

外源添加抑制剂对芦蒿吸收 Cd 和 Pb 的影响

薛 艳,王 超,王沛芳,张 慧

(河海大学环境科学与工程学院,江苏 南京 210098)

摘 要:以水生植物芦蒿为试验材料,通过人工培养液温室培养方法,研究了代谢抑制剂、P-型 ATP 酶抑制剂、蛋白合成抑制剂、离子通道抑制剂对芦蒿吸收 Cd 和 Pb 的影响。结果表明,代谢抑制剂(Na_3N)和 P-型 ATP 酶抑制剂(Na_3VO_4)对芦蒿 Cd 和 Pb 的吸收均有一定的抑制作用,说明芦蒿对 Cd 和 Pb 存在主动吸收。钙离子通道抑制剂 LaCl_3 显著抑制芦蒿根部对 Cd 的吸收,而对 Pb 的吸收没有明显的抑制作用,说明芦蒿对 Cd 的吸收与钙离子通道有关;蛋白质合成抑制剂放线菌酮(CHD)对芦蒿 Cd 和 Pb 的吸收有显著的抑制作用,说明芦蒿对 Cd 和 Pb 的吸收与一些蛋白质或酶的诱导合成及其活性密切相关。

关键词:芦蒿;Cd 吸收;Pb 吸收;抑制剂

中图分类号:X503.231 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2009)11-2255-04

Effect of Additive Inhibitor on the Cd and Pb Uptake of *Artemisia selegensis*

XUE Yan, WANG Chao, WANG Pei-fang, ZHANG Hui

(College of Environmental Science and Engineering, Hehai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: *Artemisia selegensis* is a popular vegetable in Nanjing. It provides people with kinds of vitamins, celluloses and minerals. However, it is easily contaminated by heavy metal, which is harmful to people's health. So it is very important to study on the mechanism of heavy metal absorption of *A. selegensis*. To reduce heavy metal adsorption and develop pollution-free vegetables, the paper investigated the effect of the inhibitor of respiration, P-type ATPase inhibitor, ion channels inhibitor, protein synthesis inhibitor on Cd and Pb uptake in *A. selegensis*. The results showed both the respiration inhibitor NaN_3 and P-type ATPase inhibitor Na_3VO_4 could inhibit Cd and Pb uptake, which showed properly initiative Cd and Pb uptake in the plant. Ca^{2+} ion channel inhibitor LaCl_3 inhibited Cd uptake of *A. selegensis* in root, while did not inhibit Pb uptake, which demonstrated Cd uptake of *A. selegensis* was related to Ca^{2+} ion channel, while Pb uptake was not. Cd and Pb uptake of *A. selegensis* were inhibited by the protein synthesis inhibitor cycloheximide, showed that Cd and Pb uptake related to induce-synthesize and activity of protein and enzyme. The results provided the theoretical basis on heavy metal reduction of *A. selegensis*, and it had practical significance to improve the health of people.

Keywords: *Artemisia selegensis*; cadmium uptake; lead uptake; inhibitor

芦蒿原名菱蒿(*Artemisia selegensis*)是南京的特色蔬菜,深受中外消费者的喜爱,它为人类提供丰富而价廉的各种维生素、纤维素和矿物质。但是近年来研究表明^[1-2],芦蒿很容易受到重金属的污染,而且在植株表现出重金属毒害之前,其体内的重金属含量已超过食用安全标准。由于芦蒿多被人们直接食用,其体内重金属的超标,将对人们的健

康造成很大的危害。所以研究芦蒿吸收重金属的机理,对减少其对重金属的吸收,发展绿色食品和无公害蔬菜,提高人民的健康水平具有重要的现实意义。

芦蒿对重金属是否存在主动吸收,其吸收是否通过离子通道,另外与蛋白质或酶的关系如何,这些是研究植物对重金属吸收运转机制的重要问题。研究表明^[3]植物对重金属可能存在主动吸收。本文通过研究代谢抑制剂、P-型 ATP 酶抑制剂、蛋白合成抑制剂、离子通道抑制剂对芦蒿吸收 Cd 和 Pb 的影响,初步探讨芦蒿吸收 Cd 和 Pb 的机理,为减少芦蒿对重金属的吸收提供了理论基础。

收稿日期 2009-04-20

基金项目 国家自然科学基金(40871227);江苏省研究生培养创新工程(B07034)

作者简介 薛 艳(1978—),女,山东临沂人,博士研究生,研究方向为水污染控制理论与应用。E-mail: yanxuex@sohu.com

1 材料与方法

1.1 植物培养

芦蒿样品采自南京八卦洲。将采回的芦蒿幼苗置于营养液中驯养, 每两天更换一次营养液, 并用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HCl}$ 调节 pH 值至 5.5 左右。培养液组分如下($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 600 MgSO_4 300 K_2HPO_4 300 H_3BO_3 13.8 MnSO_4 217 Na_2MoO_4 0.3, CuSO_4 0.5 ZnSO_4 0.3 $\text{Fe}(\text{---})\text{-EDTA}$ 16.2 pH5.5, 自然光照的温室下 培养 30 d 后用于各种处理。

1.2 试验处理

1.2.1 代谢抑制剂 (Na_3N) 和 P-型 ATP 酶抑制剂 (Na_3VO_4) 对 Cd 和 Pb 吸收的影响

芦蒿植株在加入 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 代谢抑制剂叠氮化钠(Na_3N)或 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ P-型 ATP 酶抑制剂钒酸钠(Na_3VO_4)的吸收液(分别含 5 或 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 和 20 或者 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 的营养液)中处理 5 h^[3]后 植株分不同部位收获, 取根部分析其体内的重金属含量。以不含 Na_3N 和 Na_3VO_4 的吸收液中生长的植株为对照, 每个处理重复 3 次。

1.2.2 离子通道抑制剂和蛋白合成抑制剂对 Cd 和 Pb 吸收的影响

芦蒿植株在加入 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的钙离子通道抑制剂 LaCl_3 或 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蛋白合成抑制剂放线菌酮(CHD)的吸收液(分别含 5 或 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 和 20 或者 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 的营养液)中处理 48 h^[3]后 植株分不同部位收获。取根部分析其体内的重金属含量。以不含 LaCl_3 和 CHD 的吸收液中生长的植株为对照, 每个处理重复 3 次。

1.3 分析方法

植物根系用冷冻的 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 解析 30 min, 再用去离子水洗净, 在 $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干至恒重。植物样品用 $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ 消煮, 原子吸收分光光度计(TAS-986)测定植株不同部位的 Cd 和 Pb 含量。

2 结果与讨论

2.1 代谢抑制剂(Na_3N)和 P-型 ATP 酶抑制剂(Na_3VO_4) 对 Cd 和 Pb 吸收的影响

$\text{H}^+\text{-ATPase}$ 通过水解 ATP 产生的能量把细胞质内的 H^+ 运转出细胞, 从而在细胞两侧形成质子的电化学梯度^[4], 该梯度为一系列次级转运体和通道蛋白跨质膜转运各种营养物质及离子提供能量^[5]。

Na_3N 由于同 O_2 竞争与 Cytaa_3 中 Fe 的结合, 从

而抑制呼吸电子传递链中 Cytaa_3 到 O_2 的电子传递, 不但抑制 ATP 形成, 同时还降低了呼吸速率。而且 Na_3N 也是线粒体、质膜和液胞膜上 $\text{H}^+\text{-ATPase}$ 水解活性的抑制剂。表 1 显示了不同 Cd 和 Pb 浓度下 Na_3N 对芦蒿吸收 Cd 和 Pb 的影响。可以看出, 在低浓度 Cd($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和高浓度 Cd($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理下, Na_3N 对芦蒿 Cd 吸收都有明显的抑制作用($P < 0.05$)。Cd 浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 抑制率达到了 35.8%, 而 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd 处理时, Na_3N 对芦蒿的 Cd 吸收抑制率为 24.2%, 这一结果说明, 芦蒿对 Cd 存在主动吸收过程。 Na_3N 对芦蒿 Pb 吸收的抑制作用与 Cd 的相似, 低 Pb($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时, 抑制率为 44.8%, 高浓度 Pb ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时, 抑制率为 34.8%, 抑制效果明显, 所以芦蒿对 Pb 的吸收也存在主动吸收过程。

P-型-ATPase 是通用的离子泵, 起维持细胞内外离子平衡的作用, 目前发现较早的有 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 、 $\text{H}^+\text{-ATPase}$ 等, 而 $\text{Cd}^{2+}\text{-ATPase}$ 和 $\text{Pb}^{2+}\text{-ATPase}$ 等重金属转运 P-型-ATPase 是新近才发现的。少剂量的钒酸钠(μmol 级)即可抑制各种 P-型-ATPase 的活性^[6]。表 1 还列出了不同 Cd 和 Pb 浓度下 Na_3VO_4 对芦蒿吸收 Cd 和 Pb 的影响。从表中可以看出, 低浓度 Cd ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 Pb($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时, Na_3VO_4 对芦蒿 Cd 和 Pb 吸收均有显著的抑制作用($P < 0.05$), 在高浓度 Cd($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理下, Na_3VO_4 对芦蒿 Cd 吸收的抑制作用不明显, 而高 Pb($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理时, Na_3VO_4 对芦蒿 Pb 吸收仍然有显著的抑制作用。这些结果表明, 芦蒿对 Cd 和 Pb 的吸收与 P-型-ATPase 的活性密切相关, 与 Na_3N 的抑制结合也进一步说明芦蒿对 Cd 和 Pb 可能存在主动吸收机制。

Salt 等^[7]研究发现, 在芥菜中 Cd^{2+} 通过木质部液从根部运输到地上部后主要依赖于 $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 进入液胞^[8]。

表 1 不同 Cd 和 Pb 浓度下 Na_3N 和 Na_3VO_4 对芦蒿吸收 Cd 和 Pb 的影响($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Table 1 Effect of Na_3N and Na_3VO_4 on Cd and Pb of *A. selengensis* under different Cd and Pb concentration($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

重金属/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	CK	Na_3N		Na_3VO_4	
		重金属含量	抑制率/%	重金属含量	抑制率/%
Cd 5	93.5±10.5	60.1±6.53	35.8	69.3±7.31	26.0
Cd 20	202.4±19.3	153.5±15.9	24.2	187.7±20.5	7.2
Pb 20	198.2±11.9	109.3±11.3	44.8	101.2±12.3	48.9
Pb 100	524.6±46.9	342.0±22.5	34.8	353.5±27.9	32.6

2.2 离子通道抑制剂对 Cd 和 Pb 吸收的影响

LaCl₃ 是 Ca²⁺离子竞争性抑制剂^[9],它通过与 Ca²⁺竞争而抑制 Ca²⁺进入细胞质中。同时它还引起膜透性的增加,加重膜质过氧化程度^[10]。在低浓度和高浓度 Cd 处理下,钙离子通道抑制剂 LaCl₃ 均显著抑制了芦蒿根部对 Cd 的吸收($P < 0.05$, 图 1),表明芦蒿对 Cd 的吸收与钙离子通道密切相关。Cataldo 等^[11]在研究大豆时也得到了类似的结果。Rivetta 等^[12]在研究萝卜时也发现,Cd²⁺可能通过质膜上的 Ca 通道离子进入细胞内。

LaCl₃ 对芦蒿 Pb 吸收的抑制作用与对 Cd 的不同,如图 1 所示。在低 Pb 和高 Pb 浓度处理时,LaCl₃ 没有抑制芦蒿根部对 Pb 的吸收,在 100 μmol·L⁻¹Pb 处理下,根对 Pb 的吸收有明显的增加($P < 0.05$)。因此,芦蒿对 Pb 的吸收可能不通过钙离子通道进行。施积炎等^[3]研究 LaCl₃ 对海洲香薷和鸭跖草根部吸收铜的影响时发现,海洲香薷对铜的吸收与钙离子通道有关,而鸭跖草对铜的吸收与钙离子通道关系不大。所以,植物对重金属的吸收是否与钙离子通道有关,与植物种类和重金属种类都有密切的关系。

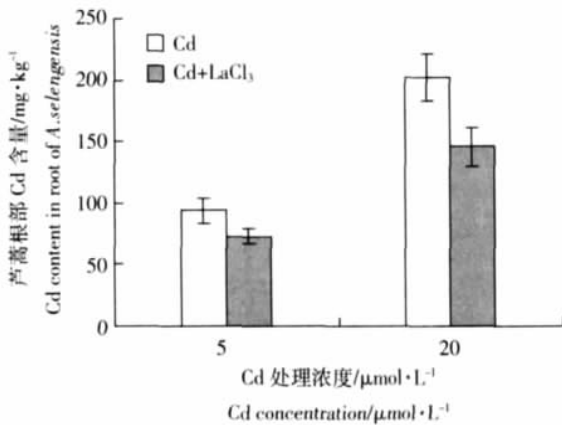


图 1 钙离子通道抑制剂对芦蒿 Cd 和 Pb 吸收的影响

Figure 1 Influence of LaCl₃ on Cd and Pb uptake of *A. selengensis*

2.3 蛋白质合成抑制剂对芦蒿 Cd 和 Pb 吸收的影响

放线菌酮 CHD 是蛋白质合成抑制剂,能够抑制有丝分裂并延长细胞周期^[13]。它通过抑制肽链(作用于 80 s 核糖体)的延伸而抑制蛋白质或酶的合成及活性。在低浓度和高浓度 Cd 处理下,CHD 使芦蒿根部吸收 Cd 的量分别下降了 53.1%和 38.9%($P < 0.05$, 图 2)。而在低和高浓度 Pb 处理时,CHD 使芦蒿根部吸收 Pb 的量分别下降了 38.7%和 42.7%。这一结果说明,芦蒿对 Cd 和 Pb 的吸收与一些蛋白质或酶的诱导合成及其活性密切相关。Pineros 等^[14]用选择性微电极法研究 Cd²⁺在遏蓝菜(*Thlaspi caerulescens*)和败酱草(*T. arvense*)根中的迁移时,发现根细胞膜上存在 Cd²⁺的诱导蛋白。而沈凤娜等^[15]研究发现,随着镉处理浓度的增加,紫茉莉叶片的蛋白质含量活性显著降低,这也说明镉和植物体内的蛋白质相互作用。与此相同的,万定珍^[16]在研究水稻诱导蛋白时发现,Cd 能够诱导水稻幼苗不同类型蛋白质的表达。

3 结论

代谢抑制剂(Na₃N)和 P-型 ATP 酶抑制剂(Na₃VO₄)

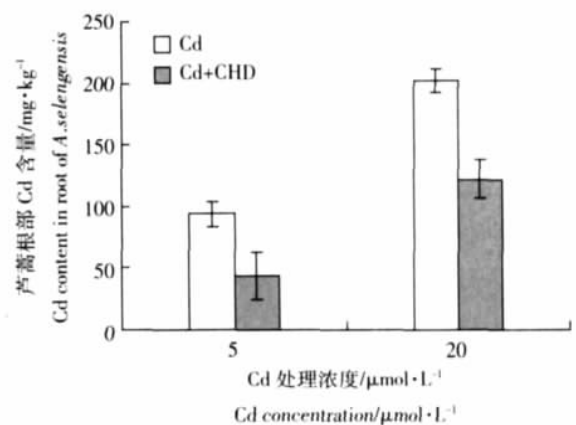


图 2 蛋白质合成抑制剂对芦蒿 Cd 和 Pb 吸收的影响

Figure 2 Influence of CHD on Cd and Pb uptake of *A. selengensis*

对芦蒿 Cd 和 Pb 的吸收均有一定的抑制作用, 说明芦蒿对 Cd 和 Pb 存在主动吸收。钙离子通道抑制剂 LaCl_3 显著抑制芦蒿根部对 Cd 的吸收, 而对 Pb 的吸收没有明显的抑制作用。表明芦蒿对 Cd 的吸收与钙离子通道密切相关, 而对 Pb 的吸收可能不通过钙离子通道进行。蛋白质合成抑制剂放线菌酮(CHD)对芦蒿 Cd 和 Pb 的吸收有显著的抑制作用, 说明芦蒿对 Cd 和 Pb 的吸收与一些蛋白质或酶的诱导合成及其活性密切相关。

参考文献:

- [1] 俞美香, 章 敏, 王飞飞. 芦蒿中铅、铬、汞、砷的含量分析与安全评价[J]. 食品科学, 2005, 26(8) :294-296.
YU Mei-xiang, ZHANG Min, WANG Fei-fei. Determination of plumbum, chromium, hydrargyrum and arsenic and safety evaluation on *Artemisia seoirgensis* Turcz[J]. *Food Science*, 2005, 26(8) :294-296
- [2] 薛 艳, 王 超, 王沛芳, 等. Cd 污染对芦蒿膜脂过氧化和 2 种保护酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(2) :488-489.
XUE Yan, WANG Chao, WANG Pei-fang, et al. Effects of cadmium(Cd) on lipid peroxidation and 2 protective enzymes activity of *Artemista seoirgensis*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(2) :488-489.
- [3] 施积炎, 陈英旭, 田光明, 等. 海州香薷和鸭跖草铜吸收机理[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(6) :642-646.
SHI Ji-yan, CHEN Ying-xu, TIAN Guang-ming, et al. Copper uptake mechanism of *Elsholtzia splendens* and *Commelina communi*[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2004, 10(6) :642-646.
- [4] Ohinishi T, Gall R S, Mayer M L. An improved assay of inorganic phosphate in the presence of extralabile phosphate compounds :Application to the ATPase assay in the presence of phosphocreatine[J]. *Anal Bioch*, 1975, 69 :261-267.
- [5] Morsomme P, Boutry M. The plant plasma, membrane H^+ -ATPase :structure, function and regulation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465 :1-16.
- [6] Williams L E, Pittman J K, Hall J L. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1465 :104-126.
- [7] Salt D E, Prince R C, Pickering I J, et al. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard[J]. *Plant Physiol*, 1995, 109 :1427-1433b.
- [8] Salt D E, Rauser W E. MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107 :1293-1301a.
- [9] 陈为钧, 陶 冶, 胡天斗, 等. 稀土离子对烟草 RuBPcase 的抑制作用[J]. 中国稀土学报, 2001, 19(4) :362-365.
CHEN Wei-jun, TAO Ye, HU Tian-dou, et al. Effects of Ln^{3+} on inhibition of tobacco RuBPcase[J]. *Journal of The Chinese Rare Earth Society*, 2001, 19(4) :362-365.
- [10] Poovaiah B W, Leopold C. Effects of inorganic salts on tissue permeability[J]. *Plant Physiol*, 1976, 58 :182-189.
- [11] Cataldo D A, Garland T R, Wildung R E. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants[J]. *Plant Physiol*, 1983, 73 :844-848.
- [12] Rivetta A, Negrini N, Cocueei M. Involvement of Ca^{2+} -calmodulin in Cd^{2+} toxicity during the early phases of raddish(*Raphanussativus* L.) seedgermination[J]. *Plant Cell and Environment*, 1997, 20 :600-608.
- [13] Zetterberg A, Larsson O. Kinetic analysis of regulatory events in G leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1985, 82 :5365-5369.
- [14] Pineros M A, Shaff J E, Kochian L V. Development, characterization and application of a cadmium-selective microelectrode for the measurement of cadmium fluxes in roots of *Thlaspi species* and wheat[J]. *Plant Physiol*, 1998, 116 :1393-1401.
- [15] 沈凤娜, 柯世省, 何丽娜, 等. 镉对紫茉莉叶片蛋白质、脯氨酸和抗氧化酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(35) :15329-15332.
Shen Feng-na, Ke Shi-sheng, He Li-na, et al. Effects of cadmium on protein, proline and antioxidant enzymes activities in leaves of *Mirabilis jalapa* L.[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(35) :15329-15332.
- [16] 万定珍. Cd, Hg 和 TCB 胁迫对水稻蛋白组的影响及诱导蛋白功能分析[D]. 扬州 扬州大学硕士论文, 2008.
WAN Ding-zhen. The Effect of Cd, Hg and TCB on proteome in rice and analysis on the function of revulsive protein[D]. Paper for the master of Yangzhou University. 2008.