

• 药材与资源 •

黄芩愈伤组织中多酚氧化酶活性与黄芩苷合成的关系研究

任振兴¹, 耿韶华², 王梦亮^{1*}, 刘滇生¹

(1. 山西大学应用化学研究所, 山西 太原 030006; 2. 中央民族大学中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081)

摘要:目的 研究黄芩愈伤组织中多酚氧化酶活性变化规律及其与黄芩苷次生合成之间的关系。方法 采用紫外分光光度法测定多酚氧化酶活性, 采用高效液相色谱法测定黄芩苷的量。研究不同添加物(抗坏血酸、氯化钠、苯甲酸、聚乙烯吡咯烷酮、硫酸铜)对多酚氧化酶和黄芩苷量的影响。结果 在黄芩愈伤组织生长周期的前 20 d, 黄芩苷基本没有合成, 多酚氧化酶的活性低水平表达; 20~35 d, 黄芩苷大量合成, 多酚氧化酶的活性有所降低, 但降低趋势较小; 35~50 d, 多酚氧化酶活性高水平表达, 黄芩苷次生合成受到抑制。结论 多酚氧化酶的高水平表达不利于黄芩苷的次生合成, 抗坏血酸、氯化钠、苯甲酸等均可抑制多酚氧化酶的活性, 促进黄芩苷次生合成, 其中以添加 0.02% 的抗坏血酸效果最为明显, 可使黄芩苷的量提高 17.6% (82.3 mg/g), 而聚乙烯吡咯烷酮、硫酸铜对多酚氧化酶的活性有着明显的促进作用, 抑制了黄芩苷的积累。

关键词:黄芩; 愈伤组织; 黄芩苷; 多酚氧化酶

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)11-1796-04

Correlation of polyphenol oxidase activity and baicalin synthesis in callus of *Scutellaria baicalensis*

REN Zhen-xing¹, GENG Shao-hua², WANG Meng-liang¹, LIU Dian-sheng¹

(1. Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. China Minority Tadtional Medical Center for Minzu University of China, Beijing 100081, China)

Abstract: Objective To study the correlation of polyphenol oxidase (PPO) activity and baicalin synthesis in callus of *Scutellaria baicalensis*. **Methods** PPO Activity was determined by ultraviolet spectrophotometry and the content of baicalin was detected by HPLC. The effects of various substances (ascorbic acid, sodium chloride, benzoic acid, polyvinylpyrrolidone, and copper sulfate) on PPO activity and the content of baicalin were studied. **Results** There was no baicalin accumulation in the first 20 d of growth period, while PPO activity was expressed slowly during this period. From 20 d to 35 d, PPO activity increased significantly and the baicalin secondary synthesis was restrained. **Conclusion** The high-level expression of PPO activity do harm the baicalin secondary synthesis. These chemical substances, such as ascorbic acid, sodium chloride, and benzoic acid could inhibit the PPO activity and improve the content of baicalin; It is obvious for ascorbic acid (0.02%) to improve the content of baicalin with 17.6% (82.3 mg/g) compared with the control. However, polyvinylpyrrolidone and copper sulfate could increase the PPO activity and greatly inhibit the baicalin accumulation.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; callus; baicalin; polyphenol oxidase (PPO)

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)是一类广泛分布于植物体内能催化多酚类物质氧化成醌类物质的含铜金属酶类, 是植物愈伤组织褐化的关键酶^[1], 而黄芩的主要成分黄芩苷含多个酚羟基, 容易被多酚氧化

酶氧化为醌类物质, 因此, 多酚氧化酶活性将直接影响黄芩愈伤组织的生长和黄芩苷的积累程度。

在前期的实验中, 已经对黄芩愈伤组织生长特性和黄芩苷合成调控的规律进行了系统研究, 并利

收稿日期: 2009-01-15

基金项目: 山西省重点实验室开放基金研究项目(2007031011)

作者简介: 任振兴(1981—), 山西洪洞人, 主要从事中草药的研究开发、生物化工等的科研工作。

Tel: 13935161549 E-mail: zxren@sxu.edu.cn

* 通讯作者 王梦亮 Tel: (0351)7016101 E-mail: mlwang@sxu.edu.cn

用前体和诱导子饲喂黄芩愈伤组织强化黄芩苷生产研究^[2,3]。本实验在前期研究的基础上,主要研究多酚氧化酶在黄芩愈伤组织中的活性变化规律以及与黄芩苷次生合成的关系,并进一步研究了儿种多酚氧化酶的抑制剂(抗坏血酸、氯化钠、苯甲酸)和促进剂(聚乙烯吡咯烷酮、硫酸铜)对黄芩苷积累量的影响,旨在提高黄芩愈伤组织的生物量和黄芩苷的量,为工业化生产黄芩苷提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料:黄芩种子由山西省陵川县农业综合开 发局提供,经山西大学药 学系秦雪梅教授鉴定。

黄芩愈伤组织(实验室筛选)。继代培养基^[2] 为:MS 培养基(附加 0.3 mg/L 的 IAA 和 2 mg/L 的 6-BA),蔗糖 4%,琼脂 0.8%,pH 5.8,暗培养, (25±1)℃,培养周期为 50 d。

1.2 愈伤组织培养及检测条件参考文献方法^[2]。

1.3 多酚氧化酶活性测定方法

1.3.1 提取方法^[4]:取 5 g 新鲜黄芩愈伤组织于研钵中,加入 20 mL 0.1 mol/L pH6.8 的 Tris-HCl 缓冲液(缓冲液,材料,研钵于 0~4℃保存),低温快速研磨成匀浆,于 8 000 r/min,在 0~4℃条件下离心 20 min,取上清液 0~4℃保存备用。

1.3.2 测定方法^[5]:取 2 mL 多酚氧化酶提取液,加入反应介质 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 25 mL,反应液 0.1 mol/L 邻苯二酚溶液 5 mL(以不加底物邻苯二酚,而以 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液代替底物邻苯二酚作为对照),25~30℃水浴条件下反应 20 min 后,再加入 1 mL 三氯乙酸终止反应,反应体系冷却至室温后用紫外分光光度计测定 410 nm 处的吸光度(A)值。酶活性标准以每分钟吸光度值变化 0.001 为 1 个单位(U)。

1.4 影响多酚氧化酶活性的不同物质的添加浓度^[6]:见表 1。将新鲜黄芩愈伤组织分别接种于添加了不同物质的固体培养基中,并立即置于暗环境、(25±1)℃中培养,培养周期为 50 d,每个处理 3 次重复。

表 1 不同物质的添加浓度

Table 1 Additive concentration of different substances

添加物	添加物/%
硫酸铜	0.20
抗坏血酸	0.02
氯化钠	1.50
聚乙烯吡咯烷酮	2.00
苯甲酸	0.30

2 结果与分析

2.1 黄芩愈伤组织的生长曲线和黄芩苷量的变化

曲线:将新鲜的黄芩愈伤组织接种于 MS 培养基上(接种量约为 0.5 g/瓶)置于培养箱中暗培养,从第 10 天起每隔 5 d 取样,测定黄芩愈伤组织的生长量和黄芩苷的量。其结果见图 1 和 2。

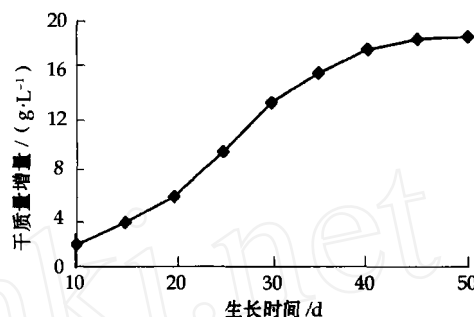


图 1 黄芩愈伤组织的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of callus in *S. baicalensis*

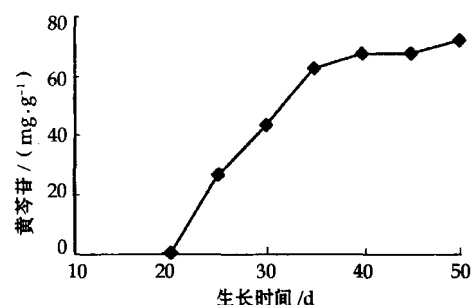


图 2 黄芩苷的合成曲线

Fig. 2 Synthesis curve of baicalin

图 1 显示,黄芩愈伤组织的生长曲线呈典型的“S”形,0~25 d 为潜伏期,25~35 d 为快速合成期,35 d 后黄芩愈伤组织生长变缓,干质量增量不再增加,最大值为 18 g/L。而从图 2 可以看出,黄芩苷在前 20 d 基本没有合成,但从培养的 20 d 后开始合成,20~35 d 为黄芩苷的快速合成期,到 35 d 时,黄芩苷的积累量达最大值,为 70 mg/g,之后黄芩苷的量变化不大。

从图 1、2 可以得出一个重要规律:黄芩愈伤组织的生长和黄芩苷的积累并不同步,而是呈现先生长后合成的趋势。在愈伤组织生长的前 20 d,细胞内主要是进行初级代谢,很少有次级代谢产物合成,但随着培养基中营养成分的逐渐消耗,初级代谢逐渐减弱,次级代谢逐渐得到增强,次级代谢产物开始合成。

2.2 黄芩愈伤组织中多酚氧化酶活性的变化规律:图 3 显示,在黄芩愈伤组织生长周期的前 20 d,多酚氧化酶的活性低水平表达;20~35 d,多酚氧化酶的活性有所降低,但降低的幅度较小,从最开始的 268 U 降低到 35 d 时的最低值 250 U;35~50 d,多酚氧化酶活性逐渐增大,而且增大的幅度很大,到 50 d 时达到最大值 480 U。

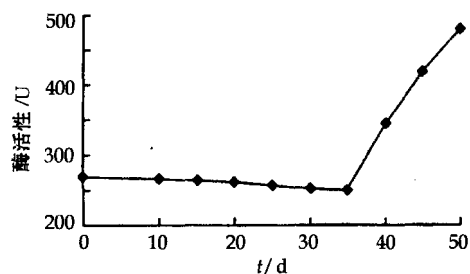


图 3 多酚氧化酶活性变化曲线

Fig. 3 Changes curve of PPO activity

结合图 1 和 2 可以看出多酚氧化酶活性变化规律与黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累量的关系:在黄芩愈伤组织生长周期的前 20 d,细胞内主要进行初级代谢,表现为细胞生物量的增加,但是次级代谢产物黄芩苷基本没有合成,此时由于缺少多酚氧化酶作用的底物,其活性低水平表达;20~35 d,随着培养基中营养成分的逐渐消耗,初级代谢逐渐减弱,次级代谢逐渐得到增强,表现为细胞生物量仍在增加,次级代谢产物开始合成,但由于愈伤组织细胞内环境的变化,多酚氧化酶的活性略有降低;35~50 d,细胞内初级代谢和次级代谢逐渐减弱,细胞进入衰老期,而此时细胞内积累了大量次级代谢产物,而且细胞内环境也适合多酚氧化酶催化底物反应,这个时期酶高活性表达,但也抑制了黄芩苷的进一步积累。

2.3 影响多酚氧化酶活性的因素:在黄芩愈伤组织生长周期(50 d)内,多酚氧化酶的活性高低与黄芩苷的积累呈负相关性,因此多酚氧化酶成为影响黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的一个重要因素,因此抑制多酚氧化酶的活性对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累有着重要意义。为确定影响多酚氧化酶活性的因素,分别测定了在硫酸铜、抗坏血酸(VC)、氯化钠、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、苯甲酸等物质存在条件下多酚氧化酶的活性和黄芩苷的量,以促进和抑制表示作用效果,以下结果均在愈伤组织培养的第 35 天进行测定,结果见表 2。

表 2 显示,抗坏血酸、氯化钠、苯甲酸等化学物质均可抑制多酚氧化酶的活性,其中以抗坏血酸对多酚氧化酶活性的抑制程度最强,而且黄芩苷的量也有明显提高,比对照提高了 17.6%,但聚乙烯吡咯烷酮和硫酸铜则对多酚氧化酶的活性有着明显的促进作用,其中以硫酸铜对多酚氧化酶的促进作用最强,黄芩苷的量显著降低。据此认为,在黄芩愈伤组织中,添加适量多酚氧化酶的抑制剂是提高黄芩苷积累量的一条有效途径。

表 2 不同物质对多酚氧化酶活性的影响

Table 2 Effects of different substances on PPO activity

添加物	添加物 /%	A (410 nm)	PPO 比 活性/U	作用 程度	作用 效果	黄芩苷/ (mg · g ⁻¹)
硫酸铜	0.2	1.745	1.745	551	促进	12.2
抗坏血酸	0.02	0.074	74	-72.4	抑制	82.3
氯化钠	1.5	0.214	214	-20.1	抑制	73.4
聚乙烯吡咯烷酮	2	0.473	473	76.5	促进	32.5
苯甲酸	0.3	0.128	128	-52.2	抑制	75.2
对照	0	0.268	268	—	—	70.0

作用程度(%)=(加入化学物质后的酶活性-加入化学物质前的酶活性)/加入化学物质前的酶活性。

此外,多酚氧化酶活性与细胞的衰老呈正相关,多酚氧化酶的活性越强,细胞衰老的速度也就越快,即多酚氧化酶活性是细胞生长周期长短的一个制约因素。而利用多酚氧化酶抑制剂抑制多酚氧化酶的高活性表达,可以延缓细胞的衰老,进而使细胞的生长周期和次级代谢过程延长,这对植物细胞组织培养有着重要的现实意义。

3 讨论

黄芩苷是一种含多酚结构的细胞次级代谢产物,它本身就可以表征细胞次级代谢的旺盛程度。在黄芩愈伤组织生长周期的前 20 d,黄芩苷基本没有合成,由于缺少底物,多酚氧化酶的活性低水平表达。在黄芩愈伤组织生长周期 25~35 d,黄芩苷大量合成,但此时黄芩苷的积累量尚不足以对细胞本身造成危害,所以在细胞内环境变化的影响下,多酚氧化酶的活性略有降低。但在黄芩愈伤组织生长周期 35~50 d,由于黄芩苷大量积累对愈伤组织细胞造成了危害,细胞进行相应的自身调节,多酚氧化酶活性增大,将多余的黄芩苷及时清除,将其转化为醌类物质,使细胞褐化。

多酚氧化酶是引起黄芩愈伤组织褐化的主要原因,也是制约黄芩苷大量积累的关键因素之一。利用组织细胞培养法生产黄芩苷必须有效解决黄芩愈伤组织培养过程中褐化这一根本性问题,才能获得大量的次级代谢产物。本实验为解决黄芩愈伤组织褐化问题提供了很好的研究方法,可利用抗坏血酸、氯化钠、苯甲酸等抑制多酚氧化酶活性,使黄芩愈伤组织培养过程中所合成的大量黄芩苷不能被氧化为醌类物质,进而减缓愈伤组织褐化程度,促进黄芩愈伤组织的生长量和黄芩苷的积累量。

参考文献:

[1] 黄明,彭世清.植物多酚氧化酶研究进展[J].广西师范大学学报,1998,16(2):65-70.
 [2] 王梦亮,任振兴,黄登宇,等.黄芩愈伤组织培养及其黄芩苷合

- 成调控的研究[J]. 中草药, 2006, 37(6): 924-928.
- [3] 王梦亮, 任振兴, 刘滇生. 前体和诱导子饲喂黄芩愈伤组织强化黄芩苷生产研究[J]. 中草药, 2007, 38(1): 128-130.
- [4] Dai Y, Shi C H, Tang H, *et al.* The purification of polyphenol oxidase in tobacco and its properties [J]. *Acta Tabac Sin.*, 2001, 7(4): 7-12.
- [5] 胡风庆, 王关林, 马 辉, 等. 东北红豆杉细胞培养物 PPO 活性研究[J]. 植物研究, 2001, 21(4): 583-586.
- [6] 赵伶俐, 范崇辉, 葛 宏, 等. 植物多酚氧化酶及其活性特征的研究进展[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(3): 156-159.

药用峨眉野连种子形态及萌发条件的研究

张春平¹, 何 平^{1*}, 袁凤刚², 胡世俊³, 张益锋¹, 高 珊¹

(1. 西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715; 2. 徐州医学院 生物化学与分子生物学研究中心, 江苏 徐州 221002; 3. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘 要:目的 通过对峨眉野连种子形态和萌发生理的研究, 找到打破种子休眠、提高种子萌发率的最佳条件。方法 观察种子外观形态, 对峨眉野连种子长宽、千粒质量、含水量、吸水率、生活力和萌发等多项生理指标进行测定, 考察不同温度、不同激素质量浓度对种子萌发率的影响。结果 TTC(四氮唑)染色法测得的种子的生活力低, 仅为 56%。空粒和无生活力的种子占 44%, 表明峨眉野连发育完全的种子较少。种子的吸水实验表明种皮透水性较好, 完全吸水时间仅为 6 h, 从而可以判断, 种皮不可能是萌发率过低的制约因素。萌发实验显示, 4 ℃ 是种子较为适宜的萌发温度, 发芽率可达到 54.43%。5.0 mg/L 的 GA₃(赤霉素)处理后的萌发率提高最为显著, 可达 73.48%, 但是过高质量浓度(7.5 mg/L)的 GA₃ 则对种子萌发有一定的抑制效应。结论 种子生活力较低, 且种子休眠, 这可能是导致其萌发率低的重要原因。峨眉野连种子在不同温度和不同质量浓度的激素处理下存在着很大的差异, 为其人工栽培生产提供了理论依据。

关键词:峨眉野连; 种子; 生活力; 萌发率; 休眠

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)11-1799-04

Morphology and germination characteristics of medicinal plant *Coptis omeiensis* seeds

ZHANG Chun-ping¹, HE Ping¹, YUAN Feng-gang², HU Shi-jun³, ZHANG Yi-feng¹, GAO Shan¹

(1. Key Laboratory (Ministry of Education) of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research for Three Gorges Reservoir Region, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Research Center of Biochemistry and Molecular Biology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China; 3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Objective To break the dormancy and improve the germination rate of the seeds of *Coptis omeiensis*, the morphology and germination characteristics of *C. omeiensis* seeds were studied. **Methods** Several physiological indexes, like the weights per thousand seeds, content of moisture, the rate of water absorption, seed vigor, and different germination rates were measured. The germination rate of *C. omeiensis* seeds was determined under different temperatures and different concentration of hormone, GA₃ treatment. **Results** Seed vigor tested by TTC was relatively low (56%), while empty seeds and seeds without vitality could reach 44%, which indicated that there was a limitation in seed development of *C. omeiensis*. The water absorption experiment proved that the water permeability of seed coat was better, it could achieve complete absorption in only 6 h. A conclusion could be got that the seed coat was not the limiting factor of low seed germination rate. The experiment of germination showed that 4 ℃ was the most appropriate temperature for the seed germination with the germination rate up to 54.43%. The effect of 5.0 mg/L GA₃ on germination was the most significant to stimulate the rate of germination by 73.48%. But it also showed that higher concentration (7.5 mg/L) could restrain the germination. The most suit-

收稿日期: 2009-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070080)

作者简介: 张春平(1982—), 男, 山东潍坊人, 博士研究生, 主要从事植物资源学与植物分子生物学等方面的研究。

Tel: 13667652727 E-mail: chunpingzhang520@163.com

* 通讯作者 何 平 Tel: (023)68254122 E-mail: heping196373@126.com