

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.甘草酸钠口服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(2006BAI06A1F-02);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

是其药材重金属超标的重要原因之一。

关键词: 参环毛蚓; 重金属; 耐受性

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1377-03

参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 属钜蚓科动物, 药材习称“广地龙”, 在《中国药典》收录的4个来源中被认为是品质最优者^[1], 也是广东省著名的道地药材。但在市场流通中发现, 广地龙药材中重金属含量常常超标, 严重地影响了广地龙药材的临床应用以及药材的出口创汇。为了有效地解决这一长期困扰广地龙药材质量的问题, 本研究设计在不同镉离子浓度的土壤环境条件下, 人工饲养活体参环毛蚓, 观察记录动物的生存状态, 测定活蚓体内耐受重金属的量, 考察参环毛蚓对重金属镉离子的耐受特性, 为进一步研究其重金属富集的机制提供实验依据, 也为今后解除药材重金属量超标的策略制定提供新的思路。

1 仪器与试剂

1.1 仪器: AASNOVAA400 原子吸收光谱仪 (德国耶拿分析仪器股份有限公司), Marsxpress 微波消解仪 (美国 CEM 公司), 电热板 (瑞士 Precisa 仪器股份有限公司), XS225A 分析天平 (瑞士 Precisa 仪器股份有限公司), 养殖槽, 为自制木槽。

1.2 试剂: 氯化镉 ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$), 硝酸, 乙醇, 氢氟酸均为分析纯; 镉单元素标准溶液 $1\,000\, \mu\text{g}/\text{mL}$ (中国计量科学研究院提供, 批号 GBW08612); 水为实验室自制去离子水。土壤为细沙壤土, 采自实验所用参环毛蚓的原生长地, 经测定, 含水量 15.4% , $\text{pH}\,4.40$, 镉离子量为 $0.28\, \text{mg}/\text{kg}$ 。

活体参环毛蚓采自广东从化, 经广州中医药大学李薇教授鉴定为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)。选取体型健壮、活力较强, 平均湿质量 $13.9\, \text{g}$, 具明显生殖环带的参环毛蚓进行养殖, 以适应实验室环境。

2 方法与结果

2.1 重金属诱导养殖: 根据《中华人民共和国国家标准土壤环境质量标准》(GB15618-1995), 设定空白组为II类土壤, 镉离子量为 $0.6\, \text{mg}/\text{kg}$, 以此为基数, 设置土壤镉离子浓度为其镉离子浓度的 0.5 、 10 、 20 、 30 、 40 、 50 倍7个组, 镉离子浓度的调整用氯化镉试剂, 镉离子浓度由低至高分别编号为第1~7组。各组称取土壤 $5\, \text{kg}$ (以干燥品计), 放入养殖槽, 参照参环毛蚓生活对土壤含水量的要求, 调节含水量至 21% ^[2], 每组随机选取8条参环毛蚓, 养殖

14 d, 养殖前后称质量, 每天观察其活动情况。如发现死亡, 即取出, 并记录时间和质量。

2.2 样品处理: 将养殖14 d的参环毛蚓置于垫有润湿滤纸的箱中吐泥48 h。用乙醇麻醉参环毛蚓, 解剖, 冲洗, 每组取全蚓、躯干、内脏各1份, 剪成 $1\sim 2\, \text{cm}$ 小段, 干燥, 研成粗粉, 移至称量瓶内, 干燥至恒重, 置干燥器内, 备用。

2.3 供试品溶液的制备: 分别称取每组样品的全蚓、躯干、内脏各3份, 全蚓、躯干取 $0.2\, \text{g}$, 内脏取 $0.1\, \text{g}$ 。置于消解罐内, 各加硝酸 $10\, \text{mL}$, 消解 (表1)。挥酸, 移至 $50\, \text{mL}$ 量瓶中定容至刻度, 第1、2、3、7组样品液全部稀释10倍, 第4、5、6组全部稀释50倍即为待测样溶液。同法制空白溶液。

表1 微波消解程序

Table 1 Procedure of microwave digestion

步骤	功率/W	温度/℃	时间/min
1	800	120	5
2	800	150	5
3	800	190	20
4	0	冷却下降	20

2.4 原子吸收分光光度计工作条件: 石墨管类型为 WALL (普通型); 测定波长 $228.8\, \text{nm}$; 灯电流 $3.0\, \text{mA}$; 狭缝宽度 $0.8\, \text{mm}$; 进样体积 $10\, \mu\text{L}$ 。石墨炉升温程序见表2。

表2 石墨炉升温程序

Table 2 Procedure of temperature incensement of graphite furnace

步骤	备注	温度/℃	升温速率/(℃·s ⁻¹)	时间/s
1	干燥阶段	90	5	20
2	干燥阶段	105	3	20
3	干燥阶段	110	2	10
4	灰化阶段	300	250	10
5	原子化阶段	1 300	1 500	3
6	清洗阶段	2 000	500	4

2.5 标准曲线的制作: 移取镉标准溶液 $100\, \mu\text{L}$ 于 $100\, \text{mL}$ 量瓶, 用 1% 硝酸液定容至刻度, 制成 $1\, \mu\text{g}/\text{mL}$ 的镉标准储备液; 再移取储备液 $120\, \mu\text{L}$ 于 $10\, \text{mL}$ 量瓶制成 $12\, \text{ng}/\text{mL}$ 的标准液, 采用仪器自动进样自动设配比方法, 配比成质量浓度为 0.00 、 1.50 、 3.00 、 6.00 、 9.00 、 $12.00\, \text{ng}/\text{mL}$ 的系列标准溶液, 由仪器自动给出标准曲线, 回归方程为 $Y = 0.0596X + 0.0416$, $r = 0.9967$ 。

2.6 重现性试验: 取同一样品, 按2.3项方法操作,

平行试验6份, RSD为3.106%, 表明重现性良好。

2.7 仪器精密性: 取同一样品溶液, 连续测定6次, RSD为1.863%, 表明仪器精密性良好。

2.8 加样回收试验: 取同一样品5份, 精密加入1000 $\mu\text{g/mL}$ 镉标准液0.25 μL , 按2.3项操作。平均回收率为98.25%, RSD为4.886%。

2.9 样品测定: 按2.3项平行操作制备供试液。按“2.4”项条件测定。结果见表3。因第6、7组在养殖过程中全部死亡, 不计富集系数。

表3 样品镉离子量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Determination of cadmium in sample ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	躯干/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	内脏/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全蚓/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
1	1.05 $\pm$ 0.12	10.06 $\pm$ 2.40	2.95 $\pm$ 0.05
2	16.51 $\pm$ 0.46	36.32 $\pm$ 2.39	20.37 $\pm$ 2.08
3	19.54 $\pm$ 0.41	56.89 $\pm$ 3.96	25.38 $\pm$ 0.52
4	48.77 $\pm$ 4.58	90.15 $\pm$ 0.23	71.73 $\pm$ 4.12
5	82.17 $\pm$ 4.68	143.03 $\pm$ 7.04	101.79 $\pm$ 1.48
6	46.39 $\pm$ 4.01	74.23 $\pm$ 8.18	49.81 $\pm$ 4.12
7	27.36 $\pm$ 0.71	52.37 $\pm$ 0.46	27.76 $\pm$ 0.52

实验过程中密切观察各组参环毛蚓的活动状态, 按时随机取样检测其全蚓、躯干和内脏所含镉离子的浓度, 并将其与各组土壤浓度进行比较分析。结果表明, 1~4组的参环毛蚓在整个14 d养殖过程中均生长良好, 体质量保持不变或略有增加。此时, 蚓体内脏和全蚓的镉离子最高浓度分别为90、70 mg/kg 。随着养殖时间的推移, 高镉浓度污染的第6组和7组从第5天和第6天开始出现异常情况, 表现为参环毛蚓活力下降, 体形变小, 体质量减轻, 或呈结节状, 出现缢缩痕, 有的尾部脱落, 直到第7天两组蚯蚓均全部死亡。在养殖至第11天和第14天时, 第5组的参环毛蚓体形也发生变小或呈结节状, 并分别有1条蚯蚓死亡。

3 讨论

本研究发现, 中低浓度镉污染组中的参环毛蚓

均能正常存活, 而且在此环境中蚓体内脏和全蚓的镉离子浓度随土壤镉离子浓度递增而增加, 最高可达90、70 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》中所规定的中药材重金属镉离子限量的233~300倍。由此可见, 参环毛蚓对重金属镉离子具有极强的耐受能力, 这很可能是广地龙药材重金属超标的重要原因之一。

实验中还发现生长良好的参环毛蚓(1~4组)镉离子量内脏均高于躯干, 内脏镉量是躯干的1.8~9.8倍, 此结果表明, 参环毛蚓主要是通过消化系统吸收镉离子, 此结果与Stuërzenbaum等^[3]研究粉正蚓 *Lumbricus rubellus* 对镉的蓄积结果一致。

此外, 将参环毛蚓投入高浓度(24 mg/kg 以上)镉土壤中它会迅速死亡, 而当投入到较低浓度镉土壤中时, 参环毛蚓会适应此环境而正常存活, 其内脏和全蚓浓度可分别高达90、70 mg/kg 以上, 该浓度远远超过24 mg/kg 。此结果提示参环毛蚓在不超过生理极限的情况下, 机体会产生某种有效的重金属解毒机制, 而表现出机体对镉离子的高耐受性。

总之, 上述实验结果为进一步研究参环毛蚓重金属富集机制提供了必要的依据, 同时, 对于今后解除参环毛蚓重金属富集作用的策略制定以及提高广地龙药材品质优良度也具有重要意义。

参考文献:

- [1] 冯耀南, 刘明, 刘俭, 等. 中药材商品规格质量鉴别[M]. 广州: 暨南大学出版社, 1995
- [2] 喻良文, 裴建社, 李薇, 等. 参环毛蚓对土壤含水量及pH值因子的选择研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1310-1311
- [3] Stuërzenbaum S R, Kille P, Morgan A J. The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein[J]. *FEBS Lett*, 1998, 431(3): 437-442

(上接第1352页)

- cells and its possible mechanism[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 106: 179-186
- [2] 徐丽君, 魏世超, 陆付耳, 等. 马钱子若干组分治疗实验性关节炎的比较研究[J]. 同济医科大学学报, 2001, 30(6): 564-565
- [3] Yin W, Wang T S, Yin F Z, *et al*. Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of *Strychnos nux-vomica* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 88: 205-214
- [4] 林明侠, 张浩, 徐涛. 马钱子的毒理学研究[J]. 中医药信息, 2002, 19(1): 25-26
- [5] 张路, 简江波, 盛燕, 等. 马钱子碱脂质体的大鼠离体透皮性能和兔皮肤刺激性研究[J]. 中国医药工业, 2006, 37(3): 172-174
- [6] 宋金春, 王玉广. 马钱子碱微乳的制备及其体外透皮吸收的研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(12): 928-931
- [7] 陈军, 胡巍, 蔡宝昌, 等. 马钱子碱体外经皮吸收性质考察[J]. 中药材, 2008, 31(3): 445-447
- [8] 胡巍, 陈军, 蔡宝昌. 马钱子碱与土的宁体外经皮渗透性质的考察[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(12): 1053-1056
- [9] 胡巍, 陈军, 蔡宝昌, 等. 马钱子碱经皮给药的镇痛作用[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(2): 385-386
- [10] Malone M H, St J A, Katherine M, *et al*. Brucine lethality in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 1992, 35(3): 295-297