

# 镉对平菇菌丝生长及同工酶表达的影响

王松华, 周正义, 沈厚琴, 陈庆榆, 陆晓民, 吴 萍

(安徽科技学院生命科学学院, 安徽省蚌埠市 233100)

**摘要:**采用液体培养研究了不同浓度镉(Cd)处理 7d 对平菇(*Pleurotus ostreatus*)菌丝体生长及其同工酶表达的影响。结果表明, 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理对平菇菌丝生长抑制率为 55.6%, 2000  $\mu\text{mol/L}$  Cd 为菌丝生长致死浓度。同工酶活性电泳图谱显示, Cd 处理不仅改变酯酶(EST)、乳酸脱氢酶(LDH)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)同工酶带数, 而且也影响各酶带的表达强度。50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理分别诱导出 2 条和 3 条新的 POD 同工酶带, 而抑制一条分子量较大的 POD 酶带的表达, 但明显增强总的 POD 活性。正常生长的平菇菌丝体 LDH 同工酶谱只出现 2 条酶带, 50  $\mu\text{mol/L}$  以下 Cd 处理不影响其同工酶的表达, 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理组 2 条同工酶带均消失。50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理能够显著增强 SOD 活性, 且诱导 2 条 SOD 同工酶表达。100  $\mu\text{mol/L}$  及其以下浓度 Cd 处理均能提高 EST 的活性, 这可能具有加速细胞内酯类化合物水解而增加羧基的数量以螯合更多的游离 Cd 离子而解 Cd 毒的作用。Cd 浓度在 50  $\mu\text{mol/L}$  以下时, 随着处理浓度的增加, 对金属硫蛋白的诱导作用呈逐渐增强的趋势, 而 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 的诱导作用减弱。

**关键词:**平菇; Cd; 同工酶

文章编号: 1000-0933(2006)05-1616-08 中图分类号: Q143, Q938 文献标识码: A

## Effect of cadmium on the growth and isozymes of *P. ostreatus* mycelia

WANG Song-Hua, ZHOU Zheng-Yi, SHEN Hou-Qin, CHEN Qing-Yu, LU Xiao-Ming, WU Ping (Anhui Science and Technology University, Life Science College, Anhui Bengbu 233100, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(5): 1616 ~ 1623.

**Abstract:** Cadmium is one of the widespread trace pollutants in soil and water with a long biological half-life, causing heavy toxicity to humans, animals and edible fungi. *Pleurotus ostreatus*, a popular edible fungus, which is widely cultured in China, could accumulate and turn over Cd that enters into human body through the chain of food. Although there are accumulating reports concerning the toxicity of Cd in plants and animals, very little is known about that in edible fungi. To understand how *P. ostreatus* accumulates and detoxifies Cd at biochemical level, we used *P. ostreatus* 17 strain to study the effects of Cd on mycelial growth and isozymes pattern of *P. ostreatus*. After 7 days *P. ostreatus* was cultured in PDA medium, containing various concentration of Cd, mycelia were harvested, homogenized and then the supernatants from the homogenate were used for enzyme analysis using PAGE and isozyme staining. To investigate the role of mycelial metallothionein of *P. ostreatus* involved in turning over of Cd, metallothionein content was determined by a Cd-saturation method. The results showed that Cd at 50  $\mu\text{mol/L}$  could inhibit the growth of mycelia by 55.6%, and a lethal dose of metal for mycelia was 2000  $\mu\text{mol/L}$ . The analysis of native PAGE enzyme activity staining revealed that exogenously applied Cd not only modulated the activities of peroxidase (POD E.C.1.11.1.7), superoxide dismutase(SOD E.C1.1.5.1.1), esterase (EST E.C.3.2.1.1) and lactate dehydrogenase(LDH E.C.1.1.1.27), but also the expression patterns of these isozymes. Total POD activity was drastically enhanced in mycelia treated with cadmium at 50 and 100  $\mu\text{mol/L}$ , whereas additional isozymes bands were induced while a band with the highest molecular weight was

基金项目:安徽省科技厅重点科研项目(04023070);安徽省教育厅自然科学基金项目(2005KJ155)

收稿日期:2005-08-16;修订日期:2006-02-15

作者简介:王松华(1970~),男,安徽太湖人,硕士,副教授,主要从事生物化学研究. E-mail: shwang70@yahoo.com.cn

Foundation item: The project was supported by Key Science Research item of Science and technology Department of Anhui Province (No. 04023070); Natural Science Foundation Item of Education Department of Anhui Province (No. 2005KJ155)

Received date: 2005-08-16; Accepted date: 2006-02-15

Biography: WANG Hong-Hua, Master, Associate professor, mainly engaged in biochemistry. E-mail: shwang70@yahoo.com.cn

suppressed. Two bands of LDH isozymes were observed in mycelia of *P. ostreatus* without Cd treatment, and the LDH pattern was not affected by Cd below 50  $\mu\text{mol/L}$ . However, the activity of LDH was completely inhibited in mycelia treated with 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd. Cadmium at 50 and 100  $\mu\text{mol/L}$  caused significant changes in the total activity of SOD and induction of two new isozyme bands. Treatment with 10 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd resulted in an increase of EST activity, suggesting a role of EST in detoxification of Cd. Moreover, metallothionein content was markedly increased in mycelia in the presence of Cd at 10 and 20  $\mu\text{mol/L}$  Cd, however, the induction of metallothionein by Cd at 100  $\mu\text{mol/L}$  attenuated remarkably, suggesting that metallothionein plays an important role in complexing with Cd ion inside the cell at low concentration Cd stress.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*; cadmium; isozymes

近年来,随着工农业生产的发展,三废的排放、矿产的开发、污水灌溉以及农药、除草剂和化肥等的广泛使用,环境污染日益严重。其中,水体、土壤重金属(Cd、Pb等)污染是影响我国持续农业和生态环境质量的一个重要因素。镉是食用蕈菌的非必需元素,但食用蕈菌对重金属元素具有一定的富集或生物转化作用<sup>[1]</sup>,能够在吸收必需的矿质元素的同时大量吸收并积累覆土和水中的镉,从而使土壤和水体中的重金属通过食物链进入人体,影响食用者的健康<sup>[2-5]</sup>。有关镉生物毒性机理和解毒机制的研究已取得一定进展,但绝大多数研究集中在植物和动物方面<sup>[6]</sup>,而有关食用蕈菌对镉胁迫响应的生理生化机理研究国内外尚少见报道。

以动物和植物为材料的研究表明,生物细胞中累积的 Cd 会通过替代蛋白质或酶中的 Zn、Fe 等必需元素抑制其生物学活性、诱导氧化胁迫及细胞膜脂过氧化、改变代谢相关酶的活性等途径引起 Cd 毒害<sup>[7]</sup>。为了降低 Cd 的细胞毒性,生物体在遭受 Cd 胁迫时能够通过改变代谢途径作出应答,如在细胞质内产生可络合有毒重金属的 Fe 素蛋白(ferritins)、富含半胱氨酸残基的金属硫蛋白(metallothioneins)及谷胱甘肽衍生肽植物螯合肽(phytochelatins, PCs)等,可与  $\text{Cd}^{2+}$  螯合成为无活性形式的 Cd-复合物并被运输至无反应活性的液泡而达到脱 Cd 毒的目的<sup>[8]</sup>。此外,细胞质内的小分子物质有机酸(如柠檬酸、草酸、苹果酸)、氨基酸及其衍生物等也能与  $\text{Cd}^{2+}$  形成稳定的螯合物,使  $\text{Cd}^{2+}$  的毒性下降。然而,当这些结合点达到饱和时,由 POD、SOD、CAT 等抗氧化酶和抗坏血酸、谷胱甘肽等抗氧化剂组成的抗氧化防御系统将被激活,从而可清除因  $\text{Cd}^{2+}$  诱导产生的过量活性氧,以维持细胞稳态<sup>[9]</sup>。食用蕈菌对镉胁迫响应的生理生化机理是否与动物植物有相似之处,尚不清楚。本文以在我国已有相当大的栽培面积的平菇(*Pleurotus ostreatus*)为材料,研究了镉胁迫对液体培养的平菇菌丝酯酶、乳酸脱氢酶、过氧化物酶和超氧化物歧化酶同工酶的影响及其对金属硫蛋白诱导作用,并初步探讨了平菇菌丝解 Cd 毒的生理生化机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料培养与处理

平菇(*Pleurotus ostreatus* 17)菌种购自上海农科院。每支试管 10 ml PDA 培养基(马铃薯 20%、蔗糖 2%、琼脂 2%、pH5.5~6.0),灭菌后制成斜面,接种平菇菌丝,25℃培养激活 7d,从斜面上挑起菌丝接种至 250ml 三角烧瓶(盛有 60 ml/瓶 PDA 液体培养基),25℃,160 r/min 下振荡培养 7d 后用无菌磁力搅拌器将菌丝球打碎,作为 2 次接种的种子液。PDA 液体培养基中按一定比例加入 10 mmol/L  $\text{CdCl}_2$  母液使培养基中 Cd 终浓度分别为 0、10、20、50、100、500、1000、2000  $\mu\text{mol/L}$ ,按接种量 10%接种平菇种子液,各处理重复 3 次,25℃,160 r/min 摇瓶培养 7d。抽滤菌丝球,称鲜重,-30℃冷冻保存待用。

### 1.2 过氧化物酶(POD E.C.1.11.1.7)、酯酶(EST E.C.3.2.1.1)、超氧化物歧化酶(SOD E.C.1.1.5.1.1)和乳酸脱氢酶(LDH E.C.1.1.1.27)同工酶活性电泳

称取 1.0 g 鲜菌丝球,按质量分数 1/3 的比例加入酶提取液(0.05 mmol/L pH 7.8 磷酸缓冲液,内含 2% PVP 和 5 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇),超声波冰浴破碎至匀浆,4℃冷冻离心(10000  $\times$  g, 30 min),取上清液作为电泳上样酶液。

EST 同工酶电泳采用 Tris-柠檬酸缓冲液,分离胶浓度为 10%,浓缩胶 5%,先用 100 V 电泳 10 min,再改为

200 V, 3~4 h 后结束电泳。称取 200 mg 醋酸- $\alpha$ -萘酯和 200 mg 坚牢蓝, 分别用 10 ml 丙酮溶解后倒入 200 ml 0.1 mol/L (pH 6.4) 磷酸缓冲液中混匀即为染色液。凝胶板放在培养皿内, 用蒸馏水冲洗 1 次, 倒入染色液, 37℃ 下振荡保温, 待酶带显示清楚(10~30 min), 弃掉染色液, 用蒸馏水将胶板冲洗干净, 保存于蒸馏水中。

POD 同工酶电泳采用 Tris-HCl 缓冲液, 分离胶浓度为 7%, 浓缩胶 5%, 2~3 h 后结束电泳。用醋酸联苯胺染色。按联苯胺溶液: 4%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 5%  $\text{EDTA-Na}_2$ : 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $\text{dH}_2\text{O} = 1:1:1:1:8$  的体积比例配制染色液。染色毕用蒸馏水将胶板冲洗干净, 用 5% 醋酸固定。

SOD 同工酶电泳采用 Tris-HCl 缓冲液, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶 5%。用 NBT 作为染色剂。

LDH 同工酶电泳采用 Tris-HCl 缓冲液, 分离胶浓度为 7%, 浓缩胶 5%, 2~3 h 后结束电泳。用蒸馏水冲洗胶板 1~2 次, 按下列比例配制反应染色液 0.2% NBT: 0.2% PMS: 0.01 mol/L NAD: 80% 乳酸钠: 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) = 8:1:5:10:26。37℃ 黑暗染色 30 min。

以上电泳图谱均用 IS-2200 凝胶成像系统拍照并记录结果。

### 1.3 金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 提取及含量测定

取冻干菌丝按质量分数 1/2 加入 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8.6) 缓冲液, 冰浴超声破碎, 置于 4℃ 冰箱过夜抽提。4℃ 冷冻离心 (10000  $\times$  g, 30 min), 收集上清液。置于 100℃ 水浴加热 2~3 min, 4℃ 冷冻离心 (10000  $\times$  g, 30 min)。收集上清液, 加入 3 倍体积 -20℃ 预冷的无水乙醇, -20℃ 过夜沉淀。4℃ 冷冻离心 (12000  $\times$  g, 30 min), 向沉淀中加入 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8.6) 缓冲液溶解沉淀, 4℃ 冷冻离心 (10000  $\times$  g, 20 min), 收集上清液即为金属硫蛋白粗提液。

采用 Cd-血红蛋白饱和法<sup>[10]</sup>测定平菇 MT 含量。通过原子吸收分光光度计测定  $\text{Cd}^{2+}$  的含量, 按照每个 MT 结合 7 个  $\text{Cd}^{2+}$ , MT 相对分子量, 按 MT 分子量为 6000 计算出平菇菌丝体 MT 含量。

### 1.4 数据统计

各处理重复 3 次, 取均值, 数据统计采用 SPSS10 的 ANOVA 分析软件处理。

## 2 结果

### 2.1 Cd 处理对平菇菌丝体生长的影响

由表 1 可知, 在本实验浓度范围内, 随着培养液中 Cd 浓度的升高, 培养基质的颜色由浅变深直至混浊; 菌丝体的颜色亦是由透明至黄褐色。100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理 7d 对菌丝生长的抑制率高达 82%, 2000  $\mu\text{mol/L}$  Cd 则为菌丝生长的致死浓度。鉴于此, 重新设置 0、10、20、50、100  $\mu\text{mol/L}$  等 5 个水平的 Cd 浓度作为处理液。在该处理浓度范围内 Cd 对菌丝生长的影响见图 1, 其中 50  $\mu\text{mol/L}$  处理组菌丝鲜重为对照组 44.4%。在以下同工酶电泳实验中均采用这 5 个 Cd 水平。

表 1 不同浓度 Cd 处理对菌丝生长的影响

Table 1 Effects of cadmium at various concentrations on the growth of mycelia of *P. ostreatus*

镉的浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) Cd concentration	培养基质颜色 Medium color	菌丝体颜色 Mycelia color	菌丝体鲜重 (g) Mycelia FW	菌丝体干重 (g) Mycelia DW
0	清亮 clear	乳白 ivory-white	4.91 $\pm$ 0.36	0.233 $\pm$ 0.052
10	浅茶色 yellow-brown	乳黄 ivory-yellow	5.24 $\pm$ 0.28	0.253 $\pm$ 0.061
100	茶色 brown	浅黄 buff	0.62 $\pm$ 0.03*	0.042 $\pm$ 0.003*
500	深茶色 dark-brown	黄褐 filemot	0.28 $\pm$ 0.06*	0.019 $\pm$ 0.005*
1000	轻微混浊 slight-turbid	褐色 brown	0.11 $\pm$ 0.03*	0.007 $\pm$ 0.002*
2000	混浊 turbid	混浊 turbid	—	—

— 无法测量或变化不明显 Showed being unable to measure or unremarkable alteration; \* 与对照比较差异显著 Compared with controls  $p < 0.05$

### 2.2 Cd 处理对平菇菌丝体 MT 含量的影响

以 10~100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理平菇菌丝体 7d 后以沸水浴处理 3 min 除去杂蛋白, 并采用 Cd-血红蛋白饱和法测定平菇 MT 含量, 结果如图 2 所示。Cd 处理诱导平菇菌丝体 MT 的产生具有浓度效应, 以 20  $\mu\text{mol/L}$  Cd 诱导效果最佳, MT 含量高达 1.24 mg/g.FW。随着 Cd 处理浓度的加大, MT 含量显著下降 ( $p < 0.05$ )。

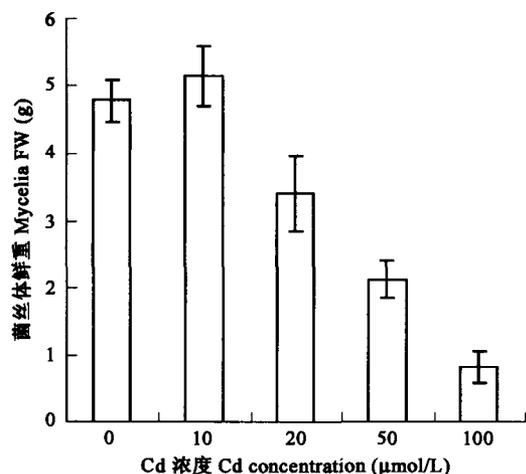


图 1 不同浓度 Cd 处理对菌丝体鲜重的影响

Fig.1 Effects of cadmium at various concentrations on the fresh weight of mycelia of *P. ostreatus*

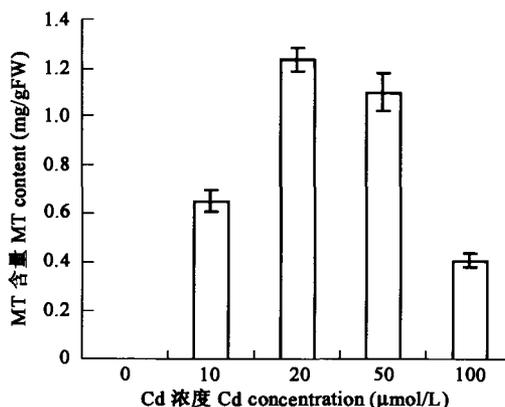


图 2 不同浓度 Cd 处理对菌丝 MT 含量的影响

Fig.2 Effects of cadmium at various concentrations on the content of MT in mycelia of *P. ostreatus*

### 2.3 Cd 处理对平菇菌丝体 EST 同工酶的影响

由图 3A 可知,正常条件下生长的平菇菌丝体中共有 9 条酯酶同工酶带,其中 EST- II、EST- VI、EST- VII 和 EST- XI 等 4 酶带颜色较深,活性较高,而其它 5 条酶带颜色较浅活性较低。Cd 处理既改变 EST 同工酶的种类又改变其活性。10 ~ 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理下,同工酶 EST- II、EST- VI、EST- VII 和 EST- VIII 活性逐渐增强,尤其是 EST- VIII 由弱带变为强带,酶活性显著升高,50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理时酶活性达到最高,而同工酶 EST- III、EST- IV 和 EST- IX 基本不受 50  $\mu\text{mol/L}$  以下 Cd 处理的影响,但 EST- IV 酶带在 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理时已消失。100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理组 EST- VI、EST- VII、EST- VIII 和 EST- IX 酶带活性较 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理组活性低,但仍高于对照,此时 EST- III 和 EST- IV 酶带都已经消失。

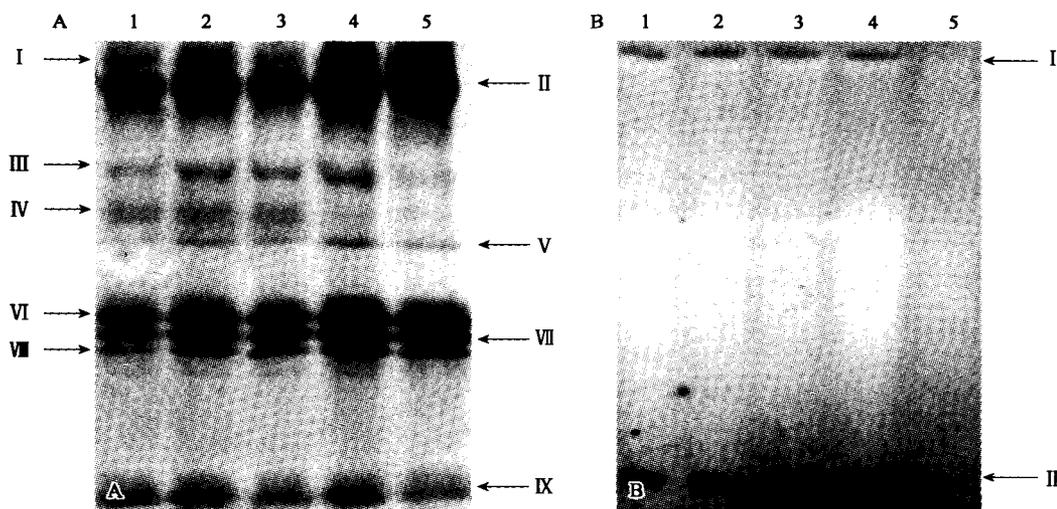


图 3 不同浓度 Cd 处理对菌丝体 EST(A)和 LDH(B)同工酶的影响

Fig.3 Effects of cadmium at various concentrations on the EST(A)and LDH(B)isozyme of mycelia of *P. ostreatus*

1: CK; 2: 10  $\mu\text{mol/L}$ ; 3: 20  $\mu\text{mol/L}$ ; 4: 50  $\mu\text{mol/L}$ ; 5: 100  $\mu\text{mol/L}$

## 2.4 Cd 处理对平菇菌丝体 LDH 同工酶的影响

正常生长的平菇菌丝体 LDH 同工酶谱可见 2 条酶带 LDH-I 和 LDH-II (图 3B), 低于 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理基本不影响 LDH 同工酶的表达, 而 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理组 2 条酶带均消失。

## 2.5 Cd 处理对平菇菌丝体 POD 同工酶的影响

平菇菌丝体 POD 同工酶电泳图谱如图 4A 所示。正常生长的平菇菌丝体可见 4 条同工酶, 其中 POD-I 和 POD-V 酶带活性较强, 而 POD-VI 和 POD-VII 酶带活性较弱。10 和 20  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理基本不改变同工酶谱。50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理则诱导出 POD-III 和 POD-IV 新的同工酶带, 且显著增强 POD-V 和 POD-VI 酶带活性而抑制 POD-I 酶带活性。100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理组明显可见 POD-II、POD-III 和 POD-IV 等 3 条新的同工酶带, 且 POD-V、POD-VI 和 POD-VII 酶带活性显著高于对照, 此时 POD-I 酶带已消失。

## 2.6 Cd 处理对平菇菌丝体 SOD 同工酶的影响

平菇菌丝体 SOD 同工酶谱如图 4B 所示。对照组可见 2 条 SOD 同工酶带, 其中 SOD-I 酶带为强带, SOD-II 为弱带。20  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理组可显著增强 SOD-I 和 SOD-II 酶带亮度, 表明此浓度的 Cd 能够使总的 SOD 活性升高。50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理能诱导平菇菌丝体中 SOD-III 和 SOD-IV 2 条新的同工酶表达, 此时酶的总活性明显高于对照, 且 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理组较 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理组 SOD-II、SOD-III 和 SOD-IV 酶带亮度更强。

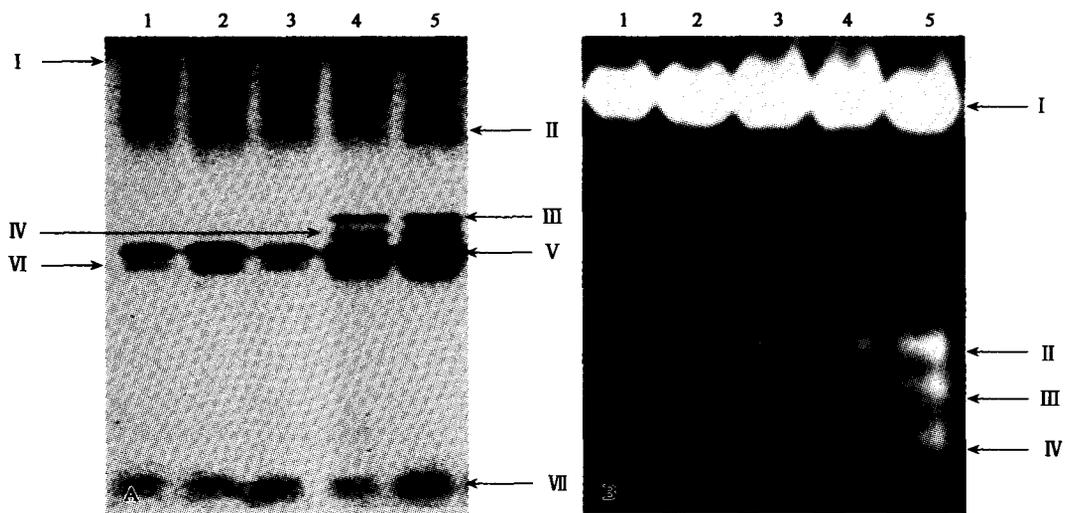


图 4 不同浓度 Cd 处理对菌丝体 POD(A)和 SOD(B)同工酶的影响

Fig. 4 Effects of various concentrations cadmium on the POD(A) and SOD(B) isozyme of mycelia of *P. ostreatus*

1: CK; 2: 10  $\mu\text{mol/L}$ ; 3: 20  $\mu\text{mol/L}$ ; 4: 50  $\mu\text{mol/L}$ ; 5: 100  $\mu\text{mol/L}$

## 3 讨论

10~100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理液体培养基中平菇菌丝时, 酯酶同工酶发生应激性变化, 表现为酶活性升高和酶带数目有所增减, 且在本实验浓度范围内随着 Cd 处理浓度的增加其酶活性呈现逐渐升高的趋势(图 3A)。这与一定浓度的 Cd 可诱导河蟹、蟾蜍、育珠蚌等动物 EST 活性的升高、改变 EST 同工酶的表达<sup>[11-13]</sup>的结果一相致。EST 是生物体内催化羧酸脂类化合物水解和合成的一类生命活动的基础代谢酶, 它不但能催化细胞内参与正常代谢的脂类化合物水解为相应的醇和酸( $\text{RCOOR}' + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCOOH} + \text{R-OH}$ ), 而且还能水解大量非生理存在的脂类化合物, 因此一般认为 EST 可能具有解毒作用。笔者认为, EST 作为 Cd 胁迫的一种应激性酶, 与其特殊的生理作用密切相关。因为 Cd 胁迫时, EST 活性升高可导致脂类化合物的水解作用加强, 从而可以产生大量的可螯合游离 Cd 的有机羧酸, 降低细胞内游离 Cd 浓度而起到解 Cd 毒作用。Nagase 等的研究表明,

0.1 mol/L NaOH 处理蓝藻(cyanobacteria)可显著提高其吸附  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等 2 价重金属离子的能力,并推测 NaOH 处理蓝藻细胞主要是增加了细胞中羧基的数量,因为使用羧基酯化的化学试剂处理细胞则其结合 2 价重金属离子的能力大大下降<sup>[14]</sup>。平菇菌丝在 Cd 胁迫下通过提高 EST 的活性加速脂类化合物水解而增加细胞中羧基的数量以螯合更多的游离 Cd 离子,从而起到解 Cd 毒的作用。Cd 胁迫下,平菇菌丝体中有机酸含量是否升高有待进一步研究。

LDH 是糖代谢之中的一种重要的酶,参与乳酸的合成或分解。到目前为止已在动植物组织中鉴定 LDH1、LDH2、LDH3、LDH4、LDH5 等 5 种同工酶,其中 LDH1 和 LDH2 可能主要是在富氧条件下发挥分解乳酸的作用,LDH4 和 LDH5 是缺氧条件下合成乳酸,而 LDH3 作为对氧反应中性的同工酶<sup>[15]</sup>。本实验条件下,正常生长的平菇菌丝体 LDH 同工酶谱从正极到负极只出现 2 条酶带 LDH-I 和 LDH-II (图 3B),根据其迁移率判断相当于动植物组织中的 LDH1 和 LDH5 而中间无其他酶带。有关平菇等食用蕈菌 LDH 同工酶尚未见报道,而除平菇外的食用蕈菌之 LDH 同工酶是否也只存在 2 条带有待进一步证实。一定浓度的 Cd 处理能改变动植物组织中 LDH 同工酶谱<sup>[15-17]</sup>,如 Cd 处理抑制蟾蜍精巢 LDH1、LDH2 活性而增强 LDH5 的活性<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,低于 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理基本不影响 LDH 同工酶的种类和数量,100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理组 2 条同工酶带均消失,表明高浓度 Cd 处理抑制了平菇 LDH 活性。

POD 是由血红素辅基和单一肽链组成的一类氧化酶,它广泛存在于各种动植物和微生物体内,具有清除  $\text{H}_2\text{O}_2$  等活性氧、参与植物木质素木栓质合成和环境胁迫下传递信号等生理功能。据表达方式不同可将其分为组成型和诱导型两大类,各种内因(如激素或离子水平)和外因(如盐碱或重金属胁迫)都可影响其同工酶基因的表达<sup>[18]</sup>。本研究结果表明,低浓度 Cd 处理不影响 POD 同工酶谱,50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理分别诱导出 2 条和 3 条新的 POD 同工酶带,且总的 POD 活性显著高于对照。POD 活性的显著升高预示着细胞中  $\text{H}_2\text{O}_2$  等活性氧水平的上升;同时,高活性的 POD 大量消耗  $\text{H}_2\text{O}_2$  加强木质素等次生代谢物合成,这在一定程度上可以减少 Cd 诱导的氧化胁迫。

目前一般认为生物体中存在 Cu/Zn-SOD、Fe-SOD、Mn-SOD 等 3 种类型 SOD 同工酶,其主要作用是将  $\text{O}_2^-$  歧化为  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2$ ,从而防止  $\text{O}_2^-$  与  $\text{H}_2\text{O}_2$  通过 Fenton 反应产生毒性更强的  $\cdot\text{OH}$ 。重金属胁迫诱导 SOD 同工酶的表达已有不少报道。在细菌中,Fe、Mn 可诱导 SOD 同工酶的表达;Chonpraditnun 等发现,1 mg/L 的 Cu 能诱导大豆 Cu/Zn-SOD 的表达<sup>[19]</sup>。Miszalski 等报道<sup>[20]</sup>,Cd 处理时担子菌纲真菌 *R. involutus* SOD 同工酶谱中出现一条新的同工酶带。本研究亦表明(图 4B),50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理能诱导平菇菌丝体中 SOD-III 和 SOD-IV 同工酶的表达。目前对 Cd 等重金属诱导 SOD 同工酶的表达机理尚不清楚,推测有两种可能途径,① 直接途径,在过量 Cd 存在下,调节蛋白 ACE-1 专一性地结合到 Cu/Zn-SOD 基因的调控序列而激活其转录,使表达量增加;② 间接途径,过量 Cd 使抗坏血酸氧化酶和 NADPH 氧化酶活性升高,导致  $\text{O}_2^-$  含量增加, $\text{O}_2^-$  则可作为第二信使启动细胞的防御反应,诱导 SOD 同工酶的表达。Cd 诱导平菇菌丝 SOD 同工酶的表达是通过直接途径还是间接途径尚需从分子水平进一步研究。

金属硫蛋白(MT)是一类广泛存在于动物、植物、微生物中的低分子量富含巯基的金属结合蛋白,具有调节微量元素储存、运输和代谢以及使有毒重金属无毒化等作用<sup>[21-23]</sup>。一定浓度的镉处理能诱导柱状田头菇、酵母产生 MT<sup>[24,25]</sup>。本研究的结果表明 Cd 能够诱导平菇菌丝体产生 MT,以 20  $\mu\text{mol/L}$  Cd 诱导效果最好,随着 Cd 处理浓度的加大,MT 含量明显下降。这可能是由于细胞中累积的大量 Cd 离子攻击线粒体、核糖体、核仁等细胞器使其解体甚至消失<sup>[26]</sup>,导致膜蛋白质和酶发生交联及 DNA 片段化,从而抑制转录和翻译等基因表达过程,使细胞蛋白质合成能力下降。由此可见平菇 MT 在低浓度 Cd 处理下能发挥其无毒化重金属的作用,而高浓度 Cd 时这种效果不明显。

此外,本研究还测定了不同浓度 Cd 处理平菇菌丝体中苯丙氨酸解氨酶(PAL)、谷胱甘肽转硫酶(GST)、谷氨酸脱氢酶(GDH)的活性,其中 GST 未检测到,而 PAL 和 GDH 活性与对照无明显变化(资料未列出),具体原因正在进一步研究之中。

总之,平菇菌丝具有动物和植物相似的抗镉毒机理。一方面,高浓度 Cd 可刺激细胞内 SOD、POD 等抗氧化酶活性的升高而增强细胞及时清除由 Cd 诱导产生的活性氧,维持细胞的稳态;另一方面,Cd 胁迫可诱导 MT 生成和羧酸含量的升高,以提高细胞螯合游离 Cd 离子使之无毒化。至于平菇等食用蕈菌是否具有液泡区室化途径脱 Cd 毒尚需进一步探讨。

## References:

- [ 1 ] Michelot D, Siobud E, Chrisphe J Dore, *et al.* Update on metal conten profiles in mushrooms toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulations. *Toxicon*, 1998, 36 (12): 1997 ~ 2012.
- [ 2 ] Li S S, Lei J G, Chen H C. Accumulation and distribution of cadmium, phosphorus and calcium and their interaction in *Agaricus blazei* cells. *Acat Edulis Fungi*, 2001, 8(4): 24 ~ 27.
- [ 3 ] Xing Z T, Tang Q J, Zhou C Y, *et al.* Analysis of trace elements and their safety inb different ganoderma fruit bodies and coarse polysaccharide. *Mycosystema*, 2002, 21(1): 107 ~ 111.
- [ 4 ] Xing Z T, Wang C G, Pan Y J, *et al.* The progress in the research of the heavy-metal-elements contained in edible fungi. *Acat Edulis Fungi*, 2000, 7 (2): 58 ~ 64.
- [ 5 ] Shi Q Q, Lin L, Chen Z C, *et al.* Studies on the accumulation of heavy metal and their effect on the growth and metabolism in edible fungi. *Acta Mycol Sin*, 1991, 10 (4): 301 ~ 311.
- [ 6 ] Wang H B, Shu W S, Lan C Y. Ecology for heavy metal pollution: recent advances and future prospects. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(3): 596 ~ 605.
- [ 7 ] Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stess and protection by mycorrhization. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1351 ~ 1365.
- [ 8 ] Vido K, Spector D, Lagniel G, *et al.* A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2001, 276: 8469 ~ 8474.
- [ 9 ] Briat L R, Lebrun M. Plant responses to metal toxicity. *Plant Biol Pathol*, 1999, 322: 43 ~ 54.
- [ 10 ] Klein D K, Bartsch, Summer K H. Quantitation of Cu-containing metallothione in by a Cd-saturation method. *Anal Biochem*, 1990, 189: 35 ~ 39.
- [ 11 ] Wang L, Yang X Q, Wang Q, *et al.* The accumulation of Cd<sup>2+</sup> and the effect on EST in five tissues and organs of *Eriocheir sinensis*. *Acta Zool Sin*, 2001, 47: 96 ~ 100.
- [ 12 ] Jia X Y, Dong A H. Effects of Pb on the peroxidase isozymes and stterase isozymes in liver and kidney of *Bufo bufo gargarizans*. *Chin J Ecot*, 2005, 24 (2): 159 ~ 162.
- [ 13 ] Wei W, Liu K W, Zhao X P, *et al.* Effects of Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> on three enzymes in oyster liver. *Chin J Appl Environ Biol*, 2004, 10 (2): 170 ~ 173.
- [ 14 ] Nagase H, Inthorn D, Oda A, *et al.* Improvement of selective removal of heavy metals in cyanobacteria by NaOH treatment. *J Biosci and Bioeng*, 2005, 99 (4): 372 ~ 377.
- [ 15 ] Duan C Q, Wang H X. The effects of lead, cadmium and mercury ions on LDH in *Vicia faba*. *Acta Ecologica Sinica*, 1998, 18 (4): 413 ~ 417.
- [ 16 ] Jia X Y, Dong A H. Effects of cadmium and lead on testicular enzymes of *Bufo bufo gargarizans*. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(10): 2329 ~ 2333.
- [ 17 ] Huang F Y, Li M Y, Zhu J Q, *et al.* Influence of cadmium on the expression of isozymes in blood cells of *Boleophthalmus pectinirostris* in the situation of acute toxicosis. *J Shanghai Fish Univ*, 2004, 13 (4): 289 ~ 292.
- [ 18 ] Chen E L, Chen Y N, Chen L M, *et al.* Effect of copper on peroxidase activity and lignin content on *Raphanus sativus*. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 40: 439 ~ 444.
- [ 19 ] Chongpraditnun P, Mori S, Chino M. Excess copper induces a cytosolic Cu, Zn-superoxide dismutase in soybean root. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33 (3): 239 ~ 244.
- [ 20 ] Jacob C, Courbot M, Brun A, *et al.* Molecular cloning, characterization and regulation by cadmium of a superoxide dismutase from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Eur. J Biochem*, 2001, 268: 3223 ~ 3232.
- [ 21 ] Hamer D H, Thiele D J, Lemont J E. Function and autoregulation of yeast coppertionein. *Science*, 1985, 228: 685 ~ 695.
- [ 22 ] Yu W, Santhanotopalan V, Sewell A K, *et al.* Dominance of metallothionein in metal ion fuffering in yeast capable of synthesis of (gamma EC)nG isopeptides. *J Bio Chem*, 1994, 269: 21010 ~ 21015.
- [ 23 ] Jiao F C, Mao X, Li R Z. Genes of metal-binding proteins and their application in bioremediation of heavy metals. *Hereditas*, 2002, 24 (1): 82 ~ 86.
- [ 24 ] Liu A L, Zhu B F, Liu Z, *et al.* Isolation, purification and characterization of metallothionein from *Agrocybe cylindracea*. *Mycosystema*, 2002, 22 (1): 112 ~ 117.
- [ 25 ] Lin Z L, Ma G D, Li F R, *et al.* Isolation, purification and identification of metallothionein from strain BD102 of *Hansenula anomala*. *Acta Microb Sin*, 2001, 41 (2): 216 ~ 222.

- [26] Shi G X, DU K H, Xie K B, *et al.* Ultrastructural Study of Leaf Cells Damaged from  $Hg^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  Pollution in *Hydrilla verticillata*, *Acta Bot Sin*, 2000, 42(4): 373 ~ 378.

#### 参考文献:

- [2] 李三晷,雷锦桂,陈惠成. 镉、磷、钙在姬松茸细胞内的积累和分布特征及其交互作用. 食用菌学报, 2001, 8(4): 24 ~ 27.
- [3] 邢增涛,唐庆九,周昌艳,等. 不同灵芝子实体及其粗多糖中微量元素及重金属含量分析. 菌物系统, 2002, 21(1): 107 ~ 111.
- [4] 邢增涛,王晨光,潘迎捷,等. 食(药)用菌中重金属的研究进展. 食用菌学报, 2000, 7(2): 58 ~ 64.
- [5] 施巧琴,陈静仪,陈哲超,等. 重金属在食用菌中的富集及其对生长代谢的影响. 真菌学报, 1991, 10(4): 301 ~ 311.
- [6] 王宏斌,束文圣,蓝崇钰. 重金属污染生态学研究现状与展望. 生态学报, 2005, 25(3): 596 ~ 605.
- [11] 王兰,杨秀清,王茜,等. 镉在河蟹五种组织器官的积累及对酯酶同工酶的影响. 动物学报, 2001, 47(专刊): 96 ~ 100.
- [12] 贾秀英,董爱华. 铅对蟾蜍肝、肾过氧化物酶和酯酶同工酶的影响. 生态学杂志, 2005, 24(2): 159 ~ 162.
- [13] 魏炜,刘克武,赵欣平,等. 水体中 Cu 和 Cd 污染对育珠蚌肝脏中 3 种酶的影响. 应用与环境生物, 2004, 10(2): 170 ~ 173.
- [15] 段昌群,王焕校.  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  对蚕豆(*Vicia faba* L.) 乳酸脱氢酶的影响. 生态学报, 1998, 18(4): 413 ~ 417.
- [16] 贾秀英,董爱华. 镉、铅对蟾蜍精巢毒作用的酶学研究. 生态学报, 2004, 24(10): 2329 ~ 2333.
- [17] 黄福勇,李明云,竺俊全,等. 急性镉中毒对大弹涂鱼血细胞同工酶表达的影响. 上海水产大学学报, 2004, 13(4): 289 ~ 292.
- [23] 焦芳婵,毛雪,李润植. 金属结合蛋白基因及其在清除重金属污染中的应用. 遗传, 2002, 24(1): 82 ~ 86.
- [24] 刘安玲,朱必凤,刘主,等. 柱状田头菇金属硫蛋白的分离纯化与特性研究. 菌物系统, 2002, 22(1): 112 ~ 117.
- [25] 林稚兰,马国栋,李福荣,等. 异常汉逊酵母 BD102 金属硫蛋白的分离纯化和鉴定. 微生物学报, 2001, 41(2): 216 ~ 222.
- [26] 施国新,杜开和,解凯彬,等. 汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究. 植物学报, 2000, 42(4): 373 ~ 378.