

# 铅、镉和锌污染对芦苇幼苗氧化胁迫和抗氧化能力的影响

王正秋<sup>1</sup>, 江行玉<sup>2</sup>, 王长海<sup>1</sup>

(1. 烟台大学海洋生化工程研究所, 山东 烟台 264005; 2. 山东农业大学农学院, 山东 泰安 271018)

**摘要:**对 Pb, Cd 和 Zn 胁迫下芦苇幼苗叶片和根内超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )和过氧化产物丙二醛(MDA)的含量、电解质渗漏以及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性进行了研究。结果表明,受 3 种重金属的影响,叶片和根内  $O_2^-$  积累,MDA 含量增加,伴随着电解质渗漏增大,显示发生了膜脂过氧化,细胞膜系统遭到破坏;作为植物抗氧化系统中的关键酶,SOD 和 POD 活性高于对照,说明在重金属胁迫下芦苇幼苗体内的抗氧化能力增强。可见,在重金属污染下细胞内  $O_2^-$  浓度升高带来的膜脂过氧化增强是重金属伤害植物的主要原因;而保护酶系统 SOD 和 POD 活性的升高则可能是芦苇抗过氧化的机理之一。

**关键词:** 芦苇; 铅; 镉; 锌; 氧化胁迫; 抗氧化能力

中图分类号: TQ920.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2002)06-0558-06

## 1 前言

自 McCord 和 Fridovich 1969 年首次从牛血红细胞中发现超氧化物歧化酶以来,生物活性氧代谢的研究受到了普遍的重视。研究表明,在植物遭受逆境胁迫或衰老过程中,细胞内活性氧产生与清除的平衡会遭到破坏,引起自由基的积累和膜脂过氧化,使膜系统的结构和功能受到损伤,造成植物细胞伤害<sup>[1]</sup>。UV 辐射对紫杉针叶内源保护物质,特别是抗坏血酸、胡萝卜素未表现出明显诱导作用,使紫杉针叶自由基清除能力不足,导致针叶及叶绿体产生的大量活性氧自由基随紫外线照射时间的延长而增加、膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量及针叶电解质渗漏逐渐升高,从而使针叶失绿<sup>[1]</sup>。Price 等<sup>[1]</sup>发现小麦叶绿体在光下活性氧( $O_2^-$ )的产生随干旱处理时间的延长而增加,同时叶片叶绿素被降解。与其它形式的胁迫相似,重金属污染也能导致植物体内产生大量的活性氧自由基,引起蛋白质和核酸等生物活性物质变性、膜脂过氧化,使植物受到伤害<sup>[2-4]</sup>。研究表明,在镉和砷的胁迫下,植物叶片中超氧阴离子( $O_2^-$ )和  $H_2O_2$  的积累显著增加,并伴随着 MDA 含量升高和电解质渗漏加剧<sup>[5,6]</sup>。可见,在重金属危害植物的过程中,过多的自由基引起的膜脂过氧化是关键因素之一。而由超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)组成的抗氧化防卫系统能够清除自由基,可使细胞免受由重金属引起的氧化胁迫伤害<sup>[7,8]</sup>。

芦苇属于禾本科芦苇属,为多年生高挺水草本植物。由于其适应性强,生长快,产量高,可用于造纸、编织、药材等,具有较大的经济价值;因其对重金属具有很强的抗性,因而被广泛地用于富含重金属的污水处理<sup>[9,10]</sup>。本文主要对芦苇抗重金属污染机理,尤其是重金属污染后,芦苇体内超氧阴离子含量以及保护酶活性变化进行了相关的研究。

## 2 材料和方法

### 2.1 植物材料和污染处理

芦苇 [*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel] 种子(采自山东省寿光市)播种于装有洗净细沙

的花盆(直径 20 cm、高 25 cm)中。萌发后,每天浇灌 Hoagland 营养液,并使液面保持在细沙面水平。二叶期选择生长一致的健壮幼苗每盆保留 5 株。在第 8 片叶出现时,分别用含 2 和 4 mmol/L CdCl<sub>2</sub>, 10 和 15 mmol/L Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 10 和 15 mmol/L ZnCl<sub>2</sub> 等重金属离子的营养液浇灌芦苇幼苗,每个处理设置 5 个重复组,并且每天分别给上述各个处理组更换含相应重金属离子的营养溶液 2 次。

## 2.2 超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)含量的测定<sup>[11]</sup>

分别称取 5 g 芦苇幼苗的新鲜叶片或根,用 65 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.8) 6 ml 研磨,经 4 层纱布过滤,滤液 5000 r/min 离心 10 min。取上清液 1 ml 加磷酸缓冲液 0.9 ml 和 10 mmol/L 羟胺氯化物 0.1 ml,在 25°C 下放置 20 min。取上述混合液 0.5 ml 加 0.5 ml 7 mmol/L 的 $\alpha$ -萘胺,25°C 下反应 20 min。根的显色液用同体积正丁醇充分摇匀,静置分层,取正丁醇相测吸光度 A<sub>532</sub>,用磷酸缓冲液作对照;叶片的显色液用同体积乙醚充分摇匀,1500 r/min 离心 5 min,吸出粉红色的水相测吸光度 A<sub>530</sub>,O<sub>2</sub><sup>-</sup>的含量(nmol/mg 蛋白质)根据 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的标准曲线换算获得。

## 2.3 MDA 含量的测定<sup>[12]</sup>

称取 0.4 g 经不同处理的芦苇幼苗植株的叶片或根,剪成 0.5 cm 左右长的小段,放入研钵中,加少许石英砂和 2 ml 0.1%三甲川(TCA)溶液,研磨成匀浆。将匀浆转到试管中,用 3 ml 0.1% TCA 溶液分 2 次冲洗研钵,合并提取液。然后加 0.5% 硫代巴比妥酸溶液 5 ml,摇匀,沸水浴 10 min,立即将试管放入冷水中。冷却后,3000 r/min 离心 15 min,取上清液并量其体积,以 0.5%硫代巴比妥酸溶液为空白测吸光度 A<sub>532</sub> 和 A<sub>600</sub>。丙二醛(MDA)的含量(mmol/g 样品)= $\Delta A N / 155 W_F$ ,其中 $\Delta A = A_{532} - A_{600}$ ,N 为上清液总体积,155 为 1 mmol TCA 溶液在 532 nm 的吸光系数,W<sub>F</sub> 为样品鲜重。

## 2.4 质膜透性的测定<sup>[13]</sup>

取不同处理的芦苇幼苗植株的叶片或根用去离子水迅速冲洗干净,用刀片将材料切成小段,重蒸水迅速冲洗 2 次,再用吸水纸吸干表面水份。称一定量的样品放入试管中,加入重蒸水,用抽气泵抽气,真空渗入 30 min 后,用电导率仪测溶液的电导值。最后,将样品高温(100°C)杀死(5 min),测电导值。以相对电导率的大小来表示质膜透性,相对电导率=(原电导值/总电导值)×100%。

## 2.5 POD 活性的测定<sup>[14]</sup>

称取芦苇幼苗根和叶片 1 g,加 20 mmol/L 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 ml,于研钵中研磨成匀浆,4000 r/min 离心 15 min,取清液保存在冷处,残渣再用 5 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液提取 1 次,合并上清液,即为酶提取液。取酶提取液 1 ml 于比色杯中,加适量反应混合液(50 ml 100 mmol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液中加愈创木酚 28  $\mu$ l,30%过氧化氢 19  $\mu$ l,混匀保存于冰箱中),立即用秒表记录时间。在 470 nm 波长下测 OD 值,每隔 1 min 读数 1 次,以反应混合液 3 ml 中加 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 ml 为空白对照。酶活性以每分钟吸光度变化值表示。

## 2.6 SOD 活性的测定<sup>[15]</sup>

将不同处理的芦苇幼苗叶片或根 1 g 放入预冷的研钵中,加提取介质 10 ml(50 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液,内含 1%聚乙烯吡咯烷酮),研磨成匀浆,4°C 温度下 15000 r/min 离心 10 min,上清液为酶提取液。取 80.2  $\mu$ mol/L 核黄素溶液(以含 0.1 mmol/L EDTA 的 50 mmol/L pH 7.8 磷酸缓冲液配制)0.1 ml、反应介质(50 mmol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液内含 77.12  $\mu$ mol/L 的硝基四唑蓝、0.1 mmol/L EDTA 和 13.37 mmol/L 蛋氨酸)3.9 ml 和酶提取液 0.01 ml 于试管中,在 3000 Lux 灯下放置 10 min,在 560 nm 波长处测 OD 值,以 0.01 ml 50 mmol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液作空白。酶活力,即 SOD 活力(U/g)= $60 \Delta A N / (0.01 \times 50 \% A_0 t W_F)$ ,式中 A<sub>0</sub> 为空白对照吸光值, $\Delta A$  为 A<sub>0</sub> 与加入酶反应液的吸光值差,N 为酶提取液的总体积,t 为光照时间,0.01 为加入酶液的体积。

### 3 实验结果

#### 3.1 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量与膜脂过氧化

表 1 显示, 2 mmol/L Cd 和 10 mmol/L Zn 处理后根和叶片中的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量增加, 但 2 mmol/L Cd 的影响不显著, 4 mmol/L Cd 和 15 mmol/L Zn 的影响明显, 且与处理时间呈正相关. Pb 对叶片和根内 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量的影响不十分显著, 仅表现为在第 4 d 用 15 mmol/L 处理与对照组有一定的差异.

表 1 铅、镉和锌对芦苇叶片和根中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量的影响

Table 1 Effects of Pb, Cd and Zn on O<sub>2</sub><sup>-</sup> contents in the leaves and roots of *P. australis* (nmol/mg)

Organism	Treatment (mmol/L)	Time (d)				
		0	0.5	1	2	4
Control	0	6.20	6.35	6.09	6.88	6.16
Leaf	10	5.01	5.30	5.82	4.99	5.48
	15	5.01	5.78	6.94	7.22	13.22
Root	10	6.43	5.99	6.87	7.10	7.36
	15	6.43	6.99	7.79	8.01	10.01
Leaf	2	5.01	4.96	5.6	6.86	7.02
	4	5.01	8.18	14.23	19.15	28.14
Root	2	6.43	6.55	6.43	7.93	8.11
	4	6.43	7.06	7.74	10.52	15.66
Leaf	10	5.01	5.50	6.77	10.50	12.47
	15	5.01	5.46	16.54	20.71	30.24
Root	10	6.43	7.16	7.88	9.94	9.97
	15	6.43	7.29	9.08	13.20	19.85

在 Zn 和 Cd 作用下, 叶片和根内大量积累 MDA, 并且胁迫浓度越大、时间越长, 叶片和根内积累的 MDA 就越多; 4 mmol/L Cd 和 15 mmol/L Zn 污染的叶片和根内 MDA 含量分别比对照组高 20% 以上. 10 mmol/L Pb 处理后叶片和根内的 MDA 含量变化不显著, 但 15 mmol/L Pb 处理后, MDA 的含量随处理时间的延长逐渐增加(表 2). 可见, 用 Cd 和 Zn 处理对芦苇体内 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 MDA 含量的影响比用 Pb 处理影响大; 而受 3 种重金属胁迫的芦苇叶片中积累的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 MDA 较根部多.

表 2 铅、镉和锌对芦苇叶片和根中 MDA 含量的影响

Table 2 Effects of Pb, Cd and Zn on MDA contents in the leaves and roots of *P. australis* (μg/g)

Organism	Treatment (mmol/L)	Time (d)				
		0	0.5	1	2	4
Control	0	15.66	15.51	15.82	15.01	15.55
Leaf	10	15.54	15.37	16.49	15.61	17.06
	15	15.54	15.75	18.11	25.60	30.02
Root	10	18.73	17.25	18.77	18.64	19.15
	15	18.73	18.99	19.12	20.56	23.41
Leaf	2	15.54	17.01	16.68	17.16	18.02
	4	15.54	17.99	25.10	34.17	58.62
Root	2	18.73	18.94	18.81	19.11	20.09
	4	18.73	19.28	19.69	23.48	28.97
Leaf	10	15.54	15.11	14.98	16.61	20.12
	15	15.54	17.66	23.15	30.59	49.00
Root	10	18.73	19.26	18.67	20.88	21.10
	15	18.73	19.72	21.84	23.75	26.89

#### 3.2 质膜透性

相对电导率的变化是植物组织电解质渗漏的表观现象. 图 1 和 2 的结果表明, Zn 和 Cd 对芦苇幼苗根和叶片的电解质渗漏影响显著, 且随着 Zn 和 Cd 处理浓度的增加和处理时间的延长而加

重. 而 Pb 对芦苇幼苗根和叶片的电解质渗漏影响不显著, 除在 15 mmol/L Pb 污染条件下芦苇根和叶片的电解质渗漏在第 4 d 明显大于对照外, 其它 Pb 污染条件下皆无显著变化(图略).

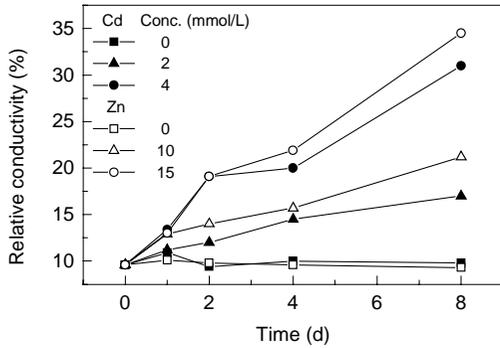


图 1 镉和锌对芦苇叶片电解质渗漏的影响  
Fig.1 Effects of Cd and Zn on electrolyte leakage in the leaves of *P. australis*

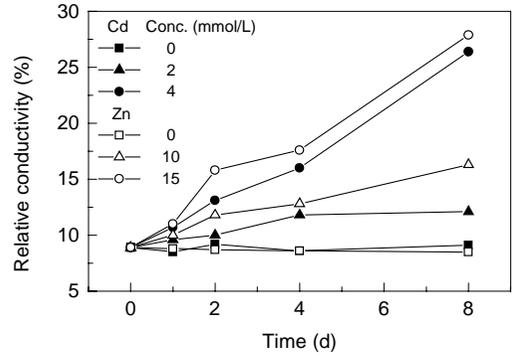


图 2 镉和锌对芦苇根电解质渗漏的影响  
Fig.2 Effects of Cd and Zn on electrolyte leakage in the roots of *P. australis*

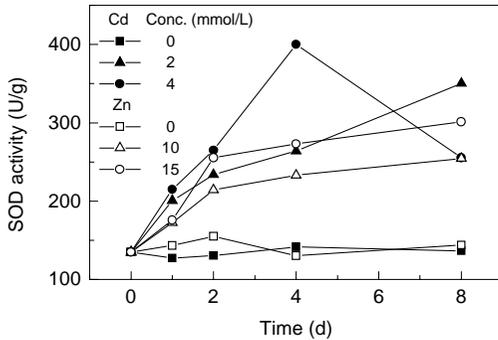


图 3 镉和锌对芦苇叶片 SOD 活性的影响  
Fig.3 Effects of Cd and Zn on SOD activity in the leaves of *P. australis*

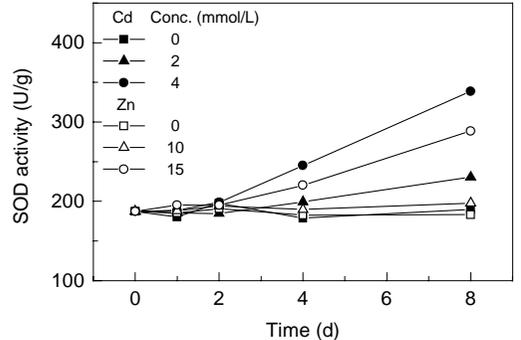


图 4 镉和锌对芦苇叶片 SOD 活性的影响  
Fig.4 Effects of Cd and Zn on SOD activity in the roots of *P. australis*

### 3.3 SOD 和 POD 活性

从所获得的数据可见, Cd 和 Zn 对芦苇幼苗根和叶片内 SOD 活性的影响比较显著. 在 2, 4 mmol/L Cd 和 10, 15 mmol/L Zn 的胁迫下, 芦苇幼苗根和叶片内 SOD 活性均与胁迫时间呈正相关; 尤其是在 4 mmol/L Cd 和 15 mmol/L Zn 的处理条件下, 芦苇根内 SOD 活性也随时间延长不断升高, 而叶片内 SOD 活性随时间延长则表现为先升高后下降的趋势(图 3, 4). 但是, 在本实验条件下 Pb 对芦苇幼苗根和叶片内 SOD 活性的影响不显著(图略).

从图 5 和 6 可见, 镉和锌的处理可使芦苇幼苗叶片和根内 POD 活性升高, 并且表现为处理浓度越高叶片和根内 POD 活性越大, 但它们的动态变化较为复杂, 呈现随胁迫时间的延长先升高、再下降、然后又升高的趋势. 而在本实验条件下 Pb 对芦苇幼苗根和叶片内 POD 活性的影响不显著(图略).

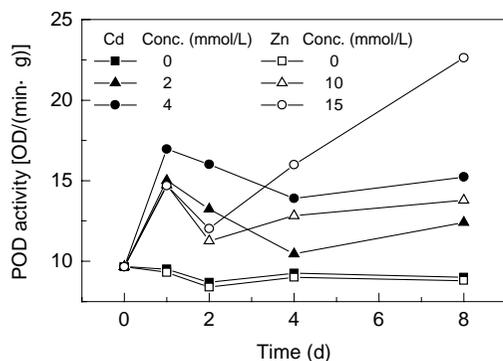


图5 镉和锌对芦苇叶片 POD 活性的影响  
Fig.5 Effects of Cd and Zn on POD activity  
in the leaves of *P. australis*

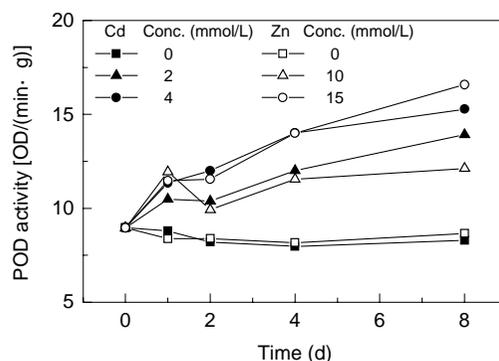


图6 镉和锌对芦苇叶片 POD 活性的影响  
Fig.6 Effects of Cd and Zn on POD activity  
in the roots of *P. australis*

## 4 讨论

正常生长条件下植物体内活性氧产生处于动态平衡,自由基浓度较低,不会引起植物伤害.当处于各种逆境胁迫条件下或衰老时,植物体内活性氧产生和消除的平衡遭到破坏,有利于活性氧的产生.当活性氧浓度超过一定阈值时,植物细胞内的大分子物质发生过氧化,特别是膜脂中的不饱和脂肪酸受到自由基的攻击,引起膜脂相分离,膜的完整性受到破坏,导致植物生长异常<sup>[16]</sup>.膜质过氧化是膜上不饱和脂肪酸中所发生的一系列活性氧反应,其最重要的产物是MDA,它是一种高活性的脂质过氧化产物,能交联脂类、核酸、糖类及蛋白质,破坏膜的结构,导致细胞膜受损伤,电解质渗漏严重.因此,MDA含量是反映脂质过氧化作用强弱的一个重要指标,而电解质渗漏又是膜损伤的直接证据.本实验结果表明,在Pb、Zn和Cd三种重金属胁迫下,芦苇幼苗叶片和根中 $O_2$ 积累,伴随MDA含量升高,膜透性增大,说明由于 $O_2$ 的过氧化伤害,细胞膜组成发生变化,结构遭到破坏,揭示了重金属胁迫下芦苇细胞膜系统伤害的机制,证明了重金属毒害植物的过程中,过多的自由基引起的膜脂过氧化充当了重要角色.

SOD和POD是细胞内清除活性氧系统中的重要酶.SOD能将 $O_2$ 歧化为 $H_2O_2$ ,抑制Haber-Weiss反应,再由POD将 $H_2O_2$ 分解成 $H_2O$ ,将有毒的超氧阴离子转变成无毒的 $H_2O$ ,使细胞内自由基维持在一个低水平,防止细胞受自由基的毒害.本研究表明,在三种重金属污染条件下,POD活性随胁迫时间的延长先升高、再下降、然后又升高,这可能是芦苇对重金属胁迫的应激反应,具体机理还有待于进一步研究.4 mmol/L Cd和15 mmol/L Zn处理后,芦苇叶片内SOD活性随时间的延长表现为先升高后下降的两阶段反应,这符合植物对胁迫反应的典型特征,即当胁迫发生后,植物体就会采取各种措施,提高抗性以适应不良环境,但如果胁迫时间过长或胁迫程度过大,超过植物所能忍耐的极限,其防御措施也就相应地减弱,乃至死亡.总体而言,SOD和POD活性均随胁迫时间的延长和胁迫强度的增加而升高,在一定程度上减轻了膜脂过氧化程度.尽管两种保护酶活性与胁迫时间和胁迫强度正相关,但植物体内 $O_2$ 积累、MDA含量以及质膜透性也随胁迫时间的延长和胁迫强度的增加而增大,导致产生的自由基总量减去清除的自由基总量后净余量不断上升,说明SOD和POD对膜系统的保护作用有一定的限度,即保护酶活性升高尚不足以弥补膜脂过氧化作用所引起的伤害.

可见,在重金属污染下细胞内 $O_2$ 浓度升高带来的膜脂过氧化增强是重金属伤害植物的主要原因,而保护酶系统SOD和POD活性的升高则可能是芦苇抗过氧化的主要机理之一.

## 参考文献 :

- [1] Price A H, Hendry G A F. Drought-induced Oxidative Stress in Wheat [J]. *Biochem. Soc. Tran.*, 1989, 17: 493–494.
- [2] Marjorette M, Pena O, Koch K A, et al. Dynamic Regulation of Copper Uptake and Detoxification Genes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol. Cell Biol.*, 1998, 18: 2514–2523.
- [3] Stohs S J, Bagchi D. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions [J]. *Free Rad. Biol. Med.*, 1995, 18: 321–326.
- [4] Cho U H, Park J O. Mercury-induced Oxidative Stress in Tomato Seedlings [J]. *Plant Science*, 2000, 156: 1–9.
- [5] 罗立新, 孙铁衍, 靳月华. 镉胁迫下小麦叶片中超氧阴离子的积累 [J]. *环境科学学报*, 1998, 18(5): 495–499.
- [6] 罗立新, 孙铁衍, 靳月华. 镉胁迫对小麦叶片中脂质过氧化的影响 [J]. *中国环境科学*, 1998, 18(1): 72–75.
- [7] Fang W C, Kao C H. Enhanced Peroxidase Activity in Rice Leaves in Response to Excess Iron, Copper and Zinc [J]. *Plant Science*, 2000, 158: 71–76.
- [8] Teisseire H, Guy V. Copper-induced Changes in Antioxidant Enzymes Activities in Fronds of Duckweed (*Lemna minor*) [J]. *Plant Science*, 2000, 153: 65–72.
- [9] Unbabin J S, Bowmer K H. Potential Use of Constructed Wetlands for Treatment of Industrial Wastewater Containing Metals [J]. *The Science of the Total Environment*, 1992, 111: 151–168.
- [10] Jean L De Maeseener. Constructed Wetlands for Sludge Dewatering [J]. *Wat. Sci. Tech.*, 1997, 35(5): 279–285.
- [11] 王爱国, 罗广华. 植物体内羟胺反应与超氧阴离子根的定量关系 [J]. *植物生理学通讯*, 1990, 6: 55–57.
- [12] 林植芳. 叶片凋零与过氧化物酶活性和脂质过氧化的关系 [J]. *植物学报*, 1984, 26(6): 605–615.
- [13] 康言, 李明亮. 植物抗盐性的测量 [J]. *曲阜师大学报*, 1984, 1: 59–62.
- [14] 张志良. POD 活性的测定 [A]. 张志良. *植物生理学实验指导* [C]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 154–155.
- [15] Dhindsa R S. Leaf Senescence Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation and Decreased Levels of a Superoxide Dismutase and Catalase [J]. *J. Exp. Bot.*, 1981, 32: 93–101.
- [16] 许祥明, 叶和春, 李国风. 耐盐植物研究进展 [J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(4): 379–387.

## Effects of Pb, Cd, and Zn on Oxidative Stress and Antioxidative Ability in *Phragmites australis*

WANG Zheng-qiu<sup>1</sup>, JIANG Xing-yu<sup>2</sup>, WANG Chang-hai<sup>1</sup>

(1. Institute of Marine Biochemical Engineering, Yantai University, Yantai, Shandong 264005, China;

2. Agricultural College, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** Superoxide anion radical, MDA, electrolyte leakage, as well as activities of SOD and POD in the leaf and root cells of *Phragmites australis* were investigated under the conditions of Pb, Cd, and Zn stresses. Under these conditions, the accumulation of superoxide anion radical and MDA, and the electrolyte leakage of the cell membrane increased in the plant cells, which indicated that the peroxidation of cell membrane lipid was induced and the membrane system was damaged. Higher activity of SOD and POD, two key enzymes of the antioxidative system, was observed in all Pb, Cd, and Zn treated plant cells. These results suggest that the enhancement of peroxidation of membrane lipid induced by superoxide anion radical may be one of the heavy metal injury mechanisms in *P. australis*. Furthermore, the accumulation of the two enzymes would be part of general defense strategies to cope with oxidative stress.

**Key words:** *Phragmites australis*; Pb; Cd; Zn; oxidative stress; antioxidative ability