

1,2,4-三氯苯胁迫对大豆下胚轴膜脂过氧化影响

刘 宛, 孙铁珩, 李培军, 周启星, 台培东, 张春桂, 许华夏, 张海荣

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要:以盆栽法研究了不同浓度 1,2,4-三氯苯(TCB)胁迫对大豆下胚轴膜脂过氧化作用的影响。结果表明,100—300 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ TCB 胁迫初期(1—3 d)促使萌发大豆下胚轴内过氧化氢(H_2O_2)的积累显著增加,同时伴随质膜电解质渗漏率和组织自动氧化速率升高,显示发生膜脂质过氧化作用。TCB 胁迫 1—6 d 使活性氧清除酶功能紊乱,其中过氧化物酶(POD)活性升高,过氧化氢酶(CAT)活性开始上升后转为下降。推测大豆下胚轴受 TCB 胁迫伤害过程中,活性氧代谢失衡造成的膜脂质过氧化起着重要作用。

关键词:1,2,4-三氯苯胁迫; 大豆; H_2O_2 ; 膜脂质过氧化; 抗氧化酶

中图分类号:X503.231 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-0267(2002)05-0413-04

Effects of 1, 2, 4 - Trichlorobenzene Stress on Membrane Lipid Peroxidation in Soybean Hypocotyls

LIU Wan, SUN Tie-heng, LI Pei-jun, ZHOU Qi-xing, TAI Pei-dong, ZHANG Chun-gui, XU Hua-xia, ZHANG Hai-rong

(Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

Abstract: Effects of different 1, 2, 4 - trichlorobenzene (TCB) concentrations on membrane lipid peroxidation in soybean hypocotyls were studied with pot culture experiment. The results indicated that during the beginning (1st—3rd day) of 100—300 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ TCB treatments, the accumulation of H_2O_2 , membrane electrolytic leakages and tissue autooxidation rates in soybean hypocotyls all enhanced. During 1—6 d of TCB stress, activities of peroxidase (POD) gradually increased, activities of catalase (CAT) were increased first and decreased afterwards. It may be suggested that injury effects of TCB stress on germinated soybean hypocotyls be achieved by excessive accumulation of active associated with the degradation of the active oxygen scavenging enzyme system.

Keywords: 1, 2, 4 - trichlorobenzene stress; soybean; H_2O_2 ; membrane lipid peroxidation; antioxidant enzymes

氯苯、1,2-二氯苯、1,4-二氯苯和 1,2,4-三氯苯等氯苯类化合物在工业、农业、医药生产中用途很广,但它们亦是重要的环境污染物、国际公认的危险化学品,美国国家环保局已将 25 种氯苯类化合物列入优先控制污染物黑名单^[1]。我国该类化合物污染也非常严重,在沈阳等城市及其周边地区的土壤及地下水中检测浓度均较高^[2],导致农产品中该类化合物的积累,并通过食物链危害人类健康。因此,研究这些污染物对生态系统可能带来的负面影响及其机理具有重要的理论和现实意义。

在逆境胁迫下,生物体内活性氧的代谢平衡被破坏,造成活性氧的过量积累,进而引发或加剧膜脂过氧化作用,使得细胞膜系统的结构和功能变劣,新陈代谢紊乱,这在由 NaCl 、 O_3 、 NO_x 、 SO_2 和重金属等逆境胁迫^[3-12]引起的植物细胞膜伤害过程中已有较多的报道。但在 TCB 胁迫下,植物细胞内活性氧及其抗氧化酶系统的变化情况国内外均未有报道。本文研究了 TCB 对萌发大豆下胚轴膜脂过氧化作用的影响,以探讨 TCB 胁迫对植物的毒性机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设计

大豆(*Glycine max*)品种为沈农 91-44 号。TCB 纯度为 99.5%,购自 Fluka ChemieAG 公司。所用土壤采自中国科学院沈阳生态试验站大豆小区 0—20 cm

收稿日期: 2002-02-07

基金项目:中国科学院知识创新工程项目(KZCX2-401,KZCS2-SW-416);沈阳应用生态研究所重大项目(SCXZD0103)资助

作者简介:刘 宛(1963—),女,博士,副研究员,主要从事污染生态学
研究,E-mail:liuwan63@hotmail.com。

耕层,其有机质含量为 2.21%,全 N 含量 0.12%。用 2 mL 丙酮溶解的下列浓度 TCB 加水 3 mL 摇匀后直接投配至 600 g 土壤中,混匀。大豆种子经 0.1% HgCl_2 表面消毒 5 min,去离子水冲洗干净并用滤纸擦干后,分别播种于 0、100、200、300 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (风干土壤)的塑料杯(口径 9.5 cm,高 10.5 cm)中发芽,以蒸馏水和丙酮为对照。大豆种子萌发试验在避光、22 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。分别取播种后 1、2、3、4、5、6 d 的大豆下胚轴为材料。每一处理重复 3 次,所有试验重复 2 次。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 H_2O_2 含量测定^[13]

1.0 g 鲜重大豆下胚轴用 5 mL 冷丙酮研磨成匀浆,离心($13\,000 \times g$)20 min。反应液中含 0.1 mL 体积比为 20%的 TiCl_4 的浓盐酸,0.2 mL 浓氨水和 1 mL 上清液。生成的过氧化物-Ti 复合物用丙酮洗 5 次,丙酮挥发后溶于 3 mL 硫酸($1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)中,测定 OD(optical density) 410。按同样程序制备 H_2O_2 标准曲线。

1.2.2 POD 活性测定^[14]

取 2.0 g 鲜重大豆下胚轴,加入 5 mL 62.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH7.8)于冰浴上研磨,于 $13\,000 \times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,上清液为酶液。测定方法采用愈创木酚显色法。

1.2.3 CAT 活性测定^[15]

酶液制备同 POD。1 mL 反应液含磷酸缓冲液(pH7.8)50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 H_2O_2 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,加入 2 mL 酶液在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 3 min,立即加入 2 mL 1.8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 终止反应。用 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 滴定剩余的 H_2O_2 ,酶活性单位用 $\text{mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1}\text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示。

1.2.4 组织自动氧化速率测定

按文献[16]的方法。

1.2.5 质膜透性

用 DDS-11 型电导仪测定大豆下胚轴浸提液的电导率占煮沸 10 min 后电导率的百分比表示。

2 结果与讨论

2.1 TCB 胁迫对大豆下胚轴中 H_2O_2 积累、组织自动氧化速率及质膜透性的影响

植物细胞内的 H_2O_2 主要是由 $\text{O}_2 \cdot$ 歧化而形成的。图 1 显示,在萌发开始的 1—4 d 内,对照组大豆下胚轴 H_2O_2 含量逐渐上升,在第 4 d 达到高峰之后略有降低,并基本维持在一个水平上。100—300 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

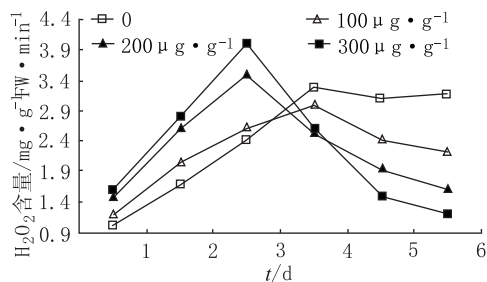


图 1 TCB 胁迫对大豆下胚轴 H_2O_2 含量的影响

Figure 1 Effects of TCB stress on H_2O_2 contents of soybean hypocotyls

TCB 处理 1—3 d, 增加大豆下胚轴 H_2O_2 含量, 且 200 与 300 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ TCB 两个高浓度处理组使 H_2O_2 含量峰值提前至第 3 d, 其最高值分别为对照的 1.4 倍和 1.6 倍, 差异显著 ($P < 0.05$)。 $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot$ 作为一种活性很强的活性氧, 当它积累到一定水平后, 必然会诱发植物膜脂不饱和脂肪酸发生连锁的过氧化反应, 使脂肪酸发生降解, 产生脂质过氧化物^[7]。

由于膜脂质过氧化作用涉及到多种活性氧及酶促和酶促保护系统的复杂平衡关系, 其中某一种酶或某一物质的变化并不能代表机体总的清除活性氧能力的变化。为了表示机体总的清除活性氧的能力, 在逆境研究中采用了组织自动氧化速率的概念, 即将组织在生理 pH 下匀浆, 在生理温度(25 $^{\circ}\text{C}$)暴露于空气中振荡一定时间, 然后测定丙二醛(MDA)的积累速率。一般认为 MDA 积累越多, 组织自动氧化速率越大, 表明机体中总的清除活性氧能力越低, 即组织的保护能力弱。研究表明(图 2), 大豆下胚轴组织自动氧化速率在 TCB 胁迫 1—3 d 内缓慢上升, 说明植株在 TCB 胁迫初期仍维持较强的修复能力; 而 4—6 d 时急剧上升, 而且与 TCB 浓度间分别呈显著正相关关系($r^2 = 0.982—0.991$)。5 d 与 6 d 时 200 与 300 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ TCB 处理组与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)。说明机体总的清除活性氧能力在迅速下降, 进一步证实 TCB 胁迫对植物伤害的重要机制之一是活性氧的过量积累导致膜脂过氧化。

植物细胞质膜的选择透性是植物的重要功能之一, 其大小可反映环境胁迫对植物的伤害程度。图 3 表明, 大豆下胚轴质膜透性随 TCB 浓度增加和胁迫时间延长而上升, 开始时(1—3 d)上升趋势比较平缓; 而 4—6 d 时急剧增加, 200 和 300 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ TCB 处理与对照组差异极明显 ($P < 0.01$)。说明在 TCB 胁迫下, 大豆下胚轴的膜系统受到了严重伤害。

细胞膜是 TCB 胁迫危害的原初反应基地。如果在胁迫条件下, 细胞膜的性质和结构不受危害, 保持

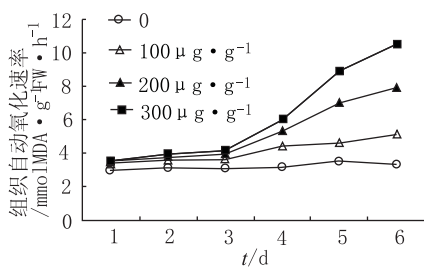


图 2 TCB 胁迫对大豆下胚轴组织自动氧化速率的影响

Figure 2 Effects of TCB stress on tissue autooxidation rate of soybean hypocotyls

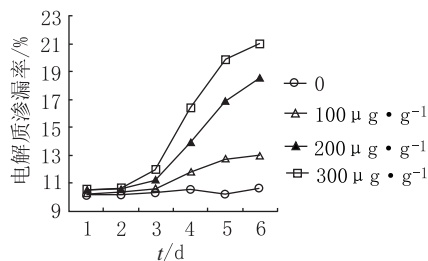


图 3 TCB 胁迫对大豆下胚轴电解质渗漏率的影响

Figure 3 Effects of TCB stress on electrolytic leakage of soybean hypocotyls

其稳定性,即使细胞内部发生变化,其受害程度也是较轻的,并且危害往往是可逆的。如果细胞膜的性质和结构遭到破坏,不仅其局部,甚至整体均要受害,最后导致植株死亡。细胞膜系统有一定的抗性,只有当 TCB 浓度超过它们的伤害阈值时,才表现出细胞膜透性的变化(图 3)。膜透性的增加和生物体内组织自动氧化速率的增加有密切的关系(图 2、图 3),这是因为活性氧很容易使膜脂发生过氧化作用或膜脂脱脂化作用形成 MDA,后者与质膜内的氨基酸、蛋白质、不饱和脂肪酸和硫氢基等生物大分子发生反应,破坏硫氢基,从而阻止新脂类的合成,使膜的一定部位受到损伤,并破坏细胞超微结构(另文发表),这也是 TCB 胁迫 4—6 d 时大豆下胚轴 H_2O_2 含量下降的主要原因之一。

2.2 TCB 胁迫对大豆下胚轴中抗氧化酶活性的影响

过氧化氢酶是植物体内含铁的血红蛋白酶类,与植物代谢强度及抗逆境能力密切相关。从图 4 可知,在正常条件下,大豆种子萌发后第 1—2 d 其下胚轴的 CAT 活性很低,随着生长日龄延长而迅速上升,至第 3 d CAT 活性达到峰值,之后出现平台效应,保持在一个比较稳定的水平上。100 $\mu g \cdot g^{-1}$ TCB 处理 3—6 d 对大豆下胚轴 CAT 活性有促进作用,说明萌发大豆幼苗产生了应激反应;200 和 300 $\mu g \cdot g^{-1}$ TCB 处理短期内(1—2 d)亦有促进作用,但处理 3 d 后即表现

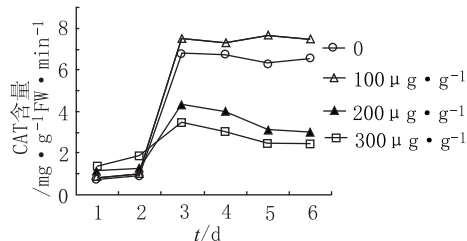


图 4 TCB 胁迫对萌发大豆下胚轴 CAT 活性的影响

Figure 4 Effects of TCB stress on CAT activities of soybean hypocotyl during germination

出明显的抑制作用,与对照组的差异极明显($P < 0.01$)。

CAT 能够清除植物组织中的 H_2O_2 ,阻止 H_2O_2 在体内的积累,限制潜在的活性氧伤害。在本实验中,CAT 活性的下降,势必造成 H_2O_2 的积累,从而导致细胞膜结构的损伤。

POD 是植物呼吸代谢的末端氧化酶之一,可催化有毒物质的氧化分解,是一种对环境因子比较敏感的酶,它和 CAT 不同的是需要另一个底物。研究结果表明(图 5),TCB 处理后 6 d,大豆下胚轴 POD 活性随着处理浓度的增加而升高。相关分析表明,POD 活性与 TCB 处理浓度表现出显著正相关, $r^2 = 0.991$ 。200 和 300 $\mu g \cdot g^{-1}$ TCB 两个处理组大豆下胚轴的 POD 活性为 CK 组的 152% 和 170%,差异极显著($P < 0.01$)。与罗立新等^[7]报道小麦叶片受镉胁迫的 POD 活性增加的变化规律相似。

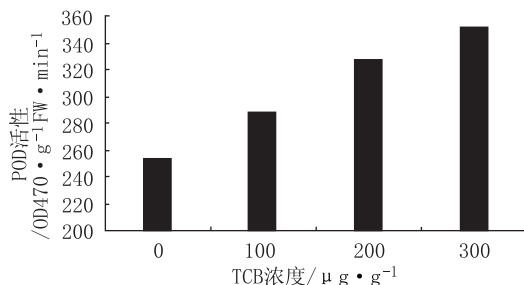


图 5 TCB 胁迫 6 d 对萌发大豆下胚轴 POD 活性的影响

Figure 5 Effects of TCB stress on POD activities of soybean hypocotyl during germination after 6 d treatment

POD 活性的增加是由于 TCB 进入植物体内后,通过一系列代谢反应产生了对自身有害的过氧化物(POD 底物)浓度的增加而诱导。POD 利用 H_2O_2 来催化这些过氧化物的氧化分解,从而消除 H_2O_2 及有害中间产物的毒性效应^[17]。已有研究表明^[17,18],POD 活性与器官老化有关,并且与生长速率呈负相关。环境毒物通过诱导 POD 活性的增加,促进植物细胞壁中的半纤维素、伸展素或果胶质等发生交链,形成木质

素,增加木质化程度,使细胞壁硬化,阻止细胞伸长。这是由于 POD 具有吲哚乙酸(IAA)氧化酶功能,在 TCB 胁迫下 POD 活性的剧烈增加可导致 IAA 含量下降,从而抑制幼苗的生长^[8,11,17]。

3 结论

在正常条件下,萌发大豆下胚轴内活性氧的产生和清除维持动态平衡。TCB 胁迫诱导了 H₂O₂ 的代谢失衡和过量积累,又使 CAT 活性总体水平下降,POD 活性逐渐增加,致使活性氧清除酶系统功能紊乱,不能有效地消除细胞内的活性氧。在 TCB 胁迫下,萌发大豆下胚轴质膜透性及组织自动氧化速率升高,表明机体膜脂质过氧化进程加剧,使植物因膜脂质过氧化而受到严重伤害。

参考文献:

- [1] 甘 平,等. 氯苯类化合物的生物降解[J]. 环境科学, 2001, **22** (3): 93-96.
- [2] 张丽珊,等. 慢速渗滤土地处理系统对沈阳西部城市污水有机污染物净化效果的研究[J]. 应用生态学报, 1992, **3**(4): 355-363.
- [3] Chris B, Marc V H, Dirk I. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. *Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol*, 1992, 43: 83-87.
- [4] John G S. Oxygen stress and superoxide dismutase[J]. *Plant Physiol*, 1993, 101: 7-12.
- [5] Fridovich I. The biology in oxygen radical[J]. *Science*, 1975, 201: 875-880.
- [6] Jita P, Brahma B P. A comparison of biochemical responses to oxidative

and metal stress in seedlings of barley, *Hordeum vulgare* L.[J]. *Environmental Pollution*, 1998, 101: 99-105.

- [7] 罗立新,孙铁珩,靳月华. 镉胁迫下小麦叶中超氧阴离子自由基的积累[J]. 环境科学学报, 1998, **18**(5): 495-499.
- [8] 庞 欣,王东红,彭 安. 汞胁迫对小麦幼苗抗氧化酶活性的影响[J]. 环境化学, 2001, **20**(4): 351-355.
- [9] Winston G W. Physiological basis for free radical formation in cell: Production and defenses. In: Alscher R G, Cumming J G(eds). *Stress Response in Plants: Adaption and acclimation*[M]. Wiley-Liss, New York, 1990. 57-86.
- [10] 金明红,冯宗炜,等. 臭氧对水稻叶片膜脂过氧化和抗氧化系统的影响[J]. 环境科学, 2000, **21**(3): 1-5.
- [11] 朱雪竹,董 斌,谢翼飞. 不同形态铝对小麦抗氧化系统的影响[J]. 环境化学, 2001, **20**(2): 119-123.
- [12] 陈文利,徐朗莱. 盐胁迫下两品种大麦叶片累积及其清除酶活性的变化[J]. 南京农业大学学报, 1999, **22**(2).
- [13] Patterson B D, Mackae E A, et al. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium(IV)[J]. *Anal Biochem*, 1984, 139: 487-492.
- [14] 朱广廉,等. 植物生理实验[M]. 北京:北京大学出版社, 1990. 51-53.
- [15] 孙铁珩,周启星,李培军. 污染生态学[M]. 北京:科学出版社, 2001. 124-126.
- [16] 李伯林,梅慧生. 燕麦叶片衰老和活性氧代谢的关系[J]. 植物生理学报, 1989, **15**(1): 6-12.
- [17] 严重玲,傅舜珍,杨先科,等. 土壤中 Pb、Hg 及其相互作用对烟草叶片抗氧化酶的影响[J]. 环境科学学报, 1997, **17**(4): 469-473.
- [18] Bandurski R S, Nonhebel H M Auxins. In wilkins advanced plant physiology[M]. London: Pitman Press, 1984. 1-16.

(上接第 405 页)

下仍具有较好的除磷效果,将其应用于高浓度含磷废水处理工艺中前景看好。

(3)球形红杆菌在微好氧培养过程中能达到与厌氧-微好氧培养过程相似的除磷效果,从而提示只要废水中存在足够的碳源(本试验中的碳源为苹果酸),即使全部是微好氧过程,球形红杆菌也能有效地摄取磷酸盐而达到较好的除磷效果,从而增加了将该菌应用于实际含磷废水处理工艺的可行性。

参考文献:

- [1] Meganck M, et al. *Wat Sci Tech*, 1985, **17** (11/12): 199.
- [2] 朱章玉,等. 光合细菌的研究及其应用[M]. 上海:上海交通大学

出版社, 1993. 242-250.

- [3] 郑光灿. 污水生物除磷技术的工作机理述评[J]. 环境科学, 1990, **11**(1): 50-55.
- [4] Buchan L. *Wat Sci Tech*, 1983, **15**(3): 87.
- [5] 魏复盛,等. 水和废水监测分析方法[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1989. 280-286.
- [6] Kulaev I S. *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*[M]. New York: Jone wiley & Sons Inc, 1979. 17.
- [7] 周岳溪. 假单胞菌磷代谢特性的研究[J]. 环境科学, 1992, **13**(5): 42.
- [8] Deinema M H, et al. *Wat Sci Tech*, 1985, **17** (11/12): 119.