

### 3种重金属对欧洲花楸悬浮细胞生物量的影响

黄蕾, 肖文娟, 刘超, 杨光, 郝庆秀, 吴志刚, 郭兰萍\*

(中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:以欧洲花楸悬浮培养细胞(SASC)为材料,研究非生物诱导子-重金属对SASC生物量的影响。方法:配制不同浓度的氯化镉、硝酸铜、硝酸铅溶液对SASC进行处理,用电子天平进行SASC生物量测定。结果:低浓度氯化镉刺激细胞生长而高浓度则抑制细胞生长,对细胞生长的影响表现为Hormesis现象,最适刺激质量浓度为 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;低浓度硝酸铜抑制细胞生长,高浓度刺激细胞生长, $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸铜处理后细胞生物量最低;基本所有浓度的硝酸铅都表现为刺激细胞生长,最适刺激质量浓度为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结论:重金属诱导子影响了SASC的生物量,且其作用程度和方式与氯化镉、硝酸铜、硝酸铅3种诱导子种类及浓度相关。

**[关键词]** 重金属(镉 铜 铅); 欧洲花楸; 生物量

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0226-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013240226

### Effect of Three Heavy Metals on Cell Suspension Cultures of *Sorbus aucuparia* Biomass

HUANG Lei, XIAO Wen-juan, LIU Chao, YANG Guang, HAO Qing-xiu, WU Zhi-gang, GUO Lan-ping\*

**[收稿日期]** 20130705(022)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81130070, 81072989);国家科技支撑计划项目(2012BAI29B02);国家中医药管理局行业科研专项(201107009)

**[第一作者]** 黄蕾,硕士生, Tel:010-64014411, E-mail:hnlei-27@163.com

**[通讯作者]** \*郭兰萍,博士,研究员,从事中药资源与鉴定研究, Tel:010-64011944, E-mail:glp01@126.com

#### [参考文献]

- [1] Debling D, Amelang M, Hasselbach P, et al. Diabetes and cognitive function in a population-based study of elderly women and men[J]. J Diabetes Complications, 2006, 20(4): 238.
- [2] Fischer P, Jungwirth S, Zehetmayer S, et al. Conversion from subtypes of mild cognitive impairment to Alzheimer dementia [J]. Neurology, 2007, 68(4): 288.
- [3] Sima A A, Kamiya H, Li Z G. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 490(1/3): 187.
- [4] Sato T, Shimogaito N, Wu X, et al. Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease[J]. Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2006, 21(3): 197.
- [5] Di Loreto S, Caracciolo V, Colafarina S, et al. Methylglyoxal induces oxidative stress-dependent cell injury and up-regulation of interleukin-1beta and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cells [J]. Brain Res, 2004, 1006(2): 157.
- [6] Thornalley P J, Anngborg A, Minhas H S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose[J]. Biochem J, 1999, 344(1): 109.
- [7] Miller A G, Smith D G, Bhat M, et al. Glyoxalase I is critical for human retinal capillary pericyte survival under hyperglycemic conditions [J]. J Biol Chem, 2006, 281(17): 11864.
- [8] Beisswenger P J, Drummond K S, Nelson R G, et al. Susceptibility to diabetic nephropathy is related to dicarbonyl and oxidative stress[J]. Diabetes, 2005, 54(11): 3274.
- [9] Odani H, Shinzato T, Matsumoto Y, et al. Increase in three alpha,beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific *in vivo* determination of intermediates in advanced Maillard reaction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 256(1): 89.

[责任编辑 邹晓翠]

(*Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*)

**[ Abstract ] Objective:** The cell suspension cultures of *Sorbus aucuparia* (SASC) was used to study the effect of abiotic elicitors-heavy metals on the SASC biomass. **Method:** The different concentrations of lanthanum chloride, copper nitrate, lead nitrate solution were prepared to treat the SASC, an electronic balance was used for measurement of Biomass of SASC. **Result:** The cell growth was stimulated by low concentration of lanthanum chloride but inhibited by high concentration of lanthanum chloride, the effect on cell growth was similar to Hormesis phenomenon, optimal stimulating concentration was  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; low concentration of copper nitrate inhibited cell growth but high concentrations stimulated cell growth, after treated with  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  copper nitrate the cell biomass was the lowest; substantially all concentrations of lead nitrate stimulated cell growth, the optimal stimulating concentration was  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . **Conclusion:** Heavy metals affect the SASC biomass, and its role in the extent and manner may be related to elicitors' type and concentration.

**[ Key words ]** heavy metals; *Sorbus aucuparia*; biomass

欧洲花楸 *Sorbus aucuparia* L. 为蔷薇科苹果亚科花楸属植物,具有很好的食用和药用价值,可治疗肾病、糖尿病、风湿病、尿酸代谢紊乱、月经失调、维生素 C 缺乏等症,还可溶解尿酸沉积、碱化血液、增强代谢等<sup>[1]</sup>。该属植物含有较丰富的黄酮、花青素、双联苯酚、氰苷、三萜皂苷等成分,有强抗氧化、抗癌、抗辐射和止咳平喘等功效,从而逐渐引起国内外的关注<sup>[2]</sup>。

非生物诱导子是指理化因素如紫外线、高温、低温、乙烯、pH、重金属盐类和高浓度盐等。重金属作为非生物诱导子一种,会诱导植物体内出现氧化胁迫,从而可能不同程度的影响植物生长。研究表明不同浓度的镧、铜、铅对植物生长有不同的影响,如元英进等将镧元素引入长春花细胞培养中,结果发现  $20, 40, 60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的硝酸镧均能促进长春花细胞的生长,其中  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  硝酸镧效果最好,  $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  硝酸镧效果最差<sup>[3]</sup>;张艳贞等发现  $0 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{La}^{3+}$  有利于冬凌草愈伤生物量的积累<sup>[4]</sup>;李晓丹等研究发现在  $\text{Cu}, \text{Zn}$  低浓度处理状态下能够抑制  $\text{Cd}, \text{Pb}$  等复合作用的影响,从而使小麦生物量降低幅度相对减少<sup>[5]</sup>;董诚明等研究不同浓度的  $\text{Zn}$  对冬凌草产量的影响,发现叶面喷施  $0.10\%$  的  $\text{Zn}$  有利于提高冬凌草的产量<sup>[6]</sup>。此外,低浓度铅可以促进植物生物量的增加,高浓度则呈抑制作用。如 *Begonia* 用  $100, 200, 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  处理印度芥菜,发现在  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  处理促进了根系的生长,表现为生物量比对照有所增加,但在高浓度铅处理下,根系的生物量却显著下降<sup>[7]</sup>;武征等研究发现低剂量铅和镉能导致夏枯草果穗个数、果穗总量显著高于对照组,而高

剂量则显著低于对照组<sup>[8]</sup>。

本实验以欧洲花楸悬浮培养细胞(SASC)为材料,研究了以镧、铜、铅3种重金属离子作为非生物诱导子对SASC生物量的影响,为进一步研究重金属对SASC中化合物代谢的影响提供参考。

## 1 材料

**1.1 植物** 诱导出的欧洲花楸愈伤组织接种于含  $50 \text{ mL}$  MS 固体培养基的  $400 \text{ mL}$  广口瓶中,愈伤组织每  $14 \text{ d}$  继代  $1$  次,经过  $3 \sim 5$  次继代后,选择疏松的愈伤组织转入液体培养基中培养,每  $250 \text{ mL}$  三角瓶中分装  $50 \text{ mL}$  的液体培养基,置于  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  培养箱中暗培养。悬浮细胞培养转速设定为  $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。使用的欧洲花楸悬浮细胞是将减压过滤后的  $1.4 \text{ g}$  欧洲花楸悬浮细胞接种于含有  $20 \text{ mL}$  MS 液体培养基的  $100 \text{ mL}$  三角瓶中。

**1.2 仪器与试剂** Conviron Adaptis CMP6010 型培养箱,TCYQ ZYSA0351 型超大型摇床,Sartorius BS 2202S 型电子天平;SW-CJ-2FD 型净化工作台。所有试剂均为国药集团化学试剂有限公司产品。

## 2 方法

**2.1 3种重金属离子溶液的配制及处理方法** 3种重金属离子溶液按相应浓度配制,配制完毕后,高压灭菌,冷藏备用。处理时每  $20 \text{ mL}$  细胞培养基内加  $1 \text{ mL}$  重金属离子溶液,每个处理重复  $4$  次。参照岳红等研究化学修复剂对重金属污染土壤中青蒿的影响<sup>[9]</sup> 设置重金属浓度,氯化镧质量浓度分别为  $0.0001, 0.001, 0.01, 1, 10, 20, 50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;硝酸铜质量浓度分别为  $0.01, 0.05, 0.5, 1, 10, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;硝酸铅质量浓度分别为  $0.05, 0.5, 1, 5, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;不施加重金属处理作为对照(CK),分别在处

理后 0, 1, 12, 24, 72, 96, 144 h 取样。

**2.2 欧洲花楸悬浮细胞生物量测定方法** 将培养的悬浮细胞真空抽滤至不滴水后, 直接称量细胞鲜重即为收获量, 用鲜重 (FW) 表示, 每个处理重复 4 次, 结果为 4 次的平均值。

### 3 结果与分析

**3.1 铜对欧洲花楸悬浮细胞生物量的影响** 不同浓度氯化铜处理对 SASC 总生物量的影响不同 (图 1)。在实验设置的浓度范围内, 整体表现为低浓度的氯化铜刺激细胞生长而高浓度则抑制细胞的生长。0.1 ~ 10 mg·L<sup>-1</sup> 的氯化铜对细胞生长的刺激作用随着质量浓度的增大先增加后减少, 其中 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 氯化铜对细胞生长的刺激作用最大, 总生物量为 15.32 g, 比对照组增加了 20.82%。质量浓度达到 20 mg·L<sup>-1</sup> 后, 氯化铜抑制细胞生长, 但是 50 mg·L<sup>-1</sup> 却表现为刺激细胞生长。

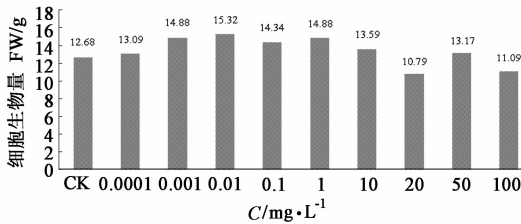


图 1 铜处理下欧洲花楸悬浮细胞总生物量的变化趋势

不同浓度的氯化铜在不同时间对 SASC 生物量的影响也不同 (图 2)。与 CK 组细胞生物量平稳增长趋势对比, 加氯化铜处理后细胞增长出现了不同形式的波动。0.000 1, 0.001, 0.01, 10, 50 mg·L<sup>-1</sup> 5 个浓度的氯化铜处理后细胞生物量变化趋势一致, 处理后 6 h 相对 1 h 有明显的增加, 12 h 出现小幅下降, 随后细胞生物量持续增加; 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 氯化铜处理后细胞生物量逐渐增加 72 h 时达到最大然后开始减少; 1 mg·L<sup>-1</sup> 氯化铜处理后细胞生物量则出现先减少再增加而后又减少的波状变化趋势; 20, 100 mg·L<sup>-1</sup> 2 个质量浓度氯化铜没有像其他浓度处理后细胞生物量出现的波动性变化, 而是和 CK 组一样持续增加, 但是相对 CK 组生物量增加明显减少, 细胞增长处于抑制状态。可以看出氯化铜处理后, 细胞若出现波动增长则表现为此浓度的氯化铜刺激细胞生长, 且细胞增长出现波动后若呈现平稳增长趋势则细胞总生物量最大, 说明波动是细胞为应对外来刺激而进行的调整, 以利于细胞的生长。

**3.2 铜对欧洲花楸悬浮细胞的影响** 不同浓度硝酸铜对 SASC 总生物量的影响 (图 3), 与对照相比低浓度的硝酸铜刺激细胞生长而高浓度的硝酸铜抑

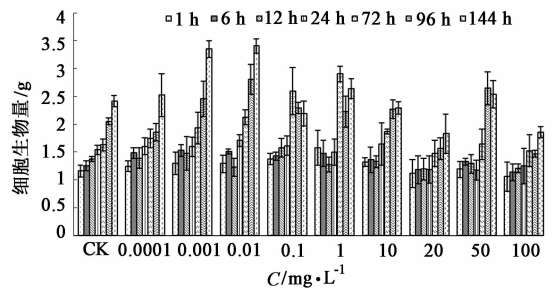


图 2 铜处理下欧洲花楸悬浮细胞鲜重变化趋势 ( $\bar{x} \pm s$ )

制细胞生长。当硝酸铜质量浓度为 0.05 mg·L<sup>-1</sup> 时, SASC 生物量最小, 说明这个浓度下硝酸铜对细胞生长的抑制作用最大; 质量浓度为 50 mg·L<sup>-1</sup> 时, 硝酸铜对细胞生长即表现出一定的刺激作用。

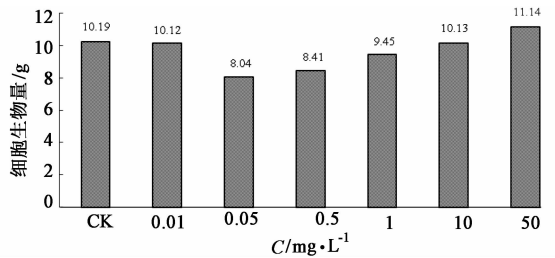


图 3 铜处理下欧洲花楸悬浮细胞总生物量的变化趋势

与 CK 组细胞生物量平稳增长趋势对比 (图 4), 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 硝酸铜处理后细胞生物量增长虽然稍微出现一些停滞, 但随着时间的延长生物量增长和 CK 组没有太大变化; 0.05, 0.5, 1, 10 mg·L<sup>-1</sup> 4 个质量浓度处理后细胞生物量增长出现不同形式的波动, 例如 0.05 mg·L<sup>-1</sup> 的硝酸铜处理后细胞生物量先减少后增加, 0.5, 1 mg·L<sup>-1</sup> 的硝酸铜处理后细胞生物量先增加后减少然后又增加, 10 mg·L<sup>-1</sup> 的硝酸铜处理后细胞生物量则先增加后减少。50 mg·L<sup>-1</sup> 的硝酸铜处理后细胞生物量增长并没有出现异

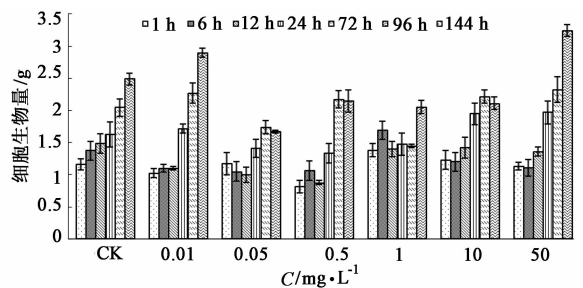


图 4 铜处理下欧洲花楸悬浮细胞鲜重变化趋势

常的波动, 而是和 CK 组相同, 呈现平稳增长, 且其细胞生物量增长量明显比 CK 组大。可以看出, 在硝酸铜处理下细胞的波动增长并非是刺激细胞生长的表现, 相反高浓度的硝酸铜则能刺激细胞生物量平稳增长。

**3.3 铅对欧洲花楸悬浮细胞的影响** 不同浓度硝

酸铅对 SASC 总生物量的影响不同(图 5)。随着硝酸铅浓度的增大,对细胞生长表现出不同程度的促进作用,其中质量浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的硝酸铅对细胞生长促进作用最大,细胞总生物量达到  $7.8 \text{ g}$ ,比对照增加了  $42.86\%$ 。

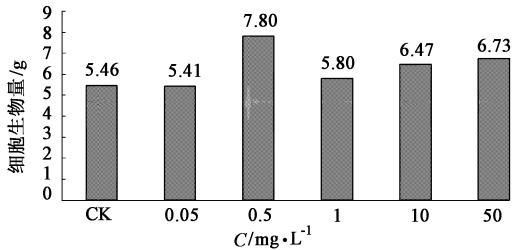


图 5 铅处理下欧洲花楸悬浮细胞总生物量的变化趋势

不同浓度的硝酸铅在不同时间对 SASC 生物量的影响也是不同的(图 6),与 CK 组细胞生物量增长趋势对比,0.05,1,5,50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  4 个质量浓度的硝酸铅处理后细胞增长与 CK 组基本一致,0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的硝酸铅处理好后细胞表现出比 CK 组更有规律的增长,说明细胞进行平稳增长是适应硝酸铅环境的一种表现。

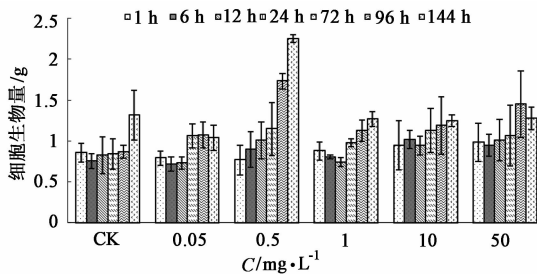


图 6 铅处理下欧洲花楸悬浮细胞鲜重的变化趋势( $\bar{x} \pm s$ )

#### 4 讨论

镉、铜、铅胁迫对 SASC 生物量积累均显示出不同的影响。氯化镉、硝酸铅处理后对细胞刺激作用都有一个中间最适浓度,在最适浓度处理下,这两种重金属离子对细胞的刺激作用最大,在实验设置浓度范围内,整体上表现为低浓度的氯化镉刺激细胞生长高浓度抑制细胞生长,呈现出 Hormesis 现象<sup>[10]</sup>。镉、铅作为重金属胁迫因子,当细胞受到胁迫刺激后内环境稳态遭到破坏而发生过度补偿效应<sup>[10]</sup>,低浓度的重金属离子刺激细胞分裂,当胁迫浓度超过细胞的防御能力时就会抑制细胞生长。在实验结果中,硝酸铅并未表现出抑制细胞生长,可能

硝酸铅浓度设置没有达到抑制细胞生长的浓度。由于铜是植物正常生命活动必需的 7 种微量元素之一,所以硝酸铜处理后细胞并未出现像氯化镉、硝酸铅处理的毒物效应,其对细胞的作用比较复杂,小剂量的硝酸铜抑制细胞生长,随着硝酸铜浓度的增加,对细胞生长抑制作用减小,甚至可以刺激细胞生长。

本实验以镉、铜、铅 3 种重金属离子作为诱导子研究其对欧洲花楸悬浮细胞生物量的影响,结果表明不同的重金属对欧洲花楸悬浮细胞有不同的刺激刺激,而且呈现出不同的规律性,为以后研究重金属是否影响细胞内化合物代谢以及其是否具有一定的规律性等提供参考。

#### [参考文献]

- [1] 赵中振,肖培根. 当代药用植物[M]. 北京:世界图书出版社,2008.
- [2] 于明,李锐. 花楸属植物化学成分药理作用及其研究进展[J]. 辽宁中医学院学报,2004,6(5):364.
- [3] 元英进,胡宗定. 稀土元素对长春花植物细胞培养的影响[J]. 稀土,1993,14(3):30.
- [4] 张艳贞,董诚明,苏秀红,等. 稀土元素对对冬凌草愈伤组织生长及冬凌草甲素、乙素含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):132.
- [5] 李晓丹,耿晓伟,张晓薇. 重金属复合污染对小麦生物量的影响[J]. 辽宁工程技术大学学报:自然科学版,2003,22(S1):62.
- [6] 董诚明,徐鹏,苏秀红,等. 锌对冬凌草产量及有效成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):58.
- [7] Begonia G B, Davis M F T, Begonia C N G. Growth responses of Indian Mustard (*Brassica juncea* (L) Czern.) and its phytoextraction of lead from a contaminated soil [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1998,61(1):38.
- [8] 武征,郭巧生,王庆亚. 夏枯草内在品质及生长特性对铅、铜、镉胁迫的响应[J]. 中国中药杂志,2010,35(3):263.
- [9] 岳红,韩晓丽. 化学修复剂对重金属污染土壤中青蒿的影响[C]. 天津:中国药学会大会暨第十届中国药师周大会,2010.
- [10] 郭兰萍,张小波,杨光. Hormesis 及其在药用植物生产中的应用[J]. 中国中药杂志,2011,36(5):525.

[责任编辑 邹晓翠]