

过氧化氢诱导酿酒酵母细胞膜透性和组成的变化

孙廷丽^{1,2,3}, 施庆珊², 欧阳友生², 陈仪本²

1 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301

2 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070

3 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 以下简述了过氧化氢(H₂O₂)作为一种信号分子诱导并调节酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞膜的变化。H₂O₂是一种强氧化剂, 可以跨膜扩散进入细胞中, 形成跨膜梯度; 当外源 H₂O₂ 达到亚致死剂量时, 酿酒酵母的细胞膜透性和流动性降低, 产生跨膜梯度, 从而限制 H₂O₂ 向细胞内的扩散速率, 保护细胞免受氧化胁迫的伤害。研究表明, 由 H₂O₂ 引起的膜透性和流动性的变化与膜的组成有关: 当酵母细胞对 H₂O₂ 产生适应时, 与膜组成和微区域变化有关的几个基因的表达发生了改变。膜组成的变化和微区域的调整还可能与 H₂O₂ 依赖的信号途径有关, 即以 H₂O₂ 为信号分子, 调节膜的变化并赋予细胞对氧化压力更高的适应性, 但这种信号分子的具体传递途径及机制还需要进一步研究。

关键词: 过氧化氢, 酿酒酵母, 膜透性, 膜流动性, 膜组成, 适应性

H₂O₂ induces changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*

Tingli Sun^{1,2,3}, Qingshan Shi², Yousheng Ouyang², and Yiben Chen²

1 South China Sea Institute of Oceanology, Guangzhou 510301, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

3 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: This article reviews the recent studies on H₂O₂ adaptation of *Saccharomyces cerevisiae*. When the cell exposed in the H₂O₂ sub-lethal doses, the plasma membrane permeability decreased, meanwhile the plasma membrane fluidity is diminished. These changes resulted in a gradient across the plasma membrane, which conferring a higher resistance to oxidative stress. Recent work has also shown that the yeast cells adapted to H₂O₂ would lead to several changes in the expression of genes coding the key enzymes involved in the biosynthesis of lipid profile and in the organization of lipid microdomains of the plasma membrane, which finally decreased its permeability and fluidity. The reorganization of the plasma membrane might be the major mechanism of the H₂O₂ adaptation. Once the yeast cells adapted to the external H₂O₂, changes in plasma occurred. The H₂O₂ dependent signaling pathways in the plasma membrane might be activated by high levels of H₂O₂. But the details of the signaling events should still be further studies.

Keywords: hydrogen peroxide (H₂O₂), *Saccharomyces cerevisiae*, plasma membrane permeability, plasma membrane fluidity, plasma membrane composition, adaptation

Received: September 14, 2009; **Accepted:** November 11, 2009

Supported by: Science and Technology Planning Project of Guangdong Province. (No. 2009A010700005).

Corresponding author: Yousheng Ouyang. Tel: +86-20-87685717; Fax: +86-20-87685717; E-mail: ouyang6411@21cn.com

广东省科技计划项目(No. 2009A010700005)资助。

过氧化氢(H_2O_2)是一种强氧化剂,外源添加 H_2O_2 可以直接作用于蛋白质,或者跨过细胞膜后进一步与金属离子反应产生自由基,对胞内的蛋白质甚至DNA产生伤害^[1-3]。因此,限制外源 H_2O_2 向胞内的扩散是微生物细胞对自身的一种保护,可以有效降低 H_2O_2 对微生物的氧化损伤。细胞膜作为细胞的第一层屏障,可以有效地阻止有害的氧自由基等进入胞内,从而增加细胞对 H_2O_2 的适应性,提高微生物的存活率。

对酿酒酵母的研究发现^[4-5],当细胞暴露于亚致死剂量的外源 H_2O_2 中时,细胞膜的流动性和膜上的脂质成分发生变化,通过降低细胞膜对 H_2O_2 的透性来控制进入细胞内的 H_2O_2 含量,使细胞对 H_2O_2 胁迫产生适应,从而保护细胞免受氧化胁迫伤害。

研究微生物对 H_2O_2 的适应性及其细胞膜产生的透性、流动性和膜组成的变化,对于保护微生物免受氧化压力的伤害和研究微生物如何在氧化应激中生存具有重要的意义。

1 H_2O_2 诱导酿酒酵母细胞膜的透性和流动性变化

1.1 H_2O_2 诱导膜透性的变化

H_2O_2 作为一种高度扩散性的分子,很容易跨过膜,但近年来的研究表明 H_2O_2 向细胞内的扩散是受限的。目前已经在酿酒酵母^[4]、Jurkat T-cells^[6]、大肠杆菌 *Escherichia coli*^[7]等中观察到了 H_2O_2 跨膜梯度。当酿酒酵母暴露于外源 H_2O_2 中时,细胞膜随着 H_2O_2 适应性反应迅速发生变化, H_2O_2 在细胞膜内外两侧产生跨膜梯度。梯度越大,细胞对于 H_2O_2 的适应性越强。根据动力学研究和酶潜伏期的概念(过氧化氢酶的活性在密闭环境下比在开放环境中要低),可以得出公式(1)^[5]:

$$\frac{[H_2O_2]_{in}}{[H_2O_2]_{out}} = \frac{k_{perm}}{k_{perm} + k_{catabolism}} = R = \frac{k_{intact\ cell}}{k_{catabolism}} \quad (1)$$

其中 k_{perm} 是指 H_2O_2 渗透入细胞的一级速率常数, $k_{catabolism}$ 指细胞内分解过氧化氢的一级速率常数, R 指完整细胞和原生质体中总 H_2O_2 的消耗速率常数之比。因此,跨膜梯度可以通过实验中测量 R 值确

定,同时 k_{perm} 可以基于 R 和 $k_{catabolism}$ 确定。

分析上述公式,当 k_{perm} 远大于 $k_{catabolism}$ 时, $[H_2O_2]_{in} = [H_2O_2]_{out}$, 即不存在梯度;当 k_{perm} 发生变化时, H_2O_2 的梯度就形成了;当 $k_{catabolism}$ 增加时,梯度增加。所以当使用 H_2O_2 诱导细胞时,过氧化氢酶的活性增加,细胞的跨膜梯度变大。梯度大小的判断可以根据实验中测量到的 R 值来分析。由于细胞中存在多种抗氧化酶类,而只有过氧化氢酶的活性才能测到精确的值,因此公式(1)可以简化为(2)^[4]:

$$\frac{[H_2O_2]_{in}}{[H_2O_2]_{out}} = \frac{k_{perm}}{k_{perm} + k_{catalase}} = R_{catalase} \quad (2)$$

由于 $k_{catalase} < k_{catabolism}$, 因此,测得的梯度比实际的梯度要小。但是过氧化氢酶是一种典型的 H_2O_2 清除酶,采用 $k_{catalase}$ 测得的梯度值也就很有代表性。

如果膜的透性屏障与保护细胞免受 H_2O_2 的伤害有关,则当细胞处于外源 H_2O_2 中时,膜的透性应该是降低的。Branco等^[4]通过比较使用150 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理60 min的酿酒酵母细胞和未处理的对照样品的跨膜梯度和透性系数,发现在 H_2O_2 适应的细胞中的 $R_{catalase}$ 和 k_{perm} 值(分别为 0.34 ± 0.06 , 0.049 ± 0.012 , $P < 0.05$)都比对照细胞(分别为 0.64 ± 0.09 , 0.083 ± 0.028 , $P < 0.05$)中低。

因此,在酿酒酵母对 H_2O_2 产生适应时,抗氧化酶活性增加,同时细胞膜的透性降低。不仅用 H_2O_2 处理能使细胞膜的透性下降,其他可以通过诱导产生 H_2O_2 适应性的物质如环己胺^[5]、亚油酸过氧化氢(LoaOOH)^[8],也可以引起细胞膜透性的降低。

1.2 H_2O_2 诱导膜的流动性变化

目前,荧光偏振因其灵敏、便捷、可重复性好等优点已成为研究细胞膜结构和膜脂质的动力学的最常用的技术和方法。荧光各向异性(Fluorescence anisotropy)是一个与荧光偏振有关的物理量,它描述荧光分子对时间平均的旋转运动,从而反映生物大分子的形状、大小以及分子在溶液中的转动角度和时间之间的函数关系;通过细胞膜上荧光各向异性的变化,分析膜上各分子间的作用模式、结合和解聚程度,可得到膜平均流动性变化的关系^[9]。

当链活动性大时,荧光探针从吸收到发射这段时间内随类脂分子的活动而有不同程度的倾斜,

从而使发射的荧光偏振度减小, 各向异性减小, 膜流动性增加, 二者成反比关系^[10]。Folmer 等^[11]通过纳入细胞中的荧光探针 DPH、2-AS 和 TMA-DPH 的稳态荧光各向异性的变化研究了膜的生物物理特性变化, 特别是流动性的变化。用亚致死剂量的 H_2O_2 处理酿酒酵母, 可以发现膜的透性降低、流动性降低、渗透系数稳定, 同时伴随着 DPH、2-AS 的荧光各向异性增加。

根据 H_2O_2 消耗的动力学, 计算膜的梯度发现, 细胞膜的变化发生在对 H_2O_2 适应的早期, 此时膜透性和膜流动性降低, 从而形成陡峭的跨膜梯度, 保护细胞免受氧化压力的伤害。

膜透性的降低不只是与膜的流动性有关, 还可能与跨膜蛋白的转运作用有关。现已发现, 在植物中运输甘油和水等小分子物质的水通道蛋白介导了 H_2O_2 的跨膜运输^[12]。而在酿酒酵母中, 加入通道蛋白抑制剂氯化汞时, 野生型菌株和突变株 *fps1Δ*、*yfl054cΔ*(水通道蛋白功能丧失)的膜透性相似, 但膜的荧光各向异性却增加, 表明 H_2O_2 的膜透性与通道蛋白无关, 而与流动性的变化密切相关^[11]。

在外源 H_2O_2 存在时, 酿酒酵母的细胞膜会迅速对 H_2O_2 作出反应, 从而保护细胞免受氧化压力的伤害。但是这种适应性的变化机制却并不十分清楚。初步的研究结果表明, 对 H_2O_2 产生适应性时, 除膜的透性和流动性发生了变化外, 膜的组成也产生了变化。

2 H_2O_2 诱导酿酒酵母细胞膜的组成变化

众所周知, 膜透性和流动性的变化, 本质上是由膜的脂质组成变化引起的。存在 H_2O_2 时, 膜的各种脂肪酸的长度、饱和度、不同脂肪酸的比例及固醇类的脂质等的组成变化, 都可以导致膜的物理性质的变化。

2.1 麦角甾醇在膜上的组成和位置的变化

麦角甾醇被认为是酿酒酵母的膜对 H_2O_2 产生适应的一种影响因素。敲除一个麦角甾醇途径的基因(ERG3 或 ERG6), 可使得膜对 H_2O_2 的渗透性增加, 细胞对 H_2O_2 更加敏感^[4]。当用亚致死剂量的

H_2O_2 处理酿酒酵母时, 同样可以观察到与麦角甾醇合成途径有关的 ERG1、ERG3、ERG7 和 ERG25 的 mRNAs 水平迅速降低^[13]。同样的证据在裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 中也有发现, 当环境中存在 H_2O_2 时, F-box 族蛋白 pof14 会通过直接调节麦角甾醇合成途径中的关键酶 Erg9(鲨烯合成酶)来抑制麦角甾醇合成, 提高细胞在氧化胁迫中的生存能力^[14]。

早期的假设是麦角甾醇含量的变化引起了膜透性的变化, 但 Pedroso 等^[13]通过研究 H_2O_2 适应时酿酒酵母细胞膜上脂质组成和微区域的变化发现, 当细胞对 H_2O_2 产生适应时, 麦角甾醇的含量并没有变化, 而膜上麦角甾醇的前体鲨烯的水平却急剧增加。鲨烯是麦角甾醇合成途径的前体物质, 也是一种高度疏水性分子, 分布在膜脂质双层的平面上, 从而降低膜的透性^[15]。膜上鲨烯的水平增加时, 膜对 H_2O_2 的透性也降低。当在鲨烯的上游阻断麦角甾醇合成途径时, 细胞对 H_2O_2 更加敏感。

麦角甾醇在质膜上的分布是不均匀的, 可以随条件改变而变化, 并能与含有长链酰基的神经鞘脂类一起形成脂质筏(Lipid rafts)。使用荧光抗生素菲律宾菌素^[16]对质膜染色和 t-PnA 探针 (Trans-parinaric-acid)^[17]检测膜上的有序区域, 可以看到细胞中的甾醇发生了重新分配, 富含麦角甾醇的区域增加, 膜的有序性增加。通过这种脂质筏的调节, 可以部分或者全部地降低膜透性。极长链脂肪酸(VLCFA)^[18]也是通过调节脂质筏来起作用的: 当 VLCFA 增加时, 膜的透性是降低的。

2.2 膜上脂质组分(Lipid composition)的变化

当酿酒酵母对外源 H_2O_2 产生适应时, 还可以观察到膜上其他脂质成分组成和相对比率的变化^[13], 这些变化主要有: 1)油酸(Oleic acid)水平下降, 不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸之间比率(UFA/SFA)的降低; 2)卵磷脂(Phosphatidylcholine)和磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine)的比率(PC/PE)增加; 3)极长链脂肪酸(VLCFA)增加, C26:0 水平增加同时 2-羟-C26:0 和 C20:0 水平的降低。组成膜的各种脂质的成分和各成分的数量, 各个成分之间的比例, 都

会对膜的流动性产生影响,进而改变膜的透性^[19]。

长链脂肪酸含量降低和不饱和度的降低可以引起膜的流动性和透性降低。酿酒酵母的细胞膜中,油酸(C18:1)、9-十六碳烯酸(C16:1)和棕榈酸(C16:0)是主要的长链脂肪酸的组成成分。当长链脂肪酸(油酸)水平降低时,膜的流动性和透性也会相应的降低,从而保护细胞。这种在 H₂O₂ 诱导中产生的长链脂肪酸水平和不饱和度的变化在肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae*^[20]和大肠杆菌^[21]中也有相似的表现。当肺炎链球菌处于无氧环境中时,由于 H₂O₂ 的产生减少,顺式十八碳烯酸增加,不饱和度系数和 C18:C16 比率增加。

PC/PE 的比例同样对膜的透性变化有影响。PC 整体呈圆柱形并倾向于形成脂质双层结构,这使得它非常适合维持膜的稳定性和完整性。相反,PE 被称为二型脂类,它的极性头部的横截面积较小,总体呈圆锥形,比较倾向于形成扭曲的非层状结构,如 H_{II} phase(倒六角形)。PE 是 PC 合成途径的前体,过多或过少都对细胞的生长有影响。降低 PE 的含量对细胞有害甚至致死,而过多的 PE 则削弱膜的屏障作用^[22]。由于双层脂类和非双层脂类具有不同的内在曲率半径(PC > PE),它们相对比例的改变会改变膜的内在曲率,从而对膜的性质特别是渗透性产生影响^[23]。PC/PE 增加,透性降低^[13]。

VLCFA^[18]在酵母中作为神经鞘脂类的神经酰胺骨架大量存在,也是在酵母质膜中形成脂质筏所必须的组成部分。因此,VLCFA 可以同麦角甾醇一起,改变膜部分或者整体的透性和有序性从而改变膜的透性。

与膜上的脂质组成变化相一致的是,细胞中与膜脂质组成有关的基因也发生了变化。下调脂肪酸合酶(FAS)的基因表达水平,酿酒酵母对 H₂O₂ 的适应性增加^[18];当细胞处于亚致死剂量的 H₂O₂ 中时,DNA 微阵列分析和 Northern blotting 分析都可发现,与脂肪酸的合成(FAS1, FAS3)、延伸(ELO1, FEN1, SUR4)、不饱和(OLE1)和磷脂合成(LAC1, LIP1, GPT2)有关的基因表达降低了^[13]。这些基因表达水平的变化,直接影响了酿酒酵母的脂肪酸合酶的表达,而脂肪酸合酶则控制膜上脂肪酸的合成发

生变化,从而改变膜对 H₂O₂ 的透性。

3 结语

细胞膜处于一种高度动态的过程中,它可以随时调节膜上脂质的组成和流动性来行使各项功能,例如向细胞内转运物质,作为信号分子作用靶点等。对酿酒酵母的研究表明,H₂O₂ 可以通过调节麦角甾醇合成途径和脂肪酸合酶等有关的基因表达来调节细胞膜的脂质组成、流动性和对 H₂O₂ 的透性变化,从而赋予微生物细胞更高的抗氧化能力,提高微生物对 H₂O₂ 等的适应性。所以,H₂O₂ 分子也可以被认为是一种对细胞有益的信号分子。不仅是 H₂O₂,其他活性氧物质(ROS)也可以诱导膜的变化,但是具体的诱导机制却各有不同,目前并不十分清楚。因此,研究 ROS 这类信号分子如何在微生物的细胞中起作用,将是一个很好的切入点。

由于 H₂O₂ 本身和由其产生的活性氧会对微生物产生伤害,因此,H₂O₂ 也作为一种杀菌剂,特别是杀孢子的物质被广泛应用于环境、医疗等方面^[24-25]。本实验室汪保卫等^[26]认为细菌的抗氧化系统 oxyR 调节子可能与微生物的耐药性产生有关,因此,研究微生物的膜对 H₂O₂ 的适应,有助于了解微生物对 H₂O₂ 的杀灭作用的耐受性,从而为研究微生物的耐受机制提供一种新的思路。

REFERENCES

- [1] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem*, 1995, **64**: 97-112.
- [2] Zastawny TH, Altman SA, Randers-Eichhorn L, et al. DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions. *Free Radic Biol Med*, 1995, **18**: 1013-1022.
- [3] Li SL, Jiao P, Cao ZA. Effects of H₂O₂ addition on oxygen supply and metabolism of microorganisms. *Acta Microbiol Sin*, 2002, **42**(1): 129-132.
李书良, 焦鹏, 曹竹安. 流加 H₂O₂ 对提高供氧及微生物代谢的影响. *微生物学报*, 2002, **42**(1): 129-132.
- [4] Branco MR, Marinho HS, Cyrne L, et al. Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2004, **279**(8): 6501-6506.
- [5] Sousa-Lopes A, Antunes F, Cyrne L. Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae*

- cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Lett*, 2004, **578**: 152–156.
- [6] Antunes F, Cadenas E. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett*, 2000, **475**: 121–126.
- [7] Seaver LC, Imlay JA. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 7182–7189.
- [8] Evans MV, Turton HE, Grant CM, *et al.* Toxicity of linoleic acid hydroperoxide to *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of a respiration-related process for maximal sensitivity and adaptive response. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 483–490.
- [9] Shinitzky M, Barenholz Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim Biophys Acta*, 1978, **515**: 367–394.
- [10] Wang SS, Li L, Li B. Effect of magnetic field on microscopic structure and cell membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J South China Univ Technol (Nat Sci Edi)*, 2008, **36**(4): 138–143.
王山杉, 李琳, 李冰. 磁场对酿酒酵母微观结构及膜脂流动性的影响. 华南理工大学学报(自然科学版), 2008, **36**(4): 138–143.
- [11] Folmer V, Pedroso N, Matias AC, *et al.* H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1778**: 1141–1147.
- [12] Dynowski M, Schaaf G, Loque D, *et al.* Plant plasma membrane water channels conduct the signaling molecule H₂O₂. *Biochem*, 2008, **414**: 53–61.
- [13] Pedroso N, Matias AC, Cyrne L, *et al.* Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med*, 2009, **46**: 289–298.
- [14] Tafforeau L, Le Blastier S, Bamps S, *et al.* Repression of ergosterol level during oxidative stress by fission yeast F-box protein Pof14 independently of SCF. *EMBO J*, 2006, **25**: 4547–4556.
- [15] Hauss T, Dante S, Dencher NA, *et al.* Squalane is in the midplane of the lipid bilayer: implications for its function as a proton permeability barrier. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1556**: 149–154.
- [16] Norman AW, Demel RA, de Kruijff B, *et al.* Studies on the biological properties of polyene antibiotics: evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol. *J Biol Chem*, 1972, **247**: 1918–1929.
- [17] de Almeida RF, Loura LM, Fedorov A, *et al.* Nonequilibrium phenomena in the phase separation of a two-component lipid bilayer. *Biophys J*, 2002, **82**: 823–834.
- [18] Matias AC, Pedroso N, Teodoro N, *et al.* Down-regulation of fatty acid synthase increases the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* cells to H₂O₂. *Free Radic Biol Med*, 2007, **43**: 1458–465.
- [19] Seo PR, Teksin ZS, Kao JPY, *et al.* Lipid composition effect on permeability across PAMPA. *Eur J Pharm Sci*, 2006, **29**: 259–268.
- [20] Pesakhov S, Benisty R, Sikron N, *et al.* Effect of hydrogen peroxide production and the fenton reaction on membrane composition of *Streptococcus pneumoniae*. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1768**: 590–597.
- [21] Nishida T, Orikasaa Y, Ito Y, *et al.* *Escherichia coli* engineered to produce eicosapentaenoic acid becomes resistant against oxidative damages. *FEBS Lett*, 2006, **580**: 2731–2735.
- [22] de Kroon AI. Metabolism of phosphatidylcholine and its implications for lipid acyl chain composition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1771**: 343–352.
- [23] Gruner SM. Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 3665–3669.
- [24] Li Q, Abrashev R, Harvey LM. Oxidative stress-associated impairment of glucose and ammonia metabolism in the filamentous fungus, *Aspergillus niger* B1-D. *Mycol Res*, 2008, **112**: 1049–1055.
- [25] Marquis RE, Baldec JD. Sporicidal interactions of ultraviolet irradiation and hydrogen peroxide related to aseptic technology. *Chem Eng Process*, 2007, **46**: 547–553.
- [26] Wang BW, Shi QS, Ouyang YS, *et al.* Progress in oxyR regulon-the bacterial antioxidant defense system—a review. *Acta Microbiol Sin*, 2008, **48**(11): 1556–1561.
汪保卫, 施庆珊, 欧阳友生, 等. 细菌抗氧化系统—oxyR 调节子研究进展. 微生物学报, 2008, **48**(11): 1556–1561.