

干旱胁迫下甘草酸合成与脱落酸的相关性初步研究

徐 鹏, 刘长利*, 许利平*, 王满元, 于 萍

(首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

摘要: 目的 研究干旱胁迫下甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 植物体内的甘草酸与植物抗旱信号传导物质脱落酸量的变化, 分析二者相关关系。方法 以人工培育甘草为材料, 按照外源钙叶面喷施浓度、喷施季节与干旱胁迫程度 3 因素 3 水平设计正交试验, 检测不同试验处理下的甘草酸与脱落酸量变化, 分析各试验因素对甘草酸、脱落酸量变化的影响, 以及两者量之间的相关性。结果 干旱胁迫对甘草酸和脱落酸均具有极显著的影响, 且二者量之间具有极显著的正相关关系。结论 干旱胁迫下甘草植物体内甘草酸的合成积累与抗旱信号传导物质脱落酸的合成密切相关。

关键词: 甘草; 甘草酸; 脱落酸; 干旱胁迫; 相关性

中图分类号: S567.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)08-1375-03

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的根及根茎^[1], 广泛应用于中医临床, 具有抗炎、抗变态反应、抗溃疡、免疫调节、抗 HIV、诱生干扰素、抗癌等作用^[2-7]。甘草酸 (glycyrrhizic acid, GA) 是甘草中有效成分之一^[8], 为评价中药甘草 *Radix Glycyrrhizae* 质量优劣的指标性成分, 作为一种次生代谢产物, 其特殊分子结构能够在严重脱水的情况下有效保护植物细胞膜结构和功能大分子, 从而提高植物的抗旱性^[9]。而脱落酸 (abscisic acid, ABA) 作为一种信号传导物质, 可使气孔快速关闭, 有助于阻止植物水分蒸腾, 在植物抗旱机制中发挥着重要的作用^[10]。

甘草野生分布于内蒙古、宁夏、甘肃、新疆等干旱半干旱地区, 属于阳性旱生植物^[11]。干旱作为一种外界环境的逆境胁迫, 对植物抗旱传导物质 ABA 以及次生代谢产物的合成积累都会产生影响。试验以人工种植的甘草 *G. uralensis* 为材料, 在干旱胁迫的外界刺激下增加外源钙喷施浓度和喷施季节的试验因素, 应用 HPLC 法测定甘草中的 GA 与 ABA 的量, 探讨两者的关系, 为进一步揭示 GA 等次生代谢产物合成积累的抗旱生理生态学机制奠定理论依据。

1 仪器与试药

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 安捷伦液相色谱系统化学工作站; EYELA 旋转蒸发仪; AR1140 型电子天平 (OHAUS—USA)。

甘草酸铵对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 11073-200614); ABA 对照品 (北京欣经科生物技术有限公司, 批号 1100FA12); 乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher), 水为纯净水, 其余试剂均为分析纯。

2 材料与方法

2.1 试验材料的培育及试验设计: 盆栽试验设置于北京济世恩康中草药种植中心的防雨棚中。甘草种子购于内蒙古亿利集团甘草分公司, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为豆科植物甘草 *G. uralensis* Fisch.。2008 年 5 月份播种于花盆中进行栽培试验, 7 月份采用控水法进行土壤干旱胁迫处理^[11]。在此基础上增加外源钙喷施季节与喷施浓度 2 个试验因素, 因素水平如表 1 所示, 采用 3 因素 3 水平的正交表 $L_9(3^4)$ 进行正交试验设计, 共 9 个处理组, 每组设置 5 个重复。

表 1 盆栽甘草试验的因素水平表

Table 1 Factors and levels of potting *Glycyrrhizae Radix* test

因素	水 平		
	1	2	3
干旱胁迫	轻度干旱胁迫(D ₁)	中度干旱胁迫(D ₂)	重度干旱胁迫(D ₃)
程度	(土壤相对含水量 60%~65%)	(土壤相对含水量 45%~50%)	(土壤相对含水量 30%~35%)
外源钙叶面	不喷钙对照(Ca ₁)	低钙对照(Ca ₂)	高钙对照(Ca ₃)
喷施浓度	0 mmol/L 的 CaCl ₂ 溶液	8 mmol/L 的 CaCl ₂ 溶液	16 mmol/L 的 CaCl ₂ 溶液
外源钙叶面	春季(T ₁)	春季(T ₂)	春季(T ₃)
喷施季节	(甘草生长初期, 5月上旬)	(甘草生长盛期, 7月上旬)	(甘草生长末期, 9月上旬)

2.2 供试样品的采集: 2009 年 5 月中旬采集样品。将花盆里的土倒出, 清理甘草植物表面泥土, 剪去地上部分, 留下根部 (根龄为 1 年), 作为 GA 与 ABA 量的供试样品。

* 收稿日期: 2009-12-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30701085); 北京市属市管高等学校人才强教计划资助项目 (BAHED2006)

* 通讯作者 刘长利 Tel: (010) 83911633 E-mail: lcl74@126.com

许利平 Tel: (010) 83911639 E-mail: xlp1962@yahoo.com.cn

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 GA 供试品溶液的制备: 先将甘草药材在 60 ℃ 烘箱干燥 24 h, 粉碎后过 60 目筛, 然后准确称取药材粉末 0.100 0 g, 用甲醇冷浸 24 h, 超声提取 30 min, 放至室温, 加甲醇定容在 25 mL 量瓶中备用^[12]。

2.3.2 ABA 供试品溶液的制备: 参考相关文献^[13-14]方法进行改进。快速称取 1.000 0 g 甘草须根, 转入预冷的研钵中, 倒入适量的液氮, 快速进行研磨, 反复几次至研成粉末; 将粉末转入烧杯中, 加入预冷 80% 甲醇 15 mL, 4 ℃ 中浸提 12 h, 抽滤, 得滤液; 滤渣用 10 mL 甲醇浸提 2 h, 抽滤, 合并滤液; 将滤液减压浓缩至水相, 加盐酸调 pH 值 2.8~3.0, 加入醋酸乙酯萃取 3 次, 得醋酸乙酯相; 将醋酸乙酯相减压浓缩至干, 再用甲醇溶解定容在 10 mL 量瓶中, 备用。

2.4 指标测试

2.4.1 GA 定量分析: 色谱条件为 Waters C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0 min, 20% A; 8 min, 30% A; 15 min, 35% A; 35 min, 50% A。检测波长 248 nm; 体积流量 0.6 mL/min; 柱温 25 ℃。在此条件下, 样品中 GA 与其他物质的峰分离完全 (图 1)。精密度实验, 重现性实验, 稳定性实验, 加样回收实验结果表明该方法稳定可靠。

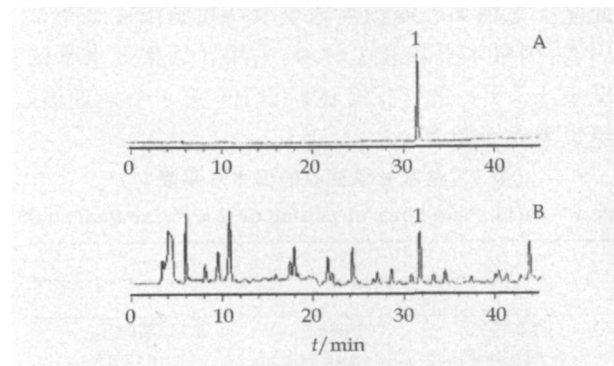


图 1 GA 对照品 (A) 及样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of GA reference substance (A) and sample (B)

2.4.2 ABA 定量分析: 色谱条件为 Waters C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0 min, 20% A; 5 min, 25% A; 8 min, 30% A; 15 min, 35% A; 25 min, 45% A。检测波长 260 nm; 体积流量 0.6 mL/min; 柱温 25 ℃。在此条件下, 样品中 ABA 与其他物质的峰分离较完全 (图 2)。精密度实验, 重

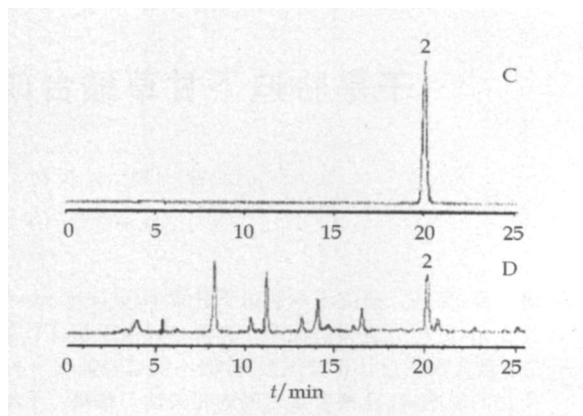


图 2 ABA 对照品 (C) 及样品 (D) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC Chromatograms of ABA reference substance (C) and sample (D)

现性实验, 稳定性实验, 加样回收实验结果表明该方法稳定可靠。

3 结果与分析

3.1 干旱胁迫对外源钙喷施条件下 GA 与 ABA 量的影响: 通过对采集根龄为 1 年的甘草药材中 GA 及 ABA 量的测试分析, 9 种正交试验处理下的 GA 和 ABA 量数据如表 2 所示, 方差分析结果如表 3 所示。

表 2 各正交试验处理下盆栽甘草植物体内的 GA 与 ABA 量 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 GA and ABA Contents in potting *Glycyrrhizae Radix* in orthogonal test ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

试验处理代号	干旱胁迫	喷钙季节	喷钙浓度/(mol · L ⁻¹)	GA /%	ABA/(μg · g ⁻¹)
D ₁ T ₁ Ca ₁	轻度	春季	0	0.332 1 ± 0.037 8	19.61 ± 0.96
D ₁ T ₂ Ca ₂	轻度	夏季	8	0.247 4 ± 0.05 8	11.90 ± 0.42
D ₁ T ₃ Ca ₃	轻度	秋季	16	0.259 3 ± 0.05 0	15.57 ± 0.61
D ₂ T ₂ Ca ₁	中度	夏季	0	0.196 7 ± 0.03 0	8.93 ± 0.12
D ₂ T ₃ Ca ₂	中度	秋季	8	0.221 3 ± 0.04 0	7.22 ± 0.16
D ₂ T ₁ Ca ₃	中度	春季	16	0.245 8 ± 0.03 4	8.16 ± 0.27
D ₃ T ₃ Ca ₁	重度	秋季	0	0.252 3 ± 0.04 8	10.74 ± 0.32
D ₃ T ₁ Ca ₂	重度	春季	8	0.218 2 ± 0.04 0	13.56 ± 0.45
D ₃ T ₂ Ca ₃	重度	夏季	16	0.190 9 ± 0.05 3	10.70 ± 0.27

表 3 各试验因素对 GA 与 ABA 量影响的方差分析结果

Table 3 Variance analysis of factors against contents of GA and ABA

试验因素	对 GA 量的影响		对 ABA 量的影响	
	F	Sig.	F	Sig.
干旱胁迫	10.208	0.000	9.775	0.000
喷钙季节	6.489	0.004	2.016	0.147
喷钙浓度	2.660	0.083	0.869	0.428

表 2 表明, 轻度干旱胁迫下 GA 量和 ABA 量较高。表 3 表明, 干旱胁迫对 GA 量与 ABA 量均有极显著 ($P < 0.01$) 的影响。说明不同的干旱胁迫条件下, 甘草植物体内抗旱信号传导物质 ABA 合成量具有显著的差异, 且作为次生代谢产物的

GA 合成量也明显不同。本试验中, 轻度干旱胁迫下 GA 和 ABA 量高于其他干旱胁迫处理, 是由于盆栽甘草根系生长受到限制, 且根龄为 1 年, 只能适应轻度干旱胁迫环境。

3.2 干旱胁迫下 GA 与 ABA 量相关性分析: 为了进一步阐明不同程度的干旱胁迫下 GA 量极显著不同的原因, 对干旱胁迫下 GA 和 ABA 的 45 组数据进行了相关性分析, 分析结果显示, 二者量相关性 r 为 0.426, 相关性分析的双侧 Pearson 检验 $P = 0.004 < 0.01$, 表明干旱胁迫下 GA 和 ABA 之间具有极显著的正相关关系。

4 讨论

甘草作为我国西北地区的阳性旱生植物, 具有很强的抗旱性。而 GA 作为一种次生代谢产物, 是长期适应干旱胁迫环境下的结果, GA 的合成积累对提高植物抗旱性具有重要意义^[15]。试验结果表明, 人工培育甘草在受到适当的干旱胁迫刺激下, 有利于 GA 的合成积累。

近年来, ABA 作为信号分子参与植物的抗旱反应已被越来越多的学者所认同^[10]。干旱作为一种外界环境的刺激, 对植物体内的生理反应以及代谢过程都会产生影响, 其中作为植物激素的 ABA 要发生明显变化。试验结果表明, 干旱胁迫下甘草植物根部的 ABA 量提高, 且与 GA 量的变化呈极显著的正相关。据此可以推断当甘草受到干旱胁迫时, 根部合成 ABA, ABA 作为信号分子在细胞间传递干旱信号, 促进了 GA 等次生代谢产物的积累,

提高了甘草植物体对干旱环境的适应性, 此过程是否与相关酶类和蛋白基因的表达有关, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 管燕, 谢强敏. 甘草黄酮对肺部炎症小鼠细胞因子表达和氧化反应的调节作用[J]. 中草药, 2009(8): 1254-1259
- [3] 朱任之. 甘草酸钠给药的抗炎及免疫调节作用[J]. 中国药理学通报, 1996, 12(6): 121-123
- [4] 金健民, 刘秀芳, 徐汉生. 甘草次酸衍生物的合成及其抗癌活性[J]. 应用化学, 2001, 18(11): 870-872
- [5] 李诚秀, 黄能慧, 李玲, 等. 甘草甜素对抗癌药活性及毒性的影响[J]. 贵阳医学院学报, 1996, 21(3): 183-185
- [6] Van Rossum T G, Vulto A G, De Man R A, et al. Review article: Glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1998, 12(2): 199
- [7] Shiota G, Harada K, Ishida M, et al. Inhibition of hepatocellular carcinoma by glycyrrhizin in diethylnitrosamine treated mice[J]. *Carcinogenesis*, 1999, 20(1): 59
- [8] 张明发, 沈雅琴. 甘草粗提物及其黄酮类成分的抗肿瘤作用[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(2): 124-129
- [9] 王根轩, 廖建雄, 吴冬秀. 荒漠条件下甘草气孔振荡的水被运动证据[J]. 植物学报, 2001, 43(1): 41-45
- [10] 徐晓辉, 刘延吉, 王森, 等. 干旱胁迫对杨树幼苗叶片内 ABA 和 CaM 含量的影响[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(11): 2332-2335
- [11] 刘长利. 甘草抗旱特性的初步研究[D]. 河北: 河北农业大学, 2002
- [12] 陈云华. 不同来源甘草的化学成分及相关药效的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2008
- [13] 陈昆松, 徐昌杰, 李方, 等. HPLC 法检测果实组织中内源激素 IAA、ABA 方法的改进[J]. 果树学报, 2003, 20(4): 4-7
- [14] 张有林, 党娅, 张静, 等. 高效液相色谱法同时测定银凤桃中赤霉素和脱落酸[J]. 西北植物学报, 2005, 25(7): 1467-1471
- [15] 刘长利, 王文全. 干旱胁迫对甘草酸积累影响的物质组分分配研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 55-57

参环毛蚓对重金属镉离子耐受能力的考察

喻良文¹, 李薇¹, 吴波², 邓向亮¹, 吴文如¹, 赖小平^{1*}

(1 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2 广州医学院, 广东 广州 510182)

摘要: 目的 考察参环毛蚓对重金属镉离子的耐受能力, 为进一步探索参环毛蚓富集重金属机制提供实验依据。方法 在菜园土壤基础上设置 7 个组别的不同浓度的重金属镉污染环境, 观察人工饲养条件下参环毛蚓在不同浓度镉离子环境中的生存状态, 并利用原子吸收分光光度法分别测定参环毛蚓不同部位的镉离子量。结果 参环毛蚓在土壤镉离子量为 40 倍、50 倍两组养殖 7 d 后死亡; 30 倍组在 10 d 以后也有两条死亡, 其余各组生长情况良好; 参环毛蚓体内镉离子浓度随土壤镉离子浓度递增而增加。参环毛蚓能够在土壤中镉离子浓度 12 mg/kg 以下生存良好, 其体内脏器中镉浓度可高达 70~90 mg/kg。该浓度是中国对外贸易经济合作部发布的《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》中镉限量指标的 233~300 倍。结论 参环毛蚓对重金属镉离子的耐受能力极强, 这可能

* 收稿日期: 2009-10-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772741); 国家科技支撑计划子课题(2006BAI06A1F02); 广东省科技计划资助项目(2007B020701004)

作者简介: 喻良文(1977-), 男, 硕士, 副教授。主要研究方向为中药材品质评价。

Tel: (020) 39358296 E-mail: fisherman@gzhtcm.edu.cn