

对 5 个样品中黄芩苷含量分析,黄芩苷含量为 $5^{\#} > 3^{\#} > 6^{\#} > 2^{\#}$, 差异不明显,而 $4^{\#}$ 中的含量明显低于其他批号样品,故 X 射线衍射分析结果表明该样品应属次品。

3.2 双黄连片剂: $7^{\#}$, $8^{\#}$, $9^{\#}$ 样品的 X 射线衍射图谱的几何拓扑图形一致,经分析计算获得 X 射线 Fourier 标准指纹图谱(图 5)。所含的 19 个特征峰均值为: $10.42/16^{\circ}$, $7.11/22^{\circ}$, $6.04/38^{\circ}$, $5.90/39$, $5.36/44^{\circ}$, $5.23/42^{\circ}$, $4.75/36$, $4.54/37$, $4.31/50^{\circ}$, $4.13/55^{\circ}$, $3.92/100$, $3.76/46^{\circ}$, $3.51/34^{\circ}$, $3.19/30^{\circ}$, $3.05/23^{\circ}$, $2.599/28^{\circ}$, $2.147/18^{\circ}$, $2.099/17^{\circ}$, $2.017/16^{\circ}$ 。

3 个样品 X 射线衍射图谱的几何拓扑图形一致,衍射峰的相似度依次为 95%, 90%, 100%。结果表明其含量基本相同。

4 讨论

分析计算结果表明:应用 X 射线 Fourier 指纹

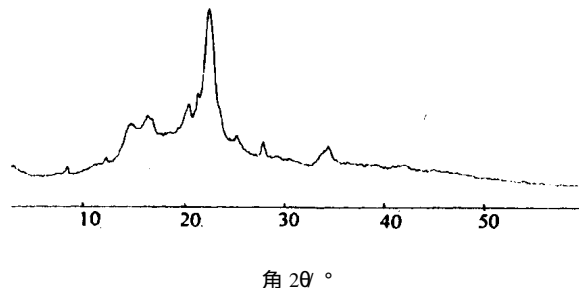


图 5 双黄连片剂的 X 射线 Fourier 标准指纹图谱

图谱分析方法可实现中成药双黄连制剂的鉴定,该方法具有简便易行、直观及结果可靠的特点。通过对指定化学成分的含量分析,本法还可以建立中成药的质量控制标准^[3]。

参考文献:

- [1] 吕扬,郑启泰,章菽,等. 中药材山萘的 X 衍射 Fourier 图谱分析[J]. 药学报, 1998, 33(8): 587-590.
- [2] 吕扬,郑启泰,吴楠,等. 中药材牛黄的 X 衍射全谱分析研究[J]. 中国医学科学院学报, 1997, 19(5): 331-336.
- [3] 郑笑为,吕扬,赵斌,等. 牛黄解毒片的 X 射线付里叶图谱分析研究[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(3): 202-205.

甲基茉莉酮酸对悬浮培养南方红豆杉细胞自由基清除系统酶的影响

路明,王艳东,许明丽,元英进*

(天津大学化工学院 制药工程系,天津 300072)

摘要: 目的 研究外加甲基茉莉酮酸对南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* 细胞培养体系氧自由基清除系统中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)酶活的影响规律。方法 酶活分析技术。结果 甲基茉莉酮酸能够诱导南方红豆杉细胞 SOD 的活性;对 POD 活性的诱导作用极为显著(约为对照组的 10 倍)且 POD 活性在培养第 10 天达到峰值;在甲基茉莉酮酸作用下 CAT 活性先升高后降低,即在表现出较强的诱导作用之后又抑制了 CAT 的酶活水平。结论 甲基茉莉酮酸的加入刺激细胞产生了防御应答反应,诱导了相关的自由基清除酶类,其中 POD 对甲基茉莉酮酸的信号转导贡献最大。

关键词: 南方红豆杉;甲基茉莉酮酸;超氧化物歧化酶;过氧化物酶;过氧化氢酶;悬浮培养

中图分类号: R286.02; R282.13 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)11-0985-04

Effects of methyl jasmonate on SOD, POD and CAT in cell suspension culture of *Taxus chinensis* var. *mairei*

LU Ming, WANG Yan-dong, XU Ming-li, YUAN Ying-jin

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: **Object** To study the effects of methyl jasmonate(MJ) on SOD, POD and CAT in cell suspension culture of *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu. **Methods** SOD, POD and CAT enzymes analysis. **Results** MJ could induce the activity of SOD and especially of POD (approximately ten times as much as the control), whose activity reached its peak on the 10th-day-cultured cells. Activity of CAT also increased, but then decreased after the treatment of MJ, which enhanced CAT first then inhibited it. **Conclusion** Addition of MJ to the cell suspension cultures of *T. chinensis* var. *mairei* could cause the cells to elicit the defence response and induce the activities of relative enzymes, in

* 收稿日期: 2002-03-07
* 通讯作者

which POD would play the most important role for the signal transduction of MJ.

Key words: *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu; methyl jasmonate (MJ); SOD; POD; CAT; suspension culture

紫杉醇(taxol)是继顺铂和阿霉素后最有前途的抗癌药物之一。甲基茉莉酮酸(methyl jasmonate, MJ)是一种重要的植物生长调节剂和非生物诱导子。Ketchum等^[1]用MJ作为诱导子诱导悬浮培养的红豆杉细胞,发现紫杉醇产量增长速率可达到每天23.4 mg/L,因此MJ在生物合成提高紫杉醇产量的研究中备受关注^[2~4]。然而,大多数研究只集中于MJ对紫杉醇产量的影响,其对自由基清除系统酶的作用规律却鲜有报道。本实验研究了MJ在细胞培养中期对超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)这3种自由基清除系统酶^[5]的影响规律,以期揭示MJ对红豆杉细胞代谢水平的影响及其生理作用机制。

1 实验材料

1.1 细胞培养:研究用细胞系是南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* Lemee et Lévl, Cheng et L. K. Fu 细胞 T 系,由中国科学院植物研究所提供。在改良 B₅ 固体培养基[含蔗糖 25 g/L、水解酪蛋白 1 g/L, 萘乙酸(NAA) 2 mg/L, 6-苄基嘌呤 0.15 mg/L]上继代培养,每 30 d 接种一次。然后将细胞转入含 50 mL 改良 B₅ 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,25 ℃, 110 r/min 黑暗振荡培养 5 代以上。选取长势良好的细胞,培养第 7 天加入 MJ, 终浓度达 100 μmol/L, 同时设立空白对照组。在加入诱导子的第 0, 3, 4, 6, 8 天取样测定酶活指标。

1.2 酶液的制备:取 0.1 g 鲜细胞放入研钵中,加入 0.01 g PVP 和 3 mL 酶提取液(pH=7.8 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中含 0.2 mmol/L EDTA 和 0.4 mmol/L DTT), 研磨细胞,于 4 ℃, 10 000 r/min 离心 20 min 后取上清液作为酶待测液。

2 实验方法与结果

2.1 SOD 活性测定方法:取 0.25 mL 胞内待测液,加入 3 mL SOD 反应液(pH=7.8 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中含 54 mL 14.5 mmol/L dl-甲硫氨酸、2 mL 3 μmol/L EDTA、2 mL 2.25 mmol/L NBT 和 2 mL 60 μmol/L 核黄素)后,于 4 000 lx 荧光灯下照射 20 min, 反应前后分别在 560 nm 处测量吸光度(A)值,以 $\Delta A_{560} / \Delta t = 0.1 / (20 \text{ min})$ 表示一个酶活单位(u)。

2.2 POD 活性测定方法:在 50 mL 100 mmol/L

磷酸盐缓冲液(pH=6.5)中加入 28 μL 愈创木酚,溶解冷却,加入 19 μL 30% 的 H₂O₂ 作为 POD 反应液。取 0.5 mL 待测液与 2 mL POD 反应液和 1 mL 0.2 mol/L 磷酸二氢钾反应,于 470 nm 处每隔 1 min 测其吸光度(A)值,以 $\Delta A_{470} / \Delta t = 0.01 / \text{min}$ 表示一个酶活单位(u)。

2.3 CAT 活性测定方法:在 50 μL 待测液中加入 1 mL 0.6% 的 H₂O₂ 和 2 mL 磷酸盐缓冲液(pH=6.0)后,于 240 nm 处以 15 s 为间隔测定其吸光度(A)值,并以 $\Delta A_{240} / \Delta t = 0.01 / \text{s}$ 表示一个酶活单位(u)。

2.4 正常培养条件下南方红豆杉细胞 POD, SOD 和 CAT 酶活变化规律:如图 1 所示, SOD 活性先升高后下降, 然后维持在一定水平; SOD 和 POD 在培养的中期均有活性峰出现, 且出峰顺序为 SOD 先于 POD (SOD 活性峰的出峰时间为培养的第 10 天, POD 活性峰的出峰时间为培养的第 11 天); 在培养的第 10 天 SOD 活性处于峰值而 POD 活性处于同时期最低水平; 与之对应, 在培养的第 11 天 POD 活性处于峰值, 而 SOD 活性处于同时期最低水平; CAT 酶活在此培养时期内除第 11 天有所提高外基本上呈逐渐下降的趋势。

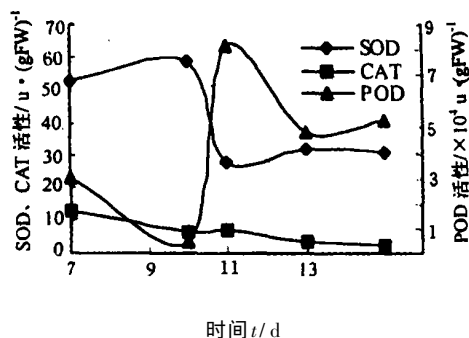


图 1 南方红豆杉细胞培养过程中 SOD、POD 和 CAT 活性变化

2.5 MJ 作用下 SOD 酶活变化规律:结果如图 2 所示。经 MJ 处理后 SOD 活性变化趋势与对照组相似,同为先升高后降低,最后维持在一定水平;但其相对于对照组而言,酶活始终高出一定水平;同时保留了正常培养条件下的酶活性峰,且出峰时间未受影响。因此,从整体上看 MJ 的加入诱导了悬浮培养的南方红豆杉细胞 SOD 的活性,但诱导作用不显著。

2.6 MJ 作用下 POD 酶活变化规律:结果如图 3

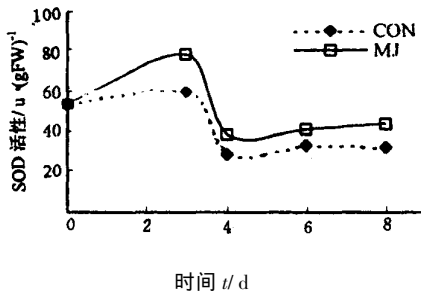


图 2 经 MJ 处理后 SOD 活性变化

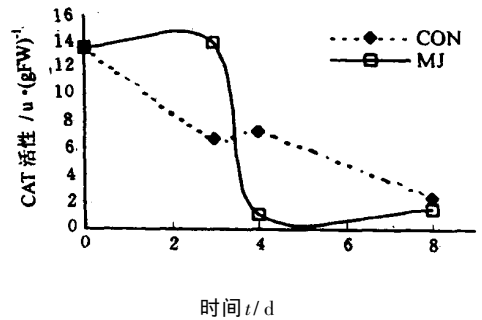


图 4 经 MJ 处理后 CAT 活性变化

所示。POD 活性在 MJ 作用下发生较大变化。首先,从整体上看 POD 活性较之对照组有很大提高(实验组酶活峰值约为对照组峰值的 10 倍);其次,与对照组的单位峰相比经 MJ 处理后的实验组 POD 除保留了原有的那个活性峰之外还出现了第二个活性峰,出峰时间为 MJ 加入后的第 6 天(培养第 13 天),其活性约为同时间对照组酶活的 14 倍;再次, MJ 的加入使 POD 活性峰提前 1 d 出现;最后, POD 活性虽有所波动,但在本实验所考察的细胞培养时期内始终维持居高不下的趋势。因此, MJ 的加入对悬浮培养的南方红豆杉细胞 POD 表现出显著的诱导作用。

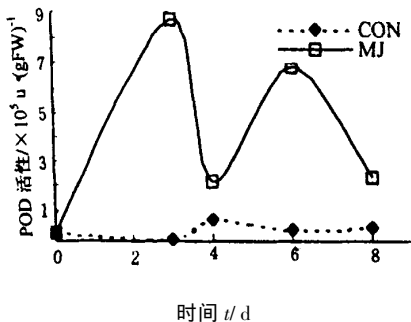


图 3 经 MJ 处理后 POD 活性变化

2.7 MJ 作用下 CAT 酶活变化规律: 结果如图 4 所示。CAT 活性先升高然后又急剧下降; MJ 加入后的第 3 天实验组 CAT 活性值明显高于对照组(约为对照组的 2 倍); MJ 加入后的第 4 天实验组 CAT 活性水平显著低于对照组(约为对照组的 1/6); 且 MJ 作用下细胞的 CAT 活性下降速率较之对照组更快。从整体上看, MJ 的加入对悬浮培养的南方红豆杉细胞 CAT 在表现出了较强的诱导作用之后又显著地抑制了培养体系中的 CAT 活性。

3 讨论

正常培养南方红豆杉细胞在第 10 天处于指数生长期, 此时细胞代谢旺盛, 呼吸作用增强, 胞内产生大量氧自由基。由于植物 SOD 酶是一种典型的诱导酶^[5], 所以 SOD 酶活被诱导用于清除过多的氧自由基, 即代谢水平和呼吸作用的增强是诱导 SOD 活

性峰在培养中期(第 10 天)出现的原因。随着多余的超氧自由基被还原为 H₂O₂, 超氧自由基的数量不断减少, 第 10 天后 SOD 活性开始下降; 此后, 细胞进入指数生长期末并于第 15 天左右转入停滞期, 已经完全适应新环境且环境氧分压处于相对恒定水平, 所以环境氧分压的高低等外部环境条件不会再诱导 SOD 酶活, 这也是促成 SOD 活性峰后伴随着酶活的下降以及维持一定水平的原因之一。由于 H₂O₂ 既是 SOD 催化反应的产物又是 POD 催化反应的底物, 且在 SOD 活性峰出现时胞内还没有产生大量的 H₂O₂, 因此 H₂O₂ 的浓度水平还不足以诱导 POD 活性, 这就导致了培养第 10 天时 SOD 活性处于峰值而 POD 活性处于同时期的最低水平。随着 SOD 催化反应的进行, H₂O₂ 在胞内过量积累, 诱导了培养中期(第 11 天) POD 活性峰的出现与 CAT 酶活水平的增加; 这同时也导致了 SOD 活性峰较之 POD 活性峰的提前出现和培养第 11 天 POD 活性处于峰值, 而 SOD 活性处于同时期最低水平的结果。

近期研究表明 MJ 在植物抗病中参与了局部或系统抗性^[6], 是抗病信号传递体之一, 它不但可以激活特定的防御相关基因的表达和诱导植物自卫防御反应的发生, 而且还可以启动植物体内与信号转导相关的基因^[7]。由于 SOD 是与植物抗性密切相关的酶, 因此细胞的 SOD 活性水平在 MJ 作用下有了一定程度的提高, 但在本研究中提高程度不大, 抗损害能力并不十分显著。这可能是 MJ 作用下细胞内某些物质与 SOD 共同作用完成清除自由基这一功能的缘故, 关于这一点有待进一步研究。

另外, POD 是与植物抗胁迫密切相关的酶, 在酚类聚合成木质素的过程中及 HRGP 高级结构的形成中起着重要作用, 其活性的高低在一定程度上可以反映细胞抗病能力的强弱。从本实验结果分析, 实验组 POD 活性虽有所波动但始终维持居高不下的趋势, 这说明 MJ 作用下细胞中 POD 对于抗损害能力有较大的贡献。由于 MJ 是一种典型的信号分

子,而包括 POD 在内的氧化还原酶类参与细胞信号转导过程中的信号级联放大过程^[8,9],因此可以推测 POD 在 MJ 的信号转导中起很大作用。如前所述, MJ 加入后并未显著诱导细胞 SOD 的活性而在 MJ 作用下胞内必然会产生大量活性氧自由基,所以 SOD 必须借助胞内其他物质共同完成清除自由基的任务。在这种协同作用下,胞内 H₂O₂ 的积累可以提前达到诱导 POD 活性的浓度水平,从而造成了 POD 活性峰的提前出现。在培养的第 13 天,实验组 CAT 活性水平受到显著抑制而 POD 同样可以完成 CAT 消除 H₂O₂ 损害的功能,因此出现了第 2 个 POD 活性峰,即 CAT 与 POD 的功能互补性是导致 POD 多产生一个活性峰的原因。此外,有文献报道 POD 活性的增高在一定程度上表征了细胞次生代谢水平的增强,有利于抗毒素的合成,因此 MJ 的加入也刺激了细胞的次生代谢活动。

CAT 是清除活性氧的关键酶,是维持活性氧代谢平衡的重要因素。MJ 加入后细胞产生了防御应答反应,产生的过多活性氧自由基需要包括 CAT 在内的自由基清除酶类加以消除,因此 MJ 对 CAT 首先表现出较强的诱导作用;而随后 CAT 酶活的急剧下降是同时期 POD 酶活的高水平所导致的,即 CAT 与 POD 功能上的互补性抑制了 CAT 的活性水平。除此之外,还有多种因素都能够对 CAT 活性产生影响,因此有关 MJ 作用下细胞 CAT 活性的变化规律需要更加深入的研究。

综上所述,外源加入 MJ 能够诱导南方红豆杉细胞 SOD 的活性;对 POD 活性的诱导作用极为显著(约为对照组的 10 倍),且 POD 活性在培养第 10

天达到峰值;CAT 活性先升高后降低,即外源 MJ 在表现出较强的诱导作用之后又抑制了 CAT 的酶活水平。MJ 作用下细胞产生了防御应答反应,次生代谢水平增强,POD 在 MJ 的信号转导中贡献最大。MJ 通过影响细胞 SOD,POD 和 CAT 的活性改变胞内氧自由基分布状况,进而影响细胞的氧代谢及其他生理代谢活动。

参考文献:

- [1] Ketchum R E B, Gibson D M, Croteau R B, *et al.* The kinetics of taxol accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 62: 97-105.
- [2] Mirjalili N, Linden J C. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models[J]. *Biotechnol Prog*, 1996, 12: 110-118.
- [3] Furmanowa M, Glowinski K, Syklovska-Baranek K, *et al.* Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus media* var. *hafieldii* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1997, 49: 75-79.
- [4] 苗志奇, 未作君, 元英进. 甲基茉莉酮酸诱导下紫杉醇合成途径中拟稳态转移模式及其作用位点的研究[J]. *生物物理学报*, 2000, 16(2): 204-211.
- [5] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [6] Creelman R A, Mellut J E. Biosynthesis and action of jasmonates in plant[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 355-381.
- [7] Choi D, Bostock R M, Avdiushko S, *et al.* Lipid-derived signals that discriminate wound and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 96: 2329-2333.
- [8] Doke N, Chai H B. Activation of superoxide generation and enhancement of resistance against compatible races of *Phytophthora infestans* in potato plants treated with digitonin[J]. *Physiol Plant Pathol*, 1985, 27: 323-334.
- [9] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 251-275.

杭白菊总黄酮的提取工艺及其含量的动态变化研究

杨俊, 蒋惠娣*, 徐娟华*

(浙江大学药学院, 浙江 杭州 310006)

摘要: 目的 确定杭白菊总黄酮的最佳提取工艺,并考察总黄酮含量随杭白菊不同采摘时间的动态变化。方法 采用正交试验法,考察提取温度、提取时间、乙醇浓度及提取次数对提取液中总黄酮含量的影响,确定最佳提取条件,然后在该条件下对同一种植区域,不同时间采摘的杭白菊进行总黄酮提取并进行含量测定。结果 在所考察的因素中,对杭白菊黄酮提取影响程度为:乙醇浓度>提取温度、提取次数>提取时间,不同时间采摘的杭白菊,其总黄酮含量未见明显变化。结论 杭白菊黄酮最佳提取条件为:75%乙醇,100℃水浴回流提取 3 次,每次 1.5 h;杭白菊总黄酮含量与采摘时间无关。

* 收稿日期: 2002-01-14

基金项目: 浙江省教育厅资助项目(G20062); 浙江省桐乡市科委资助项目(H20000792)

* 通讯作者 E-mail: Hdjiang@zju.edu.cn