

运用蚕豆幼苗叶片生物标志物评价铅污染土壤

汪承润^{1,2}, 王晓蓉^{1*}, 于红霞¹, 乔松³, 张宝刚¹, 孙剑¹

(1. 南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093; 2. 淮南师范学院生命科学系, 淮南 232001; 3. 南京工业大学环境学院, 南京 210009)

摘要:以蚕豆(*Vicia faba* L.)幼苗为供试植物, 通过室外盆栽实验研究了暴露 5 周后的蚕豆幼苗叶片应激蛋白(HSP70 和 HSP60)等相关生物指标对土壤铅胁迫的响应. 结果表明, 随着外源铅的增加, 叶片总铅含量、超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和膜脂质过氧化产物都在不同程度上得到增加. 相关性分析表明, $O_2^{\cdot-}$ 与膜脂质过氧化产物($r = 0.973$, $p < 0.01$)之间存在显著的相关性. 超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶和抗坏血酸过氧化物酶活力均被相应的诱导. HSP70 和 HSP60 对铅污染的响应比上述其它生物指标更加敏感. 可见, 土壤铅进入叶片后, 可能通过 $O_2^{\cdot-}$ 的作用诱导了膜脂质过氧化, 而 4 种抗氧化酶活力的提高缓解了活性氧的氧化损伤. HSP70 和 HSP60 可作为土壤铅污染早期诊断的潜在的生物标志物, 同时还应该考虑铅的暴露剂量并综合利用其它生物指标.

关键词: 铅; 蚕豆幼苗; 应激蛋白; HSP70; HSP60; 生物标志物

中图分类号: X18 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3246-06

Evaluation of Soil Lead Contamination by Biomarkers in Leaves of *Vicia faba* L. Seedlings

WANG Cheng-run^{1,2}, WANG Xiao-rong¹, YU Hong-xia¹, QIAO Song³, ZHANG Bao-gang¹, SUN Jian¹

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Department of Life Science, Huainan Normal University, Huainan 232001, China; 3. School of Environment, Nanjing Industrial University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Stress proteins (HSP70 and HSP60) and other related biological parameters were investigated in leaves of *Vicia faba* L. seedlings subjected to soil lead stress. The seedlings were cultivated outdoors in pots for five weeks. Results showed that total lead content, superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) and lipid peroxidation productions in the leaves increased with the increase of extraneous lead in soils. Significant correlation was found between the $O_2^{\cdot-}$ and lipid peroxidation productions ($r = 0.973$, $p < 0.01$). Activities of superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) were activated. Moreover, HSP70 and HSP60 increased more sensitively than the other parameters in response to lead stress. This indicates lead might cause lipid peroxidation in the leaves by mediation of $O_2^{\cdot-}$. The activated antioxidative enzymes alleviated the stress and damage of reactive oxygen species. HSP70 and HSP60 are potential biomarkers for early warning of lead-contaminated soils. Additionally, concentrations of soil lead and related biological parameters should be combined.

Key words: lead; *Vicia faba* L. seedlings; stress proteins (HSPs); HSP70; HSP60; biomarker

随着工农业的发展, 土壤重金属污染面积和污染程度呈现上升趋势. 重金属进入植物体后, 可替代酶蛋白分子中一些重要的辅助因子, 导致必需元素的缺失和活性氧等自由基(ROS)的积累^[1,2], 并进一步诱导膜脂质、蛋白质和 DNA 分子的氧化损伤^[3~5]. 重金属积累引起的 ROS 增加不仅对细胞造成氧化损伤, 还可作为信号分子引起植物体的应激反应^[6]. ROS 通常包括超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($\cdot OH$)以及单线态氧(1O_2)等. 为抵御环境胁迫, 植物进化了一系列防御机制, 如通过增强抗氧化酶活性来淬灭自由基的积累^[5]; 又如通过快速合成热休克蛋白(HSP, 又称应激蛋白)来修复或加速降解变性的蛋白分子. HSPs

是一系列高度保守的蛋白质家族, 能够被高/低温、重金属等生物或非生物胁迫所诱导^[7], 按其分子量大小, 通常可分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和其它低分子量蛋白. HSP70 和 HSP60 是广泛存在于动植物细胞中的 2 种分子伴侣, 二者相互配合, 是维护细胞正常蛋白结构的必需组分^[8]. 在环境胁迫下, HSP70 和 HSP60 的升高可指示生物体中的“持家蛋白”受到损伤, 因此, 二者是细胞内蛋白分子完整性

收稿日期: 2007-11-10; 修订日期: 2007-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(20577021); 江苏省自然科学基金项目(BK2004091); 污染控制与资源化研究国家重点实验室开放基金项目(PCRRF07007)

作者简介: 汪承润(1966~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为土壤环境毒理学与化学, E-mail: chengrunw66@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: ekxr@nju.edu.cn

的潜在的分子标志物^[9]. HSP70 可作为土壤动物蚯蚓^[10]、线虫^[11]以及水生动物贻贝^[12]和鱼类^[13]对重金属毒性响应的分子标志物. HSP60 也有作为线虫^[11]、草虾(*Palaeomonetes pugio*)^[9]和海葵(*Anemonia viridis*)^[14]对污染物毒性响应的分子标志物的报道.

应用植物应激蛋白或其基因表达水平作为分子标志物的研究也有少数报道. 有人曾将酶联免疫或 Western blot 技术应用于研究 HSP70 或 HSP90 在某些植物体中的诱导表达^[15~18]; 还有人将 HSPs 基因表达的定量分析技术应用到检测某些植物对重金属毒性的响应^[19,20]. 但是, 应用 HSP70 和 HSP60 作为农作物对土壤重金属污染胁迫的分子标志物研究仍鲜见报道.

本研究通过室外盆栽实验, 运用 Western blot 技术研究蚕豆幼苗叶片 HSP70、HSP60 及其它生理生化指标对铅污染土壤的响应, 探讨其作为诊断铅污染土壤的分子标志物的可行性.

1 材料与方法

1.1 铅污染土壤的制备和蚕豆幼苗的培养

试验土壤取自安徽省淮南市八公山区, 本底 pH 值为 7.6, 总铅含量为 $20.13 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 有机质含量为 1.027%. 拌入硝酸铅溶液(使用相同稀硝酸溶液梯度稀释母液而成)后, 外源铅含量分别为 0、12.5、25、50、125、250、500 和 $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 平衡 4 周, 土壤 pH 值范围为 7.3~7.5. 蚕豆种子用 0.1% 次氯酸钠溶液浸没 10 min, 去离子水漂洗干净, 催芽后选择大小基本一致的幼苗移栽到含上述铅污染土壤的花盆中, 每剂量组重复 3 盆. 每盆保留 6 棵大小基本一致的幼苗用于实验. 花盆置于室外, 幼苗生长于 3、4 月份, 阳光充分, 定期补充等量的 Hoagland 营养液. 移栽 5 周后采集第 3 轮叶片, 检测相关指标.

1.2 叶片铅含量的测定

用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液和去离子水先后洗涤叶片, 60°C 烘干, 称重, 浓 HNO_3 浸没过夜, 再用 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1:1, 体积比) 加热消解. 铅含量用原子吸收光谱仪 (Solaar M series, Thermo Elemental, Cambridge, UK) 测定, 选用地矿部物化探研究所提供的灌木枝叶样品 (GBW07603, GSV-2) 控制分析的准确性, 铅的回收率为 $(100 \pm 5)\%$, 叶片中铅的含量用干重表示.

1.3 超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)和脂质过氧化的测定

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 的测定参照文献^[21]. 取 1g 新鲜叶片, 液氮速冻并立即研磨成粉状, 并在提取液 (250

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液, $\text{pH} = 8.0$, 含 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸吡哆醛, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT) 中匀浆, 4°C 下, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min. 上清液用于 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的测定. 分别取 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4Cl (1 mL) 和 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 ($\text{pH} = 7.8$) (0.5 mL), 加入 0.5 mL 上清液, 25°C 水浴 60 min. 然后分别加入 $17 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对氨基苯磺酸 (1 mL) 和 $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -萘胺 (1 mL), 25°C 继续水浴 20 min, 在 530 nm 波长下立即比色. 以亚硝酸钠作为底物, 按上述方法制备标准曲线, 根据标准曲线换算出 $[\text{NO}_2^-]$, 再计算出 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的含量.

脂质过氧化的测定参照文献^[22]. 根据消光系数 $155 \text{ mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{cm})^{-1}$, 计算 2-硫代巴比妥酸反应产物 (TBARS) 含量, 结果以 TBARS (FW) 生成量 $[\mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{g})^{-1}]$ 表示.

1.4 抗氧化酶活性的测定

粗酶液同 1.3, 蛋白含量的测定参照 Bradford^[23] 的方法. 超氧化物歧化酶 (SOD) ($\text{EC}1.15.1.1$)、过氧化氢酶 (CAT) ($\text{EC}1.11.1.6$)、过氧化物酶 (POD) ($\text{EC}1.11.1.7$) 和抗坏血酸过氧化物酶 (APX) ($\text{EC}1.11.1.11$) 活性的测定参照文献^[24]. 一个 SOD 酶活力单位 (U) 定义为抑制 50% NBT (氯化硝基四氮唑蓝) 还原反应所需要的酶量; 一个 CAT 酶活力单位 (U) 定义为每 min 分解 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 所需要的酶液量; 一个 POD 酶活力单位 (U) 定义为每 min 产生 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化性愈创木酚所需要的酶液量; 一个 APX 酶活力单位 (U) 定义为每 min 氧化 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸所需要的酶液量.

1.5 HSP70 和 HSP60 表达水平的测定

总蛋白的提取参照文献^[25]. 液氮下研磨, 匀浆 (提取液含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸钠, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF, $\text{pH} = 8.9$). 4°C 下 $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 25 min, 可溶性总蛋白含量的测定参照 Bradford^[23] 的方法. 上清液分装后添加裂解液, 煮沸 5 min, 用于 SDS-PAGE (Bio Rad Mini-PROTEAN 3 mini gel system) (10% 分离胶, 5% 积层胶) 和 Western blot. 每孔上样 $28.0 \mu\text{g}$ 总蛋白, 并用预染分子量 Marker (# SM0671, Fermentas, US) 显示带型分子量大小. 电泳结束后, 胶块用于考马斯亮蓝 R-250 染色和半干转印 (BioRad semi-dry transfer apparatus). 转印后的 PVDF 膜 (Amersham Pharmacia) 用 8% 脱脂奶粉 (质量浓度) / TBS-T 缓冲液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $\text{pH} = 7.5$, 0.02% Tween-20) 封闭 2 h, TBS-T 缓冲液漂洗, 一抗封闭: 鼠抗-HSP70/HSC70

(SPA-820, StressGen) (1 : 5 000)、鼠抗-HSP60 (SPA-807, StressGen) (1 : 1 000) 和鼠抗-β-Actin (MS-1295, Labvison, California, USA) (1 : 100) 分别于 4℃ 孵育 8 h 以上. TBS-T 缓冲液漂洗后, 室温下二抗(辣根过氧化物酶连接的抗鼠-IgG, Stabizyme, USA) (dilution 1 : 5 000 in 1% BSA/TBS-T) 封闭 (1 : 5 000) 2 h, ECL (Amersham) 发光, X-胶片感光. 运用 Image J 软件 (National Institutes of Health, USA) 进行光密度分析, 计算各剂量组与相应 β-Actin 光密度的比值.

1.6 数据统计

运用 SPSS10.0 软件进行数据处理, 并运用 Dunnett's *t*-test 进行显著性分析, 所有数据表示为平均数 ± SD, * 表示显著性差异, *p* < 0.05; ** 表示极显著性差异, *p* < 0.01.

2 结果与讨论

2.1 土壤铅对蚕豆幼苗叶片铅含量、超氧自由基和膜脂质过氧化的影响

实验结果表明, 随着外源铅浓度的增加, 叶片中铅的含量呈现上升趋势; 当外源铅剂量增至 50 mg·kg⁻¹ 时, 叶片铅含量显著性增加(见表 1). 本实验结果还表明, 随着外源铅和叶片铅含量的增加, 叶片 O₂⁻ 的产生和积累呈现上升趋势[见图 1(a)]. 这可能是由于铅属于非氧化还原态重金属, 通过间接

作用, 如替代酶蛋白分子活性中心的必需元素, 导致必需元素的缺失, 消耗谷胱甘肽等途径介导活性氧等自由基的产生^[1,2]. 而且, 随着铅剂量的增加, 细胞膜脂质过氧化程度(TBARS 产物)也在增加[见图 1(b)]. 这可能是因为 ROS 能够氧化膜不饱和脂肪分子, 造成膜脂质过氧化和细胞膜损伤^[3]. 相关性分析表明, O₂⁻ 与脂质过氧化产物 TBARS 之间 (*r* = 0.973, *p* < 0.01) 存在显著的相关性. 因此, 膜脂质过氧化产物的增加可作为植物体受到氧化胁迫的生物标志物^[26]. 由此可见, 土壤铅通过蚕豆幼苗的吸收和运输作用进入叶片, 诱导 O₂⁻ 产生, 进一步导致膜脂质过氧化损伤.

表 1 土壤铅对蚕豆幼苗叶片中铅含量的影响¹⁾

Table 1 Effect of soil lead on total lead content in leaves of *Vicia faba* seedlings

外源铅含量(DW)/mg·kg ⁻¹	叶片总铅含量(DW)/μg·g ⁻¹
0	3.8 ± 0.6
12.5	3.7 ± 0.5
25	4.0 ± 0.1
50	4.3 ± 0.5
125	7.1 ± 1.4 *
250	9.3 ± 0.2 **
500	13.8 ± 0.4 **
1 000	30.7 ± 1.7 **

1) *n* = 3; * 表示 *p* < 0.05; ** 表示 *p* < 0.01

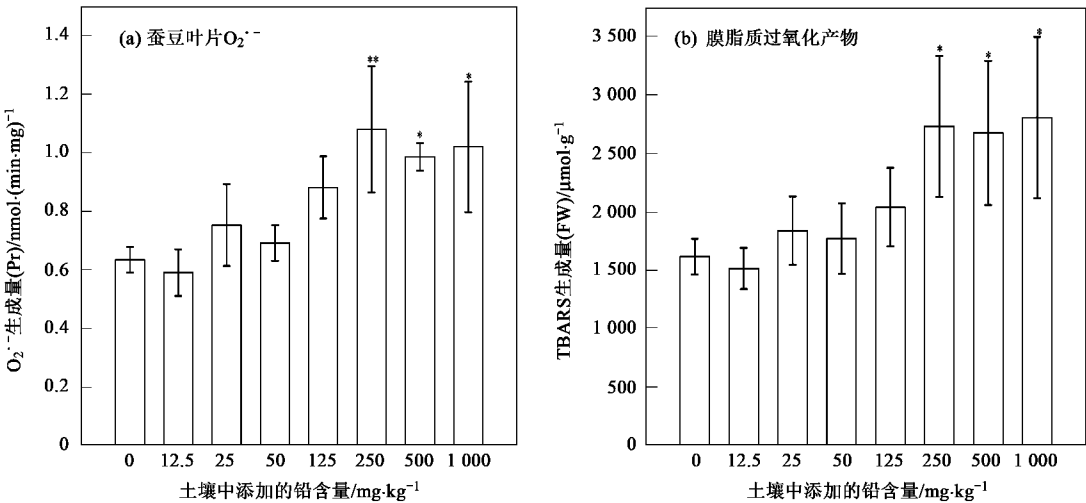


图 1 土壤铅对蚕豆叶片 O₂⁻ 和膜脂质过氧化产物的影响

Fig.1 Effect of soil lead on O₂⁻ content and lipid peroxidation production in leaves of *Vicia faba* seedlings

2.2 土壤铅对蚕豆叶片抗氧化酶活力的影响

在非胁迫情况下, ROS 是植物体生长与发育过

程中必需的一种信号分子, 但其机制尚不清楚. 当植物遭遇环境胁迫时, ROS 迅速积累, 并引起植物体的

一系列应激反应^[6].为抵御和清除 ROS,植物体合成并激活一系列抗氧化酶.如 SOD 酶能够将 $O_2^{\cdot -}$ 转化为 H_2O_2 和 O_2 ;CAT 和 POD 酶能将 H_2O_2 转化为 H_2O 和 O_2 ;APX 酶是抗坏血酸-谷胱甘肽循环的重要组成部分,参与清除 H_2O_2 .SOD 酶与猝灭 H_2O_2 的抗氧化酶之间的平衡是维持 $O_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2 稳定水平的决定因素.本实验结果表明,在不同剂量范围内,随着外源铅含量的增加,SOD、POD、CAT 和 APX 这 4 种抗氧化酶活力均呈现不同程度的增长趋势(见图 2).当

剂量超过 $250\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,CAT 酶活力逐步下降[见图 2(c)],高浓度铅对 CAT 酶活力具有抑制作用.相关性分析表明, $O_2^{\cdot -}$ 含量与 SOD 酶活性之间存在显著的相关性($r = 0.926, p < 0.05$),这可能是因为 $O_2^{\cdot -}$ 诱导了 SOD 酶活性的增强,相应地,SOD 酶也是清除蚕豆叶片 $O_2^{\cdot -}$ 的主要抗氧化酶.POD 和 CAT 可直接参与 H_2O_2 的清除,而 APX 需要通过抗坏血酸-谷胱甘肽循环清除 H_2O_2 .因此,这 4 种抗氧化酶活力的升高在一定程度上减少了自由基的积累,缓解

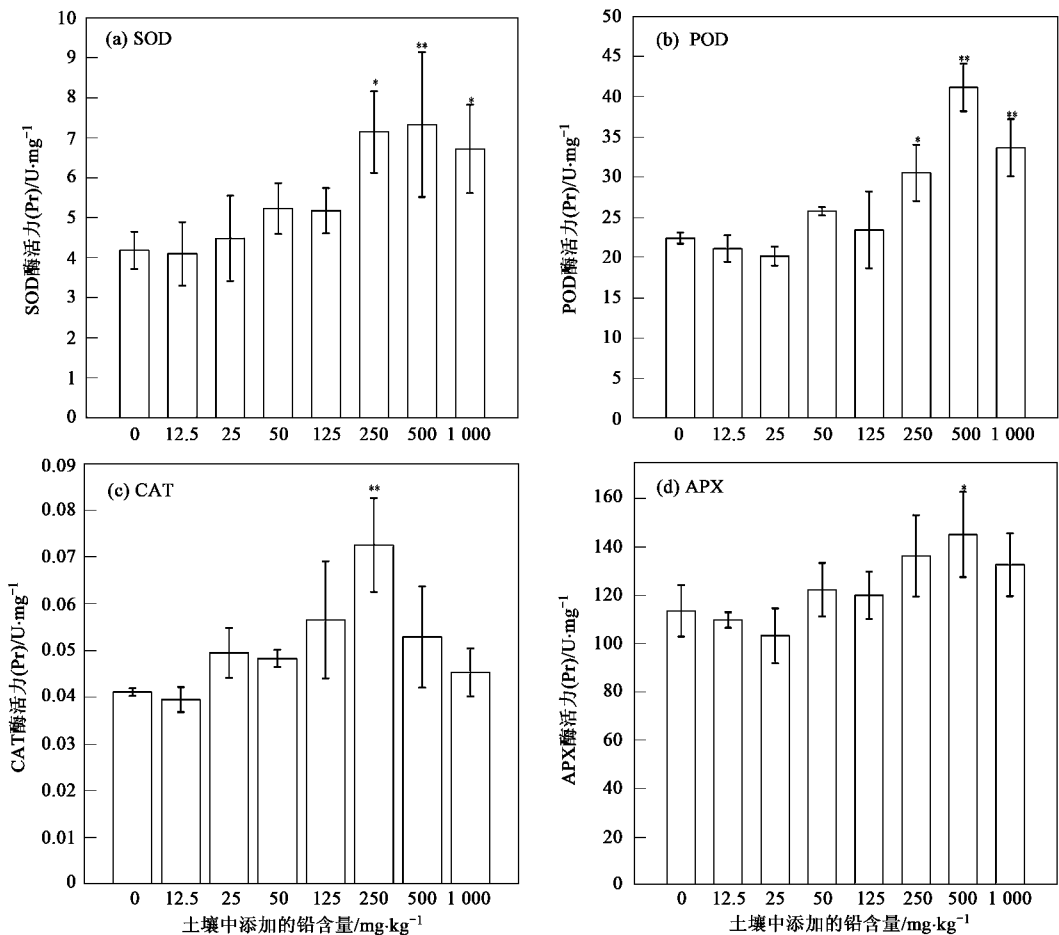


图 2 土壤铅对蚕豆叶片 4 种抗氧化酶活力的影响

Fig.2 Effect of soil lead on activities of four antioxidative enzymes in leaves of *Vicia faba* seedlings

了铅对蚕豆幼苗的氧化胁迫.

2.3 土壤铅对蚕豆叶片 HSP70 和 HSP60 表达水平的影响

实验结果表明,在 $0 \sim 250\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 外源铅作用下,蚕豆幼苗叶片 HSP70 和 HSP60 在不同程度上增长了其表达水平;超过此剂量范围,则呈现下降趋势(见图 3).由于 HSP70 和 HSP60 表达水平的增加可指示细胞内“持家”蛋白正在经历着变性过程,检测

二者的表达水平就可以判断细胞高级结构成分的完整性^[9].因此,HSP70 和 HSP60 可作为环境污染监测的潜在的分子标志物.例如,镉和渗透胁迫能够在短时间内诱导海生植物 *Fucus serratus* 和淡水植物 *Lemna minor* 中 HSP70 升高,HSP70 可作为其短期暴露的生物标志物^[15].另外,HSP70 和 HSP60 表达的增加表明铅诱导了蚕豆叶片蛋白质分子损伤或变性,因此,铅对蚕豆幼苗具有一定的蛋白质毒性.

有研究表明,铅能够诱导 ROS 的产生^[2],而积累的 ROS 可迅速攻击蛋白质多肽链,尤其是其中的组氨酸、脯氨酸、精氨酸和赖氨酸,导致羰基基团的增加^[27].而损伤或变性蛋白的积累又可进一步诱导 HSPs 基因的快速表达^[28].因此,ROS 能够诱导 HSPs 基因的增强表达^[29].本实验中,铅也可能通过 O_2^- 等自由基的作用诱导了 HSP70 和 HSP60 合成的增加.

分子标志物是环境科学研究中新兴的领域之一,其优势在于能够在生物体表观症状出现之前,在分子水平上反映出污染物的毒理学效应,能够把化学分析的结果与生物体的毒理学响应结合起来.植物是土壤重金属污染的直接受害者,是监测土壤污染的良好实验材料^[30].蚕豆分布于世界各地,是常见的农作物之一.运用农作物作为研究材料,能够获得环境污染对农作物的损伤程度,又能够对其食品安全性提供早期预警信息,而应用植物应激蛋

白作为环境污染早期预警的研究报道较少.本实验结果表明,过高的铅暴露都会导致 HSPs 实际表达水平接近或低于对照组,从而掩盖了污染物的实际毒性.因此,利用化学方法分析土壤重金属的可利用性或植物体重金属含量是重要的前提条件.另外,综合利用生物体多项应激响应指标,就能够弥补应激蛋白低水平表达时的不足.例如,由图 3(b)可见,在 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 外源铅作用下, HSP70 和 HSP60 表达水平低于对照组,而 SOD、POD 和 APX 这 3 种抗氧化酶以及 O_2^- 和脂质过氧化均显著性高于对照组[见图 2(a)、2(b)、2(d)].另外,重金属暴露时间的长短也可能对 HSPs 的表达水平产生影响,有待进一步验证.因此,笔者认为,运用植物应激蛋白作为土壤重金属污染早期诊断的生物标志物至少应该考虑如下 2 个因素:①土壤重金属的可利用性或植物体重金属含量;②多项生物指标的综合利用.

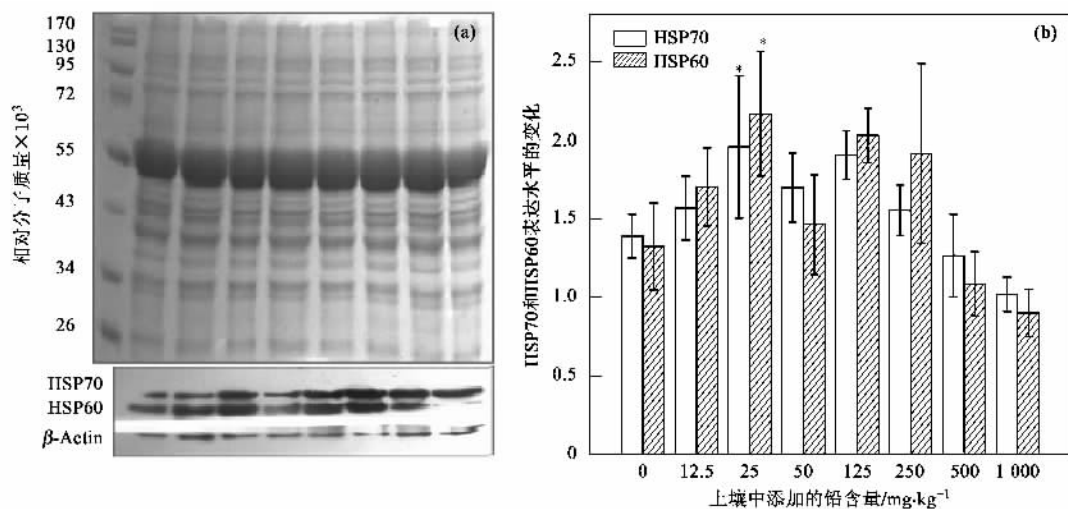


图 3 土壤铅对蚕豆叶片 HSP70 和 HSP60 表达水平的影响

Fig.3 Effect of soil lead on HSP70 and HSP60 levels in leaves of *Vicia faba* seedlings

3 结论

(1)随着土壤外源铅的增加,蚕豆叶片总铅的含量呈现上升趋势.铅可能通过介导叶片 O_2^- 的积累进一步诱导膜脂质过氧化.4 种抗氧化酶活性的升高有助于清除活性氧等自由基,缓解铅的氧化胁迫.

(2)HSP70 和 HSP60 对铅污染的响应比上述其它生物指标更加敏感;HSP70 和 HSP60 作为分子标志物必须考虑土壤铅的暴露剂量,而且应该综合利用其它相关生物指标.

参考文献:

[1] Dietz K J, Baier M, Kramer U. Free radicals and reactive oxygen

species as mediators of heavy metal toxicity in plants [A]. In: Prasad M N V, Hagemeyer J (eds). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1999. 73-97.

[2] Qian Y C, Zheng Y, Ramos K S, et al. The Involvement of Copper Transporter in Lead-induced Oxidative Stress in Astroglia [J]. Neurochem Res, 2005, 30(4): 429-438.

[3] Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization [J]. J Exp Bot, 2002, 53: 1351-1365.

[4] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, et al. Reactive oxygen gene network of plants [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9(10): 490-498.

[5] Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Meharg A A. Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity [J]. Plant Cell Environ, 2001, 24: 713-722.

- [6] Vranová E, Inzé D, Breusegem F V. Signal transduction during oxidative stress [J]. J Exp Bot, 2002, **53**: 1228-1236.
- [7] Bierkens J G E A. Application and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring [J]. Toxicology, 2000, **153**: 61-72.
- [8] Hartl F U. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. Nature, 1996, **381**: 571-579.
- [9] Downs C A, Fauth J E, Woodley C M. Assessing the health of grass Shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system [J]. Mar Biotechnol, 2001, **3**: 370-397.
- [10] Nadeau D, Corneau S, Plante I, et al. Evaluation for HSP70 as a Biomarker of effects of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris* [J]. Cell Stress Chaperon, 2001, **6**: 153-163.
- [11] Arts M J S J, Schill R O, Knigge T, et al. Stress proteins (HSP70, HSP60) induced in isopods and nematodes by field exposure to metals in a gradient near Avonmouth, UK [J]. Ecotoxicology, 2004, **13**: 739-755.
- [12] Franzellitti S, Fabbri E. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors [J]. Biochem Bioph Res Commu, 2005, **336**: 1157-1163.
- [13] 沈骅, 王晓蓉, 张景飞, 等. Cu²⁺ 和 Cu-EDTA 对鲫鱼脑组织应激蛋白 HSP70 诱导的影响[J]. 环境科学, 2004, **25**(3): 94-97.
- [14] Choreshe O, Ron E, Loyal Y. The 60-kDa Heat Shock Protein (HSP60) of the Sea Anemone *Anemonia viridis*: A Potential Early Warning System for Environmental Changes [J]. Mar Biotechnol, 2001, **3**: 501-508.
- [15] Ireland H E, Harding S J, Bonwick G A, et al. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor* [J]. Biomarkers, 2004, **9**(2): 139-155.
- [16] Manitašvić S, Dunderski J, Matic G, et al. Seasonal variation in heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 expression in an exposed and a shaded habitat of *Iris pumila* [J]. Plant Cell Environ, 2007, **30**: 1-11.
- [17] Saidi Y, Domini M, Choy F, et al. Activation of the heat shock response in plants by chlorophenols: transgenic *Physcomitrella patens* as a sensitive biosensor for organic pollutants [J]. Plant Cell Environ, 2007, **30**: 753-763.
- [18] Rau S, Miersch J, Neumann D, et al. Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu, Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels [J]. Environ Exp Bot, 2007, **59**: 299-306.
- [19] Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance [J]. Phytochemistry, 2007, **68**: 139-146.
- [20] Rivera-Becerril F, Metwally A, Martin-Laurent F, et al. Molecular responses to cadmium in roots of *Pisum sativum* L. [J]. Water Air Soil Poll, 2005, **168**: 171-186.
- [21] Ke D S, Wang A G, Sun G C, et al. The effect of active oxygen on the activity of ACC synthase induced by exogenous IAA [J]. Acta Bot Sin, 2002, **44**: 551-556.
- [22] Verma S, Dubey R S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants [J]. Plant Sci, 2003, **164**: 645-655.
- [23] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, **72**: 248-254.
- [24] García-Limones C, Hervás A, Navas-Cortés J A, et al. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* [J]. Physiol Mol Plant P, 2002, **61**: 325-337.
- [25] Turco E, Close T J, Fenton R D, et al. Synthesis of dehydrin-like proteins in *Quercus ilex* L. and *Quercus cerris* L. seedlings subjected to water stress and infection with *Phytophthora cinnamomi* [J]. Physiol Mol Plant P, 2004, **65**: 137-144.
- [26] Aravind P, Prasad M N V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism [J]. Plant Physiol Bioch, 2005, **43**: 107-116.
- [27] Stadtman E R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions [J]. Annu Rev Biochem, 1993, **62**: 797-821.
- [28] Craig E A, Gross C A. Is hsp70 the cellular thermometer? [J]. Trends Biochem Sci, 1991, **16**: 135-140.
- [29] Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, et al. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells [J]. Plant J, 1998, **13**: 519-527.
- [30] Citterio S, Aina R, Labra M, et al. Soil genotoxicity assessment: a new strategy based on biomolecular tools and plant bioindicators [J]. Environ Sci Technol, 2002, **36**: 2748-2753.