

忍冬种子萌发期间 PAL 活性及氯原酸含量变化

山东中医药大学(济南 250014)

张永清* 王丽萍

青州市卫生局

曾宪勇

摘要 忍冬种子萌发期间 PAL 活性呈不断提高趋势,并在胚根与子叶突破或脱离种皮时出现两次高峰;氯原酸含量表现为持续提高,提高幅度不断加大。PAL 活性变化与氯原酸含量变化并不同步但有密切关系。笔者还测定了幼苗不同器官中的 PAL 活性与氯原酸含量。

关键词 忍冬 种子萌发 PAL 氯原酸

Changes of Phenylalanine Ammonia Lyase Activity and Chlorogenic Acid Content of Japanese Honeysuckle Seeds (*Lonicera japonica*) During Germination

Zhang Yongqing, Zeng Xianyong and Wang Liping (Shandong University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Jinan 250014)

Abstract Changes of phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity and chlorogenic acid content of honeysuckle seeds during germination were studied. The results showed that the activity of phenylalanine ammonia lyase increased and two peaks occurred on the time when the radicle and cotyledon broke the seed coats, and the content of chlorogenic acid also increased but not synchronously. There was close relationship between phenylalanine ammonia lyase activity and chlorogenic acid content. The phenylalanine ammonia lyase activity and chlorogenic acid content in different organs of honeysuckle seedlings were determined.

Key words honeysuckle *Lonicera japonica* Thunb. seeds germination phenylalanine ammonia lyase (PAL) chlorogenic acid

忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 属忍冬科植物,为常用中药金银花与忍冬藤的主要原植物,在山东、河南等省有大面积种植。一般认为,氯原酸是金银花与忍冬藤的主要有效成分,并被作为评价药材与制剂质量的指标。氯原酸作为植物体次生代谢物质,来源于苯丙烷类代谢途径,在其生物合成过程中,苯丙氨酸解氨酶(PAL)是第一个关键酶和限速酶^[1]。研究忍冬种子萌发期间 PAL 活性及氯原酸含量的变化,对于了解氯原酸的生物合成与积累规律,提高药材质量,有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料:采摘本校药用植物园种植的忍冬

(*Lonicera japonica* Thunb. 李建秀教授鉴定)植株成熟果实,清水漂洗去除果皮、果肉及瘪种,收集饱满种子,将水沥干,置室内通风处阴干备用。

1.2 方法:1)种子发芽:种子以 0.1%HgCl₂ 水溶液表面消毒 15 min 后,用蒸馏水冲净,置培养皿中发芽,每 100 粒种子为 1 组,多次重复。发芽期间,每 2 天取 3 组种子测定 PAL 活性及氯原酸含量,取平均值作为结果。2)PAL 活性测定:将种子置研钵中,加入在 0~4℃温度下放置一段时间后的 10 mL 含 5 mmol 的巯基乙醇硼酸缓冲液、0.5 g 聚乙烯吡咯烷酮及少量石英砂,冰浴研磨,将匀

* Address: Zhang Yongqing, Shandong University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Jinan

张永清 1983 年山东中医药大学中药专业本科毕业,1989 年获山东农业大学植物生理生化专业硕士学位,1995 年被破格晋升为副教授,现为山东中医药大学中青年学术骨干学科带头人培养对象。多年来,一直从事药用植物栽培学与中药市场的教学与研究工作,专业研究方向为药材栽培生理,力图通过控制人工栽培条件来达到控制或提高药材的产量与质量。相继完成的“金银花高产优质栽培技术及其推广应用”、“玉竹产地加工研究”等有关课题 6 项,获得多项奖励,在国家级及省级以上学术刊物上发表学术论文 50 余篇,主编、参编《药材种植实用技术》、《中药市场营销学》等著作 4 部。

浆抽滤,滤液在 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液测定酶活性,方法为 1 mL 酶液加 10.02 mmol/L L-苯丙氨酸、2 mL 蒸馏水,对照以蒸馏水代替 L-苯丙氨酸溶液,反应液置恒温水浴保温 30 min 后测定 290 nm 处的吸收度,以每小时吸收度变化 0.01 所需酶量为一个单位,酶活性以单位毫克蛋白质中的酶单位表示。蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法^[2]。3) 氯原酸含量测定:取种子研细,加入一定量 95%乙醇多次洗涤,完全转移于大试管中,用塑料布封口,在 80℃水浴上连续提取 2 次,每次 1.5 h,提取液过滤后定容,测定 333 nm 处的吸收度,以氯原酸纯品作对照绘制标准曲线、计算氯原酸含量。

2 结果与分析

2.1 PAL 活性的变化:忍冬种子浸水后,经吸胀、裂口、胚根伸出、子叶脱离种皮等,最终完成萌发。其间种子 PAL 活性变化如图 1。

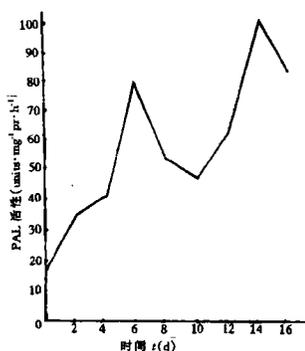


图 1 忍冬种子萌发过程中 PAL 活性的变化

图 1 表明,发芽初期种子的 PAL 活性较低,而后不断提高,在第 6 天出现第一个高峰,然后呈下降趋势,至第 10 天又开始上升,第 14 天达到第二个高峰。对照种子外部形态变化,发现 PAL 活性两次高峰的出现,恰恰发生在胚根与子叶突破或脱离种皮的时候,说明光照、氧气等因素对 PAL 活性的提高有刺激作用。

2.2 氯原酸含量的变化:忍冬干种子含有少量氯原酸,并且主要分布在种皮中^[3]。发芽期间其氯原酸含量变化如图 2 所示。

发芽伊始,种子与水接触,因渗透和扩散

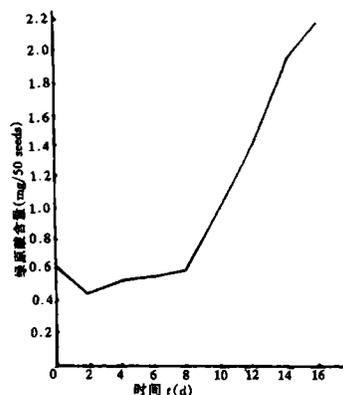


图 2 忍冬种子萌发过程中氯原酸含量的变化

作用,种皮中的氯原酸含量有所损失,结果种子中的氯原酸含量略有下降。从第 2 天开始,伴随着 PAL 活性的提高,氯原酸含量也不断提高,且提高幅度不断加大。

从忍冬种子发芽期间 PAL 活性与氯原酸含量的变化可以看出二者之间存在明显正相关,但 PAL 活性易受多种因素的影响发生显著变化,而合成后的氯原酸除不断代谢外尚有一定积累,含量呈逐步增加趋势。这也说明,氯原酸的生物合成除受 PAL 限制外,还受其它因素调节。

2.3 忍冬幼苗不同器官中的 PAL 活性及氯原酸含量:取胚轴长 2~4 cm、胚根长 2~3 cm、两片子叶完全展开并呈绿色的幼苗,分别测定不同器官 PAL 活性及氯原酸含量(表 1)。

表 1 忍冬幼苗不同器官中的 PAL 活性与氯原酸含量

器官	子叶	胚轴	胚根
氯原酸(%FW)	0.1706	0.0544	0.0496
PAL/mg·h	70.10	255.88	325.99
活性/g·FW·h	1 200.59	624.59	625.94

表 1 指出,子叶的氯原酸含量最高,胚轴和胚根较低,此结果与完整植株叶、茎与根中的氯原酸含量变化趋势相一致^[4]。PAL 活性因表示单位的不同有很大差异,以每小时单位毫克蛋白质中的酶单位(/mg·h)表示时,子叶 PAL 活性最低,胚轴居中,胚根最高;以每小时每克鲜重中的酶单位(/g·FW·h)来表示时,子叶 PAL 活性最高,其次是胚根和胚轴。所以如此,与子叶含有较多储存蛋白

质密切相关。

参考文献

- 1 欧阳光察,等. 植物生理学通讯,1988,(3):9
- 2 肖伏娥. 湖南农学院学报,1987,(增刊):145

- 3 张永清,等. 山东中医学院学报,1991,15(2):39
- 4 张永清,等. 中国中药杂志,1996,21(4):204
(1998-10-19 收稿)

太行铁线莲生药学初步研究

山东省临沂市中医医院(276002) 孙兆祥*

摘要 对太行铁线莲进行了原植物、药材性状、显微鉴定等生药学方面的初步研究,并与威灵仙作对比区别,以澄清混乱,挖掘中药资源。

关键词 太行铁线莲 生药学 威灵仙

A Preliminary Pharmacognostic Study on *Kirilow Clematis* (*Clematis kirilowii*)

Sun Zhaoxiang (Linxin Hospital of TCM in Shandong Province, Linxin 276002)

Abstract A preliminary study on the origin medicinal effects and microscopic characteristics of *Clematis kirilowii* Maxim. were carried out in comparison with that of *C. chinensis* Osbeck in order to clarify their confusion and excavate the traditional Chinese medicinal resources.

Key words *Clematis kirilowii* Maxim. *Clematis chinensis* Osbeck

太行铁线莲 *Clematis kirilowii* Maxim. 为毛茛科铁线莲属植物,在我省广为分布。目前在教学、科研和某些地区用药上,均把太行铁线莲误定为威灵仙 *Clematis chinensis* Osbeck。为了澄清混乱,保证用药的正确性,挖掘中药资源,笔者对其进行了原植物、药材性状、显微鉴定等生药学方面的初步研究。

1 材料及方法

1.1 材料采自山东费县、济南等地。原植物及药材均经鉴定为太行铁线莲。

1.2 药材采用徒手切片法、石蜡切片法及组织解离法制片,并进行了显微描绘。

1.3 将花粉按 Erdtman(1969)醋酸酐分解法处理制片^[1],在光学显微镜下观察、测量并摄影。

1.4 将干燥的花粉直接均匀地撒在双面胶片上^[1],喷碳、喷金后置于日本 JEOL. SU-PERPROBE733 型扫描电子显微镜下观察,

并照像。

2 结果

2.1 植物形态:藤本,干后常为黑褐色。茎、小枝有短柔毛和细纵棱。一至二回羽状复叶,叶片革质,卵形、卵圆形或长圆形;基部叶较大,顶端叶较小,长 0.3~6.2 cm,宽 0.2~3.2 cm;两面网脉突出,沿叶脉疏生短柔毛或近无毛。花较大,萼片 4~6,倒卵圆形,顶端呈截形而微凹,宽 4~7 mm,白色,干后常变灰黄色,外面有短柔毛,边缘密生绒毛,内面无毛。瘦果卵形至椭圆形,长 5~7 mm,扁平,边缘稍厚,被平伏绒毛。宿存花柱长 2~3 cm,有黄色柔毛。

花粉粒辐射对称,多为圆球形,少有长球形,极轴长 20~26.6 μm ,赤道轴长 15.5~23.3 μm ,三沟,无萌无孔,扫描电镜下观察外壁粗糙,现颗粒性,表面较大颗粒约 14 个/ $10 \mu\text{m}^2$ (图 1-1~3)。

* Address: Sun Zhaoxiang, Linyi Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Linyi