

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210811003

陈卓, 胡芯, 唐洪玉. 黑藻(*Hydrilla verticillat*)在铅、锌胁迫下的代谢组学研究[J]. 生态毒理学报,2022, 17(4): 405-416 Chen Z, Hu X, Tang H Y. Metabolomics study of *Hydrilla verticillata* under heavy metal stress of lead and zinc [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(4): 405-416 (in Chinese)

黑藻(Hydrilla verticillat)在铅、锌胁迫下的代谢组学研究

陈卓, 胡芯, 唐洪玉*

西南大学水产学院,重庆 400000 **收稿日期:**2021-08-11 录用日期:2021-11-14

摘要:黑藻(*Hydrilla verticillat*)作为我国淡水水域常见的沉水植物,对水环境重金属污染修复有着重要作用。通过超高效液相 色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)技术检测了黑藻中 342 个初级代谢产物,并采用单变量、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法 判别分析(OPLS-DA)多元统计分析方法分析代谢物,以探究在不同浓度铅、锌胁迫下黑藻初级代谢产物的变化特性,弄清铅、 锌对生物体代谢活动的影响。结果表明,铅单一胁迫主要促进黑藻机体酚酸类和糖类物质的生成,抑制脂类的生成,N-苯乙 酰基-L-谷氨酰胺和异水杨酸-O-葡萄糖显著上调,相比单一铅胁迫,铅锌复合胁迫主要促进黑藻氨基酸、糖类、有机酸和脂质 等代谢物的合成,抑制酚酸类、维生素和脂质等代谢物的合成;锌单一胁迫主要促进氨基酸、核苷酸、糖类和有机酸等代谢物 的生成,抑制部分酚酸类和脂质代谢物的生成,相比单一锌胁迫,高浓度铅锌复合胁迫(Pb0.10+Zn2.00)可主要促进酚酸类、核 苷酸、有机酸和脂质等代谢物的合成,抑制以谷胱甘肽为代表的氨基酸等代谢物的合成;超高浓度铅锌复合胁迫(Pb0.20+ Zn4.00)可主要促进对苯二甲酸(C₈H₆O₄)和去鼠李糖异洋丁香酚苷 B(C₂₃H₂₆O₁₁)2 种酚酸类代谢物的合成,抑制氨基酸、核苷 酸、维生素和有机酸等代谢物的合成。另外,N-苯乙酰基-L-谷氨酰胺(C₁₃H₁₆O₈)可作为铅胁迫的代谢标记物,5-氨基戊酸(C₃H₁₁NO₂)、 L-(+)-精氨酸(C₆H₁₄N₄O₂)和 L-焦谷氨酸(C₅H₇NO₃)等可作为锌胁迫的代谢标记物。 关键词:铅;锌:黑藻;植物毒性;代谢组学

文章编号: 1673-5897(2022)4-405-12 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Metabolomics Study of *Hydrilla verticillata* under Heavy Metal Stress of Lead and Zinc

Chen Zhuo, Hu Xin, Tang Hongyu*

College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400000, ChinaReceived 11 August 2021accepted 14 November 2021

Abstract: *Hydrilla verticillata*, a common submerged plant in freshwater of China, has a certain adsorption effect on heavy metals, which made it play an important role in water environment protection. Excessive lead accumulation could affect the growth and physiological metabolism in plants, meanwhile, even cause plant death. As the associated metal of lead, zinc is one of the necessary elements of organisms, but when its content exceeds the micro-demand required, it will cause a certain degree of damage to the body. Three hundred and forty-two primary me-

基金项目:重庆市生态渔产业技术体系项目(4322000112201903)

第一作者:陈卓(1996—),男,硕士研究生,研究方向为水产养殖,E-mail: 824692392@qq.com

^{*} 通讯作者(Corresponding author), E-mail: thy1970@163.com

tabolites in *H. verticillata* were detected by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) detection technology. We explored the changes of the first metabolites and the metabolism activities in H. verticillata under 28-day stress of different concentrations of lead-zinc by univariate, principal part-related analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The results showed that single lead stress mainly increased the production of phenolic acids and saccharides in H. verticillata and inhibited the production of lipids, which involved physiological processes such as phenylalanine metabolism, carbohydrate metabolism and biosynthesis of secondary metabolites. It indicated phenolic acids and carbohydrates played a major role in resistance under lead stress. While lead-zinc combined stress promoted the yield of amino acids, sugars, organic acids and lipids, and depressed the production of phenolic acids, vitamins and lipids. Single stress of zinc mainly increased the production of amino acids, nucleotides, saccharides and organic acids, and inhibited the content of phenolic acids and lipid metabolites. The physiological processes relates to citrate cycle (TCA cycle), arginine and proline metabolism, carbohydrate metabolism, biosynthesis of secondary metabolites, carbon metabolism and ABC transporter metabolism. Amino acids, nucleotides, carbohydrates and other substances take protective action on the body after subjected to external environmental stress, indicating that the body has carried out metabolic regulation to combat stress. Compared with single zinc stress, high-concentration lead-zinc combined stress (Pb0.10 +Zn2.00) mainly promoted to increase the content of phenolic acids, nucleotides, organic acids and lipids, and depressed the production of amino acids represented by oxidized glutathione. In addition, the ultra-high concentration of lead and zinc combined stress (Pb0.20+Zn4.00) mainly increased the production of phenolic acid (terephthalic acid and calceorioside B), and inhibited the content of amino acids, nucleotides, vitamins and organic acids. Consequently, phenylacetyl-L-glutamine, L-tyramine, p-coumaroylcaffeoyl tartaric acid, glucogallin and isosalicylic acid O-glycoside could be used as metabolism markers in H. verticillata under lead stress, while 5-aminovaleric acid, L-(+)-arginine and L-pyroglutamic acid could be used as metabolism markers in *H. verticillata* under zinc stress. Keywords: lead; zinc; Hydrilla verticillata; hytotoxicity; metabolomics

水体中的铅锌常为相伴重金属,其主要来源为 铅锌矿开采、冶炼、电池加工等工业活动。铅作为 "重金属五毒"之一,其在植物体内聚集过量会抑制 植物的生长以及影响植物的生理代谢过程,严重时 还可导致植物的死亡^[1]。过量的铅进入人体会影响 人体的神经、消化和造血系统,如果进入孕妇体内还 会影响胎儿的智力。而锌作为铅的伴生金属,其本 身是生物体的必需元素之一,但当其含量超过机体 所需的微量需求时,同样会对机体造成一定程度的 伤害^[2]。黑藻(*Hydrilla verticillat*)又常被称为轮叶黑 藻,分类上属于水鳖科(Hydrocharitaceae),黑藻属 (*Hydrilla* Rich),是我国水产养殖中常见的敏感性植 物。其对重金属的吸附作用一直受到研究者的关 注^[3-10],可作为重金属污染环境修复植物和水体污 染的指示植物^[11-12]。

代谢组学(metabonomics/metabolomics)是继基因 组学、转录组学及蛋白质组学之后发展起来的一门 新兴学科,其概念是由 Nicholson 于 1999 年提出,指 通过对细胞、组织或生物体内所有低分子量代谢物

的定性和定量分析研究,阐明各代谢物变化规律,探 讨各种刺激因素对机体产生的影响,从小分子代谢 物视角揭示生命活动的本质和过程[13-14],通过研究 它们能更灵敏更准确地获知机体状态及动态变化过 程[15-16]。代谢组学、基因组学、转录组学及蛋白质组 学均属于系统生物学组成部分,其研究思想类似,且 彼此之间有着密切联系,但同时又有着明显的区 别^[17]。在外界环境刺激下,生物体内会发生一系列 代谢,但不是每次刺激都会对其基因和蛋白造成显 著影响,而研究机体代谢产物的代谢组学能真正反 映出机体已经发生的事件[18]。因此借助代谢组学的 技术来评价环境污染物暴露带来的毒性效应优势明 显,特别是在低剂量或环境剂量污染物的毒性效应 评价方面^[19]。目前关于藻类在重金属胁迫等方面的 研究主要是在高浓度、单一胁迫下的吸附效果及生 理生化指标研究,对多种重金属胁迫下黑藻的生理 响应研究较少,尤其是铅锌胁迫下初生代谢产物研 究更是未见报道。本试验通过对铅、锌单一胁迫与 铅锌复合胁迫下黑藻的初级代谢产物研究,从多个 层面分析其在不同胁迫情况下的代谢差异,探究黑藻 在面对铅锌胁迫后的响应及作用机制,填补相关研究 的空白并以期为铅锌胁迫对黑藻代谢物影响的后续 研究提供基础数据,为铅锌污染检测提供理论依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 试验材料及处理

试验材料取自西南大学水产学院实验教学中心 实习实训基地。将采集到的黑藻清洗干净后移入室 内水池,用改良后的 10% Hoagland 营养液^[20]进行 培养驯化,温度为(25±0.4) ℃,pH 6.5±0.2,光照周期 为 12 h :12 h(L : D),每 2 天更换一次培养液,每天 用 HNO₃ 或 NaOH 调节 pH 值。培养 1 个月后,选 取新长茎叶且长势一致的黑藻进行正式试验。

1.2 黑藻培养及试验条件

正式试验容器为透明整理箱(400 mm×300 mm×200 mm),底部采用固植板将黑藻固定住,试验条件管理同驯化期一致。培养一周后进行铅、锌(分别以 Pb(NO₃)₂和 ZnSO₄·7H₂O形式加入水体中)胁迫,试验采用二因素设计,铅、锌各浓度设置参照《地表水环境质量标准》(GB 3838—2002)中的V类和超V类标准浓度值,具体处理设置如表1所示,共7个处理,每个处理3个平行。在处理28d后采集对照组S1(CK)和处理组S4(Pb0.10)、S5(Pb0.20)、S16(Zn2.00)、S21(Zn4.00)、S19(Pb0.10+Zn2.00)、S25(Pb0.20+Zn4.00)的黑藻茎叶,液氮处理后放置于-80℃冰箱保存。其中每个处理组3个生物学重复。

1.3 代谢物提取

(1)选取生长状况相似的黑藻茎叶,液氮处理后 置于-80 ℃冰箱保存;(2)将保存样品放置于冻干机 中真空冷冻干燥;(3)冷冻干燥后的样品利用研磨仪 在 30 Hz 下研磨 1.5 min 至粉末状;(4)研磨后称取 100 mg 粉末状样品,置于 0.6 mL 70% 甲醇提取液 中溶解;(5)将溶解后的样品置于 4 ℃冰箱过夜提 取,期间涡旋 6 次,以提高提取率;(6)处理后的样品 在 10 000 g下离心 10 min,吸取上清,用微孔滤膜 (0.22 μm)过滤样品,并保存于进样瓶中,并采用超 高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)检测分析。 1.4 色谱质谱条件

1.4.1 液相色谱条件

色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 1.8 μm,2.1 mm×100 mm;流动相:A 相为超纯水(加 入 0.04% 的乙酸),B 相为乙腈(加入 0.04% 的乙酸); 洗脱梯度:0.00 min B 相比例为 5%,10.00 min 内 B 相比例线性增加到 95%,并维持在 95% 1 min, 11.00~11.10 min,B 相比例降为 5%,并以 5% 平衡 至 14 min;流速 0.35 mL·min⁻¹;柱温 40℃;进样量 4 μL。

1.4.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI)温度设置为550℃,质谱电 压设置为5500V,帘气(CUR)206850Pa,碰撞诱导 电离(CAD)参数设置为高。在三重四级杆(QQQ)中, 每个离子对根据优化的去簇电压(DP)和碰撞能(CE) 进行扫描检测。

1.5 数据处理与分析

采用 UPLC-MS/MS 检测技术,利用构建的植物 初生代谢物数据库,智能二级谱匹配方法对物质定 性,采用三重四级杆质谱的多反应监测模式(MRM) 检测物质相对含量,随后利用软件 Analystl.6.3 处理 质谱数据。通过三重四级杆筛选出每个物质的特征 离子,在检测器中获得特征离子的信号强度(CPS), 用 MultiaQuant 软件进行色谱峰的积分和校正工作。 本试验采用单变量、主成分分析(PCA)和正交偏最 小二乘法判别分析(OPLS-DA)多元统计分析方法, 对代谢物进行定性定量分析。

单变量统计分析方法包括参数检验和非参数检验。多元统计方法 PCA 用 R 软件(www.r-project. org/)内置统计 prcomp 函数,设置 prcomp 函数参数 scale=True,对数据进行归一化。OPLS-DA 在原始 数据进行 log2 转换后,再进行中心化处理,利用 R

Table 1 The settings of treatment group			
$Pb^{2+}/(mg \cdot L^{-1})$	$Zn^{2+}/(mg \cdot L^{-1})$		
	0.00	2.00(V类 V class)	4.00(>V类>V class)
0.00	СК	Zn2.00	Zn4.00
0.10(V类 V class)	Pb0.10	Pb0.10+Zn2.00	
0.20(>V类>V class)	Pb0.20		Pb0.20+Zn4.00

表1 试验处理组设置

软件中的 Metabo AnalystR 包 OPLSR.Anal 函数对数 据进行分析。评价 OPLS-DA 模型时, Q^2 表示模型 的预测能力, $Q^2 > 0.5$ 时可认为是有效的模型, $Q^2 > 0.9$ 时为出色的模型。

本研究差异代谢物筛选标准。(1)选取差异倍数 值 fold change≥2 和 fold change≤0.5 代谢物,即代 谢物在对照组和实验组中差异为2 倍以上(显著上 调)或0.5 倍以下(显著下调)认为差异显著。(2)在上 述的基础上,选取 VIP≥1 的代谢物。VIP 值表示对 应代谢物的组间差异在模型中各组样本分类判别中 的影响强度,一般认为 VIP≥1 的代谢物为差异显著。

2 结果分析(Results)

2.1 黑藻初生代谢物定性分析结果

本研究基于 UPLC-MS/MS 检测平台和相应的 数据库共检测出 342 个代谢物,其中有机酸 126 种, 脂类 80 种,氨基酸及其衍生物 71 种,核苷酸及其衍 生物 39 种,糖和醇类 20 种,维生素 6 种。

2.2 单一铅、锌胁迫黑藻代谢物差异分析

通过对照组(S1)与 Pb0.10 单一处理组(S4)的 PCA 分析,发现其第一主成分(PC1)值为 40.84%,第 二主成分(PC2)值为 19.86%(图 1(a));通过对照组 (S1)与 Pb0.20 单一处理组(S5)的 PCA 分析,发现其 第一主成分(PC1)值为 36.97%,第二主成分(PC2)值 为 25.01%(图 2(a)),且各图中的 2 组数据分别在 X 轴两侧,表明对照组和单一铅处理组之间存在明显 差异。对数据进行 OPLS-DA 分析,经 200 次排列 实验验证,模型的有效性验证图如图 1(b)、图 2(b)所 示, *Q*² 分别为 0.808、0.846,表明所建模型可靠。横 线对应原始模型的 *R*² Y和 *Q*²,红点和蓝点分别代 表 Y置换后模型的 *R*² Y和 *Q*²,。*R*² Y和 *Q*²,均小 于原始模型的 *R*² Y和 *Q*²,即相应点都不超过相应 的线,说明该模型有意义。

根据代谢物差异筛选标准(fold change≥2 或 fold change≤0.5,且 VIP≥1),与对照组相比,Pb0.10 单一处理组有32个显著差异代谢物,Pb0.20 单一处 理组有19个显著差异代谢物。在这些差异代谢物 中,共有11个相同的差异代谢物,其中,5个代谢物 出现了显著上调(fold change≥2),分别为 N-苯乙酰 基-L-谷氨酰胺、芥子酸吡喃葡萄糖酯、香草酸葡萄 糖苷、异水杨酸-O-葡萄糖、海藻糖-6-磷酸等酚酸类 和糖类物质;6个代谢物出现显著下调(fold change ≤0.5),分别为酪胺、对香豆酰咖啡酰酒石酸、没食 子鞣质、溶血磷脂酰乙醇胺18:0(2n 异构)、十七烷酸 和顺-10-十七碳烯酸等脂类物质。

通过对照组(S1)与 Zn2.00 单一处理组(S16)的 PCA 分析,发现其第一主成分(PC1)值为 60.48%,第 二主成分(PC2)值为 14.56%(图 3(a));通过对照组 (S1)与 Zn4.00 单一处理组(S21)的 PCA 分析,发现 其第一主成分(PC1)值为 55.64%,第二主成分(PC2)



Fig. 1 Difference analysis of metabolites between control group (S1) and Pb0.10 single treatment group (S4) Note: (a) PCA score plots; (b) Permutation test of OPLS-DA score plots.





Fig. 2 Difference analysis of metabolites between control group (S1) and Pb0.20 single treatment group (S5) Note: (a) PCA score plots; (b) Permutation test of OPLS-DA score plots.



注:(a)PCA分析得分图;(b)OPLS-DA有效性验证图。



值为18.81%(图4(a)),且2组数据分别在X轴两侧, 表明对照组和单一锌处理组之间存在明显差异。对 数据进行 OPLS-DA 分析,经200次排列实验验证(模 型的有效性验证图如图3(b)、图4(b)所示), Q²分别为 0.979、0.974,表明所建模型极好,且该模型有意义。

根据代谢物差异筛选标准(fold change≥2 或 fold change≤0.5,且 VIP≥1),与对照组相比,Zn2.00

单一处理组有 108 个显著差异代谢物, Zn4.00 单一 处理组有 85 个显著差异代谢物。在这 108 个和 85 个差异代谢物中, 共有 65 个相同的差异代谢物, 其 中有 46 个代谢物出现了显著上调(fold change≥2), 包括 1-甲基组氨酸、5-氨基戊酸、L-(+)-精氨酸、谷胱 甘肽、黄嘌呤、D-葡萄糖-6-磷酸、海藻糖-6-磷酸、γ-氨基丁酸、奎尼酸和柠檬酸等氨基酸、核苷酸、糖和 有机酸物质;有19个代谢物出现显著下调(fold change≤0.5),包括1'-O香草酰-β-D-葡糖苷、5'-葡糖基氧代茉莉酸、芥子酸吡喃葡萄糖酯、岩白菜素、花生四烯酸和棕榈油酸等酚酸类和脂类物质。

2.3 单一铅、锌处理组与铅、锌复合处理组之间黑 藻代谢物差异比较

通过 Pb0.10 单一处理组(S4)与 Pb0.10+Zn2.00 复

合处理组(S19)的 PCA 分析,发现其第一主成分(PC1) 值为 45.73%,第二主成分(PC2)值为 28.57%(图 5(a)); 通过 Pb0.20 单一处理组(S5)与 Pb0.20+Zn4.00 复合 处理组(S25)的 PCA 分析,发现其第一主成分(PC1) 值为 55.82%,第二主成分(PC2)值为 17.68%(图 6 (a)),且 2 组数据分别在 X 轴两侧,表明单一铅处理 组和对应浓度的铅、锌复合处理组之间存在明显差



图 4 对照组(S1)与 Zn4.00 单一处理组(S21)代谢物差异分析 注:(a)PCA 分析得分图;(b)OPLS-DA 有效性验证图。

Fig. 4 Difference analysis of metabolites between control group (S1) and Zn4.00 single treatment group (S21) Note: (a) PCA score plots; (b) Permutation test of OPLS-DA score plots.



注:(a)PCA分析得分图;(b)OPLS-DA有效性验证图。

Fig. 5 Difference analysis of metabolites between Pb0.10 single treatment group (S4) and Pb0.10+Zn2.00

composite treatment group (S19)

Note: (a) PCA score plots; (b) Permutation test of OPLS-DA score plots.

异。对数据进行 OPLS-DA 分析, 经 200 次排列实 验验证(模型的有效性验证图如图 5(b)、图 6(b)所 示), Q² 分别为 0.925、0.953, 表明所建模型极好。横 线对应原始模型的 R² Y 和 Q², 红点和蓝点分别代 表 Y置换后模型的 R² Y 和 Q², 。R² Y 和 Q², 均小 于原始模型的 R² Y 和 Q², 即相应点都不超过相应 的线, 说明该模型有意义。

根据代谢物差异筛选标准(fold change≥2 或 fold change≤0.5,且 VIP≥1),与 Pb0.10 单一处理 组相比,Pb0.10+Zn2.00 复合处理组有 75 个显著 差异代谢物;而相比 Pb0.20 单一处理组, Pb0.20+ Zn4.00 复合处理组有 87 个显著差异代谢物。在 这 75 个和 87 个差异代谢物中,共有 45 个相同的 差异代谢物,其中有 31 个代谢物出现了显著上调 (fold change≥2),包括 5-氨基戊酸、5-氧化脯氨酸、 D-葡萄糖-6-磷酸、奎尼酸、柠檬酸和溶血磷脂酰 甘油(16:0)等氨基酸、糖类、有机酸和脂质;有 14 个代谢物出现显著下调(fold change≤0.5),包括 岩白菜素、烟酰胺和棕榈油酸等酚酸类、维生素 和脂质。



注:(a)PCA 分析得分图;(b)OPLS-DA 有效性验证图。



treatment group (S25)

Note: (a) PCA score plots; (b) Permutation test of OPLS-DA score plots.

2.4 锌单一处理组与铅、锌复合处理组之间黑藻代谢物差异比较

通过 Zn2.00 单一处理组(S16)与 Pb0.10+Zn2.00 复合处理组(S19)的 PCA 分析,发现其第一主成分 (PC1)值为 45.54%,第二主成分(PC2)值为 20.13% (图 7(a));通过 Zn4.00 单一处理组(S21)与 Pb0.20+ Zn4.00 复合处理组(S25)的 PCA 分析,发现其第一 主成分(PC1)值为 38.46%,第二主成分(PC2)值为 21.20%(图 8(a))。且 2 组数据分别在 X 轴两侧,表 明 Zn2.00 单一锌处理组和对应浓度的铅、锌复合处 理组之间存在明显差异。对数据进行 OPLS-DA 分 析,经 200 次排列实验验证(模型的有效性验证图如 图 7(b)、图 8(b)所示), Q² 分别为 0.603、0.755,表明所 建模型可靠,且该模型有意义。

根据代谢物差异筛选标准(fold change ≥ 2 或 fold change ≤ 0.5 , 且 VIP ≥ 1), 与 Zn2.00 单一处理组 相比, Pb0.10+Zn2.00 复合处理组有 29 个显著差异 代谢物,其中有 25 个代谢物出现了显著上调(fold change ≥ 2),包括对羟基苯甲酸、次黄嘌呤、鸟苷、葵 二酸和石榴酸等酚酸类、核苷酸、有机酸和脂质;有 4 个代谢物出现显著下调(fold change ≤ 0.5),分别为 L-茶氨酸、谷胱甘肽、PE(18:3/18:3+O3)和二十碳五 烯酸(顺-5,8,11,14,17)/EPA(C20:5)。与 Zn4.00 单一 处理组相比, Pb0.20+Zn4.00 复合处理组有 17 个显 著差异代谢物,其中只有 2 个代谢物出现了显著上 调(fold change ≥ 2),分别为酚酸类的去鼠李糖异洋 丁香酚苷 B 和对苯二甲酸;而有 15 个代谢物出现 显著下调(fold change≤0.5),包括谷胱甘肽还原型、 顺式-4-羟基-D-脯氨酸、2-脱氧腺苷、5-甲基胞嘧啶、 鸟嘌呤、胸腺嘧啶、烟酰胺和延胡索酸(富马酸、反丁 烯二酸)等氨基酸和核苷酸类物质。 试验结果表明黑藻在单一 Pb²⁺胁迫后会使酚 类、糖类物质含量增加,脂类物质含量减少。在引入 Zn²⁺复合胁迫后进一步促进了黑藻的糖类物质含量 增加,可见铅锌复合在促进黑藻糖类物质增加方面 存在协同作用。其原因可能是植物体在受到重金属





Fig. 7 Difference analysis of metabolites between Zn2.00 single treatment group (S16) and Pb0.10+Zn2.00 composite treatment group (S19)



Note: (a) PCA score plots; (b) Permutation test of OPLS-DA score plots.



Fig. 8 Difference analysis of metabolites between Zn4.00 single treatment group (S21) and Pb0.20+Zn4.00 composite treatment group (S25)

Note: (a) PCA score plots; (b) Permutation test of OPLS-DA score plots.

胁迫后,体内产生一系列抗逆性反应,这些反应的维 持均需要糖类化合物提供大量能量。另外,在维持 机体渗透压稳定方面也需要可溶性糖类起作用。

而黑藻在单一Zn²⁺胁迫后会导致氨基酸、核苷 酸、糖和有机酸等物质含量增加,酚酸类和脂类物质 含量减少。在高浓度胁迫下(Pb0.10+Zn2.00),铅锌 复合可进一步促进 Zn²⁺使黑藻的核苷酸、有机酸物 质含量增加,抑制 Zn²⁺使黑藻的酚酸类和脂类物质 含量减少的作用,可见铅锌复合在促进黑藻核苷酸、 有机酸物质增加等方面存在协同作用,在使黑藻的 酚酸类和脂类物质含量减少方面存在拮抗作用:在 超高浓度胁迫下(Pb0.20+Zn4.00),铅锌复合会抑制 Zn²⁺使黑藻的氨基酸和核苷酸物质含量增加、酚酸 类物质含量减少的作用,可见超高浓度的铅锌复合 在使黑藻的氨基酸和核苷酸物质含量增加、酚酸类 物质含量减少方面存在拮抗作用。不同浓度下产生 不同结果的主要原因是植物体对于重金属胁迫的响 应并不是一直持续升高的,当某种重金属浓度逐渐 升高并超过某个特定阈值后,机体代谢程度往往是 逐渐升高后降低并最终保持稳定的。

3 讨论(Discussion)

目前,有关代谢组学在环境领域中的应用所涉 及的物种主要包括微生物、植物和动物等。在环境 科学领域中,代谢组学主要研究生物机体在受到外 界环境因素刺激后的代谢变化情况。与基因组学和 蛋白质组学不同的是,代谢组学可以捕捉生物机体 生理代谢的瞬间变化,其灵敏的变化可以用来指示 或评价该环境因素对生物机体或组织器官的毒理效 应^[21-23],尤其是某些代谢物的上下调可能标记着该 代谢通路上的某信号缺陷或被激活^[19]。由此可见, 代谢组学在环境领域中的应用是可行的。

生物机体中游离的氨基酸及其衍生物,不仅能 合成机体生命活动所需的各种蛋白质,还能帮助维 持各种膜和蛋白质结构的稳定性,是细胞渗透调节 的重要有机溶剂,具有保护膜系统、减少体内蛋白质 降解和维持机体各类酶结构正常等作用,能直接或 间接对机体受到的胁迫做出响应,因此氨基酸在研 究机体生理机制中占有重要作用。Ruiz等^[24]的研 究表明缺硼状态下可抑制机体蛋白质合成,并降低 硝酸还原酶活性以及硝酸盐的同化能力,从而降低 植物固氮能力。酚酸类物质是一类含有酚环的有机 酸,其具有杀菌的功效,广泛存在于植物体内,参与 机体的各种代谢。核苷酸及其衍生物是一类由嘧啶

碱基、核糖或脱氧核糖以及磷酸3种物质组成的化 合物,其主要参与机体核酸的构成,同时还具有参与 机体三磷酸腺苷(ATP)、脱氢辅酶等能量代谢相关的 生物学功能。糖是植物进行光合作用后的产物,同 时也是机体进行呼吸作用时的底物,并能为机体生 长发育提供能量,因此其在植物生长发育过程中起 着重要作用,且有研究表明植物在应激条件下所累 积的可溶性糖可作渗透压调节剂,对机体的细胞膜 和蛋白质起到保护作用[25]。维生素是维持机体健康 的一类有机化合物,其不是构成机体的基础物质,也 不是能量的来源,但是却能参与机体的代谢调节,在 生物机体生长发育与抗性中起到重要作用。有机酸 作为重要的小分子渗透调节物质,个别物质具有抗 氧化功能,在抗性生理过程中同样起到至关重要的 作用。Liu 等^[6]通过研究发现有机酸对镉有一定活 化作用,且超富集生态型东南景天可通过调节其根 系内有机酸的合成来适应镉的胁迫。脂质是机体中 生物膜的重要组成部分,个别脂类含量的减少会直 接破坏机体细胞膜结构,从而引发一系列生理问题。

基于本试验的初生代谢组学分析可知,与对照 组相比,在0.10 mg·L⁻¹和0.20 mg·L⁻¹ Pb²⁺单一胁 迫中,共有11种相同代谢物发生同样的显著变化, 出现显著上调的主要为酚酸类和糖类物质,出现显 著下调的主要为脂类物质,其中涉及到苯丙氨酸代 谢、糖类代谢和次生代谢产物的生物合成等生理过 程,说明铅胁迫下,黑藻酚酸类物质和糖类物质起到 了主要的抗性作用,同时黑藻在铅胁迫下,其机体的 脂类物质减少,导致细胞膜可能受到了一定的损害。 糖类的合成和分解会影响细胞的渗透性,而渗透能 力的变化可以影响机体的抗逆能力,因此细胞内糖 类的累积对细胞具有一定保护作用,可以增强植物 的抗逆能力[27]。罗庆[28]在研究不同铅浓度下东南景 天内糖类代谢物的变化中发现,随着铅浓度的升高, 东南景天根系分泌物中的半乳糖、葡萄糖和麦芽糖 等糖类代谢物就表现出先上调后下调的变化趋势。 赵丽娟^[17]的研究同样证实了这一点,在低浓度镉胁 迫下,菠菜和玉米幼苗内与能量代谢相关的葡萄糖、 蔗糖和半乳糖等糖类化合物含量显著上调。在铅 (1000 mg·L⁻¹)胁迫下,萝卜根内果糖、葡萄糖和半 乳糖含量升高,但镉胁迫下(400 mg·L⁻¹)3 种糖类代 谢物的含量却呈现出降低的趋势。其原因推测可能 是由于在面对不同浓度重金属胁迫下的反应机制存 在些微差距,即在低浓度下植物体分泌糖类等物质 用于富集吸收金属离子,当金属离子浓度高于机体 耐受阈值便停止吸收以防止对机体产生损害[17.28]。 在 2.00 mg·L⁻¹ 和 4.00 mg·L⁻¹ Zn²⁺单一胁迫中,共 有65种相同代谢物发生同样的显著变化,其中氨基 酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物、糖及醇类和有机 酸含量均显著上调,而酚酸类和脂质含量均有部分 上调,部分下调,涉及到柠檬酸盐循环(TCA 循环)、 精氨酸和脯氨酸代谢、糖代谢、次生代谢产物的生物 合成(其他抗生素)、碳代谢和 ABC 转运子代谢等生 理过程,说明单一锌胁迫下,促进了黑藻机体氨基 酸、核苷酸和糖类等物质的合成,机体为抗击逆境进 行了许多代谢调节。有研究表明,脯氨酸等氨基酸 类物质会和金属离子螯合,形成稳定的螯合物从而 达到解毒的作用^[29]。此外 Zn²⁺单一胁迫中谷胱甘 肽与对照组(CK)相比出现显著上调,这与本研究所 测定到的谷胱甘肽(GSH)含量变化一致,因此进一 步验证了锌胁迫对黑藻 GSH 的影响。王珊珊^[30]在 栅藻对重金属离子的富集及其机理的研究中也发现 GSH、谷胱甘肽硫转移酶(GST)与金属离子浓度呈正 相关,与本实验结果相一致。由此可见,黑藻在重金 属耐受过程中会合成谷胱甘肽及其相关抗氧化酶等 物质以保护细胞免受伤害。本研究还发现,N苯乙 酰基-L-谷氨酰胺、酪胺、对香豆酰咖啡酰酒石酸、没 食子鞣质和异水杨酸-O-葡萄糖只在单一铅胁迫组 中发生了显著变化,因此这几种代谢物或许可以作 为铅胁迫的代谢标志物,而5-氨基戊酸、L-(+)-精氨 酸、L-冬胺基乙酸-L-苯丙胺基乙酸和 L-焦谷氨酸等 多个代谢物只在单一锌胁迫组中发生了显著变化, 因此这些代谢物或许可以作为锌胁迫的代谢标志 物。另外,本研究还发现芥子酸吡喃葡萄糖酯和香 草酸葡萄糖苷这2种代谢物在单一铅胁迫中表现为 显著上调,而在单一锌胁迫中表现为显著下调,说明 这2种代谢物的含量或许可以作为区分铅、锌胁迫 的指示代谢物。

在复合胁迫中,Pb0.10+Zn2.00 和 Pb0.20+Zn4.00 处理组与相应的单一铅处理组相比,共有 45 种相同 代谢物发生同样的显著变化,出现显著上调的主要 为氨基酸、糖类、有机酸和脂质,出现显著下调的主 要为酚酸类、维生素和脂质,其中涉及到柠檬酸盐循 环(TCA 循环)、精氨酸和脯氨酸代谢、谷胱甘肽代 谢、糖代谢、次生代谢产物的生物合成和碳代谢等生 理过程,说明相比单一铅胁迫,铅锌复合胁迫后黑藻 机体内的机体受到的刺激增大,体内产生大量的氨

基酸、糖类等物质来对抗不良环境。高慧兵^[31]在研 究中也提到,在铅锌复合胁迫时,蓖麻叶片中脯氨酸 含量随胁迫浓度的增加而增加,可能是高浓度胁迫 时锌、铅发生协同作用,毒性增强,导致作为清氧剂 的脯氨酸积累量增加,以调节细胞渗透压,缓解高浓 度重金属的迫害。郭晓音等^[32]的研究也证实了这一 点,在高浓度锌(或镉)的加入与土壤中的镉(或锌)发 生协同作用,导致秋茄中的渗透调节物质脯氨酸、有 机酸的积累量增加,以缓解高浓度重金属的胁迫;另 外,在复合胁迫下有多种脂质代谢物显著上调,其原 因可能是铅锌胁迫后,对黑藻细胞膜的伤害增大,此 时机体通过不断地合成脂质来修补重金属对细胞的 伤害:铅锌复合可进一步促进 Pb²⁺使黑藻的糖类物 质含量增加的作用,说明黑藻体内的糖类物质很有 可能与超氧化物歧化酶(SOD)活性、脯氨酸(Pro)合 成以及其他抗氧化酶或物质成正相关。Pb0.10+ Zn2.00 处理组与 Zn2.00 单一胁迫相比有 29 个代谢 差异物,其中有25种代谢物含量显著上调,主要为 酚酸类、核苷酸、有机酸和脂质,有L-茶氨酸、谷胱 甘肽、PE(18:3/18:3+O3)和二十碳五烯酸(顺-5,8,11, 14,17)/EPA(C20:5)4 个代谢物出现下调。Pb0.20+ Zn4.00 处理组与 Zn4.00 单一胁迫相比有 17 个代谢 差异物,其中15种代谢物含量显著下降,主要为氨 基酸类和核苷酸类;2种代谢物含量上升,均为酚酸 类,说明超高浓度 Pb²⁺、Zn²⁺复合胁迫与单一 Zn²⁺胁 迫相比抑制了黑藻氨基酸、核苷酸的合成,导致黑藻 机体抗性能力的下降,说明黑藻中氨基酸和核苷酸 是机体抗氧化代谢途径中重要的组成部分。从本研 究结果中可发现,2组铅锌复合胁迫处理与相应的 单一铅处理组之间有共同的差异代谢物,而与相应 的单一锌处理组之间没有共同的差异代谢物,因此 初生代谢物一定程度上可以协助统一探讨铅锌复合 胁迫与单一铅胁迫之间生理代谢的区别,但在探讨 铅锌复合胁迫与单一锌胁迫之间生理代谢区别时可 能需要根据不同情况具体去分析。

综上所述,铅单一胁迫主要可促进黑藻机体酚 酸类和糖类物质的生成,抑制脂类的生成。锌单一 胁迫对机体代谢物的影响较多,其中可主要促进氨 基酸、核苷酸、糖类和有机酸等代谢物的生成,抑制 部分酚酸类和脂质代谢物的生成。相比单一铅胁 迫,铅锌复合胁迫可主要促进黑藻氨基酸、糖类、有 机酸和脂质等代谢物的合成,抑制酚酸类、维生素和 脂质等代谢物的合成。相比单一锌胁迫,高浓度铅 锌复合胁迫(Pb0.10+Zn2.00)可主要促进酚酸类、核 苷酸、有机酸和脂质等代谢物的合成,抑制以谷胱甘 肽为代表的氨基酸等代谢物的合成;超高浓度铅锌 复合胁迫(Pb0.20+Zn4.00)可主要促进对苯二甲酸和 去鼠李糖异洋丁香酚苷 B 2 种酚酸类代谢物的合 成,抑制氨基酸、核苷酸、维生素和有机酸等代谢物 的合成。

通讯作者简介:唐洪玉(1970—),女,硕士,副教授,主要研究 方向水产养殖。

参考文献(References):

 [1] 任继凯,陈清朗,陈灵芝,等. 土壤中镉、铅、锌及其相 互作用对作物的影响[J]. 植物生态学与地植物学丛刊, 1982, 6(4): 320-329
 Ren J K, Chen Q L, Chen L Z, et al. The effect of cadmi-

um, lead, zinc in soil and their interaction on crop plants [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 1982, 6(4): 320-329 (in Chinese)

- [2] 陈怀满. 土壤-植物系统中的重金属污染[M]. 北京: 科 学出版社, 1996: 74-83
- [3] 简敏菲, 汪斯琛, 余厚平, 等. Cd²⁺、Cu²⁺胁迫对黑藻 (Hydrilla verticillata)的生长及光合荧光特性的影响[J]. 生态学报, 2016, 36(6): 1719-1727

Jian M F, Wang S C, Yu H P, et al. Influence of Cd^{2+} or Cu^{2+} stress on the growth and photosynthetic fluorescence characteristics of *Hydrilla verticillata* [J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(6): 1719-1727 (in Chinese)

- [4] Bunluesin S, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, et al. Batch and continuous packed column studies of cadmium biosorption by *Hydrilla verticillata* biomass [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 103(6): 509-513
- [5] 陈国梁,林清.不同沉水植物对 Cu, Pb, Cd, Zn 元素吸收积累差异及规律研究[J].环境科技, 2009, 22(1): 9-12, 16

Chen G L, Lin Q. Research on accumulation of Cu, Pb, Cd, Zn in different submerged plants [J]. Environmental Science and Technology, 2009, 22(1): 9-12, 16 (in Chinese)

 [6] 张连凯, 覃小群, 黄奇波, 等. 岩溶区矿山污染地下水的水生植物修复初步研究[J]. 中国岩溶, 2017, 36(5): 743-750

Zhang L K, Qin X Q, Huang Q B, et al. Aquatic plants bioremediation to groundwater contaminated by mines in Karst areas [J]. Carsologica Sinica, 2017, 36(5): 743-750 (in Chinese)

[7] 焦轶男, 朱宏. 黑藻(Hydrilla verticillata)对重金属 Cd2+

的积累及生理响应[J]. 中国农学通报, 2014, 30(5): 249-253

Jiao Y N, Zhu H. Physiological responses of *Hydrilla verticillata* to cadmium and cadmium bioaccumulation [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(5): 249-253 (in Chinese)

[8] 林海,陈思,董颖博,等.黑藻、狐尾藻对重金属铅、镉、铬、钒污染水体的修复[J].中国有色金属学报,2017,27(1):178-186

Lin H, Chen S, Dong Y B, et al. Phytoremediation on heavy metal-polluted water of Pb, Cd, Cr and V by *Hydrilla verticillata* and *Myriophyllum verticillatum* [J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2017, 27(1): 178-186 (in Chinese)

- [9] 高海荣,陈秀丽,赵爱娟,等.5种沉水植物对重金属富 集能力的对比研究[J].环境保护科学,2016,42(4): 101-105
 Gao H R, Chen X L, Zhao A J, et al. Comparison of heavy metal accumulation by five submerged macrophytes [J]. Environmental Protection Science, 2016, 42(4):
- [10] 谢佩君,李铭红,晏丽蓉,等. 三种沉水植物对 Cu、Pb 复合污染底泥的修复效果[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(4): 757-763
 Xie P J, Li M H, Yan L R, et al. Remediation of Cu and Ph co-polluted sediments by three submerged plants [1]

101-105 (in Chinese)

Pb co-polluted sediments by three submerged plants [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2016, 35(4): 757-763 (in Chinese)

- [11] Wang C, Zhang S H, Wang P F, et al. Effects of ammonium on the antioxidative response in *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle plants [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73(2): 189-195
- [12] Yan S, Zhou Q X. Toxic effects of *Hydrilla verticillata* exposed to toluene, ethylbenzene and xylene and safety assessment for protecting aquatic macrophytes [J]. Chemosphere, 2011, 85(6): 1088-1094
- [13] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999, 29(11): 1181-1189
- [14] Nicholson J K, Connelly J, Lindon J C, et al. Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2002, 1(2): 153-161
- [15] Zheng P, Gao H C, Li Q, et al. Plasma metabonomics as a novel diagnostic approach for major depressive disorder
 [J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11 (3): 1741-

1748

- [16] Jiménez B, Montoliu C, MacIntyre D A, et al. Serum metabolic signature of minimal hepatic encephalopathy by 1H-nuclear magnetic resonance [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(10): 5180-5187
- [17] 赵丽娟. 代谢组学技术研究氯磺隆和镉对玉米幼苗和 菠菜代谢的影响[D]. 太原: 山西大学, 2016: 8-10 Zhao L J. Changes in metabolites of maize seedlings and Spinacia oleracea L. under chlorsulfuron and cadmium stress, measured by metabonomics technology [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2016: 8-10 (in Chinese)
- [18] 李英帅.应用代谢组学技术进行中医药研究探讨[J]. 安徽中医学院学报, 2008, 27(6): 1-5 Li Y S. Discussion on the application of metabonomics technology in traditional Chinese medicine research [J]. Journal of Anhui Traditional Chinese Medical College, 2008, 27(6): 1-5 (in Chinese)
- [19] 耿柠波,张海军,王菲迪,等.代谢组学技术在环境毒 理学研究中的应用[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(3): 26-35

Geng N B, Zhang H J, Wang F D, et al. A review on the application of metabonomic approaches in environmental toxicology [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11 (3): 26-35 (in Chinese)

- [20] 高艳. 重金属 Pb²⁺胁迫对轮叶黑藻毒性效应研究[D]. 重庆:西南大学,2017:13-14 Gao Y. The toxic effects of heavy metal Pb²⁺ stress on Hydrilla verticillata [D]. Chongqing: Southwest University, 2017: 13-14 (in Chinese)
- [21] Lankadurai B P, Nagato E G, Simpson M J. Environmental metabolomics: An emerging approach to study organism responses to environmental stressors [J]. Environmental Reviews, 2013, 21(3): 180-205
- [22] Viant M R, Bearden D W, Bundy J G, et al. International NMR-based environmental metabolomics intercomparison exercise [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(1): 219-225
- [23] Simpson M J, McKelvie J R. Environmental metabolomics: New insights into earthworm ecotoxicity and contaminant bioavailability in soil [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 394(1): 137-149
- [24] Ruiz J M, Bretones G, Baghour M, et al. Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves [J]. Phytochemistry, 1998, 48(2): 269-272
- [25] Usadel B, Bläsing O E, Gibon Y, et al. Multilevel genom-

ic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in Arabidopsis rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range [J]. Plant, Cell & Environment, 2008, 31(4): 518-547

- [26] Liu D, Islam E, Li T Q, et al. Comparison of synthetic chelators and low molecular weight organic acids in enhancing phytoextraction of heavy metals by two ecotypes of Sedum alfredii Hance [J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 153(1-2): 114-122
- [27] 陈玲玲. 敖汉苜蓿小花与种子响应硼胁迫的蛋白质组 学与代谢组学分析[D]. 北京:中国农业大学, 2017: 4-5 Chen L L. Proteomic and metabolomics analysis of flowers and seeds of Medicago sativa L.Cv. "Aohan" response to boron stress [D]. Beijing: China Agricultural University, 2017: 4-5 (in Chinese)
- [28] 罗庆. 镉、铅胁迫下东南景天根系分泌物的代谢组学 研究[D]. 沈阳: 东北大学, 2016: 136-138 Luo Q. Metabolomics study on root exudates of Sedum alfredii under Cd and Pb stress [D]. Shenyang: Northeastern University, 2016: 136-138 (in Chinese)
- [29] 徐超. 脯氨酸与重金属耐性和富集的研究进展[J]. 中 国资源综合利用, 2018, 36(2): 80-83 Xu C. A review of amino acid in heavy metal tolerance and accumulation [J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2018, 36(2): 80-83 (in Chinese)
- [30] 王珊珊. 栅藻对重金属离子的富集及其机理的研究 [D]. 福州: 福建师范大学, 2013: 49-52 Wang S S. Study on the enrichment for heavy metals by Scenedesmus sp. and its adsorption mechanisms [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2013: 49-52 (in Chinese)
- [31] 高慧兵. 铅锌胁迫对蓖麻开花生理的影响[D]. 长沙: 中 南林业科技大学, 2019: 39-41 Gao H B. Affect of Lead&Zinc stress on flowering physiology of Ricinus communis L. [D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2019: 39-41 (in Chinese)
- [32] 郭晓音, 严重玲, 叶彬彬. 镉锌复合胁迫对秋茄幼苗渗 透调节物质的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15 (3): 308-312

Guo X Y, Yan C L, Ye B B. Effect of Cd-Zn combined stress on contents of osmotic substances in Kandelia candel (L.) Druce seedlings [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2009, 15(3): 308-312 (in Chinese)