中 国 科 学
1992年4月 B 辑 第4期

渗透胁迫引起的膜损伤与膜脂过氧化和某些自由基的关系

王邦锡 孙 莉 黄久常
(兰州大学植物生理研究室，兰州 730000)

摘 要

本文用不同渗透势的PEG溶液漂浮处理黄瓜叶圆片引起水分胁迫，可使膜的透性增加，膜脂过氧化产物之一的MDA生成减少，POX活性下降，但对SOD和CAT活性无明显影响. 用DDC和AT分别抑制SOD和CAT，用甘露醇清涂 OH 等方法来验证膜的损伤是否是由于 $O_2^{\cdot-}$，H_2O_2 和 OH 引发了脂类过氧化所致. 结果表明黄瓜叶片的膜受到损伤与脂过氧化之间并无相关性，因而不能把水分胁迫引起植物膜的损伤完全归因于自由基的损害.

关键词：渗透胁迫 膜损伤，脂过氧化，自由基，超氧物歧化酶

水分胁迫引起植物膜受损伤的现象已被许多学者证实，但损伤的机理至今尚不完全清楚. 近年来，一些学者的研究认为膜脂过氧化是造成膜受损伤的关键因素[1－11]，而膜脂过氧化则又是由活性氧($O_2^{\cdot-}$，H_2O_2，OH 和 O_2)等自由基物质所引发，从而降低了膜的流动性、柔性和分子的破坏. 但由于植物体内存在许多保护酶类，例如SOD，CAT，POX，GR和AR以及其他还原性物质，它们都可以清除活性氧从而降低膜脂过氧化[2,3 6,9－13]. 本文的目的在于探讨这些保护酶体系中的某些酶的有效性和对水分胁迫造成植物膜损伤与膜脂过氧化间的相互关系.

一、材 料 和 方 法

1. 材料

试验用黄瓜(*Cucumis sativus* L. cv. Anningcigua)幼苗叶片为材料，种子用流水冲洗后种于盛煮沸洗净的锯末瓷盘中，在日温22°C、夜温7°C、光照940 J · dm^2 · h^{-1} · 16h、暗期8h的培养室中生长，定时补充失水及Hoagland营养液，当第二片真叶长出后取第一片真叶为材料. 用0.8cm直径的打孔器钻取叶圆片，每10片为1组，共做6种处理，将叶圆片称重后，近轴面向上分置于盛有10 ml蒸馏水、－0.2、－1.0、－2.0、－3.0和－4.0MPa PEG

本文1990年12月11日收到，1991年9月20日收到修改稿.

本文缩写：SOD——超氧物歧化酶，CAT——过氧化氢酶，POX——过氧化物酶，AT——氨基三唑，DDC——二乙基二硫代氨基甲酸钠，PEG——聚乙二醇，MDA——丙二醛，GR——谷胱甘肽还原酶，AR——抗坏血酸还原酶.

溶液的直径为5.5 cm 的培养皿中,加盖放在 25°C、光照 940 J · dm^{-2} · h^{-1} 的植物生长箱中处理 12 h 进行各项测定.

2. 方法

用 FM-4 型冰点渗透压计测定 PEG(6000)溶液的渗透势. 烘干法测定叶圆片的含水量. 同时测定蛋白质含量[14]、膜的相对渗透率[1]、丙二醛含量和 SOD 活性[15]、CAT 活性[16] 和 POX 活性[17]. 并用 DDC,AT 和甘露醇分别抑制 SOD, CAT 的活性和清除 OH,观察脂过氧化产物 MDA 的含量与膜的相对透性变化.

以上试验每次平行做 3 份样品,各重复 3 次以上计算所得结果.

试验所用试剂 PEG 为日本进口天津化学试剂批发部分装. DDC 为分析纯试剂,AT 和甘露醇分别为 Sigma 和 B.D.H 公司产品.

二、试 验 结 果

1. 水分胁迫对叶圆片相对含水量的影响

叶圆片的相对含水量随 PEG 处理溶液渗透势下降递减,经 12 h 处理后各处理分别为对照的99.0%,97.3%,92.6%,86.1% 和84.2% (图1). 由此可见叶圆片分别受到了不同程度的水分胁迫.

2. 水分胁迫对膜的相对透性和 MDA 含量的影响

膜的相对透性在水分胁迫强度递增下显著增加,由对照的 5.5% 上升到−4.0MPa 处理的 62.8%. 与此同时脂类的过氧化产物 MDA 的含量随胁迫加深明显减少(图 2). 说明膜遭受损伤与脂过氧化产物 MDA 的含量变化并无正相关关系.

试验由于是在溶液中进行漂浮处理,MDA 是否会外渗进入溶液中影响叶圆片

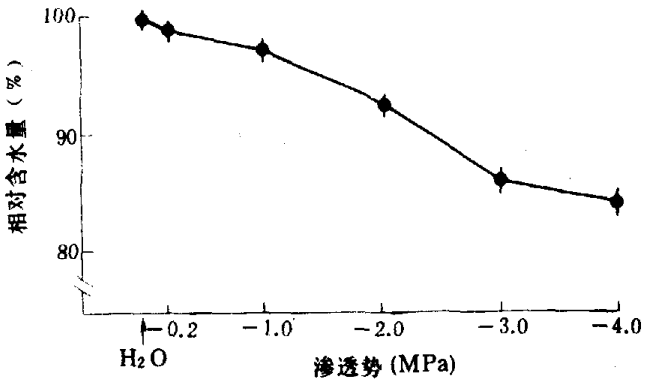


图 1　黄瓜叶片的相对含水量和溶液渗透势的关系

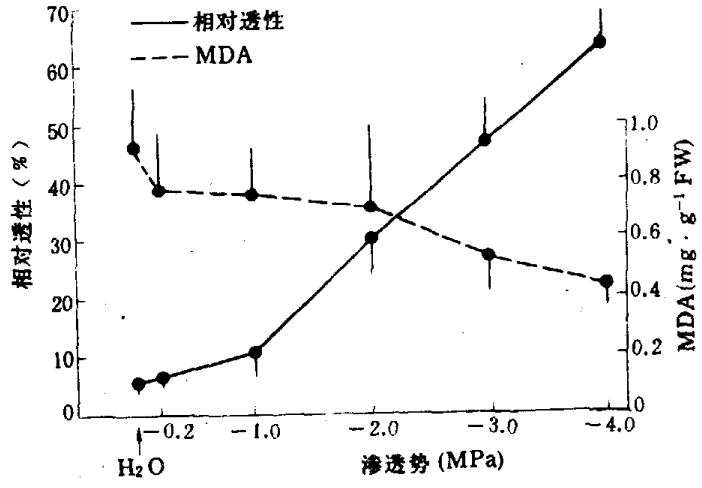


图 2　水分胁迫对MDA 和膜相对透性的影响

内的含量,为此取漂浮液测定 MDA 的含量,未见到有明显的MDA存在. 另外还用−2.0MPa PEG 溶液做了6,12 和 24 h 处理试验,叶圆片内的MDA含量亦随时间延长分别比对照降低了2.3%,26.1% 和 50.2%. 漂浮液中同样未见到有明显的 MDA 含量出现.

3. 水分胁迫对抗氧化酶类的影响

SOD,CAT 和 POX 均是细胞内清除活性氧的重要保护性酶类. 图 3 的结果表明: 水分胁迫对 SOD 和 CAT 的活性没有显著影响,只有 POX 的活性出现明显下降,与对照相比 −4.0MPa

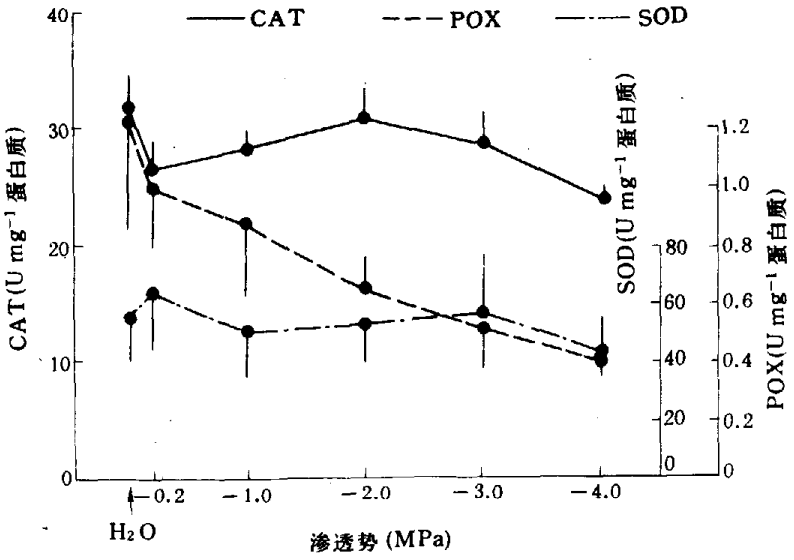


图 3 水分胁迫对CAT, POX 和 SOD 活性的影响

处理活性下降了 66.7 %.

4. DDC 对 SOD, MDA 和膜相对透性的影响

DDC 是 SOD 的专一性抑制[18, 19]. 而 SOD 是防止膜脂过氧化清除 O_2^- 自由基的重要保护酶之一. 如果膜损伤是由水分胁迫引发 O_2^- 产生导致的, 那么 SOD 受抑便会引起 O_2^- 增多, 加剧对膜的损伤并使 MDA 的含量增多. 本文用 1mmol/L DDC 处理 12 h 的结果表明: 各处理的 SOD 活性比未加 DDC 的下降 50% 左右(图 4), 但是 MDA 的含量并未因 SOD 受抑增多, 反而相应地减少了 10 — 50%, 膜的透性只约有增高(图 5). 这些结果说明水分胁迫引起的膜损伤与膜脂过氧化并无相关关系存在, 也与 O_2^- 无紧密关系.

5. AT 对 CAT, MDA 和膜相对透性的影响

AT 是 CAT 的抑制剂[20], CAT 能清除 H_2O_2, H_2O_2 是活性氧中的分子而不是自由基, 因此它的寿命很长, 能有效地引发脂类过氧化, 据此认为 CAT 受抑后 H_2O_2 会发生累积, 通过脂过

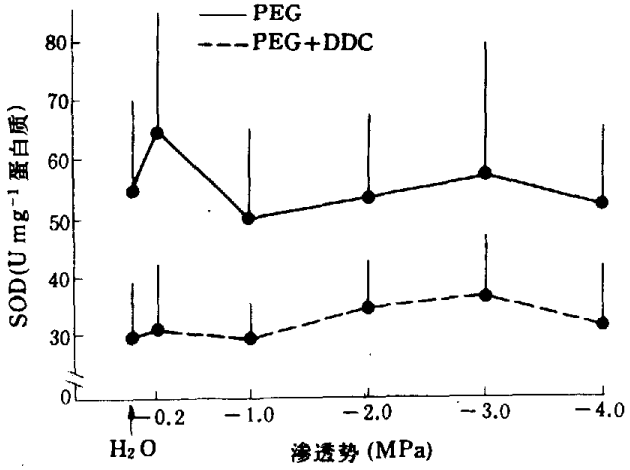


图 4 DDC 对 SOD 活性的影响

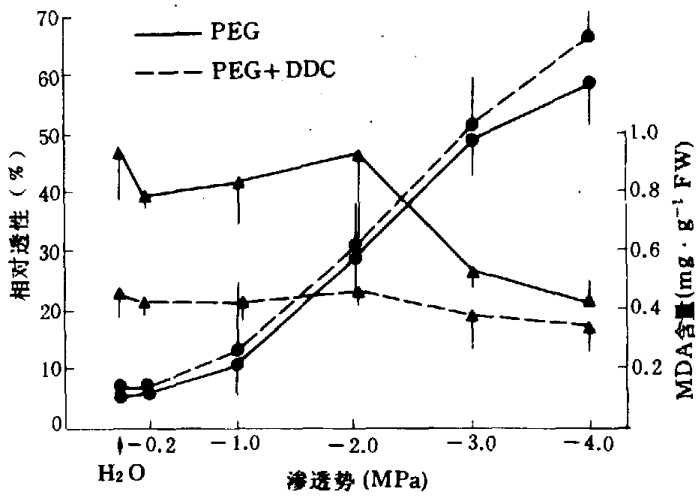


图 5 DDC 对膜透性(•)和 MDA 含量(▲)的影响

氧化导致膜损伤. 本文用 2 m mol/L AT 处理叶圆片 12 h, CAT 的活性比未经 AT 处理的下降了 63 — 88%(图 6), 但未明显改变 MDA 的生成量和膜的相对透性(图 7). 虽然如此, 我们还不能完全肯定 CAT 受抑后必然会使 H_2O_2 累积增多, 因为除 CAT 外 POX 同样可以清除 H_2O_2. 所以我们又测定了 AT 对 POX 的影响. 在上述相同处理条件下 POX 的活性也由对照的 0.513 mg^{-1} 蛋白 min^{-1} 下降到 0.391 mg^{-1} 蛋白 min^{-1}. 这个结果也有力地证明水分胁迫引起的黄瓜叶圆片膜损伤可能不是由于 H_2O_2 引发脂过氧化产生的.

6. 甘露醇对 MDA 和膜的相对透性的影响

甘露醇是 ·OH 良好的清除剂[21]. 本文用 10 mmol/L 甘露醇处理叶圆片 12 h, 不仅未见到 MDA 的含量增加,反而稍有下降,与此同时也未见到膜的透性发生显著改变(图 8). 从而说明水

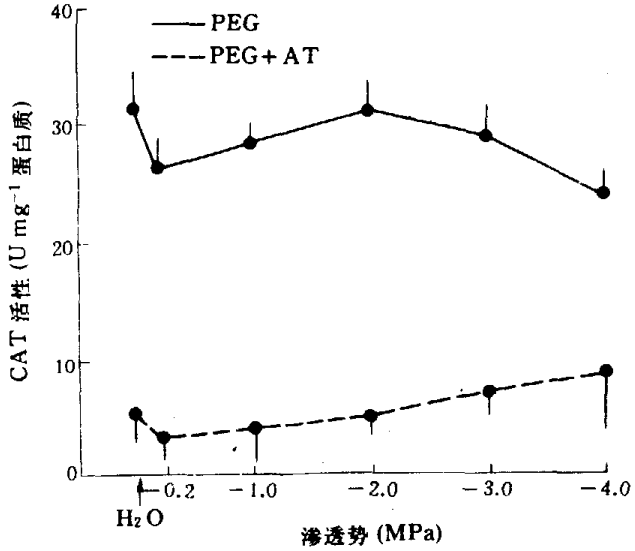


图6　AT 对 CAT 活性的影响

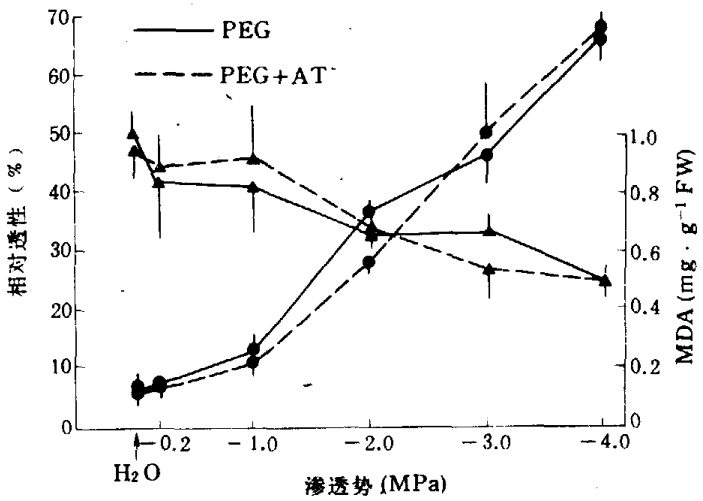


图7　AT 对膜透性(•)和 MDA 含量(▲)的影响

分胁迫引起膜损伤在黄瓜叶中可能不是由于 ·OH 引发脂过氧化所致.

三、讨　论

综上所述,水分胁迫对黄瓜叶圆片可引起膜的相对透性增加、MDA 的生成减少和 POX 活性下降,但对 SOD 和 CAT 的活性未见明显影响. 因此表明把水分胁迫对膜造成的伤害归因于干旱诱发 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 和 ·OH 的产生从而导致膜脂过氧化的证据尚不充分.

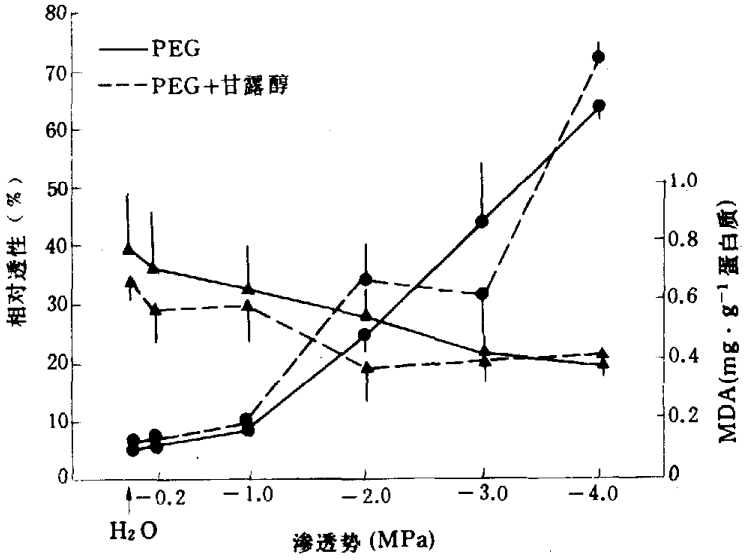


图8　甘露醇对膜相对透性(•)和 MDA 含量(▲)的影响

关于 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 和 ·OH 的产生, Nakano 等[13] 和 Malan 等[11] 认为它们是在植物绿色器官中由 O_2 接受电子后依次还原形成的. 他们还描述了清除活性氧的有关酶类及作为还原剂的有关化合物. 但 Kenyan 等[12] 用 Acifluorfen 处理黄瓜子叶的结果指出: 在脂过氧化中内源抗氧剂抗坏血酸和谷胱甘肽含量降低,同时也看到了 SOD, POX 和 CAT 等的活性下降现象. Malan 等[11] 在试验中证明耐受型与敏感型玉米在受到百草枯、SO_2 和干旱胁迫时,它们表现出交叉耐受性和敏感性差异,这可能与体内的保护酶体系及抗氧化剂存在差异有关.

本文在黄瓜叶片上试验的结果表明:水分胁迫对膜造成的损伤可能因植物种类不同在机理上与其他植物存在差异,或膜的损伤可能由多种原因引起,这与前述一些学者在其他植物上采用 PEG

进行根际胁迫的结果不同. 本室在用小麦幼苗所作的根际与溶液漂浮胁迫试验中,同样获得了叶片内 MDA 含量和膜的相对透性升高的结果,用蚕豆幼苗叶圆片作 PEG 溶液漂浮胁迫处理也呈现出 MDA 含量升高(未发表资料). 因此我们认为水分胁迫对不同植物造成膜的损伤,不宜完全归因于自由基引起膜脂过氧化来解释,对此还可能存在其他机理有待进一步研究.

参 考 文 献

[1] 李锦树等, 植物生理学报, **9**(1983), 3:223—229.

[2] 武宝玕、格林·托德, 植物学报, **27**(1985), 2:152—160.

[3] 王宝山、赵思齐, 山东师范大学学报, **2**(1987), 1:29—37.

[4] 尹出夫等, 植物生理学通讯, 1989, 4:16—18.

[5] Mukherjee, S. P. & Choudhuri, M. A., *Physiol. Plant.*, **58**(1983), 3:166—170.

[6] Gamble, P. E. & Durke, J. J., *Plant Physiol.*, **76**(1984), 3:615—621.

[7] Burke, J. J. et al., *ibid.*, **79**(1985), 2:415—419.

[8] Dhindsa, S. R. & Dhindsa, R. S., *J. Exp. Bot.*, **36**(1985), 167:980—988.

[9] Schmidt, A. & Kunert, K. J., *Plant Physiol.*, **82**(1986), 3:700—702.

[10] Navari-Izzo, F. et al., *J. Exp. Bot.*, **40**(1989), 215:675—680.

[11] Malan, C. et al., *Plant Sci.*, **69**(1990), 2:157—166.

[12] Kenyan, W. H. & Duke, S., *Plant Physiol*, **79**(1985), 3:862—866.

[13] Nakano, Y. & Asada, K., *Plant and Cell Physiol.*, **22**(1981), 5:867—880.

[14] Lowry, O. H. et al., *J. B. Chem.*, **193**(1951), 1:265—275.

[15] Dhindsa, R. S. et al., *J. Exp. Bot.*, **32**(1981), 126:93—101.

[16] Chance, B. & Maehly, A. C., *Methods in Enzymol*, 1955, 11:764—755.

[17] Wittenbach, V. A. & Bucobac, M. J., *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **100**(1975), 4:387—398.

[18] 郑荣梁、莱斯科, S. A., 曹安邦, 生物化学与生物物理学报, **16**(1984), 6:558—563.

[19] Keikkila, R. E., in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (Ed. Greenwald, R. A.), CRC Press Boca Raton Florida, 1985, 387—390.

[20] Margoliash, E. et al., Biochem. J. **74**(1960), 2:339—348.

[21] Weitzman, S. A. & Stossel, T. P., *J. Immunol.*, **128**(1982), 6:2770—2772.