

## 外源多胺对铜胁迫下苜蓿叶片生物膜的保护作用

王学\*, 徐恒戩

山东理工大学生命科学院, 山东淄博 255049

**摘要:** 研究外源亚精胺和精胺对铜胁迫下苜蓿叶片细胞膜透性、膜脂脂肪酸组成、光合、呼吸、铜积累影响的结果表明, 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  处理导致膜脂脂肪酸组分中饱和脂肪酸组分增加, 不饱和脂肪酸组分及不饱和指数(IUFA)下降, 细胞膜透性加大, 光合速率下降, 呼吸速率迅速上升, 铜在叶细胞中大量积累。外施 0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  亚精胺和精胺可以稳定生物膜的结构和功能, 降低铜在细胞中的累积。

**关键词:** 多胺; 铜; 苜蓿; 生物膜

## Protective Effect of Exogenous Polyamines on Biomembranes of *Nymphoides peltatum* (Gmel) O. Kuntze Leaves under Cu Stress

WANG Xue\*, XU Heng-Jian

College of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255049, China

**Abstract:** The effects of exogenous spermidine (Spd) and spermine (Spm) on the membrane permeability, fatty acid composition, photosynthesis, respiration and copper accumulation in the leaves of *Nymphoides peltatum* under Cu stress were studied. Results showed that 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  copper treatment increased the levels of saturated fatty acids, lowered the levels of unsaturated fatty acids and the index of unsaturated fatty acid (IUFA), enhanced membrane permeability, decreased photosynthesis rate, increased respiratory rate, and accelerated Cu accumulation in the leaves of *N. peltatum*. 0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  exogenous Spd or Spm stabilized the structure and function of biomembranes, and reduced Cu accumulation.

**Key words:** polyamines; copper; *Nymphoides peltatum*; biomembranes

生物膜是细胞或细胞器与其外界环境接触的所有膜的总称。近几十年的研究表明, 生物膜与环境胁迫及其抗逆性有密切关系(Murata 和 Wada 1995)。植物细胞除质膜(细胞膜)外, 还有线粒体、叶绿体等细胞器膜。不同的生物膜具有不同的生理功能。生物膜的组成成分主要是脂质和蛋白质。它们对环境胁迫都十分敏感, 尤其是膜脂。膜脂主要由磷脂组成, 脂肪酸又是磷脂的主要成分。生物膜必须具有一定流动性才能完成生物各种生命活动功能(Sergent 等 2005)。而保证膜的流动性的一个很重要的方面就是防止膜脂脂肪酸氧化。在重金属(Ouariti 等 1997)、高温(Larkindale 和 Huang 2004)、盐(El-shintinawy 2000)等胁迫下, 脂肪酸的不饱和程度急剧下降, 膜的流动性变差, 从而影响各种生物膜的正常生理功能。

多胺(polyamines, PAs)是生物代谢过程中产生的具有生理活性的低分子量脂肪族含氮碱, 广泛分布于高等植物体中, 其中腐胺(putrescine, Put)、亚精胺(spermidine, Spd)和精胺

(spermine, Spm)分布尤为普遍。生理 pH 值下, PAs 常常带有很多正电荷, 它们可以与膜上带负电荷的膜脂及蛋白质结合, 从而保护脂膜防止其受活性氧的袭击。但外施 PAs 能否缓解重金属胁迫下膜脂脂肪酸的氧化, 还未报道(Agazio 等 1988; Gorecka 等 2007), 因此研究外源 PAs 对重金属胁迫下植物细胞膜透性、膜脂脂肪酸组分的影响是有意义的。此外, 重金属积累是造成植物重金属毒害加剧和高营养级的生物体内重金属富集的原因, 如何最大限度地减少植物体内重金属积累, 减轻或避免重金属通过食物链对高营养级的生物乃至人类造成威胁也是人们关注的热点。

### 材料与方法

苜蓿 [*Nymphoides peltatum* (Gmel) O. Kuntze]

收稿 2008-02-25 修定 2008-05-27

资助 国家自然科学基金(30670121)和山东理工大学博士科研启动经费(4041-406027)。

\* E-mail: xue\_wang@163.com; Tel: 0533-2762630

采自苏州太湖无污染的淡水里,用自来水和蒸馏水冲洗干净后,放入加有 1/10Hoagland 培养液的玻璃缸中。选取高度和重量大约相同的植株为实验材料,培养于环境可调的培养箱中,光照周期 12 h/12 h,光暗温度 25 /18 ,光照强度 115  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。2 周后,植物材料转入已加有 1 L 培养液的烧杯中。实验处理有:(1)对照植物培养于 1/10Hoagland 培养液中(含有 32 nmol Cu),叶面喷施蒸馏水;(2) Cu 处理的植物培养于加有 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  的 1/10Hoagland 培养液中,叶面喷施蒸馏水;(3) Cu+Spd 处理的植物培养于加有 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  的 1/10Hoagland 培养液中,叶面喷施 0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Spd;(4) Cu+Spm 处理的植物培养于加有 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  的 1/10Hoagland 培养液中,叶面喷施 0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Spm。每天于 7:00 和 19:00,向植物叶片上喷施蒸馏水、0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Spd 和 0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Spm 2 次。喷施溶液内加入 Tween-80 作为粘附剂。喷施的浓度是根据预备实验结果确定的。每 2 d 更换一次培养液,处理 4 d 后,选取充分展开 10 d 的叶片进行各项生理指标测定。

膜脂的提取按 Amenta (1970)的方法。类囊体膜的制备根据 Dunahay 等(1984)介绍的方法。脂肪酸的提取参照刁丰秋等(1997)文中的方法。将准备好的膜脂或类囊体膜悬浮液置于玻璃管中,用 1890 气相色谱仪和 3295 积分仪(均为惠普上海分析仪器有限公司产品)分析脂肪酸,用外标法确定保留时间,结果用归一法求得。膜透性测定参照谢田和徐中际(1986)的紫外吸收法。叶绿素含量参照 Arnon (1949)的方法测定。铜含量用电感耦

合等离子体发射光谱法(ICP-MS)测定。采用薄膜氧电极和自动记录装置,参照李德耀等(1982)和 Gao等(1988)文中的方法测定叶片的光合速率和呼吸速率,以碎叶片放氧和吸氧的速率表示。

实验重复 3 次,结果用平均值  $\pm$  标准误差表示,重量皆为鲜重,用 *t* 检验法对组间数据进行差异显著性分析。

## 结果与讨论

### 1 外源 PAs 对铜胁迫下苜蓿叶片膜脂脂肪酸组分的影响

从图 1 可知,受 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  胁迫的苜蓿叶膜脂脂肪酸组分发生明显变化,其中饱和脂肪酸 16:0 和 18:0 分别提高 18.5% 和 47.1%,不饱和脂肪酸 18:1 和 18:3 分别下降 15.8% 和 20.8%,而 16:1 和 18:2 几乎没有变化,从总体上看,由于饱和脂肪酸组分增加,不饱和脂肪酸组分下降,以致脂肪酸不饱和指数(IUFA)显著降低(图 2);而外施 Spd 和 Spm 可以降低 16:0 和 18:0 的含量,延缓 18:1 和 18:3 的下降速度,因而铜胁迫下苜蓿叶片膜脂的 IUFA 提高(图 2)。

### 2 外源 PAs 对铜胁迫下苜蓿叶片类囊体膜脂肪酸组分的影响

从图 3 可见,外源 PAs 对铜胁迫下苜蓿叶片类囊体膜脂肪酸组分的影响比对叶片总膜脂脂肪酸组分的影响显著得多。受 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  胁迫的苜蓿叶片类囊体膜的饱和脂肪酸 16:0 和 18:0 分别提高 82.2% 和 189.5%,不饱和脂肪酸 18:1、18:2 和 18:3 分别降低 43.5%、18.5% 和 25.6%,但对 16:1 的影响不显著。由于不饱和脂肪酸的降低和

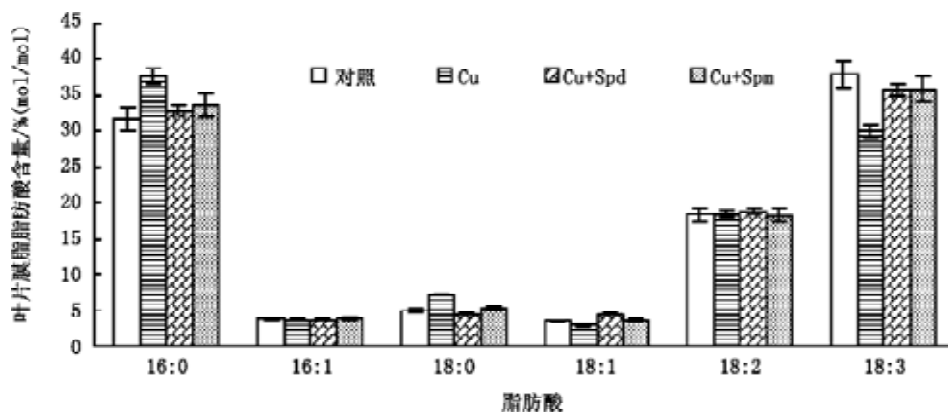


图 1 外源 PAs 对铜胁迫下的苜蓿叶片膜脂脂肪酸组分的影响

Fig.1 Effects of exogenous PAs on the fatty acid composition in the membrane of *N. peltatum* leaves under Cu stress

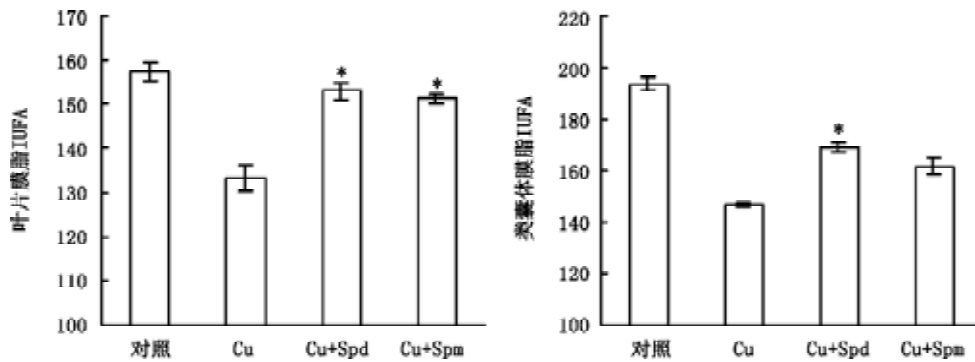


图2 外源PAs对铜胁迫下的苜蓿叶片及类囊体膜IUFA的影响

Fig.2 Effects of exogenous PAs on the IUFA in leaves and thylakoid membrane of *N. peltatum* under Cu stress

\*表示与铜处理组的显著性差异( $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; Student's *t*-test), 下同。IUFA = {[16:1 mol%×1]+[18:1 mol%×1]+[18:2 mol%×2]+[18:3 mol%×3]}×100%。

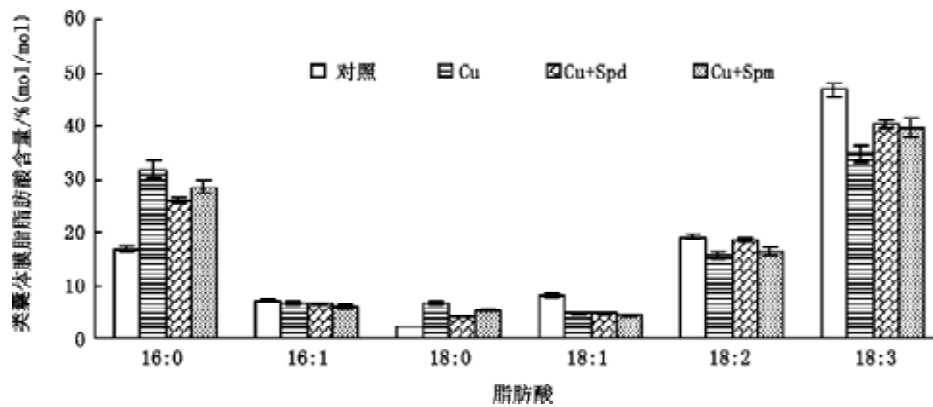


图3 外源PAs对铜胁迫下的苜蓿叶类囊体膜脂脂肪酸组分的影响

Fig.3 Effects of exogenous PAs on the fatty acid composition in the thylakoid membrane of *N. peltatum* leaves under Cu stress

饱和脂肪酸的升高, IUFA 显著下降(图2); 外施 Spd 和 Spm 均可逆转铜对上述脂肪酸的影响, 提高 IUFA (图2)。

### 3 外源 PAs 对铜胁迫下苜蓿叶片膜透性和铜积累的影响

重金属对植物伤害的生理机制之一是破坏其膜系统的完整性, 降低其对外界物质的选择透过性。由图4可见,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  处理 4 d 后, 苜蓿叶片的膜透性极显著提高( $P < 0.01$ ), 比未经铜处理的提高 204.6%。外施 Spd 和 Spm 均可有效地阻止膜透性的提高, 铜胁迫下经 Spd 和 Spm 处理的苜蓿叶的膜透性分别下降 34.3% ( $P < 0.01$ ) 和 25.7% ( $P < 0.01$ )。由此可见, Spd 和 Spm 都可有效地保护铜胁迫下的植物细胞膜系统。Spd 和 Spm 保护细胞膜系统可能是通过提高铜胁迫下苜蓿叶片膜脂的 IUFA (图2), 阻止生物膜由液晶态

向凝胶态转变, 防止其脆性变大, 透性提高。此外, 膜脂过氧化也是膜透性提高的一个重要原因, 我们以前的研究(Wang 等 2007)发现铜胁迫导致了苜蓿叶内大量活性氧产生, 从而使得膜脂的过氧化程度提高, MDA 大量积累, 膜的损伤程度加大。而外施 Spd 和 Spm 可以抑制活性氧的产生, 保护质膜, 从而有效地阻止膜透性的提高。

膜透性的改变必然会影响到重金属胁迫下的植物体内毒性元素的积累。从图4可以看出, 随着膜透性的增加铜在苜蓿体内急剧积累。未经铜处理的苜蓿叶中铜的含量仅为  $0.72 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 经铜处理 4 d 后, 苜蓿叶中的铜含量上升至  $129.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 比未经铜处理的提高 177.8 倍( $P < 0.01$ )。外施 Spd 和 Spm 后苜蓿叶中的铜含量分别降至 60.7 和  $108.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 与单一铜处理的植物相比分别降低 46.9% ( $P < 0.05$ ) 和 16.3% ( $P < 0.05$ ), 其中外源 Spd 的效

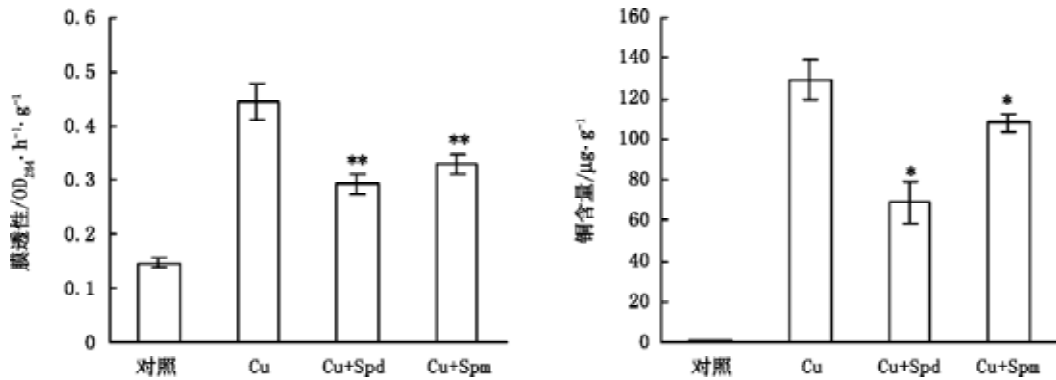


图4 外源 PAs 对铜胁迫下的苜蓿叶片膜透性和铜积累的影响

Fig.4 Effects of exogenous PAs on cell membrane permeability and copper accumulation in *N. peltatum* leaves under Cu stress

果要优于外源 Spm。

#### 4 外源 PAs 对铜胁迫下苜蓿叶片叶绿素含量的影响

Patsikka 等(2002)的研究指出,在评价不同胁迫条件的效应时必须将叶绿素含量变化考虑在内。本文中,铜胁迫下叶绿素的含量也显著降低。由图5可见,50  $\mu mol \cdot L^{-1}$  铜处理4 d的苜蓿叶内的叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素含量分别下降48.5% ( $P < 0.01$ )、56.3% ( $P < 0.01$ )和51.1% ( $P < 0.01$ ),三者均达到极显著水平。外施 Spd 和 Spm 均可有效缓解铜胁迫下叶绿素含量下降。其中外施 Spd 的叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量分别提高57.6% ( $P < 0.05$ )、59.4% ( $P < 0.01$ )和58.1% ( $P < 0.01$ ),外源 Spm 的缓解作用略小于外源 Spd,外施 Spm 能分别提高44.4% ( $P < 0.05$ )、46.6% ( $P < 0.05$ )和45.1% ( $P < 0.05$ )。

#### 5 外源 PAs 对铜胁迫下苜蓿叶片光合速率和呼吸速率的影响

从图6可见,50  $\mu mol \cdot L^{-1}$   $CuSO_4$  处理4 d的

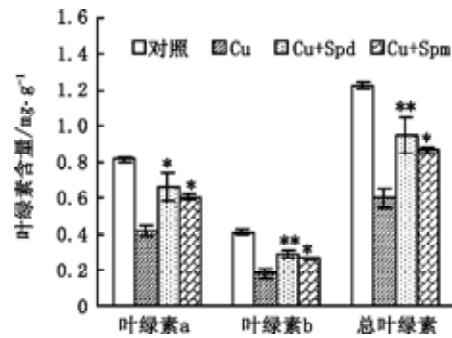


图5 外源 PAs 对铜胁迫下的苜蓿叶片叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量的影响

Fig.5 Effects of exogenous PAs on chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll contents in *N. peltatum* leaves under Cu stress

苜蓿叶光合速率下降,呼吸速率极显著上升,外施 Spd 和 Spm 均可显著提高铜胁迫下苜蓿叶的光合速率,抑制其呼吸速率的上升。

外施 Spd 和 Spm 抑制铜胁迫下苜蓿叶光合速

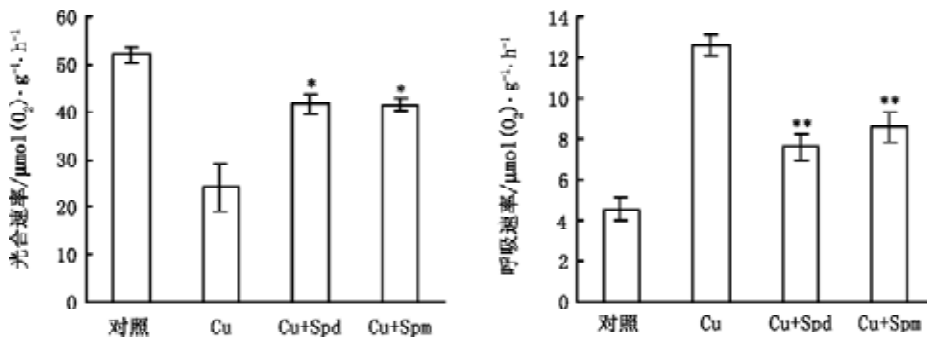


图6 外源 PAs 对铜胁迫下的苜蓿叶片光合速率和呼吸速率的影响

Fig.6 Effects of exogenous PAs on photosynthesis rate and respiratory rate in *N. peltatum* leaves under Cu stress

率下降的原因可能是:(1)提高铜胁迫下苜蓿叶中类囊体膜的IUFA(图2),阻止其光合速率下降。类囊体膜是叶绿体内进行光合作用的膜,其中膜脂是光合膜的基本骨架。完整的类囊体膜的双分子层内部的疏水区与膜蛋白互相作用,从而可以保证色素顺利吸收光能并能引起光合电子的产生和传递以及光合磷酸化的正常进行。铜胁迫下类囊体膜IUFA下降后,膜的流动性降低,从而会影响光能的正常吸收和转换。(2)防止作为光合色素成员的叶绿素含量的减少(图5)。

此外,外施Spd和Spm还可以通过抑制铜胁迫下苜蓿叶IUFA的下降,防止生物膜的流动性变差、透性提高、细胞内酶与底物接触,从而抑制铜胁迫诱导的呼吸速率的提高。

总之,外源PAs通过抑制生物膜IUFA的下降,可有效保护各种生物膜的生理功能,防止细胞膜选择透过性和类囊体膜光合作用能力的减弱,进而阻止铜在苜蓿叶内的过度积累、光合速率的下降和呼吸速率的上升,最终有效缓解苜蓿的铜毒害。

### 参考文献

- 刁丰秋,章文华,刘友良(1997).盐胁迫对大麦叶片类囊体膜组成和功能的影响.植物生理学报,23(2):105~110
- 李德耀,邱国雄,沈允钢(1982).氧电极法测叶片光合作用技术探讨.植物生理学通讯,(5):23~25
- 谢田,徐中际(1986).测定细胞膜透性的紫外吸收法.植物生理学通讯,(1):45~46
- Agazio MD, Giardina MC, Grego S (1988). Effect of exogenous putrescine, spermidine, and spermine on  $K^+$  uptake and  $H^+$  extrusion through plasmamembrane in maize root segments. *Plant Physiol*, 87: 176~178
- Amenta JS (1970). A rapid extraction and quantification of total lipids and lipid fractions in blood and feces. *Clin Chem*, 16: 339~346
- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24: 1~15
- Dunahay TG, Staehelin LA, Seibert M, Ogilvie PD, Berg SP (1984). Structural, biochemical, and biophysical characterization of four oxygen-evolving photosystem II preparations from spinach. *Biochim Biophys Acta*, 764: 179~193
- El-shintinawy F (2000). Photosynthesis in two wheat cultivars differing in salt susceptibility. *Photosynthetica*, 38 (4): 615~620
- Gao SJ, Chen SS, Li MQ (1988). Rapid post-illumination oxygen consumption and its relation to photorespiration. *Acta Phytophysiol Sin*, 14 (4): 313~317
- Gorecka K, Cvikrova M, Kowalska U, Eder J, Szafranska K, Gorecki R, Janas KM (2007). The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in anther culture of carrot. *Plant Physiol Biochem*, 45: 54~61
- Larkindale J, Huang B (2004). Changes of lipid composition and saturation level in leaves and roots for heat-stressed and heat-acclimated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environ Exp Bot*, 51: 57~67
- Murata N, Wada H (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem J*, 308: 1~8
- Ouariti O, Boussama N, Zarrouk M, Cherif A, Ghorbal MH (1997). Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry*, 45 (7): 1343~1350
- Patsikka E, Kairavuo M, Sersen F, Aro E-M, Tyystjarvi E (2002). Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition *in vivo* by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiol*, 129: 1359~1367
- Sergent O, Pereira M, Belhomme C, Chevanne M, Huc L, Lagadic-Gossman D (2005). Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 313: 104~111
- Wang X, Shi GX, Xu QS, Hu JZ (2007). Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum*. *J Plant Physiol*, 164: 1062~1070