

# Cr<sup>6+</sup> 对慈姑部分生理生化指标的影响

王 君<sup>1</sup>, 刘思思<sup>2</sup>, 王 妍<sup>2</sup>, 徐勤松<sup>2</sup>, 解凯彬<sup>2</sup>

(1 扬州职业大学生物化学工程系, 扬州 225002)  
(2 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 研究了不同浓度的 Cr<sup>6+</sup> 对慈姑叶绿素含量、叶绿素 a/b 比值、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率、MDA 含量、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性及可溶性蛋白含量的影响。受 Cr<sup>6+</sup> 胁迫后, 随着 Cr<sup>6+</sup> 浓度的增加, 叶绿素含量、叶绿素 a/b 比值、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率先升高后降低; MDA 含量呈持续上升趋势; SOD 活性表现出先降后升趋势; POD 活性则表现出先明显上升后下降的情况; 可溶性蛋白含量变化不明显; CAT 活性在根和叶中所受的影响存在明显不同。研究结果表明, 同种离子对同一植物的不同部位的毒害存在差异。

[关键词] 慈姑, Cr<sup>6+</sup>, 抗氧化酶系统, 可溶性蛋白

[中图分类号] Q945.78 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)02-0108-05

## Effects of Cr<sup>6+</sup> on Some Physiological Indicators of *Sagittaria trifolia*

Wang Jun<sup>1</sup>, Liu Sisi<sup>2</sup>, Wang Yan<sup>2</sup>, Xu Qinsong<sup>2</sup>, Xie Kabin<sup>2</sup>

(1. Department of Biochemical Engineering, Yangzhou Polytechnic College, Yangzhou 225002, China)  
(2. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract** The effects of Cr<sup>6+</sup> on chlorophyll content, chlorophyll a/b value, generation rate of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, MDA content, activities of SOD, POD and CAT, soluble protein content were studied. The results show that chlorophyll content, chlorophyll a/b value and the generation rate of O<sub>2</sub><sup>-</sup> increase first and decrease afterwards with the concentration of Cr<sup>6+</sup> increasing. MDA content increase progressively. The activity of SOD drops first and increases afterwards, while the activity of POD increases apparently first and decrease at last. The soluble protein content does not change obviously. The activity of CAT is affected very different by the leaf and root. The results indicate that there are different toxic effects between different organs of a plant stressed by the same ion.

**Key words** *Sagittaria trifolia*, Cr<sup>6+</sup>, Antioxidant enzyme systems, soluble protein

工农业生产中排放含重金属离子的废水, 导致水体重金属污染日益严重并引起人们的广泛关注。由于水体中的重金属不仅不能被微生物降解, 而且还能在生物体内累积并在生物体之间进行转移, 从而对水生植物生长发育产生不可忽视的影响, 并且最终通过水生食物链的生物放大作用对更高营养级的生物直至人类产生毒害, 给人类的生命和身体健康造成严重威胁<sup>[1]</sup>。Cr<sup>6+</sup> 是一种常见的工业排放污染物, 严重影响了水生植物的生长发育。本文以太湖流域常见的水生经济植物慈姑 (*Sagittaria trifolia*) 为材料, 研究 Cr<sup>6+</sup> 对其叶绿素含量、超氧阴离子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 及 SOD、POD 和 CAT 活性测定、脂类过氧化物 MDA 含量等一系列生理指标的影响, 为进一步研究水生植物抗污染的生物学机理, 探讨重金属污染的治理、环境污染的监测及控制重金属污染物在生态环境中的迁移提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及处理

慈姑, 采自苏州市吴县东山镇杨湾大田, 在室温 (15℃ ~ 20℃) 下, 于蒸馏水中培养 2 d, 选取生长状态

收稿日期: 2008-12-08

基金项目: 江苏省普通高校自然科学基金计划 (08KJB180004) 资助项目。

通讯联系人: 解凯彬, 副教授, 研究方向: 重金属污染对水生植物的影响及植物光合作用. E-mail: kbxi@sina.com

— 108 —

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

一致的植株作为实验材料,分别培养于浓度为 1、3、5、10、20 mg/L 的  $\text{Cr}^{6+}$  水溶液中,并用无  $\text{Cr}^{6+}$  水培养作对照。处理后第 3 天,取其叶和根,用蒸馏水洗净,揩干,测定各项生理指标。实验设 3 个平行组,重复 3 次。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 叶绿素含量的测定

取 1 g 叶加 100% 丙酮和少量石英砂进行研磨,在 4℃ 下以 6 000 r/min 离心 20 min,取上清液以 100% 丙酮作空白对照,用 UV-754 型分光光度计测定 663 nm 和 645 nm 下的吸光值。根据公式计算鲜叶叶绿素浓度。单位: mg/g

### 1.2.2 SOD、CAT、POD 酶液的制备

取材于预冷钵中,加入 pH 7.0 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L),冰浴下研磨成匀浆,10 000 r/min 低温离心 20 min,上清液即为所需酶液。

### 1.2.3 SOD(超氧化物歧化酶)活性的测定

按从南京建成生物工程研究所购买的试剂盒顺序测定。单位: U/g (以每毫升样品每秒分解 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的量为一个 U)。

### 1.2.4 CAT(过氧化氢酶)活性的测定

按从南京建成生物工程研究所购买的试剂盒顺序测定。单位: U/g

### 1.2.5 POD(过氧化物酶)活性的测定

愈创木酚法<sup>[2]</sup>,将 30  $\mu\text{L}$  酶液与 3 mL 反应混合液 (愈创木酚与过氧化氢以 28:19 混合于 50 mL 磷酸缓冲液),以反应混合液 3 mL 加同体积的磷酸缓冲液作对照,在 470 nm 下每隔 15 s 读 1 次吸光值,以每分钟吸光值的变化表示酶活性的大小。单位: U/(min·g)。

### 1.2.6 可溶性蛋白含量的测定

采用 Bradford<sup>[3]</sup>考马斯亮蓝 G-250 法,将样品 100  $\mu\text{L}$  与染料考马斯亮蓝 G-250 溶液 3 mL 混合,用 754 型分光光度计,在波长 620 nm 下测定吸光值,以牛血清的蛋白 (BSA) 为标准蛋白作标准曲线,查得蛋白质浓度。单位:  $\mu\text{g/g}$

### 1.2.7 $\text{O}_2^-$ (超氧阴离子自由基)产生速率的测定

采用王爱国等的方法<sup>[4]</sup>。1 mL 样品酶液中加入 0.9 mL 50 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.8) 和 0.1 mL 10 mmol/L 盐酸羟胺,摇匀后于 25℃ 中保温 20 min,然后再加入 1 mL 17 mmol/L 对氨基苯磺酸,混匀后于 25℃ 中保温 30 min,用 UV-754 型分光光度计测定 530 nm 下的吸光值,根据标准曲线算出  $\text{O}_2^-$  的产生速率。单位:  $A_{530}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。

### 1.2.8 MDA(丙二醛)含量的测定

参照 Heath 等<sup>[5]</sup>的硫代巴比妥 (TBA) 比色法进行。取 1.5 mL 粗酶提取液,与 2.5 mL 0.5% TBA 的 20% 三氯醋酸混匀,在 100℃ 水浴加热 15 min 后,迅速冷却,过滤,取其上清液,用 UV-754 型分光光度计测定 530 nm 和 600 nm 下的吸光值。

## 2 结果

### 2.1 $\text{Cr}^{6+}$ 对慈姑叶叶绿素的含量及叶绿素 a 和 b 比值的影响

由图 1 和图 2 可看出,  $\text{Cr}^{6+}$  对叶绿素含量的影响明显,随着处理浓度的增加,叶绿素的含量呈现先上升后下降的趋势,其中用 5 mg/L  $\text{Cr}^{6+}$  处理的叶绿素的含量最高,为对照的 1.46 倍。叶绿素 a 和 b 的比值变化不大,表明两者对  $\text{Cr}^{6+}$  敏感性相近。

### 2.2 $\text{Cr}^{6+}$ 对慈姑 MDA 含量、 $\text{O}_2^-$ 产生速率的影响

由图 3 可以看出,  $\text{O}_2^-$  产生速率呈现相似的变化趋势,都是先升高后降低,但叶在 5 mg/L  $\text{Cr}^{6+}$  浓度时达到最高,而根则在 1 mg/L 时就达到峰值。在根和叶中,MDA 含量都是随着  $\text{Cr}^{6+}$  浓度的增加而升高 (如图 4 所示),根在 20 mg/L  $\text{Cr}^{6+}$  浓度时,MDA 含量升高到 CK 的 2.16 倍。

### 2.3 $\text{Cr}^{6+}$ 对慈姑抗氧化酶活性的影响

由图 5 可以看出,在叶和根中, SOD 活性都是表现为先降低后升高,且都是在  $\text{Cr}^{6+}$  浓度为 3 mg/L 时,

达到最低. 这说明在低浓度下,  $\text{Cr}^{6+}$  处理使 SOD 活性受到强烈抑制, 随浓度升高, 活性有所回升, 在  $20\text{mg/L}$  时, 活性达到最高, 但仍低于对照. 这与张小兰、施国新等人所做的  $\text{Hg}^{2+}$  对轮藻毒害中 SOD 活性测定结果相一致<sup>[6]</sup>.

POD 的活性变化与 SOD 不同, 如图 6 所示, 在叶和根中都表现为先升高后降低, 在  $\text{Cr}^{6+}$  浓度为  $5\text{mg/L}$  时, 达到最高.

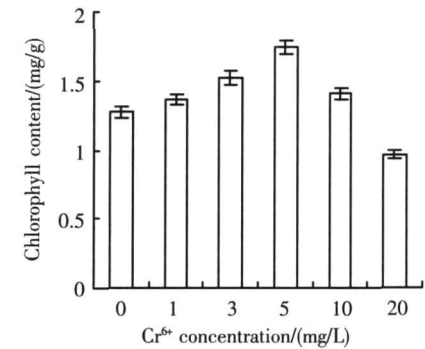


图 1  $\text{Cr}^{6+}$ 对叶绿素含量的影响  
Fig.1 The effect of  $\text{Cr}^{6+}$  on chlorophyll content

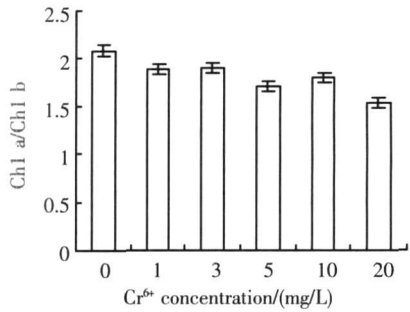


图 2  $\text{Cr}^{6+}$ 对叶绿素 a 和 b 比值的影响  
Fig.2 The effect of  $\text{Cr}^{6+}$  on chl a/chl b value

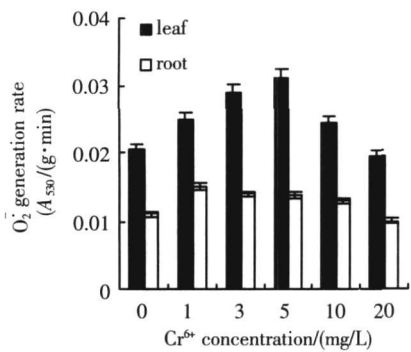


图 3  $\text{Cr}^{6+}$ 对  $\text{O}_2^-$  产生速率的影响  
Fig.3 The effect of  $\text{Cr}_6$  on  $\text{O}_2^-$  generation rate

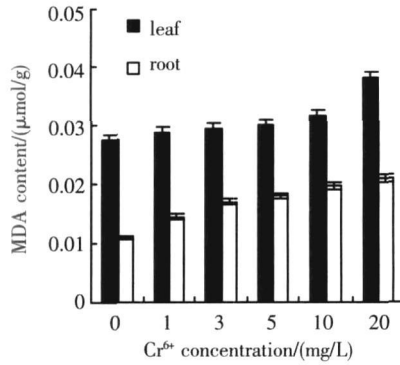


图 4  $\text{Cr}^{6+}$ 对 MDA 含量的影响  
Fig.4 The effect of  $\text{Cr}^{6+}$  on MDA content

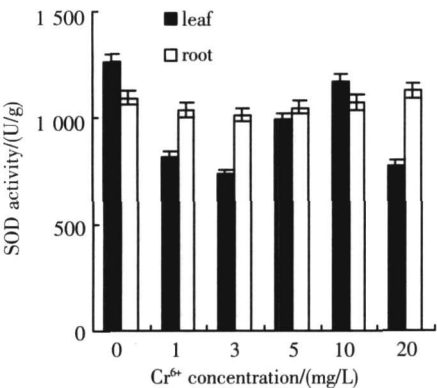


图 5  $\text{Cr}^{6+}$ 对 SOD 活性的影响  
Fig.5 The effect of  $\text{Cr}^{6+}$  on SOD activity

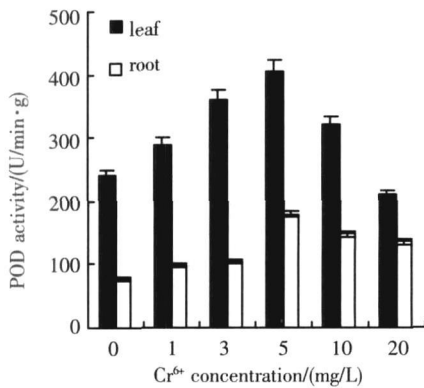
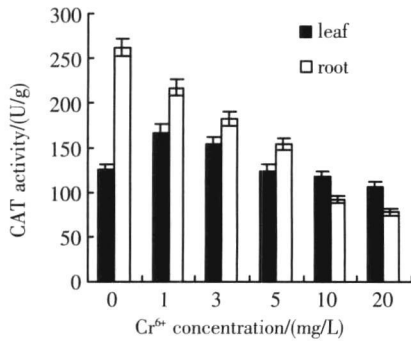
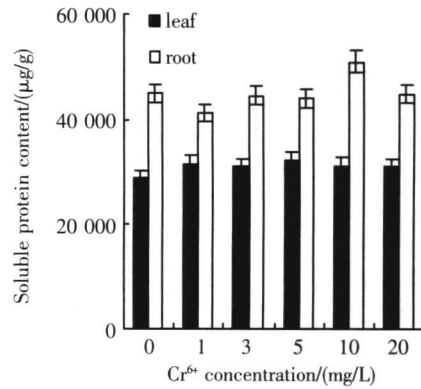


图 6  $\text{Cr}^{6+}$ 对 POD 活性的影响  
Fig.6 The effect of  $\text{Cr}^{6+}$  on POD activity

由图 7 可以看出, 在叶中, CAT 活性变化与 POD 相似, 表现为先升高后降低, 除了在  $\text{Cr}^{6+}$  浓度为  $1\sim 3\text{mg/L}$  时刺激升高外, 对其他浓度处理不敏感; 而根中, CAT 活性变化出现了与 POD 不同的趋势, 随着浓度的增大而持续下降, 说明根比叶对  $\text{Cr}^{6+}$  的毒害更敏感.

2.4  $\text{Cr}^{6+}$  对慈姑可溶性蛋白含量的影响

如图 8 所示, 根和叶的可溶性蛋白含量随  $\text{Cr}^{6+}$  浓度的增高变化不明显.

图 7  $\text{Cr}^{6+}$  对 CAT 活性的影响Fig.7 The effect of  $\text{Cr}^{6+}$  on CAT activity图 8  $\text{Cr}^{6+}$  对可溶性蛋白含量的影响Fig.8 The effect of  $\text{Cr}^{6+}$  on soluble protein content

### 3 讨论

叶绿素是类囊体膜色素蛋白复合体的主要成分,是植物进行光合作用的主要色素,其含量的高低直接影响植物光合效率的强弱.严重玲等认为叶绿素含量的减少是衡量植物衰老或受伤程度的重要生理指标<sup>[7]</sup>.孙赛初等提出  $\text{Cd}^{2+}$  对水生维管植物叶绿素 a 和 b 的影响中,叶绿素 a 的下降幅度更大<sup>[8]</sup>.陈国祥等通过用  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  分别处理莼菜冬芽茎叶<sup>[9]</sup>,任安芝等用  $\text{Cr}$ 、 $\text{Cd}$ 、 $\text{Pb}$  处理青菜叶片测定叶绿素含量和  $\text{Chla/b}$  值<sup>[10]</sup> 也得出相类似的结论.本研究中,慈姑在低浓度  $\text{Cr}^{6+}$  毒害下,叶绿素含量有略微上升,表明一些酶应激性地增高活性,而随着浓度的增加,处理时间的增长,叶绿素曲线下降,叶绿素含量明显降低,这和上述研究结果是一致的.但本研究中叶绿素 a b 对  $\text{Cr}^{6+}$  毒害的敏感性相似和前人的研究结果有差异,造成这种差异的原因尚有待进一步研究.

生物自由基 (Free Radical) 伤害学说,自 Fridovich 20 世纪 60 年代末提出以来,就被广泛应用于需氧生物细胞毒害机理的研究和用于解释重金属对植物的毒害机理<sup>[11]</sup>.在正常情况下,植物体内活性氧清除系统能有效地清除体内的活性氧自由基,从而使细胞免受伤害.但在逆境下,植物体内活性氧自由基的产生速度超出了植物清除活性氧的能力,便会引起伤害<sup>[8]</sup>. $\text{O}_2^-$  离子是机体内代谢过程中产生的重要自由基,MDA 则是其攻击生物膜中不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化形成的过氧化物的产物,二者存在相关关系.本研究中,在  $\text{Cr}^{6+}$  胁迫下, $\text{O}_2^-$  含量在低浓度时上升,表明慈姑体内的活性氧自由基清除系统已不能有效地发挥作用,以至  $\text{O}_2^-$  等活性氧自由基诱发膜脂不饱和脂肪酸发生连锁的过氧化反应,导致脂肪酸发生降解产生脂质过氧化物,使得膜脂过氧化<sup>[12]</sup>,随着  $\text{Cr}^{6+}$  浓度增大, $\text{O}_2^-$  含量下降,可能表明慈姑受到不可逆转的伤害,细胞内代谢速率大幅度下降,由于 MDA 是一种重要的脂质过氧化产物,其含量增大可表明膜系统受伤害的程度.前人的实验表明,MDA 含量曲线多滞后于  $\text{O}_2^-$ <sup>[13]</sup>.本研究中,MDA 含量曲线一直呈上升趋势,在 20mg/L  $\text{Cr}^{6+}$  时还没有达到峰值,可能是由于处理浓度偏低所造成.

植物体内活性氧的清除主要由某些酶系统和抗氧化物质来完成,其中 SOD、CAT 和 POD 是一个重要的活性氧清除酶系统,它们能清除细胞内过多的超氧阴离子自由基,以保护细胞膜的结构完整. SOD 将  $\text{O}_2^-$  歧化成  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,再由 CAT 和 POD 将  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解成  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{O}_2$ .因此在逆境条件下,这 3 种酶协同作用消除这些自由基对植物细胞膜结构潜在氧伤害的可能性,是植物耐受逆境胁迫的重要物质基础之一<sup>[14]</sup>.尤其是 SOD,它作为一种重要的防御酶,在提高植物抗逆性方面起关键作用.在本研究中,慈姑在用 1mg/L  $\text{Cr}^{6+}$  处理时,SOD 活性即开始下降,这说明慈姑 SOD 活性中心的空间结构极易受到  $\text{Cr}^{6+}$  离子的破坏而降低活性或丧失活性,也就意味着削弱了抗氧化酶对活性氧的消除能力和增加了活性氧对植物细胞伤害的可能性.而高浓度  $\text{Cr}^{6+}$  处理的慈姑,有部分叶片死亡,这在一定程度上避免了整株植物的死亡,起到了缓解毒害的作用,SOD 活性的回升,可能是存活的叶片继续发挥清除活性氧的作用.

POD 是一种含 Fe 的金属蛋白质,其作用如同氢的接受体一样,在植物呼吸代谢中起重要作用.研究表明,重金属对植物毒害机理之一是它可以影响植物的呼吸作用,而呼吸作用酶类活性的维持和增加,可以减缓其不利影响,使植物免受毒害.低浓度的  $\text{Cr}^{6+}$  处理使慈姑 POD 活性上升,说明慈姑在一定范围内对

$\text{Cr}^{6+}$  有耐受的作用. 在同样的浓度处理的慈姑中, 根的 POD 活性上升幅度大于叶. 而 CAT 活性, 根中表现出更强的敏感度, 这种差异可能是由于根作为植物主要的吸收器官, 其吸收的重金属离子较多, 也可能是根部富集的重金属离子较多, 具体原因还需进一步分析.

另外, 可溶性蛋白含量的变化, 是植物在逆境中受伤害程度的一个重要指标. 前人的实验证明, 重金属可引起可溶性蛋白含量增加, 而可溶性蛋白含量的提高, 很可能是植物抵抗毒害的一种解毒机制, 例如能诱导产生重金属结合蛋白, 从而降低重金属的毒性<sup>[15]</sup>; 此外, 蛋白质含量的提高, 还会增加细胞渗透浓度和功能蛋白的数量, 有助于维持细胞正常代谢<sup>[16]</sup>. 本研究中慈姑根、叶中可溶性蛋白含量变化不明显, 和另外的研究结果有明显不同, 这是否能说明慈姑在  $\text{Cr}^{6+}$  诱导下难以产生重金属结合蛋白, 而是以其它途径来对抗  $\text{Cr}^{6+}$  产生的毒害, 这也是我们进一步研究的重点.

### [参考文献]

- [1] 徐勤松, 施国新, 杜开和, 等.  $\text{Cd}^{2+}$  处理对苎草叶片保护酶活性和细胞超微结构的毒害影响 [J]. 水生生物学报, 2003, 27(6): 584-586
- [2] 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 154-155.
- [3] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantity of protein dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254
- [4] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧自由基与羟胺反应的定量关系 [J]. 植物生理学通讯, 1990, 6: 55-57
- [5] Heath R L, Parker L. Photoperitition in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. Arch Biophys 1968, 25: 189-198
- [6] 张小兰, 施国新, 徐楠, 等.  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  对轮藻部分生理生化指标的影响 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2002, 25(1): 38-42
- [7] 严重玲, 李瑞智, 钟章成. 模拟酸雨对绿豆、玉米生理生态特征的影响 [J]. 应用生态学报, 1995, 6(增刊): 124-131.
- [8] 孙赛初, 王焕校. 水生维管植物受镉污染后的生理生化变化及受害机制初探 [J]. 植物生理学报, 1995, 11(2): 113-121
- [9] 杨丹慧. 重金属离子对高等植物光合膜结构与功能的影响 [J]. 植物学通报, 1991, 8(3): 26-29.
- [10] 陈国祥, 施国新, 何兵, 等.  $\text{Hg}$ 、 $\text{Cd}$  对莼菜纯冬芽光合膜光化学活性及多肽组分的影响 [J]. 环境科学学报, 1999, 19(5): 521-525
- [11] 黄玉山, 罗广华, 关荣文. 镉诱导的自由基过氧化损伤 [J]. 植物学报, 1997, 39(6): 522-526
- [12] Chris B, Marc V H, Dirk I. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. Annu Rev Plant Mol Biol 1992, 43: 83-116
- [13] 常福辰, 施国新, 丁小余, 等.  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  复合污染下金鱼藻的细胞膜脂过氧化和抗氧化酶活性的变化 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2002, 25(1): 44-48
- [14] 杨居荣, 贺建群, 张国祥, 等. 不同耐受性作物中几种酶活性对  $\text{Cd}$  胁迫的反应 [J]. 中国环境科学, 1996, 16(2): 113-117.
- [15] 张玉秀, 柴团耀, Gerard B. 植物耐重金属机理研究进展 [J]. 植物学报, 1999, 41(5): 453-457.
- [16] 张金彪, 黄维南. 镉对植物的生理生态效应的研究进展 [J]. 生态学报, 2000, 20(3): 514-523.

[责任编辑: 孙德泉]