

盐生杜氏藻微重力生物学效应的可能机制*

胡章立 刘永定

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘 要

在回转器模拟微重力刺激导致盐生杜氏藻细胞代谢特性变化的基础上,通过几种代谢抑制剂和激活剂的实验及其结果分析,发现细胞质膜可能是盐生杜氏藻细胞最直接的微重力感受体;质膜磷脂-蛋白、PMH⁺-ATPase、膜电位、Ca²⁺及钙调蛋白在其信号传导与响应过程中起到重要的作用.构建了盐生杜氏藻对微重力刺激感受、传导与响应的初步模型.

关键词 盐生杜氏藻 — 微重力 — 质膜 — 微重力感受模型

1 引 言

由于地面无法真正模拟微重力条件,微重力生物学效应的研究因此受到很大的限制.到目前为止,不仅对微重力是否会导致可遗传的生物学效应还没有一致的看法,而且对生物体特别是单细胞感受、传导及反应微重力刺激的研究还处于提出模型与假说阶段.这些假说与模型的提出大多建立在细胞生物学实验的基础上.本文以盐生杜氏藻为实验材料,在已获得藻细胞微重力生物学效应研究结果的基础上^[2],对其产生效应的机理,包括藻细胞感受、传导和响应微重力胁迫的可能机制进行了初步探讨.

2 材料与方 法

藻种 盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina* FACHB435) 中国典型培养物保藏中心中国淡水藻种库 (FACHB, 中国科学院水生生物研究所) 提供.

回转器培养 将接种后的初始培养物装入回转器的培养管内,在光照 $36 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、温度 $25\text{—}28^\circ\text{C}$ 、模拟微重力水平 $\leq 10^{-2} \text{g}$ 的条件下培养.

甘油含量的测定 参照 Ben-Amotz 等^[2]的方法.

H⁺分泌速率的测定 将在含 2mol/L NaCl 的培养液中生长的细胞经滤膜过滤收集后,重新悬浮于 2mol/L NaCl 水溶液 (无其它营养成分) 中.取 5mL 新悬浮液置于测定容器中,放入搅拌子,通入经 NaOH 溶液清除 CO_2 的空气, 5min 后开始测试.时间为 10min ,用经标定的 0.9878mol/L NaOH 回滴,根据滴定所用体积计算出 H⁺ 分泌速率.

* 国家载人航天工程资助项目

细胞质膜的分离 参照 Weiss 等^[3]的方法略作修改. 整个过程均在 0—4°C 以下进行.

质膜 H⁺-ATPase 活力的测定 根据 Weiss^[3]的方法介绍, 将 5—40 μg 蛋白的酶样在 37°C 的反应液中保温 30 min. 反应总体积为 500 μL, 反应液含 20 mmol/L Tris-Mops (pH7.0), 50 mmol/L KCl, 8 mmol/L MgCl₂, 2.5 mmol/L Tris-ATP. 用 0.5 mL 的冷冻 10% 三氯乙酸终止反应. 采用钼黄法测定 ATPase 水解所释放的无机磷含量. 由标准曲线计算出 ATPase 活性.

膜蛋白含量测定 采用 Commassie Brilliant Blue G-250 染色法测定^[4].

膜磷脂含量测定 参照 Folch 等^[5]方法抽提质膜的磷脂. 取 0.1 mL 抽提样品加入 0.1 mL 浓 H₂SO₄ 和 0.1 mL H₂O₂, 置于电炉氧化酸解到剩 0.1 mL 浓 H₂SO₄; 冷却后加入 1 mL 2%(NH₄)₃MoO₄ 和 0.4 mL 还原剂 (0.1% NH₂C₁₀H₅, 0.2% Na₂SO₃, 6% Na₂SO₃), 再加入 1.5 mL H₂O, 摇匀静置 3 min, 在 700 nm 处比色. 由标准曲线求得膜磷脂量.

生物量的测定 采用细胞计数表示其藻的生物量.

3 结 果

3.1 细胞的微重力感受部位

由于细胞外部介质与细胞质膜是直接相连的, 外部介质变化的第一个感受体就是细胞质膜. 为检测质膜在微重力胁迫中的作用, 本实验对不同盐度对细胞微重力效应的影响进行了分析, 结果发现, 在盐度低的培养基中生长的藻细胞通过微重力刺激后, 甘油含量

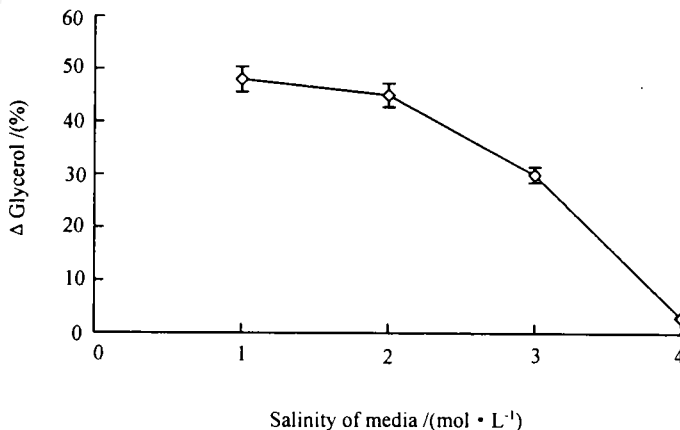


图 1 回转器模拟微重力刺激下盐生杜氏藻甘油含量增值与培养基盐度 (NaCl 浓度) 的关系

Δ 为细胞甘油含量增值与对照藻细胞甘油含量的比

Fig.1 The relationship between the increment of glycerol content in *Dunaliella salina* cells and the salinity of media under clinorotation, Δ Glycerol showing ratio of glycerol increment under clinorotation to the glycerol content of the control

变化较明显: 而盐度高的培养基中, 其微重力刺激对甘油含量变化的影响很小(见图 1)。

由于细胞外部介质盐度不同, 渗透压就不一样, 而渗透压对植物细胞的是通过植物细胞质膜来起作用的^[6], 其方式是通过影响质膜的离子通道, 载体蛋白及脂类组成等。对于盐生杜氏藻来说, 甘油是渗透调节物质, 其含量受盐度(渗透压)影响。细胞质膜感受并传导渗透胁迫, 本实验在模拟微重力刺激下, 低盐度培养基中, 细胞甘油含量增量, 高盐度则增量小, 说明微重力与盐度升高有一定的“等效”作用。由于微重力条件下质膜可能发生变化, 因而离子运输亦可能被改变, 继而影响代谢过程和渗透物质的积累。可见, 质膜在微重力感受方面可能起到重要的作用, 并经“传导”而影响细胞的生命活动。对水稻根的研究表明, 改变周围介质的密变能够影响其根的向重性。Staves 等^[6]在轮藻的研究中也得出结论, 细胞质膜是重力的受体。本实验所得的结果表明, 质膜作为微重力胁迫的感受体是完全有可能的, 但要得出肯定的结论则还需要更直接的证据。

3.2 PM H⁺-ATPase 对盐生杜氏藻微重力效应的调控

Na₃VO₄ 是 PM H⁺-ATPase 的专一性抑制剂。在回转器实验组中加入 Na₃VO₄(终浓度为 20 μmol/L), 结果发现: Na₃VO₄ 能不同程度地抑制微重力对藻细胞 PM H⁺-ATPase 活性、H⁺ 分泌速率及甘油含量变化的影响。而对膜脂-蛋白比率变化的影响则很小(见表 1)。可以看出, 在模拟微重力刺激导致的盐生杜氏藻细胞生物学效应中, 膜脂的变化可能不受 PM H⁺-ATPase 活性影响, 说明它在微重力信号传导系统中可能定位在 PM H⁺-ATPase 之前; 而 H⁺ 分泌及其有关的膜过极化反应和甘油含量变化是受 ATPase 活性调节的。他们在传导系统中可能位于 PM H⁺-ATPase 之后。

表 1 Na₃VO₄(20 μmol/L) 对藻细胞微重力生物学效应的影响

	对照组 (无 Na ₃ VO ₄)	处理组 (有 Na ₃ VO ₄)
质膜 H ⁺ -ATPase(μmol Pi·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)	6.02±0.36	4.01±0.15
H ⁺ 分泌速率 (10 ⁻²⁰ mol·Cell ⁻¹ ·min ⁻¹)	1.28±0.06	0.85±0.04
甘油含量 (pg·Cell ⁻¹)	29.56±1.48	22.31±1.12
质膜磷脂 / 蛋白	1.12±0.06	1.08±0.04

3.3 中性红对 Na₃VO₄ 效应的影响

将经 Na₃VO₄ 处理的藻细胞在回转器上运转数天后, 我们没有发现其藻细胞甘油含量明显增加(见图 3)。我们将藻细胞培养介质中加入中性红使其终浓度达到 5×10⁻⁶ mol/L, 继续在回转器中运转 12h 后, 测定藻细胞甘油含量, 结果发现, 其甘油含量明显地增加(见图 2)。由于中性红能激活 K⁺ 通道而引起膜在光照时过极化(Hyperpolarizing)^[7], 而中性红能逆转 Na₃VO₄ 对盐生杜氏藻微重力效应的影响, 说明微重力的生物学效应与膜的过极化相关。从图 3 可以看出, 尽管对照组也加入中性红处理, 但其甘油含量并没有达到回转器实验组的水平, 说明微重力导致的甘油含量变化过程中还有除膜过极化之外的其它协助因素在起作用。

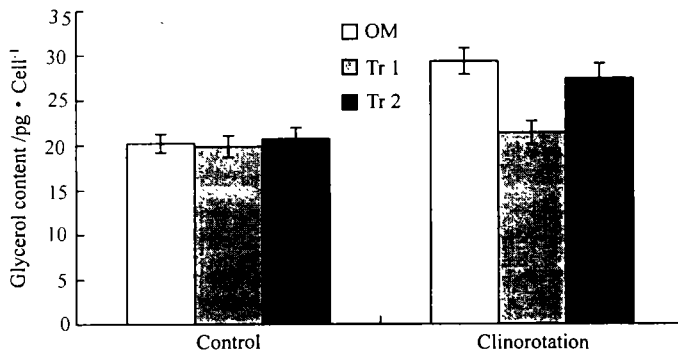


图2 中性红在盐生杜氏藻微重力反应中对 Na_3VO_4 效应的拮抗作用

OM: Original medium, Tr 1: 加 $20\mu\text{mol/L}$ Na_3VO_4 ,

Tr 2: 加 $20\mu\text{mol/L}$ Na_3VO_4 和 $5 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 中性红

Fig.2 The antagonism of neutral red on the effects of vanadate in the microgravitative response of *Dunaliella salina* cells

OM:Original medium; Tr1: with $20\mu\text{mol/L}$ Na_3VO_4 ; Tr 2: with $20\mu\text{mol/L}$ Na_3VO_4 and $5 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ Neutral red

3.4 Ca^{2+} 在盐生杜氏藻细胞微重力生物学效应中的作用

我们使用的盐生杜氏藻培养基中 Ca^{2+} 的浓度是 0.3mmol/L 。改用无 Ca^{2+} 的培养基对藻细胞进行培养,发现在没有钙的培养基中微重力刺激不能导致藻细胞甘油含量的明显增加;而 $1\mu\text{mol/L}$ 的 Ca^{2+} 浓度时,微重力效应便可表现出来,但升高至 $300\mu\text{mol/L}$,微重力效应再不明显升降(见图3)。

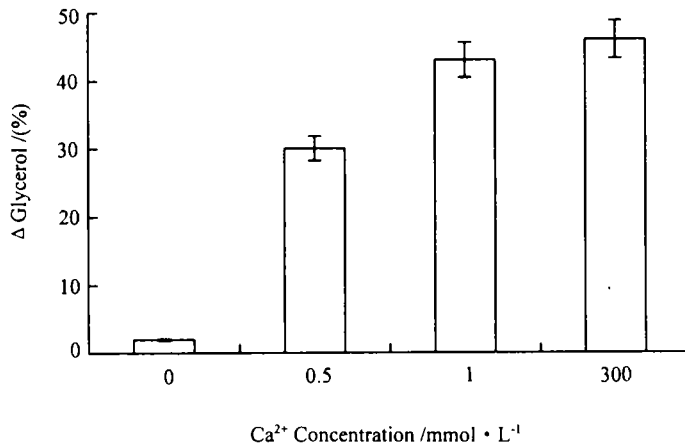


图3 培养基 Ca^{2+} 浓度对盐生杜氏藻微重力效应的影响

Fig.3 Effect of external Ca^{2+} concentration on the changes of glycerol content in *Dunaliella salina* cells under clinorotation

3.5 Ca^{2+} 与钙调蛋白 (CaM) 的复合物对微重力生物学效应的影响

微重力激活反应对 Ca^{2+} 的需求是在激活钙调素的生理浓度范围内. 为了证实 Ca^{2+} -钙调蛋白复合体参与微重力信号传导链的可能性, 将细胞用 Ca^{2+} -钙调蛋白复合物抑制 W-7 处理, 其抑制动力学如图 4. 从图 4 中我们可以看出, 经 W-7 处理后, 盐生杜氏藻细胞甘油含量的升高有明显的滞后作用. 这说明 CaM 有可能是微重力信号传导系统中的组成成份之一. 同时, 我们没有发现 W-7 对微重力胁迫 PM H^+ -ATPase 活性的抑制作用. 这说明 PM H^+ -ATPase 在微重力传导系统中可能位于 Ca^{2+} -钙调蛋白复合物之前.

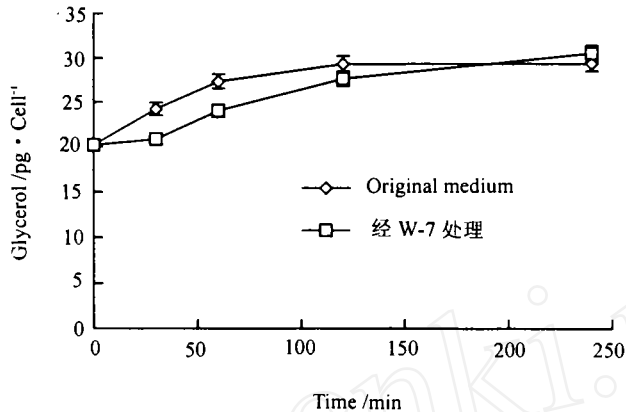


图 4 CaM 抑制剂 W-7 对盐生杜氏藻细胞微重力效应的影响

Fig.4 Effect of W-7 (CaM inhibitor) on the microgravitative response of *Dunaliella salina* cells under clinorotation

3 讨 论

Nemec 等^[8]通过切除术实验鉴定了根的重力感受部位. 他发现, 当去掉包含平衡石的根冠时, 细胞不能对重力产生反应, 这表明根冠是重力感受位点. Haberlandt 等^[8]进行了一个类似的实验, 发现 *Tradescantia virginica* 的茎中感受重力部位是每个细胞的基本部. Sievers^[9]指出植物组织细胞的平衡石 (包括淀粉体和 BaSO_4 晶体) 是最有可能的重力感受体. 然而, 大量的重力感受系统是没有平衡石的^[10], 在这种情况下, 质膜可能起到重力感受体的作用. 有可能存在这样的情况, 质膜是所有生物体共同的重力感受器, 而平衡石则起到一个天线的用来增加细胞对重力反应的灵敏性. Belyavskya^[11]在研究微重力对游离的和与膜结合的 Ca^{2+} 的影响时指出: 从微重力导致 Ca^{2+} 通过质膜流入细胞并引起一系列生命活动变化的情况来看, 微重力感受部位可能在细胞质膜上. 由于盐生杜氏藻没有细胞壁结构, 只是在质膜外包裹着一层薄而富有弹性的外膜, 此膜主要由带负电荷的糖蛋白组成. 我们的实验结果已经表明, 外部介质的渗透压会改变盐生杜氏藻的微重力生物学效应 (见图 1), 而介质渗透压对藻细胞最直接的影响在于细胞质膜, 且盐生杜氏藻没有类似平衡石的结构, 表明细胞膜可能就是微重力感受器. 进一步的研究发现通过微重

力胁迫后, 细胞膜磷脂 - 蛋白比率及 PM H^+ -ATPase 活性均发生了变化^[1], 更说明了这一点.

膜磷脂的组成及含量的变化会导致膜上功能单位 (包括 PM H^+ -ATPase) 的活性变化^[12]. 从本实验测定结果来看, 正钒酸钠对盐生杜氏藻表现出明显的抑制作用, 说明微重力与 PM H^+ -ATPase 活性之间可能有一定的相关性. 虽然我们没有得到从 PM H^+ -ATPase 到膜过极化的直接证据, 但从中性红对 Na_3VO_4 抑制效应的逆转来看, 说明膜的过极化在微重力与甘油含量变化之间起到重要的介导作用.

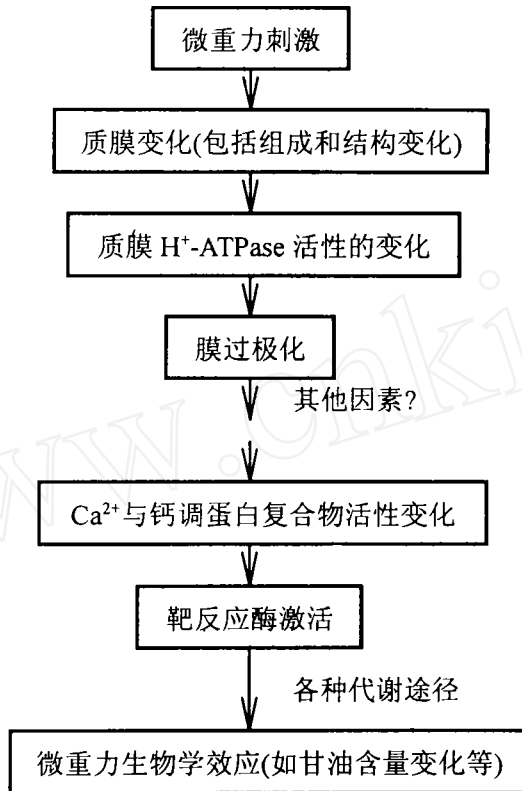


图 5 盐生杜氏藻微重力生物学效应的可能机制

Fig.5 Possible mechanism of microgravitative effects on the cells of *Dunaliella salina*

在植物细胞与环境进行信息交流过程中, Ca^{2+} 起到第二信使的作用. 本实验结果表明, Ca^{2+} 对藻细胞微重力效应来说是必需的, 在无 Ca^{2+} 培养基中, 微重力不产生甘油含量明显增加的效应, 在一定 Ca^{2+} 浓度 ($1 \mu\text{mol/L}$) 下, 这种效应便稳定发生, 在更高的 Ca^{2+} 浓度下 ($300 \mu\text{mol/L}$), 效应强度几乎一致. 证明 Roux 等^[13] 论述 Ca^{2+} 可能对微重力信号在细胞内的传导起作用是有道理的. Kordyum 等^[14], 对生长在 Salyut 6 轨道站的大豆幼苗细胞的研究表明, 微重力下根细胞的 Ca^{2+} 水平是增加的. 同时 Belyavskaya^[11] 等指出, 空间飞行对膜结合 Ca^{2+} 的影响可能是通过膜从外界环境流入 Ca^{2+} 的提高所致.

细胞在对微重力反应时, 质膜上的 Ca^{2+} 通道被激活, 使得 Ca^{2+} 进入植物细胞, 从而引起细胞质中自由钙水平提高, 并通过钙激活的 ATPase 以及 Ca^{2+} - H^{+} 反向通道 (Antipore) 来抑制 Ca^{2+} 的外流. 显然, 介质中 Ca^{2+} 的存在是必要的, 这些与实验的结果一致.

CaM 和 Ca^{2+} 一样作为生物细胞第二信使系统的组成成份已得到大量实验证明. 当藻细胞受到微重力刺激后, 细胞内 Ca^{2+} 浓度增加, 当增加到一定浓度时, Ca^{2+} 与 CaM 形成 Ca-CaM 复合物, 从而激活某些酶类, 引起生理生化的变化^[15]. 在本实验中 W-7 对微重力导致细胞甘油含量上升的抑制与延缓作用证明 Ca^{2+} 及 CaM 也参与了盐生杜氏藻微重力信号的传导.

根据前人研究的基础和本文研究结果, 作者归纳盐生杜氏藻微重力生物学效应的可能机制 (见图 5). 这种机制不应该看作是普遍发生的, 在有平衡石 (BaSO_4 、 CaCO_3)、淀粉粒或其它致密颗粒的细胞中, 情况会不完全一样, 但至少图 5 提供了一个就现有证据理性化的新推论.

参 考 文 献

- [1] 胡章立, 刘永定. 盐生杜氏藻对回转器模拟微重力刺激的反应. 科学通报, 1998, 43(15)
- [2] Ben-Amotz A, Avron M. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. In: Cresswell R C *et al* ed. *Alga and Cyanobacterial Biotechnology*, 1989. 91—114
- [3] Weiss M, Sekler L, Pick U. Characterization of soluble and membrane bound forms of a vanadate-sensitive ATPase from plasma membrane of the halotolerant Alga *D. salina*. *BBA*, 1989, 974:254—260
- [4] 李琳, 焦新之. 应用蛋白染色剂考马斯亮兰 G-250 测定蛋白质的方法. 植物生理学通讯, 1980, 6:152—155
- [5] Folch J, Less M, Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226:497—509
- [6] Staves M P, Wayne R, Leopold A C. Hydrostatics factors affect the gravith-induced polarity of cytoplasmic streaming in *characean algae*. *Plant Physiol.*, 1993, 3—4:78
- [7] Tazawa M, Shimmen T. Demonstration of the K^{+} channel in the plasmalemma of tonoplast-free cells of *Chara australis*. *Plant Cell Physiol.*, 1980, 21:1535—1540
- [8] Haberlandt G. *Physiological Plant Anatomy*. London: Macmillan, 1914. 1—40
- [9] Sievers A, Volkmann D. Gravitropism in single cells. In: Haupt W, Feinleib M E ed. *Physiology of Movements*. Berlin: Springer, 1979. 567—572
- [10] Dennison D S, Shropshire J W. The gravireceptor of phycomyces. Its development following gravity exposure. *J. Gen. Physiol.*, 1984, 84: 845—859
- [11] Belyavskaya N A. Free and membrane-bound calcium in microgravity and microgravity effects at the membrane level. *Adv. Space Res.*, 1996, 17(6/7):169—177
- [12] 胡章立等. 水分胁迫对玉米幼叶生长区细胞质膜 H^{+} -ATPase 活性的影响. 植物生理学报, 1993, 19(2):124—130
- [13] Roux S J. Calcium as a mediator of plants directional growth response to gravity. In: Asaxhima M, Malacinski G M ed. *Fundamental of Space Biology*. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press, 1990. 57—67
- [14] Kordyum E L *et al*. The role of calcium ions in cytological effects of hypogravity. *Adv. Space Res.*, 1984, 4(12):23—26
- [15] Poovaiah B W *et al*. Calcium messenger system in plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 1987, 6:47—103
- [16] David T C, Raymond S B. Lipid modulation of plasma membranebound ATPase. *Physiol. Plant*, 1990, 78:153—159

THE POSSIBLE MECHANISM FOR RESPONSES OF ALGAL CELL *Dunaliella salina* TO SIMULATED MICROGRAVITY

HU Zhangli LIU Yongdiing

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

Abstract

Combining the results from ground based experiments which showed that the simulating microgravity by clinorotation induced changes of metabolic features in *Dunaliella salina* cells with experimental data obtained by employing metabolic activators and inhibitors, it is found that, the plasma membrane should be the most direct sites of graviperception, PM H⁺-ATPase, PM phospholipid/protein, PM electrical potential, Ca²⁺ and calmodulin might play important roles in signal transduction and response. A theoretic model for the microgravisensing, transduction and responses of *Dunaliella salina* cells is proposed.

Key words *Dunaliella salina*, Microgravity, Plasma membrane, Graviperception model