

中国莲(*Nelumbo nucifera*)幼苗抗氧化系统对砷胁迫的响应

樊香绒^{1,2,3}, 尹黎燕^{1,2}, 李伟^{1,2*}, 常锋毅^{1,2*}

(1. 中国科学院水生植物与流域生态重点实验室, 武汉 430074; 2. 中国科学院武汉植物园
水生生物学实验室, 武汉 430074; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:为了研究中国莲(*Nelumbo nucifera*)抗氧化系统对砷胁迫的响应,研究比较了两种不同价态无机砷 As(Ⅲ)和砷 As(V)对中国莲幼苗可溶性蛋白含量、丙二醛(MDA)含量以及抗氧化系统的影响。结果表明,中国莲幼苗中MDA和可溶性蛋白质含量随砷浓度的增加呈现先升高后降低的趋势。中国莲幼苗的MDA和蛋白质含量受As(V)的影响不如As(Ⅲ)敏感。抗氧化系统酶中,超氧化物歧化酶(SOD)对砷处理最敏感,当As(Ⅲ)浓度在2.5 μmol/L和As(V)浓度在100 μmol/L时, SOD酶活性显著高于对照组。过氧化物酶(POD)在As(Ⅲ)处理浓度为10 μmol/L时就出现显著上升,相对而言,过氧化氢酶(CAT)对As(V)比较敏感。实验结果表明,随着浓度的增加,砷对幼苗产生的氧化胁迫导致SOD、CAT和POD三种酶活性有所增加,以配合清除细胞内的活性氧自由基(ROS),维持细胞代谢的稳定。本研究为进一步研究砷胁迫下莲的生理和生长变化、以及莲的培育和移植提供了部分基础数据。

关键词:中国莲; 抗氧化系统; 砷

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)06-0570-06

Responses of the Antioxidant System in *Nelumbo nucifera* Seedlings to Arsenic Toxicity

FAN Xiang-Rong^{1,2,3}, YIN Li-Yan^{1,2}, LI Wei^{1,2*}, CHANG Feng-Yi^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Botany and Watershed Ecology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China;
2. Laboratory of Aquatic Plant Biology, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China;
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: To study the antioxidant system of *Nelumbo nucifera* seedlings in response to arsenic stress, compared the influence of two valences of inorganic arsenic, As(Ⅲ) and As(V), on soluble protein content, malondialdehyde(MDA) and the antioxidant system. Results showed that: MDA and soluble protein content of *N. nucifera* seedlings increased and then decreased with increasing concentration; MDA and protein content were more sensitive to As(Ⅲ) than to As(V) treatment. The Superoxide Dismutase(SOD) was the most sensitive to arsenic treatment; when the concentration of As(Ⅲ) was 2.5 μmol/L and As(V) was 100 μmol/L, the activity of SOD increased significantly. When the concentration of As(Ⅲ) was 10 μmol/L, the activity of Peroxidase(POD) increased significantly. The Catalase(CAT) was more sensitive to As(V). From the experimental results, with the increase in arsenic concentration, the enzyme activities of SOD, CAT and POD increased, which can be used to eliminate reactive oxygen species(ROS) and maintain cell metabolism stability. This study provides some basic data for further study of *N. nucifera* physiology and growth change, cultivation and transplants with arsenic stress.

收稿日期: 2013-05-24, 修回日期: 2013-10-07。

基金项目: 武汉市学科带头人计划项目(长江中下游浅水湖泊稳态转换及其调控机制的实验生态学研究); 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金(2012FB21)。

作者简介: 樊香绒(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事生态毒理学研究(E-mail: bestxiangrong@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: liwei@wbgcas.cn; changfy@wbgcas.cn)。

Key words: *Nelumbo nucifera*; Antioxidant systems; Arsenic

中国莲(*Nelumbo nucifera*)作为我国最具特色、栽培面积最大、品种资源最丰富的水生经济作物之一,是日常生活中重要的食用蔬菜之一,在国民经济中占有重要位置。随着农村产业结构的调整,莲种植区域有进一步扩大的趋势。但近年来随着重金属污染日益严重,大量重金属进入水体,使得重金属污染对莲生长生理的影响急需开展研究。砷是环境中对人类健康毒性最大的污染物之一,在农业生态系统中可通过土壤和水体等多种介质对植物生长产生直接影响。水体中的砷主要以无机五价砷酸盐和三价亚砷酸盐两种无机形式存在,就其化学性质而言,三价砷的毒性要大于五价砷^[1]。目前无机砷对各种经济植物生长生理影响的研究开展的较多,但大部分集中在小麦、水稻等主要粮食作物方面^[2,3],对水生植物莲的影响鲜有报道^[4,5]。我们以莲幼苗为实验材料,研究不同价态和浓度的砷胁迫条件下莲幼苗中丙二醛(MDA)含量和抗氧化系统超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性的变化情况,以期阐明不同价态砷对莲特定生长期的毒害机理,为莲在农业种植过程中砷毒害的预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2012年9月购买湖北洪湖当年成熟的中国莲(*Nelumbo nucifera*)莲籽,将实验材料浸泡于去离子水中24 h,选取完全沉水的种子自然晾干后置于阴凉通风处保存。挑选大小均匀的莲籽并用砂纸打磨,使外壳破损,浸入去离子水中进行萌发,以备随后进行毒理学实验。亚砷酸钠(NaAsO₂)和砷酸氢二钠(Na₂HAsO₄·7H₂O)均为分析纯。

1.2 实验设计

分别将三价砷(NaAsO₂)和五价砷(Na₂HAsO₄·7H₂O)用去离子水配制成不同价态的砷溶液C0(0)、C1(2.5)、C2(10)、C3(50)、C4(250)、C5(500),单位μmol/L。挑选长至10 cm左右均匀的幼苗,置于不同浓度的三价砷和五价砷溶液中处理24 h,取样,测定莲籽幼苗抗氧化系统酶活性的变化,每组设置3个重复。

1.3 测定方法

蛋白质及酶提取方法:取一定质量的中国莲幼苗在4℃条件下以pH 7.8、浓度为50 mmol/L的PBS缓冲液研磨,10000 g离心10 min,取上清液备用。可溶性蛋白质含量用考马斯亮蓝G-250法^[5]测定,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白,测定595 nm下的吸光度。

MDA测定方法:参照李合生的方法^[6]并进行适当改进,取1.5 mL酶提取液加入2.5 mL含有0.6%硫代巴比妥酸(TBA)的20%的三氯乙酸,90℃下反应30 min,冰浴冷却,4000 g离心10 min,测定OD₅₃₂和OD₆₀₀处的吸光值。

$$MDA(\text{mmol/L}) = 6.45 \times (OD_{532} - OD_{600}) - 0.56 \times OD_{450}$$

POD活性测定方法:参照李合生的方法^[6]并进行适当改进。3 mL反应体系中包括1 mL pH 7.0的PBS缓冲液、1 mL 0.2% H₂O₂、0.95 mL愈创木酚和0.05 mL酶提取液,测定470 nm处吸光值的变化。以OD₄₇₀每分钟增加0.01为一个酶活性单位(U)。

CAT活性测定采用Cakmak和Marschner的方法^[7],稍作改良。3 mL反应液包含50 mmol/L pH 7.0的PBS 1.95 mL和0.2% H₂O₂ 1 mL,最后加入0.05 mL酶液启动反应,测定240 nm处吸光度的降低速度。将每分钟吸光度减少0.01定义为一个酶活性单位(U)。

SOD活性测定方法:参照李合生和Giannopolitis等的方法^[6,8]。3 mL的反应混合液中含甲硫氨酸2.5 mL(13 mmol/L)、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)0.25 mL(63 mmol/L)、核黄素0.15 mL(13 mmol/L)、50 mmol/L PBS(pH7.8)0.05 mL,加入经适当稀释的酶液,以不加酶液的试管(用缓冲液代替)为最大光化还原管,用缓冲液作空白对照(用缓冲液代替NBT),然后将各管放在4000 lx光照培养箱照光约20 min,在560 nm处测定光密度值。以抑制NBT光化还原50%所需的酶量定义为一个活性单位(U)。

1.4 数据分析

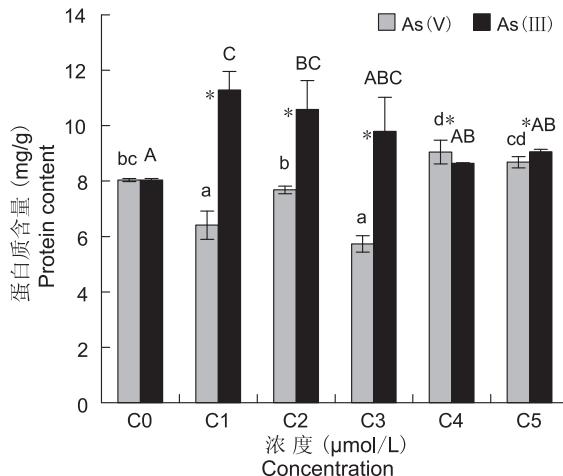
采用Excel进行作图,对蛋白质及抗氧化系统

酶测定结果采用 SPSS 16 统计分析软件进行方差分析和组间差异显著性检验 (One-way ANOVA, Tukey)。

2 结果与分析

2.1 砷对中国莲幼苗中可溶性蛋白质含量的影响

中国莲幼苗体内蛋白质对 As(Ⅲ) 比较敏感, 当 As(Ⅲ) 的处理浓度为 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 时, 可溶性蛋白质含量就显著高于对照组 ($p < 0.05$), 随着 As(Ⅲ) 处理浓度的增大, 可溶性蛋白质含量降低, 其他处理组与对照组差异皆显著 ($p < 0.05$) (图 1)。As(V) 处理组幼苗的可溶性蛋白质含量在 As(V) 浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$ 时最低, 且与对照组差异极显著 ($p < 0.01$), 随着 As(V) 处理浓度的增大, 可溶性蛋白质先降低然后升高。



图中横坐标上的 C0 到 C5, 分别表示各种浓度: 0、 2.5 、 10 、 50 、 250 、 $500 \mu\text{mol/L}$ 。误差线代表标准误, 星号表示同一浓度下不同处理的结果的差异显著性 ($p < 0.05$), 不同大写小写字母表示各处理间有显著性差异 ($p < 0.05$)。下同。

The C0 to C5 of abscissa represents the different concentrations 0, 2.5 , 10 , 50 , 250 , $500 \mu\text{mol/L}$. Error bars indicate standard error. Asterisks indicate the treats have significant difference in same concentration ($p < 0.05$). Different capital and lowercase letters indicate that the treats have significant difference ($p < 0.05$). The same below.

图 1 不同浓度 As(Ⅲ) 和 As(V) 对莲幼苗中可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of As(Ⅲ) and As(V) on soluble protein content in *Nelumbo nucifera* seedlings

2.2 砷对中国莲幼苗中 MDA 含量的影响

莲籽幼苗组织膜脂过氧化产物 MDA 在 As(Ⅲ) 处理浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时显著高于对照组 ($p <$

0.05), 当 As(Ⅲ) 处理浓度再增加时 MDA 含量有减少的趋势 (图 2), 而 As(V) 处理组浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 时 MDA 含量显著大于对照组, 在处理浓度低于 $100 \mu\text{mol/L}$ 时各处理组与对照组差异皆不显著。

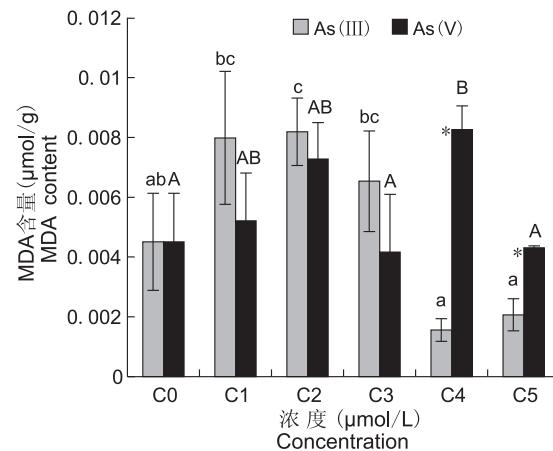


图 2 不同浓度 As(Ⅲ) 和 As(V) 对莲幼苗中 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of As(Ⅲ) and As(V) on MDA content in *N. nucifera* seedlings

2.3 砷对中国莲幼苗抗氧化系统的影响

As(Ⅲ) 和 As(V) 的处理显著影响了中国莲幼苗组织内的 SOD、CAT 和 POD 活性。3 种抗氧化酶中 SOD 处理最敏感, 当 As(Ⅲ) 处理浓度为 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 时 SOD 活性显著高于对照组 ($p < 0.05$), 并且 SOD 活性随着 As(Ⅲ) 浓度的增加而显著增加 (图 3), As(V) 浓度达到 $100 \mu\text{mol/L}$ 时 SOD 活性才显著高于对照组 ($p < 0.05$)。当 As(Ⅲ) 处理浓度达到 $10 \mu\text{mol/L}$ 时 POD 活性显著高于对照组 ($p < 0.01$), 并且 POD 活性在处理浓度小于 $100 \mu\text{mol/L}$ 时随着 As(Ⅲ) 含量的增加而增加 (图 4), 在最高浓度 $500 \mu\text{mol/L}$ 时显著降低。As(V) 处理浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, POD 活性显著高于对照组 ($p < 0.05$), 并且随着 As(V) 处理浓度的增大而增大。从图 5 可看出, CAT 对 As(Ⅲ) 处理不如对 As(V) 处理敏感, As(V) 处理浓度达到 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 时 CAT 活性显著高于对照组 ($p < 0.05$), 处理浓度在 $50 \mu\text{mol/L}$ 时, CAT 活性最高, As(V) 高于 $50 \mu\text{mol/L}$ 处理浓度时会导致 CAT 活性显著降低。

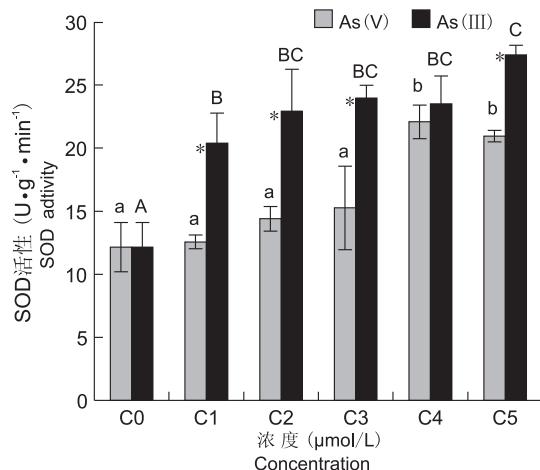


图3 不同浓度As(Ⅲ)和As(V)对莲幼苗中SOD活性的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of As(Ⅲ) and As(V) on SOD activity in *N. nucifera* seedlings

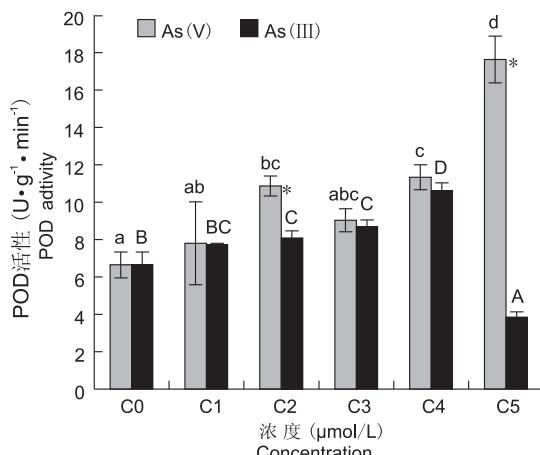


图4 不同浓度As(Ⅲ)和As(V)对莲幼苗中POD活性的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of As(Ⅲ) and As(V) on POD activity in *N. nucifera* seedlings

3 讨论

蛋白质是生物体生命活动的基础。重金属的胁迫极易造成植物体内可溶性蛋白含量的变化。以往的研究中以水生植物为对象, 对单一价态重金属生物学效应进行了广泛的研究。Xing 等发现当铜离子或铁离子浓度达 10 mg/L 时能显著降低紫萍和伊乐藻组织内可溶性蛋白质含量^[9]。Cd²⁺处理能够降低粗梗水蕨可溶性蛋白含量^[10]。本研究表明, 不同浓度不同价态的 As 能够显著影响莲幼苗体内

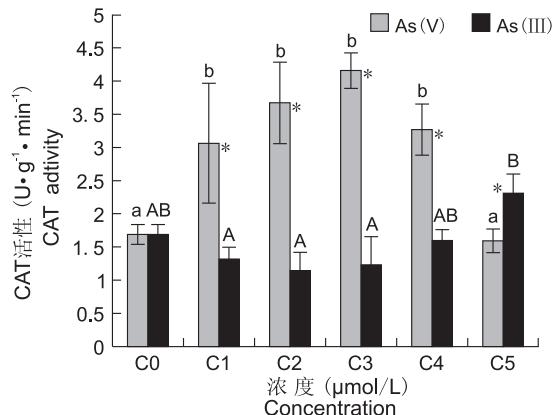


图5 不同浓度As(Ⅲ)和As(V)对莲幼苗中CAT活性的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of As(Ⅲ) and As(V) on CAT activity in *N. nucifera* seedlings

可溶性蛋白质的含量。实验中As(Ⅲ)在低浓度时就能够显著增加可溶性蛋白质的含量, 而在浓度达到 10 μmol/L 时可溶性蛋白质的含量又有所降低。As(V)处理幼苗 24 h 后, 幼苗体内的可溶性蛋白质量随着处理浓度的增加先降低后上升。不同浓度两种价态 As 处理下的莲幼苗蛋白质含量的变化表现出典型的毒物兴奋效应。

MDA 是膜脂过氧化的产物, 植物体内的 MDA 含量的多少就反映了膜脂过氧化的程度^[11, 12]。本实验中 As(Ⅲ) 处理浓度达到 10 μmol/L, 幼苗组织内的 MDA 含量显著高于对照组, 而后随着浓度的增加 MDA 含量迅速降低, As(V) 处理组只有在浓度达到 100 μmol/L 时, MDA 含量才显著大于对照组, 其余处理组与对照组差异不显著。本实验结果表明较低浓度的 As 会使幼苗细胞调动防御机制, 诱导 MDA 的生成, 以防止细胞膜脂过氧化, 而较高浓度的 As 可能会直接影响莲幼苗的生长状况, 导致 MDA 含量迅速降低。两种价态 As 对 MDA 含量影响的结果表明, As(Ⅲ) 毒性大于 As(V)。

活性氧自由基(ROS)在植物细胞在代谢过程中, 由叶绿素和线粒体尤其是光合作用时的叶绿体产生^[13, 14], 可通过抗氧化酶系统(SOD、POD、CAT 等)的催化降解及还原性物质(GSH、抗坏血酸和维生素 E 等)的还原在细胞内维持较低的浓度, 在植物的生长发育过程中起着信号传递的

作用^[15]。

当植物受到胁迫时细胞内的 ROS 含量会发生变化, 植物会通过增加抗氧化酶含量或活性或抗氧化物质的浓度来抵御 ROS 造成的不良影响。因此, 可以通过测定氧化酶的活性(如 SOD、POD 和 CAT 的活性)和抗氧化物质(如 GSH)含量来衡量植物受氧化胁迫的大小。

超氧化物歧化酶(SOD)作为细胞受不良因素胁迫时, 通过催化超氧阴离子(O_2^-)降解为双氧水(H_2O_2)及氧气 O_2 , 来对细胞起保护作用, 是植物抗氧化胁迫的关键酶之一^[16]。在不同重金属对不同植物的影响实验中, SOD 活性的变化差异很大。用铁离子处理伊乐藻后, SOD 活性先随着铁离子浓度增加而增加, 当铁离子浓度达到 100 mg/L 时, SOD 活性下降^[17], 而铁离子处理 *Bacopa monnieri* 24 h 后 SOD 活性随着处理浓度的增加而增加^[18], 但是随着 Cd^{2+} 浓度增加, 玉米幼苗叶片^[19]及水稻叶片中^[20] SOD 活性下降。本实验中, 两种价态的 As 处理 24 h 后, 莲幼苗细胞内 SOD 活性随着处理浓度的增加而增加, 在 As(Ⅲ)浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时就显著高于对照组 SOD 活性, 表明两种价态 As 均造成了氧化胁迫。而且随着处理浓度的增加, 产生的 ROS 增多, 莲幼苗以提高 SOD 活性或含量来清除 ROS。SOD 清除 ROS 所产生的 H_2O_2 是由过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)共同来清除的。

4 结论

本实验中, 中国莲幼苗细胞内 POD 活性随着 As(Ⅲ)处理浓度的增加而增加, 但是 POD 活性对 As(Ⅴ)处理浓度的敏感程度要低于 SOD 活性。这可能是 SOD 降解 ROS 产生的 H_2O_2 并不是全部由 POD 来清除的, CAT 也承担着清除 H_2O_2 的工作。本实验中 CAT 活性随 As(Ⅴ)处理浓度的增加而增加, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时达到显著水平。根据实验结果推测, 随着砷浓度的增加, 对幼苗产生了氧化胁迫, 导致 SOD、CAT 和 POD 三种酶活性都有所增加, 相互配合以清除 ROS, 维持细胞代谢的稳定。

参考文献:

- [1] 洪雪花, 张婉静, 张爱, 刘贵明, 杨良, 李作生. 环境砷的存在状态、生物转化和修复研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2011, 26(4): 567–571.
- [2] Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, et al. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2009, 72: 1102–1110.
- [3] LI C X. Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings [J]. *J Environ Sci*, 2007, 19: 725–732.
- [4] Rai S, Wahile A, Mukherjee K. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104: 322–327.
- [5] Bradford A, Handy R D, Readman J W, et al. Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments [J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(12): 4530–4536.
- [6] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术: 面向 21 世纪课程教材[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [7] Cakmak I, Marschner H. Magnesium-deficiency and high light-intensity enhance activities of superoxide-dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione-reductase in bean-leaves [J]. *Plant Physiol*, 1992, 98(4): 1222–1227.
- [8] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases. 1. Occurrence in higher-plants [J]. *Plant Physiol*, 1977, 59(2): 309–314.
- [9] Xing W, Huang W, Liu G. Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid [J]. *Environ Toxicol*, 2010, 25(2): 103–112.
- [10] 张继飞, 陈青云, 吴名. 重金属镉对粗梗水蕨生长及叶片中蛋白质含量的影响 [J]. 江汉大学学报: 自然科学版, 2011, 39(4): 92–104.
- [11] Wang H F, Zhong X H, Shi W Y, et al. Study of malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in chickens infected with avian infectious bronchitis virus [J]. *Af J Biotechno*, 2011, 10(45): 9213–9217.
- [12] 张义贤, 张丽萍. 重金属对大麦幼苗膜脂过氧化及脯氨酸和可溶性糖含量的影响 [J]. 农业环境科学

学报, 2006, 25(4): 857–860.

[13] Blokhina O, Fagerstedt K V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems [J]. *Physiol Plant*, 2010, 138(4): 447–462.

[14] Jaspers P, Kangasjarvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling [J]. *Physiol Plant*, 2010, 138(4): 405–413.

[15] Swanson S, Gilroy S. ROS in plant development [J]. *Physiol Plant*, 2010, 138(4): 384–392.

[16] 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(4): 645–655.

[17] Xing W, Li D, Liu G. Antioxidative responses of *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St. John to short-term iron exposure [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2010, 48(10–11): 873–878.

[18] Sinha S, Saxena R. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. [J]. *Chemosphere*, 2006, 62(8): 1340–1350.

[19] 黄辉, 李升, 郭娇丽. 镉胁迫对玉米幼苗抗氧化系统及光合作用的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(2): 211–215.

[20] 于方明, 刘可慧, 刘华. 镉污染对水稻不同生育期抗氧化系统的影响 [J]. 生态环境学报, 2012, 21(1): 88–93.

(责任编辑: 张平)