

镉胁迫对灵芝菌丝体生长及代谢产物积累的影响

王茗宇, 付玉芹, 尹 婷, 李全亮, 纪海训, 赵超越, 李思圆*, 王秀然*

吉林农业大学, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 研究镉(Cd)胁迫对灵芝菌丝生长及代谢产物积累的影响, 探讨 Cd 胁迫影响生长和代谢产物积累的机制, 为灵芝生产栽培过程中控制 Cd 元素提供依据。方法 在 Cd 质量浓度分别为 0、0.5、1.0、4.0、10.0、40.0 mg/L 下培养灵芝菌丝体, 对其生物量积累、胞内活性氧(ROS)水平、膜氧化损伤、抗氧化酶活性及 ROS 调控相关酶表达量进行分析。结果 Cd 质量浓度达到 4.0 mg/L 时, 抑制菌丝生长; 胞内 ROS 水平、H₂O₂ 及丙二醛(MDA)含量显著上升, 分别提升了 76%、46%、325%, 且随着 Cd 质量浓度的增加呈上升趋势; NADPH 氧化酶基因(NOXA)、超氧化物歧化酶基因(SOD1, SOD4)、过氧化氢酶基因(CAT)表达量显著上调。Cd 质量浓度达到 10.0 mg/L 时抑制效果显著, 菌落生长直径及发酵菌丝干质量抑制率分别为 26.15%、32.78%, 灵芝总三萜抑制率为 33.7%, 对总蛋白合成的抑制率为 30.3%, 对多糖抑制不显著。Cd 质量浓度达到 40.0 mg/L 时, 抗坏血酸过氧化物酶基因(APX)及谷胱甘肽过氧化物酶基因(GPX)表达量显著上调。随着 Cd 质量浓度的增加, SOD、CAT、APX、GPX 酶活性都呈先上升后下降趋势, Cd 质量浓度达到 1.0 mg/L 时, GPX 酶活性下降, APX 酶活性上升显著。外源添加 diphenyleneiodonium chloride(DPI)、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)、维生素 C(VC)对 Cd 胁迫灵芝胞内清除 ROS 水平及降低 MDA 含量作用显著。结论 Cd 胁迫造成灵芝菌丝产量及代谢物积累下降, 可能是由于 Cd 离子抑制 GPX 酶活性下降, 造成 H₂O₂ 积累, 引起 ROS 水平上升及膜氧化损伤, 抑制菌丝生长及代谢产物积累, 同时调控 NOXA 基因表达量上调, 造成抗氧化酶活性及表达量上升来提高机体对活性氧的清除。因此在灵芝的生产过程中要控制 Cd 元素质量浓度小于 1 mg/L。

关键词: Cd 胁迫; 灵芝; 活性氧; NADPH 氧化酶; 抗氧化酶

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)14-3444-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.027

Study on growth and metabolites accumulation of *Ganoderma lucidum* mycelium by cadmium stress

WANG Ming-yu, FU Yu-qin, YIN Ting, LI Quan-liang, JI Hai-xun, ZHAO Chao-yue, LI Si-yuan, WANG Xiu-ran
Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To study the effects of cadmium stress on mycelial growth and accumulation of metabolites in *Ganoderma lucidum*, and to explore the mechanisms affecting growth and accumulation of metabolites, and to provide evidence for controlling cadmium in the production and cultivation of *G. lucidum*. **Methods** The mycelium of *G. lucidum* was cultured under the conditions of heavy metal ion cadmium concentration of 0, 0.5, 1, 4, 10, and 40 mg/L, and its biomass accumulation, intracellular ROS level, membrane oxidative damage, anti-oxidant enzyme activity, and ROS regulation related enzyme expression were analyzed. **Results** When the concentration of cadmium reached 4 mg/L, the mycelial growth was inhibited. The levels of intracellular ROS, H₂O₂, and MDA increased significantly, increasing by 76%, 46% and 325%, respectively, and increased with the increase of cadmium concentration; The NADPH expression levels of oxidase gene (NOXA), superoxide dismutase gene (SOD1 and SOD4), and CATase gene (CAT) were significantly up-regulated. When the cadmium concentration reached 10 mg/L, the inhibitory effect was significant. The colony growth diameter and the dry weight inhibition rate of fermentation mycelium were 26.15% and 32.78%, respectively. The total triterpenoid inhibition rate of *G. lucidum* was 33.7%, and the inhibition rate of total protein synthesis was 30.3%. Inhibition of polysaccharides was not significant. When the cadmium concentration reached 40 mg/L, the expression levels of Ascorbate peroxidase gene (APX) and Glutathione peroxidase gene (GPX) were significantly up-regulated. With the increase of cadmium concentration, the activities of SOD, CAT, APX, and GPX increased first and then decreased. When the concentration of cadmium reached 1 mg/L, the

收稿日期: 2019-03-06

基金项目: 吉林省科技支撑项目(20160312008ZG); 吉林省自然科学基金项目(20180101260JC)

作者简介: 王茗宇(1994—), 男, 硕士研究生, 主要从事药用真菌研究。Tel: 18004426065 E-mail: wangmingyu_37@163.com

*通信作者 李思圆, 女, 博士, 主要从事药用真菌研究。Tel: 13756091177 E-mail: lisy0714@163.com

王秀然, 男, 副教授, 主要从事微生物遗传与免疫研究。Tel: 18686515382 E-mail: wangxiuran7810@163.com

activity of GPX decreased and the activity of APX increased significantly. Exogenous addition of diphenyleneiodonium chloride (DPI), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) and vitamin C (VC) had significant effects on cadmium-induced *G. lucidum* clearance of ROS and reduction of MDA content. **Conclusion** Cadmium stress causes the decrease of mycelial production and metabolite accumulation of *G. lucidum*, which may be due to the inhibition of GPX activity by cadmium ions, resulting in the accumulation of H_2O_2 , causing the increase of ROS level and membrane oxidative damage, inhibiting mycelial growth and accumulation of metabolites, and regulating NOX. Up-regulation of gene expression results in an increase in anti-oxidant enzyme activity and expression to increase the clearance of reactive oxygen species. Therefore, the cadmium content should be controlled within the range of 1 mg/L during the production process.

Key words: cadmium stress; *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) karst; ROS; NADPH oxidase; anti-oxidant enzymes

灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst, 1881 年首次被英国真菌学家 Peter Adolf Karsten 命名, 是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌, 是我国名贵的药用真菌之一^[1-2], 具有几千年历史。灵芝含有蛋白类、多糖类、三萜类、核苷类、甾醇类、生物碱等多种有效成分, 具有很高的药用价值^[3-4]。现代药理研究表明灵芝具有多种药理作用, 具有这些药理作用与其含有的有效成分密切相关。

近年来镉 (Cd) 污染日益严重, Cd 是重金属中毒性最强的元素之一, 有积累性强、作用持续等特点^[5]。Cd 不是人体的必需元素, 但能通过外界环境摄入且在体内蓄积引起 Cd 中毒, 对肝、肺、肾功能造成严重损伤。据报道我国中药材中重金属 Cd 污染率为 23.35%, 是众多重金属污染之首^[6], 世界卫生组织 (WHO) 和联合国粮食及农业组织 (FAO) 早在 1972 年就已将 Cd 列为严重的食品污染物, 仅次于黄曲霉毒素和砷, 随后又被国际癌症研究机构 (IARC) 列为一类致癌物^[7]。Cd 通过竞争性替换钙离子、铁离子、锌离子等金属离子在膜转运蛋白上的结合位置, 改变细胞膜通透性从而进入细胞, 对细胞产生毒害作用^[8]。灵芝也是深受 Cd 污染影响, 在机体内富集, 严重影响了灵芝的生长与功效^[9]。Cd 污染灵芝的途径有土壤、栽培基质和水, 且易在灵芝胞内富集, 抑制菌丝生长。

胞内活性氧 (ROS) 是细胞有氧代谢过程中的产物, 包括过氧化物、氧离子及超氧阴离子自由基等。机体内 ROS 水平在各类抗氧化酶的参与下^[10-11]处于动态平衡状态, 当机体受到外界刺激后, 会使 ROS 的产生与消除过程受到影响, 使 ROS 水平异常。过多的 ROS 能够引起细胞内线粒体膜电位下降和蛋白质、DNA 损伤等氧化应激反应, 诱导细胞膜氧化损伤^[12]。作为信号分子, ROS 在对环境胁迫的反应中起着重要作用。研究表明, Cd 离子可以通过不同的途径, 引起胞内 ROS 短暂或持续增加, 如抑制抗氧化酶活性, 破坏线粒体电子呼吸传

递链抑制细胞呼吸^[13], 诱导 NADPH 氧化酶 (NOX) 过表达, 激活 NOX 活性^[14]。据已有研究发现, 灵芝在 Cd 胁迫下会导致生物量及总糖、还原糖含量下降, 通过激活胞内抗氧化酶活性, 增加非蛋白疏基化合物 (NPT) 的表达来抵御 Cd 毒害作用^[15]。但 Cd 胁迫对灵芝菌丝胞内 ROS 及对菌丝氧化损伤影响机制尚未明确。

本研究利用重金属 Cd 胁迫培养灵芝菌丝体, 探究其对灵芝菌丝体生长及代谢产物积累的影响, 同时探讨影响生长及代谢产物积累的机制, 为进一步提高灵芝产量和质量积累提供理论依据, 为药用真菌生产过程中重金属元素控制提供实验依据, 对于药食用菌的生产具有重要的意义。

1 材料与培养基

1.1 菌种及试剂

样品购与中国微生物菌种保藏中心, 编号 bio-69729, 笔者鉴定为赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst。RNA 提取试剂盒、PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR®Premix ex Taq™ 等试剂购自大连 TaKaRa 公司; 引物合成均由上海生工生物工程有限公司完成; 无水乙醇、其他化学试剂购自于国产分析纯; DCFH-DA 探针试剂盒、酶活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。齐墩果酸对照品购自北京索莱宝公司, CAS 号 508-02-1, 质量分数 ≥ 98%。

1.2 培养基

1.2.1 PDA 培养基 (固体) 去皮马铃薯提取液 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 硫酸镁 1.5 g/L, 磷酸二氢钾 3.0 g/L, 维生素 B1 0.05 g/L, 琼脂粉 20 g/L。

1.2.2 液体发酵培养基 葡萄糖 35 g/L、蛋白胨 15 g/L、酵母粉 5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、磷酸二氢钾 1 g/L、维生素 B1 0.05 g/L。

1.2.3 含有重金属盐溶液的培养基 培养基经灭菌后加入重金属标准溶液 (Cd 以 $CdCl_2$ 配制标准溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 下同)。

2 方法

2.1 固体培养基培养

在 Cd 处理终质量浓度分别为 0、0.5、1.0、4.0、10.0、40.0 mg/L 的固体平板培养基中心接种圆形菌块 ($d=0.5$ cm), 每个浓度处理设 3 个重复。28 °C 暗培养 5 d。

2.2 液体发酵培养

从 28 °C 培养 5 d 的固体平板上取 5 块 0.5 mm×0.5 mm 带培养基灵芝菌丝体接种到 PDA 液体培养基中培养, 250 mL 三角瓶装液 100 mL, 150 r/min, 28 °C 培养 5 d, 获得种子培养基备用。液体发酵培养基经灭菌后加入重金属标准溶液, Cd 胁迫处理终质量浓度分别为 0、0.5、1.0、4.0、10.0、40.0 mg/L。外源 ROS 清除剂处理组需在 Cd 质量浓度为 10 mg/L 的培养基中外源添加 diphenyliodonium chloride (DPI)、N-乙酰-L-半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC)、维生素 C (VC)。DPI、NAC、VC 处理终浓度分别为 10 μmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L, 以外源添加 2 mmol/L H₂O₂ 作为阳性对照组。每个处理组设 3 个重复。灵芝种子经过无菌破碎后, 以 5% 接种量转接到液体发酵培养基中, 250 mL 三角瓶装液 100 mL, 150 r/min, 28 °C 培养 5 d, 蒸馏水冲洗干净, 收集全部菌丝。菌丝干质量需 60 °C 烘干收集。

2.3 平板菌落直径测定

固体培养基接种第 5 天, 测定菌落直径, 垂直方向测定 2 次, 取平均值。

2.4 ROS 的检测及细胞膜氧化损伤指标检测

2.4.1 菌丝胞内 ROS 检测 将无菌盖玻片倾斜插入各处理组培养基中, 待菌丝爬上盖玻片时, 取出盖玻片, 在 10 μmol/L DCFH-DA 中避光孵育 20 min, 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液 (PBS) 冲洗 2 或 3 次, 置于荧光显微镜下观察。DCFH-DA 探针荧光采用 Image J 软件进行分析量化。

2.4.2 H₂O₂、丙二醛 (MDA) 含量检测 取适量不同处理的液体发酵菌丝球, 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次, 使用 H₂O₂ 含量测定试剂盒、MDA 含量测定试剂盒检测。

2.4.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 选取了超氧化物歧化酶基因 (SOD1、SOD2), 过氧化氢酶基因 (CAT), 谷胱甘肽过氧化物酶基因 (GPX), 抗坏血酸过氧化物酶基因 (APX) 及 NADPH 氧化酶基因 (NOXA、NOXB) 共 7 个基

因进行了表达量分析, 引物见表 1。将各组培养菌丝以 Trizol 试剂提取各组总 RNA, 电泳质量检测后反转录为 cDNA 用于 qRT-PCR。以 GAPDH 为内参, 0 mg/L Cd 胁迫组表达量为对照组, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各组的相对表达量。

表 1 荧光定量引物序列

Table 1 qPCR primer sequence

基因	引物	序列 (5'→3')
GAPDH	RT-F	CACTCGCCAAGATAATCAACG
	RT-R	CCATTCCTGTCAACTTCCCAT
SOD1	RT-F	ATCGCCGTCCTCGTCGTTT
	RT-R	GTGACTGGTGCGGTAGGGA
SOD2	RT-F	CTCACCGCGACGCGATTAC
	RT-R	CCCTTGCCCTCAGACTTGG
CAT	RT-F	TACGGTATTACGCTCTTGT
	RT-R	TGTTGTAACGGAAGTCTCTC
APX	RT-F	TTTTCGGTGCCCTTGGTGC
	RT-R	GTAAGTCTTATCAGCCGCTT
GPX	RT-F	ATGTCCGACGCAGGATTCTACT
	RT-R	GGAAGCCGAGAATGACGAAG
NOXA	RT-F	CGTAGAGTTCTTCTGGGTTTGC
	RT-R	CTGCGTGAGGTAGATGTTGATA
NOXB	RT-F	TTCGCGTCGATCCTCAAGT
	RT-R	GTTCTGCGTGTCTGCTCC

2.4.4 抗氧化酶活性测定 超氧化物歧化酶 (SOD) 酶活性 (NBT 还原法)、H₂O₂ 酶、CAT 酶活性 (紫外吸收法)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 酶活性 (紫外比色法)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) (比色法) 酶活性测定均使用南京建成生物工程研究所酶活性测定试剂盒测定。

2.4.5 总三萜含量的测定 以齐墩果酸对照品, 准确制作标准曲线, 得到齐墩果酸标准曲线方程 $Y=2.1556X-0.0045$, $R^2=0.9992$ 。准确称取菌丝 300 mg, 加入 20 mL 95% 乙醇, 220 W 超声破壁 1.5 h, 每隔 20 min 摇匀 1 次。超声后室温静置过夜, 使用旋转蒸发仪 60 °C 蒸干, 加入 1 mL 色谱甲醇溶解, 0.22 μm 滤膜滤过置 1.5 mL 管中。精密移取各组样品制备液 0.5 mL 于玻璃试管中, 加热挥发掉溶剂, 加入 5% 香草醛溶液 0.5 mL, 1 mL 高氯酸, 混匀, 置于 60 °C 水浴锅中水浴 30 min。取出后冰浴 10 min, 以试剂空白液调零, 550 nm 处测定吸光度值 (A), 测得总三萜含量。

2.5 总蛋白含量的测定

分别收取各处理组液体发酵菌丝，双蒸水冲洗 3 遍，纱布滤过挤干，称取鲜质量 1 g 于冰浴研钵中，加入 5 g 石英砂、5 mL 灵芝菌丝提取液充分研磨取出后冰浴 10 min，加入同体积的 Tris 饱和酚，震荡，4 °C、13 000 r/min 离心 10 min，保留酚层，加入 4 倍体积预冷的甲醇置于-20 °C、10 h、4 °C、13 000 r/min 离心 10 min 得粗蛋白沉淀，预冷的甲醇洗涤，4 °C、13 000 r/min 离心 5 min，去甲醇得总蛋白沉淀，置超净工作台内吹干称定质量分析。

2.6 多糖含量的测定

利用葡萄糖制作标准曲线，苯酚-硫酸法进行灵芝多糖含量测定。精准称取各组烘干灵芝菌丝体 1 g，研磨成粉末，加入 5 mL 85%甲醇震荡 1 min，静置 5 min，4 °C、13 000 r/min 离心 5 min，重复 3 次以去除色素、脂类等小分子物质，加入 15 倍的双蒸水，95 °C 提取 3 h，重复 2 次并滤过，合并滤液并定容至 100 mL 备用。取待测样品 1 mL 于带塞试管中，加入 5%苯酚 0.5 mL 及浓硫酸 5.0 mL，摇匀，沸水浴 10 min，冷却

至室温，以双蒸水作为空白对照组调零，在波长 490 nm 处测得各管 A 值，求得多糖含量。

2.7 数据处理

所有数据作图采用 Excel 2007 和 Prism 6 完成，数据分析采用 SPSS 20.0 分析，图像分析采用 Image J 分析。

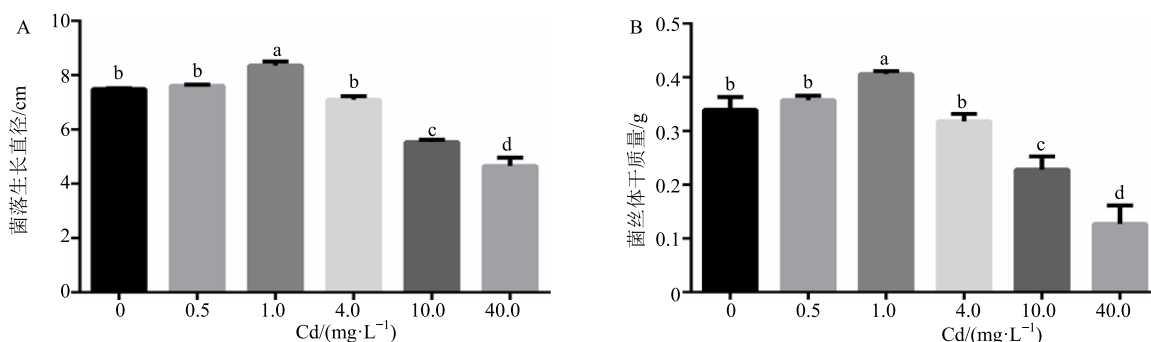
3 结果与分析

3.1 Cd 对灵芝菌丝体生长的影响

如图 1 结果显示，随着 Cd 质量浓度的增加，菌丝生长表现为先促进后抑制。其中处理质量浓度为 1.0 mg/L 时促进了菌丝的生长，菌落直径及菌丝干质量与对照组相比都呈显著差异；在处理浓度超过 10.0 mg/L 时显著抑制菌丝的生长，相比对照组，菌落生长直径抑制率为 26.15%，发酵菌丝干质量抑制率为 32.78%。

3.2 Cd 胁迫对灵芝菌丝重要代谢产物的影响

灵芝中的蛋白类、多糖类、三萜类是其重要的代谢产物，也是其重要的药用有效成分。本实验研究表明，灵芝中总三萜的含量会随着 Cd 质量浓度的升高呈先上升后下降的趋势（图 2-A），在 Cd 处理质量浓



不同字母表示 5% 水平差异显著， $P < 0.05$ ，下同

Markers (a, b, c, d, etc.) indicated among the groups differences significant $P < 0.05$, same as below

图 1 Cd 胁迫灵芝平板菌落生长直径差异性分析 (A) 和液体发酵干重生物量差异性分析 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of growth of *G. lucidum* treated by Cd²⁺ with different concentration (A) and effect of weight of *G. lucidum* treated by Cd²⁺ with different concentration (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

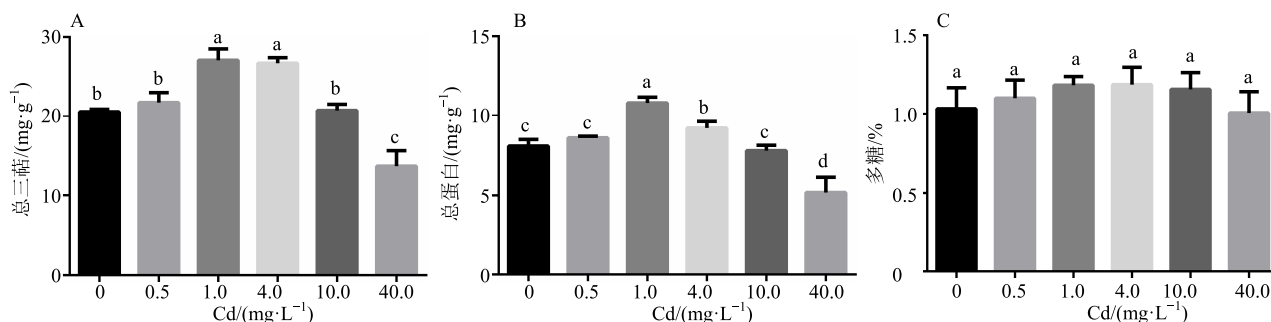


图 2 Cd 胁迫灵芝菌丝总三萜 (A)、总蛋白 (B)、总多糖 (C) 测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.2 Effect of cadmium stress on yield of *G. lucidum* triterpenoids (A), *G. lucidum* total protein content under cadmium stress analysis (B), and *G. lucidum* amylose content cadmium stress analysis (C) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

度达到 1.0 mg/L 时,总三萜含量显著比对照组提高了 31.6%,随着处理质量浓度的升高,三萜含量开始呈下降趋势,当 Cd 质量浓度达到 40.0 mg/L 时,总三萜含量显著低于对照组,相比对照组降低了 33.7%。随着 Cd 处理浓度升高,总蛋白含量呈先上升后下降趋势(图 3-B),当 Cd 处理质量浓度为 1.0 mg/L 时,总蛋白含量与对照组相比显著升高 34%;随着 Cd 处理浓度增加开始下降,当达到 40.0 mg/L 时,总蛋白含量与对照组相比显著下降 30.48%。经测定,灵芝中多糖含量随着 Cd 质量浓度的升高呈先上升后下降趋势(图 2-C),但在本研究处理质量浓度范围内无显著差异。

3.3 Cd 胁迫对灵芝菌丝体胞内 ROS 水平及诱导细胞膜氧化损伤指标的影响

为了探究 Cd 对灵芝菌丝体胞内 ROS 水平的影响,采用荧光探针 DCFH-DA 对不同 Cd 胁迫质量浓度平板菌丝及液体发酵孢子 ROS 进行检测。结果如图 3-A 所示,随着 Cd 质量浓度增加灵芝胞内 ROS 水平也随之增高,根据 DCFH-DA 荧光强度量化结果(图 3-B)及 H_2O_2 含量测定结果(图 3-C),相对于对照组,0.5 mg/L Cd 胁迫对胞内的

ROS 及 H_2O_2 含量无明显变化,当质量浓度为 1.0、4.0、10.0、40.0 mg/L 时,胞内 ROS 水平相比对照组分别提高了 31%、76%、104%、245%,胞内 H_2O_2 含量相比对照组分别提高了 34%、46%、96%、169%。这些结果表明,重金属 Cd 胁迫提高了灵芝菌丝体胞内 ROS 水平及 H_2O_2 含量,且随着 Cd 质量浓度的增加呈上升趋势。

胞内 ROS 的上升会导致细胞膜氧化损伤,MDA 是膜脂质过氧化产物,是细胞膜氧化损伤的重要指标,因此探究了不同 Cd 胁迫质量浓度下对液体发酵的灵芝菌丝胞内 MDA 含量的影响。如图 3-D 所示,Cd 处理质量浓度为 0.5、1.0 mg/L 时,MDA 含量上升但不显著,当 Cd 浓度达到 4 mg/L 时,MDA 含量及膜损伤率显著提高,4.0、10.0、40.0 mg/L 时 MDA 含量分别提高了 325%、463%、580%。

3.4 Cd 胁迫下灵芝菌丝体 ROS 相关调控基因转录水平分析

为了探究 Cd 对 ROS 相关的调控基因的影响,对其进行了基因表达量分析。NADPH 氧化酶(NOX)是产生 ROS 的重要来源之一,穆大帅等^[16]在灵芝中鉴定出 NOX 家族的 2 种 NOX 亚型 NOXA、

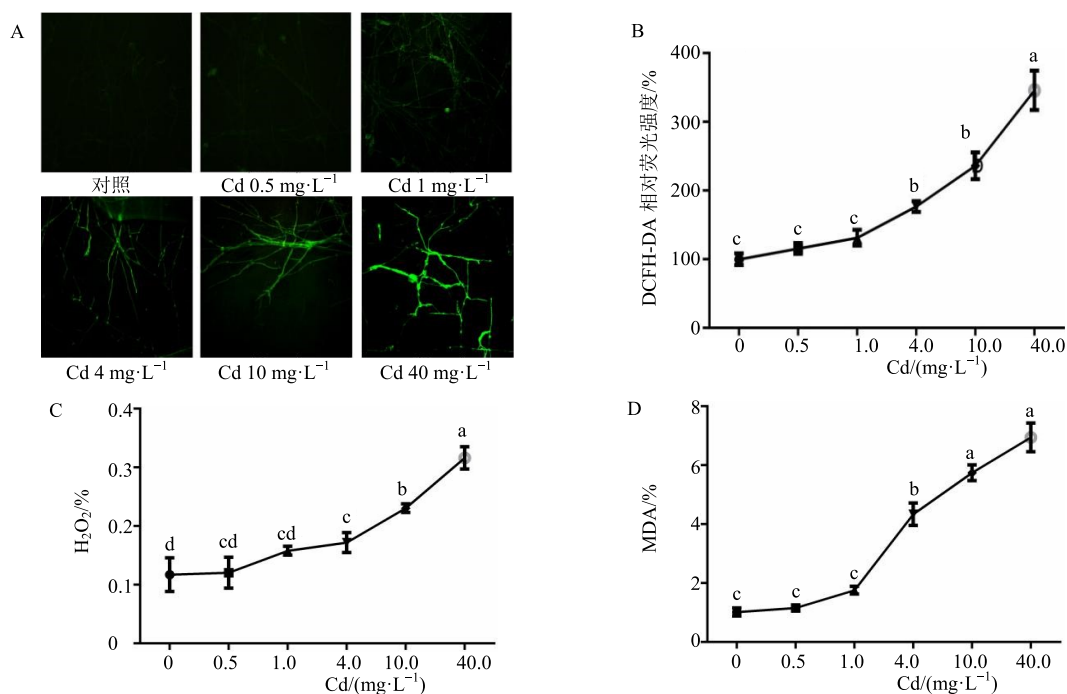


图 3 Cd 胁迫下灵芝菌丝及孢子的 DCFH-DA 荧光染色 (A)、DCFH-DA 荧光强度量化分析 (B)、灵芝胞内 H_2O_2 含量影响 (C) 和灵芝胞内 MDA 含量(D) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 DCFH-DA fluorescence staining of mycelia and spores of *G. lucidum* under Cd²⁺ stress quantitative analysis of fluorescence intensity of DCFH-DA (B), effect of Cd²⁺ on intracellular hydrogen dioxide content (C), and effect of Cd²⁺ on intracellular MDA content (D) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

NOXB, 在调控 ROS 水平中有着重要的作用。由图 4-A 可见, 随着 Cd 质量浓度达到 4.0 mg/L 时, NOXA 与 NOXB 基因表达量显著上调, 且一直呈上升趋势, Cd 质量浓度达到 40.0 mg/L 时, NOXA 表达量上调了 1.98 倍, NOXB 基因表达量上调了 1.86 倍。Cd 胁迫诱导 NOXA、NOXB 基因表达量上调, 使 NOX 酶激活, 可能为破坏

灵芝胞内 ROS 水平的一个重要因素。如图 4-B 所示, Cd 胁迫使灵芝胞内抗氧化酶基因 SOD1、SOD4、CAT、GPX、APX 上调。Cd 质量浓度为 4.0 mg/L 时, SOD1 基因表达量最高上调 4.02 倍; Cd 质量浓度达到 40.0 mg/L 时, SOD4、CAT、GPX、APX 基因表达量分别最高上调 1.91、6.16、6.08、5.08 倍。

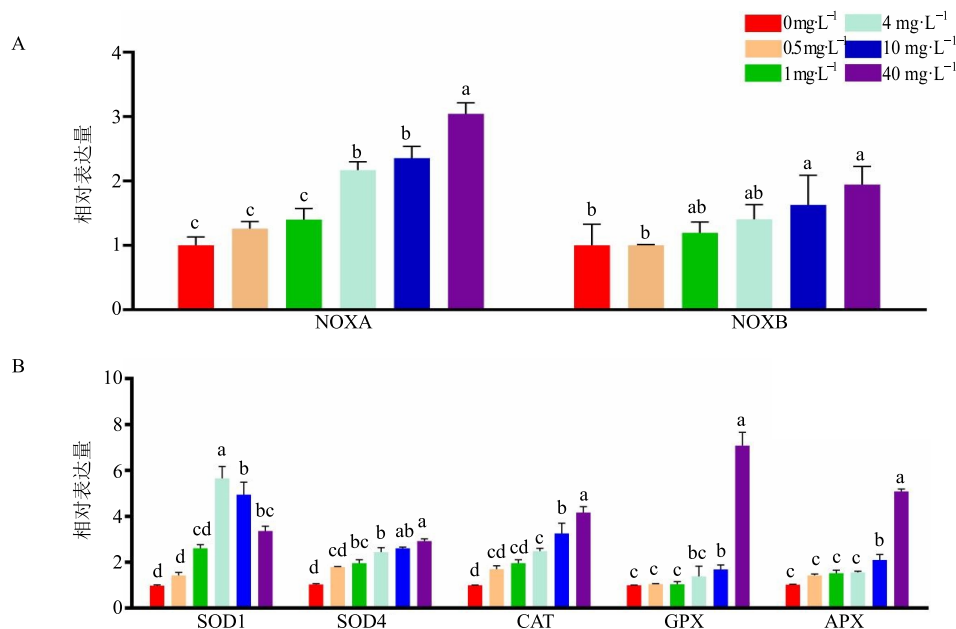


图 4 Cd 胁迫对 NADPH 氧化酶基因 (A) 和 Cd 胁迫对抗氧化酶基因 (B) 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Cd²⁺ stress on expression of NADPH oxidase gene (A) and anti-oxidase enzymes gene (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 Cd 胁迫对灵芝菌丝体抗氧化酶活性的影响

Cd 胁迫后, 抗氧化酶基因表达量有所上调, 为了进一步研究抗氧化响应机制, 测定了抗氧化酶 SOD、CAT、APX、GPX 的酶活。

如图 6 可见, SOD 酶活性随着 Cd 浓度的增加先上升后下降, Cd 质量浓度 10.0 mg/L 时酶活达到最高, 相比对照组上升了 34.2%, 后下降到与对照组相当。Cd 胁迫会刺激灵芝细胞 SOD 酶活性上升, 清除超氧负离子能力增强。CAT 酶活性随着 Cd 浓度的升高先上升后下降, 质量浓度为 1.0 mg/L 时, 酶活性达到最高, 相比对照组提高了 31%, Cd 浓度达到 40.0 mg/L 时, 相比于对照组酶活下降 30%。APX 酶活性随着 Cd 质量增加呈先上升后下降趋势, Cd 浓度 10.0 mg/L 时达到最高, 相比于对照组提高了 7.25 倍。Cd 胁迫显著提高了 APX 的酶活性。GPX 可以通过催化谷胱甘肽(GSH)还原过氧化物, 清除机体自由基。Cd 质量浓度为 0.5 mg/L 时 GPX 酶活性较对照组提升 24.7%, 当质量浓度高于 1.0

mg/L 活性呈下降趋势, Cd 质量浓度达到 40.0 mg/L 时, 酶活性比对照组降低了 87.4%, 高质量浓度的 Cd 胁迫严重抑制了 GPX 的酶活。Cd 胁迫使这 4 种抗氧化酶的酶活性均呈先上升后下降的趋势, 且 Cd 质量浓度大于 1 mg/L 时, 对 GPX 酶活性抑制效果及 APX 酶活性促进效果较为明显, 对比图 5-C 可见, 胞内 H₂O₂ 的积累可能是由于 GPX 酶活性的下降造成的。

3.6 DPI、NAC、VC 处理对 Cd 胁迫灵芝胞内 ROS 水平及膜氧化损伤指标的影响

DPI 是 NOX 抑制剂, 能有效的抑制 NOX 活性, 从而抑制 ROS 的产生。NAC 是 ROS 抑制剂, 拮抗多种蛋白酶体抑制剂的活性。VC 通过抗氧化作用清除有害的氧自由基来降低胞内活性氧。为了探究外源 ROS 清除剂对 Cd 胁迫产生的 ROS 的消除效果及细胞氧化膜损伤的缓解作用, 采用 DPI、NAC、VC 处理后进行 Cd 胁迫培养灵芝菌丝, DCFH-DA 荧光探针染色量化结果见图 6-A, 正常条件下外源

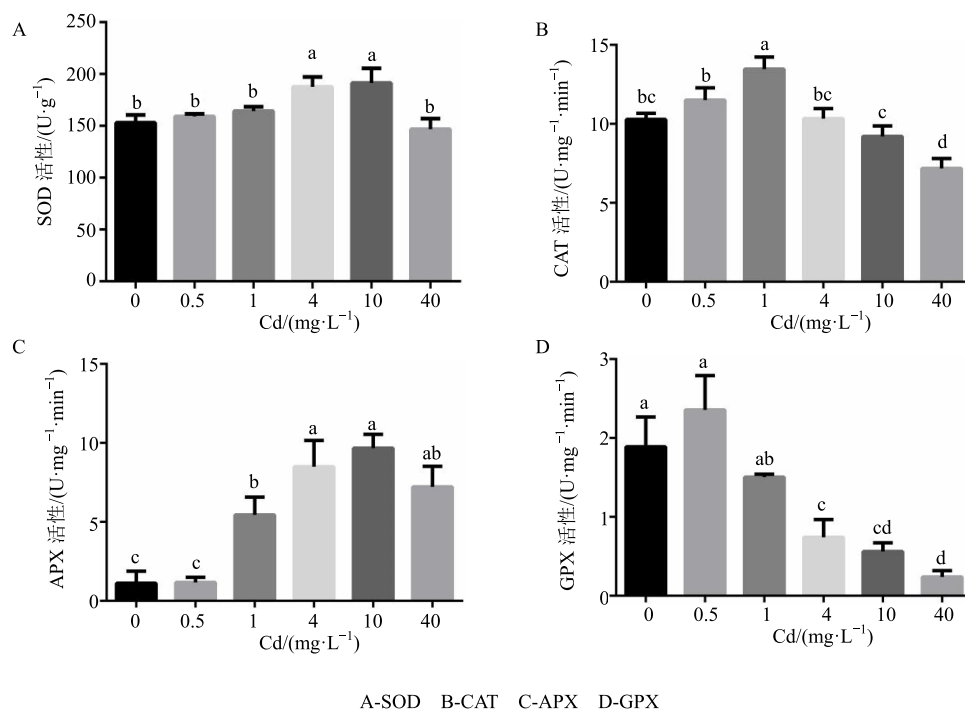
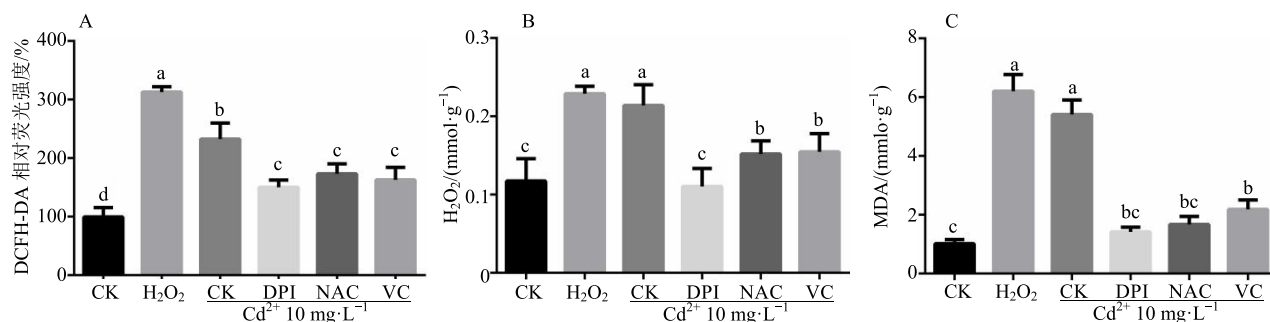


图 5 Cd 胁迫对抗氧化酶活性的影响

Fig. 5 Effects of Cd²⁺ stress on anti-oxidase enzymes activity图 6 外源 ROS 清除剂对 Cd 胁迫灵芝菌丝胞内 ROS、H₂O₂、MDA 的影响Fig. 6 Effects of exogenous ROS scavengers on ROS, H₂O₂, and MDA of cadmium coerced *G. lucidum* mycelium

H₂O₂ 处理组 ROS 水平显著提高, 相对于对照组提高了 2.11 倍。10.0 mg/L Cd 胁迫下, 抑制剂处理组相比未处理组 ROS 水平都显著下降, 分别下降了 35.5%、25.5%、29.9%。如图 6-B 可见, DPI、NAC、VC 都可以显著降低胞内 H₂O₂ 含量, 相比 10.0 mg/L Cd 处理组分别降低了 48.3%、28.9%、27.6%, DPI 处理组 H₂O₂ 含量下降到未处理组水平。如图 6-C 可见, 外源 H₂O₂ 处理后与对照组相比 MDA 含量提高了 5.08 倍, 10 mg/L Cd 胁迫下, NAC、VC、DPI 处理组与未处理组相比, 都显著降低了胞内 MDA 的水平, 分别降低了 69.1%、59.36%、73.8%, 其中 NAC、DPI 处理组 MDA 含量接近对照组水平。这些结果表明, DPI 抑制 ROS 及 H₂O₂ 的产生, 使

MDA 含量下降, ROS 抑制剂 NAC 及清除剂 VC 都可以降低 Cd 胁迫状态下的 ROS 水平及 MDA 含量, 缓解 Cd 对灵芝细胞的氧化膜损伤。因此抑制 NOX 酶活性及直接清除 ROS 均可控制 ROS 及 MDA 水平, 从而降低膜损伤。

4 讨论

灵芝作为担子菌具有特殊的发育方式、次生代谢和其他的发育过程, 也因为它的药用价值与经济价值而备受人们的关注。重金属 Cd 的污染使灵芝的产量下降, 严重影响药用、经济价值, 近年来 Cd 对灵芝生长与生理特性的影响备受大家关注。有研究表明, ROS 参与调控灵芝的次生代谢及菌丝分支, 过多的 ROS 会造成灵芝细胞膜、DNA 及蛋白

质损伤,严重影响灵芝的生长及次级代谢产物的合成^[9]。所以研究 Cd 胁迫对灵芝 ROS 的影响是研究 Cd 对灵芝生长及生理特性影响的重点之一。

Cd 不能直接引起芬顿反应,因此不能直接诱导 ROS 的产生,但可以抑制抗氧化酶活性,破坏线粒体电子呼吸传递链抑制细胞呼吸^[11],诱导 NOX 过表达,激活 NOX 活性引起动、植物及微生物的 ROS 水平升高^[17]。ROS 水平升高后,机体自身启动 ROS 清除系统,提升抗氧化能力。作为抗氧化系统中清除超氧负离子关键酶 SOD 将产生的超氧负离子清除并生成 H₂O₂ 和 O₂,来降低 ROS 对细胞的损伤^[18-19]。CAT、APX、GPX 参与机体内分解 H₂O₂ 及过氧化物,尤其以 CAT 为主分解 H₂O₂,提高抗环境胁迫的能力^[20]。

本研究表明,灵芝菌丝体的生长受 Cd 胁迫影响,有一定的 Cd 抵抗能力。Cd 质量浓度低于 1 mg/L 时,抗氧化酶 SOD、CAT、APX、GPX 基因表达量增加及对应的酶活性增加,此时 ROS 水平上升不显著,可能是由于促进了胞内代谢速率的上升,从而促进了菌丝体的生长。Cd 质量浓度达到 4 mg/L 时,NOX 2 个亚型 NOXA、NOXB 基因表达量上调。说明一定的 Cd 质量浓度会使灵芝 NOX 酶激活^[16]。随着 Cd 质量浓度的增加,ROS 水平及 MDA 含量显著上升说明 Cd 胁迫导致灵芝胞内产生大量的 ROS 及自由基,引发细胞膜氧化损伤,且随着 Cd 质量浓度的升高,膜氧化损伤程度越严重,抑制了菌丝的生长。

ROS 上升后,诱导抗氧化酶基因表达及酶活提升胞内抗氧化机制提升。SOD 与 CAT、APX、GPX 共同参与清除细胞内的 ROS。本研究中,高浓度的 Cd 胁迫下,SOD、CAT、APX、GPX 的转录水平显著提高,但是 GPX 酶活性却均呈下降趋势,金属离子可能影响了 GPX 酶活性,造成 ROS 水平过高,造成蛋白失去活性^[21]。其中 APX 的极显著提高可以抑制超氧负离子的生成速率^[22],所以 APX 活性显著上升,可能为 Cd 胁迫后灵芝胞内超氧负离子的生成速率不断提高,进而导致的应激反应。在刘娜等^[23]对长江华溪蟹谷胱甘肽系统影响的研究中表明,Cd²⁺能与 Se-Cys 结合导致 GPX 酶活性中心破坏而失去活性,这可能是 GPX 在 Cd 质量浓度超过 0.5 mg/L 后酶活性突然下降及 H₂O₂ 积累的主要原因。罗其勇^[24]重金属暴露引起鱼体氧化应激反应的研究中发现,在 H₂O₂ 清除过程中,GPX 可

能优先参与保护反应,Cd 质量浓度的增加使 H₂O₂ 含量逐渐上升,所以 GPX 酶活性在 H₂O₂ 浓度较低时有所提高。外源添加 DPI、NAC、VC 可以抑制或清除 Cd 胁迫产生 ROS。NOX 抑制剂 DPI 对 ROS 抑制效果显著,这也说明 Cd 胁迫对灵芝胞内 NOX 激活及 ROS 的积累有重要的影响。

综上所述,Cd 质量浓度低于 1.0 mg/L 时不会对灵芝生长造成抑制;Cd 质量浓度超过 1.0 mg/L 时,可能由于抑制了 GPX 酶活性,造成 H₂O₂ 积累,导致胞内 ROS 水平及 MDA 含量显著上升,NOX 表达量上调,抗氧化酶 SOD、CAT 基因表达量上调,APX 活性显著上升,来清除 ROS,在此过程中菌丝生长受到抑制;随着 Cd 质量浓度提高,NOX、SOD、CAT、APX、GPX 基因表达量呈升高趋势,但是 SOD、CAT、APX 酶活性等均呈先上升后下降趋势,在 Cd 质量浓度较低时生物可以通过调节自身产生大量的抗氧化酶来抵御氧化自由基的积累,但是当 Cd 质量浓度过高时可能抑制了抗氧化酶的活性造成酶活性下降,膜损伤加重细胞代谢产物积累受抑制,因此造成重要代谢产物产率下降。在生产过程中,应着力通过改变培养条件及调控代谢途径等手段控制 Cd 质量浓度在 1.0 mg/L 以保障灵芝质量。

参考文献

- [1] 戴玉成,杨祝良.中国药用真菌名录及部分名称的修订[J].菌物学报,2008,27(6):801-824.
- [2] 戴玉成.中国多孔菌名录机[J].菌物学报,2009,28(3):315-327.
- [3] Li Y Q, Wang S F. Antihepatitis B activities of ganoderic acid from *Ganoderma lucidum* [J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(11): 837-841.
- [4] Xu J W, Xu Y N, Zhong J J. Production of individual ganoderic acids and expression of biosynthetic genes in liquid static and shaking cultures of *Ganoderma lucidum* [J]. *Appl Microbiol Bioechnol*, 2010, 87: 457-466.
- [5] 董峰,吴琼,李向阳,等.ROS 在镉诱导 HK-2 细胞氧化损伤和凋亡中的作用研究[J].中国细胞生物学学报,2018,40(10):1662-1669.
- [6] 赵连华,杨银慧,胡一晨,等.我国中药材中重金属污染现状分析及对策研究[J].中草药,2014,45(9):1199-1206.
- [7] Baldantoni D, Morra L, Zaccardelli L, et al. Cadmium accumulation in leaves of leafy vegetables [J].

- Ecotox Environ Safe*, 2016, 123: 89-94.
- [8] 张 鼎. 镉中毒及锌对镉中毒的作用机理研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [9] 张晓柠. 灵芝对四种重金属富集作用的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- [10] Labuschagne C F, Brenkman A B. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(4): 918-930.
- [11] Wulf D. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. *Physiol Reviews*, 2002, 82(1): 47-95.
- [12] 董 峰, 吴 琼, 李向阳, 等. ROS 在镉诱导 HK-2 细胞氧化损伤和凋亡中的作用研究 [J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(10): 1662-1669.
- [13] Wang Y, Fang J, Leonard S S, *et al.* Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species [J]. *Free Rad Biol Med*, 2004, 36: 1434-1443.
- [14] Thijssen S, Cuypers A, Maringwa J, *et al.* Low cadmium exposure triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidneys [J]. *Toxicology*, 2007, 236(12): 29-41.
- [15] 王松华, 张 华, 崔元戎, 等. 镉对灵芝菌丝抗氧化系统的影响 [J]. 应用生态学报, 2008(6): 1355-1361.
- [16] 穆大帅. 灵芝基因沉默体系的建立及 NADPH 氧化酶基因家族功能分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [17] Thijssen S, Cuypers A, Maringwa J, *et al.* Low cadmium exposure triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidneys [J]. *Toxicology*, 2007, 236: 29-41.
- [18] Daud M K, He Q L, Lei M, *et al.* Ultrastructural, metabolic and proteomic changes in leaves of upland cotton in response to cadmium stress [J]. *Chemosphere*, 2015, 120: 309-320.
- [19] 颜 鹏. 重金属胁迫下废水中白腐真菌抗氧化应激的研究 [D]. 无锡: 江南大学 2017.
- [20] 周 丽, 郎多勇, 张文晋, 等. NaCl 胁迫对银柴胡生长及生理生化特性的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2829-2833.
- [21] Cuypers A, Plusquin M, Remans T, *et al.* Cadmium stress: An oxidative challenge [J]. *Biometals*, 2010, 23: 927-940.
- [22] Sato Y. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings [J]. *J Exper Bot*, 2001, 52(354): 145-151.
- [23] 刘 娜, 闫 博, 李涌泉, 等. 镉对长江华溪蟹谷胱甘肽系统的影响 [J]. 环境科学, 2008(8): 2302-2307.
- [24] 罗其勇. 重金属暴露引起鱼体氧化应激反应的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2018, 46(25): 32-35.