

外源谷胱甘肽(GSH)对水鳖 Zn^{2+} 毒害的缓解作用

赵娟, 施国新*, 徐勤松, 王学, 许丙军, 胡金朝

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要: 研究在 10 mg L^{-1} Zn^{2+} 毒害下外施 $10\text{--}50\text{ mg L}^{-1}$ 梯度浓度的还原型谷胱甘肽(GSH)对水鳖(*Hydrocharis dubia*)的保护酶(SOD、CAT、POD)活性、GSH、可溶性蛋白质、叶绿素、 H_2O_2 含量以及 O_2^- 产生速率的影响。结果表明, 相对单一的 Zn^{2+} 毒害, 施用外源 GSH 可明显减轻毒害症状, 植物体内 GSH 含量增加了 10.71%–35.71%, O_2^- 的产生速率最低降至 78.2%, H_2O_2 含量最低降至 62.7%。植物体内可溶性蛋白含量和 CAT、SOD、POD 的活性最大分别增加了 74.2%、108.2%、61.4%、19.5%。随 GSH 浓度增大, 缓解能力下降, 在培养液中最佳缓解浓度为 $20\text{--}40\text{ mg L}^{-1}$ 。

关键词: 还原型谷胱甘肽; Zn^{2+} ; 水鳖; 缓解作用

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)03-0213-05

Alleviatory Effect of Exogenous Glutathione (GSH) on *Hydrocharis dubia* Toxicated by Zn^{2+}

ZHAO Juan, SHI Guo-xin, XU Qin-song, WANG Xue, XU Bing-jun, HU Jin-zhao

(College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The effect of 10 mg L^{-1} Zn^{2+} together with various concentrations of glutathione (GSH) on the changes in activity of protective enzymes (SOD, CAT, POD), generation rate of O_2^- , and the contents of GSH, soluble protein, chlorophyll and H_2O_2 in leaves of *Hydrocharis dubia* were determined. The results showed that the addition of endogenous GSH in treatments obviously increased the content of GSH in leaves by 10.71% to 35.71%, generation rate of O_2^- was lowered to 78.2% and H_2O_2 was scavenged to 62.7% as compared to the treatment with 10 mg L^{-1} Zn^{2+} alone without GSH. The content of soluble protein increased at most by 74.2%, and the activities of CAT, SOD, POD increased at most by 108.2%, 61.4%, 19.5%, respectively. It is obvious that GSH relieve the toxic of Zn^{2+} to some extent. The most effective concentrations of GSH against Zn^{2+} stress are $20\text{--}40\text{ mg L}^{-1}$ in culture solution.

Key words: Glutathione (GSH); Zn^{2+} ; *Hydrocharis dubia*; Alleviated effect

重金属污染对植物生长发育的影响已引起了国内外学者的高度关注, 并在缓解植物重金属胁迫方面做了比较系统的研究^[1]。目前所用的缓解物质, 如硒、镍、稀土等, 虽在一定程度上提高了植物对重金属的抗性, 但这些物质本身也具有毒性, 往往会引起二次污染和其它逆境胁迫^[2-3]。

正常生长的植物中富含谷胱甘肽(glutathione,

GSH), 它是有效的酶活性调节物质^[4], 能够维持组织的抗氧化特性, 在对氧化还原敏感的信号传导调节中起关键性作用^[5-8]。植物体内 GSH 水平的高低与植物对环境胁迫的耐受性密切相关^[9]。目前尚未见利用 GSH 缓解重金属对水生植物胁迫的报道。本文通过施用外源 GSH, 观察在 Zn^{2+} 胁迫下水鳖(*Hydrocharis dubia* (Bl.) Backer)的叶绿素和可溶性

收稿日期: 2005-09-30 接受日期: 2006-02-22

基金项目: 国家自然科学基金(30370083); 江苏省教育厅自然科学基金(03KJB180062); 江苏省重点实验室开放基金项目资助

* 通讯作者 Corresponding author

蛋白质含量、抗氧化酶系统的活性及活性氧产生速率等的变化,为筛选无毒副作用的缓解重金属胁迫的物质提供参考依据。

1 材料和方法

仪器 Sigma 3K30 型冷冻离心机;上海第三分析仪器厂产的 UV-754 型紫外分光光度计;上海天平仪器厂产的 HHS-4s 型电热恒温水浴锅。

材料 水鳖(*Hydrocharis dubia* (Bl.) Backer) 属水鳖科(Hydrocharitaceae)植物,为多年生水生经济植物,在我国南北均有分布。实验用水鳖于 5 月下旬采自太湖水域。

选取生长一致的水鳖,用自来水在实验室内预培养 2-3 d 后进行处理。以用 1/20 Hoagland 培养液处理做原始对照。实验处理如下:0 为用含 $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 的 1/20 Hoagland 培养液处理;1 为用含 $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 和 $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ GSH}$ 的 1/20 Hoagland 培养液处理;2 为用含 $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 和 $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ GSH}$ 的 1/20 Hoagland 培养液处理;3 为用含 $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 和 $30 \text{ mg L}^{-1} \text{ GSH}$ 的 1/20 Hoagland 培养液处理;4 为用含 $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 和 $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ GSH}$ 的 1/20 Hoagland 培养液处理;5 为用含 $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 和 $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ GSH}$ 的 1/20 Hoagland 培养液处理。用 ZnSO_4 (AR) 配制 Zn^{2+} 溶液,含量以 Zn^{2+} 计。5 d 后取样进行测定,每处理重复 3 次,对数据进行统计分析。

叶绿素的测定 参照张志良的方法^[10]。单位用 $\text{mg g}^{-1} \text{ FW}$ 表示。

酶液的提取 取新鲜叶片,用蒸馏水洗净,揩干,电子天平称重。放入研钵中,加 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.8),冰浴研磨, 4°C 、 $10\ 000\times\text{g}$ 下离心 20 min,上清液用来测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)活性和可溶性蛋白含量。

SOD 活性测定 用黄嘌呤氧化酶法^[11]测定,采用南京建成生物研究所生产的试剂盒,其活力单位定义为:每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个亚硝酸盐单位(NU)。

CAT 活性测定 用南京建成生物工程研究所的 CAT 试剂盒测定^[12],其活力单位定义为:以每克叶片每秒分解 $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 的 CAT 量为一个活

力单位(U)。

POD 活性测定 采用愈创木酚法^[13]测定,以每克叶片每分钟 A_{470} 变化 0.01 为一个酶活力单位。

可溶性蛋白质含量测定 采用 Bradford 考马斯亮蓝 G250 法^[14]测定,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白作标准曲线。单位用 $\text{mg g}^{-1} \text{ FW}$ 表示。

O_2^- 产生速率 按照王爱国和罗广华的方法^[15]测定,单位用 $\text{OD}_{530} \text{ g}^{-1} \text{ FW min}^{-1}$ 表示。

H_2O_2 含量测定 用 H_2O_2 试剂盒测定,购自南京建成生物工程研究所。单位用 $\text{mmol g}^{-1} \text{ FW}$ 表示。

GSH 含量测定 用 GSH 试剂盒测定,购自南京建成生物工程研究所。单位用 $\text{mg g}^{-1} \text{ FW}$ 表示。

2 结果和分析

2.1 GSH 含量的变化

从图 1A 可见,在 Zn^{2+} 的毒害下,GSH 的含量显著降低,只有对照的 75.7%;而施用外源 GSH 后,叶片内的 GSH 含量显著增加。外源 GSH 浓度为 30 mg L^{-1} 时,叶片内 GSH 含量比未施外源 GSH 的单一 Zn^{2+} 毒害增加了 35.7%,比原始对照增加了 2.7%。

2.2 外源 GSH 对 Zn^{2+} 毒害下的叶绿素含量的影响

从图 1B 可见, Zn^{2+} 毒害下叶片的叶绿素含量降低,是原始对照的 88.8%。加入外源 GSH 后其含量增加,在 GSH 浓度为 30 mg L^{-1} 时叶绿素含量达到峰值,与 $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 毒害相比,叶绿素 a 和 b 含量分别增加了 37.7%和 31.8%,比原始对照增加了 22.2%和 23.4%,说明施用外源 GSH 促进了叶绿素的合成。统计分析显示,叶绿素 a 含量在 Zn^{2+} 毒害下与 GSH 缓解毒害下相比: $t=2.776, P=0.012 < 0.05$,外源 GSH 的施用显著提高了叶片的叶绿素 a 含量。同样,外源 GSH 对叶绿素 b 的含量也有较大影响, $t=2.77, P=0.0048 < 0.01$ 。由此可见,施用外源 GSH 极显著增加了叶片的叶绿素含量,提高了植物的光合作用,以达到缓解毒害的目的,并且在外源 GSH 浓度为 30 mg L^{-1} 时其缓解效果最显著。

2.3 外源 GSH 对保护酶活性的影响

图 1C 可见,在 Zn^{2+} 毒害下,SOD 的活性上升,这与低浓度 Zn^{2+} 处理时,SOD 被诱导表达有关。SOD 在逆境下被诱导表达而活性增加,与多种因素

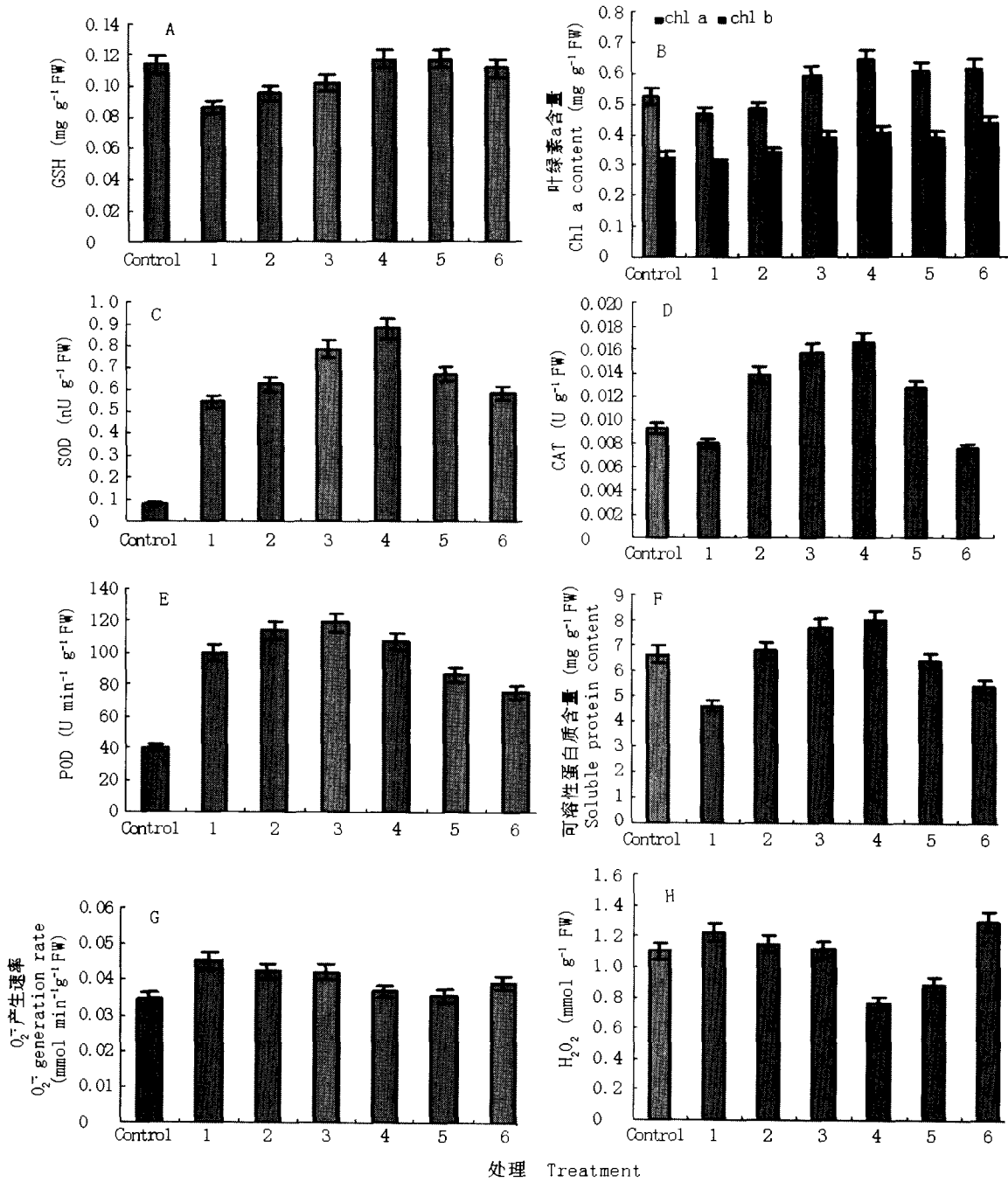


图 1 外源 GSH 处理对水螅叶片的 GSH (A)、叶绿素 a (B)、可溶性蛋白 (F) 和 H₂O₂ (H) 含量、SOD (C)、CAT (D)、POD (E) 活性、及 O₂⁻ 产生速率 (G) 的影响

Fig. 1 Effects of exogenous GSH on the contents of GSH (A), chlorophyll a (B), soluble protein (F) and H₂O₂ (H), the activities of SOD (C), CAT (D), POD (E) and O₂⁻ generation rate (G) in leaves of *H. dubia* under Zn²⁺ stress

Treatments from 1 to 5 are cultured on 1/20 Hoagland and 10 mg L⁻¹ Zn²⁺ supplemented with GSH at 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹ and 50 mg L⁻¹, respectively, whereas control represent 1/20 Hoagland and 0 represent 1/20 Hoagland with 10 mg L⁻¹ Zn²⁺.

有关, 往往是内源激素和活性氧共同调节 SOD 的表达。因此在图 1A 中原始对照 GSH 含量虽然较高, 但其 SOD 活性并不高。施用外源 GSH 后, SOD

活性明显增大, 在 GSH 的浓度为 30 mg L⁻¹ 时达到峰值, 相对于单一 Zn²⁺ 毒害其活性增加了 61.4%, 统计分析显示, $t=2.599, P=0.048 < 0.05$ 。外源 GSH

对 SOD 活性影响显著。

图 1D 可见, 外源 GSH 的施用对于 CAT 的活性也有较大的影响。CAT 活性在 Zn^{2+} 毒害下降低, 是原始对照的 85.9%。施用外源 GSH 后, 其活性增加。当 GSH 浓度为 30 mg L^{-1} 时达到峰值, 是 Zn^{2+} 毒害的 208.2%。统计分析显示, $t=3.34, P=0.028 < 0.05$, 外源 GSH 作用下 CAT 活性显著提高。

POD 是植物体内重要的保护酶, 它能有效清除 H_2O_2 和其他的氧自由基。与 SOD 类似, 在低浓度 Zn^{2+} 短时间处理下, POD 会应激性地表达, 使生物体能够通过自身诱导的保护酶清除胁迫产生的超氧阴离子, 达到减轻毒害的目的。当外源 GSH 的加入, POD 的活性有了较大变化, 如图 1E 所示, 其活性随 GSH 浓度的增大先增加后降低, 在 GSH 浓度为 20 mg L^{-1} 时 POD 活性达到峰值, 是 Zn^{2+} 毒害的 119.5%。

2.4 可溶性蛋白质含量的变化

从图 1F 可以看出, 外源 GSH 的施用显著影响了可溶性蛋白质的含量。在 Zn^{2+} 毒害下, 可溶性蛋白质含量显著减少, 是对照的 69.1%。施用 GSH 后, 可溶性蛋白质含量显著增加, 在 GSH 浓度为 30 mg L^{-1} 时达到最大, 是 Zn^{2+} 毒害的 174.2%, 比对照高 20.4%。统计分析显示, $t=4.799, P=0.0087 < 0.01$, 可溶性蛋白质含量极显著增加。

2.5 活性氧产生速率的变化

外源 GSH 的加入有效地清除了 O_2^- , 也减少了它在植物体内的积累, 防止对植物造成大的伤害。图 1G 可见, O_2^- 产生速率明显随着 GSH 浓度的增加先降后升, 当 GSH 浓度为 40 mg L^{-1} 时, O_2^- 的产生速率最低, 是 Zn^{2+} 毒害的 78.2%, 其变化趋势与 SOD 的相反, 说明 SOD 清除了 O_2^- 。统计分析可知: $t=2.776, P=0.012 < 0.05$, 显示 GSH 缓解下 O_2^- 产生速率显著降低。

H_2O_2 的产生速率与 O_2^- 的产生速率总体趋势一致。当 GSH 浓度为 30 mg L^{-1} 时, 其含量最少, 是 Zn^{2+} 毒害的 62.7%。经统计分析显示: $t=2.776, P=0.131321 < 0.05$, 外源 GSH 缓解下与 Zn^{2+} 毒害的差异显著, 表明外源 GSH 有效地减少了 H_2O_2 的积累。

3 讨论

Zn^{2+} 是植物生长必需的微量元素, 但是当 Zn^{2+}

的浓度较高时, 就表现出对植物的毒害作用^[16]。锌对生物体的危害一般认为是其与生物大分子的结合造成的, 它能够与酶的活性中心或活性蛋白的巯基结合, 导致蛋白质构象改变, 酶活性丧失^[18]。此外, 还可通过生物体内氧化还原反应, 产生自由基而导致细胞的氧化损伤^[19]。

GSH 是一种重要的水溶性抗氧化物质, 它可以直接同活性氧反应, 将其还原^[20]; 又可以作为酶的底物在活性氧清除中发挥重要作用^[21], 它在植物体内往往通过 ASA-GSH-NADPH 循环^[20]清除植物体内产生的活性氧, 在这一途径中, GSH 作为 H_2O_2 还原的再循环中间物而存在。

水鳖对 Zn^{2+} 的毒害较敏感, 10 mg L^{-1} Zn^{2+} 使水鳖叶片内活性氧产生速率增加, 同时叶绿素 a 和可溶性蛋白质含量降低, 叶片发黄, 光合作用受影响, 这是因为叶绿素的降解与活性氧有关^[22]。实验表明, 加入外源 GSH 后, 清除了活性氧, 抑制了 Zn^{2+} 毒害导致的蛋白质和叶绿素降解, 使叶绿素 a 和 b 及可溶性蛋白质含量都显著增加, 在 GSH 浓度为 50 mg L^{-1} 时, 其含量高于原始对照, 表明 GSH 能促进叶绿素的合成, 缓解了毒害症状。

活性氧除了由 GSH 直接还原, 与植物体内的抗氧化酶系统关系更密切。SOD、CAT、POD 是植物体内主要的保护酶。SOD 可以催化 O_2^- 发生歧化反应生成 H_2O_2 和 O_2 ; CAT 和 POD 则将 H_2O_2 分解成水。在正常情况下, 植物体内产生和清除 O_2^- 的能力处于动态平衡, 植物体内的 SOD、POD 的活性处于稳定水平。低浓度的 Zn^{2+} 毒害诱导植物过量表达 SOD、POD, 使其活性升高, 以清除积累的 O_2^- ^[16], SOD 在逆境下被诱导表达而活性增加, 与多种因素有关, 往往是内源激素和活性氧共同调节 SOD 的表达的结果^[16-17]。外源 GSH 的加入, 更有效地提高了 SOD 和 CAT 的活性, 在 GSH 浓度为 30 mg L^{-1} 时, SOD、CAT 活性达到最高, POD 的活性在 GSH 浓度为 20 mg L^{-1} 时达到峰值。由于 CAT、SOD 保持较高活性, 导致 H_2O_2 浓度下降, 使歧化反应正常进行, O_2^- 产生速率低于 Zn^{2+} 毒害, 避免对植物的损伤。

外源 GSH 能有效地减缓锌的毒害, 其原因可能是由于植物在受到各种胁迫时, 自身会诱导产生大量的 GSH, 加入外源 GSH 后, 又增加了水鳖叶片内源 GSH 的含量。GSH 一方面通过提高保护酶活

性,清除活性氧,另一方面 GSH 可以螯合重金属^[23],而且作为金属螯合肽合成的重要前体,对植物内重金属胁迫下体内金属螯合肽的含量有重要的影响^[24],从而增加了金属螯合肽的合成量,螯合重金属,降低了游离的重金属离子含量,解除了重金属与酶蛋白的结合,提高了酶活性,从而减轻其毒害。

参考文献

- [1] Wang X(王学), Shi G X(施国新), Ma G Y(马广岳), et al. Effects of exogenous spermidine on resistance of *Nymphoides peltatum* to Hg²⁺ stress [J]. *Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学报), 2004, 30 (1): 69–74. (in Chinese)
- [2] Zhang X L(张小兰), Shi G X(施国新), Xu Q S(徐勤松), et al. Detoxication of lanthanum against nickel in *Hydrocharis dubia* Bl. [J]. *J Chin Rare Earth Soc* (中国稀土学报), 2003, 21 (1): 81–84. (in Chinese)
- [3] Wang C T(王春涛), Shi G X(施国新), Xu Q S(徐勤松), et al. Toxic effect of Cd²⁺ on *Potamogeton crispus* alleviated by exogenous Nd³⁺ [J]. *J Chin Rare Earth Soc* (中国稀土学报), 2004, 22 (6): 821–824. (in Chinese)
- [4] May M J, Vernoux T, Leaver C, et al. Glutathione homeostasis in plant: Implications for environmental sensing and plant development [J]. *J Exp Bot*, 1998, 49: 649–667.
- [5] Cnubben N H P, Rietjens I M C M, Wortelboer H, et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2001, 10: 141–152.
- [6] He rouart D, Baudouin E, Frenedo P, et al. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-rhizobium symbiosis [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 40: 619–624.
- [7] Pastorig M, Foyer C H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 460–468.
- [8] Sen C K. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements [J]. *Mol Cell Biochem*, 1999, 196: 31–42.
- [9] Xiong F S(熊福生), Song P(宋平), Gao Y Z(高煜珠). Effects of photoinhibitory conditions on the metabolism of glutathione in C₃ plant leaves [J]. *Jiangsu J Agri Sci* (江苏农业学报), 1996, 32 (5): 328–331. (in Chinese)
- [10] Zhang Z L(张志良). *The Experimental Guide for Plant Physiology* [M]. 2nd ed. Beijing: High Education Press, 1990. 88–91, 154–155. (in Chinese)
- [11] Zhang Z L(张志良), Qu W J(瞿伟菁). *The Experimental Guide for Plant Physiology* [M]. 3rd ed. Beijing: High Education Press, 2003. 67–69, 268–269. (in Chinese)
- [12] ПоμИНок. Translated by Xing J H(荆家海), Ding Z R(丁钟荣). *Analyzing Methods of Plant Biochemistry* [M]. Beijing: Science Press, 1981. 197–209. (in Chinese)
- [13] Maehly A C. Plant peroxidase [J]. *Meth Enzym*, 1995, 2: 801–813.
- [14] Bradford M A. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1): 248–254.
- [15] Wang A G(王爱国), Luo G H(罗广华). Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1990, 10 (1): 27–30. (in Chinese)
- [16] Hao H Q(郝怀庆), Shi G X(施国新). Toxic effect of zinc on *Hydrocharis dubia* [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2001, 7 (6): 526–531. (in Chinese)
- [17] Chen H F(陈惠芳), Wang Q(王琦), Fu X C(付学池), et al. The molecular biology of superoxide dismutase (SOD) [J]. *Chem Life* (生命的化学), 2003, 23 (4): 291–293. (in Chinese)
- [18] Van A F, Clijsters H. Effects of metal on enzyme activity in plants [J]. *Plant Cell Environ*, 1990, 13: 195–206.
- [19] Alscher R G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants [J]. *Physiol Plant*, 1989, 77: 457–464.
- [20] Zhu W M(朱为民), Ding H D(丁海东), Qi N M(齐乃敏), et al. Effects of Cd²⁺ stress on ascorbate-glutathione cycle metabolism in tomato seedlings [J]. *Acta Agri Boreali-Sin* (华北农学报), 2005, 20 (3): 50–53. (in Chinese)
- [21] Du X M(杜秀敏), Yin W X(殷文璇), Zhao Y X(赵彦修), et al. The production and scavenging of reactive oxygen species in plants [J]. *Chin J Biotechn* (生物工程学报), 2001, 17(2): 121–125. (in Chinese)
- [22] Jiang M Y(蒋明义), Yang W Y(杨文英), Xu J(徐江), et al. Active oxygen damage effect of chlorophyll degradation in rice seedlings under osmotic stress [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1994, 36 (4): 289–295. (in Chinese)
- [23] Zhang Y X(张玉秀), Chai T Y(柴团耀), Burkard G. Research advances on the mechanisms of heavy metal tolerance in plants [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41(5): 453–457. (in Chinese)
- [24] Cai B S(蔡保松), Lei M(雷梅), Chen T B(陈同斌), et al. Phytochelatin and their roles in phyto-tolerance to heavy metals: A review [J]. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2003, 23 (10): 2125–2132. (in Chinese)