

Cd²⁺胁迫下浮萍叶细胞核超微结构、nDNA 损伤及抗氧化酶系的变化

王如平¹, 解凯彬^{2*}, 徐楠², 徐勤松², 施国新²

(1. 扬州环境资源职业技术学院, 江苏扬州 225002; 2. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046)

摘要: 以不同浓度 Cd²⁺ 处理 6 d 的浮萍为材料, 从细胞核超微结构损伤、nDNA 一级结构变化及抗氧化酶系活性改变等方面分析重金属的植物毒理学效应。透射电镜观察发现, 5~7 mg/L Cd²⁺ 处理的细胞核膜完整, 染色质凝聚并趋边化; 10 mg/L Cd²⁺ 处理后则核仁解体, 且 DNA 原位末端标记(TUNEL)检测发现 DNA 的 3'-OH 断端可被特异标记, 表现出典型的凋亡细胞特征。而 20 mg/L Cd²⁺ 已导致细胞坏死。同时, 较低浓度的 Cd²⁺ 胁迫可刺激抗氧化酶(SOD, POD, CAT)活性升高, 以清除体内活性氧, 而随金属浓度的进一步提高, 三种抗氧化酶活性都急速下降。研究发现, 活性氧和抗氧化酶系密切参与了重金属 Cd²⁺ 诱导的浮萍体细胞凋亡过程。

关键词: Cd²⁺; 浮萍; 超微结构; nDNA 损伤; 抗氧化酶; TUNEL

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)04-0502-04

Changes of nuclear ultrastructure, nDNA and antioxidant enzymes in leaves of *Lemna minor* induced by Cd²⁺

WANG Ru-Ping¹, XIE Kai-Bin^{2*}, XU Nan²,
XU Qin-Song², SHI Guo-Xin²

(1. Yangzhou Vocational College of Environment and Resources, Yangzhou 225002, China;
2. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: Damage to nuclear DNA and ultrastructure and changes of antioxidant enzymes in leaves of *Lemna minor* grown in different Cd²⁺ concentration gradient for 6 days were investigated to clarify the phytotoxicity of heavy metals in aquatic plants. The condensation and marginations of chromatin were observed under the electron microscope when the Cd²⁺ concentration was from 5-7 mg/L; nucleolus break up when the Cd²⁺ concentration was 10 mg/L. TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) analysis of cells revealed that the nuclear DNA strand breaks could be identified by labeling free 3'-OH termini, which was the typical feature of the cell apoptosis process. And necrotic injury occurred in 20 mg/L Cd²⁺ group. The activities of antioxidant enzymes could be stimulated exposing to low Cd²⁺ concentration to clean up the active oxygen, and the cell apoptosis happened when their activities declined rapidly at higher Cd²⁺ concentrations. The results also indicated that reactive oxygen species(ROS) and antioxidant enzymes were involved in the apoptosis process.

Key words: Cd²⁺; *Lemna minor*; ultrastructure; nDNA damage; antioxidant enzymes; TUNEL

收稿日期: 2008-10-06 修回日期: 2009-05-20

基金项目: 国家自然科学基金(30670121)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30670121)]

作者简介: 王如平(1960-), 江苏扬州人, 硕士, 副教授, 研究方向为植物细胞及生理生化。

* 通讯作者(Author for correspondence): 硕士, 副教授, 研究方向为植物细胞生理生化。

Cd²⁺ 为重金属污染物之一,不仅对植物具有毒害作用(吴燕玉等,1997),还可以进入食物链危及人类健康(Sugiyama,1994)。有关重金属对水生植物生长发育过程和生理生化的影响,国内外学者已作过较多的研究工作(施国新等,2000;Korichera 等,1997;张玉秀等,1999),但对于重金属胁迫诱导的植物细胞程序性死亡(PCD),国内外报道并不多见。细胞程序性死亡是指由基因控制的细胞自主性死亡,它有别于一般的细胞坏死(deJong 等,2002)。近年来,对植物细胞程序性死亡的研究越来越广泛,除了植物自身生长发育过程中的 PCD 外,逆境条件也常常导致植物细胞的程序性死亡(于维华等,2004)。目前常用的研究方法是形态学观察法和生化检测法(谭茂玉等,2006)。

本文以分布广泛的浮萍(*Lemna minor*)为研究对象,应用生理测定、透射电子显微镜、TUNEL 原位标记技术对其叶细胞核损伤及抗氧化酶系活性变化规律进行初步分析,旨在揭示重金属胁迫条件下水生植物 PCD 的发生及其可能原因,以期进一步探讨植物防御重金属伤害和耐重金属胁迫的机理,为实践中筛选灵敏的重金属水污染监测植物提供参考依据和毒害指标。

1 材料与方 法

1.1 材料培养与处理

浮萍于 2002 年 5 月上旬(25 °C 左右)采自苏州东山,采集后选取生长良好,长势一致的植株,先用去离子水培养 2 d,然后于上午 9:00 左右,分别移至已加入 CdCl₂ 的玻璃缸中,处理浓度:0、5、7、10、20 mg/L(以纯 Cd²⁺ 计)。所有处理材料均置于 Forma-3744 型全封闭光照培养箱中,空气温度(25.0±0.5)°C/(15.0±0.5)°C(日/夜),每天光照 12 h(光强 70 μmol·photons·m⁻²·s⁻¹)。第 6 天选取直径 6 mm 的叶片作为实验材料进行测定。

1.2 电子显微镜观察

将叶片自中央位置取材后,放入 2.5%戊二醛和 2%锇酸双重固定,丙酮系列脱水,Epon812 包埋,LKB 切片机制片,经醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色后于 Hitachi 600-A-2 型透射电镜下观察和拍照。

1.3 TUNEL 检测

另取同样位置叶片,置于 FAA 固定液中抽气

固定 24 h,常规酒精系列脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,Leica 切片机切片(叶片横切),厚度 7 μm。用作原位末端标记的切片用含多聚赖氨酸的粘片剂粘片 45 °C 保存过夜。为避免正常细胞中的 DNA 降解,所用试剂均不含 DNA 酶。切片经过脱腊,PBS 缓冲液漂洗及微波增透,然后用蛋白酶 K(20 μg/mL)在 37 °C 消化 20 min,双蒸水清洗,最后按照试剂盒(In Situ Cell Death Kit,AP)使用说明染色,Olympus 显微镜下观察拍照。

1.4 抗氧化酶系的提取和测定

取 0.5 g 新鲜材料于预冷的研钵中,加入 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.8),冰浴,研磨,10 000 r/min,低温(0~4 °C)离心 20 min,取其上清液。SOD、POD、CAT 的测定均按照 Trevor 和 Fletcher(1994)的方法(Trevor 等,1994)。实验设 2 个平行组,重复 3 次。用系统自带软件对实验数据进行相关性(R)统计分析。

2 实验结果

2.1 细胞核的损伤

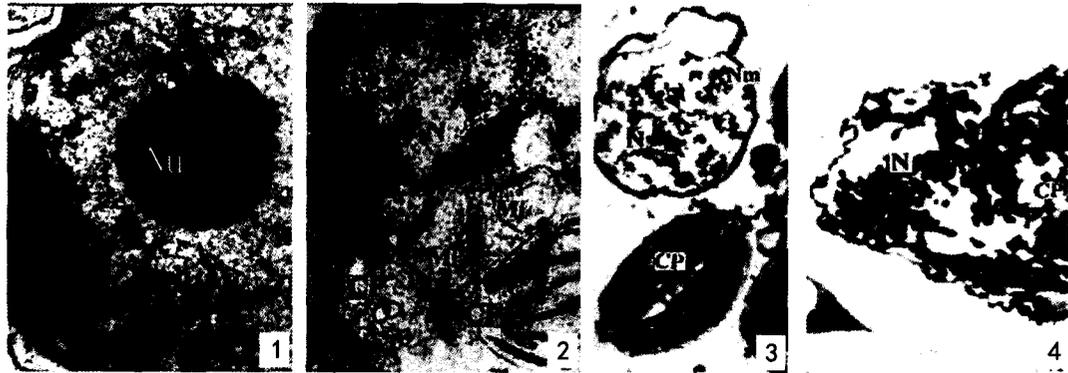
对照组叶细胞形态规则,细胞核膜完整,核仁边缘清晰,染色质分布均匀,细胞质内各种细胞器清晰(图版 I:1)。5 mg/L Cd²⁺ 处理 6d 的叶细胞,核内染色质出现凝聚状态。7 mg/L Cd²⁺ 处理的叶细胞核染色质进一步凝缩且周边化(图版 I:2)。10 mg/L Cd²⁺ 处理叶细胞的核仁已解体分散,核质呈高电子密度的颗粒或团块状态(图版 I:3)。20 mg/L Cd²⁺ 则出现细胞坏死,表现为核膜破裂,染色质散出(图版 I:4)。

2.2 细胞核 DNA 断裂程度的 TUNEL 检测

Cd²⁺ 胁迫下第 6 天,经 TUNEL 检测 5 mg/L Cd²⁺ 处理的部分细胞已观察到 DNA 断裂信号,细胞核被标记成棕色,呈 TUNEL 阳性(图版 II:2 中箭头所示)。随着 Cd²⁺ 处理浓度的增高,TUNEL 阳性细胞的比例明显上升。10 mg/L Cd²⁺ 处理下,约有 50%~60%的细胞检测到强烈的 DNA 断裂信号(图版 II:3 中箭头所示)。而对照组细胞均未检测到 TUNEL 标记阳性细胞(图版 II:1)。

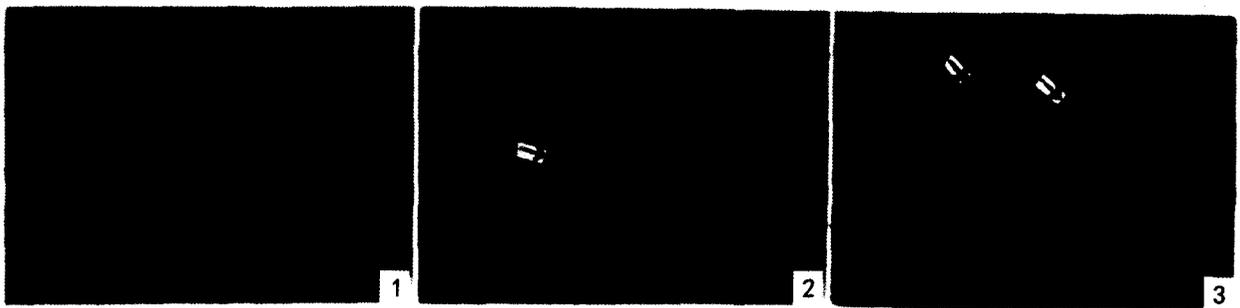
2.3 抗氧化酶系统活性的变化

如图 1 所示,SOD 含量的变化总趋势表现为低浓度 Cd²⁺ 刺激 SOD 活性迅速上升($R=0.975, P<0.01^{***}$),并在 7 mg/L Cd²⁺ 达到峰值,较对照升



图版 I Cd²⁺胁迫下浮萍叶细胞核超微结构变化 1. 对照叶细胞的细胞核(×8 000); 2. 7 mg/L Cd²⁺ 处理的叶细胞, 示染色质凝聚和周边化(×6 000); 3. 10 mg/L Cd²⁺ 处理的叶细胞, 示核仁解体成多个小核仁, 呈颗粒状分布于核膜附近(×5 000); 4. 20 mg/L Cd²⁺ 处理的叶细胞, 示细胞核解体(×5 000)。

Plate I Ultrastructural changes of nucleus in *Lemna minor* leaves treated with Cd²⁺ 1. nucleus in normal leaf cells(×8 000); 2. Leaf cells treated with 7 mg/L Cd²⁺, showing condensation and shrinkage of chromatin at the periphery of nuclear membrane(×6 000); 3. Leaf cells treated with 10 mg/L Cd²⁺, showing break of nucleolus into several small nucleoli mainly distribution nearby the nuclear membrane(×5 000); 4. Leaf cells treated with 20 mg/L Cd²⁺, showing chromatin highly condensed and nucleus broke down(×6 000).



图版 II Cd²⁺胁迫下浮萍叶细胞 nDNA 断裂的 TUNEL 检测结果 1. 对照细胞, 无 TUNEL 标记信号; 2. 5 mg/L Cd²⁺ 处理组, 检测到 DNA 断裂信号(箭头所示), 且被标记细胞核形态规则; 3. 20 mg/L Cd²⁺ 处理组, 检测到大量的 DNA 断裂信号(箭头所示), 而被标记细胞核形态不规则。

Plate II Results of DNA cleavage in *Lemna minor* leaves treated with Cd²⁺ by TUNEL method 1. Control. There was no positive TUNEL staining in the section; 2. After treated with 5 mg/L Cd²⁺, cells gave positive reaction to TUNEL staining, which were markedly regular; 3. After treated with 20 mg/L Cd²⁺, cells were also gave positive reaction to TUNEL staining, which were irregular.

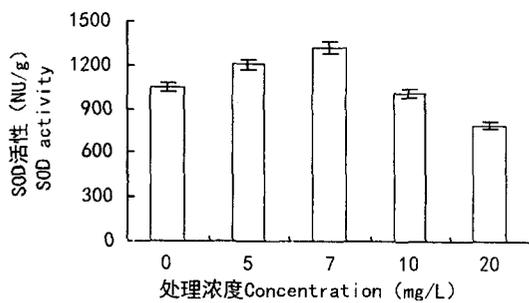


图 1 Cd²⁺ 处理后 SOD 活性的变化

Fig. 1 Effect of Cd²⁺ pollution on SOD activity

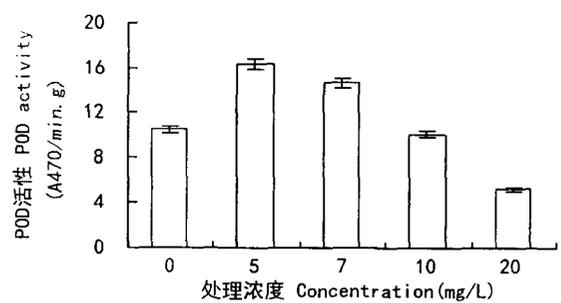


图 2 Cd²⁺ 处理后 POD 活性的变化

Fig. 2 Effect of Cd²⁺ pollution on POD activity

高 26.16%。当 Cd²⁺ 浓度进一步加大时, SOD 活性呈急速下降趋势 ($R = -0.839, P < 0.05^{**}$), 10 mg/L

Cd²⁺ 活性低于对照, 20 mg/L Cd²⁺ SOD 活性仅为对照 75.30%。

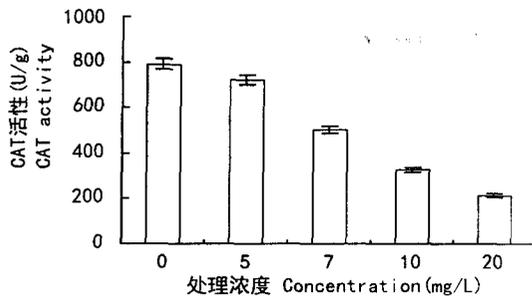


图 3 Cd²⁺处理后 CAT 活性的变化

Fig. 3 Effect of Cd²⁺ pollution on CAT activity

POD 活性变化(图 2)则在 5 mg/L Cd²⁺组中升高至对照的 156.46%,而后随 Cd²⁺浓度的加大,POD 活性迅速下降直至对照的 49.76% ($R = -0.937, P < 0.01^{***}$)。

CAT 活性的变化相对敏感(图 3),在整个浓度梯度中均表现持续下降。5 mg/L Cd²⁺处理的比对照下降了 8.78%,而后急速下降 ($R = -0.912, P < 0.01^{***}$),20 mg/L 则仅为对照 27.15%。

3 讨论

近年来,有关重金属诱导细胞凋亡及其机制的研究已得到广泛的重视,国内外均有重金属胁迫诱导细胞凋亡的报道(Habbebu 等,1998;Ishido 等,1998;翟琦巍等,2000),但从环境污染角度开展重金属诱导水生植物细胞凋亡的研究还很少。

细胞凋亡的一个重要特征是 DNA 发生片段化,TUNEL 原位末端标记出 DNA 断裂过程中产生的 3'-OH 末端以及细胞超微结构变化特别是细胞核的变化均为公认的检测细胞凋亡的有效指标(Wijsman 等,1993;Kerr 等,1972)。林久生等(2001)的研究表明,凋亡细胞往往表现为核基因组 nDNA 断裂,裸露出游离的 3'-OH 末端,因而在 TUNEL 反应中被标记成棕色,且细胞核发生染色质凝聚,以至解体。我们的实验结果有力的证明了这一点;Cd²⁺胁迫不仅诱使细胞核出现染色质凝集,周边化等明显的凋亡变化,而且 TUNEL 检测也显示出 5~10 mg/L Cd²⁺胁迫下浮萍叶细胞核出现 DNA 断裂,这是植物体在低浓度重金属离子胁迫下主动清除自身冗余,病变或损伤的细胞,以维持机体内部平衡;而随着 Cd²⁺浓度升高,发生细胞核 DNA 断裂的细胞数目明显增加,程度加重,直至 20 mg/L Cd²⁺已导致细胞解体,组织坏

死,其原因可能是植物细胞依靠自身调节系统无法适应高剂量的重金属急性毒害。可见,重金属诱导植物细胞由凋亡转向坏死,具有典型的剂量—效应关系。

夏慧莉等(1999)和陆怡等(1996)的研究表明,细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的堆积能诱导多种细胞发生凋亡。通常细胞内有一系列有效的抗氧化防御机制,包括清除 ROS 的 SOD、CAT、POD 等。而一旦氧化与抗氧化作用失衡,细胞功能将会受影响,细胞凋亡可能就是这种失衡的结局之一。本实验检测到:低浓度的 Cd²⁺可短暂刺激抗氧化酶活性以消除体内活性氧,而一旦活性氧水平超出一定域值,抗氧化酶活性则急速下降,造成植物体细胞的凋亡。ROS 对生物的伤害作用机制还主要涉及 DNA 的损伤,尤其是线粒体 DNA (mtDNA)及核 DNA (nDNA)的氧化损伤(曾昭惠等,1995),DNA 氧化损伤的结果可导致碱基修饰,碱基缺失,单链和双链 DNA 的断裂,DNA 交联等(陆怡等,1996),所以可以推测细胞凋亡时 DNA 片段的断裂可能与 ROS 有关。实验结果表明: Cd²⁺能促使细胞核 DNA 受损,同时引发细胞代谢的失控,最终导致细胞凋亡。

参考文献:

- deJong AJ, Elena TY, Veneta MK, *et al.* 2002. A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells[J]. *Planta*, **214**:537-545
- Habbebu SS, Liu J, Klaassen CD. 1998. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, **149**(2):203-209
- Ishido M, Homma-Takeda S, Tohyama C, *et al.* 1998. Apoptosis in rat renal proximal tubular cells induced by cadmium[J]. *J Toxicol Environ Health*, **55**(1):1-12
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR, *et al.* 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics[J]. *Br J Cancer*, **26**:239-257
- Korichera J, Roy S, Vranjic JA, *et al.* 1997. Antioxidant responses to simulated acid rain and heavy metal deposition in birchseedlings[J]. *Environ Pollut*, **95**:249-258
- Lin JS(林久生), Wang GX(王根轩). 2001. Programmed cell death induced by osmotic stress in wheat leaves(渗透胁迫诱导的小麦叶片细胞程序性死亡)[J]. *Acta Photophysiol Sin*(植物生理学报), **27**(3):221-225
- Lu Y(陆怡), Pan HZ(潘华珍), Xu CM(许彩民). 1996. Oxidative stress induced apoptosis(氧化与细胞凋亡)[J]. *Progress in Biochim and Biophysics*(生物化学与生理进展), **23**(2):118-121

(下转第 526 页 Continue on page 526)

- 黄学林. 1985. 种子生理学试验手册[M]. 北京: 农业出版社, 20—23
- 张志良, 翟伟菁. 2003. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 50—60
- 邹奇. 2003. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 100—105.
- Gao HM(高红明), Wu XX(吴晓霞), Zhang B(张彪). 2006. The change of defensive enzymes and active oxygen of *Puccinellia tenuiflora* seedlings under Na_2CO_3 stress(Na_2CO_3 胁迫下星星草幼苗活性氧及保护酶活性的变化)[J]. *Bull Bot*(植物研究), 13(6): 87—91
- Jin L(金兰), Ding L(丁莉). 2003. Changes of diastase activity and soluble carbohydrate content of germinating *Puccinellia tenuiflora* seeds under sodium carbonate stress(盐胁迫下星星草种子萌发过程中淀粉酶活性及可溶性糖含量变化)[J]. *J Qinghai Norm Univ*(青海师范大学学报), 2(5): 61—63
- Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stress Vol II 2nded[J]. *New York: Academic Press*, 5: 99—100
- Munns RA. 1986. Whole-plant responses to salinity[J]. *Aust J Plant Physiol*, 13: 143—160
- Munns R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses[J]. *Plant Cell Environ*, 16: 152—241
- Shi DC(石德成), Ying SJ(尹尚君), Yang GH(杨国会). 2002. Citric acid accumulation in an alkali-tolerant plant *Puccinellia tenuiflora* under alkaline stress(碱胁迫下耐碱植物星星草体内柠檬酸特异积累现象)(英)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 5(12): 112—115
- Sun GR(孙国荣), Wang JB(王建波), Cao WZ(曹文钟), et al. 2005. GST activity and its related indexes in the chloroplasts of *Puccinellia tenuiflora* seedlings under Na_2CO_3 stress (Na_2CO_3 胁迫下星星草幼苗叶绿体 GST 活性变化及其与相关指标的关系)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 25(12): 2495—2501
- Sun GR(孙国荣), Chen YY(陈月艳), Yan XF(阎秀峰). 1999. Changes of diastase activity, soluble carbohydrate content and respiratory intensity of germinating *Puccinellia tenuiflora* seeds under sodium carbonate stress(盐碱胁迫下星星草种子萌发过程中有机物, 呼吸作用及酶活性的变化)[J]. *Bull Bot*(植物研究), 10(4): 445—451
- Wang JB(王建波), Song GR(孙国荣), Chen G(陈刚). 2006. The relationship between light energy utilization and dissipation of PSII of *Puccinellia tenuiflora* seedlings and osmotic potential of culture solution under Na_2CO_3 stress(Na_2CO_3 胁迫下星星草幼苗叶片 PSII 光能利用和耗散与培养基质渗透势的关系)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), 1(1): 115—121
- Wei CX(韦存虚), Wang JX(王建军), Wang JB(王建波). 2006. Effects of Na_2CO_3 stress on the ultrastructure of mesophyll cells in *Puccinellia tenuiflora* (Na_2CO_3 胁迫对星星草叶肉细胞超微结构的影响)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), 1(1): 108—114
- Wei CX(韦存虚), Zhang J(张军), Wang JX(王建军). 2006. Observation on structural characters of vegetative organs of *Puccinellia tenuiflora* under salt stress (星星草营养器官适应盐胁迫的结构特征)[J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境学报), 15(1): 51—56
- Yan XX(阎先喜). 1994. The effect of the membrane in wheat germ under salt stress (盐胁迫对大麦胚根系细胞膜系统的影响)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 36(增刊): 33—36
- Zhang NN(张楠楠), Xu XL(徐香玲). 2005. The study of the mechanism which the plants resist the salt(植物抗盐机理的研究)[J]. *J Harbin Norm Univ(Nat Sci Edi)*(哈尔滨师范大学·自然科学版), 21(1): 65—68

(上接第 505 页 Continue from page 505)

- Shi GX(施国新), Du KH(杜开和), Xie KB(解凯彬), et al. 2000. Ultrastructural study of leaf cells damaged from Hg^{2+} and Cd^{2+} pollution in hydrilla verticillata(汞, 镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 42(4): 373—378
- Sugiyama M. 1994. Pole of cellular antioxidants in metal-induced damage[J]. *Cell Biol Toxicol*, 10: 1—22
- Tan(谭茂玉), Shen FF(沈法富). 2006. The regulation and test on plant programmed cell death(植物细胞程序性死亡的调控及检测)[J]. *J Taishan Univ*(泰山学院学报), 28(3): 79—83
- Trevor EK, Fletcher RA. 1994. Paclobutrazd protects wheat seedlings from heat and paraquat injury. Is detoxification of active oxygen involved? [J]. *Plant Cell Physiol*, 1: 45—52
- Wijmsman JH, Jonker RR, Keijzer R, et al. 1993. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ End-labeling of fragmented DNA[J]. *Histochem Cytochem*, 41: 7—12
- Wu YY(吴燕玉), Wang X(王新), Liang RL(梁仁禄), et al. 1997. Ecological effect of compound pollution of heavy metals in soil plant system II. Effect on element uptake by crops, alfalfa and tree(重金属复合污染对土壤—植物系统的生态效应 II. 对作物、苜蓿、树木吸收元素的影响)[J]. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), 8(5): 79—83
- Xia HL(夏慧莉), Chen HM(陈浩明), Wu Y(吴逸), et al. 1999. Hydroxyl radicals induce apoptosis of tobacco cells(羟自由基诱导烟草细胞凋亡)[J]. *Acta Photophysiol Sin*(植物生理学报), 25(4): 339—342
- Yu WH(于维华), Chen P(陈鹏), WANG Li(王莉), et al. 2004. Advances in studies on programmed cell death (PCD) in plants (植物细胞程序性死亡(PCD)的研究进展)[J]. *Guihaia*(广西植物), 24(2): 146—151
- Zeng ZH(曾昭惠), Zhang ZY(张宗玉). 1995. The oxidative damage of mitochondrial DNA by free radicals and aging(自由基对线粒体 DNA 的氧化损伤与衰老)[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*(生物化学与生物物理进展), 22(5): 429—432
- Zhai QW(翟琦巍), Ji HB(季红斌), Zhen ZC(郑仲承), et al. 2000. A novel type of apoptosis induced by cadmium in BA/F3 β cells(镉离子诱导 BA/F3 β 细胞发生奇特的细胞凋亡)[J]. *Acta Biochemica Biophysica Sin*(生物化学与生物物理学报), 32(1): 77—80
- Zhang YX(张玉秀), Chai TY(柴团耀), Gerard Burkard. 1999. Research advances on the mechanisms of heavy metal tolerance in plants(植物耐重金属机理研究进展)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 41(5): 453—457