

商陆耐重金属 Cd 关键酶抗氧化酶的研究

张玉秀, 张红梅, 黄智博, 李林峰, 刘金光, 李霞

(中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083)

摘要: 研究商陆 (*Phytolacca americana* L.) 对 Cd 胁迫的抗氧化酶响应, 对于揭示其耐 Cd 机制具有重要意义。商陆幼苗在 200 $\mu\text{mol/L}$ 或 400 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 营养液中处理 4 d, 叶片活性氧自由基和 MDA 含量升高, 膜透性增加, 光合速率降低, 表明 Cd 胁迫诱导产生氧化胁迫。随着 Cd 处理含量的提高和时间的延长, 商陆叶片 SOD 和 POD 活性迅速增加, CAT 活性在 400 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 处理 3 d 后显著上升, 表明抗氧化酶在清除 Cd 毒害产生的活性氧自由基和提高 Cd 耐性中有重要作用。

关键词: 重金属; Cd 耐性; 抗氧化酶; 商陆

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)03-0896-05

Antioxidative Enzymes Play Key Roles in Cadmium Tolerance of *Phytolacca americana*

ZHANG Yu-xiu, ZHANG Hong-mei, HUANG Zhi-bo, LI Lin-feng, LIU Jin-guang, LI Xia

(School of Chemical & Environmental Engineering, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China)

Abstract: *Phytolacca americana* L. has the capacity to take up and accumulate to very high levels heavy metals such as Mn and Cd, and is used for phytoextraction of heavy metal contaminated soils. The role of antioxidative enzyme of *Phytolacca americana* in response to Cd stress is unknown. The 6-week-old seedlings of *Phytolacca americana* were exposed to half strength Hoagland solution with 200 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ or 400 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ for 4 days. The content of H₂O₂ and MDA, and electrolyte leakage increased, while the photosynthetic rate decreased, indicated that the oxidative damage induced by Cd stress in *Phytolacca americana* was one of the metal toxicity mechanism. The activities of SOD and POD increased rapidly with elevated Cd concentration and exposure time, CAT activity was stable in response to 200 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ stress, and increased only at 3 d later upon 400 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ treatment. Suggested that the enzymatic antioxidation capacity played important role in Cd tolerance of hyperaccumulator plant.

Key words: heavy metal; Cd tolerance; antioxidative enzyme; *Phytolacca americana*

我国是煤炭生产、加工和利用大国, 煤矸石和粉煤灰是煤炭开采和加工过程中形成的两大固体废物, 富含 Cd、Cu 和 Zn 等重金属, 这些废物的露天堆放不仅侵占大量土地, 而且其中的重金属通过长期的风化淋溶进入周边土壤, 造成矿区严重的土壤重金属污染, 致使许多土壤成为不毛之地而被废弃, 矿区生态环境进一步恶化。如胜利露天煤矿上覆岩层的 Cd 含量已严重超出土壤环境质量一级标准中规定的自然背景值, 平均超出量为 0.412 mg/kg^[1]。焦作市演马煤矿煤矸石周围土壤的 Cd 和 Zn 含量远远超过国家土壤环境质量标准(GB 15618-1995)中的三级标准, 超出量达 0.795 mg/kg, 周边土壤植物中的重金属含量在平面上与煤矸石堆间的距离负相关^[2]。由于土壤重金属污染具有隐蔽性、长期性和不可逆的特点, 不仅严重影响农作物的产量与品质, 而且能通过食物链危害人类的生命和健康^[3]。目前, 重金属污染已严重影响我国农产品的质量安全及其市场竞争力, 仅 2002 年我国约有包括农产品在内的 74 亿美元的出口商品因“绿色壁垒”而受阻。

因此, 清除土壤重金属污染是解决食品中重金属超标和生态恢复问题的关键。

植物修复技术是利用重金属累积植物吸收和累积重金属的特性清除土壤重金属, 与传统的整治技术相比具有廉价、清洁、生态友好和潜在或显在经济效益等巨大优势, 因而成为当前国际上的一个重要研究热点和重大科技发展方向。然而, 多数自然界的重金属超累积植物(如遏蓝菜)生长缓慢、生物量低, 限制了植物修复技术的产业化进程。所以, 研究重金属累积植物的耐性机制, 对于利用基因工程技术培育具有速生生物量高的重金属累积植物^[4]、绿化矸石山以及增进人类健康具有重要的现实意义。

重金属毒害导致植物体内累积大量的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS), 如超氧阴离子(O₂⁻)、羟基自由基(OH⁻)和 H₂O₂, 引起膜脂过氧

收稿日期: 2010-01-28; 修订日期: 2010-05-07

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA10Z407); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08009-130B); 中国矿业大学(北京)大学生创新性实验计划项目
作者简介: 张玉秀(1962~), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为基因工程和环境生物学, E-mail: zhangyuxiu@cumtb.edu.cn

化,细胞膜透性的增加,细胞功能失调等.逆境胁迫下植物抗氧化酶活性提高,可以有效地清除自由基,保护细胞免受氧化胁迫的伤害.豌豆在 $50 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$ 胁迫下,脂质过氧化作用增加,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性降低^[5].辣椒在 $25 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 铜处理下,叶片 O_2^- 的产生加快,丙二醛(MDA)含量升高,SOD、POD 和 CAT 活性随 Cu 含量的增加表现出先升后降的变化趋势^[6].遏蓝菜地上部累积的 Zn 含量与 SOD 活性成正相关,表明 SOD 活性的提高是遏蓝菜超累积 Zn 的机制之一^[7].商陆是重金属 Mn 累积植物,也是 Cd 累积植物^[9],然而,其 Cd 的耐性机制报道甚少,抗氧化酶活性在 Cd 耐性中的作用至今还不清楚.所以,研究商陆在 Cd 胁迫下的抗氧化酶响应,对于揭示植物的耐重金属机制和植物修复技术具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 材料培养与重金属处理

商陆(*Phytolacca americana* L.)种子用 75% 乙醇表面消毒 45 min 后,用灭菌水冲洗干净,在 4°C 冰箱中低温处理 3 d,然后分别铺在含有 1/4 MS 培养基的三角瓶中,在温室放置一周后萌发.温室的温度是 $22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$,15 h 光照 $165 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$.萌发 2~3 周后,在自然光下炼苗 2~3 d,然后,转入 1/2 Hoagland 营养液中水培生长,每 4 d 更换一次营养液.水培生长 8 周的幼苗分别转至含有 0、100、200、400 或 $600 \mu\text{mol/L CdCl}_2$ 处理一周,分析商陆的生长和毒害症状.最后,确定用 $200 \mu\text{mol/L}$ 或 $400 \mu\text{mol/L CdCl}_2$ 处理幼苗 1~4 d,测定叶片的抗氧化酶活性.

1.2 相对电导率和 MDA 含量测定

相对电导率和 MDA 含量参考文献^[9]的方法.

1.3 抗氧化酶活性测定

酶液提取:称取 0.5 g 新鲜植物叶片,加 5 mL 冰预冷的含有 0.1 mmol/L EDTA 和质量浓度为 1% polyvinylpyrrolidone 的 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)于冰浴研磨, 4°C 4000 r/min 离心 15 min,取上清液进行酶活测定.

酶活性测定:超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性分析,参考文献^[5]的方法.

1.4 可溶性蛋白含量测定

可溶性蛋白含量的测定用考马斯亮蓝法.取上述酶液 0.1 mL,加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250,充分混合,放置 2 min 后在 595 nm 下比色,记录吸光度

值,通过标准曲线查得蛋白质含量.

1.5 自由基的组织化学染色和 H_2O_2 含量测定

自由基的组织化学染色:根尖用 $25 \mu\text{mol/L}$ 氯甲基二氯二氢荧光素二乙酯(CM-H2DCFDA)分子探针染色 30 min,充分洗净后用激光共聚焦扫描电子显微镜(LSM510, Zeiss)观察绿色荧光,激发波长 488 nm ,发射波长 525 nm .

H_2O_2 含量测定:取 0.5 g 植物叶片,加 0.1% (质量浓度)冰预冷的 TCA 研磨匀浆, 4°C 4000 r/min 离心 25 min,取上清液测定.3 mL 反应混合液含有 0.5 mL 样品上清液、0.5 mL 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8)和 2 mL 1 mol/L KI .将反应混合液置于黑暗处放置 1 h 后, 390 nm 测定反应液吸光度.根据 H_2O_2 标准曲线查得样品中 H_2O_2 浓度($\mu\text{mol/L}$).

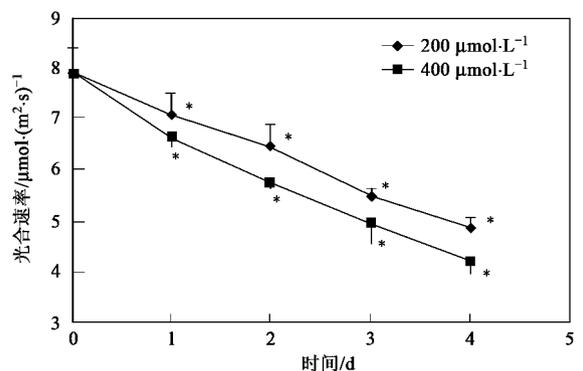
1.6 数据处理

利用 Excel 进行数据处理分析,图中的数值是 3 次数据的平均值和标准差,处理和对照之间在 $p < 0.05$ 水平的差异用 * 表示.

2 结果与分析

2.1 Cd 对商陆生长的影响

预实验表明商陆幼苗在 $200 \mu\text{mol/L CdCl}_2$ 水培处理一周时叶色正常,在去除重金属后仍然能恢复生长;在 $400 \sim 600 \mu\text{mol/L CdCl}_2$ 胁迫 5~6 d 时部分叶片失水萎蔫,而 $600 \mu\text{mol/L CdCl}_2$ 胁迫症状表现尤为严重,Cd 去除后几乎不能恢复生长.所以,本实验选用 $200 \mu\text{mol/L}$ (中度胁迫)和 $400 \mu\text{mol/L CdCl}_2$ (严重胁迫)2 个浓度处理商陆幼苗 1~4 d,分析其抗氧化酶活性响应.图 1 表明 Cd 胁迫下光合作



数据是平均值和标准差,处理和对照之间在 $p < 0.05$ 水平的差异用 * 表示

图 1 商陆在 CdCl_2 胁迫下的光合作用变化

Fig. 1 Effect of CdCl_2 on the photosynthetic rate in *P. americana*

用迅速下降,200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理 4 d 时光合分别下降 38% 和 47%,表明 Cd 胁迫明显地抑制商陆的生长。

2.2 Cd 胁迫诱导氧化损伤

MDA 是植物体膜脂过氧化产物,其含量反映细胞膜的氧化伤害程度.图 2 结果表明:商陆叶片的 MDA 含量随 Cd 浓度和处理时间的增加显著上升.200 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理 4 d 时 MDA 含量较对照提高 35%,400 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理下 MDA 含量提高 47%,表明 Cd 毒害引起商陆产生了氧化胁迫,氧化损伤随 Cd 胁迫浓度的增加而加强.电导率是反映细胞膜系统完整性的重要指标之一。

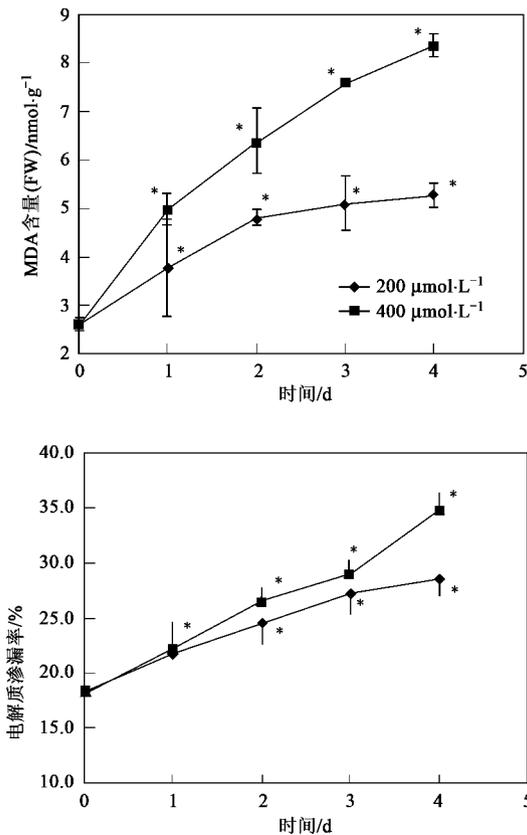


图 2 商陆在 CdCl_2 处理下的 MDA 含量和电导率变化

Fig. 2 MDA content and Electrolyte leakage in leaves of *P. americana* treated with different CdCl_2 concentrations

图 2 结果表明商陆叶片的电导率随 Cd 浓度处理的增加和时间的延长迅速上升,说明 Cd 胁迫导致商陆细胞膜系统受伤害。

2.3 抗氧化酶活性分析

SOD 主要将植物体内的超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)自由基歧化为 H_2O_2 和 O_2 ,CAT 进一步将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,POD 则通过氧化还原反应清除过氧化

物,从而减轻 ROS 对细胞的毒害作用.图 3 结果表明 CdCl_2 胁迫下商陆 SOD 和 POD 活性随处理浓度和处理时间的增加而显著提高,表明重金属累积植物具有较高的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和过氧化物清除活性.CAT 活性在 200 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 胁迫下基本维持在对照水平,在 400 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理 3 d 后才迅速升高,表明在中度胁迫下商陆的 CAT 活性足以清除 Cd 胁迫产

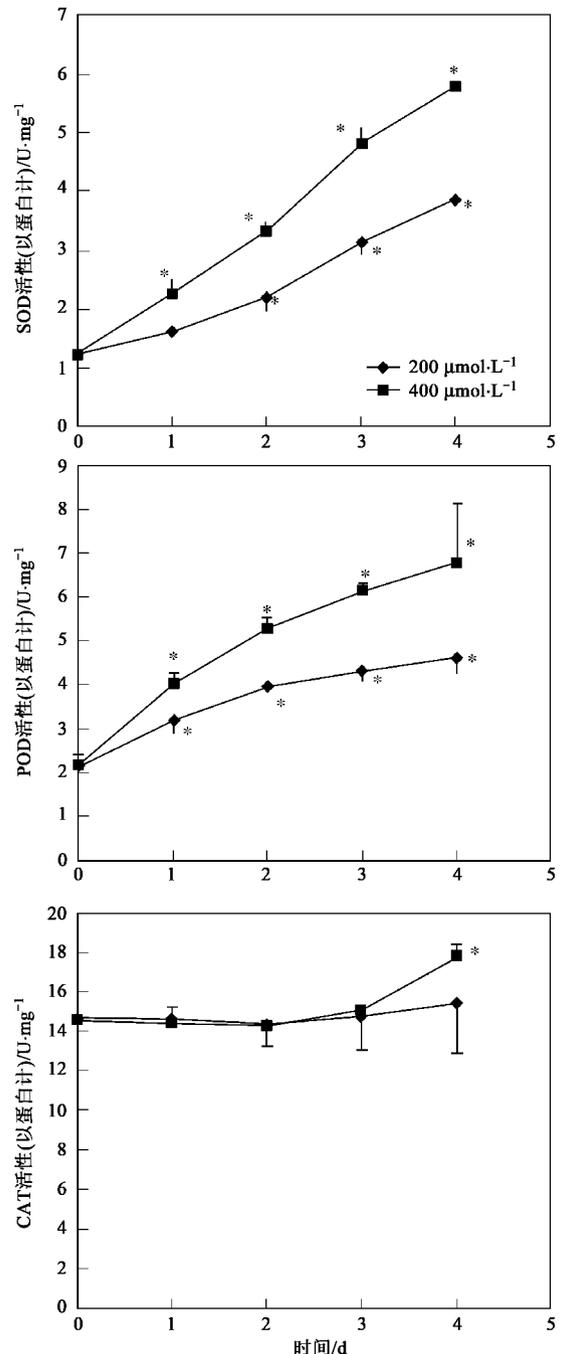


图 3 CdCl_2 处理时商陆叶片抗氧化酶活性的影响

Fig. 3 Activity of antioxidative enzymes in leaves of *P. americana* treated with different CdCl_2 concentrations

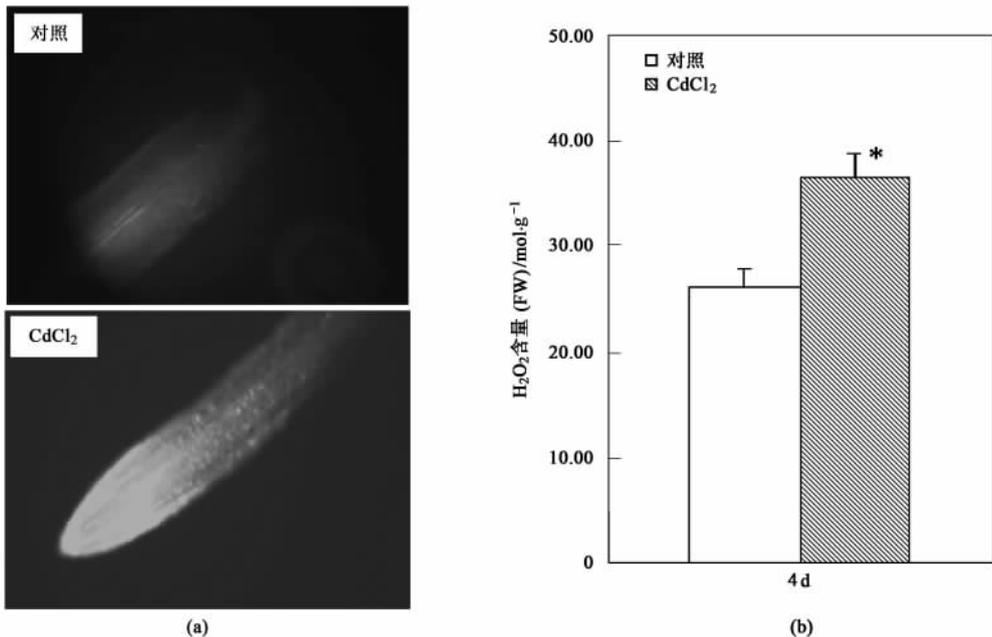
生的 H_2O_2 .

3 讨论

重金属 Cd 对植物的毒害作用因胁迫时间和浓度、以及体内积累的 Cd^{2+} 浓度的不同而不同. 本实验结果表明商陆能够忍耐 $200 \mu\text{mol/L CdCl}_2$, 而烟草在 $100 \mu\text{mol/L CdCl}_2$ 胁迫下受伤严重^[5], 表明高的 Cd 耐性可能是重金属累积植物商陆累积重金属的机制之一. Cd^{2+} 诱导细胞膜脂质过氧化作用, 导致膜系统损伤, 膜透性增加. 在 Cd 胁迫下假马齿苋和印度芥菜的电导率明显增加^[9,10], 细胞电解质外渗增加. Cd 胁迫下商陆叶片的 MDA 含量和电解质渗漏均显著升高, 并且电解质渗漏量与 MDA 含量和 Cd 处理浓度的增加成一定的正相关性, 表明 Cd 胁迫对商陆造成了氧化伤害. 重金属累积植物能在重金属胁迫下生长, 暗示其可能具有更高的抗氧化酶活性, 从而可以减轻重金属诱导产生的氧化损伤.

SOD、CAT 和 POD 是主要的抗氧化系酶, 三者协同作用可有效地清除 ROS. Cd 胁迫下印度芥菜、庭荠属 (*Alyssum lesbiacum*) 和龙葵等重金属累积植物的 SOD 和 CAT 活性增加^[10~12]; 而菜豆和绿豆等非累积植物中 CAT 活性却下降^[13,14]; 多种植物的 POD 活性在逆境胁迫下升高, 推测 POD 活性升高可

能是植物对逆境的响应^[15]. 本实验结果显示在 $CdCl_2$ 胁迫下商陆叶片 SOD 和 POD 活性均显著上升, Cd 胁迫强度越高, 酶活性增加幅度越大; 但是, CAT 活性在 $400 \mu\text{mol/L CdCl}_2$ 处理 3 d 后才显著升高, 表明高浓度的 Cd 可能导致体内累积了大量的 ROS, 所以需要更多的抗氧化酶来清除 ROS. 组织化学染色分析[图 4(a)]显示 $200 \mu\text{mol/L CdCl}_2$ 处理 6 h 时商陆根尖中的绿色荧光增强, 表明 ROS 的累积量明显高于对照; H_2O_2 含量分析[图 4(b)]进一步显示 Cd 胁迫 4 d 时叶片 H_2O_2 累积量显著高于对照, 表明 Cd 引起 ROS 的累积可能是 Cd 毒害的主要机制之一, 而高水平的 SOD 和 CAT 活性能有效淬灭 Cd 诱导产生的 ROS, 保护商陆免受 Cd 引起的氧化损伤. Cd 胁迫下遏蓝菜和印度芥菜的 SOD 和 CAT 活性均显著上升, 非累积植物烟草虽然 SOD 的活性也显著上升, 但 CAT 活性显著下降^[16]; 同样, 在 Mn 胁迫下, 商陆的 SOD 和 CAT 活性升高, 且 SOD 升高幅度大于烟草, 烟草 CAT 活性显著下降^[17], 推测 CAT 可能是重金属累积植物耐重金属关键的抗氧化酶. 转基因研究表明转印度芥菜 CAT 基因的烟草 CAT 活性明显高于野生型烟草, 且 Cd 胁迫下幼苗的根伸长速率也大于野生型^[4], 进一步证实了 CAT 的抗氧化活性在提高植物的重金属耐性方面具有重要作用.



(a) $CdCl_2$ 胁迫 6 h 根尖的活性氧自由基组织化学染色分析; (b) $CdCl_2$ 胁迫 4 d 叶片的 H_2O_2 含量

图 4 商陆在 $200 \mu\text{mol/L CdCl}_2$ 处理下累积的自由基

Fig. 4 ROS accumulation in *P. americana* seedling upon $200 \mu\text{mol/L CdCl}_2$ stress

4 结论

Cd 胁迫诱导商陆 ROS 累积,致使细胞膜透性增大,电解质泄露,生长受抑制,氧化损伤可能是 Cd 毒害的主要机制之一;高水平的抗氧化酶活性可能是商陆耐重金属 Cd 的重要机制之一。

参考文献:

- [1] 王启瑞,才庆祥,马从安,等. 胜利露天煤矿重金属污染评价 [J]. 煤炭科学技术,2006,34(10):73-78.
- [2] 杨建,陈家军,王心义. 煤矸石堆周围土壤重金属污染空间分布及评价[J]. 农业环境科学学报,2008,27(3):873-878.
- [3] Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants [J]. Biochimie, 2006, 88(11): 1707-1719.
- [4] Guan Z, Chai T, Zhang Y, et al. Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA[J]. Chemosphere, 2009, 76(5): 623-630.
- [5] Sandalio L M, Dalurzo H C, Gomez M, et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(364): 2115-2126.
- [6] 刘景春,李裕红,晋宏. 铜污染对辣椒产量、铜累积及叶片膜保护酶活性的影响 [J]. 福建农业学报, 2003, 18(4): 254-257.
- [7] 刘美青,江荣风,赵方杰. Zn 对 Zn 超积累植物遏蓝菜 (*Thlaspi caerulescens* L.) 超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响 [J]. 农业环境科学学报,2006,25(增刊): 465-470.
- [8] 聂发辉,镉超富集植物商陆及其富集效应[J]. 生态环境, 2006, 15(2): 303-306.
- [9] Mishra S, Srivastava S, Tripathi R D, et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L.[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(1): 25-37.
- [10] Mobin M, Khan N A. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(5): 601-610.
- [11] Schickler H, Caspi H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*[J]. Physiologia Plantarum, 1999, 105(1): 39-44.
- [12] Sun R L, Zhou Q X, Sun F H, et al. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. [J]. Environment and Experimental Botany, 2007, 60(3): 468-476.
- [13] Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal M H, et al. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Plant Science, 1997, 127(2): 139-147.
- [14] León A M, Palma J M, Corpas F J, et al. Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium [J]. Plant Physiol Biochem, 2002, 40(10): 813-820.
- [15] Singh S, Eapen S, D'Souza S F. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. [J]. Chemosphere, 2006, 62(2): 233-246.
- [16] Wang Z, Zhang Y, Huang Z. Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress [J]. Plant Soil, 2008, 310(1-2): 137-149.
- [17] 张玉秀,黄智博,张红梅,等. 商陆和烟草对镉胁迫的抗氧化响应研究[J]. 环境科学, 2009, 30(12): 3676-3683.