

Brassica chinensis L.体内络合钝化和抗氧化酶系统 协同抵御镉胁迫的机制初探

陈丽琴 郭逸飞 杨利民 王秋泉*

(厦门大学化学化工学院化学系, 现代分析科学教育部重点实验室; 海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005.

* 联系人, E-mail: qqwang@xmu.edu.cn)

摘要 以小白菜(*Brassica chinensis* L.)作为模型植物, 在不同浓度的 Cd 胁迫条件下, 研究小白菜富集 Cd 的能力以及可能的细胞抵御机制. 在 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下, 小白菜地上部分及根部 Cd 含量分别达到 1348.3 和 $3761.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (干重); 小白菜体内 Cd 含量与植物络合素(phytochelatin, PCs)含量成正相关, Cd 浓度越高 PCs 的含量也越高, 表明 PCs 络合 Cd 在小白菜体内 Cd 的解毒及耐受机制中起最主要的作用. 此外, 在研究 Cd 胁迫下小白菜地上部分丙二醛(MDA)的产生、 H_2O_2 的含量及抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、愈创木酚过氧化酶(POD)及抗坏血酸过氧化酶(APX)的活性变化的过程中发现, 在 $5\sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 的胁迫下, 酶的活性成上升趋势, 有效地抵御氧化胁迫, 说明抗氧化系统在小白菜对 Cd 的解毒中发挥作用. 这些抵御机制降低了游离 Cd 的破坏作用, 提高了对 Cd 的耐受能力; 谷胱甘肽(GSH)在协调 PCs 络合钝化游离态 Cd 和抗氧化酶系统抵御 Cd 的氧化损伤过程中发挥了“枢纽”作用. 这些研究结果不但为植物体内 PCs 的络合钝化及抗氧化系统协同抵御 Cd 的诱导氧化胁迫提供了实验证据, 而且深化了对植物自身本能的抵御重金属污染损伤机制的理解.

关键词 镉 小白菜 植物络合素 抗氧化酶

一些过渡金属元素如铜(Cu)和锌(Zn)在适当的浓度下对维持正常生命活动过程的进行非常重要, 如保持生物大分子构象、参与氧化还原反应、核酸的新陈代谢和大量的酶催化反应; 相反, 镉(Cd)作为另外一种过渡金属元素却几乎对所有的生命体都有毒害作用^[1], 它可以通过空气、土壤、水和食物链被植物、动物和人类所吸收^[2]. 然而, 任何一种形态的生命体都有它自身抵御侵害的保护系统或机制. 研究表明, 在 Cd 的胁迫下植物体内主要诱导产生植物络合素(phytochelatin, PCs), 而在动物体内诱导产生金属硫蛋白(metallothioneins, MTs). 通过这些多肽或蛋白与 Cd 络合, 使 Cd 被转换/或隔离成一种生命体的生理过程可代谢或可忍受的钝化形态^[3~5]. 对于植物而言, Cd 诱导产生的 PCs 是一类具有重复 $\gamma\text{-Glu-Cys}$ 二肽且 C 端为 Gly 的家族多肽. 它的基本结构是 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, 其中 $n = 2\sim 11$ ^[4]. 另外, 在一些种属的植物中也存在 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ 和 $\text{Cys}(\gamma\text{-Glu-Cys})_{(n-1)}\text{-Gly}$ 等异构体^[6]. PCs 的合成从 PC 合酶(即 $\gamma\text{-Glu-Cys}$ 二肽转移

酶)的活化开始, 它可以被很多种金属离子激活, 其中活化能力最强的是 Cd^[7]. Howden 等人^[8]通过对 Cd 敏感的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)突变株研究证实了 PCs 确实参与细胞抵御 Cd 的机制. Cobbett^[9]和 Ha^[10]的研究小组的研究结果再次证实两种 Cd 敏感的拟南芥(*A. thaliana*)突变株无法合成谷胱甘肽(GSH)和 PCs; 在印度芥菜 *Brassica juncea* 过量表达 GSH 合成酶和 PC 合酶可提高 PCs 的合成且增强了对 Cd 的抵抗能力^[11]. 另一方面, 高浓度的 Cd 会诱导产生活性氧(ROS)如超氧自由基(O_2^-), 过氧化氢 (H_2O_2), 单氧和氢氧自由基(OH)而产生氧化胁迫^[12]. ROS 可能导致非选择性的蛋白和膜的氧化, 引发 DNA 变异, 从而影响细胞的生存发育^[13]. ROS 含量变化已经在很多被 Cd 胁迫的植物中观察到^[13~15], 植物细胞也因此产生一系列抗氧化抵御机制, 包括非酶抗氧化物如 GSH、抗坏血酸(ASA)和酶抗氧化物如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物

2007-08-20 收稿, 2007-11-05 接受

国家自然科学基金(批准号: 20535020 和 20475046)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA06Z404)和国家重大基础研究发展计划(批准号: 2003CD415001)资助项目

酶(APX)和愈创木酚过氧化物酶(POD)等^[16,17]。但是,一些研究者认为氧化胁迫并不是导致 Cd 毒害的首要原因^[18]。

我们以在中国广泛播种的蔬菜——小白菜(*Brassica chinensis* L.)作为模型植物,研究 Cd 胁迫下小白菜超富集 Cd 的能力及其体内所产生的生物化学响应,试图从分子水平上研究 PCs, GSH 和一些典型抗氧化酶(SOD, CAT, APX 和 POD)在抵抗 Cd 毒害过程中的协同作用机制。这些结果将有助于理解植物在外界毒物入侵时所自发产生的保护机制。

1 实验

() 植物材料和生长条件。水培:日本花冠小白菜种子用去离子水浸透,放在有润湿滤纸的培养皿中,上面再盖一张湿滤纸,于暗处室温下催芽。3 d 后将幼苗小心转移到盛有 1/4 强度的 Hoagland 营养液的 100 mL 烧杯里,每天以 1/4 改良的 Hoagland 营养液喷淋^[19]。苗龄达 14 d 之后用含不同浓度 CdSO₄ 的 1/4 强度的改良 Hoagland 营养液培养。设置 5 个浓度梯度,分别为 0, 25, 50, 100 和 200 μmol·L⁻¹,每个浓度平行 3 组实验,培养 6 d。小白菜在约 60%湿度的室内培养,温度(25±1) °C,每天 700 μmol·m⁻²·s⁻¹ 的光照强度下光照 16 h。营养液每两天更换一次,pH 控制在 5.5~6.0 之间。6 d 之后,将小白菜采集,根部用预冷的 0.02 mol·L⁻¹ EDTA 溶液浸泡 15 min 以交换根部外表面吸附的 Cd,清洗干净,将多余的水用滤纸吸干,最后将小白菜根部和其余部分分开,待用。

土培:从农田里取土壤,阴干后,称取适量,并加入以 CdSO₄ 配制 Cd 溶液,使土壤含 Cd 量分别为 2, 20 和 200 μg·g⁻¹。将日本花冠小白菜种子种入土中,加入 1/4 强度改良的 Hoagland 营养液致土壤湿透,之后每天以 1/4 强度改良的 Hoagland 营养液喷淋。小白菜在湿度约 60%的室内培养,培养温度(25±1) °C,每天在 700 μmol·m⁻²·s⁻¹ 的光照强度下光照 16 h。生长 30 d 之后,将小白菜采集,并用 0.02 mol·L⁻¹ 预冷的 EDTA 溶液浸泡根部 15 min 以交换根部表面吸附的 Cd,清洗干净,将多余的水用滤纸吸干,最后将小白菜根部和其余部分分开,待用。

() 小白菜对 Cd 的吸收及其分布。待小白菜收获之后,将一定质量的根和地上部分在 80 °C 下于通用电烘箱中烘 24 h 至恒重。分别准确称量一定质

量的小白菜的根部和地上部分样品,并用 5 mL 硝酸室温下预消解 12 h,然后再加入 1 mL HClO₄,在电热板上加热消解至溶液呈无色或淡黄色,将酸蒸发至近干直至无白烟(高氯酸蒸汽)冒出,最后用 2%的硝酸溶液溶解残渣,并定容至 25 mL 容量瓶中。用 DRC ICP-MS (PerkinElmer-SCIEX, Canada)测定其中 Cd 含量。

Cd 在亚细胞中的分布根据 Yang 等人^[20]的方法测定。取一定质量 200 μmol·L⁻¹ Cd 胁迫的新鲜小白菜地上部分于研钵中研磨,并用预冷的 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)溶解。然后均浆液在 600×g 离心 5 min,得到的残渣主要含细胞壁;将上层清液在 2000×g 离心 10 min,得到的残渣主要含叶绿体和细胞核;最后将上层清液在 12000×g 下离心 15 min,得到的残渣主要含线粒体,而剩下的上层清液主要是细胞溶质。将得到的 4 个组分用硝酸消解并定容用 ICP-MS 测量 Cd 的含量。

() RP-LC 测定 PCs 和相关含巯基多肽。称取适量样品放入研钵,加液氮研磨,氮气保护下加入预冷并氮气饱和的水,再加入 33 μL 浓度为 6 mol·L⁻¹ 的盐酸混匀,4 °C 下萃取 15 min,然后以 20000×g 低温离心 15 min,上层清液在 -20 °C 保存。PCs 及其相关含巯基多肽的色谱分离采用梯度洗脱方式^[21]:流动相从含有 0.02%三氟乙酸(TFA)的 2%乙腈(ACN)在 25 min 内线性增加到 25% ACN,然后以 25% ACN 洗脱至 30 min。流量为 0.15 mL·min⁻¹。样品 100 μL 进样后在柱后用 5,5-二硫代二(2-硝基苯甲酸)(DTNB)衍生,衍生剂的流量为 0.05 mL·min⁻¹,于 410 nm UV 检测。PCs 总量(ΣPC)以 PC 异构体所含半胱氨酸的摩尔浓度总和表示。UV 所检测到的各个峰的归属:将色谱流出物分流,以 50 μL·min⁻¹ 直接进入 ESI-MS/MS (ESI-QUIRE-LC, Bruker Daltonik, Germany)进行鉴定。

() H₂O₂ 和膜脂过氧化程度的测定。取 0.5 g 新鲜的小白菜茎叶,液氮研磨,并溶解在 2.5 mL 50 mmol·L⁻¹ 磷酸钠溶液(pH 6.8)中,15000×g 下冷冻离心 10 min,取上层清液分析。H₂O₂ 含量采用 Gay 和 Gebicki 有氧分析方法进行测定^[22]。膜脂过氧化采用六代巴比妥酸(TBA)的方法进行测量^[23]。

() 酶活力的测量。取一定量的小白菜茎叶,液氮研磨,用含 1 mmol·L⁻¹ EDTA 和 1%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的 100 mmol·L⁻¹ 磷酸钠(pH 7.5)溶液提取。均浆液在 25000×g 下冷冻离心 20 min,取上层清液并冷冻保存备用。对于 APX 粗酶的提取,提取液为于上

述溶液中再加入 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASA. 提取液中的蛋白浓度根据 Bradford 的方法测量^[24]. 酶的活性根据下列各个方法测量: SOD-Beyer 和 Fridovich^[25]; CAT-Chance 和 Maehly^[26]; POD-Shah 等^[27]; APX-Chen 和 Asada^[28]. 以上所有溶液均以超纯水配制.

2 结果

2.1 小白菜对 Cd 的吸收及分布

考虑到 Cd 污染土壤中的 Cd 浓度范围一般在 $6.2 \sim 35.7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[29], 小白菜吸收 Cd 的能力通过含 $5 \sim 200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 的水培胁迫来进行研究. 实验结果显示小白菜根部和地上部分 Cd 浓度随着培养液中 Cd 浓度的增加而升高(图 1). 在 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 的胁迫下, 小白菜地上部分富集(150.0 ± 17.8) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (干重), 而根部富集(536.7 ± 34.8) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (干重), 它们的生物富集系数(干重组织的 Cd 浓度/培养液中的 Cd 浓度)分别为 268 和 957. 值得注意的是小白菜虽然在 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 如此高 Cd 的胁迫下仍能生存, 而且它们地上部分亚细胞 Cd 分布如下: 细胞壁中含(22.0 ± 8.7) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 占 37.2%; 叶绿体和细胞核部分中含(3.3 ± 0.7) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 占 6.0%; 线粒体部分中含(2.4 ± 0.4) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 占 4.4%; 细胞溶质部分中(29.5 ± 7.8) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 占 52.4%. 图 2 显示了土培后小白菜地上部分含 Cd 的浓度. $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd 培养的小白菜地上部分 Cd 含量高达 $261.66 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (干重).

2.2 Cd 胁迫下 PCs 的诱导合成

小白菜在 Cd 的胁迫下诱导产生 Cd 结合多肽(图 3(a)~(c)和表 1). 图 3(a)~(c)分别对应对照组、Cd 胁迫

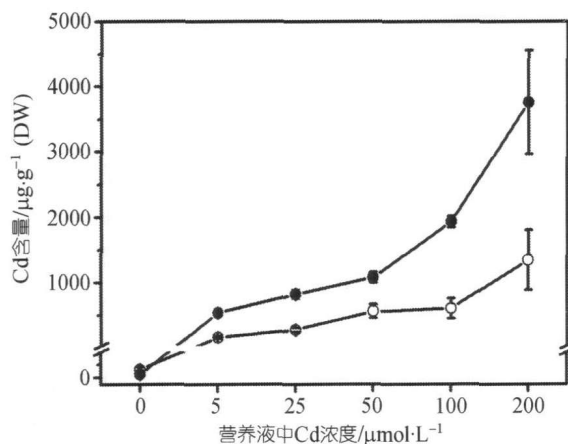


图 1 小白菜在不同浓度 Cd 胁迫 6 d 后根部(●)和地上部分(○)Cd 含量
误差条表示 3 次培养的 9 次平行实验的标准偏差. DW, 干重

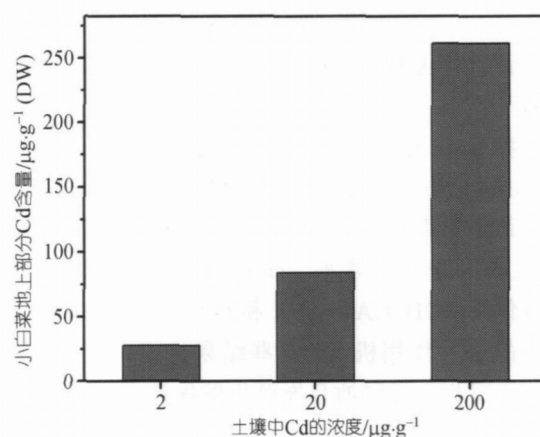


图 2 不同浓度的 Cd 土培 30 d 后小白菜地上部分 Cd 含量的测定

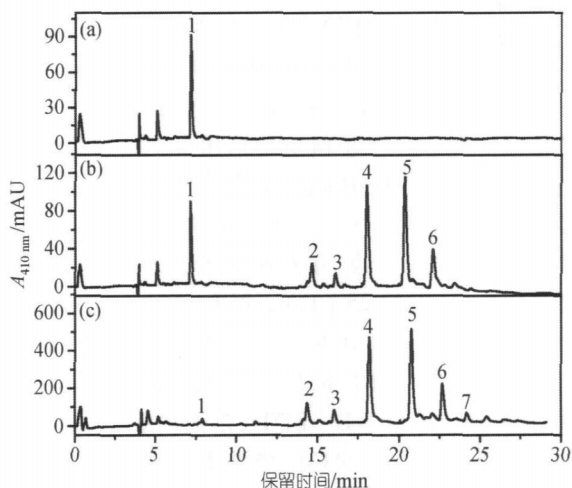


图 3 小白菜对照组根部(a)、Cd 胁迫地上部分(b)和 Cd 胁迫根部(c)的植物络和素及其相关巯基多肽的 HPLC 色谱图
峰的归属: 1, GSH; 2, PC₂; 3, desGlu-PC₃; 4, PC₃; 5, PC₄; 6, PC₅; 7, PC₆; 以及一些未确认的 SH-多肽

的小白菜地上部分和根部的 HPLC 柱后衍生色谱图. 除了 GSH 的峰外, Cd 胁迫的小白菜地上部分检测到 PCs [$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$]($n = 2, 3, 4, 5$), 而根部检测到 $n = 2, 3, 4, 5, 6$ 的 PCs. 另外, 我们在植物的地上部分和根部都发现 desGlu-PC₃ 多肽, 这个多肽也曾在玉米中发现过^[30]. 它可能是 PC₃ 多肽 N 端的氨基酸被 $\gamma\text{-Glutamyl}$ 转肽酶水解而产生的^[31]. 在小白菜对照组里我们没有发现 PCs 的存在(图 3(a)和表 1). 从表 1 可以看出小白菜地上部分 PCs 主要是 PC₃ 和 PC₄, 而根部主要是以 PC₃, PC₄ 和 PC₅ 的形式存在. 在根部, PC₂ 的含量在整个 Cd 胁迫的范围内基本不变. Cd 和

PC 的比例分别是小白菜地上部分 1.0~3.2, 根部 1.4~3.2. 表 1 也显示了 GSH 随着 Cd 胁迫的变化而变化较大: 小白菜地上部分和根部 GSH 的含量随着 Cd 浓度的增加先增大然后又下降.

2.3 小白菜在 Cd 胁迫下的被氧化程度和抗氧化能力

H₂O₂ 和丙二醛(MDA)是重金属胁迫下的两个最主要的产物. H₂O₂ 含量随 Cd 胁迫浓度的增加(5~200 μmol·L⁻¹)而呈上升趋势(表 2). 200 μmol·L⁻¹ Cd 胁迫下的 H₂O₂ 含量是对照组的近 2 倍. MDA 的含量虽有一些波动, 但在 200 μmol·L⁻¹ Cd 的胁迫下增加了 34.7%(表 2).

植物分解 ROS 的能力主要依靠诱导抗氧化酶 SOD, CAT, APX 和 POD 的活力得以实现. 为了了解

Cd 胁迫下的植物体内的抗氧化酶所起的作用, 我们检测了 SOD, CAT, APX 和 POD 的活力(表 3). 作为细胞内 O₂ 的清除者-SOD 的活力在 Cd 的胁迫下没有太大的变化, 只是在 100 和 200 μmol·L⁻¹ 的 Cd 胁迫下分别有 17.4%和 18.6%的降低. CAT, APX 和 POD 作为 3 个清除 H₂O₂ 的主要酶, 主要是在细胞内不同部位维持 H₂O₂ 在一个稳定的水平. 表 3 的数据显示这 3 种酶在 Cd 的作用下都被激活. CAT 的活力在整个 Cd 胁迫的浓度范围内都有很大的上升, 如在 100 μmol·L⁻¹ Cd 胁迫下有将近 50%的上升; 虽在 200 μmol·L⁻¹ Cd 的胁迫下 CAT 的活力有所下降, 但依然高于对照组. POD 的活力随着培养液中 Cd 浓度的增加而增大, 在 100 μmol·L⁻¹ Cd 作用下 POD 活力达

表 1 不同浓度 Cd 胁迫下小白菜在根部和地上部分诱导产生的 GSH 和 PC 异构体的含量^{a)}

植物组织	Cd /μmol·L ⁻¹	GSH /nmol·g ⁻¹ (FW) ^{b)}	PCs/nmol·g ⁻¹ (FW) ^{b)}						ΣPC ^{c)} /nmol·g ⁻¹ (FW) ^{b)}
			PC ₂	PC ₃	desGlu-PC ₃	PC ₄	PC ₅	PC ₆	
地上部分	0	13.6 ± 1.3	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}
	5	57.2 ± 1.1	6.0 ± 0.4	8.3 ± 0.3	0.4 ± 0.2	4.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	n.d. ^{d)}	60.3 ± 3.1
	25	46.9 ± 1.8	10.3 ± 2.7	46.3 ± 2.0	1.1 ± 0.3	35.1 ± 3.4	1.6 ± 0.4	n.d. ^{d)}	311.4 ± 27.3
	50	64.0 ± 5.2	44.6 ± 3.2	69.9 ± 4.6	1.3 ± 0.1	52.2 ± 4.1	3.3 ± 0.3	n.d. ^{d)}	528.4 ± 38.5
	100	57.3 ± 9.8	47.4 ± 9.9	98.5 ± 7.8	2.3 ± 0.5	68.4 ± 7.4	4.3 ± 0.7	n.d. ^{d)}	692.4 ± 77.7
	200	26.9 ± 2.0	79.9 ± 0.8	123.8 ± 4.9	3.8 ± 0.9	73.7 ± 1.7	4.7 ± 0.2	n.d. ^{d)}	861.2 ± 26.8
根部	0	10.4 ± 1.0	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}
	5	27.4 ± 1.3	7.3 ± 0.9	58.8 ± 2.9	0.7 ± 0.2	58.6 ± 2.2	13.5 ± 0.9	2.2 ± 0.2	508.0 ± 24.6
	25	58.0 ± 8.2	12.6 ± 0.8	107.1 ± 4.6	5.8 ± 0.7	124.8 ± 2.6	35.7 ± 2.1	4.0 ± 0.4	1065.6 ± 38.7
	50	152.2 ± 23.2	11.7 ± 2.2	130.6 ± 6.0	3.4 ± 1.0	149.1 ± 2.6	47.8 ± 6.9	4.6 ± 0.6	1288.6 ± 70.6
	100	53.8 ± 21.0	9.5 ± 0.7	157.2 ± 3.4	5.4 ± 0.3	158.7 ± 4.3	41.5 ± 5.8	6.8 ± 0.2	1390.2 ± 35.7
	200	26.6 ± 3.5	9.5 ± 0.6	223.6 ± 7.8	4.3 ± 0.5	199.2 ± 3.8	37.3 ± 0.8	5.6 ± 0.2	1719.8 ± 45.2

a) n = 9; b) FW, 鲜重; c) SPC 数据是所检测到的 PC 异构体所有 Cys 总数的摩尔浓度; d) n.d., 未检测到

表 2 不同浓度 Cd 胁迫下小白菜地上部分产生的 H₂O₂ 和 MDA 的含量^{a)}

氧化胁迫	Cd 浓度/μmol·L ⁻¹					
	0	5	25	50	100	200
H ₂ O ₂ /μmol·g ⁻¹ (FW)	120.3 ± 14.1	101.0 ± 14.6	128.2 ± 17.2	145.9 ± 49.8	180.3 ± 28.4	238.9 ± 13.4
MDA/nmol·g ⁻¹ (FW)	4.66 ± 0.18	5.13 ± 0.18	5.23 ± 0.38	5.14 ± 0.57	4.82 ± 0.52	6.28 ± 0.48

a) n = 9

表 3 不同浓度 Cd 胁迫下小白菜地上部分抗氧化酶 SOD, CAT, POD 和 APX 的活力^{a)}

酶活力/U·mg ⁻¹ (蛋白)·min ⁻¹	Cd 浓度/μmol·L ⁻¹					
	0	5	25	50	100	200
SOD	31.7 ± 3.5	33.4 ± 3.0	34.2 ± 6.9	30.4 ± 1.7	25.8 ± 2.3	26.2 ± 3.4
CAT	238.4 ± 25.4	329.8 ± 59.6	264.3 ± 29.0	306.8 ± 25.8	358.1 ± 68.2	284.46 ± 34.6
POD	0.20 ± 0.04	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.06	0.32 ± 0.02	0.35 ± 0.04	0.30 ± 0.04
APX	0.78 ± 0.22	1.44 ± 0.26	2.25 ± 0.14	1.33 ± 0.14	1.20 ± 0.09	1.68 ± 0.18

a) n = 9

到最大,与对照组相比约增加75%。APX活力在5~25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd胁迫下增加极快,在25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时是对照组的289%,然后随着培养液中Cd浓度的增加而迅速地被抑制,但仍高于对照组。

3 讨论

研究表明,十字花科(Brassicaceae)家族的植物都可以在它们的根部及地上部分富集Cd^[32,33]。*Thlaspi caerulescens*是十字花科家族的一种Cd超富集植物,在200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd的胁迫下可以在它们地上部分富集1140 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的Cd^[34]。欧洲油菜(*Brassica juncea* L.)在25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd的作用下可以富集200~1200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的Cd^[35]。我们的实验结果显示小白菜在200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd土培胁迫下其地上部分可以富集261.7 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (干重)的Cd。Baker等人^[36]认为在自然土壤中生长的植物地上部分Cd含量超过100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (干重),就可认为这种植物为Cd超富集植物。而我们的土培实验结果远远超过这个阈值,可认为小白菜是一种很有潜力超富集Cd的植物。

图4(a)和(b)阐明了小白菜体内Cd浓度与 ΣPC 和

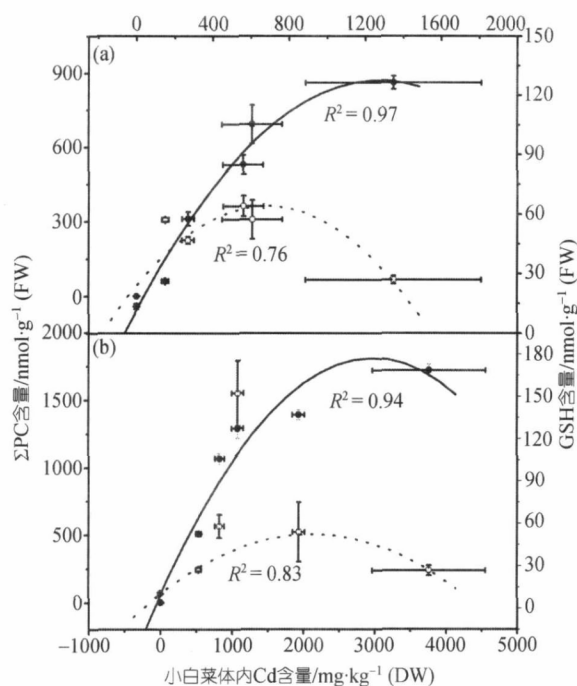


图4 小白菜地上部分(a)和根部(b)Cd浓度和 ΣPC 浓度(●)及GSH浓度(○)的关系

实线表示 ΣPC 和Cd浓度之间的相关变化趋势,点线表示GSH和Cd浓度之间的相关变化趋势。 ΣPC 数据是所检测到的PC异构体所有Cys总数的摩尔浓度。误差条表示3次培养的9次平行实验的标准偏差。DW,干重。FW,鲜重

GSH之间的相关性。Cd在小白菜体内的超富集和PCs的诱导合成速度加快相一致,说明PCs的合成对Cd超富集和超耐受能力非常重要。另一方面,由于Cd在细胞中的加速富集导致PCs的加快合成,反过来也诱导PC合酶增加GSH的含量。但在200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高浓度Cd胁迫下,PCs似乎被Cd饱和,而GSH的浓度也下降了(图4(a)和(b)),说明小白菜体内富集Cd的量已超过它对Cd的解毒容量。在根部,PC₂在不同Cd浓度胁迫下的浓度与PCs的合成途径有关,因为PCs的合成前体不仅有GSH也有PC₂^[37]。Grill等人^[21]发现当单一的PC₂和PC合酶一起培养时有PC₄产生。理论上,Cd与PCs上的巯基相互作用,PCs中的巯基和Cd的摩尔比率为4。当加入过量的Cd时,PCs可以被Cd饱和,PCs中巯基和Cd的摩尔比率近为1^[38]。我们的实验显示PC和Cd的摩尔比率地上部分为1.00~3.32,根部为1.37~3.22,说明小白菜PCs的含量足够结合大部分Cd。另外,体外合成检测到的Cd₁₋₂PC₂和Cd₁₋₃PC₃₋₅络合物也证实了这结论^[39]。一些研究也报道了Cd和PCs相似的关系:在蛇根木(*Rauvolfia serpentina*)中PC和Cd的摩尔比率为3.78^[40],在玉米中为1.01^[40]。综上所述,本实验得到的结果说明PC参与了小白菜对Cd的耐受机制。

GSH是植物体内一种重要的巯基三肽,它参与植物的代谢活动。因此,它的浓度受一个复杂的生理平衡机制所控制,而这个生理平衡也需要硫的参与。本实验中Cd以CdSO₄的形式加入,可以增加硫的吸收并有利于Cd通过与PCs的结合而被吸收。实验结果显示在不同浓度Cd胁迫下GSH的含量也发生很大的变化(表1)。GSH水平的增加源于Cd诱导参与GSH合成的基因如 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和GSH合成酶大量转录,而GSH水平的下降是因为Cd引起PCs的合成而大量消耗GSH^[40,41]。除了作为PCs合成的前体,GSH也是一种细胞内重要的ROS清除物质。作为抗氧化剂,GSH联合ASA和抗氧化酶如SOD,CAT,APX和POD共同控制细胞内ROS的浓度。实验中在高浓度Cd的胁迫下,H₂O₂含量的增加和膜脂过氧化说明Cd诱导产生小白菜的氧化损伤。在拟南芥(*A. thaliana*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)和豌豆(*Pisum sativum* L. cv. Azad)等植物的研究中也发现类似的结果^[13,42,43]。与Cu相反,Cd并不是直接作用诱导产生ROS^[44],增强的氧化胁迫可能与抗氧化剂GSH的含量和抗氧化酶活力的下降以及钙维持系统

的活化和铁参与反应过程受抑制等因素有关^[45]。膜酯过氧化的加强可能是由于细胞内各个部分过量产生的 H₂O₂ 或有毒 ROS 衍生物的毒害作用^[46]。

SOD 被认为是植物体第一个抗氧化抵御酶, 它参与了将 O₂ 转变为 H₂O₂ 和 O₂ 的过程, 来维持 O₂ 在一个稳定水平^[47]。然而, 本实验的结果却没有显示 SOD 活力在 Cd 的胁迫下发生很大的变化(表 2)。观察在不同胁迫条件下不同植物物种里 SOD 的活力变化说明氧化损伤可能有不同的机制^[48,49]。近期的一些研究同样也证明了当植物在环境和化学物质的胁迫下 GSH 和 H₂O₂ 是信号传输的中心物质, 而且 H₂O₂ 也是一个在活化细胞抵御系统包括 CAT, POD 和 APX 在内的重要的信号分子^[50-52]。以往的报道显示, 在 Cd 的胁迫下植物体会产生很多反应, 包括这些抗氧化酶活力的增加或降低^[53-55]。而本实验的结果显示小白菜暴露在低浓度的 Cd 时酶活力都增强, 而在高浓度时则降低。与对照组相比, 小白菜地上部分 CAT 的活力有很多的增强, 说明在 Cd 的胁迫下 CAT 清除 H₂O₂ 的能力被激活。POD 活力水平的上升也说明 Cd 可能引发植物体内的第二种代谢如木质化。CAT 和 POD 的活力在 200 μmol·L⁻¹ Cd 作用下呈下降趋势, 可能是因为 ROS 使酶失活, 也可能是因为酶合成能力下降或者它们结构发生了变化^[56]。

APX 是一种植物细胞内分布最为广泛的抗氧化酶。在实验中, APX 的活力在 5~25 μmol·L⁻¹ Cd 的作用下快速增长(表 3); 而当培养液中 Cd 浓度进一步增加时, 小白菜地上部分 Cd 的加速富集强烈地抑制了 APX 的活力。APX 参与的 H₂O₂ 解毒是通过 ASA 的氧化反应进行的, 而被氧化的 ASA 又需要 GSH 将之还原^[57]。因此 GSH 含量的下降导致了 APX 活力的下降(图 5 和表 3)。虽然下降的 APX 活力可通过上升的 CAT 和 POD 活力补偿, 但在 200 μmol·L⁻¹ Cd 胁迫下细胞的氧化程度似乎超出了其抗氧化抵御能力, 并过度产生 H₂O₂。因为 CAT 结合 H₂O₂ 的能力很低(K_m = 0.047~1.1 mol·L⁻¹), 大部分组织的 CAT 并不能很有效地消除 H₂O₂^[58]。而过氧化酶对 ASA 的亲和能力远远高于愈创木酚, 所以大部分 H₂O₂ 的消除可能归功于具有与 H₂O₂ 高亲和力的 APX^[58]。实验结果表明, APX 和 PCs 在 Cd 解毒过程中互相协同, 证实了不管是 APX 活力下降还是 PC 合成减小都会导致 H₂O₂ 的积累。

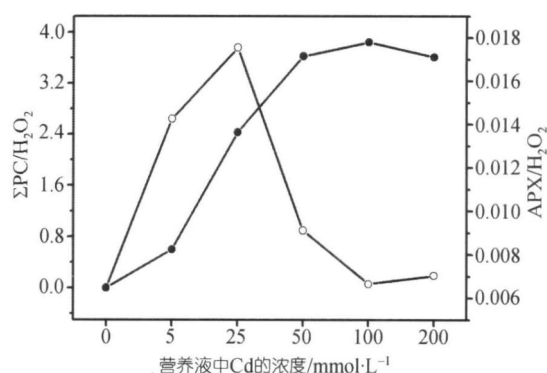


图 5 不同浓度 Cd 胁迫下小白菜地上部分 ΣPC-H₂O₂(○) 和 APX-H₂O₂(●) 的关系图

ΣPC 数据是所检测到的 PC 异构体所有 Cys 总数的摩尔浓度

总的来说, 当小白菜体内出现高浓度的 Cd 时, 一部分 Cd 诱导 PCs 合成, 而另一部分诱导氧化胁迫。首先在 γ-GluCys 合成酶和 GSH 合成酶的作用下产生的 GSH, 并在 Cd 诱导和 PC 合酶的作用下合成 PCs, 生成的 PCs 与游离 Cd 结合, 生成钝化的 Cd-PC 并传输到液泡中。同时, 过量的 Cd 诱导产生 ROS。O₂ 被 SOD 歧化分解产生 H₂O₂, 而 H₂O₂ 被 APX, CAT 和 POD 分解清除。在 APX 催化的反应中 ASA 被 H₂O₂ 氧化为脱氢 ASA(DHA), 而 DHA 通过 GSH 非酶或酶作用下还原成 ASA。这些反应降低了游离 Cd 的损害(低 MDA 水平)并导致高浓度 Cd 的富集和耐受。然而, 因为 GSH 是这两条解毒路径的关键物质, 所以在高浓度 Cd 的胁迫下, GSH 的水平下降必然导致解毒能力的下降和 H₂O₂ 的积累, 而这些将导致未成熟细胞的死亡。

参 考 文 献

- 1 Tyler G, Balsberg P A M, Bengtsson G, et al. Heavy metal ecology and terrestrial plants, micro-organisms and invertebrates. *Water Air Soil Pollut*, 1989, 47(3-4): 189—215
- 2 Wagner G J. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron*, 1993, 51: 173—212
- 3 Vögeli-Lange R, Wagner G J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiol*, 1990, 92(44): 1086—1093
- 4 Rauser W E. Phytochelatin and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol*, 1995, 109(4): 1141—1149
- 5 Tomsett A B, Thurman D A. Molecular biology of metal tolerances in plants. *Plant Cell Environ*, 1988, 11(5): 383—394
- 6 Rauser W E. Structure and function of metal chelators produced by plants: The case for organic acids, amino acids, phytyl and metal-

- lothioneins. *Cell Biochem Biophys*, 1999, 31(1): 19—48
- 7 Cobbett C S. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3(3): 211—216
- 8 Howden R, Andersen C R, Goldsbrough P B, et al. A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1995, 107(4): 1067—1073
- 9 Cobbett C S, May M J, Howden R, et al. The glutathione-deficient cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant J*, 1998, 16(1): 73—78
- 10 Ha S B, Smith A P, Howden R, et al. Phytochelatin synthase genes in *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*, 1999, 11(6): 1153—1163
- 11 Zhu Y L, Pilon-Smits E A H, Tarun A S, et al. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol*, 1999, 121(4): 1169—1177
- 12 Hendry G A F, Baker A J M, Ewart C F. Cadmium tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive clones of *Holcus lanatus*. *Acta Bot Neerl*, 1992, 41(3): 271—281
- 13 Dixit V, Pandey V, Shyam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J Exp Bot*, 2001, 52(358): 1101—1109
- 14 Skórzyńska-Polit E, Drażkiwicz M, Krupa Z. The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. *Biol Plant*, 2003, 47(1): 71—78
- 15 Wójcik M, Kórzyńska-Polit E, Tukiendorf A. Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd stress. *Plant Growth Regul*, 2006, 18(2): 145—155
- 16 Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 249—279
- 17 Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 601—639
- 18 de Vos R C H, Vonk M J, Vooijs R, et al. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol*, 1992, 98(3): 853—858
- 19 Feldmann K A, Marks M D. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Mol Gen Genet*, 1987, 208(1-2): 1—9
- 20 Yang J R, Bao Z P, Zhang S Q. Distribution and chemical binding forms of Cd, Pb in plant cell. *Chi Environ Sci*, 1993, 13(4): 263—268
- 21 Grill E, Winnacker E L, Zenk M H. Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(2): 439—443
- 22 Gay C, Gebicki J M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xyleneol organic hydroperoxide assay. *Anal Biochem*, 2000, 284(2): 217—220
- 23 Dhindsa R S, Dhindsa P, Thorpe T A. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot*, 1987, 32(1): 93—101
- 24 Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—254
- 25 Beyer W F, Fridovich Y. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem*, 1987, 161: 559—566
- 26 Chance B, Maehly A C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol*, 1955, 2: 764—775
- 27 Shah K, Kuma R G, Verma S, et al. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci*, 2001, 161(6): 1135—1144
- 28 Chen G X, Asada K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol*, 1989, 30(7): 987—998
- 29 Salt D E, Wagner G J. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd/H antiport activity. *J Biol Chem*, 1993, 268(17): 12297—12302
- 30 Chassaing H, Vacchina V, Kutchan T M, et al. Identification of phytochelatin-related peptides in maize seedlings exposed to cadmium and obtained enzymatically in vitro. *Phytochemistry*, 2001, 56(7): 657—668
- 31 Martin M N, Slovin J P. Purified γ -Glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiol*, 2000, 122(4): 1414—1426
- 32 Nanda-Kumar P B A, Dushenkov V, Motto H, et al. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ Sci Technol*, 1995, 29(5): 1232—1238
- 33 Salt D E, Prince R C, Pickering I J, et al. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol*, 1995, 109(4): 1427—1433
- 34 Brown S L, Chaney R L, Angle J S, et al. Zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown in nutrient solution. *Soil Sci Soc Am J*, 1995, 59(1): 125—133
- 35 Ishikawa S, Noriharu A E, Mutakami M, et al. Is *Brassica juncea* a suitable plant for phytoremediation of cadmium in soils with moderately low cadmium contamination?—Possibility of using other plant species for Cd-phytoextraction. *Soil Sci Plant Nutr*, 2006, 52(1): 32—42
- 36 Baker A J M, McGrath S P, Reeves D R, et al. Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. Boca Raton: CRC Press, 2000. 171—188

- 37 Zenk M H. Heavy metal detoxification in higher plants—a review. *Gene*, 1996, 179(1): 21—30
- 38 Strasdeit H, Duhme A K, Kneer R, et al. Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *J Chem Soc Chem Commun*, 1991, 16: 1129—1130
- 39 Chen L Q, Guo Y F, Yang L M, et al. SEC-ICP-MS and ESI-MS/MS for analyzing *in-vitro* and *in-vivo* Cd-phytochelatin complexes in a Cd-hyperaccumulator *Brassica chinensis*. *J Anal At Spectrom*, 2007, 22(11): 1403—1408
- 40 Meuwly P, Rauser W E. Alteration of thiol pools in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium: Adaptation and developmental cost. *Plant Physiol*, 1991, 99(1): 8—15
- 41 Xiang C B, Oliver D J. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10(7): 1539—1550
- 42 Cho U H, Seo N H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci*, 2005, 168(1): 113—120
- 43 Boominathan R, Doran P M. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83(2): 158—167
- 44 di Toppi L S, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot*, 1999, 41(2): 105—130
- 45 Okamoto O K, Pinto E, Latorre L R, et al. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2001, 40(1): 18—24
- 46 Bowler C, Montagu M V, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43: 83—116
- 47 Alscher R G, Erturk N, Heath L S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot*, 2002, 53(372): 1331—1341
- 48 Yu Q, Rengel Z. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutase in narrow-leaved lupins. *Plant Sci*, 1999, 142(1-2): 1—11
- 49 Yu Q, Rengel Z. Waterlogging influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leaved lupin and transgenic tobacco plants. *J Plant Physiol*, 1999, 155(3): 431—438
- 50 Foyer C H, Lopez-Delgado H, Dat J F, et al. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol Plant*, 1997, 100(2): 241—254
- 51 Prasad T K, Anderson M D, Martin B A, et al. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 1994, 6(1): 65—74
- 52 Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, et al. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 284(5414): 654—657
- 53 Gallego S M, Benavides M P, Tomaro M L. Effect of cadmium ions on antioxidative defense system in sunflower cotyledons. *Biol Plant*, 1999, 42(1): 49—55
- 54 Srivastava M S, Tripathi R D, Govindarajan R, et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol Biochem*, 2006, 44(1): 25—37
- 55 Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol*, 2001, 127(3): 887—892
- 56 Verma S, Dubey R S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci*, 2003, 164(4): 645—655
- 57 Metwally A, Safronova V I, Belimov A A, et al. Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *J Exp Bot*, 2005, 56(409): 167—178
- 58 Dalton D A, Hanus F J, Russell S A, et al. Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules. *Plant Physiol*, 1987, 83(4): 789—794