

镧离子对植物体内过氧化物酶活性的影响

张晓春¹ 李 邨¹ 陆天虹^{1,2} 丁晓岚³ 周 青⁴ 黄晓华^{*,1,4}⁽¹⁾ 南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097)⁽²⁾ 中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022)⁽³⁾ 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)⁽⁴⁾ 江南大学生物工程学院环境科学系, 无锡 214063)

本文首次比较了在植物体内 La^{3+} 与过氧化物酶 (POD) 的相互作用和在植物体外 La^{3+} 与辣根过氧化物酶 (HRP) 的相互作用。在植物体内的研究表明, La^{3+} 能够明显改变 POD 的活性, 并呈现低促高抑的“Hormesis 效应”。用圆二色谱 (CD)、紫外-可见 (UV-Vis) 吸收光谱和傅立叶变换红外 (FTIR) 光谱研究在植物体外 La^{3+} 与 HRP 相互作用的结果表明, 在模拟生理条件的溶液中, La^{3+} 对 HRP 的活性同样呈现低促高抑的“Hormesis 效应”。其作用机理可能是 La^{3+} 通过与 HRP 中酰胺基的 O 或 N 键合, 导致 HRP 二级结构变化, 进而改变活性中心血红素中铁卟啉的化学结构, 最终改变 HRP 的催化活性。

关键词: 镧离子 过氧化物酶 辣根过氧化物酶 活性

分类号: O614.33*1

0 引言

众所周知, 稀土离子随着食物链进入生命体系, 并对植物保护酶, 如过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 和超氧化物歧化酶 (SOD), 产生影响^[1-3]。已有研究表明, La^{3+} 对植物体内 POD 活性的影响尤为显著^[4-6], 但从化学角度探讨稀土离子对植物保护酶作用的过程尚未见文献报道。

本文比较了在植物体内 La^{3+} 与过氧化物酶 (POD) 的相互作用和在植物体外 La^{3+} 与 POD 中的一种, 即辣根过氧化物酶 (HRP) 的相互作用, 以探讨稀土离子在植物体内与保护酶相互作用的机理。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

HRP 为美国 Sigma 公司产品, 用光谱法进行标定^[7]。无水 LaCl_3 根据文献^[8]制备。其余试剂均为分析纯。所有溶液均用三次蒸馏水配置。模拟生理条件的溶液为含 20% 甲醇和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 5

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液^[9]。

CD 谱测量用 JASCOJ-715 型 CD 仪 (日本分光公司), 构象计算则用文献^[10,11]程序进行。UV-Vis 吸收光谱用 Lambda17 型紫外-可见分光光度计 (美国 Perkin-Elmer 公司) 进行, 收集差光谱数据。FTIR 光谱用 Nexus-670 型 FTIR 光谱仪 (美国 Nicolet 公司) 测量。扫描范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 扫描次数 156 次, 分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.2 La^{3+} 对植物活体生理生化指标影响测定按文献^[12]方法进行。

2 结果与讨论

2.1 La^{3+} 对植物体内 POD 活性的影响

表 1 列出了单子叶植物印度玉米在不同浓度 La^{3+} 存在时一些生理生化指标。由表 1 中的数据可见, 随着印度玉米中 La^{3+} 浓度增加, 叶绿素含量也随之增加, 当 La^{3+} 浓度为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 叶绿素含量最高, 叶绿素含量是表征光合作用效果的重要依据, 因此, 该结果表明 La^{3+} 在浓度 $30 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时促

收稿日期: 2003-06-24。收修改稿日期: 2003-09-26。

国家自然科学基金 (No. 20243002)、国家计委稀土专项基金 (No. GJX01100626)、江苏省科技厅高技术研究基金 (No. BG2001045)、江苏省教育厅高校自然科学基金 (No. 01KJB150006) 资助项目。

* 通讯联系人。E-mail: xiaohuang@citiz.net

第一作者: 张晓春, 女, 24 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物物理化学。

表 1 La^{3+} 浓度对印度玉米的生理生化指标的影响Table 1 Effects of the La^{3+} Concentration on Physiological and Biochemical Index of Indian Corn

La^{3+} concentration / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	chlorophyll content / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	permeability / %	MDA*	POD activity** / ($\Delta D_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)
0	2.34	11.52	0.08	1.30
10	3.33	8.70	0.07	1.32
30	4.98	6.00	0.07	1.32
50	4.26	8.82	0.08	1.32
80	3.34	9.96	0.12	1.43
100	2.40	11.30	0.14	2.12
200	1.00	25.32	0.28	4.33
400	0.58	30.00	0.33	4.98
600	0.32	32.00	0.45	3.12

*MDA is expressed by per fresh weight;

**POD activity is expressed by the amount of changed D_{470} per unit of time and fresh weight.

进印度玉米光合作用的效应最明显。但是当 La^{3+} 浓度进一步增加时, 叶绿素含量却随之降低, 表明 La^{3+} 浓度太高会对光合作用产生不良影响。另外, 质膜透性随 La^{3+} 浓度的变化规律与叶绿素含量相似, 当 La^{3+} 浓度为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 质膜透性降低效果最明显。质膜透性是反映植物逆境伤害程度的指标, 与 CAT、POD、SOD 等共同构成植物生理防御系统, 因此, 质膜透性越低, 对植物的生理防御系统越有利。上述结果表明, La^{3+} 在适宜浓度范围内, 明显提高光合作用中的光能转换, 降低质膜透性。

由表 1 数据还可见, 当 La^{3+} 浓度低于 $50 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, POD 活性基本上不随 La^{3+} 浓度发生变化。当 La^{3+} 浓度在 $50 \sim 400 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间时, POD 活性随 La^{3+} 浓度增大而增加, 此时 La^{3+} 可作为抗氧化损伤的调节剂。但当 La^{3+} 浓度继续增大时, 其行为即同重金属离子, 对植物保护酶系统产生抑制^[13, 14], 表明 La^{3+} 浓度对 POD 活性呈现低促高抑的“Hormesis 效应”^[15]。如 La^{3+} 浓度进一步增大则使酶系统破坏, 甚至导致植物死亡。

表示膜脂过氧化损伤指标的丙二醛含量 (MDA) 随 La^{3+} 浓度的变化规律与上几种指标不同, 当 La^{3+} 浓度低于 $50 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, MDA 基本上不随 La^{3+} 浓度发生变化。但当 La^{3+} 浓度进一步增加时, MDA 基本上随 La^{3+} 浓度增加而增大。这可能是由于膜脂过氧化反应既可由酶 (指氧合酶) 促诱发, 也可被 $\cdot\text{OH}^-$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 等自由基启动, 经连锁反应生成, 故 MDA 的含量在一定程度上反映了体内自由基的含量, 即 MDA 越少, $\cdot\text{OH}^-$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 等自由基处于越低的水平^[16], 越能防止自由基对植物产生伤害^[17]。但由于 MDA 含量与几种因素有关, 因此, 其含量随

La^{3+} 浓度的变化规律与上述几种指标不同。

2.2 La^{3+} 对在模拟生理条件溶液中的 HRP 活性的影响

图 1 表示了模拟生理条件溶液中, HRP 活性与 La^{3+} 和 HRP 浓度比的关系曲线。由图可见, 当 La^{3+} 和 HRP 浓度比小于 20 时, HRP 的活性基本不随浓度比的增大而变化。当 La^{3+} 和 HRP 浓度比大于 20 后, HRP 的活性随浓度比的增大而缓慢增加, 在浓度比为 42 时, HRP 的活性达到最大值。但继续增加 La^{3+} 和 HRP 的浓度比, HRP 的活性随浓度比增大而降低。当浓度比大于 60 后, HRP 活性随浓度比的增大而迅速降低, 此时, La^{3+} 的作用与重金属离子相似。由此可见, 在植物体外, HRP 活性随 La^{3+} 和 HRP 浓度比的变化规律基本与上述植物体内的情况相似。根据图 1 曲线, 可得到 La^{3+} 和 HRP 浓度比逐渐增大时, HRP 活性 (Y) 与浓度比 (X) 的关系式

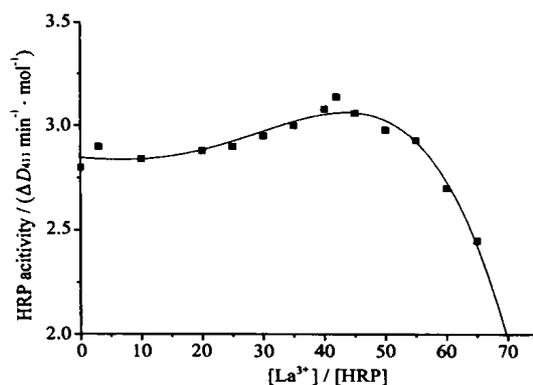


图 1 在模拟生理条件的溶液中, HRP 活性与 La^{3+} 和 HRP 的浓度比的关系曲线

Fig. 1 Relationship between the HRP activity and the molar ratio of La^{3+} and HRP in the mimic physiological solution
HRP concentration: $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

如下, 也呈现典型的“Hormesis 效应”。

$$Y = 2.845 - 0.002X + 4.479 \times 10^{-5}X^2 + 1.160 \times 10^{-5}X^3 - 2.052 \times 10^{-7}X^4$$

2.3 CD 谱研究

图 2 为在模拟生理条件的溶液中, 不含 (曲线 a) 和含 La^{3+} (曲线 b) 时, HRP 在远紫外区的 CD 谱。当溶液中不含 La^{3+} 时, CD 谱中可观察到 209 nm 和 222 nm 处的两个负峰, 它们是由多肽链的酰胺 $\pi-\pi^*$ 和 $n-\pi^*$ 跃迁所致, 归属于 HRP 的 α -螺旋构象^[10, 18]。加入 La^{3+} 后, 209 nm 和 222 nm 处两个负峰峰值明显减小 (曲线 b), 表明 HRP 的二级结构发生了变化。表 2 列出了在模拟生理条件的溶液中, HRP 二级结构随 La^{3+} 和 HRP 的浓度比变化的数据。由表可见, 随着浓度比的增加, HRP 分子中无规卷曲构象减少, 而 β -折叠含量增多。但当浓度比大于 50 时, HRP 分子中无规卷曲构象开始增加, 而 β -折叠含量开始降低, 这一规律与 HRP 活性随 La^{3+} 和 HRP 浓度比的变化相似, 表明 La^{3+} 引起 HRP 分子二级结

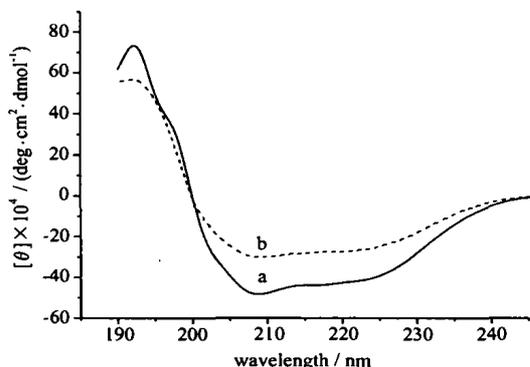


图 2 在模拟生理条件的溶液中, (a) 不含和 (b) 含 $0.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{LaCl}_3$ 时, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP 在远紫外区的 CD 谱

Fig. 2 CD Spectra of (a) $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP and (b) $0.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{LaCl}_3 + 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP in the mimic physiological solution in the far ultraviolet region

表 2 在模拟生理条件的溶液中, La^{3+} 和 HRP 的浓度比不同时 HRP 的二级结构数据

Table 2 Secondary Structures of HRP at Different Concentration Ratios of La^{3+} and HRP in the Mimic Physiological Solution

samples	α -helix / %	β -sheet / %	β -turn / %	random coil / %
HRP	15.2	44.1	12.7	28.0
$[\text{La}^{3+}]: [\text{HRP}] = 3$	14.8	46.8	13.6	24.8
$[\text{La}^{3+}]: [\text{HRP}] = 20$	15.0	46.2	12.6	26.2
$[\text{La}^{3+}]: [\text{HRP}] = 40$	14.7	47.4	12.3	25.6
$[\text{La}^{3+}]: [\text{HRP}] = 42$	14.3	48.2	14.8	22.7
$[\text{La}^{3+}]: [\text{HRP}] = 50$	13.3	44.8	11.6	30.3
$[\text{La}^{3+}]: [\text{HRP}] = 70$	precipitation			

构发生变化与 HRP 活性的变化有关。

图 3 为在模拟生理条件的溶液中, 不含 (曲线 a) 和含 La^{3+} (曲线 b) 时, HRP 在远紫外区的 CD 谱。当溶液中有 La^{3+} 时, HRP 的 Soret 带峰位在 406 nm 处, 与没有 La^{3+} 时相同, 但峰强降低了 22%。因为 HRP 分子的活性中心血红素被多肽链包埋^[19], 这使得 La^{3+} 不能与活性中心直接键合, 而只能与多肽链上的含 O 或含 N 基团相互作用, 导致 HRP 二级结构的变化。但图 3 的结果表明, 由于 La^{3+} 引起的 HRP 二级结构变化会影响血红素的结构, 以致 HRP 的 Soret 带峰强下降并略有红移。

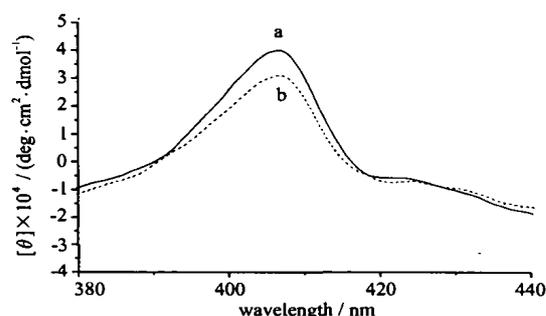


图 3 在模拟生理条件溶液中, (a) 不含和 (b) 含 $0.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{LaCl}_3$ 时, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP 在 Soret 带区的 CD 谱

Fig. 3 CD Spectra of (a) $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP and (b) $0.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{LaCl}_3 + 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP in the mimic physiological solution in the Soret region

2.4 UV-Vis 吸收光谱研究

图 4 为在模拟生理条件的溶液中, 不含 (曲线 a) 和含 La^{3+} (曲线 b) 时, HRP 的 UV-Vis 吸收差光谱。图中 205 nm 和 403 nm 处的峰分别归属于肽链上的酰胺基吸收峰和血红素卟啉环 $\pi-\pi^*$ 跃迁的特征谱带——Soret 带^[20, 21]。与不含 La^{3+} 时相比, 加入 La^{3+} 后, 这两个峰的峰位基本不变, 但 205 nm 处峰强下降 28%, 而 Soret 带下降 18% 并亦略有红移。

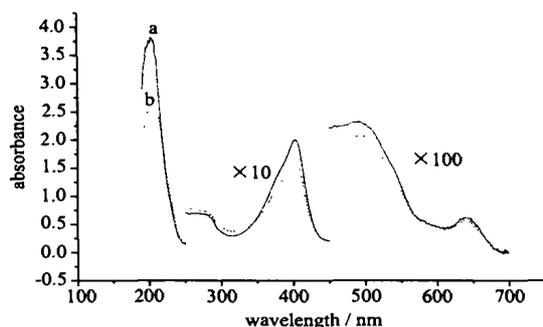


图 4 在模拟生理条件溶液中, (a)不含和(b)含 $0.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{LaCl}_3$ 时, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP 的 UV-Vis 吸收光谱

Fig. 4 UV-Vis absorption spectra of (a) $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP and (b) $0.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{LaCl}_3 + 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP in the mimic physiological solution

这进一步表明, La^{3+} 与多肽链上的含 O 或含 N 基团发生作用, 并对血红素的结构有一定影响。

2.5 FTIR 光谱研究

图 5 为在模拟生理条件的溶液中, 不含 (曲线 a) 和含 La^{3+} (曲线 b) 时, HRP 的 FTIR 光谱。由图可见, La^{3+} 离子的加入使 HRP 的红外光谱中酰胺 I 的 $\nu_{\text{C=O}}$ 吸收和酰胺 III 的 $\nu_{\text{C-N}}$ 吸收分别从 1660 cm^{-1} 和 1265 cm^{-1} 移动到 1670 cm^{-1} 和 1276 cm^{-1} , 而 N-H 伸缩带则从 3381 cm^{-1} 移到 3322 cm^{-1} , 这清楚证明了 La^{3+} 与 HRP 分子多肽链中含 O 或 N 的基团发生键合^[22, 23]。

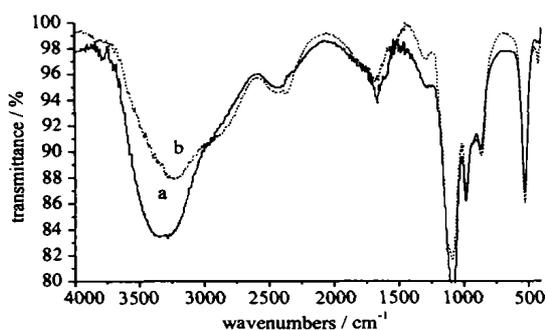


图 5 在模拟生理条件溶液中, (a)不含和(b)含 $0.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{LaCl}_3$ 时, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP 的 FTIR 光谱

Fig. 5 FTIR absorption spectra of (a) $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP and (b) $0.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{LaCl}_3 + 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HRP in the mimic physiological solution

综上所述, La^{3+} 对植物体内、外过氧化物酶活性影响的规律基本一致, 均呈现低促高抑的“Hormesis

效应”。在模拟生理条件的溶液中, La^{3+} 能与 HRP 多肽链中含 O 或 N 的基团键合, 使 HRP 的二级结构发生变化, 进而导致 HRP 活性中心血红素的铁卟啉结构发生一定变化, 进而影响其活性。

参 考 文 献

- [1] XU Guang-Xian (徐光宪) *Rare Earths*, Vol. 3 (稀土), Beijing: Metallurgical Industry Press, 1995, p557 ~ 589.
- [2] NI Jia-Zuan (倪嘉缙) *Bioinorganic Chemistry of Rare Earth Elements* (稀土生物无机化学), Beijing: Science Press, 1995, p18.
- [3] Lu K. K., Chen B. W., Wang K. et al *J. Rare Earth*, 1999, 17(2), 136.
- [4] Zhuang Q. K., Dai H. C., Gao X. X. et al *Bioelectrochemistry*, 2000, 52, 37.
- [5] Zhuang Q. K., Dai H. C. *J. Electroanal. Chem.*, 2001, 499, 24.
- [6] FENG Zhi-Xiang (冯志祥), ZHANG Shu-Gong (张树功), LIU Qi-Min (刘启民) et al *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* (Chemical Journal of Chinese Universities), 1995, 16 (7), 993.
- [7] Huang W. M., Zhang Z. L., Han X. J. et al *Biophys. J.*, 2001, 94, 165.
- [8] Taylor M. D., Carter C. P. *J. Inorg. Nud. Chem.*, 1962, 24, 287.
- [9] Mueller S., Riedel H. D., Stremmel W. *Anal. Biochem.* 1997, 245, 55.
- [10] Chang C. T., Wu C. S., Yang J. T. *Anal. Biochem.*, 1978, 91, 13.
- [11] Robert W. W., Narasimha S. *J. Chem. Phys.*, 1999, 111 (6), 2844.
- [12] Huang X. H., Zhou Q., Zhang J. H. et al *J. Rare Earth*, 2000, 18(3), 244.
- [16] Wakamatsu K., Tahama U. *Plant Physiol.*, 1993, 88, 167.
- [17] Pooviah B. W., Carl L. A. *Plant Physiol.*, 1976, 58, 182.
- [13] Van Assche F., Clijsters H. *Plant Cell Environ.*, 1990, 13, 195.
- [14] Cobbett C. S. *Plant Physiol.* 2000, 123, 825.
- [15] Calabrese E. J., Baldwin L. A. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002, 23(7), 331.
- [18] Myer Y. P. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 2115.
- [19] Welinder K. G. *Febs Letters*, 1976, 72(1), 19.
- [20] Irace G., Bismuto E., Savy F. et al *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 244, 459.
- [21] Quinn. R., Simth J. M., Burstyn J. N. et al *J. Am. Chem.*

Soc., 1984, 106, 4136.

Company: Dordrecht, 1980, p241.

[22] Koenig J. L., Tabb D. L. *Analytical Applications of FTIR to Molecular and Biological Systems*, D. Reidel Publishing

[23] Limay S. N., Saxeuands M. C. *Can. J. Chem.*, 1986, 4, 865.

Effect of Lanthanum Ion on Peroxidase Activity in Plant

ZHANG Xiao-Chun¹ LI Cun¹ LU Tian-Hong^{1,2} DING Xiao-Lan³ ZHOU Qing⁴ HUANG Xiao-Hua^{*.1.4}

(¹ College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

(² Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

(³ Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084)

(⁴ School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214063)

It is reported for the first time that the interaction between La^{3+} and POD in the plant was compared with that the interaction between La^{3+} and HRP in the mimic physiological solution. It was found that in the plant, La^{3+} could obviously change the activity of POD and show the "Hormesis effect". The results of the investigation of the interaction between La^{3+} and HRP using CD spectroscopy, UV-Vis absorption spectroscopy and FTIR spectroscopy indicated that the interaction between La^{3+} and HRP in the mimic physiological solution also showed the "Hormesis effect". It was found that La^{3+} could bond to O or N group of the amides in the polypeptide chains of HRP and thus cause the change in the secondary structure of HRP. It would change in the structure of the porphyrin group in the heme group of HRP and lead the change in the catalytic activity of HRP.

Keywords: lanthanum ion peroxidases horseradish peroxidase activity