

镉胁迫对拟南芥幼苗形态 生理和错配修复 相关基因表达的影响研究

韩艳萍^{1,2}, 刘 宛¹, 李艳芝³, 李培军¹, 张巧丽^{1,2}, 郭艳丽^{1,2}

(1.中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 辽宁 沈阳 110016; 2.中国科学院研究生院, 北京 100049; 3.济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘要:以拟南芥为供试材料,从形态指标、生理指标、分子指标3个层次研究了镉(Cd)的毒理效应,筛选Cd敏感生物标记物。分子指标的研究以18S rRNA为看家基因,错配修复基因MutS 2 homolog(atMSH2), atMSH3, atMSH7, 细胞增殖核抗原1和2(atPCNA1和atPCNA2)为检测目的基因,采用半定量反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术研究Cd胁迫对上述错配修复相关基因表达的影响。结果表明,不同浓度(0、0.125、0.25、1.0、3.0 mg·L⁻¹)Cd处理7d后,根长随Cd胁迫强度的增加而降低;0.125 mg·L⁻¹ Cd处理下,地上部可溶性蛋白含量显著增加,而在0.25、1.0和3.0 mg·L⁻¹ Cd时降低,但仍高于对照;幼苗叶片数、地上部鲜重、叶绿素含量变化与对照相比差异均不显著。地上部atMSH2, atPCNA1, atPCNA2基因表达量的变化与Cd胁迫浓度呈明显的倒U字型关系,分别在0.125、0.25和0.125 mg·L⁻¹ Cd时达到最大值。以上结果表明,地上部可溶性蛋白含量变化与上述3个错配修复相关基因表达量的改变趋势相符,且均对Cd污染胁迫较敏感,可以作为检测Cd污染及其相关生物学效应的潜在生物标记物。

关键词: 镉, 错配修复基因, 细胞增殖核抗原基因, 生物标记物, 半定量 RT-PCR

中图分类号: X503.233 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2009)06-1246-07

Effects of Cadmium Stress on Morphological, Physiological Indexes and Mismatch Repair Related Genes Expression of *Arabidopsis* Seedlings

HAN Yan-ping^{1,2}, LIU Wan¹, LI Yan-zhi³, LI Pei-jun¹, ZHANG Qiao-li^{1,2}, GUO Yan-li^{1,2}

(1.Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2.Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3.Pharmacy Department, Jining Medical College, Rizhao 276826, China)

Abstract: Using *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) as tested material, the toxic effects of cadmium (Cd) in cultural media on the three levels of morphological indexes, physiological indexes and molecular indexes were studied, in order to choose sensitive biomarkers indicative of Cd. The study on molecular indexes took 18S rRNA as house-keeping gene, MutS 2 homolog (atMSH2), atMSH3, atMSH7, atPCNA1 and atPCNA2 as targeted genes, which focused the effect of Cd on the above mismatch repair related genes expression of *Arabidopsis* seedlings with semi-quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The results indicated that the root length of *Arabidopsis* seedlings reduced with the increase of the concentration of Cd. The total soluble protein level of the shoots in *Arabidopsis* seedlings significantly increased by exposed to Cd of 0.125 mg·L⁻¹ for 7 days, and reduced by exposed to Cd of 0.25, 1.0, 3.0 mg·L⁻¹ for 7 days whereas they were still higher than the level of control. Exposure to Cd of 0.125~3.0 mg L⁻¹ did not have a significant effect on leaf numbers, fresh weight and chlorophyll level of the shoots in *Arabidopsis* seedlings as compared with the control. The inverted U-shaped dose-response effects of Cd on expression of atMSH2, atPCNA1, atPCNA2 of the shoots of *Arabidopsis* seedlings were observed, with maximum effect at 0.125 mg·L⁻¹, 0.25 mg·L⁻¹ and 0.125 mg·L⁻¹ Cd, respectively. The above results indicate that the change trend of the total soluble protein level of the shoots in *Arabidopsis* seedlings was similar to that of above three mismatch repair related genes expression. They were all sensitive to the Cd pollution and could be served as potential biomarkers for the detection of Cd pollution and the related biological effects.

Keywords: Cd; mismatch repair genes; proliferating cell nuclear antigen (PCNA) genes; biomarker; semi-quantitative RT-PCR

收稿日期: 2008-09-22

基金项目: 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室基金; 中科院知识创新重大项目(KZCX1-YW-06-03); 国家重点基础研究发展计划(2004CB418506); 中俄自然资源与生态环境联合研究中心资助

作者简介: 韩艳萍(1984—),女,山东东营人,在读硕士,主要从事生态毒理方面的研究。E-mail: hanyanping12@163.com

通讯作者: 刘 宛 E-mail: liuwan63@hotmail.com

近年来,随着工农业生产的迅速发展,农田土壤中重金属污染日益严重。我国受重金属污染的耕地面积近2 000万 hm^2 ,约占耕地面积的1/5,其中Cd污染耕地占1.33万 hm^2 。Cd由于其高移动性和高毒害性,在1984年被联合国环境规划署列为“危害全球环境的化学物质和化学过程清单”的首位,并且由于Cd的难降解性和高积累性,它可以通过急性或慢性毒性作用积累于生物体内,并通过食物链危及人类健康^[1-2],因此对Cd污染土壤的早期诊断和生态风险评价已成为当前最受关注的环境问题之一^[3]。

DNA是生命活动中最重要的遗传物质,在维护机体的正常功能上具有重要作用,但是极易受外界物理、化学等因素的影响产生损伤,从而引起细胞及机体的损害。细胞及机体则需要对各种损伤进行修复来抵御外界的各种损害。对机体损伤和修复进行检测需要依靠灵敏性高的生物标记物法^[4]。生物标记物作为指示环境污染暴露危害效应的生物信号,显示了分子水平的暴露-效应关系。在生物体中,各种DNA损伤和修复机制均有各自特异性的因子和基因组,构成各自的生物标记物^[5]。目前,生物标记物在各种DNA损伤和修复检测上的研究已成为一个很重要的研究方向,受到很多研究者的重视^[6]。

DNA错配修复(mismatch repair, MMR)是一种复制后的修复,它是机体中主要的修复途径之一。MMR基因在生物进化过程中是保守基因,它能特异性识别和修复DNA复制过程中出现的碱基错配,维持DNA复制的精确性和基因组的稳定性。错配修复基因主要为MutHLS系统,其中植物含有MutS同系物(MSH2、MSH3、MSH6、MSH7)、MutL同系物(MLH1)和PMS2等^[7]。MSH2蛋白与MSH6、MSH3蛋白形成各自的异源二聚体,其复合物分别为MutS α 和MutS β ,分别在错配修复过程中对碱基-碱基错配起识别作用,并与错配位点结合,形成一种暂时性的复合物,从而启动错配修复,并与有关的酶配合切除含错配碱基的DNA核苷酸序列^[8]。

MSH7蛋白是植物中特有的、与MSH6相似的、一种新发现的错配修复蛋白^[11,13]。MSH6和MSH7在N-末端错配结合区域均含有带电荷的芳香残基,还含有N-末端相互作用区域,这些区域可能是与增殖细胞核抗原(PCNA)相互作用的位点^[9],PCNA含量的变化与DNA合成一致,是反映细胞增殖状态的生物标记物^[10]。在生长旺盛的肿瘤组织中,PCNA呈阳性表达,可作为原位检测肿瘤细胞增殖状态的生物标记物

用于肿瘤动力学研究^[8-10]。

目前PCNA和MMR基因的研究主要集中在酵母^[11-12]和人类细胞^[8],在植物方面的研究较少,有关植物PCNA及MMR基因的研究主要集中在紫外线、MMS和 H_2O_2 等胁迫条件^[13],重金属污染胁迫对植物PCNA及MMR基因表达的研究较少。本文以拟南芥为试验材料,采用半定量RT-PCR技术探讨Cd胁迫对拟南芥幼苗MMR基因及PCNA基因表达的影响,并与其形态及生理指标作比较,筛选出Cd敏感生物标记物。旨在对环境中小剂量Cd污染进行早期预警和诊断,为我国环境风险评价及土壤污染修复效果的质量评价提供科学的决策依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试拟南芥为哥伦比亚生态型(*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)。试验采用Murashige and Skoog(M & S)营养液培养。

1.2 试验设计

拟南芥种子发芽前用去离子水浮选去瘪粒,然后选取均匀种子浸泡于0.1% HgCl_2 溶液中表面消毒5 min,用去离子水浸泡清洗3次,每次5 min。洗净后,将种子浸泡于去离子水中,于4℃放置3 d,以打破种子休眠。将100 mL M & S营养液加入三角瓶中,灭菌后将大约相同数量拟南芥种子(约40~50粒)种于三角瓶中,密封。置于摇床上进行光照培养6 d(温度21~22℃,光暗周期14 h/10 h,光强3 000 lx),然后加入Cd溶液(以 CdCl_2 形式),共设5个Cd处理浓度:0、0.125、0.25、1.0、3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,重复3次。继续在摇床上培养7 d。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 拟南芥幼苗形态指标的测定

取不同Cd浓度处理下的拟南芥幼苗,分别测量其叶片数、根长、鲜重。并计算根长抑制率 n :

$$n=(1-x/y)\times 100\%$$

式中 x 为各处理组幼苗初生根平均根长, y 为对照组幼苗初生根平均根长。

1.3.2 拟南芥幼苗地上部生理指标的测定

可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝G-250染色法测定^[14],叶绿素含量采用丙酮乙醇混合液浸提法测定^[14]。

1.3.3 拟南芥幼苗地上部RNA提取及检测

对照组和各处理组拟南芥幼苗地上部各选取100~200 mg鲜重,根据操作说明(Takara RNA植物提

取)进行拟南芥总 RNA 的提取。提取后采用 Eppendorf Bio-photometer 蛋白-核酸测定仪进行 RNA 含量及纯度测定,0.8% 琼脂糖凝胶水平电泳(127 V,17 min 左右)鉴定 RNA 提取质量。提取后 RNA 样品冷存于-80 °C 冰箱中用于后续反转录反应。

1.3.4 样品的反转录(RT)与聚合酶链式反应(PCR)

本实验采用宝生物 Takara 的 RT-PCR 试剂盒。反转录反应体系共 20 μL ,其成分、浓度(或体积)如下: MgCl_2 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $10\times\text{RT buffer}$ 2 μL ; dNTP Mixture(各 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; RNase inhibitor 1 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; AMV Reverse Transcriptase 0.25 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; Oligo(dT)primer 0.125 $\text{pmol}\cdot\mu\text{K}^{-1}$; RNA(模板量为 5 μg)和 RNase Free dH_2O 根据不同的 RNA 浓度调整加入。反转录流程为:首先 30 °C,10 min,然后 42 °C,50 min;最后 95 °C,5 min。

PCR 反应体系为 25 μL ,其成分、浓度(或体积)如下: $10\times\text{PCR buffer}$ 2.5 μL ; Ex Taq HS 0.025 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; cDNA 0.5 μL ; 上/下游特异性引物各 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

实验引物见表 1。看家基因的 18S rRNA 引物序列为:上游引物 5'-TTC CAT GCT AAT GTA TTC AGA G -3'; 下游引物 5'-ATG GTG GTG ACG GGT GAC-3'。PCR 流程为:94 °C 预变性 10 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,不同引物最适循环数通过实验进行选择,最后 72 °C 保温 10 min,PCR 产物-20 °C 保存待用。

表 1 实验所用引物名称及序列

Table 1 Names and sequences of primers used in experiment

编号	引物名称	片段大小/bp	引物序列(5'-3')
1	atMSH2(F)	136	AGGTATTTGAGGACTTAGCTGG
2	atMSH2(R)	136	AATATCTCCAGCATCCGAAGAG
3	atMSH3(F)	139	GTCGTCATCCTGACTGGAG
4	atMSH3(R)	139	ACGGATATAGCAGCTCTTTCC
5	atMSH7(F)	148	ATATACGTTGACAGGGTCTACG
6	atMSH7(R)	148	CAGCACAGTTCATGATTTCAG
7	atPCNA1(F)	126	GTGACACAGTTGTGATCTCTG
8	atPCNA1(R)	126	ATCACAATTGCATCTTCCGG
9	atPCNA2(F)	137	GATGAAGCTGATGGATATCCGAC
10	atPCNA2(R)	137	GAGATCACAACCTGTGTACCC

1.3.5 PCR 反应产物的检测——聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、凝胶成像及定量分析

PCR 反应结束后,将产物进行 12% PAGE 电泳,电压 58~60 V,电泳时间 3~3.5 h, PAGE 结束用 0.015% 溴化乙锭(EB)染色 30~40 min。然后用 Wealtec 凝胶

成像系统拍照并用 Quantity one 凝胶分析软件进行紫外强度分析。

1.4 数据分析

数据结果采用 SPSS 软件(版本 13.0)和 Microsoft Excel 2003 进行统计分析,表示为平均值 \pm 标准差。各处理的比较采用最小显著差数法(LSD)进行多重比较,凡超过 LSD 0.05 水平的视为显著。

2 结果与分析

2.1 Cd 对拟南芥幼苗叶片数、地上部鲜重、根长的影响

由表 2 可以看出,不同 Cd 浓度处理下拟南芥幼苗叶片数没有发生变化。幼苗地上部鲜重随 Cd 浓度的增加略有变化,但所有的处理组与对照相比差异不显著($P>0.05$ $P>0.05$ $P>0.05$ $P>0.05$)。根长在 0.125 至 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理下呈递减趋势,且各组之间差异显著($P<0.05$ $P<0.05$ $P<0.05$ $P<0.05$)。

表 2 不同浓度 Cd 处理 7 d 对拟南芥幼苗叶片数、地上部鲜重、根长的影响

Table 2 Effect of different concentrations of cadmium on leaf numbers, fresh weight of the shoots and root length of *Arabidopsis* seedlings for 7 days

Cd 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	叶片数	幼苗地上部鲜重/mg	幼苗根系	
			根长/cm	抑制率/%
0	6	10.03 \pm 0.85a	4.2 \pm 0.4a	0
0.125	6	11.56 \pm 1.72a	3.3 \pm 0.2b	22.49
0.25	6	11.01 \pm 1.90a	2.8 \pm 0.2c	26.79
1.0	6	10.04 \pm 1.26a	2.4 \pm 0.2d	42.58
3.0	6	9.37 \pm 0.51a	1.5 \pm 0.5e	60.53

注:同列不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

2.2 Cd 对拟南芥幼苗地上部可溶性蛋白含量和叶绿素含量的影响

Cd 对拟南芥幼苗生理特性的影响见表 3。可以看出,0.125 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理下,拟南芥幼苗地上部可溶性蛋白含量显著升高($P<0.05$),比对照增加 74.25%。0.25、1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理与 0.125 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理相比,拟南芥幼苗地上部可溶性蛋白含量减少,但均明显高于对照($P<0.05$ $P<0.05$)。而在 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理下,拟南芥幼苗地上部含量与对照相比无显著性差异($P>0.05$)。

由表 3 可以看出,拟南芥幼苗地上部叶绿素含量在 0.125、0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理下升高,在 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理下降低,但各处理与对照相比差异不显著($P>0.05$ $P>0.05$ $P>0.05$ $P>0.05$)。

表 3 不同浓度 Cd 处理 7 d 对拟南芥幼苗地上部可溶性蛋白含量和叶绿素含量的影响

Table 3 Effect of different concentrations of cadmium on total soluble protein lever and chlorophyll level of the shoots in *Arabidopsis* seedlings for 7 days

Cd 浓度/mg·L ⁻¹	可溶性蛋白含量/mg·g ⁻¹ FW	叶绿素含量/mg·g ⁻¹ FW
0	4.00±0.18a	0.45±0.06a
0.125	6.97±0.88b	0.47±0.02a
0.25	5.26±0.27c	0.46±0.03a
1.0	5.02±0.14c	0.45±0.01a
3.0	4.59±0.24ac	0.42±0.01a

2.3 Cd 对拟南芥基因表达的影响

2.3.1 拟南芥总 RNA 的提取

植物 RNA 提取的纯度和完整性严重影响着 RNA 的反转录活性。通过 OD260/OD280、OD260/OD230 的比值可以判断出 RNA 的提取纯度。由表 4 可以看出 RNA 提取的纯度,各胁迫强度下的提取 OD260/OD280 都在 1.8~2.0 之间,说明提取的 RNA 中蛋白质污染很少,质量较好。RNA 提取的完整性从图 1 可以看出,电泳中呈现了典型的 28S、18S、5S 3 种 RNA 带形且各条带无明显的拖尾现象,表明提取的 RNA 无明显降解,因此所提取的 RNA 在含量、纯度和完整性方面均较好,可以用于反转录反应。

表 4 拟南芥幼苗地上部 RNA 提取的纯度

Table 4 Purity of extracted RNA from the shoots of *Arabidopsis* seedlings

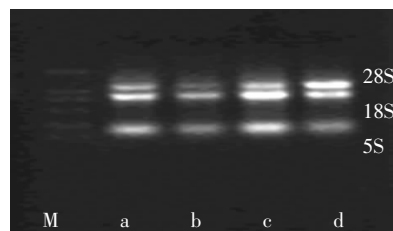
Cd 浓度/mg·L ⁻¹	A260/A280	A260/A230
0	1.98	2.11
0.125	2.05	1.92
0.25	1.90	2.10
1.0	1.87	2.08
3.0	1.86	2.09

2.3.2 各基因在不同 Cd 浓度处理下 PCR 最适循环圈数

不同 Cd 浓度处理所得 cDNA 分别与对照组 cDNA 混合,然后稀释,分别得到浓度为 100%、50%、25% 的 cDNA 溶液,调整 PCR 循环圈数使各引物在以上 cDNA 浓度时 PCR 后三者亮度呈较明显的梯度趋势,并用 Quantity one 凝胶分析软件分析紫外光强度值,若其线性相关系数大于 0.9,即为各引物的 PCR 最适循环圈数(见表 5)。

2.3.3 Cd 胁迫对拟南芥幼苗地上部 MMR 基因和 PCNA 基因表达的影响

本试验采用半定量 RT-PCR 方法,以 18S rRNA



a 为对照组, b、c、d 为 Cd 处理组,其浓度分别为 0、0.125、0.25 和 1.0 mg·L⁻¹, M 为 DL 2 000 marker。

图 1 拟南芥总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

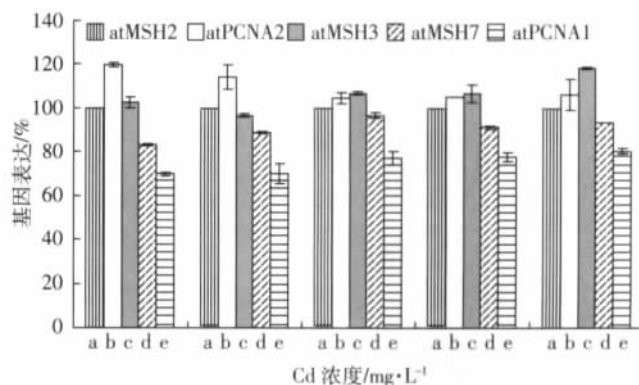
Figure 1 The agarose gel electrophoresis of total RNA in shoots of *Arabidopsis* seedlings

表 5 RT-PCR 中不同引物在各 Cd 浓度处理下对应的最适循环数

Table 5 The optimal number of cycles of semi-quantitative RT-PCR for different primers under different concentration of cadmium

Cd 浓度/mg·L ⁻¹	18S rRNA	atMSH2	atMSH3	atMSH7	atPCNA1	atPCNA2
0.125	24	35	32	37	32	28
0.25	24	35	32	37	32	27
1.0	26	37	34	40	34	30
3.0	28	50	47	42	36	33

作为看家基因检测以下 5 个 MMR 相关基因在不同浓度 Cd 处理 7 d 后表达情况:atMSH2、atMSH3、atMSH7、atPCNA1、atPCNA2。图 2 是在各浓度处理下以上各基因的相对表达情况(注:将对照组上述基因的相对表达量设定为 100%)。在 0.125 mg·L⁻¹ Cd 胁迫下,atMSH2、atPCNA2 基因的表达量显著增加,在 Cd 胁迫强度为 0.25 mg·L⁻¹ 时,atPCNA1 基因表达量



a 代表对照组; b、c、d、e 代表处理组, Cd 浓度分别为 0.25、0.5、1.0 和 3.0 mg·L⁻¹。

图 2 Cd 处理 7 d 后拟南芥幼苗地上部 MMR 和 PCNA 基因的表达情况

Figure 2 Expression levels of MMR and PCNA genes in shoots of *Arabidopsis* seedlings exposed to Cd for 7 days

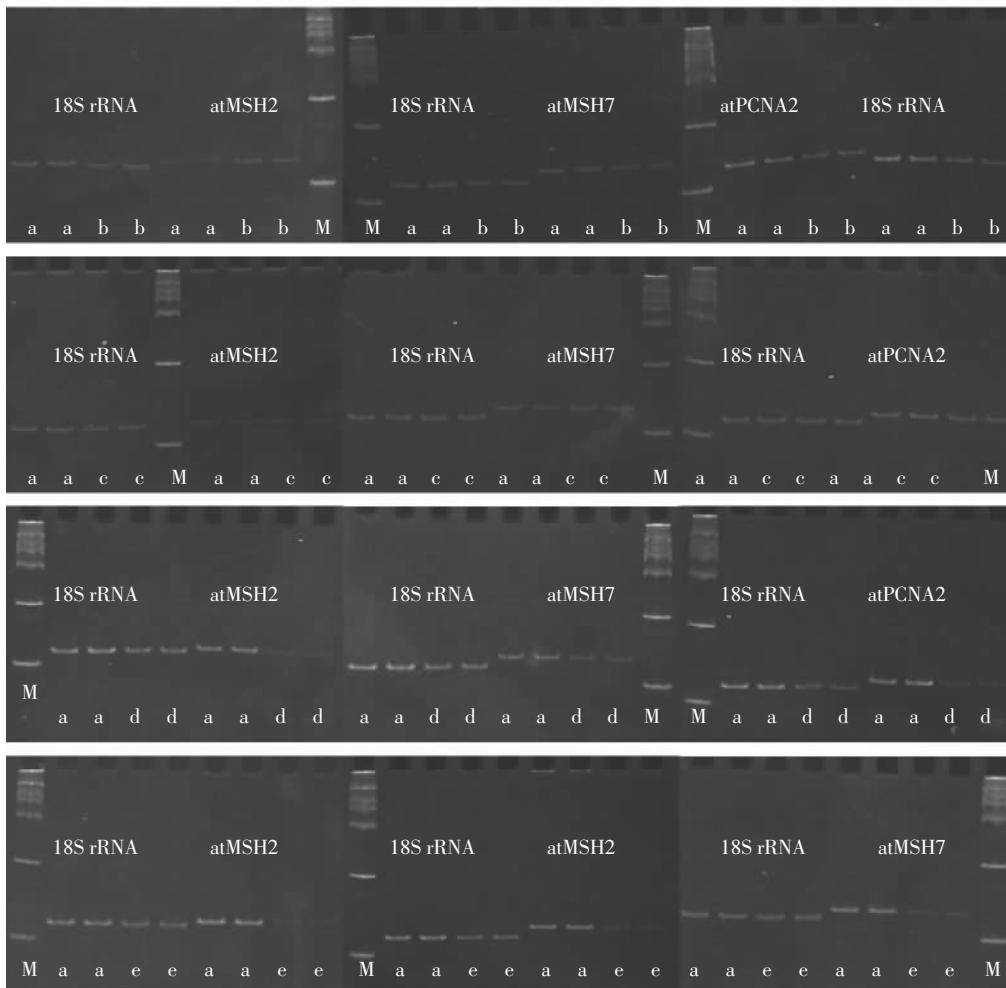
显著增加, *atMSH2*、*atPCNA2* 基因的表达量则开始降低。在 1.0 和 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 时, 这 5 个基因的表达均出现了抑制(图 2 和图 3)。由图 3 可以看出, 随着 Cd 浓度的增加, *atMSH2*、*atMSH3*、*atMSH7*、*atPCNA1*、*atPCNA2* 基因的表达呈明显的倒 U 字型。

3 讨论

使用多种类型的生物标记物对研究污染物在不同阶段、不同层次上的毒理效应已经有相关报道^[15]。本试验从拟南芥的形态指标、生理指标、分子指标 3 个层次研究了 Cd 的生态毒理效应, 筛选出了指示 Cd 污染的潜在生物标记物。

在形态指标方面, 拟南芥幼苗的叶片数、地上部鲜重随 Cd 浓度的增加没有显著变化(表 3), 只有根长度随着 Cd 浓度的增加明显减小, 0.125、0.25、1.0、

3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理 7 d 后, 幼苗根系生长的抑制率分别为 22.49%、32.06%、42.58%、63.64%, 表明 Cd 胁迫对拟南芥根系的抑制和毒害作用具有累积效应(表 3)。这与王兴明等的研究结果类似^[16]。关于 Cd 胁迫对根长的抑制毒害作用可能有以下几种原因: (1) 种子吸胀萌发时, 胚根吸水最快首先突破种皮, 所以在 Cd 的积累量和受 Cd 胁迫的时间进程上根大于其他部位, 其表现为受伤害更严重。(2) Cd 可诱导根系产生乙烯, 并可由根部向地上部分传导, 逆境乙烯可强烈伤害细胞, 而这种伤害作用则首先发生在产生乙烯的根部。(3) 根细胞壁中存在大量的交换位点, 大量 Cd 进入植物体后, 能将 Cd 离子固定在这些位点上^[17], 进而破坏细胞内染色体和核仁, 直接影响细胞的分裂和生长, 从而表现为对根伸长的抑制及形态的改变。另外, Cd 在植物体各部位不同的积累情况不同。大量研



泳道 a 代表对照, 泳道 b、c、d、e 代表处理组, 其 Cd 处理浓度分别为 0.125、0.25、1.0 和 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, M 为 DL 2 000 marker。

图 3 Cd 处理 7 d 后拟南芥幼苗地上部 *atMSH2*、*atMSH7* 和 *atPCNA2* 基因表达电泳图谱

Figure 3 Electrophoresis profiles of *atMSH2*, *atMSH7* and *atPCNA2* genes expression in the shoots of *Arabidopsis* seedlings exposed to Cd for 7 d

究表明,拟南芥幼苗根对 Cd 的累积量远大于叶片对 Cd 的累积量^[18]。

在本试验的生理指标方面中,叶绿素含量无明显变化,各处理与对照相比差异不显著可能与之有关。然而,可溶性蛋白含量随 Cd 浓度的变化呈明显的倒 U 字型(表 2)。当 Cd 浓度较低($0.125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时,可溶性蛋白含量急剧增加,比对照高出 74.25%。Cd 浓度为 0.25 、 1.0 、 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可溶性蛋白含量比 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 相比时降低,但仍高于对照。近年来可溶性蛋白含量随污染物浓度的变化而产生的变化趋势有各种不同的研究结果^[19-21]。本试验中可溶性蛋白质含量的变化趋势可能有以下几个原因:(1)可溶性蛋白质含量反映了机体内代谢酶的变化,在低浓度 Cd 胁迫下,叶片组织为适应 Cd 胁迫从而诱导蛋白质合成反应占优势,因此表现出蛋白质含量升高。但是随着 Cd 浓度的增大,合成反应受到不同程度的抑制,因而可溶性蛋白质含量又出现下降。(2)高浓度 Cd 使蛋白质变性。

在分子指标方面,生物体中的 MMR 系统是 DNA 修复的主要途径之一,MMR 系统既可以修复 DNA 复制过程中出现的碱基-碱基错配及插入-缺失突变,又可以消除由于含简单重复序列的同源序列之间的遗传重组出现的不配对碱基序列,这对维持 DNA 复制的稳定性具有重要意义。通过半定量 RT-PCR 分析可知,Cd 与其他不利因素一样可以引起拟南芥幼苗 DNA MMR 基因表达的改变(图 2 和图 3) atMSH2 基因在 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下其表达量明显高于 atMSH3 和 atMSH7,其与 Cd 胁迫浓度呈明显的倒 U 字型关系,并在 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大值。由此可见,atMSH2 基因表达诱导对低浓度 Cd 污染反应更敏感,可以作为土壤 Cd 污染的敏感生物标记物。类似的结果也存在于人类肿瘤细胞的研究中^[22-23]。关于低浓度 Cd 胁迫诱导 DNA MMR 基因表达的主要机理解释包括:(1)Cd 与蛋白三维结构中的半胱氨酸有很高的亲和性,可以促进 Cd 和 MMR 系统组分的特异性结合,从而抑制酶功能^[11]。(2)基因表达是启动子区大量信号作用的结果,Cd 胁迫引起蛋白磷酸化的增强和转录因子的活化作用进而改变细胞信号传导路径。(3)DNA 甲基化是转录控制的一个重要机制,Wang^[24]等通过对 14 例女性肺癌患者的唾液研究证明:hMSH2 基因的表达降低与其启动子甲基化有关。另外,一些基因如 MLH1 和 MSH6 的启动子区在胁迫条件下会出现甲基化或超甲基化^[25-27]。(4)低浓度 Cd 干

涉抗氧化剂防御系统并且刺激细胞中大量反应自由基的产生,从而诱导 DNA MMR 基因表达。

PCNA 通过协调 DNA 复制过程来影响细胞增殖,是细胞增殖的指标。PCNA 还可以作为功能转换因子,通过各种不同的调控方式与多种因子相互作用,参与了 DNA 损伤修复、细胞周期调控、染色体代谢、细胞凋亡及甲基化等许多重要的细胞事件^[10]。本研究中,拟南芥幼苗地上部 atPCNA1、atPCNA2 基因的表达与 Cd 胁迫浓度呈明显的倒 U 字型关系,其分别在 0.25 和 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 时达到最大值(图 3 和图 4)。这表明 PCNA 基因表达的变化对于 Cd 暴露较为敏感,可以作为 Cd 污染的有用的生物标记物。这与 Yamamoto 等^[13]研究的在 UV 和 H_2O_2 处理的水稻 PCNA mRNA 的表达结果类似,与在热激作用下水稻 PCNA mRNA 的表达量降低的结果不同。

总之,不同浓度 Cd 胁迫 (0 、 0.125 、 0.25 、 1.0 和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对拟南芥幼苗 atMSH2、atPCNA1、atPCNA2 基因表达量的影响不是呈线性的剂量-效应关系,而是呈现显著的倒 U 字型的剂量-效应关系,这与一些作者的研究结果相类似^[28-29]。

在微量污染胁迫下,植物群体、个体、细胞水平和分子水平指标的毒性响应规律是不同的,某些指标对毒物反应迟钝,故这些指标不能作为生物标记物,某些指标对毒物的反应非常敏感,并且与污染物浓度之间存在非常显著的剂量-效应关系,即为研究所筛选的敏感生物标记物。而且不同层次上的生物标记物相结合,将成为污染物毒性检测的有效途径和方法^[30]。本研究将形态、生理指标与分子指标相结合,则更有利于理解分子水平的测定结果,可以更好地理解 Cd 污染对拟南芥幼苗的毒性效应。因此,拟南芥幼苗错配修复相关基因表达的变化结合其形态、生理指标可以作为检测 Cd 污染及其遗传毒性效应的敏感生物标记物。

参考文献:

- [1] 熊治廷. 环境生物学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2000.
XIONG Zhi-ting. Environmental biology[M]. Wuhan: Wuhan University Press, 2000.
- [2] Kong F X, Hu W, Liu Y. Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1998, 40: 105-111.
- [3] 黄宝圣. 镉的生物毒性及其防治策略[J]. 生物学通报, 2005, 40(11): 26-28.
HUANG Bao-sheng. The biotoxicity and control strategies of cadmium[J]. *Bulletin of Biology*, 2005, 40(11): 26-28.

- [4] 吕斌, 周宜开. DNA损伤和修复生物标记物的检测研究[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(2): 120-122.
LV Bin, ZHOU Yi-kai. The detection of DNA damage and repair biomarkers[J]. *China Journal of Laboratory Medicine*, 2002, 25(2): 120-122.
- [5] Nia A B, et al. A multi-biomarker approach to study the effects of smoking on oxidative DNA damage and repair and antioxidative defense mechanisms[J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22: 395-401.
- [6] 刘宛, 李培军, 周启星, 等. 污染土壤的生物标记物研究进展[J]. 生态学杂志, 2004, 23(5): 150-155.
LIU Wan, LI Pei-jun, ZHOU Qi-xing, et al. Advances in the research of biomarkers of contaminated soils[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2004, 23(5): 150-155.
- [7] Hays J B. *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions[J]. *DNA Repair*, 2002, 64: 1-22.
- [8] 虞新兰, 白明. 肺癌组织中 hMSH2 及 PCNA 的表达及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(5): 691-694.
TUO Xin-lan, BAI Ming. Expression and significance of human mismatch repair gene (hMSH2) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in lung cancer[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2005, 15(5): 691-694.
- [9] Culligan K M, Hays J B. *Arabidopsis* MutS homologs-AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6 and a novel AtMSH7-form three distinct protein heterodimers with different specificities for mismatched DNA[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12: 991-1002.
- [10] 宋楠盟, 桑建利, 徐恒. 增殖细胞核抗原(PCNA)的分子结构及其生物学功能研究进展[J]. 自然科学进展, 2006, 16(10): 1201-1209.
SONG Nan-meng, SANG Jian-li, XU Heng. The molecular structure and biological function progress of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)[J]. *Progress in Natural Science*, 2006, 16(10): 1201-1209.
- [11] Jin Y H, Clark A B, Slebos R J C, et al. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair[J]. *Nature Genetics*, 2003, 34: 326-329.
- [12] Bowers J, Tran P T, Liskay R M, et al. Analysis of yeast MSH2-MSH6 suggests that the initiation of mismatch repair can be separated into discrete steps[J]. *Molecular Biology*, 2000, 302: 327-338.
- [13] Yamamoto T, Yoko M, Ishibashi T. Interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and a DnaJ induced by DNA damage[J]. *Journal Plant Research*, 2005, 118: 91-97.
- [14] 张宪征, 谭桂茹, 黄元极, 等. 植物生理学实验技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989.
ZHANG Xian-zheng, TAN Gui-ru, HUANG Yuan-ji, et al. *Plant physiology experimental technology*[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Publishing House, 1989.
- [15] Besarati Nia A, Van Schooten F J, Schiderman P. A multi-biomarker approach to study the effects of smoking on oxidative DNA damage and repair and antioxidative defense mechanisms[J]. *Carcinogenesis*, 2001, 21: 395-401.
- [16] 王兴明, 李晶, 涂俊芳, 等. Cd对油菜种子发芽与幼苗生长的生态毒性[J]. 土壤通报, 2006, 37(6): 1218-1222.
WANG Xing-ming, LI Jing, TU Jun-fang, et al. The eco-toxicity of cadmium on seed germination and seedling growth of cole[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2006, 37(6): 1218-1222.
- [17] Nishizono H. The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*[J]. *Plant and Soil*, 1987, 101: 15-20.
- [18] Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots[J]. *Biochimie*, 2006, 88: 1751-1765.
- [19] 刘宛, 郑乐, 李培军, 等. 镉胁迫对大麦幼苗基因组 DNA 多态性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(1): 19-24.
LIU Wan, ZHENG Le, LI Pei-jun, et al. Effects of cadmium stress on DNA polymorphism of genome in barley seedlings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(1): 19-24.
- [20] 解莉婧, 刘宛, 李培军, 等. 镉胁迫对蚕豆幼苗基因组 DNA 多态性的影响[J]. 生态学杂志, 2007, 26(1): 35-39.
XIE Li-jing, LIU Wan, LI Pei-jun, et al. Effects of cadmium stress on DNA polymorphism of genome in *Vicia faba* seedling[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(1): 35-39.
- [21] 张伟峰, 陈平. 镉对水稻幼苗叶片几种元素含量的影响[J]. 农业与技术, 2004, 24(5): 65-67.
ZHANG Wei-feng, CHEN Ping. Effects of cadmium on some element content in leaves of rice seedlings[J]. *Agriculture & Technology*, 2004, 24(5): 65-67.
- [22] Poplawski T, Zadrozny M, Kolacinska A, et al. Polymorphisms of the DNA mismatch repair gene hMSH2 in breast cancer occurrence and progression[J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2005, 94: 199-204.
- [23] M Spaepen, B Vankeirsbilck, S Van Opstal, et al. Germline mutation of the hMLH1 and hMSH2 mismatch repair genes in Belgian hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC) patients[J]. *Familial Cancer*, 2006, 5(5): 179-189.
- [24] Wang Y C, Lu Y P, Tseng R C, et al. Inactivation of HMLH1 and HMSH2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(6): 887-895.
- [25] Kane M F, Loda M, Gaida G M, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines[J]. *Cancer Research*, 1997, 57: 808-811.
- [26] Bearzatto A, Szadkowski M, Macpherson P, et al. Epigenetic regulation of the MGMT and hMSH6 DNA repair genes in cells resistant to methylating agents[J]. *Cancer Research*, 2000, 60: 3262-3270.
- [27] Wada Y, Miyamoto K, Kusano T, et al. Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 271: 658-666.
- [28] Daniel L V, Iris Knoebel, Michael D K, et al. Relationship between brain and ovary aromatase activity and isoform-specific aromatase mRNA expression in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76: 353-368.
- [29] Yonezawa A, Yoshizumi M, Ebilo M, et al. Ejaculatory response induced by a 5-HT2 receptor agonist m-CPP in rats: differential role of 5-HT2 receptor subtypes[J]. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2008, 88: 367-373.
- [30] Besarati Nia A, Van Schooten F J, Schiderman P. A multi-biomarker approach to study the effects of smoking on oxidative DNA damage and repair and antioxidative defense mechanisms[J]. *Carcinogenesis*, 2001, 21: 395-401.