

抗氧化系统在蜈蚣草细胞砷解毒机制中的作用*

杨学习^{1,2} 戴文韬² 陈晖² 麻密^{2**}

(¹南方医科大学生物技术学院 广州 510515)

(²中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室 北京 100093)

摘要 砷超富集植物——蜈蚣草体内可以富集高浓度的砷且不表现出受害症状, 暗示蜈蚣草细胞具有较强的砷解毒机制. 为探讨抗氧化系统在蜈蚣草砷解毒机制中的作用, 测定了0、0.5、1和2 mmol/L的砷酸盐[As(V)]、亚砷酸盐[As(III)]和二甲基砷酸盐(DMA)处理下蜈蚣草愈伤组织的丙二醛(Malonyldiadehyde, MDA)含量、非酶类抗氧化物质含量和酶类抗氧化物质的活性. 结果表明, 0.5 mmol/L As(V)和DMA就可以诱导氧化胁迫的产生, 浓度越高胁迫程度也越严重. 而1 mmol/L的As(III)仍未使蜈蚣草愈伤组织产生氧化胁迫. 在As(III)处理下, 酸溶性巯基含量增加, 叶绿素和类胡萝卜素含量不变, 过氧化氢酶(Catalase, CAT)和过氧化物酶(Peroxidase, POD)活性增加. 在As(V)处理下, 酸溶性巯基含量减少, 叶绿素和类胡萝卜素含量略有上升; CAT和POD活性先增加后减少. 在DMA处理下, 酸溶性巯基含量减少, 叶绿素含量降低而类胡萝卜素含量增加, CAT和POD活性先增加后减少. 与As(V)和DMA相比, As(III)处理下高酸溶性巯基含量、高氧化酶活性和低MDA含量暗示As(III)对蜈蚣草的毒性可能比As(V)和DMA要小. 这些结果表明, 酸溶性巯基和酶类抗氧化物质(CAT和POD)在蜈蚣草细胞砷解毒机制中发挥着重要作用. 图4 参22

关键词 蜈蚣草; 抗氧化系统; 砷污染; 砷富集; 砷解毒

CLC Q945.78

Role of Antioxidative System in Arsenic Detoxification Mechanism of *Pteris vittata* Cells*

YANG Xuexi^{1,2}, DAI Wentao², CHEN Hui² & MA Mi^{2**}

(¹School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

(²Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract *Pteris vittata* L., one of arsenic (As) hyperaccumulators, can accumulate high concentration arsenic and show no signs of toxicity, indicating the existence of effective plant-internal detoxification mechanisms. In order to elucidate the role of anti-oxidative system in *P. vittata* arsenic detoxification mechanisms, the concentrations of malonyldiadehyde (MDA), acid-soluble thiols, chlorophyll and carotenoid, and the activities of catalase (CAT) and peroxidase (POD) in *P. vittata* callus under 0, 0.5, 1, and 2 mmol/L arsenate, arsenite and dimethylarsenic acid (DMA) stress were determined. A significant increase in MDA concentration was observed under arsenate and DMA exposure, while no significant induction of MDA in 1 mmol/L arsenite treated callus. Under arsenite exposure, the acid-soluble thiols concentrations were significantly elevated, the activities of CAT and POD were enhanced in response to the increasing of arsenic concentration, chlorophyll, and carotenoid concentrations. While under arsenate and DMA exposure, the acid-soluble thiols concentrations were significantly reduced, the activities of CAT and POD increased with arsenic concentration rising to 0.5 mmol/L, and then decreased. Higher activities of anti-oxidative enzymes and lower MDA concentration suggest that the toxicity of arsenite may lower than that of arsenate and DMA. These results indicate both acid-soluble thiols and enzymatic antioxidants (CAT and POD) play important roles in *P. vittata* arsenic detoxification system. Fig 4, Ref 22

Keywords *Pteris vittata* L.; anti-oxidative system; arsenic pollution; arsenic accumulator; arsenic detoxification

CLC Q945.78

随着现代社会的发展及工业活动的增加, 砷污染日趋严重^[1], 砷污染的治理也日益引起人们关注. 传统的砷污染治理技术由于工程量大, 费用昂贵, 对大规模、中强度的污染无能为力, 目前亟需研发治理砷污染的新技术. 植物修复是一种利用植物对污染物的超富集能力来清除或减低污染的新型环境生物技术^[2-3], 其首要条件是超富集植物的筛选. 2001

年, *Nature*上首次报道了第一种能够大量富集砷的植物——凤尾蕨属蜈蚣草(*Pteris vittata* L.)^[4], 这为从根本上解决土壤和水体中的砷污染提供了一条重要途径. 但砷污染修复的长远发展依赖于在细胞、分子和生化水平上砷超富集机制的阐明, 特别是不同化学态砷(包括无机砷、有机砷、三价砷和五价砷)的吸收、代谢和解毒机制的阐明, 并利用生物技术手段研发新型超富集工程植物. 近年来的研究发现, 蜈蚣草孢子体、配子体和愈伤组织都可以富集高浓度的砷且不表现出受害症状^[4-7], 暗示蜈蚣草细胞具有特殊的砷解毒机制, 因而砷解毒机制研究也成为蜈蚣草超富集机制研究中的热点^[8-12].

收稿日期: 2010-04-24 接受日期: 2010-05-04

*国家“863”计划项目(No. 2007AA021404)资助 Supported by the State High-tech R & D Project of China (No. 2007AA021404)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: mami@ibcas.ac.cn)

土壤中的砷主要以砷酸盐[As(V)]的形式进入蜈蚣草体内,随后大部分会很快被还原为亚砷酸盐[As(III)]^[13].在动物体内,As(III)经甲基化转化为毒性较弱的一甲基砷酸(Methylarsenic acid, MMA)和二甲基砷酸(Dimethylarsenic acid, DMA),通过总砷毒性的降低来达到对砷的解毒^[14].蜈蚣草体内砷的存在形式以无机砷[As(III)和As(V)]为主,但还存在少量有机砷(MMA、DMA)^[15-16].As(III)、As(V)、DMA和MMA都可以诱导植物组织活性氧(Active oxygen species, AOS)的产生,进而产生次生氧化胁迫^[17].在植物体中存在着能够清除AOS的系统,即抗氧化系统,该系统可保持AOS之间的平衡从而维持细胞的正常生理功能.抗氧化系统主要包括酶类和非酶类抗氧化系统,其中酶类抗氧化系统主要包括超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)和抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase, APX)等,非酶类抗氧化系统主要包括谷胱甘肽、抗坏血酸和色素等^[18].作为一种砷超富集植物,蜈蚣草的孢子体、配子体和愈伤组织都可以富集高浓度的砷,其体内的As(III)、As(V)、DMA和MMA是否会对蜈蚣草细胞产生氧化胁迫,以及蜈蚣草细胞的抗氧化系统是如何抵抗或清除氧化胁迫的,目前并不清楚.

本研究利用我们前期建立的蜈蚣草愈伤组织系统^[7],通过测定蜈蚣草愈伤组织的抗氧化系统在As(III)、As(V)和DMA处理下的反应来探讨蜈蚣草抗氧化系统在其砷解毒机制中的作用,以期能为培育新型工程植物提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

蜈蚣草(*Pteris vittata*)采自我国湖北矿区,移栽在温室培养.愈伤组织的诱导及培养参见前文^[7]所述.

1.2 方法

1.2.1 砷处理 分别在含有0、0.5、1.0和2.0 mmol/L Na_3AsO_4 、 Na_3AsO_3 和DMA的1/2×MS液体培养基中接种4 g愈伤组织,120 r/min悬浮培养2 d后取样,250 mL 18 Ω的超纯水冲洗两遍,用Whatman 3 mm滤纸过滤,纸巾吸干水分,用于酸溶性巯基、色素、TBARS和抗氧化酶活性的测定.

1.2.1 MDA含量测定 将2 g蜈蚣草愈伤组织样品于液氮中研磨成粉末状,用于MDA含量的测定.具体测定参照Singh N采用的方法^[19]进行.

1.2.2 总巯基含量测定 称取2 g愈伤组织样品于液氮下研磨成粉末状,用于总巯基含量的测定.具体测定参照De Vos采用的方法^[20]进行.

1.2.3 叶绿素和类胡萝卜素含量测定 将2 g蜈蚣草愈伤组织样品于液氮中研磨成粉末状,用于叶绿素和类胡萝卜素含量的测定.具体测定参照Singh N采用的方法^[19]进行.

1.2.4 过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性的测定 将两份2 g愈伤组织样品于液氮中研磨成粉末,分别用于CAT和POD活性的测定.具体测定参照Cao X采用的方法^[21]进行.

2 结果

2.1 MDA含量变化

MDA含量被广泛用作诊断组织伤害和脂过氧化程度的

指标.为检测3种砷化合物对脂质过氧化的毒性,测定了经过As(V)、As(III)和DMA处理的蜈蚣草愈伤组织MDA含量的变化,结果见图1.从图中可以看出,与As(III)相比,相同浓度的As(V)和DMA处理下愈伤组织MDA含量明显增高,表明As(V)和DMA比As(III)更容易引起蜈蚣草悬浮培养愈伤组织的氧化胁迫.对于As(III)来说,只有浓度达到2.0 mmol/L时MDA含量才高于对照,表明氧化胁迫只有在浓度较高时才会产生.1.0 mmol/L的DMA已使细胞死亡而无法检测到MDA含量,因此随后相应的酸溶性巯基、色素、和抗氧化酶活性也不再检测.

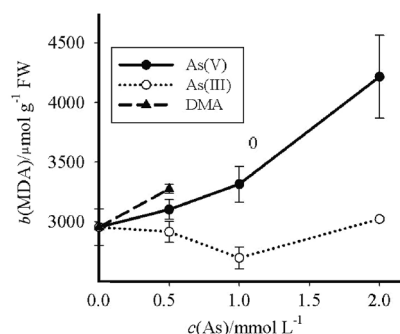


图1 砷对蜈蚣草愈伤组织中MDA含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $N = 3$)

Fig. 1 Effect of As(III), As(V) and DMA on malondialdehyde content in the calli of *P. vittata* ($\bar{x} \pm s$, $N = 3$)

2.2 酸溶性巯基含量变化

As(III)、As(V)和DMA对蜈蚣草愈伤组织中酸溶性巯基含量的影响如图2所示.1.0 mmol/L As(III)会导致蜈蚣草愈伤组织酸溶性巯基含量显著增加,As(V)则会引起蜈蚣草愈伤组织酸溶性巯基含量降低,而0.5 mmol/L DMA引起的蜈蚣草愈伤组织酸溶性巯基含量降低的速度比As(V)更快.

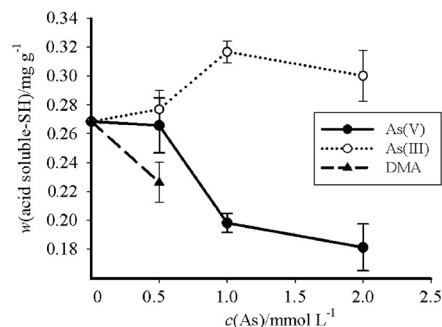


图2 砷对蜈蚣草愈伤组织中酸溶性巯基含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $N = 3$)

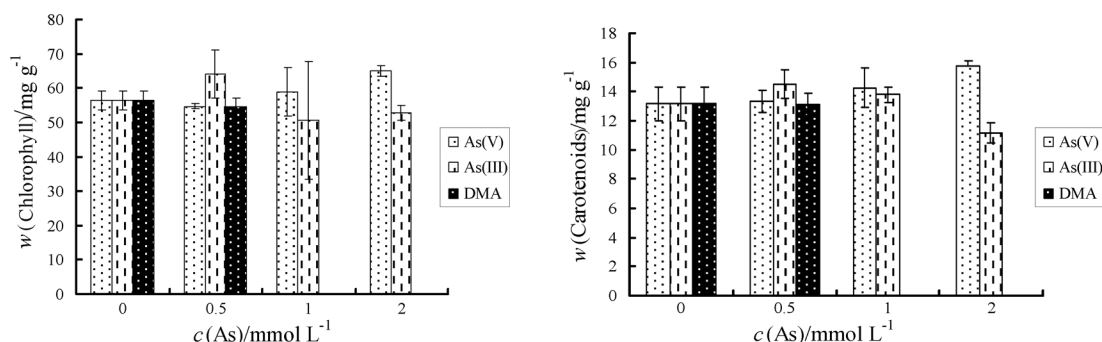
Fig. 2 Effects of As(III), As(V) and DMA on the concentrations of acid soluble-SH in the calli of *P. vittata* ($\bar{x} \pm s$, $N = 3$)

2.3 色素含量变化

对经过不同浓度As(III)、As(V)和DMA处理的悬浮细胞色素含量的分析表明,DMA会降低叶绿素含量而增加类胡萝卜素含量,而As(V)则使叶绿素和类胡萝卜素含量略有上升,As(III)则对两种色素的含量没有明显的影响(图3).经0.5 mmol/L的DMA处理的悬浮细胞颜色变淡,1.0:2.0 mmol/L的DMA则会使悬浮细胞颜色变褐死亡,经As(V)处理的悬浮细胞颜色略有变淡,而经As(III)处理的悬浮细胞颜色则没有变化.

2.4 抗氧化酶活性变化

POD和CAT结合SOD能将 O_2 转变成无毒的 H_2O_2 ,使细胞

图3 砷对蜈蚣草愈伤组织中叶绿素和类胡萝卜素含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $N = 3$)Fig. 3 Effects of As(III), As(V) and DMA on the concentrations of chlorophyll and carotenoids in the calli of *P. vittata* ($\bar{x} \pm s$, $N = 3$)

内自由基维持在一个低水平, 防止细胞受自由基的毒害. 不同浓度的3种化学态的砷对CAT和POD活性的影响见图4. 从图中可以看出, 0.5 mmol/L的As(V)、As(III)和DMA都会导致CAT活性升高. 但随着砷浓度提高, CAT活性逐渐下降. As(V)和DMA导致CAT活性下降更为迅速, 在1.0和2.0 mmol/L下活性低于对照. 而As(III) CAT活性下降得较慢, 在1.0和2.0 mmol/L下CAT活性仍高于对照. 0.5 mmol/L的As(V)会导致POD活性升高, 随之POD活性迅速下降. 0.5和1.0 mmol/L As(III)都会导致POD活性升高, 但随之POD活性也迅速下降. DMA则抑制POD活性.

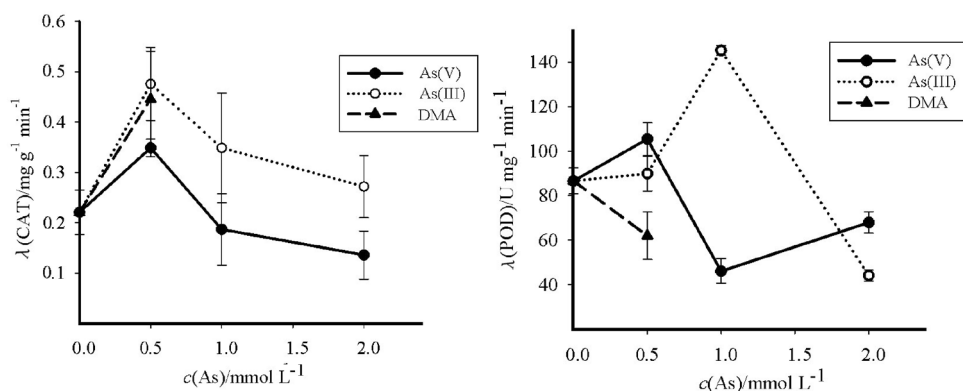
3 讨论

我们的前期工作发现蜈蚣草愈伤组织同其孢子体和配子体一样可以富集高浓度的砷, 且具有易于培养、生长迅速、同质性好, 易于操作, 为脱分化的细胞等优点^[7]. 用愈伤组织来研究酶类和非酶类抗氧化系统在砷解毒机制中的作用时可以排除砷的转运过程带来的误差, 而直接模拟蜈蚣草细胞在不同化学态的砷的胁迫下酶类和非酶类抗氧化物质的变化. 因此, 以愈伤组织代替蜈蚣草的孢子体、配子体作为研究系统是一个更好的选择.

植物的细胞膜是重金属伤害的主要部位, 膜的完整性受到破坏主要是由于膜上饱和脂肪酸中所发生的一系列活性氧反应导致膜脂相分离. 而MDA含量是衡量细胞是否产生氧化胁迫的主要标志. 本研究发现DMA使蜈蚣草愈伤组织产生氧化胁迫的能力最强, As(V)次之, As(III)最弱. 0.5

mmol/L As(V)和DMA就可以诱导氧化胁迫的产生, 并且随其浓度提高胁迫也越严重. 与二者不同的是, 即使是2.0 mmol/L As(III)处理下, 蜈蚣草愈伤组织组织也并没有产生氧化胁迫. 在生物砷解毒机制中, 首先要将砷酸盐还原为亚砷酸盐, 然后通过亚砷酸盐与富含巯基的解毒物质络合或者通过区域化进行解毒. 通常认为亚砷酸盐的毒性大于砷酸盐的毒性, 这一步会增加总砷的毒性. 前人的工作表明在蜈蚣草中不同价态砷的含量为As(III) > As(V) ≥ DMA^[15-16], 我们的实验结果显示As(III)使蜈蚣草愈伤组织产生氧化胁迫的能力小于As(V), 更小于DMA (图1), 暗示蜈蚣草可能存在一种对As(III)的特殊解毒机制, 而这一机制则可能是蜈蚣草对砷解毒和超富集机制的核心部分.

Srivastava等的研究^[22]表明, 蜈蚣草比一般的蕨类植物具有更高的抗坏血酸和谷胱甘肽含量以及较高的还原态和氧化态的比率, 使其具有较大的抗氧化潜力. 当受到砷胁迫时, 蜈蚣草体内抗氧化物质和抗氧化酶的活性也随着体内砷浓度而变化. Tu等发现砷的胁迫会导致蜈蚣草孢子体酸溶性巯基增加, 推测酸溶性巯基可能在抵抗砷引起的氧化胁迫中发挥重要的作用^[23]. 在本工作中, 我们发现As(III)会导致蜈蚣草愈伤组织细胞中酸溶性巯基含量增加, 这与前人的结果一致; 然而As(V)和DMA则会引起酸溶性巯基含量降低, 且DMA引起的下降速度更快 (图2). 蜈蚣草愈伤组织在As(III)处理下高酸溶性巯基含量和低的活性氧产生以及As(V)和DMA处理下低酸溶性巯基含量和高的活性氧产生是一致的. 这些结果证实酸溶性巯基在清除砷引起的活性氧过程

图4 砷对蜈蚣草愈伤组织中POD和CAT活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $N = 3$)Fig. 4 Effects of As(III), As(V) and DMA on the activities of POD and CAT in the calli of *P. vittata* ($\bar{x} \pm s$, $N = 3$)

中起着重要的作用. DMA和As(V)使类胡萝卜素含量略有上升, 其中类胡萝卜素含量在DMA处理下要略高于As(V)的处理; As(III)处理下类胡萝卜素含量变化不大(图3), 暗示类胡萝卜素参与了清除DMA和As(V)引起的氧化胁迫反应. 而As(III)处理下类胡萝卜素含量变化不大, 也与As(III)的处理并没有引起氧化胁迫相一致.

为了调控AOS的水平, 抗氧化酶催化的解毒反应同样在蜈蚣草砷解毒过程中发挥作用. SOD能将 O_2^- 歧化为 H_2O_2 , 由POD将 H_2O_2 分解成 H_2O , 同时CAT将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 , 将有氧的超氧阴离子转变成无毒的 H_2O_2 , 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. 在As(III)、As(V)和DMA胁迫下, CAT和POD活性在砷处理时先增加后下降(图4), 这与其它有害重金属如镉对植物胁迫时引起氧化爆发的趋势一致^[24], 符合植物对胁迫反应的典型特征.

本研究发现DMA使蜈蚣草愈伤组织产生氧化胁迫的能力最强, As(V)次之, As(III)最弱; 在As(III)胁迫下, 酸溶性巯基含量增加, CAT和POD活性增加; 而在As(V)和DMA胁迫下, 酸溶性巯基含量减少, CAT和POD活性先增加后减少. 这些结果暗示酸溶性巯基和酶类抗氧化物质(CAT和POD)在蜈蚣草细胞砷解毒机制中发挥着重要作用.

References

- Matschullat J. Arsenic in the geosphere: A review. *Sci Total Environ*, 2000, **249** (1~3): 297~312
- Salt DE, Smith RD, Raskin I. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, **49** (1): 643~648
- Tsao DT. Overview of phytotechnologies. In: Tsao DT ed. *Phytoremediation*. Berlin, Germany: Springer, 2003. 1~46
- Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang W, Cai Y, Kennelley ED. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, 2001, **409** (6820): 579
- Chen TB (陈同斌), Wei CY (韦朝阳), Huang ZC (黄泽春), Huang QF (黄启飞), Luo QG (鲁全国), Fang ZL (范稚莲). Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and its arsenic accumulation. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2002, **47** (3): 207~210
- Gumaelius L, Lahner B, Salt DE, Banks JA. Arsenic hyperaccumulation in gametophytes of *Pteris vittata*: A new model system for analysis of arsenic hyperaccumulation. *Plant Physiol*, 2004, **136** (2): 3198~3208
- Yang X, Chen H, Xu W, He Z, Ma M. Hyperaccumulation of arsenic by callus, sporophytes and gametophytes of *Pteris vittata* cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep*, 2007, **26** (10): 1889~1897
- Poynton CY, Huang JW, Blaylock MJ, Kochian LV, Elless MP. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris* species: Root As influx and translocation. *Planta*, 2004, **219** (6): 1080~1088
- Wang J, Zhao FJ, Meharg AA, Raab A, Feldmann J, McGrath SP. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiol*, 2002, **130** (3): 1552~1561
- Pickering IJ, Gumaelius L, Harris HH, Prince RC, Hirsch G, Banks JA, Salt DE, George GN. Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern. *Environ Sci Technol*, 2006, **40** (16): 5010~5014
- Chen TB, Yan XL, Liao XY, Xiao XY, Huang ZC, Xie H, Zhai LM. Subcellular and compartmentalization of arsenic in *Pteris vittata* L. *Chin Sci Bull*, 2005, **50** (24): 2843~2849
- Yang X, Chen H, Dai X, He Z, Xu W, Ma M. Evidence of vacuolar compartmentalization of arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Chin Sci Bull*, 2009, **54** (22): 4229~4233
- Duan GL, Zhu YG, Tong YP, Cai C, Kneer R. Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of Chinese brake fern, an arsenic hyperaccumulator. *Plant Physiol*, 2005, **138** (1): 461~469
- Cullen WR, Reimer KJ. Arsenic speciation in the environment. *Chem Rev*, 1989, **89** (4): 713~764
- Lombi E, Zhao FJ, Fuhrman M, Ma LQ, McGrath SP. Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytol*, 2002, **156** (2): 195~203
- Zhang WH, Cai Y, Tu C, Ma LQ. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *Sci Tot Environ*, 2002, **300** (1): 167~177
- Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*, 2004, **255** (1/2): 67~78
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006, **160** (1): 1~40
- Singh N, Ma LQ, Srivastava M, Rathinasabapathi B. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Sci*, **170** (2): 274~282
- De Vos CHR, Vonk MJ, Vooijs R, Schat H. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. 1992, *Plant Physiol*, **98** (3): 853~858
- Cao X, Ma LQ, Tu C. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environ Pollut*, 2004, **128** (3): 317~325
- Srivastava M, Ma LQ, Singh N, Singh S. Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. *J Exp Bot*, 2005, **56** (415): 1335~1342
- Tu S, Ma LQ, MacDonald GE, Bondada B. Effects of arsenic species and phosphorus on arsenic absorption, arsenate reduction and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* L. *Environ Exp Bot*, 2004, **51** (2): 121~131
- Zhang H, Jiang Y, He Z, Ma M. Cadmium tolerance and antioxidative responses of the garlic plant. *J Plant Physiol*, 2005, **162** (9): 977~984