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol*, 1984, **105**: 121–126.
- [11] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol: a convenient assay for Superoxide dismutase. *Eur J biochem*, 1974, **47**: 469–474.
- [12] Zhang YY, Li L, Su BJ. Determination of trace  $\text{H}_2\text{O}_2$  by KI iodine blue spectrophotometry. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2001, **20**(4): 41–42.
- [13] Chiou TJ, Chu ST, Tzeng WF, et al. Protection of cells from menadione-induced apoptosis by inhibition of lipid peroxidation. *Toxicology*, 2003, **191**: 77–88.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method of the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–255.
- [15] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*, 1959, **31**: 426–428.
- [16] Lu F, Wang Y, Bai D, et al. Adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to hyperosmotic and oxidative stress. *Process Biochem*, 2005, **40**: 3614–3618.
- [17] Yan GL, Hua ZZ, Du GC, et al. Adaptive response of *Bacillus* sp. F26 to hydrogen peroxide and menadione. *Curr Microbiol*, 2006, **52**: 238–242.

- [18] Ichise N, Morita N, Hoshino TA Mechanism of Resistance to hydrogen peroxide in *Vibrio rumoiensis* S-1. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 73–79.
- [19] Aldsworth TG, Sharman RL, Dodd C R. Bacterial suicide through stress. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **56**: 378–383.
- [20] Touati D. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys*. 2000, **373**: 1–6.
- [21] Song DJ, Li H, Yu ZL. Effect of  $N^+$  ion implantation on SOD, CAT, POD activity of different radiosensitivity microorganisms. *Acta Biophysica Sinica*, 1998, **14**(2): 325–330.
- 宋道军, 李红, 余增亮.  $N^+$ 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. *生物物理学报*, 1998, **14**(2): 325–330.
- [22] Kozlovsky N, Rudich A, Potashnik R. Reactive oxygenspecies activate glucose transport in L6 Myotubes. *Free Radic Biol Med*, 1997, **23**: 859–869.
- [23] Venkateshwaran G, Somashekar D, Prakash M H. Production and utilization of catalase using *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem*, 1999, **34**: 187–191.
- [24] Antunes F, Cadenas E. Estimation of  $H_2O_2$  gradients across biomembranes. *FEBS Letts*, 2000, **475**: 121–126.
- [25] Sawyer DT, Valentine J S. How super is superoxide? *Acc Chem Res*, 1981, **14**: 393–400.
- [26] Farr SB, Kogoma T. Oxidative stress in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev*, 1991, **55**: 561–585.
- [27] Vattanaviboon P, Mongkolsuk S. Evaluation of the role hydroxyl radicals and iron play in hydrogen peroxide killing of *Xanthomonas campestris* pv. *ohaseoli*. *FEMS Microbiol Letts*, 1998, **169**: 255–260.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 现代微生物学(第二版)

刘志恒 主编

978-7-03-020047-1 ¥99.00 2008年3月17日出版

本书作为研究生教科书,在内容和结构上仍然采用基础科学与应用科学相结合,以基础科学为主的编排处理。结合本书出版五年来被教学、科研及相关领域的师生、学者使用中的意见,为适应微生物学研究领域的快速发展,特别是分子生物学技术在微生物学中的广泛应用所引起的许多领域的突破、新的生长点的形成,及时充分反映微生物学新的理论和技术成果,对该书进行内容的更新和调整。内容涵盖原核生物、极端微生物和古菌、真菌、病毒,以及他们的生态、生理、生化代谢、遗传、免疫等。书中介绍细菌和真菌分子系统学、病毒学、极端微生物学、分子生态学、微生物生理学、微生物生物化学、微生物分子遗传学、免疫学等。

新版将本着删旧增新的原则,对原版文图进行调整,更能满足读者的需求。



### 蛋白质: 结构与功能(译)

[英] D. 惠特福德 著 魏群 主译

978-7-03-021010-4 ¥79.00 2008年3月20日出版

蛋白质结构功能的研究是从分子水平了解生命现象的基础。本书涉及的知识范围很广,从氨基酸到蛋白质的三维结构及检测方法,酶、膜蛋白、纤维蛋白等的结构功能,酶的催化和动力学,蛋白质的表达、纯化、合成、加工及在细胞中的周转,蛋白质的多样性和蛋白质组学,蛋白质体内外的折叠及蛋白质结构与医学分子生物学的进展等。本书适合作为国内大专院校生命科学领域本科生和研究生的教材或教学参考用书,也可供研究生命科学的相关人员及有兴趣了解现代生命科学的人士阅读。

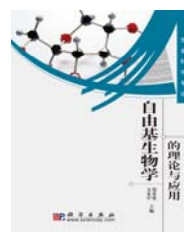


### 自由基生物学的理论与应用

方允中 郑荣梁 主编

978-7-03-009675-3 ¥110.00 2008年3月20日出版

本书详细论述了自由基生物学理论与应用的方方面面。内容包括: 自由基生物学与医学的基础理论; 抗氧化酶的结构、性质、生物学作用、生物合成与模拟酶及测定方法; 抗氧化剂, 包括抗氧化维生素, 可食植物中天然抗氧化剂的应用等。本书特点是内容全面、系统性强, 是近年自由基生物学方面集大成的一本书。各章附有较多图表, 便于读者把握内容。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>