

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897-20141030001

张明轩, 李颖邦, 刘爱云, 等. Cd<sup>2+</sup> 对 BY-2 细胞的毒性机制及水杨酸的缓解作用[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(3): 224-229

Zhang M X, Li Y B, Liu A Y, et al. Cadmium toxicology to cultured BY-2 Cells and the relief effects of salicylic acid to the cadmium toxicity [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(3): 224-229 (in Chinese)

## Cd<sup>2+</sup> 对 BY-2 细胞的毒性机制及水杨酸的缓解作用

张明轩, 李颖邦, 刘爱云, 张学文\*

湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128

收稿日期: 2014-10-30 录用日期: 2014-11-27

**摘要:** 镉对生态环境的危害表现出对植物这种定生生物的毒害性。以绿色荧光蛋白(GFP)膜泡标记的烟草 BY-2 细胞为实验材料, 分别在荧光显微镜和激光共聚焦显微镜下观察了 Cd<sup>2+</sup> 对植物细胞的毒害作用和机制, 并研究了水杨酸(SA)处理对 Cd<sup>2+</sup> 植物细胞毒害的缓解作用。研究发现激光共聚焦显微镜可以观察到 Cd<sup>2+</sup> 处理 3 h 后细胞荧光亮度减弱, 6 h 时细胞皱缩和液泡缩小, 9 h 细胞大多死亡。在 Cd<sup>2+</sup> 胁迫同时加入 SA, 可显著提高细胞成活时间, 荧光亮度增强、液泡化程度加大, 同时能够观察到荧光标记的细胞膜包裹 Cd<sup>2+</sup> 的高荧光颗粒。SA 处理的细胞还通过高度液泡化来缓解重金属 Cd<sup>2+</sup> 的毒性。结果表明具有生物活性的 SA 诱导细胞的液泡化, 并通过膜成分对重金属的包裹和结合进一步降低了重金属对植物细胞的毒害。因此水杨酸缓解重金属对植物细胞的毒性, 是通过诱导细胞的液泡化和膜对重金属离子的包裹束缚而实现的。

**关键词:** 镉; 水杨酸; 荧光标记 BY-2 细胞; 联合作用

文章编号: 1673-5897(2015)3-224-06 中图分类号: Q247 文献标识码: A

## Cadmium Toxicology to Cultured BY-2 Cells and the Relief Effects of Salicylic Acid to the Cadmium Toxicity

Zhang Mingxuan, Li Yingbang, Liu Aiyun, Zhang Xuewen\*

College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Received 30 October 2014 accepted 27 November 2014

**Abstract:** The toxicity to immobilized plants is one of the most harmful effects of heavy metal cadmium to the ecological environment. In this paper the toxicity and mechanism of Cd<sup>2+</sup> to plants cells were analyzed by fluorescence microscope and confocal laser scanning microscope observation in GFP membrane labeled BY-2 cell. The relief effects of salicylic acid (SA) treatment to the Cd<sup>2+</sup> toxicity were also investigated. The results showed that the GFP fluorescence of the labeled cells was getting dimming after 3 h Cd<sup>2+</sup> treatment. The cells and vacuoles were apparently shrunk after 6 h. All the cells were dead after 9 h treatment. When SA was also added during the Cd<sup>2+</sup> treatment, the survival time of the treated cells were prolonged significantly. The SA and Cd<sup>2+</sup> treated cells also showed stronger fluorescence and better vacuolization compared to the Cd<sup>2+</sup> treatment. High fluorescence particles attached to the cell membrane were observed, indicating that there were wrapped Cd<sup>2+</sup> microcapsules formed in SA treatment cells. The results suggest that the SA treatment can relieve the toxicity of heavy metals both by high vac-

基金项目: 湖南省教育厅一般项目(12C0156)

作者简介: 张明轩 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子细胞生物学, E-mail: 18684851879@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: xwzhang@hunau.edu.cn

uolization in the cells and by membrane components retention of the heavy metals ion. The conclusion is that the microcapsule retention and vacuolization of the cells induced by SA is the mechanism of the SA toxicity relief.

**Keywords:** cadmium; salicylic acid; GFP membrane labeled BY-2 cell; combined effect

随着工农业的持续发展,工业污水和废渣继续排放,化肥的大量使用,造成我国土壤和水源的重金属污染加剧<sup>[1]</sup>。过量的重金属会对植物有毒害作用,并且通过食物链和生物富集作用,最终会危害到人体健康,带来一系列的社会问题<sup>[2-3]</sup>。重金属污染问题已经日益受到人们的重视,植物对重金属胁迫抵御机制的研究也在日益深入。重金属在植物体内会不断累积,当累积超过一定的阈值之后,会对植物细胞结构造成不可逆转的损伤,并最终影响到植株体的正常生理活动<sup>[4]</sup>。为应对重金属胁迫带来的损伤,植物进化出独特的防御机制,如通过提升一些保护酶的活性、激素含量水平的变化等措施来降低受到的伤害<sup>[5]</sup>。水杨酸(salicylic acid, SA)是一种酚类化合物,普遍存在于植物体内,其化学名称为邻羟基苯甲酸<sup>[6]</sup>。由于 SA 存在增强植物在热胁迫、盐害、低温、干旱、等非生物胁迫条件下清除活性氧的能力,降低细胞受到的氧化损伤<sup>[7]</sup>。SA 被认为是研究植物抵御胁迫的信号分子,因此研究水杨酸对 Cd<sup>2+</sup> 胁迫下细胞的影响,可以从细胞水平上揭示水杨酸对植物细胞抗重金属胁迫的机制,对其应用于植物防御重金属毒性有着重要意义。结构是功能的基础,植物受重金属胁迫后,在其细胞结构上的改变是植物一系列生理活动异常的细胞学基础。为了开展这项研究,我们利用烟草膜泡运输特征蛋白 SCAMP2<sup>[8]</sup>与绿色荧光蛋白 GFP 进行基因重组并转化植物模式细胞——烟草 BY2 细胞,获得了膜泡荧光标记的 BY2 细胞。烟草 BY2 细胞作为一种模式植悬浮培养细胞开展的研究,具有均一性好、条件容

易控制、培养周期短、重复性好等优点<sup>[9]</sup>,而用其进行重金属盐毒性的研究,可以直接从细胞水平来研究重金属盐对细胞的作用,避开了植株水平根吸收及输运过程的影响。

## 1 材料和方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验材料

SCAMP2-GFP 膜泡荧光标记的 BY-2 细胞由湖南农业大学细胞生物学实验室提供。

### 1.2 实验方法

将离心收集的 BY-2 细胞悬浮于 MS 培养基 A 中;将等量的 BY-2 细胞悬浮于含有 0.068 mmol·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 的 MS 培养基 B 中(预实验表明 0.068 mmol·L<sup>-1</sup> 为 BY-2 细胞在试验周期中的半致死浓度);将等量的 BY-2 细胞悬浮于含有 0.068 mmol·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 与 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> SA 的 MS 培养基 C 中(如表 1)。把处理 A、B 和 C 同时置于 120 r·min<sup>-1</sup>、26 °C 中培养,在 3 h、6 h、9 h 分别取样进行细胞荧光观察(10×20)。以及分别取出培养 6 h 的样品进行激光共聚焦观察(Confocal laser scanning microscope FV1000)。用移液器吸取少许细胞,滴在载玻片上,再用去离子水稀释,利用移液器枪头将细胞充分打散,再加盖玻片后,显微镜下观察照相。

## 2 结果与分析 (Results and analysis)

细胞荧光观察实验结果表明:当 BY-2 细胞培养至 3 h 的时候,可以发现对照组 A 和 Cd-SA 处理组 C 中细胞超微机构无明显破坏,大多数细胞处于

表 1 细胞处理的配组

Table 1 The reagents in treatment of the cells

处理 Treatment	SCAMP2-GFP 转化 BY-2 GFP membrane labeled BY-2 cell	CdCl <sub>2</sub> (0.068 mmol·L <sup>-1</sup> )	SA (0.1 mmol·L <sup>-1</sup> )	MS 液体培养基 MS culture medium
A (CK)	+	-	-	+
B (Cd treatment)	+	+	-	+
C (Cd-SA treatment)	+	+	+	+

注: + 为加入该物质处理, - 为未加入该物质处理。

Note: + treatment; - without treatment.

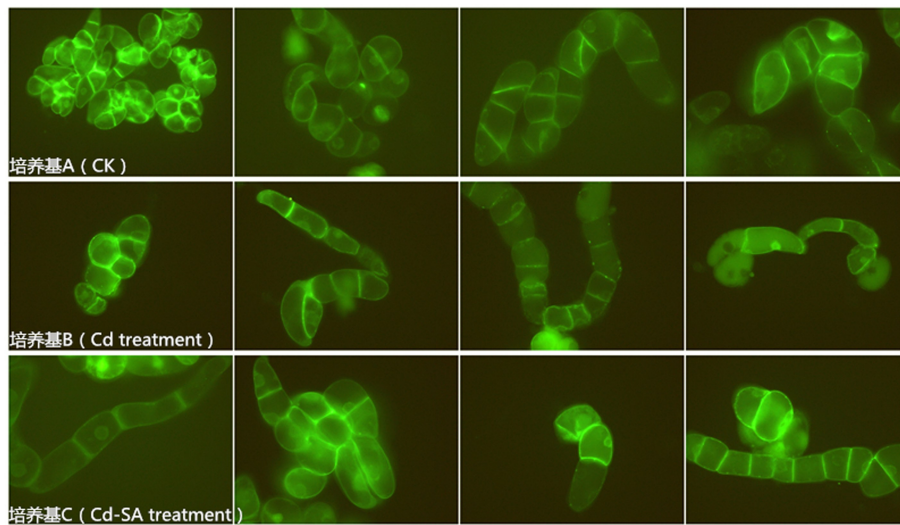


图 1 荧光标记 BY-2 培养 3 h 处理后细胞形态

Fig. 1 The cell morphology of the GFP labeled BY-2 after 3 h treatment

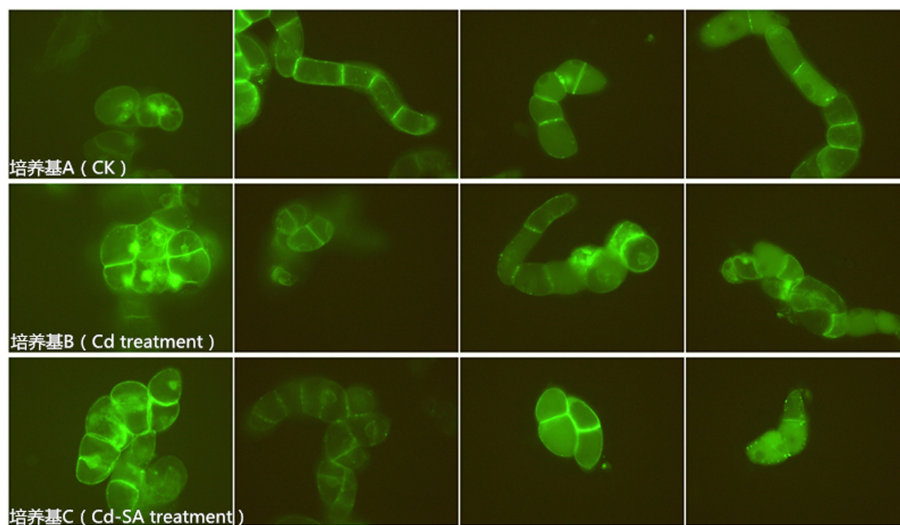


图 2 荧光标记 BY-2 培养 6 h 处理后细胞形态

Fig. 2 The cell morphology of the GFP labeled BY-2 after 6 h treatment

分裂前、中期；而 Cd 处理组 B 中少数细胞已经出现细胞核染色质凝集，核仁散开，核膜破裂，染色质从核孔散出，细胞皱缩和液泡缩小并出现导致细胞死亡的症状(图 1)。当 BY-2 细胞培养到 6 h 的时候，处理 A、C 中细胞的超微结构依然没有明显破坏，大多数细胞仍然处于分裂前、中期；而处理 B 中多数细胞已经进入细胞坏死状态，其膜通透性增高，致使细胞肿胀，细胞器变形或肿大，最后细胞破裂(图 2)。当 BY-2 细胞培养到 9 h 的时候，处理 A 中细胞超微结构仍然没有明显破坏，细胞生长状态良好；处理 C 中有个别细胞出现了细胞核染色质凝集，核仁

散开等细胞死亡的症状，但仍然有不少处于正常分裂期的细胞；而处理 B 中绝大多数细胞已经完全裂解，细胞开始分散，细胞间的黏附度下降，细胞呈现出不正常的生长状态，在显微镜下只能看到少量分散荧光或者已经看不到任何荧光(图 3)。由图 4 可知，处理 B 细胞的存活率呈现出明显的下降趋势，在 9 h 处存活率最低，下降幅度是最大的；培养基 C 细胞存活率下降度比培养基 B 细胞要低，并且在 9 h 处理 C 细胞存活率明显要高于处理 B 细胞。

细胞激光共聚焦实验结果表明：当 BY-2 细胞培养到 6 h 的时候对照 A 中细胞的超微结构无明显

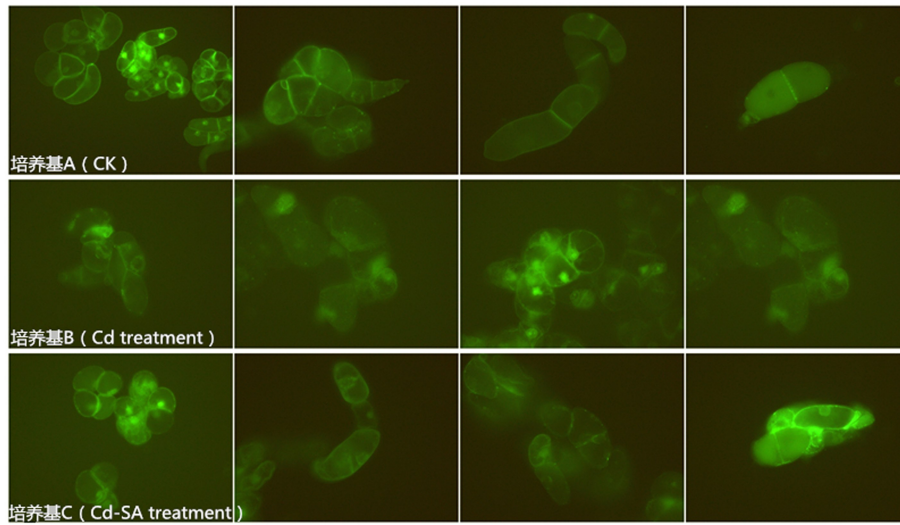


图 3 荧光标记 BY-2 培养 9 h 处理后细胞形态

Fig. 3 The cell morphology of the GFP labeled BY-2 after 9 h treatment

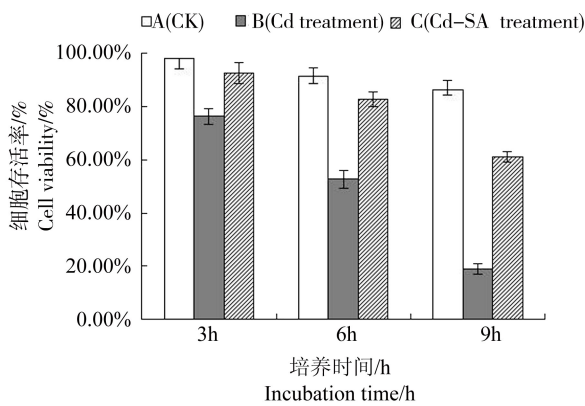


图 4 荧光标记 BY-2 水杨酸和 Cd<sup>2+</sup> 处理时间与细胞存活率柱形图

Fig. 4 The BY-2 survival chart after treatment of SA and Cd<sup>2+</sup>

变化,质膜完整,细胞正常生长,形态良好;处理 B 中细胞出现和荧光显微镜观察下相同的情况:大部分细胞体积异常增大,细胞分散肿胀,细胞器变形或肿大,细胞质膜破碎,细胞呈现出坏死状态;处理 C 中大部分细胞超微结构无明显变化,细胞体积正常,生长状态良好,部分细胞高度液泡化,并且在细胞质膜上出现了明显的荧光亮点。

### 3 讨论 (Discussion)

利用烟草膜泡绿色荧光蛋白 GFP 标记的 BY-2 细胞,结合当细胞受到重金属 Cd<sup>2+</sup> 影响后在膜泡上荧光强度的大小,在单细胞或亚细胞水平上,研究外源 SA 在细胞水平与植物镉耐性的相关性,可以很明显的得出细胞荧光强度越强镉的耐受性越大。

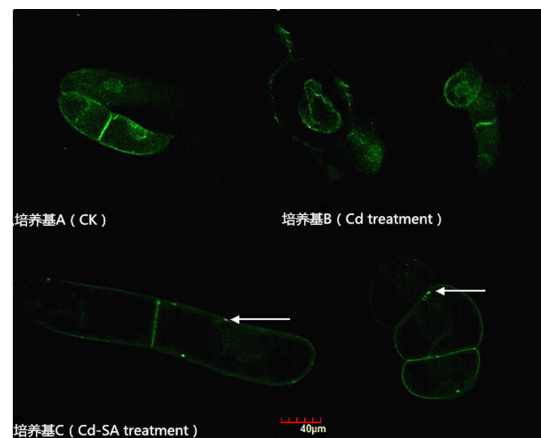


图 5 BY-2 培养 6 h 后在激光共聚焦显微镜下观察到荧光集中点

Fig. 5 The fluorescence enclose are observed around the BY-2 membrane after 6 h SA-Cd treatment of the cell under the CLSM

通过对图 1、2、3 分析发现,在重金属 Cd<sup>2+</sup> 处理 3 h,与对照组 A 相比较,水杨酸存在时镉处理的 Cd-SAC 组中大部分细胞呈现出高度的液泡化,体积膨大明显,并且绝大部分的细胞荧光亮度达到了最大值;而 Cd 处理的 B 组中大部分细胞除了体积膨大外也已呈现出皱缩的现象。在重金属处理的 6 h 处,Cd-SA 处理组大部分细胞仍保持体积膨大的状态,且少部分细胞荧光亮度没有减弱;而 Cd 处理的 B 组细胞则荧光亮度减弱,细胞皱缩现象加剧。在 9 h 处,Cd 处理的 B 组细胞亮度降到了最低值,绝大部分细胞已皱缩死亡;Cd-SA 处理的 C 组仍有

部分细胞保持较大的体积和较强的荧光亮度。推测原因,细胞以高度液泡化的形式来抵御重金属带来的损伤。细胞通过高度液泡化来缓解重金属的毒害作用,这与李春焯等<sup>[10]</sup>的实验结果相一致,所以细胞体积膨大;另外,由于在外源 SA 的影响下,Cd-SA 处理的 C 组细胞 SCAMP2 膜泡运输蛋白数量增加,加大了对重金属 Cd<sup>2+</sup> 的运输,大大提高了荧光亮度和降低了重金属的毒害作用,细胞死亡率有所降低。

通过图 4 发现,在重金属 Cd<sup>2+</sup> 胁迫 6 h 时,与对照组培养基 A 相比较,Cd-SA 处理的 C 细胞呈现出更高度度的液泡化,并且只有 Cd-SA 处理的 C 组细胞膜上出现了高荧光颗粒(如图 5 中箭头方向所示),与高电子密度颗粒一致,Liu 和 Kottkel<sup>[11]</sup>证实这些高电子密度颗粒中含有 Cd<sup>2+</sup>。这说明细胞质中游离的 Cd<sup>2+</sup> 以细胞质膜包裹的形式进入细胞内,达到了减少胞外 Cd<sup>2+</sup> 的数量和降低对细胞带来的伤害。另外,由图 4 我们也可以发现,已有高荧光颗粒开始脱离细胞质膜进入细胞内部,说明在细胞质膜处形成了凹陷,Cd<sup>2+</sup> 离子将会被膜泡包裹,然后脱离质膜,将重金属隔离在特定部位,以减少破坏作用<sup>[12,13]</sup>。宇克莉等<sup>[14]</sup>证明,细胞液泡内含有各种的蛋白质、糖类等物质,能够有效地与重金属结合,并且液泡膜上存在转运重金属的 H-ATP 酶和 Ca-ATP 酶,从而降低重金属的毒害作用。一般情况下,植物对于低浓度的重金属胁迫通过其细胞壁的稳定作用、质膜的选择透过性和液泡的区室化作用可以产生一定的抵御能力。在重金属胁迫下,细胞内部会形成数量不等的囊泡,包裹有重金属的囊泡将会与液泡相融合,达到重金属解毒的效果<sup>[15-16]</sup>。

SA 作为一种小分子酚类化合物,在植物受到生物或非生物胁迫时,其生物活性会被激活,在抵御生物和非生物胁迫带来的伤害。在受到重金属胁迫后,植物内源 SA 水平升高,抗氧化系统酶类活性升高,热激蛋白、PRP、RP、几丁质酶等蛋白等防御基因表达活性提高,植物对重金属胁迫的抵御能力提高<sup>[17]</sup>。通过施加外源 SA 有助于缓解重金属的毒害作用,提高对非生物胁迫的抗性<sup>[18-20]</sup>。李丰涛<sup>[21]</sup>在研究镉对红麻根尖细胞结构的影响中发现,在不同浓度的 Cd 胁迫处理下,红麻的根系活力明显降低,根膜透性也有一定的上升,Cd 对红麻根系确实造成了损伤。另外还发现,在施加了外源的 GSH 且在较低浓度 Cd 胁迫时,细胞壁和细胞膜出现黑色沉积,Cd 离子被阻隔在了原生质之外,保护了细胞。在本

研究中同样也发现了类似的情况。在 Cd<sup>2+</sup> 处理后,BY-2 细胞出现质壁分离和原生质膜破裂现象,并且细胞器出现逐渐减少的现象,核膜、核仁解体而游离在胞质中。在进行 Cd-SA 处理后,细胞质膜周围出现了包裹着重金属离子的高电子密度颗粒,且细胞的存活率也较高,说明在外源 SA 的影响下,BY-2 细胞内的重金属 Cd<sup>2+</sup> 得到了有效的生物处理,减缓了这些超微结构的改变给细胞造成的不可逆的损伤。本研究得到的实验结果与李丰涛在研究中施加外源 GSH 来缓解 Cd 对红麻根尖细胞结构毒害作用的结果较为相似,为本研究中采用施加外源 SA 的研究方法提供了一定的知道思路。

本实验研究表明,在重金属 Cd<sup>2+</sup> 胁迫下,Cd-SA 处理的细胞存活率较高,并由于其 SCAMP2 转运蛋白的高生物活性,获得了较高荧光亮度,并且在质膜处也发现了高电子密度颗粒,说明外源 SA 在协助细胞抵御重金属胁迫中是有一定的促进效果的。

**致谢:**感谢植物激素及生长发育湖南省重点实验室提供和协助进行扫描激光共聚焦观察。

**通讯作者简介:**张学文(1965-),男,植物学博士,教授,主要从事细胞生物学教学与研究,发表论文 50 余篇。

#### 参考文献(References):

- [1] 和莉莉,李冬梅,吴钢.我国城市土壤重金属污染研究现状和展望[J].土壤通报,2008,39(5):1211-1216  
He L L, Li D M, Wu G. Heavy metal contamination of urban soils in China: State and prospect [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2008, 39(5): 1211-1216 (in Chinese)
- [2] 王宏镛,束文圣,蓝崇钰.重金属污染生态学研究现状与展望[J].生态学报,2005,25(3):597-605  
Wang H B, Shu W S, Lan C Y. Ecology for heavy metal pollution: Recent advances and future prospects [J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(3): 597-605 (in Chinese)
- [3] 郑小东,荣湘民,罗尊长,等.土壤重金属污染及修复方法研究进展[J].农学学报,2011,37-43  
Zheng X D, Rong X M, Luo Z Z, et al. Research progress of heavy metal contamination in soil and remediation method [J]. Journal of Agriculture, 2011, 37-43 (in Chinese)
- [4] 代全林.重金属对植物毒害机理的研究进展[J].亚热带农业研究,2006,2(2):49-53  
Dai Q L. A review of toxicant mechanism s of heavy metals against plants [J]. Subtropical Agriculture Research, 2006, 2(2): 49-53 (in Chinese)

- [5] 孔祥海. 重金属离子对植物的毒害及其机理[J]. 龙岩学院学报, 2005, 23(3): 83—87  
Kong X H. Toxicity of heavy metal ions to plants and their toxicological mechanism [J]. Journal of Longyan University, 2005, 23(3): 83—87 (in Chinese)
- [6] 孟雪娇, 邸昆, 丁国华. 水杨酸在植物体内的生理作用研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(15): 207—214  
Meng X J, Di K, Ding G H. Progress of study on the physiological role of salicylic acid in plant [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(15): 207—214 (in Chinese)
- [7] Ananieva E A, Christov K N, Popova L P. Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat [J]. Plant Physiology, 2004, 161: 319—328 (in Chinese)
- [8] 印莉萍, 罗思羽, 闫莉婕, 等. 缺铁水稻根细胞膜泡相关基因群的分析与电镜观察[J]. 电子显微学报, 2005, 24(5): 489—493  
Yin L P, Luo S Y, Yan L J, et al. Gene groups analysis relevant to membrane vesicles and electron microscopic observation of rice roots under Fe-deficiency condition [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2005, 24(5): 489—493
- [9] McCabe P F, Leave C J. Programmed cell death in cell cultures [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 44: 359—368
- [10] 李春辉, 丁国华, 刘保东. 重金属影响植物细胞超微结构和功能的研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(18): 114—118  
Li C Y, Ding G H, Liu B D. Research progress of heavy metal affecting plant cell ultrastructure and function [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(18): 114—118 (in Chinese)
- [11] Liu D H, Kottke I. Subcellular localization of Cd in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy [J]. Biosciences, 2003, 28(4): 471—478
- [12] Lidon F C, Henriques F S. Role of rice shoot vacuoles in copper toxicity regulation [J]. Environmental Experiment Botany, 1998, 39: 197—202
- [13] 郝怀庆, 施国新, 杜开和, 等. 镉污染对水鳖的毒害影响[J]. 西北植物学报, 2001, 21(6): 1237—1240  
Hao H Q, Shi G X, Du K H, et al. Toxic effect of cadmium on hydrocharis dubia [J]. Acta Botanica Boreali—Occidentalia Sinica, 2001, 21(6): 1237—1240 (in Chinese)
- [14] 宇克莉, 孟庆敏, 邹金华. 镉对玉米幼苗生长、叶绿素含量及细胞超微结构的影响[J]. 华北农学报, 2010, 25(3): 118—123  
Yu K L, Meng Q M, Zou J H. Effects of Cd<sup>2+</sup> on seedling growth, chlorophyll contents and ultrastructures in maize [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25(3): 118—123 (in Chinese)
- [15] 魏志琴, 陈志勇, 秦蓉, 等. Cu<sup>2+</sup> 对拟南芥根的局部毒性及诱导 DNA 损伤和细胞死亡[J]. 植物学报, 2013, 48(3): 303—312  
Wei Z Q, Chen Z Y, Qin R, et al. Cu<sup>2+</sup> induced local toxicity and DNA damage, cell death in roots of arabidopsis thaliana [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2013, 48(3): 303—312 (in Chinese)
- [16] 关伟, 张金珠, 王占全, 等. 镉胁迫对桃树根尖细胞超微结构的影响[J]. 北京农学院学报, 2010, 25(3): 18—25  
Guan W, Zhang J Z, Wang Z Q, et al. Effect of cadmium stress on the ultrastructure of cell in peach root apex [J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2010, 25(3): 18—25 (in Chinese)
- [17] 赵新月. 水杨酸和钙对镉胁迫下玉米毒害修复的生理生态基础研究[D]. 西安建筑科技大学硕士学位论文, 2013  
Zhao X Y. Study on the physiological and ecological base of exogenous salicylic acid and calcium in repairing maize by cadmium [D]. Dissertation for Doctor Degree of Xi'an University of Architecture and Technology, 2013 (in Chinese)
- [18] 常云霞, 徐克东, 张小芳, 等. 外源水杨酸对 Hg<sup>2+</sup> 胁迫下小麦幼苗生长及生理的影响[J]. 麦类作物学报, 2014, 34(4): 540—545  
Chang Y X, Xu K D, Zhang X F, et al. Effects of salicylic acid on the growth and physiological property of wheat seedlings under Hg<sup>2+</sup> stress [J]. Journal of Triticeae Crops, 2014, 34(4): 540—545 (in Chinese)
- [19] 王林华, 梁书荣, 吕淑敏, 等. 外源水杨酸与植物非生物胁迫抗性的关系及其作用机制[J]. 河南农业科学, 2010, 8: 160—164
- [20] Popova L P, Maslenkova L T, Yordanova R Y, et al. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings [J]. Plant Physiology Biochemistry, 2009, 47(3): 224—231
- [21] 李丰涛. 红麻对重金属的吸收特征及外源 GSH 缓解镉毒的机理研究[D]. 福建农业大学博士学位论文, 2013  
Li F T. The study on accumulation characteristics of heavy metals and alleviating mechanism of exogenous GSH in kenaf [D]. Dissertation for Doctor Degree of Fujian Agriculture and Forestry University, 2013 (in Chinese)