

Tb(III)对辣根叶片膜脂脂肪酸构成的影响*

张一波 王丽红 周 青**

(工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学环境与土木工程学院, 无锡, 214122)

摘 要 以辣根为材料, 研究叶面喷洒 Tb(III)对辣根叶片膜脂脂肪酸构成的影响. 结果表明, $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Tb(III)均能增加膜脂饱和脂肪酸的百分含量, 而降低不饱和脂肪酸含量, 尤其是亚麻酸, 但 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Tb(III)未能改变不饱和度指数, $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Tb(III)使不饱和度指数显著降低. 同时, Tb(III)使辣根叶片 HRP活性降低, 膜脂发生过氧化, 表现为 MDA 含量增加. 因此, Tb(III)处理下膜脂脂肪酸的变化与 Tb(III)诱导的自由基升高有关, 且在所有脂肪酸中, 亚麻酸在稀土对膜脂脂肪酸影响中贡献最大.

关键词 铽, 脂肪酸, 质膜, 辣根.

生物膜是控制细胞内外物质与能量交换的界面, 逆境能够诱发膜脂相变. 膜脂相变程度与磷脂的主要成分脂肪酸构成密切相关. 重金属能够诱发细胞产生过量自由基, 攻击生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸, 致使不饱和脂肪酸氧化, 虽有抗氧化系统清除自由基, 但膜脂过氧化依然发生^[1]. 由于过氧化物酶 (POD)对多种环境污染物响应敏感, 已被广泛用作环境污染的生物标记物. 而辣根中的过氧化物酶 (HRP)还是临床医学领域中用于诊断标记的常用标记物^[2], 在科学研究领域使用广泛.

本文以辣根为实验材料, 探讨铽离子 [Tb(III)]对辣根叶片膜脂脂肪酸构成的影响, 为阐释稀土元素 (RE)毒害植物的机理与 RE 农用的环境安全问题提供依据.

1 材料与方法

1.1 辣根的培养与处理

实验材料为盆栽辣根 (*Cochlearia amoralia* L.), 依据常规方法进行栽培管理^[3], 室内培养温度为 $20\pm1^{\circ}\text{C}$, 光照强度 15000 lx , 光暗时间比为 12 h: 12 h. 于辣根成熟期, 选取长势相近的辣根植株, 叶片均匀喷洒 5 和 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TbCl₃溶液, 以滴液为限, 对照 (CK)植株喷洒等量蒸馏水. 各处理均为 3 平行, 每平行 3 株. TbCl₃处理 48h 后, 取不同处理下的辣根叶片测定膜脂脂肪酸构成和 MDA 含量.

1.2 膜脂脂肪酸的测定

取辣根叶片 1 g, 立即放入 105°C 烘箱中 5 min, 冷却, 氯仿: 甲醇 (1: 2 V/V) 研磨得到匀浆, $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 氯仿清洗残渣, $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 合并两次上清液, 加入 0. 76% NaCl 振荡 15 min, 取下层溶液, 减压 (通氮气吹干或用旋转蒸发器浓缩) 得到总类脂, -20°C 冰箱保存备用.

向总类脂中加入 2 ml 甲醇及 4—5 滴浓硫酸, $50\text{—}60^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 加 1—2 ml 正己烷萃取, 振荡后静置 15 min, 加 2 ml 蒸馏水, 振荡后放置, 待上下两层分清后, 将上层溶液吸入具塞圆锥型小试管中, 减压蒸去溶剂, 用 Shimadzu GC-2010 型气相色谱仪分析测定大豆幼苗叶片的总膜脂脂肪酸. 利用峰面积进行相对百分含量的归一化分析.

1.3 MDA 含量及 HRP 活性测定

参照 Hodges^[4] 的方法测定 MDA 含量. 参照 Hammerschmidt^[5] 的方法测定 HRP 活性. 所有数据均重复 3 次, 采用 LSD 方法差异显著性分析.

2008 年 6 月 4 日收稿.

* 国家自然科学基金 (30570323); 国家发改委稀土专项基金 (IFZ20051210) 资助项目.

** 通讯作者, E-mail: zhouqec@ yahoo. com. cn

2 结果与讨论

2.1 Tb(III)对辣根叶片膜脂脂肪酸构成的影响

由图 1 可见, Tb(III)未改变辣根叶片膜脂脂肪酸的组分. 总脂肪酸由豆蔻酸(14:0)、棕榈酸(16:0)、棕榈油酸(16:1)、十七碳酸(17:0)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(18:2)和亚麻酸(18:3)等组成. 饱和脂肪酸以十七碳酸(17:0)为主, 不饱和脂肪酸以亚麻酸(18:3)和棕榈油酸(16:1)为主.

虽然各处理组辣根叶片总膜脂脂肪酸的构成与对照相同, 但其配比发生明显变化. 由表 1 可知, Tb(III)处理组总饱和脂肪酸含量高于对照, 而不饱和脂肪酸含量低于对照, 且随着 Tb(III)处理浓度的增加, 上述现象加剧. $5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\text{Tb(III)}$ 处理组的不饱和度指数(UFA, 210.47)与对照(208.34)相当. $60\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\text{Tb(III)}$ 处理组 14:0 16:0 17:0 和 18:0 饱和脂肪酸的含量(16.87%, 2.74%, 7.57%, 2.18%)均高于对照(1.53%, 1.95%, 7.16%, 1.65%), 16:1, 18:1, 18:2 18:3 不饱和脂肪酸含量(22.14%, 3.53%, 4.26%, 40.70%)均低于对照, 尤其是 18:3 $60\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\text{Tb(III)}$ 处理组的 UFA(156.29)明显低于对照(208.34).

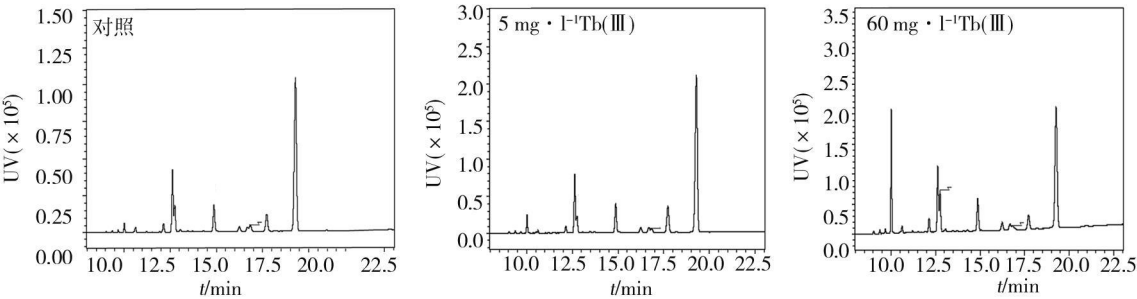


图 1 辣根叶片膜脂脂肪酸的构成
(从左到右分别为 14:0 16:0 16:1 17:0 18:0 18:1 18:2 18:3)

Fig 1 The composition of membrane lipid fatty acids in horseradish leaves treated

表 1 Tb(III)对辣根叶片膜脂脂肪酸的影响 (%)

Table 1 Effect of Tb(III) on membrane lipid fatty acids in horseradish leaves

Tb(III) ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	14:0	16:0	16:1	17:0	18:0	18:1	18:2	18:3	饱和 脂肪酸	不饱和 脂肪酸	UFA
CK	1.53	1.95	20.79	7.16	1.65	3.58	6.05	57.29	12.29	87.71	208.34
5	2.75	1.51	16.88	7.81	1.52	2.92	9.13	57.47	13.59	86.41	210.47
60	16.87	2.74	22.14	7.57	2.18	3.53	4.26	40.70	29.36	70.60	156.29

注: 不饱和度指数 = $[16:1 + 18:1 + (18:2) \times 2 + (18:3) \times 3] \times 100\%$

2.2 Tb(III)对辣根叶片膜脂过氧化和 HRP活性的影响

表 2 数据显示, Tb(III)处理组膜脂过氧化产物 MDA 的含量明显高于对照, HRP 活性低于对照. 且随着 Tb(III)剂量的增加 ($5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ — $60\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), MDA 含量增加 (106.56%—140.98%), HRP 活性显著降低 (91.57%—50.77%).

表 2 稀土 Tb(III)对辣根叶片膜质过氧化和 HRP活性的影响

Table 2 Effect of Tb(III) on membrane lipid peroxidation

Tb(III) $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	MDA 含量 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	相对值 /%	HRP 活性 $\Delta A_{470}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	相对值 /%
CK	$0.61\pm0.01\text{ a}$	100	$149.49\pm1.19\text{ c}$	100
5	$0.65\pm0.01\text{ b}$	106.56	$130.36\pm0.04\text{ a}$	87.20
60	$0.83\pm0.02\text{ c}$	140.98	$99.82\pm1.83\text{ b}$	66.77

注: 表中所列数据均为平均值, 同一列中不同字母表示不同处理间差异显著性统计 ($p<0.05$).

细胞质膜为重金属毒害植物的首要位点. 膜的流动性是细胞完成生命活动的基础条件, 也是判断细胞逆境伤害程度的重要指标. 由于膜的流动性与脂肪酸的构成密切相关, 脂肪酸的不饱和程度与膜的流动性成正比, 可通过测定膜脂脂肪酸的构成来说明膜的流动性及逆境伤害程度. 另外, 细胞膜脂不饱和脂肪酸与自由基发生氧化反应, 生成对细胞具有毒性的过氧化物, 致使蛋白质氧化、DNA 突变甚至断裂和脂质氧化等.

3 结论

Tb(III)叶片喷洒辣根植株后, 膜脂脂肪酸的构成未改变, 但多数不饱和脂肪酸水平降低, 饱和脂肪酸水平升高, 且脂肪酸的不饱和程度降低. 表明 Tb(III)胁迫通过降低不饱和脂肪酸的水平降低膜流动性, 使得膜正常功能下降甚至丧失. 生物膜脂质分子中脂肪酸构成比例失衡可影响细胞的代谢和功能. 另外, Tb(III)处理主要通过抑制高价位不饱和脂肪酸的生成来改变膜的相变. 亚麻酸是不饱和度最高的脂肪酸, 有三个不饱和键. $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Tb(III)处理后, 亚麻酸较其它脂肪酸更低于对照. 因此, 在所有膜脂脂肪酸中, 亚麻酸对稀土毒害效应贡献最大. 正常情况下, 细胞内自由基的生成和清除处于平衡状态, 一旦平衡受到破坏, 可造成膜脂过氧化损伤. 另外, Tb(III)处理辣根叶片后, HRP活性降低, 清除自由基能力减弱, 导致自由基大量积累. 从而使膜脂不饱和脂肪酸含量降低, 膜脂过氧化产物 MDA 含量增加.

参 考 文 献

- [1] Howlett N G, Avery S V, Induction of Lipid Peroxidation during Heavy Metal Stress in *Saccharomyces Cerevisiae* and Influence of Plasma Membrane Fatty Acid Unsaturation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63** (8): 2971—2976
- [2] Veitch N C, Horseradish Peroxidase: a Modern View of a Classic Enzyme [J]. *Phytochemistry*, 2004, **65**: 249—259
- [3] 韩凤, 林茂祥, 李娟, 辣根的使用栽培技术 [J]. *特种经济动植物*, 2004, **12** (23): 24
- [4] Hodges D M, DeLong J M, Fomey C F et al., Improving the Thiobarbituric Acid-Reactive-Substances Assay for Estimating Lipid Peroxidation in Plant Tissues Containing Anthocyanin and Other Interfering Compounds [J]. *Planta*, 1999, **207**: 604—611
- [5] Hammerschmidt R, Nuckles E M, Kuc J. A Association of Enhanced Peroxidase Activity with Induced Systemic Resistance of Cucumber to *Colletotrichum-Lagenarium* [J]. *Physiological Plant Pathology*, 1982, **20**: 73—82

EFFECT OF Tb(III) ON PLASMA MEMBRANE FATTY ACIDS COMPOSITION IN HORSERADISH LEAVES

ZHANG Yi-bo WANG Li-hong ZHOU Qing

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education

School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT

Effect of Tb(III) on plasma membrane fatty acids composition in horseradish leaves by foliage spray was investigated in this paper. The results show that there is a increase in the content of saturated fatty acids of plasma membrane in the horseradish leaves treated with $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Tb(III), and a decrease in the content of unsaturated fatty acids of plasma membrane, especially linolenic acid (18:3). Moreover, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Tb(III) can not change the index of unsaturated fatty acids (UFA), while $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Tb(III) makes UFA decrease. Furthermore, the increase in the content of MDA and decrease in the activity of HRP in horseradish leaves treated with Tb(III) are observed. Therefore, we can conclude that the change in plasma membrane fatty acids is related with the increase in the content of free radicals induced by Tb(III). Moreover, 18:3 is the most important fatty acid contributing to the effect of rare earth on plasma membrane fatty acids amongst all fatty acids.

Keywords terbium, fatty acid, plasma membrane, horseradish.