

羊栖菜中微量金属元素的亚细胞分区分布

赵艳芳[#] 尚德荣[#] 宁劲松 翟毓秀 盛晓风

(农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 运用亚细胞分级方法分析羊栖菜亚细胞组分中 6 种必需元素 Cu、Fe、Mn、Zn、Mg、Ca 以及有害元素 Cd、Pb、Al、As 的含量, 以揭示羊栖菜中不同微量元素的亚细胞分区分布特征, 探讨其特异性富集砷的特性。研究表明, Cu、Fe、Mn、Zn、Ca、Mg 等必需微量元素主要储存在细胞壁中, 而在胞液和细胞器中的分布特征不同。对于 Al、Cd 和 Pb, 细胞壁中的浓度远高于细胞器和胞液, 但是对于 As, 胞液是最主要的储存部位, 分布比例约为 58%, 其次为细胞壁(约为 26%~27%), 最后为细胞器(约为 15%~16%)。通过本研究推断胞液对 As 的区隔化作用很可能是羊栖菜特异性富集 As 和解毒 As 的重要原因。

关键词 羊栖菜 特异性富集 微量元素 亚细胞分级

中图分类号 X171.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)06-0118-06

Subcellular distributions of trace metals in *Sargassum fusiforme*

ZHAO Yan-fang[#] SHANG De-rong[#] NING Jin-song

ZHAI Yu-xiu SHENG Xiao-feng

(Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The subcellular distributions of Cu, Fe, Mn, Zn, Mg, Ca, Cd, Pb, Al, and As in *Sargassum fusiforme* were examined in order to reveal the distributional characteristics of different elements and the mechanism of its special hyperaccumulation of As. The results indicated that Cu, Fe, Mn, Zn, Ca and Mg were mainly stored in the plant cell walls, and the distributional patterns in cytoplasmic supernatant and cell organelles were different. The concentrations of Al, Cd and Pb in the cell walls were much higher than those in either cytoplasmic supernatant or cell organelles. However, the subcellular distributions of As showed a decreasing trend as: cytoplasmic supernatant (58%) > cell wall (26%-27%) > cell organelles (15%-16%), indicating that the cytoplasmic supernatant was the main storage for As in *S. fusiforme*. The present study suggests that the isolation of As in cytoplasmic supernatant may be an important mechanism for accumulation of As in *S. fusiforme*.

中央级科研院所基本科研业务费(20603022012016)资助

[#] 共同第一作者

收稿日期: 2012-07-03; 接受日期: 2012-12-20

作者简介: 赵艳芳(1979-), 女, 博士, 主要从事元素形态分析及水产品风险评估研究。E-mail: zhaoyf@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85836348

尚德荣(1960-), 女, 高级实验师, 主要从事元素形态分析及水产品风险评估研究。E-mail: shangdr@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85836348

KEY WORDS *Sargassum fusiforme* Special hyperaccumulation Trace metals
Subcellular distributions

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* 又名海大麦、海菜芽、海茜菜、大麦菜等,属褐藻类马尾科植物,在我国分布很广,北起辽东半岛、山东,南至浙江、福建和广东,浅海及滩头均有生长,是一种重要的经济海藻资源。羊栖菜味苦咸,性寒,具软坚散结、利水消肿、泻热化痰之功能。食用羊栖菜可防治高血压、便秘、肥胖、衰老、甲状腺机能障碍,对促进儿童发育、增强智力、恢复大脑疲劳、保持毛发光泽、皮肤润滑、增强人体免疫力、促进机体活力等有明显作用。羊栖菜中的岩藻甾醇和马尾藻甾醇还可保持生物内环境稳定、控制糖原和矿物质的代谢、调节应激反应、防治癌症、明显降低血中胆固醇等(Lee *et al.*, 2003)。羊栖菜含有较高的微量元素,人称“长寿菜”(陈耀祖等 1996)。但是,羊栖菜能将海水中的砷浓缩 3~6 万倍,含砷量达 100mg/kg 以上(安达修一 1971;孙建璋等 2004)。羊栖菜富集砷的特性引发了对其是否可以安全食用的讨论,英国食品安全局建议消费者不要食用羊栖菜(FSA 2004; COT 2004)。

研究元素在超富集植物中的微区分布有助于认识细胞中元素的生理活动和解释重金属富集、解毒机制。通过亚细胞分级方法分离出亚细胞组分后,用化学分析手段测定重金属元素的浓度,可以提供重金属元素的亚细胞分布信息。国内外研究者曾先后采用该方法对植物体内重金属的分布进行了研究。Ramos 等(2002)采用亚细胞分级方法对莴苣中 Cd 的亚细胞分布进行了研究,万敏等(2003)采用该分级方法揭示了不同镉积累类型小麦中镉的亚细胞分布存在差异,陈同斌等(2005)采用该方法对蜈蚣草中砷的亚细胞分布与区隔化作用进行了研究,廖晓勇等(2007)采用亚细胞分离方法研究了蜈蚣草中砷、钙的亚细胞分布特征,但是目前尚没有有关羊栖菜中微量元素的亚细胞分布特征研究的报道,因此本研究拟采用亚细胞分级方法分离出各个亚细胞组分之后,采用化学分析方法测定各亚细胞组分中必需元素 Cu、Fe、Mn、Zn、Mg、Ca 以及有害元素 Cd、Pb、Al、As 的浓度,以期从亚细胞水平揭示羊栖菜中不同微量元素的分布特征,探讨其特异性富集砷的特性。

1 材料与方法

1.1 材料

羊栖菜样品于 2012 年 5 月底采自山东省胶南市某养殖厂,植株先用自来水洗净,再用超纯水冲洗 3 遍,用纱布吸干表面水分。分别称取茎、叶鲜样各 1.000g,用于亚细胞分级实验。

1.2 羊栖菜茎和叶亚细胞组分的分离

参照 Hans(1980)及 Pathore 等(1972)建立的亚细胞分级方法,采用在 4℃ 预冷的缓冲液中将羊栖菜茎和叶研磨匀浆。缓冲液组成为:蔗糖 250 mmol/L, Tris-HCl(pH 7.5)50mmol/L, β-巯基乙醇 1 mmol/L。所有匀浆过程和分离过程温度均控制在 4℃。具体步骤如下:用 15 ml 缓冲液将组织研磨成浆后,转入 50 ml 离心管中,将组织匀浆液在高速冷冻离心机中于 300×g 离心 30 s,下部沉淀、底层碎片为细胞壁组分。上清液在 20 000×g 离心 45 min,底层碎片为细胞器组分,上层清液为胞液组分(包括细胞质及液泡内大分子有机物及无机离子)。

1.3 微量元素分析

分离后的细胞壁、细胞器和胞液中加入 HNO₃:HClO₄(4:1)的酸混合液,转入 100ml 玻璃消化管中,于控温消化炉中消化至消化液澄清透明或微带黄色(最后体积约为 1~2ml),冷却后加二次蒸馏水稀释至 100ml 后待测。样品中的 Cu、Fe、Mn、Zn、Mg、Ca、Cd、Pb、Al、As 等微量元素用电感耦合等离子体质谱仪(ELAN DRC II, Perkin Elmer)测定。分析中所用试剂均为优级纯,并采用国家标准参比物质(海带成分分析标准物质 GBW 08517)进行分析质量控制。亚细胞分离过程中,各微量元素的总回收率为 92%~103%。

1.4 数据统计方法

计算每一组数据平均值和标准差,运用 SPSS 16.0 数据分析软件对每种元素在不同亚细胞组分的含量分布进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),差异显著后进行 Turkey's 多重比较,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果与分析

羊栖菜茎和叶中必需微量元素 Cu、Fe、Mn、Zn、Mg、Ca 在不同亚细胞组分中的分布特征见表 1。从表 1 中可见,对于所有元素,茎和叶中各亚细胞组分中细胞壁的含量显著高于细胞器和胞液中($P < 0.05$)。无论是茎组织还是叶组织中,Mg 含量顺序均为细胞壁>胞液>细胞器,且茎组织细胞壁中的含量显著高于叶组织细胞壁,但是对于细胞器和胞液组分,两组织中无显著性差异;Ca 在茎和叶组织中亚细胞组分中的分布规律与 Mg 相同;Mn 在茎和叶细胞壁中的含量相似,但是叶组织中细胞器和胞液中的含量均显著高于茎组织中($P < 0.05$),另外,在茎组织和叶组织中,3 种亚细胞组分中的含量顺序与 Mg、Ca 的分布特征相似,即细胞壁>胞液>细胞器;叶组织细胞壁中 Fe 的含量最高,且无论是茎组织还是叶组织中,含量顺序为细胞壁>细胞器>胞液;茎组织和叶组织中 Cu 的含量顺序与 Mg、Ca 和 Mn 相似,均为细胞壁>胞液>细胞器;而对于 Zn,叶组织 3 种亚细胞组分中的含量分别显著高于茎各亚细胞组分($P < 0.05$)。另外,不同于其他元素,茎和叶中的 Zn 在细胞器和胞液中的含量相似,即细胞壁>细胞器≈胞液。

表 1 羊栖菜中不同必需元素的亚细胞分布

Table 1 Content of essential elements in different subcellular fractions of *S. fusiforme*

亚细胞 Subcellular fraction		元素浓度(湿重)Concentration (mg/kg fresh weight)					
		Mg	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
茎 Stem	细胞壁 Cell wall	$(4.09 \pm 0.16) \times 10^3^a$	$(1.21 \pm 0.01) \times 10^3^a$	17.2 ± 0.45^a	66.6 ± 2.5^b	1.01 ± 0.05^a	2.41 ± 0.14^b
	细胞器 Cell organelle	316 ± 22^d	78.8 ± 5.6^d	1.15 ± 0.02^e	10.2 ± 0.51^{cd}	0.160 ± 0.01^e	0.707 ± 0.02^d
	胞液 Cytoplasmic supernatant	$(2.90 \pm 0.08) \times 10^3^{bc}$	177 ± 15^c	6.27 ± 0.13^c	7.48 ± 0.26^{de}	0.580 ± 0.02^c	0.669 ± 0.02^d
	总计 Sum	7.31×10^3	1.46×10^3	24.6	84.3	1.75	3.79
叶 Leaf	细胞壁 Cell wall	$(2.93 \pm 0.12) \times 10^3^b$	$(1.11 \pm 0.03) \times 10^3^b$	17.1 ± 0.05^a	78.7 ± 1.4^a	0.807 ± 0.02^b	3.26 ± 0.11^a
	细胞器 Cell organelle	314 ± 15^d	86.1 ± 5.2^d	1.95 ± 0.08^d	12.5 ± 0.88^c	0.225 ± 0.01^e	0.927 ± 0.023^c
	胞液 Cytoplasmic supernatant	$(2.66 \pm 0.10) \times 10^3^c$	199 ± 11^c	10.6 ± 0.04^b	5.92 ± 0.23^c	0.480 ± 0.01^d	0.932 ± 0.019^c
	总计 Sum	5.90×10^3	1.40×10^3	29.6	97.1	1.51	5.12

注:不同英文小写字母表示数值之间差异显著($P < 0.05$)

Note: Values designated by different letters are significantly different ($P < 0.05$)

羊栖菜茎和叶组织中各种必需元素在不同亚细胞组分中所占的相对比例见图 1。从图 1 中可见,Mg 分布在茎组织细胞壁的比例为 56%,胞液中的分布比例为 40%,分布在叶组织细胞壁和胞液中的比例分别为 50%和 45%。而 Ca 和 Fe 分布在茎和叶组织细胞壁的比例均为 80%左右,但是 Ca 分布在胞液中的比例大于细胞器组分,Fe 在细胞器组分中的比例大于胞液。对于 Mn 和 Cu,3 个亚细胞组分的分布比例均是细胞壁>胞液>细胞器,而对于 Zn,分布在茎和叶细胞壁中的比例均为 63%,分布在胞液和细胞器中的比例相似,均为 18%左右。

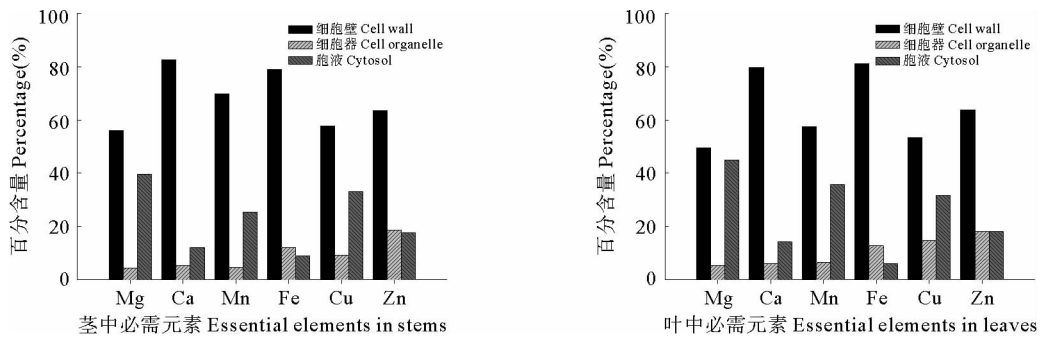


图 1 羊栖菜中不同必需元素在不同亚细胞组分中分布的相对比例

Fig. 1 The percentage of different essential elements in different subcellular fractions of *S. fusiforme*

各亚细胞组分中 Cd、Pb、Al、As 等有害元素的含量见表 2。从表 2 中可见,茎和叶细胞壁中 Al、Cd 和 Pb 的浓度远高于细胞器和胞液中的含量 ($P < 0.05$),但是对于 As,胞液组分中的浓度最高。叶组织细胞壁 Al 中的含量显著高于茎组织细胞壁 ($P < 0.05$),且茎和叶组织亚细胞组分中的分布顺序为细胞壁 > 细胞器 > 胞液;对于 As,叶组织胞液中的含量最高,且显著性高于茎组织胞液中的含量 ($P < 0.05$),As 在茎和叶组织亚细胞组分中的分布顺序为胞液 > 细胞壁 > 细胞器;茎和叶细胞壁中 Cd 的含量相似,且均显著高于细胞器和胞液,在茎和叶组织亚细胞组分中的分布顺序为细胞壁 > 细胞器 ≈ 胞液;茎和叶组织亚细胞组分中 Pb 的分布顺序为细胞壁 > 胞液 > 细胞器。

表 2 羊栖菜中主要有毒元素的亚细胞分布

Table 2 Content of harmful elements in different subcellular fractions of *S. fusiforme*

亚细胞 Subcellular fraction		元素浓度(湿重)Concentration (mg/kg fresh weight)			
		Al	As	Cd	Pb
茎 Stem	细胞壁 Cell wall	83.9 ± 3.8 ^b	8.12 ± 0.42 ^c	0.278 ± 0.021 ^a	0.621 ± 0.004 8 ^a
	细胞器 Cell organelle	29.3 ± 1.0 ^c	5.03 ± 0.28 ^d	0.050 3 ± 0.001 1 ^b	0.084 5 ± 0.002 1 ^e
	胞液 Cytoplasmic supernatant	11.0 ± 1.0 ^d	18.1 ± 1.2 ^b	0.055 9 ± 0.002 0 ^b	0.125 ± 0.010 ^d
	总计 Sum	124	31.2	0.384	0.830
叶 Leaf	细胞壁 Cell wall	130 ± 5.8 ^a	10.2 ± 0.86 ^c	0.253 ± 0.014 ^a	0.558 ± 0.021 ^b
	细胞器 Cell organelle	36.7 ± 2.6 ^c	5.71 ± 0.22 ^d	0.059 3 ± 0.001 0 ^b	0.125 ± 0.011 ^d
	胞液 Cytoplasmic supernatant	2.82 ± 0.26 ^d	21.8 ± 1.5 ^a	0.056 4 ± 0.001 6 ^b	0.173 ± 0.002 4 ^c
	总计 Sum	170	37.7	0.369	0.856

注:不同英文小写字母表示数值之间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Values designated by different letters are significantly different ($P < 0.05$)

各有害元素在不同亚细胞组分的分布比例见图 2。从图 2 中可见,茎和叶组织细胞壁中 Al 的百分比最高,分别是 68% 和 77%,细胞器中所占的百分比均为 22% 左右。茎和叶细胞壁中 Cd 的百分比最高,为 70% 左右,而细胞器和胞液组分中的所占比例相似。茎和叶细胞壁中 Pb 的百分比分别为 75% 和 65%。但是 As 在胞液组分中的分布比例最高,茎和叶中的百分比均为 58%,其次为细胞壁,百分比为 26%~27%,最后为细胞器,所占百分比为 15%~16%。

3 讨论

植物为尽量避免损害功能性相对重要的组织如细胞器,会对重金属元素表现出选择性的分配。重金属元素在非原生质体部位的积累以及细胞内的区隔化分布是重要的两个途径。因此重金属的亚细胞分布研究有助

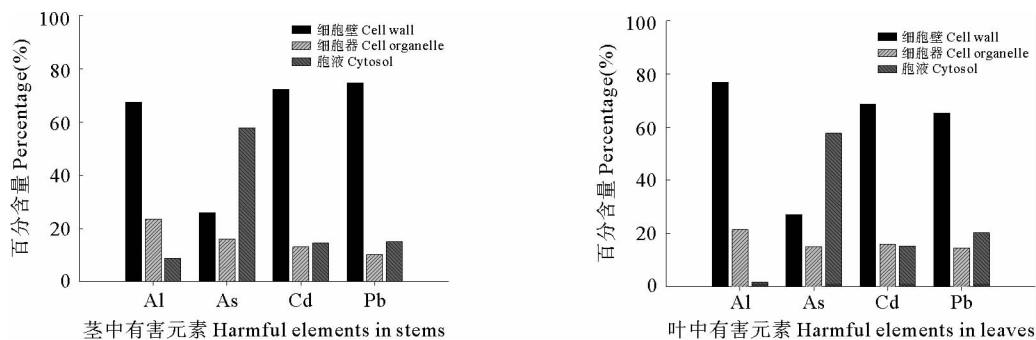


图2 羊栖菜中主要有毒元素在不同亚细胞组分中分布的相对比例

Fig. 2 The percentage of main harmful metals in different subcellular fractions of *S. fusiforme*

于确定该元素对细胞活动的影响。本研究发现,羊栖菜中的 Cu、Fe、Mn、Zn、Mg、Ca、Al、Cd、Pb 等微量元素主要储存在细胞壁中,所占相对比例约在 60%~80%之间。该研究结论与以前的研究结论相似,如对于禾秆蹄盖蕨 *Athyrium yokoscense*,大约有 70%~90%的 Cu、Zn、Cd 贮存在细胞壁中(Nishizono *et al.* 1987)。并且对于 Cd 超富集植物 *T. caerulea* 及非超富集植物 *Nicotiana tabacum*,大部分 Cd 分布在细胞壁中(Boominathan *et al.* 2003)。对于砷超富集植物蜈蚣草,各亚细胞组分中钙含量的分布为:细胞壁最高,胞液其次,细胞器最低(廖晓勇等 2007)。这是因为在以细胞壁为主体的非原生质体中,多糖分子和蛋白质分子含有大量羟基、羧基、醛基、氨基和磷酸基等亲金属离子的配位基团(Hayens 1980),可与金属离子配位而储藏部分金属,减少这些离子的跨膜运输,降低原生质体的金属浓度,以维持细胞的正常生理代谢(Allen *et al.* 1989),因此羊栖菜细胞壁是大部分重金属元素的主要贮存部位。

比较本研究羊栖菜茎和叶组织中 10 种元素在各亚细胞组分中的分布比例可见,不同元素在亚细胞组分中的分布特征不同。对于 Mg、Ca、Mn、Cu、Pb,3 个组分中的分布顺序相同,均为细胞壁>胞液>细胞器,而 Fe 和 Al 的分布顺序为细胞壁>细胞器>胞液。Mg、Cu、Mn、Fe、Zn、Ca 等是植物生长的必需微量元素,是植物生命活动的调节物质,作为酶和植物生长物质的组分,是许多酶的组分和激活剂,并且起电化学的作用,维持细胞的渗透势等功能,因此不同元素的分布特征与其不同的生理功能密切相关。Fe 和 Ca 是植物体内移动能力较弱的元素,再加上细胞壁是植物细胞最大的钙库,因此羊栖菜茎和叶组织细胞壁中的 Ca 和 Fe 所占相对比例最高,为 80%左右。另外,由于 Cd、Zn 是流动性比较强的离子,在电镜下观察时发现,植物细胞的细胞壁、质膜和液泡膜以及部分细胞器和细胞质中都有分布(徐勤松等 2002)。本研究也证明羊栖菜茎和叶组织细胞中 Zn、Cd 在细胞器和细胞胞液中的分布比例相似。

与其他元素的分布特征不同,胞液是羊栖菜中 As 的主要贮存部位。As 在羊栖菜胞液中的分布比例为 58%。陈同斌等(2005)也指出砷超富集植物蜈蚣草羽片胞液是砷的主要储存部位,整株植物累积的砷有 61% 富集在羽片胞液中。植物的胞液组分由细胞液和液泡泡液两部分组成,细胞液是细胞新陈代谢的主要场所,液泡的主要功能是参与细胞的水分代谢,同时也是植物细胞代谢副产品及废物囤积的场所(汪良驹等 1998)。因此细胞液中的重金属浓度应低于液泡泡液,以保证细胞正常的生理代谢活动(Hall 2002)。前人在研究镍、锌等超富集植物的解毒机理时发现,超富集植物 *Alyssum serpyllifolium* 细胞中 72% 的镍分布在液泡中(Brooks *et al.* 1981),通过比较超富集植物 *Thlaspi goesingense* Hálácsy 和非超富集植物 *T. arvense* L. 的液泡对镍的区隔化效应发现,前者液泡内的镍含量是后者的两倍(Kramer *et al.* 2000);锌在超富集植物 *T. caerulea* 中主要分布于表皮细胞的液泡中(Frey *et al.* 2000)。因此推断羊栖菜胞液中的 As 可能主要被隔离在液泡中。羊栖菜对砷具有超富集作用,能将海水中的砷浓缩 3 万倍~6 万倍。当细胞壁结合的 As 离子达到饱和点时,进入细胞内的大部分离子就被转移到液泡中贮存起来,即把 As 区隔化。综上所述,细胞胞液对 As 的区隔化作用以及细胞壁的沉淀作用可能是羊栖菜在亚细胞水平上对 As 的超富集和高耐性的主要机制。

参 考 文 献

- 万 敏, 周 卫, 林 葆. 2003. 镉积累不同类型的小麦细胞镉的亚细胞和分子分布. 中国农业科学, 36(6): 671-675
- 孙建璋, 孙庆海. 2004. 海带(*Laminaria japonica* Aresch)含砷问题的探讨. 现代渔业信息, 19(12): 25-27
- 陈同斌, 阎秀兰, 廖晓勇, 肖细元, 黄泽春, 谢 华, 翟丽梅. 2005. 蜈蚣草中砷的亚细胞分布与区隔化作用. 科学通报, 50(24): 2739-2744
- 陈耀祖, 潘远江, 莫卫民. 1996. 东海药用海藻化学成分分析研究(1)羊栖菜中微量元素分析. 浙江大学学报, 30(4): 471-473
- 汪良驹, 刘友良. 1998. 植物细胞中的液泡及其生理功能. 植物生理学通讯, 34(5): 394-400
- 徐勤松, 施国新, 杜开和. 2002. 重金属镉、锌在菹草叶细胞中的超微定位观察. 云南植物研究, 24(2): 241-244
- 廖晓勇, 谢 华, 陈同斌, 肖细元, 阎秀兰, 翟丽梅, 武 斌. 2007. 蜈蚣草的超微结构和砷、钙的亚细胞分布. 植物营养与肥料学报, 13(2): 305-312
- Allen DL, Jarrell WM. 1989. Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls. Plant Physiol 89(3): 823-832
- Boominathan R, Doran PM. 2003. Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. J Biotechnol 101(2): 131-146
- Brooks RR, Shaw S, Asensi MA. 1981. The chemical form and physiological function of nickel in some Iberian Alyssum species. Plant Physiol 51(2): 167-170
- Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COT), 2004. Tox/ 2004/35. Urgent COT Opinion on Arsenic in Seaweed, <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/TOx-2004-35.PDF>>
- Food Standards Agency (FSA). 2004. Food Survey Information Sheet 61/04: Arsenic in seaweed, <<http://www.food.gov.uk/science/surveillance/fsis2004branch/fsis6104>>
- Frey B, Keller C, Zierold K. 2000. Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant Cell Environ 23(7): 675-687
- Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J Exp Bot 53(366): 1-11
- Hans JW. 1980. Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean plant. Plant Physiol 65(3): 480-482
- Hayens RJ. 1980. Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: Their role in ion accumulation by plants. Bot Rev 46: 75-99
- Kramer U, Pickering IJ, Prince RC. 2000. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. Plant Physiol 122(4): 1343-1353
- Lee S, Lee YS, Jung SH and 2 others. 2003. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. Arch Pharm Res 26(9): 719-722
- Nishizono H, Ichikawa H, Suzuki S. 1987. The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*. Plant Soil 101(1): 15-20
- Pathore VS, Bajat YPS, Wittwer SH. 1972. Subcellular localization of zinc and calcium in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) tissues. Plant Physiol 49(2): 207-211
- Ramos I, Esteban E, Lucena JJ. 2002. Cadmium uptake and sub-cellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. Plant Sci 162(5): 761-767