

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2026.01.013

镉诱导龙葵程序性死亡过程中线粒体的生理响应

肖屹, 孙慧博, 胡佳伟, 郁红艳, 滕跃

(江南大学环境与生态学院, 江苏 无锡 214122)

[摘要] 植物对镉的耐受性与其细胞死亡调控密切相关, 线粒体作为能量与死亡信号枢纽, 其响应机制是理解植物逆境适应的关键缺口。本研究以镉超积累植物龙葵(*Solanum nigrum* L.)为对象, 探究镉胁迫诱导程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)过程中线粒体的生理响应机制。通过营养液培养模拟不同浓度镉胁迫, 对龙葵线粒体进行生理变化分析及超微结构观测。结果表明, 镉处理后龙葵线粒体中活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量增加, 线粒体MDA浓度升高, 线粒体膜的完整性被破坏。特别是在200 $\mu\text{mol/L}$ 镉胁迫下, 线粒体膜电位下降了51.90%, 线粒体膜通透性转换孔的开放程度扩大了47.61%, Cyt c/a比值降低了30.66%。此外, 随着镉浓度的增加, 线粒体 Ca^{2+} 含量逐步增加, Ca^{2+} -ATP酶活性逐渐降低, 导致胞质 Ca^{2+} 失稳。研究表明, 镉胁迫会造成龙葵线粒体膜结构和功能严重受损, 诱导线粒体积累大量ROS, 线粒体细胞色素c的释放和 Ca^{2+} 的增加会进一步激活龙葵细胞内PCD的信号通路, 对龙葵生长和发育产生严重的负面影响。

[关键词] 龙葵, 镉胁迫, 程序性死亡, 线粒体, 生理响应

[中图分类号] X173; Q945.78 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2026)01-0125-10

Physiological Response in Mitochondria During Cadmium-Induced Programmed Death in *Solanum nigrum* L.

Xiao Yi, Sun Huibo, Hu Jiawei, Yu Hongyan, Teng Yue

(School of Environment and Ecology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Plant tolerance to cadmium is closely related to its cell death regulation. The response mechanism of mitochondria as energy and death signaling hubs is a key gap in understanding plant adversity adaptation. In this study, we investigated the physiological response mechanism of mitochondria during cadmium stress-induced programmed cell death(PCD) in the cadmium hyperaccumulator plant *Solanum nigrum* L.. The study simulated different concentrations of cadmium stress by nutrient solution culture, and the physiological changes of *S. nigrum* mitochondria were analyzed and ultrastructural observations were made. The results showed that the reactive oxygen species(ROS) content in *S. nigrum* mitochondria increased after cadmium treatment, the concentration of mitochondrial MDA increased, and the integrity of the mitochondrial membrane was disrupted. In particular, under 200 $\mu\text{mol/L}$ Cd stress, the mitochondrial membrane potential decreased by 51.90%, the opening of the mitochondrial membrane permeability transition pore was enlarged by 47.61%, and the Cyt c/a ratio decreased by 30.66%. In addition, with increasing cadmium concentration, the mitochondrial Ca^{2+} content gradually increased and Ca^{2+} -ATPase activity gradually decreased, leading to cytoplasmic Ca^{2+} destabilization. Studies have shown that Cd stress causes severe damage to the structure and function of the mitochondrial membrane of *S. nigrum*, induces the accumulation of large amounts of ROS in the mitochondria, and the release of mitochondrial cytochrome c and the increase in Ca^{2+} will further activate the signaling pathway of PCD in *S. nigrum* cells, which will have a serious negative impact on the growth and development of *S. nigrum*.

Key words: *Solanum nigrum* L., cadmium stress, programmed cell death, mitochondria, physiological response

近年来, 土壤镉(Cd)污染因其隐蔽性和生物毒性成为全球性环境问题。Cd是农业土壤和土壤-植物-环境系统中危害最大和最广泛的污染物之一, 其成因主要是人为活动, 如工业排放、含Cd的污水污泥和

收稿日期: 2025-03-30.

基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目(BK20191337).

通讯作者: 滕跃, 博士, 副教授, 研究方向: 污染土壤植物修复研究. E-mail: tengyue@jiangnan.edu.cn

磷肥的应用以及城市垃圾处理^[1]. Cd 通过抑制植物根系发育和光合作用导致作物减产,并通过食物链威胁人类健康^[2]. 大量数据表明 Cd 会对植物的生长、代谢和细胞结构造成严重的破坏,例如抑制光合作用、诱导氧化应激等^[3-4].

植物为应对 Cd 胁迫进化出复杂应答机制,其中程序性细胞死亡(PCD)既可清除受损细胞以维持整体存活,也可能因过度激活加剧组织损伤^[5]. 植物 PCD 是一种基因调控的有序细胞清除机制,不仅是植物生长发育的关键过程,也是其抵御生物与非生物胁迫的核心防御策略. 当植物细胞暴露于多种生物和非生物胁迫时,PCD 作为植物启动的防御机制的一部分被激活,从而在细胞水平上协调植物的应激响应,帮助植物调节细胞内环境,减少细胞损伤^[6]. 此外,通过分子标记辅助育种和基因编辑技术,可以精准地将与 PCD 相关的抗逆基因导入作物,增强其在逆境条件下的生存能力和产量稳定性^[7]. 因此,PCD 机制在农业和生态修复领域具有重要的潜在应用价值,尤其是在抗逆作物育种和超富集植物利用方面.

线粒体作为细胞代谢的核心细胞器,是能量代谢、活性氧(ROS)产生和细胞死亡信号的核心场所,在 PCD 的调控中扮演着关键角色. 先前的研究揭示了线粒体与植物 PCD 之间存在一定的相关性^[8],环境和内源刺激引发的线粒体生理变化能够激活影响 PCD 的信号转导通路^[9-10]. 在植物细胞中,线粒体稳态是 Cd 响应的核心生物枢纽^[11],活性氧的产生、光合功能的损害和线粒体的动态变化是 Cd 诱导拟南芥细胞死亡的早期事件^[12]. 因此,线粒体介导的 PCD 是植物逆境响应的核心机制,其生理状态可能直接影响 Cd 诱导 PCD 的进程. 尽管已有研究揭示了重金属通过 ROS 爆发和钙信号触发 PCD 的途径^[13],但线粒体在 Cd 胁迫下的动态变化仍不清晰,尤其是以超富集植物为对象的线粒体生理响应报道较少.

龙葵(*Solanum nigrum* L.)作为 Cd 超富集植物,对高浓度 Cd 具有独特耐受性,是研究重金属-PCD 互作的理想模型. 然而,目前对龙葵耐 Cd 机制的研究多集中于重金属转运蛋白和螯合物质^[14-16],而线粒体生理状态如何调控 Cd 诱导的 PCD 还尚未揭示. 本研究聚焦 Cd 胁迫下龙葵 PCD 过程中线粒体的生理响应机制,通过整合植物生理学(PCD 调控网络)、环境科学(重金属植物修复)与细胞生物学(线粒体功能)的多维度研究框架,旨在解析线粒体在 Cd 诱导龙葵 PCD 中的核心调控作用,并系统阐明超积累植物中线粒体生理失衡(如膜电位崩溃、Cyt c 释放)与 PCD 进程的因果关系. 研究结果将填补超积累植物 Cd-PCD-线粒体之间的理论空白,为植物修复技术的优化提供新见解,同时为培育耐 Cd 作物品种开辟新思路.

1 材料与方法

1.1 龙葵培养

挑选优良的龙葵种子于 70%的乙醇中表面灭菌 30 min,然后转移到 2%次氯酸钠溶液中浸泡 10 min,最后用无菌蒸馏水洗涤三次. 10 天后,将大小一致的幼苗移栽到霍格兰溶液(pH 5.5)中,在光照 16 h/黑暗 8 h、相对湿度 75%、空气温度 22 °C 的温室中生长. 溶液每三天更新一次,每天曝气 1 h. 生长 2 周后,分别在培养液中添加不同浓度的 Cd(0、50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化镉). 7 天后,我们分别标记用不同浓度 Cd 处理过的幼苗全叶,并将其冷冻在液氮中. 样品保存在 -80 °C 超低温冰箱,以便进一步提取线粒体并进行分析. 实验设置了 3 个生物重复.

本研究中 Cd 浓度梯度(0、50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$)的设定参考了前期预实验及文献报道的植物线粒体的耐受范围. 预实验表明,50 $\mu\text{mol/L}$ Cd 即可显著诱导龙葵叶片离子渗漏率的上升($P < 0.05$),而 200 $\mu\text{mol/L}$ Cd 处理下植株虽未完全死亡,但已出现明显的生长抑制(各生长指标抑制率均 $\geq 50\%$)和 PCD 特征,符合渐进性胁迫响应分析的需求. 此外,已有研究表明,植物线粒体对 Cd 的耐受浓度上限约为 200~300 $\mu\text{mol/L}$ ^[17]. 因此,选择此梯度可有效模拟轻度至重度 Cd 污染环境下的线粒体生理响应,同时避免急性毒性导致的细胞快速坏死,确保 PCD 过程的观测.

1.2 离子渗透率

选取各处理组最下层龙葵叶片 4 片,使用直径 1 cm 的打孔器,从叶片非叶脉区域切取 5 片大小相同的小叶圆片,并转移至 10 mL 离心管中(管内预先加入 5 mL 去离子水). 室温静置 1 h,平衡细胞内外渗透压. 静置完成后,采用数字电导率仪测定初始电导率,表征细胞膜完整性受损程度^[18]. 然后将离心管置沸水浴加热 20 min,冷却至室温后测定总电导率,反映细胞彻底崩解后的离子释放量. 离子渗透率表示为释放的总离子百分比.

1.3 超微结构观察

取充分展开的叶片中部,去掉叶脉及其边缘部分,切1 cm×1 cm大小的样块,迅速放入2.5%的戊二醛溶液中,同时抽真空使样品尽量沉浸在固定液底部,在4℃冰箱中进行前固定2 h以上,接着用0.1 mol/L磷酸缓冲液冲洗三次,每次10 min,随后用1%的四氧化锇进行再固定,用丙酮进行脱水^[19].最后在透射电子显微镜下观察、拍照.

1.4 线粒体的分离与纯化

完整的线粒体按照修改后的前人的方案进行分离和纯化^[20-22].用蒸馏水洗涤新鲜的叶片,然后加入4℃预冷的线粒体提取液在冰面上研磨.将匀浆以1 500 g离心15 min,丢弃沉淀.将上清液在16 000 g下再次离心20 min,保留沉淀.沉淀物用线粒体悬液缓冲液洗涤3次,然后再次以16 000 g离心20 min.线粒体纯化采用蔗糖密度梯度离心的方法进行纯化.最后,将含有线粒体的沉淀物用悬浮缓冲液重悬到适当的体积,以获得线粒体悬浮液.分离线粒体的所有步骤均在4℃下进行,提取的线粒体在2 h内用完或置于-80℃冰箱中保存.线粒体悬浮液的浓度通过测定其蛋白质含量进行标定,并以mg protein/mL表示.线粒体蛋白质含量采用考马斯亮蓝法测定^[23].

1.5 线粒体中Cd含量的测定

为了测定线粒体中的Cd,将完整的线粒体按照前人的方案进行分离和纯化.将纯化的线粒体悬浮液(1 mL)与等体积的浓硝酸混合,在120℃下加热.将样品冷却至室温,并加入0.4 mL 30%(w/v)过氧化氢.将该混合物在120℃下加热20 min,冷却,并加入去离子水至最终体积为5 mL.在线粒体中,Cd通过火焰原子吸收光谱法(AAS)分析,并通过样品中总线粒体蛋白的量进行标准化^[24].

1.6 线粒体中Ca²⁺含量和Ca²⁺-ATP酶活性的测定

线粒体Ca²⁺含量根据前人描述的方法测定^[25].首先将分离的线粒体悬浮于1.5 mL的悬浮液中,随后加入5 mL浓度为98%(w/v)的硝酸,并将其置于黑暗环境中反应7天.此步骤的目的是通过酸处理使线粒体中的Ca²⁺释放出来,以便后续检测.反应完成后,将样品稀释至10 mL,并加入1%的氯化镧溶液.氯化镧在此处作为释放剂,有助于提高Ca²⁺的检测灵敏度.最后,采用AAS对Ca²⁺的含量进行测定.最终结果以mmol/mg Pro表示.

线粒体Ca²⁺-ATPase的活性是通过比较3 mmol/L硝酸钙存在时和不存在时的酶活性来评估的.将线粒体制备物加入反应混合物中,反应混合物按H⁺-ATP酶反应系统的体积进行配比.加入30 mmol/L ATP-Tris(pH 8.0)启动反应,然后在37℃水浴中培养30 min.加入55%的三氯乙酸(TCA)终止反应.反应过程中释放的无机磷酸盐(Pi)用无机磷酸盐测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行定量. Ca²⁺-ATPase的活性以释放的无机磷酸量表示,单位为μmol/h/g FW.

1.7 线粒体活性氧和脂质过氧化的测定

线粒体内ROS含量的测定参考前人的方法^[26].通过使用特定染料2,7-二氯二氢-荧光二乙酸酯(H₂DCF-DA)在荧光分光光度计上检测其荧光强度.激发波长为485 nm,发射波长为530 nm,狭缝为10 nm.单位浓度线粒体中ROS的含量表示为a.u/mg protein.

线粒体内丙二醛(MDA)的含量参考前人方法进行测量^[25].线粒体中MDA的含量表示为: mmol/μg protein.

1.8 线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)、线粒体通透性转换和Cyt c/a比值的测量

为了分析线粒体膜电位的变化,使用了特异性分子探针5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-碘化四乙基氨基碳菁(JC-1)^[19],并在荧光分光光度计上测量JC-1单体荧光强度(绿色荧光,525 nm)和J聚集荧光强度(红色荧光,595 nm)的平均值.

为了研究线粒体膜的通透性的转变,实验中将分离得到的线粒体悬浮于专门配制的缓冲液中.该缓冲液的成分包括5 mmol/L琥珀酸钠、70 mmol/L蔗糖、5 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液以及220 mmol/L甘露醇,将pH值精确调节至7.4,以确保线粒体在适宜的环境中保持其结构和功能的完整性.随后,添加1 mmol/L丙酮酸和1 mmol/L苹果酸作为复合物的呼吸底物,并通过添加10 mg氯化钙引发线粒体通透性转换孔(MPTP).线粒体肿胀被测量为在540 nm处吸光度的降低^[25].

如先前的一项研究^[27]所述,为了测定线粒体中细胞色素 c(Cyt c)的含量,将悬浮的线粒体加入 0.2% 的牛血清蛋白溶液,使其达到 0.5 mg/mL 的最终浓度. 随后,使用紫外分光光度计在 550 nm 和 630 nm 两个波长处测量悬浮液的吸光度. 通过计算这两个波长的吸光度值之差,可以得到 Cyt c 的特征吸收值,进而用于计算 Cyt c/a 值. Cyt c/a 比值 = A550/A630.

1.9 类半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 的活性测定

根据制造商的说明书(Solarbio, BC3830),采用胱天蛋白酶 3 样活性检测试剂盒进行实验操作^[17]. 为了测量胱天蛋白酶 3 样的活性,将 35 μL 提取液与 65 μL 预先配制完成的反应缓冲液(含 5 μL 浓度为 2 mmol/L 的 DEVD-pNA 底物)于 96 孔微孔板中充分混合,构建反应体系. 随后将上述混合液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中持续孵育 4 h 以完成酶促反应,最后用酶标仪在 405 nm 波长处对反应产物进行吸光度测定,通过比色法实现活性值的定量分析.

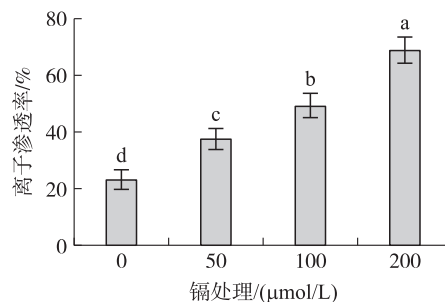
1.10 数据分析

使用 Graphpad Prism 9.5 绘制相关图表,IBM SPSS 25 进行统计分析(ANOVA),每个数据为三个平行实验的平均值. 所有数据均基于三次独立重复实验的平均值 \pm 标准差(mean \pm SD),以 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 不同 Cd 处理浓度下龙葵叶片离子渗透率的变化

离子渗透率反映膜完整性,膜损伤是 PCD 的早期事件,导致内容物泄漏和死亡信号激活,本研究探讨了不同浓度 Cd 处理对龙葵叶片离子渗透率的影响. 图 1 显示,随着 Cd 处理浓度的增加,龙葵叶片的离子渗透率呈现显著的上升趋势. 具体而言,当 Cd 处理浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时,龙葵叶片的离子渗透率约为 23.13%. 当 Cd 处理浓度增加至 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,离子渗透率显著上升至约 34.28%,表明低浓度 Cd 处理即对叶片离子通透性产生了影响. 随着 Cd 浓度进一步增加至 100 $\mu\text{mol/L}$,离子渗透率继续上升至约 49.37%,此时差异具有统计学显著性. 最终在 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cd 处理浓度下,离子渗透率达到了约 69.05%,相较于对照组有极显著差异.



条形图上不同小写字母表示不同处理之间存在显著差异 ($P < 0.05$).

图 1 不同 Cd 胁迫下龙葵叶片的离子渗透率
Fig. 1 Ion leakage of *S. nigrum* leaves under different Cd stresses

2.2 不同 Cd 胁迫对龙葵线粒体超微结构的影响

如图 2(a) 所示,对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ Cd)的线粒体膜结构完整,线粒体基质中含有大量清晰的嵴. 在低浓度 Cd 胁迫下(50 $\mu\text{mol/L}$),线粒体膜部分受损,出现空腔,但对整体结构影响不大,说明线粒体在 Cd 胁迫下开始受损(图 2(b)). 在中等浓度 Cd 胁迫(100 $\mu\text{mol/L}$)下,线粒体外膜模糊,开口增加,嵴减少,结构逐渐变形(图 2(c)). 高浓度 Cd 胁迫(200 $\mu\text{mol/L}$)处理叶片时,膜双分子层逐渐溶解,外膜严重破裂,内部线粒体开始分裂,导致线粒体逐渐解体(图 2(d)).

2.3 不同 Cd 胁迫下线粒体 Cd 含量的变化

如图 3 所示,在不同浓度的 Cd 暴露条件下,龙葵叶片线粒体的 Cd 积累量呈现出显著的差异. 具体而言,经过 50~200 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 处理的龙葵叶片线粒体,其 Cd 积累量明显高于未暴露 Cd 的对照组. 在设置的梯度 Cd 处理体系中,与低浓度组(50 $\mu\text{mol/L}$)相比,中浓度组(100 $\mu\text{mol/L}$)和高浓度组(200 $\mu\text{mol/L}$)的龙葵叶片线粒体 Cd 含量分别显著提高了 21.41% 和 26.49%. 然而,值得注意的是,中浓度组与高浓度组之间的 Cd 积累量差异并未达到统计学显著性水平. 这表明龙葵线粒体对 Cd 的主动隔离能力可能存在阈值(约 100 $\mu\text{mol/L}$),后续高浓度胁迫下 Cd 可能更多分布于液泡或细胞壁等区室.

2.4 不同 Cd 胁迫下线粒体 Ca²⁺ 含量与 Ca²⁺-ATP 酶活性变化

如图 4(a) 所示,可以看出随着 Cd 处理浓度从 0 增加到 200 $\mu\text{mol/L}$,线粒体 Ca²⁺ 含量逐步增加,呈现

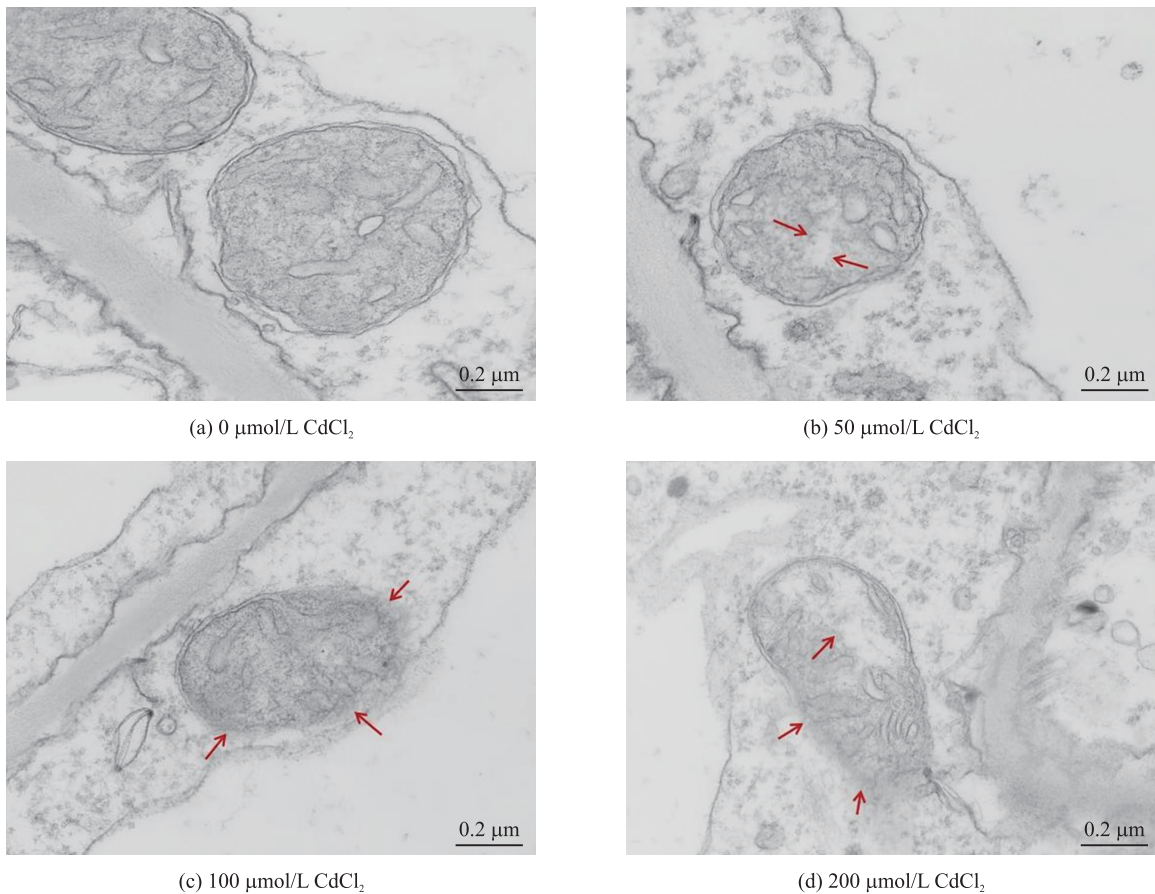


图2 不同 Cd 胁迫下龙葵线粒体的超微结构

Fig. 2 Mitochondrial ultrastructure in leaves of *S. nigrum* under different Cd stresses

出显著的剂量依赖性. 当 Cd 处理浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 线粒体 Ca^{2+} 含量显著高于对照组, 但随着浓度的进一步增加, 线粒体 Ca^{2+} 含量增速下降. 此结果表明, 在低浓度 Cd 胁迫下, 线粒体通过主动吸收 Ca^{2+} 以缓冲胞质钙离子毒性; 在高 Cd 胁迫阶段, 线粒体 Ca^{2+} 超载导致功能崩溃, 胞质 Ca^{2+} 二次升高, 加速细胞死亡. 图 4(b) 展示了不同 Cd 胁迫下 Ca^{2+} -ATP 酶的活性变化, Ca^{2+} -ATP 酶活性与 Cd 胁迫强度呈显著负相关. 与对照组相比, 50 $\mu\text{mol/L}$ Cd 处理影响了 Ca^{2+} -ATP 活性, 使其有所降低. 但在 200 $\mu\text{mol/L}$ Cd 处理下, Ca^{2+} -ATP 酶活性较对照下降 64.3%. 该酶活性降低直接影响 Ca^{2+} 跨膜转运效率, 导致胞质钙信号紊乱, 中高浓度 Cd ($\geq 100 \mu\text{mol/L}$) 可能通过取代酶活性中心的 Ca^{2+} 结合位点, 引发酶蛋白构象失活.

2.5 不同 Cd 处理浓度下线粒体 ROS 和 MDA 含量的变化

为了检测龙葵线粒体在 Cd 胁迫下产生的 ROS, 采用了 ROS 敏感的荧光指示剂 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. 如图 5(a) 所示, 随着 Cd 处理浓度的增加, 线粒体中 ROS 含量呈显著上升趋势. 与低 Cd 胁迫 (50 $\mu\text{mol/L}$) 相比, 中、高 Cd 胁迫 (100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$) 下线粒体中的 ROS 含量分别增加了 73.10% 和 249.62%. 在高浓度 Cd 胁迫 (200 $\mu\text{mol/L}$) 下, 线粒体中 ROS 含量的增长率达到最大值.

MDA 是脂质过氧化损伤的最终产物之一, 其浓度与膜脂质过氧化的程度有关. 如图 5(b) 所示, MDA 的含量随 Cd 浓度的增大而增大. 与非 Cd 对照相比, 各浓度 Cd 胁迫下线粒体 MDA 的含量分别显著增长了 52.68%、126.05% 和 251.51%. 上述结果说明 Cd 毒害导致的活性氧迸发严重破坏线粒体膜结构, 致使线粒体膜脂过氧化.

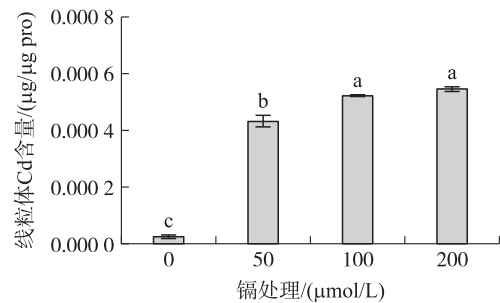


图3 不同 Cd 胁迫下龙葵叶片线粒体的 Cd 积累量
Fig. 3 Cd accumulation in mitochondria of *S. nigrum* leaves under different Cd stresses

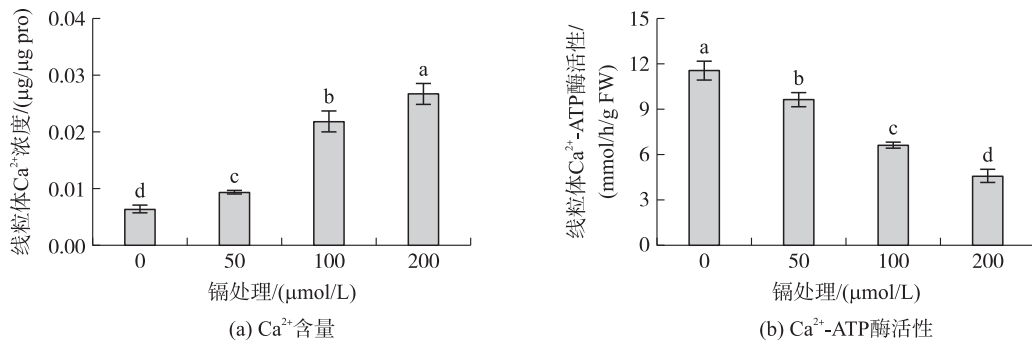


图 4 Cd 诱导的龙葵线粒体 Ca²⁺ 含量与 Ca²⁺-ATP 酶活性变化

Fig. 4 Cd-induced changes in mitochondrial Ca²⁺ content and Ca²⁺-ATPase activity in *S. nigrum*

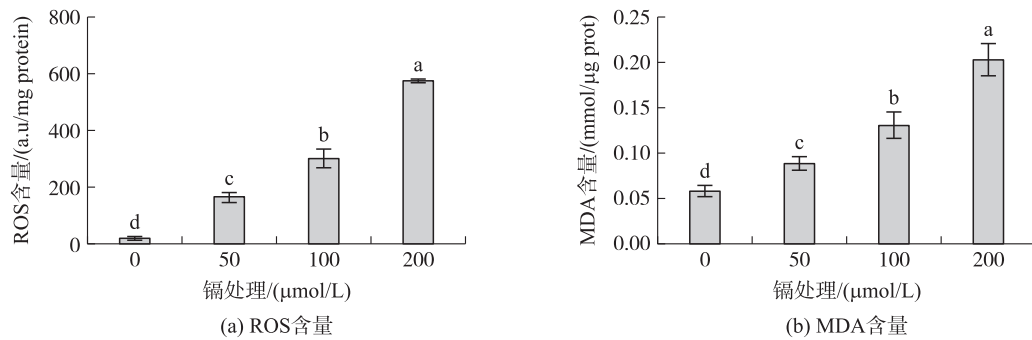


图 5 不同 Cd 浓度诱导下的线粒体 ROS 和 MDA 的含量

Fig. 5 Mitochondrial ROS and MDA contents induced by different Cd concentrations

2.6 不同 Cd 胁迫下线粒体膜电位、MPTP 和 Cyt c/a 比值的变化

荧光染料 JC-1 探针具有独特的性质,在高线粒体电位下自发形成红色荧光二聚体,而其单体形式普遍存在于低 $\Delta\Psi_m$ 细胞中,发出绿色荧光. 因此,红/绿荧光的变化比值反映了膜电位的变化. 如图 6(a) 所示,随着 Cd 浓度的升高,线粒体膜电位逐渐下降. 与非 Cd 对照相比,各浓度 Cd 胁迫下线粒体膜电位显著下降 7.66%, 26.96%, 51.90%, 呈现典型的阶梯式下降. 各组间显著性差异,说明 Cd 对线粒体膜电位的破坏具有明确的剂量依赖性.

线粒体光密度降低意味着 MPTP 扩大和开放. 图 6(b) 结果显示,在对照组中,膜的吸光度约为 0.21. 当 Cd 浓度增加至 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,膜的吸光度略有下降,下降了 12.24%. 继续增加 Cd 浓度至 100 $\mu\text{mol/L}$,膜吸光度进一步下降了 35.59%. 当 Cd 浓度达到 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,膜吸光度的下降率达到 47.61%,与对照组及较低浓度组之间均有显著差别. 因此,随着 Cd 浓度的增加,MPTP 的开放程度呈现出逐渐扩大的趋势.

图 6(c) 显示了不同浓度 Cd 胁迫下线粒体 Cyt c/a 比值的变化. 结果表明,随着 Cd 浓度的增加,Cyt c/a 比值逐渐降低. 具体而言,在 0 $\mu\text{mol/L}$ Cd 处理时,Cyt c/a 比值最高,约为 1.37;当 Cd 浓度升至 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,比值有所下降,约为 1.22;进一步增加 Cd 浓度至 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,Cyt c/a 比值继续下降至约

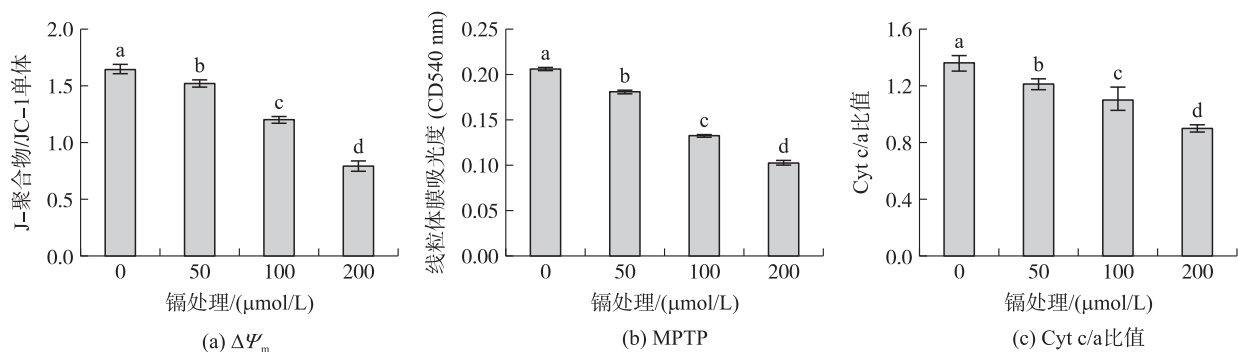


图 6 Cd 胁迫对线粒体膜电位、MPTP 和 Cyt c/a 比值的影响

Fig. 6 The effect of Cd stress on mitochondrial membrane potential, MPTP and Cyt c/a ratio

1.14;而当 Cd 浓度达到 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, Cyt c/a 比值降至最低,约为 0.95. 这些数据显示, Cd 胁迫对线粒体 Cyt c/a 比值具有显著影响,且该比值与 Cd 浓度之间存在负相关关系. 在 Cd 胁迫下,线粒体中 Cyt c/a 比值越小,反映细胞色素 c 从线粒体内膜脱落的能力越强,释放到细胞质基质的可能性越大.

2.7 不同 Cd 胁迫下龙葵 caspase-3-like 活性

Caspase-3-like 活性通常用于评估植物 PCD^[28]. 本研究通过测定 caspase-3-like 的活性来研究 Cd 胁迫对龙葵 PCD 的响应. 实验数据如图 7 所示,随着 Cd 浓度增加, caspase-3-like 活性也逐渐增大. 具体而言,当 Cd 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时, caspase-3-like 活性最低. 随着 Cd 浓度增加至 50 $\mu\text{mol/L}$, caspase-3-like 活性开始上升,比对照组高 128.45%. 当 Cd 浓度进一步增加至 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, caspase-3-like 活性继续上升,表明中等浓度 Cd 胁迫对 caspase-3-like 活性的促进作用更加明显. 而在高浓度 Cd 胁迫(200 $\mu\text{mol/L}$)下, caspase-3-like 活性达到最高,比对照组高出了 7 倍左右,显示出显著的增加趋势.

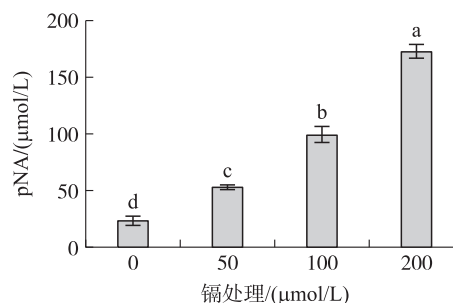


图 7 Cd 胁迫对龙葵叶片 caspase-3-like 活性的影响
Fig. 7 The effect of Cd stress on caspase-3-like activity from leaves of *S. nigrum*

3 讨论

作为真核细胞内重要的半自主性细胞器,线粒体呈现出独特的双膜系统构型,其结构层次包括外膜、膜间腔及内膜等组成部分. 它们在多种细胞过程中发挥重要作用,如细胞代谢、信号转导和细胞死亡调节. 线粒体结构和功能的异常可触发细胞内信号通路的级联反应和 PCD 的启动,这一生理过程与各类细胞损伤的发生和进展密切相关. 透射电镜结果显示,高浓度 Cd 胁迫导致线粒体膜双层的溶解和嵴结构的破坏(图 2). 这可能与镉离子(Cd^{2+})的理化特性密切相关: Cd^{2+} 可通过竞争性结合膜脂质的磷酸基团或取代 Ca^{2+} 结合位点,破坏线粒体膜的稳定性. 线粒体膜的主要成分是磷脂,其磷酸基团通常与 Ca^{2+} 等阳离子结合以维持膜结构的稳定性^[29-30]. Cd^{2+} 由于其较高的亲和力,能够与这些磷酸基团竞争性结合,导致膜脂质的排列紊乱,从而削弱膜的完整性^[31]. 尽管线粒体中 Cd 积累量较低(图 3),但其仍足以引发显著的生理损伤. 此外,过量 ROS 的积累(图 5(a))可诱发膜脂过氧化(图 5(b)),直接损伤膜完整性. 已有研究证实,ROS 可通过氧化线粒体内膜的心磷脂导致细胞色素 c 与膜的解离,而嵴结构的解体可能进一步削弱氧化磷酸化效率,加剧能量代谢紊乱^[32]. 这表明即使微量 Cd^{2+} 也可通过干扰 Ca^{2+} 信号或氧化还原稳态间接破坏线粒体功能. 因此,龙葵线粒体损伤主要由 Cd 的间接毒性而非直接积累驱动, Cd 通过氧化损伤和离子干扰双重途径破坏线粒体超微结构,最终导致其功能失活.

植物在胁迫下产生由 Ca^{2+} 通道、转运蛋白和传感器介导的 Ca^{2+} 信号,影响 Ca^{2+} 的浓度和分布^[33]. 我们的研究表明(图 4), Cd 胁迫与龙葵 PCD 中的 Ca^{2+} 信号传导有关,一定浓度的 Cd 胁迫能够加速线粒体内 Ca^{2+} 的积累,并降低 Ca^{2+} -ATP 酶的活性. 这与 Brisac 等^[34] 在脊髓灰质炎病毒诱导的 IMR5 细胞 PCD 中的发现一致,线粒体过度摄取细胞质 Ca^{2+} 后,线粒体 Ca^{2+} 含量增加,随后导致 IMR5 细胞线粒体功能障碍和细胞死亡. 同样, Luo 等^[35] 也观察到 Cd 诱导的黄瓜根尖 PCD 中线粒体 Ca^{2+} -ATP 酶活性降低,线粒体依赖性细胞死亡数量增加. 线粒体充当临时 Ca^{2+} 库,对 Ca^{2+} 信号传导、细胞命运和生物能量学至关重要^[36]. Wang 等^[37] 观察到,在经历发育控制 PCD 的拟南芥根冠细胞中,细胞内 Ca^{2+} 浓度升高并伴有线粒体断裂是 PCD 执行的最早事件.

如图 6(a) 所示, Cd 暴露会导致龙葵叶片线粒体膜电位降低. 这是线粒体功能受损的一个重要指标,它与细胞平衡密切相关,最常用来确定线粒体的代谢状态^[38]. 线粒体膜电位的崩溃标志着电子传递链功能障碍和质子梯度消散,这直接诱导 MPTP 的开放(图 6(b)). MPTP 是线粒体内外膜之间的一类蛋白质复合物,是线粒体通透性转变的结构基础^[39]. 我们的结果表明, MPTP 的持续扩大会导致 Cyt c 从内膜释放至胞质,导致 Cyt c/a 比值降低(图 6(c)),进而与凋亡酶激活因子(Apaf-1)蛋白结合形成凋亡体,激活 caspase-3-like 蛋白酶(图 7). 类似机制在动物细胞中已被广泛报道^[40],而本研究表明植物 PCD 亦遵循这一经典通路. 值得注意的是,胞质 Ca^{2+} 浓度的升高(图 4(a))可能通过激活钙依赖性蛋白酶间接增强

caspase 活性,共同推动 PCD 进程^[36]。

尽管 Cd 胁迫对龙葵线粒体造成显著损伤,但作为超积累植物,龙葵可能通过多种机制缓解毒性。例如,线粒体通过上调抗氧化酶活性以清除过量 ROS^[41],或利用植物螯合肽隔离游离 Cd²⁺,减少其对膜蛋白的直接攻击^[42]。此外,线粒体自噬也会选择性清除受损线粒体,维持细胞稳态^[43]。与非积累植物(如黄瓜^[17]、花生^[25])相比,龙葵在线粒体层面对重金属胁迫表现出的显著差异主要体现在离子稳态调控方面:龙葵线粒体 Ca²⁺-ATP 酶活性虽受抑制(图 4(b)),但其基础活性显著高于非积累植物,这可能是由于其通过液泡区隔化缓解胞质 Ca²⁺超载。其次,与烟草悬浮细胞相比^[44],龙葵在重金属胁迫下激活的 caspase-3-like 蛋白酶活性要显著高于非积累植物。这些差异表明,龙葵线粒体通过增强抗逆能力与精准调控 PCD 信号,实现了对 Cd 毒性的独特耐受。

4 结论

综上所述,Cd 胁迫通过诱导 ROS 爆发与脂质过氧化,破坏线粒体膜完整性,导致膜电位崩溃及 MPTP 开放。值得注意的是,尽管线粒体中 Cd 积累量较低,但其通过干扰 Ca²⁺ 稳态与氧化还原平衡的“低剂量高毒性”效应仍显著触发线粒体功能障碍。此外,线粒体损伤直接导致 Cyt c 释放与 caspase-3-like 活性上升,证实植物 PCD 遵循“线粒体-Cyt c-caspase”经典通路。本研究首次阐明超积累植物线粒体在 Cd-PCD 中的枢纽作用,为解析植物重金属耐受机制提供了新视角。然而,本研究集中于线粒体 Cd 胁迫的稳态响应,未探讨时间动态性对线粒体功能的影响。未来需结合多时间点动态分析与分子调控网络解析,进一步揭示线粒体自噬、修复途径与 PCD 执行的互作关系,以推动植物修复技术与抗逆育种的协同发展。

[参考文献]

- [1] Luo N,Zhang X J,Gong L F,et al. Review of remediation methods for soil contaminated with cadmium[J]. Eurasian Soil Science,2025,58(1):3.
- [2] Zhao Y,Wang J,Huang W,et al. Abscisic-acid-regulated responses to alleviate cadmium toxicity in plants[J]. Plants,2023,12(5):1023.
- [3] Zhou Y,Fu J,Ye Y,et al. Physiological and molecular response mechanisms of tomato seedlings to cadmium(Cd) and lead (Pb) stress[J]. PeerJ,2024,12:e18533.
- [4] Wang J,Chen X,Chu S,et al. Conjoint analysis of physio-biochemical,transcriptomic,and metabolomic reveals the response characteristics of *Solanum nigrum* L. to cadmium stress[J]. BMC Plant Biology,2024,24(1):567.
- [5] Quadros I P S,Madeira N N,Loriato V A P,et al. Cadmium-mediated toxicity in plant cells is associated with the DCD/NRP-mediated cell death response[J]. Plant,Cell & Environment,2022,45(2):556-571.
- [6] Daneva A,Gao Z, Van Durme M,et al. Functions and regulation of programmed cell death in plant development[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology,2016,32(1):441-468.
- [7] Cui F,Li X,Wu W,et al. Ectopic expression of *Botrytis susceptible1* reveals its function as a positive regulator of wound-induced cell death and plant susceptibility to *Botrytis*[J]. The Plant Cell,2022,34(10):4105-4116.
- [8] Jones A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? [J]. Trends in Plant Science,2000,5(5):225-230.
- [9] Endlicher R,Drahota Z,Štefkova K,et al. The mitochondrial permeability transition pore-current knowledge of its structure,function,and regulation,and optimized methods for evaluating its functional state[J]. Cells,2023,12(9):1273.
- [10] Schwarzlander M,Finkemeier I. Mitochondrial energy and redox signaling in plants[J]. Antioxidants & Redox Signaling,2013,18(16):2122-2144.
- [11] Liu M Y,Huang Z R,Xie K X,et al. Mitostasis is the central biological hub underlying the response of plants to cadmium stress[J]. Journal of Hazardous Materials,2023,441:129930.
- [12] Bi Y H,Chen W L,Zhang W N,et al. Production of reactive oxygen species,impairment of photosynthetic function and dynamic changes in mitochondria are early events in cadmium-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*[J]. Biol Cell,2009,101(11):629-643.
- [13] Sychta K,Slomka A,Kuta E. Insights into plant programmed cell death induced by heavy metals:discovering a terra incognita

- [J]. *Cells*,2021,10(1):65.
- [14] Wang J,Chen X,Chu S,et al. Influence of Cd toxicity on subcellular distribution,chemical forms,and physiological responses of cell wall components towards short-term Cd stress in *Solanum nigrum*[J]. *Environmental Science and Pollution Research*,2021,28(11):13955–13969.
- [15] Li Z,Yang Y,Guan W,et al. Insight into the subcellular mechanism of maximizing Cd accumulation in hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. under the action of biodegradable chelating agent[J]. *Environmental and Experimental Botany*,2023,207:105226.
- [16] Song L Y,Liu X,Zhang L D,et al. Proteomic analysis reveals differential responsive mechanisms in *Solanum nigrum* exposed to low and high dose of cadmium[J]. *Journal of Hazardous Materials*,2023,448:130880.
- [17] Luo S,Tang Z,Yu J,et al. Hydrogen sulfide negatively regulates cd-induced cell death in cucumber(*Cucumis sativus* L.) root tip cells[J]. *BMC Plant Biology*,2020,20:1–13.
- [18] Jambunathan N. Determination and detection of reactive oxygen species(ROS),lipid peroxidation,and electrolyte leakage in plants[J]. *Methods in Molecular Biology*,2010,639:292–298.
- [19] Zheng M M,Feng D,Liu H J,et al. Subcellular distribution,chemical forms of cadmium and rhizosphere microbial community in the process of cadmium hyperaccumulation in duckweed[J]. *Science of the Total Environment*,2023,859(2):160389.
- [20] Yin B,Zhang J X,Liu Y D,et al. *PtomtAPX*,a mitochondrial ascorbate peroxidase,plays an important role in maintaining the redox balance of *Populus tomentosa* Carr[J]. *Scientific Reports*,2019,9:19541.
- [21] Zhong Y H,Guo Z J,Wei M Y,et al. Hydrogen sulfide upregulates the alternative respiratory pathway in mangrove plant *Avicennia marina* to attenuate waterlogging-induced oxidative stress and mitochondrial damage in a calcium-dependent manner[J]. *Plant Cell & Environment*,2023,46(5):1521–1539.
- [22] Xu Y,Li X,Huang J,et al. A simplified method to isolate rice mitochondria[J]. *Plant Methods*,2020,16:1–10.
- [23] Grintzalis K,Georgiou C D,Scheider Y J. An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination[J]. *Analytical Biochemistry*,2015,480:28–30.
- [24] Agrawal B,Czymmek K J,Sparks D L,et al. Transient influx of nickel in root mitochondria modulates organic acid and reactive oxygen species production in nickel hyperaccumulator *Alyssum murale*[J]. *Journal of Biological Chemistry*,2013,288(10):7351–7362.
- [25] Zhan J,Li W,He H Y,et al. Mitochondrial alterations during Al-induced PCD in peanut root tips[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*,2014,75:105–113.
- [26] Esposti M D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species[J]. *Methods*,2002,26(4):335–340.
- [27] Li J,He Y,Ma D,et al. Volatile allelochemicals of *Chenopodium ambrosioides* L. induced mitochondrion-mediated Ca^{2+} -dependent and Caspase-dependent apoptosis signaling pathways in receptor plant cells[J]. *Plant and Soil*,2018,425:297–308.
- [28] Ren R,Li Z,Zhou H,et al. Changes in apoptosis-like programmed cell death and viability during the cryopreservation of pollen from *Paeonia suffruticosa*[J]. *Plant Cell,Tissue and Organ Culture*,2020,140(2):357–368.
- [29] Kour J,Khanna K,Singh A D,et al. Calcium's multifaceted functions:From nutrient to secondary messenger during stress[J]. *South African Journal of Botany*,2023,152:247–263.
- [30] Balantic K,Weiss V U,Allmaier G,et al. Calcium ion effect on phospholipid bilayers as cell membrane analogues[J]. *Bioelectrochemistry*,2022,143:107988.
- [31] Romanova N,Sule K,Issler T,et al. Cadmium-cardiolipin disruption of respirasome assembly and redox balance through mitochondrial membrane rigidification[J]. *Journal of Lipid Research*,2025,66(3):100750.
- [32] Petrosillo G,Ruggiero F M,Paradies G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria[J]. *The FASEB Journal*,2003,17(15):2202–2208.
- [33] Ren H,Zhao X,Li W,et al. Calcium signaling in plant programmed cell death[J]. *Cells*,2021,10(5):1089.
- [34] Brisac C,Teoule F,Autret A,et al. Calcium flux between the endoplasmic reticulum and mitochondrion contributes to poliovirus-induced apoptosis[J]. *Journal of Virology*,2010,84(23):12226–12235.
- [35] Luo S,Tang Z,Yu J,et al. Hydrogen sulfide inhibits cadmium-induced cell death of cucumber seedling root tips by protecting mitochondrial physiological function[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*,2022,41(8):3421–3432.
- [36] Ruberti C,Feitosa-Araujo E,Xu Z,et al. MCU proteins dominate in vivo mitochondrial Ca^{2+} uptake in *Arabidopsis* roots[J]. *The Plant Cell*,2022,34(11):4428–4452.
- [37] Wang J,Bollier N,Buono R A,et al. A developmentally controlled cellular decompartmentalization process executes programmed

- cell death in the *Arabidopsis* root cap[J]. *The Plant Cell*, 2024, 36(4) :941–962.
- [38] Du R, Bei H, Jia L, et al. A low-cost, accurate method for detecting reticulocytes at different maturation stages based on changes in the mitochondrial membrane potential[J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2020, 101 : 106664.
- [39] Cui Y, Pan M, Ma J, et al. Recent progress in the use of mitochondrial membrane permeability transition pore in mitochondrial dysfunction-related disease therapies[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2021, 476(1) :493–506.
- [40] Vringer E, Tait S W. Mitochondria and cell death-associated inflammation[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2023, 30(2) : 304–312.
- [41] Kowalczyk P, Sulejczak D, Kleczkowska P, et al. Mitochondrial oxidative stress: a causative factor and therapeutic target in many diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24) :13384.
- [42] Bellini E, Bandoni E, Giardini S, et al. Glutathione and phytochelatins jointly allow intracellular and extracellular detoxification of cadmium in the liverwort *Marchantia polymorpha*[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2023, 209 :105303.
- [43] Liu L, Li Y, Chen G, et al. Crosstalk between mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain mitochondrial homeostasis [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2023, 30(1) :86.
- [44] Kobylinska A, Posmyk M M. Melatonin protects tobacco suspension cells against Pb-induced mitochondrial dysfunction[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24) :13368.

[责任编辑:杜忆忱]