

## 超低温保存后玉兰花粉的氧化应激和细胞凋亡研究

徐瑾<sup>1,2</sup>, 石印<sup>1</sup>, 刘芊<sup>1</sup>, 刘燕<sup>1,\*</sup>, 贾梦雪<sup>1</sup>, 李秉玲<sup>1</sup>

<sup>1</sup>花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室, 国家花卉工程技术研究中心, 城乡生态环境北京实验室, 北京林业大学园林学院, 北京100083; <sup>2</sup>广州大学建筑与城市规划学院, 广州510006

**摘要:** 为了揭示花粉超低温保存的生理机制, 本研究以玉兰花粉作为试验材料, 对花粉超低温保存前后与氧化应激和细胞凋亡相关的指标进行测定。结果显示, 活性氧水平和丙二醛含量在花粉超低温保存前后没有显著变化, 而质膜相对透性在超低温保存后显著提高, 说明脂质过氧化不是造成细胞膜通透性增强的直接原因。超低温保存后过氧化氢酶活性显著升高, 而抗坏血酸含量显著下降, 说明超低温保存引起了玉兰花粉细胞内抗氧化防御系统的显著变化, 细胞通过氧化/抗氧化系统的自我调节取得了新的平衡, 因而使活性氧的水平在保存前后维持了稳定, 并未诱导氧化应激的发生。对磷脂酰丝氨酸的外化水平和DNA片段化程度的测定表明, 超低温保存并未引起细胞凋亡现象的发生。这可能是维持超低温保存后玉兰花粉高生活力的根本原因。

**关键词:** 花粉; 超低温保存; 氧化应激; 细胞凋亡

## Oxidative Stress and/or Apoptosis of *Magnolia denudata* Pollen after Cryopreservation

XU Jin<sup>1,2</sup>, SHI Yin<sup>1</sup>, LIU Qian<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1,\*</sup>, JIA Meng-Xue<sup>1</sup>, LI Bing-Ling<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding, National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; <sup>2</sup>College of Architecture & Urban Planning, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** In order to reveal the physiological mechanism of pollen cryopreservation, pollen of *Magnolia denudata* was chosen and the oxidative stress and apoptosis-related indicators were measured. The results showed that there was no significant difference on reactive oxygen species generation and malonic dialdehyde content, whereas significantly increase was observed on relative conductivity, which indicated that lipid peroxidation was not a direct cause for enhanced membrane permeability. Significant increase on catalase activity and obvious decrease on ascorbic acid content were discovered, which suggested that cryopreservation had caused a significant change in antioxidant defense system of the magnolia pollen cell and a new balance had achieved via self-regulation of oxidant/antioxidants system, resulted in nonsignificant change on reactive oxygen species generation and no oxidative stress occurred. The results on phosphatidylserine externalization and DNA ladder measurements reveal that apoptosis did not exist in magnolia pollen cryopreservation. These may be the reasons why high germination level of pollen was remained after cryopreservation.

**Key words:** pollen; cryopreservation; oxidative stress; apoptosis

超低温保存是指将生物材料保存在-80 ℃以下的低温(通常为液氮-196 ℃)的生物技术(Baust 2002)。由于具有“永久性”保存生物材料的特点, 生物材料经历极端低温后又有正常存活的奇妙现象, 更重要的是由于超低温保存技术在医学、畜牧和动植物相关领域广泛应用后获得的鼓舞人心的成功案例, 使其成为近30年来低温生物学的研究热点之一。

近年来在人类和动物材料超低温保存中的研

究显示, 超低温保存过程中形成的活性氧引起的氧化应激, 可能是除了胞内冰结晶、渗透压冲击和冷冻保护剂的毒性之外造成生物材料超低温保存损伤的另一个主要原因(Baumber 2003; Blesbois等2005; Zribi等2010)。进一步的证据还表明超低温

收稿 2015-01-29 修定 2015-04-28

资助 国家自然科学基金(31370693)。

\* 通讯作者(E-mail: chblyan@163.com; Tel: 010-62336062)。

温保存中出现的氧化应激不仅可以直接造成细胞损伤, 还可能诱导了细胞凋亡(Liu等2008; Li等2010)。

超低温保存是花粉长期保存的适宜方式, 并且已经成功地应用于多种物种的花粉保存(宋尚伟等2007; 张亚利等2007; Akond等2012)。作为少数几种可以无需经过复杂的脱水和冷冻保护剂的参与即可直接投入液氮, 成功实现超低温保存的单细胞材料, 花粉无疑是超低温保存机制研究的理想模板。

本文在课题组前期园林植物超低温保存花粉库建立的基础上(Li等2011; Xu等2014), 选择玉兰花粉作为研究对象, 对其展开细胞生理层面的研究, 探讨超低温保存对玉兰花粉细胞氧化应激和细胞凋亡的影响, 从而研究花粉超低温保存的相关生理机制。

## 材料与方法

### 1 试验材料

花粉于2012年4月盛花期采自露地生长于北京林业大学校园内的玉兰(*Magnolia denudata* Desr.)。

### 2 花粉的采集和处理

于晴朗上午的9:00~11:00, 将当天盛开的花朵带回实验室。用镊子将花药轻轻地剥离花朵, 并尽可能彼此分离地置于硫酸纸上。在(22±2) °C、湿度(20±5)%的环境下放置24 h, 直到花药开裂花粉散出。将含有花药的花粉过筛, 并在解剖镜(Leica, 德国)下用解剖针除去杂质。将纯净的花粉充分混匀后, 按试验所需精确称量, 用铝箔纸分别包裹, 其中新鲜样品直接用于各个指标测定, 其余两个处理的样品装入冻存管中, 液氮保存2 d和1年后取出, 经自来水冲洗5 min化冻, 然后用于各个指标测定。

### 3 花粉生活力的测定

花粉的生活力测定使用悬滴萌发法进行(胡适宜1993)。花粉培养液为5% (W/V)蔗糖+0.01% (W/V)硼酸。25 °C条件下培养4 h。花粉的萌发情况在光学显微镜(Leica, 德国)下确定。花粉管伸长为花粉粒直径的2倍或2倍以上界定为萌发的花粉。花粉萌发率按以下公式计算: 花粉萌发率=视野中萌

发的花粉粒数/视野中总共的花粉粒数×100%。

### 4 花粉生理指标的测定

花粉活性氧的测定使用DCFH-DA (2',7'-二氯荧光素二乙酸酯)作为荧光染料, 按照的LeBel等(1992)的方法, 在FACSCalibur流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国)上进行。花粉细胞质膜相对透性的测定参照《植物生理学实验指导》(陈建勋和王晓峰2002), 在电导率仪(上海雷磁)上进行。花粉丙二醛含量的测定按照《植物生理生化实验原理和技术》(李合生2000), 在紫外分光光度计(Thermo, 美国)上进行。花粉过氧化氢酶活性的测定按照《植物生理生化实验原理和技术》(李合生2000), 采用高锰酸钾滴定法进行。花粉抗坏血酸含量的测定参照《植物生理学实验指导》(陈建勋和王晓峰2002), 在紫外分光光度计(Thermo, 美国)上进行。试验中所用各个试剂均按大体积配置, 并选用同一生产商的同一批次药品进行, 以避免由药品本身、试剂制备过程等带来的试验误差。

磷脂酰丝氨酸的外化检测使用南京碧云天公司的Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒进行; DNA片段化检测使用南京碧云天公司的细胞凋亡-DNA Ladder抽提试剂盒进行。

### 5 数据的处理与分析

数据使用Excel进行整理, 部分百分数数据经反正弦转化后, 采用SPSS 18.0软件进行统计学分析。

## 实验结果

### 1 超低温保存对花粉生活力和与氧化应激相关指标的影响

花粉生活力和与氧化应激相关的指标测定结果如表1所示。新鲜花粉和保存2 d的花粉生活力比保存1年的略高, 但差异不显著。活性氧水平三者差异也不显著, 并且花粉的活性氧水平随保存时间略有下降趋势。尽管超低温保存2 d的花粉相对电导率与新鲜花粉差异不显著, 但保存1年后电导率显著上升( $P<0.05$ ), 从(42.3±0.6)%上升到了(56.1±2.8)%, 说明保存1年后细胞内部分电解质发生外渗, 细胞膜受到了一定程度的破坏。花粉在超低温保存前后丙二醛含量没有显著变化, 说明超低温保存并未造成花粉细胞质膜脂质过氧化程

度的变化,从而排除细胞膜破坏是由脂质过氧化造成的可能性。对细胞内两种主要抗氧化剂的测定结果表明,花粉过氧化氢酶活性随着超低温保存时间的延长有明显的升高趋势,保存2 d和保存1年的花粉与新鲜花粉差异显著( $P<0.05$ );而花粉抗坏血酸含量随着超低温保存时间的延长有明显的降低趋势,其中保存1年的花粉与新鲜花粉差异显著( $P<0.05$ ),暗示超低温保存对花粉细胞内的抗氧化系统存在显著影响。

## 2 超低温保存对花粉与细胞凋亡相关指标的影响

磷脂酰丝氨酸的外化和DNA片段化分别是细胞凋亡早期和晚期的重要指标。如图1所示,新鲜花粉和保存2 d、保存1年的花粉差异不显著,说明超低温保存并未造成花粉细胞磷脂酰丝氨酸的外化。从图2可得,新鲜花粉和保存2 d、保存1年的花粉均没有典型的DNA ladder产生,且彼此间差异不显著,说明超低温保存并未造成花粉细胞DNA链的断裂。

表1 超低温保存对花粉生活力和与氧化应激相关指标的影响

Table 1 Effect of cryopreservation on pollen viability and indicators related to oxidative stress

处理	花粉萌发率/%	活性氧水平	细胞质膜相对透性/%	丙二醛含量/ nmol·g <sup>-1</sup>	过氧化氢酶活性/ mg·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>	抗坏血酸含量/ μmol·g <sup>-1</sup>
新鲜	50.6±4.4 <sup>a</sup>	26.5±2.2 <sup>a</sup>	42.3±0.6 <sup>b</sup>	32.3±2.8 <sup>a</sup>	33.8±0.3 <sup>c</sup>	26.3±0.1 <sup>a</sup>
液氮保存2 d	50.1±2.7 <sup>a</sup>	25.4±2.7 <sup>a</sup>	45.8±1.9 <sup>b</sup>	30.2±2.6 <sup>a</sup>	39.2±0.2 <sup>b</sup>	24.6±1.0 <sup>a</sup>
液氮保存1年	47.5±3.5 <sup>a</sup>	22.5±0.8 <sup>a</sup>	56.1±2.8 <sup>a</sup>	32.3±2.2 <sup>a</sup>	42.3±1.2 <sup>a</sup>	20.6±0.1 <sup>b</sup>

表中数据表示为3个重复的平均值±标准误。经Duncan新复极差测验,同一列中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

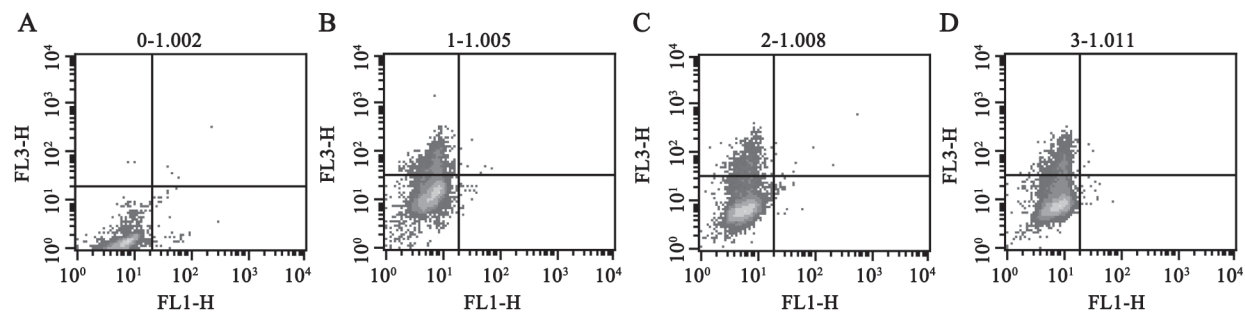


图1 超低温保存后花粉细胞磷脂酰丝氨酸的外化的流式细胞仪检测

Fig.1 Flow cytometry study of phosphatidylserine externalization in pollen after cryopreservation

a: 未染色花粉; b: 新鲜花粉; c: 保存2 d的花粉; d: 保存1年花粉。

## 讨 论

### 1 超低温保存对花粉细胞质膜的影响

超低温保存会造成细胞膜的大范围破坏,因此往往将细胞膜的完整性作为成功的超低温保存的最低标准(Tchir和Acker 2010)。本研究对细胞质膜相对透性的测定结果表明,超低温保存2 d后,花粉的相对电导率尽管略有上升,却未到达显著水平,而保存1年后花粉的相对电导率显著上升。这与课题组前期在芍药多个品种花粉超低温保存不同时间测定的细胞膜通透性变化趋势基本一致(尚晓倩2005),说明随着超低温保存时间的延长,细胞

膜损伤的程度在逐渐加深。

在众多超低温保存造成细胞膜损伤的因素中,细胞内冰晶的形成被认为是其中的主要原因(Motta等2010)。研究还表明,任何显著数量的细胞内冰晶的形成都是致命的(Pegg 2010)。本研究中,无论是在超低温保存的2 d后或是1年后,花粉的萌发率与新鲜花粉并不存在显著差异,说明细胞膜通透性的增强,并未对细胞造成致命的伤害,这也在一定程度上排除了玉兰花粉细胞膜的损伤是由细胞内冰晶的形成所造成的。

活性氧的过量产生所引起的脂质过氧化,同样也可以改变细胞膜的通透性和流动性,造成细

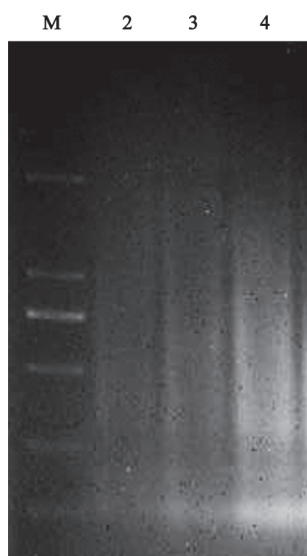


图2 超低温保存后花粉DNA片段化检测

Fig.2 DNA ladder test of apoptosis in pollen after cryopreservation

M: DNA 2000 marker; 2: 新鲜花粉; 3: 保存2 d的花粉; 4: 保存1年花粉。

胞膜的损伤(Sicherle等2011)。丙二醛作为脂质过氧化的产物,其含量经常被用来作为判断超低温保存细胞脂质过氧化程度的指标(Roca等2005; Uchendu 2009; 邵丽2011)。本研究对活性氧水平和丙二醛含量的测定表明,超低温保存对花粉细胞的活性氧生成量和质膜的脂质过氧化水平并没有产生显著影响,这在一定程度上说明,脂质过氧化同样不是造成细胞膜通透性增强的直接原因。

研究表明,除以上两大因素之外,在冻融过程中发生的质膜相变同样可能导致细胞膜渗透性的增加和特定的磷脂、胆固醇或蛋白质的彼此分离,从而造成细胞膜的损伤(Stoll和Wolkers 2011)。但本研究中玉兰花粉细胞超低温保存1年后细胞质膜相对透性的显著增强是否是由质膜相变造成的还有待进一步的研究证实。此外,课题组在玉兰花粉超低温保存的最新蛋白质组学研究的结果还表明,超低温保存过程中存在蛋白质尤其是酶类的激活或抑制变化,其中获得有效鉴定的催化细胞内脂肪酸合成的烯酰(基) ACP还原酶在超低温保存中就处于下调表达(徐瑾2014),而脂肪酸合成的缺乏可能会导致细胞膜因缺乏原料而无法修复由超低温保存冻融过程所造成的损伤,从而在生

理上表现为细胞膜通透性的增强。

## 2 超低温保存对花粉细胞氧化/抗氧化系统的影响

在众多的活性氧中,过氧化氢被认为是毒性最强的种类,因为它可以自由穿越细胞膜,抑制酶的活性和细胞的功能,从而降低抗氧化系统的防御能力(Michael等2007)。过氧化氢酶和抗坏血酸-谷胱甘肽循环在对过氧化氢的清除中发挥着重要作用(Dat等2000)。本研究也主要测定了过氧化氢酶的活性和抗坏血酸的含量,结果表明,花粉细胞内的过氧化氢酶活性随着超低温保存时间的延长有明显的升高趋势,而花粉细胞的抗坏血酸含量随着超低温保存时间的延长有明显的降低趋势,这看似相悖的两个结果可能与过氧化氢酶和抗坏血酸清除过氧化氢的特性相关。研究表明,抗坏血酸几乎存在于所有的细胞区室内,对过氧化氢的亲性和高,因此负责清除具体位置的少量过氧化氢;而过氧化氢酶只存在于过氧化物酶体中,尽管对过氧化氢的亲力较低,却具有很高的反应速率,在应激状态下大量的活性氧产生时,负责清除大量的过氧化氢(Dat等2000; Ahmad等2008)。因此本研究认为抗坏血酸含量的减少正是由于其作为底物与活性氧反应的结果,而活性增强的过氧化氢酶同样是为了更有效地催化过氧化氢的分解反应,从而平衡因超低温保存增加的活性氧含量。这可能是超低温保存前后活性氧水平没有发生显著变化的直接原因,并且与玉兰花粉生活力在超低温保存前后没有显著变化相关。

## 3 超低温保存对花粉细胞凋亡的影响

细胞凋亡是一个普遍发生的、受到严格监管的生理性细胞死亡过程(Martin等2007)。近年来的研究表明它可能是造成超低温保存后猪肝细胞(Matsushita等2003)、牛精子(Martin等2004)和人类半月板(Villalba等2012)等生物材料功能降低或丧失的直接原因。本研究为了探讨玉兰花粉超低温保存是否同样存在细胞凋亡,选择了磷脂酰丝氨酸的外化和DNA的片段化这两个指标来对比超低温保存前后的花粉。其中磷脂酰丝氨酸是细胞膜内层磷脂上的一种组成成分,在早期凋亡的细胞中会发生转位而暴露于细胞膜的外侧(Kadirvel等2012)。DNA的片段化是细胞凋亡的最终结果之一(Baust 2002)。本研究的结果表明,玉兰花粉超

低温保存前后这两个指标均没有发生显著变化,说明玉兰花粉的超低温保存中并不存在细胞凋亡。鉴于细胞凋亡往往是由活性氧诱导的,如活性氧可以作为上游信号触发p53基因的激活,或者作为p53的下游因子介导细胞凋亡(Liu等2008),因此本研究的结果表明正是由于细胞内的氧化/抗氧化系统通过自我调节取得了新的平衡,没有发生氧化应激,从而及时遏制了高水平活性氧的危害,避免了细胞凋亡现象的产生。这可能也是玉兰花粉在超低温保存前后生活力没有受到显著影响的直接原因。

综上所述,超低温保存引起了玉兰花粉细胞内抗氧化防御系统的显著变化,细胞通过氧化/抗氧化系统的自我调节取得了新的平衡,因而并未引起氧化应激和细胞凋亡等生理现象的发生,从而有效维持了超低温保存后玉兰花粉的高生活力。

### 参考文献

- 陈建勋, 王晓峰(2002). 植物生理学实验指导. 广州: 华南理工大学出版社, 64-65, 75-76
- 胡适宜(1993). 植物胚胎学实验方法(一)花粉生活力的测定. 植物学通报, 10 (2): 60-62
- 李合生(2000). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 165, 260
- 尚晓倩(2005). 芍药花粉超低温保存研究[学位论文]. 北京: 北京林业大学
- 邵丽(2011). 留兰香种质材料的超低温保存及遗传变异分析[学位论文]. 开封: 河南大学
- 宋尚伟, 闫锋, 蔡艳婷, 苗红霞(2007). 桃品种‘八月香’花粉的超低温保存. 植物生理学通讯, 43 (1): 181-183
- 徐瑾(2014). 玉兰花粉超低温保存机制研究[学位论文]. 北京: 北京林业大学
- 张亚利, 陈瑞丹, 张波, 刘燕(2007). 超低温保存的梅花花药萌发率和授粉后的结实能力. 植物生理学通讯, 43 (3): 457-460
- Ahmad P, Sarwat M, Sharma S (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *J Plant Biol*, 51 (3): 167-173
- Akond A, Pounders CT, Blythe EK, Wang X (2012). Longevity of crapemyrtle pollen stored at different temperatures. *Sci Hortic-Amsterdam*, 139: 53-57
- Baumber J (2003). Reactive oxygen species and equine sperm function [dissertation]. Davis: University of California
- Baust JM (2002). Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. *Cell Preserv Technol*, 1 (1): 17-31
- Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F (2005). Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 129: 371-378
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci*, 57 (5): 779-795
- Kadirvel G, Periasamy S, Kumar S (2012). Effect of cryopreservation on apoptotic-like events and its relationship with cryocapacitation of buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm. *Reprod Domest Anim*, 47 (1): 143-150
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*, 5 (2): 227-231
- Li BL, Zhang YL, Wang H, Song C, Liu Y (2011). 80. Pollen cryobank establishment and application of traditional Chinese flowers. *Cryobiology*, 63 (3): 328
- Li Z, Lin Q, Liu R, Xiao W, Liu W (2010). Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. *J Androl*, 31: 437-444
- Liu B, Chen Y, St Clair DK (2008). ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radical Bio Med*, 44 (8): 1529-1535
- Martin G, Cagnon N, Sabido O, Sion B, Grizard G, Durand P, Levy R (2007). Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Hum Reprod*, 22 (2): 380-388
- Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R (2004). Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod*, 71 (1): 28-37
- Matsushita T, Yagi T, Hardin JA, Cragun JD, Crow FW, Bergen HR, Gores GJ, Nyberg SL (2003). Apoptotic cell death and function of cryopreserved porcine hepatocytes in a bioartificial liver. *Cell Transplant*, 12 (2): 109-121
- Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Saratsis P, Boscos C (2007). Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 68 (2): 204-212
- Motta JP, Gomes BE, Bouzas LF, Paraguassu-Braga FH, Porto LC (2010). Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology*, 60 (3): 301-307
- Pegg DE (2010). The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*, 60 (3 Suppl): 36-44
- Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA (2005). Survival and *in vitro* fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J Androl*, 26 (1): 15-24
- Sicherle CC, Maia MS, Bicudo SD, Rodello L, Azevedo HC (2011). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or trolox. *Small Ruminant Res*, 95 (2): 144-149
- Stoll C, Wolkers WF (2011). Membrane stability during biopreservation of blood cells. *Transfus Med Hemoth*, 38 (2): 89-97
- Tchir J, Acker JP (2010). Mitochondria and membrane cryoinjury in micropatterned cells: effects of cell-cell interactions. *Cryobiology*, 61 (1): 100-107
- Uchendu EE (2009). Cryopreservation of shoot tips: antioxidant investigations with *Rubus* and protocols for *Mentha* and *Vaccinium* [dissertation]. Corvallis: Oregon State University
- Villalba R, Pena J, Navarro P, Luque E, Jimena I, Romero A, Gomez VJ (2012). Cryopreservation increases apoptosis in human menisci. *Knee Surg Sport Tr A*, 20 (2): 298-303
- Xu J, Li BL, Liu Q, Shi Y, Peng JG, Jia MX, Liu Y (2014). Wide-scale pollen banking of ornamental plants through cryopreservation. *Cryoletter*, 35 (4): 312-319
- Zribi N, Chakroun NF, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Keskes LA (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril*, 93 (1): 159-166