

野山参与园参抗坏血酸-谷胱甘肽循环代谢差异的比较

靳雯棋, 毕英飞, 王 晶, 唐 雪, 麻 锐, 孙立伟*

北华大学化学与生物学院, 吉林 吉林 132013

摘要: **目的** 通过比较野山参与园参在抗坏血酸-谷胱甘肽 (AsA-GSH) 循环中代谢相关酶活性及代谢物的量, 探讨野山参与园参抗氧化能力差异。**方法** 氮蓝四唑法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 高锰酸钾滴定法测定过氧化氢酶 (CAT) 活性, UV 法测定抗氧化酶活性和抗氧化物的量, 利用氨基酸自动分析仪检测谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸量。**结果** 野山参与园参中 SOD、CAT 活性高于园参, 在 AsA-GSH 循环中野山参与园参抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 等抗氧化酶活性均高于园参, 谷胱甘肽 (GSH)、抗坏血酸 (AsA)、脱氢抗坏血酸 (DHA) 等抗氧化物的量有高于园参的趋势。比较谷胱甘肽合成前体的上游氨基酸 (谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸) 量, 发现野山参与园参亦高于园参, 保障了 AsA-GSH 再循环的平衡。**结论** AsA-GSH 循环中关键抗氧化酶活性及抗氧化物量均为野山参与园参高于园参, 导致野山参与园参抗氧化能力强于园参, 为野山参与园参功效差异研究提供了理论依据。

关键词: 人参; 抗坏血酸-谷胱甘肽循环; 抗氧化物; 抗氧化酶; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶

中图分类号: R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)02-0373-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.02.026

Comparison on difference of ascorbic acid-glutathione cycle between wild and cultivated ginseng

JIN Wen-qi, BI Ying-fei, WANG Jing, TANG Xue, MA Rui, SUN Li-wei

Chemical and Biological Engineering College, Beihua University, Jilin 132013, China

Abstract: Objective In order to explore the anti-oxidant capacity of wild and cultivated ginseng, the anti-oxidase activities and antioxidants contents on ascorbic acid-glutathione (AsA-GSH) cycle were compared. **Methods** The activity of superoxide dismutase (SOD) was detected by NBT method and the activity of catalase (CAT) was detected by potassium permanganate titration. The anti-oxidase activities and anti-oxidants contents on AsA-GSH cycle were tested using spectrophotometric determination. The contents of glutamate (Glu), cysteine (Gly), and glycine (Cys) were tested by automatic amino acid analysis. **Results** The activities of SOD and CAT in wild ginseng were higher than that of cultivated ginseng. In AsA-GSH cycle, the activities of anti-oxidase such as ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), and glutathione reductase (GR). And the contents of antioxidants such as glutathione (GSH), ascorbic acid (AsA), and dehydroascorbic acid (DHA) were also more in wild ginseng. And then the contents of amino acids (Glu, Gly, and Cys), the precursor of GSH synthesis were high expression in wild ginseng to keep the balance of AsA and GSH recirculation. **Conclusion** The anti-oxidase activities and antioxidants content on AsA-GSH cycle in wild ginseng are higher than those in cultivated ginseng, which may be led to the antioxidant capacity of wild ginseng is stronger. It will provide a theoretical basis for efficacy differences research on wild and cultivated ginseng.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Mey.; ascorbic acid-glutathione cycle; anti-oxidants; anti-oxidase; SOD; CAT

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 是五加科多年生草本植物, 具有抗氧化、抗衰老、增强免疫、抗肿瘤多种生物活性。根据人参生长环境与年限的不

同分为野生人参 (野山参) 和种植人参 (园参)^[1]。野山参生长环境复杂, 生长年限长达几十年, 所遭受的氧化胁迫要强于园参。野山参为了响应和防御

收稿日期: 2016-08-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373932); 吉林省教育厅项目 (吉教科合字 [2016] 第 76 号); 吉林省中药生物技术科技创新中心资助项目 (20130604039TC); 吉林省人参转化关键技术研究与应用创新团队资助项目 (20140519016JH)

作者简介: 靳雯棋 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为人参活性成分。Tel: 15843268371 E-mail: 1091145090q@sina.com

*通信作者: 孙立伟 (1970—), 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药蛋白质组学及中药有效成分功效机制。

Tel: (0432)64602992 E-mail: sunnylilwei@163.com

氧化胁迫,形成了一套调节及解毒机制,可有效清除氧化胁迫时产生的过多自由基^[2]。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和 AsA-GSH 循环酶类就是酶促清除系统^[3]。在某些细胞器中,当无 CAT 存在时,AsA-GSH 就会有效地清除细胞代谢产生的 H₂O₂。AsA-GSH 循环系统在植物抵抗氧化胁迫、延缓衰老、清除活性氧自由基方面具有重要作用^[4]。为探究野山参与园参抗氧化能力差异,本实验比较了两者 AsA-GSH 循环中代谢物及相关酶活性的差异。

1 材料

1.1 样品

30 年生野山参采自于 127°E, 42°N, 海拔 500 m 吉林省抚松县境内长白山山脉,5 年生园参采购于吉林省抚松县,采样时间 2014 年 8 月 20~23 日。经露水河镇野山参基地总经理吴杰和长春中医药大学赵大庆教授共同鉴定为成熟野生和种植人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 获得野山参 5 株及园参 15 株。新鲜野山参与园参样品用去离子水洗净晾干后,加入液氮研磨成粉末,放于 -80 °C 冰箱冻存备用。

1.2 仪器与试剂

德国 Eppendorf 离心机 5804R, UV765 紫外可见分光光度计,TECAN 酶标仪,日立 L-8900 氨基酸自动分析仪,METTLER TOLEDO 电子分析天平,电热恒温水浴锅(永光明医疗仪器有限公司)。试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 酶液提取液的制备

野山参和园参各取 0.5 g 用液氮研磨成粉末,加入 2~4 倍量 0.2 mol/L pH 7.5 的 PBS 缓冲溶液,4 °C 震荡 2 h, 12 000 r/min 离心 20 min, 上清作为待测酶液。4 °C 保存备用。

2.2 抗氧化酶活性检测

分别采用氮蓝四唑(NBT)法测定 SOD 活性,高锰酸钾滴定法测定 CAT 活性^[5]。抗坏血酸过氧化物(APX)及谷胱甘肽还原酶(GR)活性测定参考 Ma 等方法^[6]。单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)活性按照 Nakano 等^[7]的方法测定。

2.3 抗氧化物检测

谷胱甘肽(GSH)量参照 Griffith 等^[8]方法测定。抗坏血酸(AsA)和脱氢抗坏血酸(DHA)量参照 Hodges 等^[9]的方法测定。

2.4 氨基酸测定

称取 0.2 g 的样品,放于水解管内。在水解管内

加 6.0 mol/L 盐酸 30 mL,再加入巯基乙酸 1 mL,盖上胶塞,用真空泵抽至真空并封口,将此水解管封口存放在(110±1)°C 的恒温干燥箱内保温 24 h 后,取出冷却。打开水解管,将水解液过滤并冲洗定容至 50 mL 量瓶。吸取滤液 1 mL 于 25 mL 烧杯内,在水浴上蒸干,残留物用 1 mL 0.02 mol/L HCl 溶解,立即使用氨基酸分析仪测定。

2.5 统计学分析

实验数据均采用 GraphPad 软件进行数据处理和统计分析。

3 结果与分析

3.1 野山参与园参 SOD 和 CAT 活性的比较

SOD 是植物体内清除自由基的重要酶之一,CAT 作为一种酶类清除剂,可促使过氧化氢分解为分子氧和水,从而使细胞免于遭受 H₂O₂ 的毒害,是生物防御体系的关键酶之一^[10]。实验结果表明,野山参 SOD 活性是园参的 1.6 倍,CAT 活性是园参的 1.79 倍(图 1),提示野山参清除自由基能力优于园参。

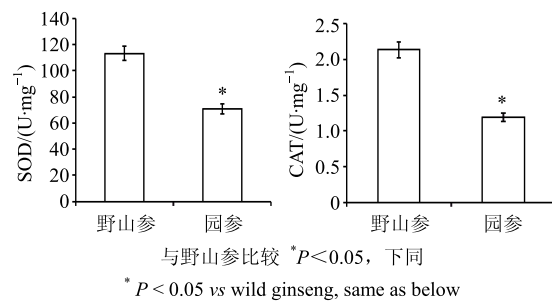


图 1 野山参与园参 SOD 和 CAT 活性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 1 Comparison of SOD and CAT activities in wild and cultivated ginseng ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 野山参与园参 AsA-GSH 循环中抗氧化酶活性的比较

APX、MDHAR、GR 等抗氧化酶是 AsA-GSH 循环中的关键酶^[11]。实验发现,野山参 APX 活性是园参的 12 倍,MDHAR 活性是园参的 3.16 倍,GR 活性是园参的 2.75 倍(图 2),在 AsA-GSH 循环体系中野山参抗氧化酶活性呈整体高于园参的趋势,证明野山参在维持体内氧化还原平衡能力上显著高于园参。

3.3 野山参与园参 AsA-GSH 循环中抗氧化物量比较

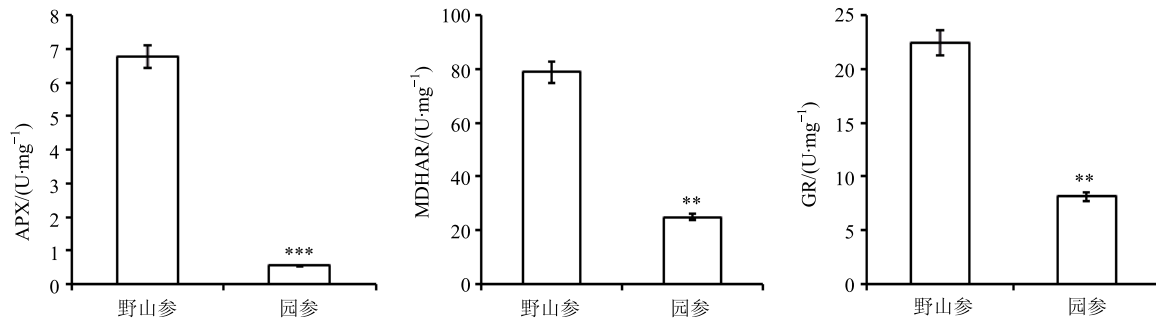
在 AsA-GSH 循环体系中,酶的活力变化将会影响其抗氧化物的合成。图 3 显示,野山参 GSH 量是园参的 1.69 倍,AsA 量是园参的 1.93 倍,但野山参和园参的 DHA 无显著差异。AsA/DHA 可反

映抗氧化能力^[12], 野山参 AsA/DHA 是园参的 1.9 倍, 表明野山参抗氧化、抗胁迫能力优于园参。

3.4 野山参与园参 AsA-GSH 循环中上游氨基酸量比较

谷胱甘肽是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组

成^[13], 研究发现这 3 种氨基酸在野山参中表达量高于园参。其中野山参谷氨酸量是园参的 1.15 倍, 半胱氨酸量是园参的 1.25 倍, 甘氨酸量是园参的 1.38 倍(图 4), 为维持其下游 GSH 合成及 AsA-GSH 循环平衡提供了前体物质。



与野山参比较 ***P*<0.01 ****P*<0.001, 下同
P*<0.01 *P*<0.001 vs wild ginseng, same as below

图 2 野山参与园参抗氧化酶活性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Comparison on anti-oxidant enzyme activity in wild and cultivated ginseng ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

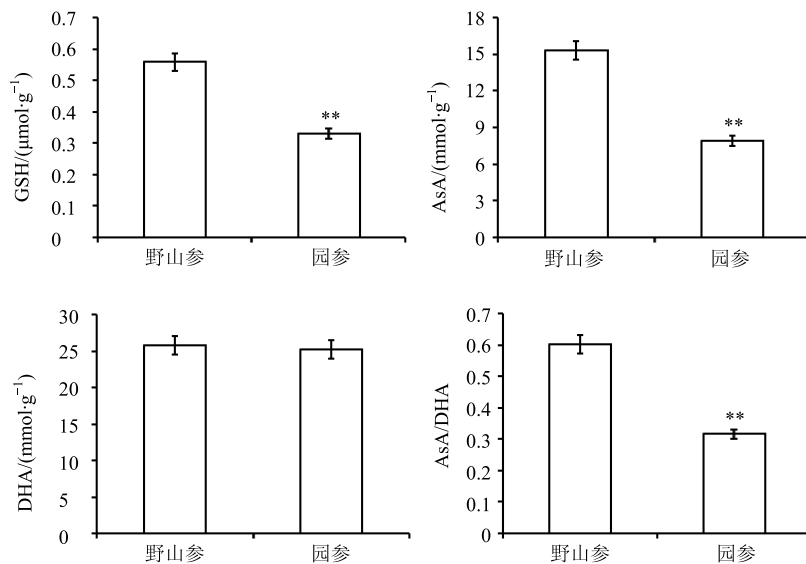


图 3 野山参与园参抗氧化物量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Comparison on anti-oxidants contents in wild and cultivated ginseng ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

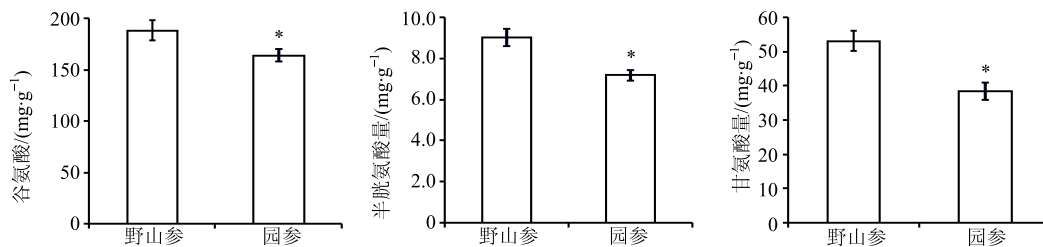


图 4 野山参与园参氨基酸量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Comparison on amino acid contents in wild and cultivated ginseng ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

野山参作为“长寿”植物,在几十年甚至上百年的生长过程中,当光照、温度、金属离子等生长条件不适宜时会导致过量自由基的产生与积累,从而引起细胞膜脂过氧化、蛋白质变性及核苷酸损伤等氧化应激。为了能够健康生长,野山参要通过调控自身的防御体系,维持体内氧化还原平衡,保护细胞免受氧化损伤。为探其究竟,研究了野山参与园参 AsA-GSH 循环中下游的抗氧化酶、抗氧化物及上游 3 种关键氨基酸量差异分析。

当机体发生氧化应激时,SOD 是植物防御体系中第一道防线,在野山参中活力较高,催化超氧阴离子歧化成 O_2 和 H_2O_2 ^[14]。随后 H_2O_2 可通过 CAT 或 AsA-GSH 循环将 H_2O_2 还原成 H_2O 。AsA-GSH 循环中 APX 活性在野山参与园参的比率上显著高于 CAT 活性,CAT 虽可以直接分解 H_2O_2 ,但它与 H_2O_2 的亲合力相对于 APX 较弱^[15]。因此 AsA-GSH 在野山参的抗氧化体系中占据重要地位。本实验发现 AsA-GSH 循环中野山参抗氧化酶(APX、MDHAR、GR)和抗氧化物(AsA、GSH)量均高于园参,确保野山参有效清除活性氧自由基,抵抗氧化胁迫。

本研究通过检测发现抗氧化物谷胱甘肽的量在野山参中显著表达,谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸作为 GSH 合成的前体物质,这 3 种氨基酸在野山参中量均高于园参。保障了 AsA-GSH 循环中 GSH 的高效再循环,从而形成一种氧化还原循环^[16],不断清除细胞内过量的 H_2O_2 。

综上所述,研究结果表明,野山参在自然条件下常年经历着氧化胁迫,其自身可以通过同时上调 SOD、CAT、AsA-GSH 循环中的抗氧化酶和抗氧化物以及上游的氨基酸代谢,而提高其抗氧化能力,从而降低氧化胁迫对野山参所造成的氧化损伤,使其得以多年生存和生长,这也很可能是其药用价值高于园参的原因之一。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
[2] 张维静, 陆海, 杜希华. 抗坏血酸过氧化物酶在植物抵抗氧化胁迫中的作用[J]. 山东师范大学学报: 自然

科学版, 2008, 23(4): 113-115.

- [3] 吕品, 张岩, 李建华, 等. 植物细胞活性氧的产生和清除机制[J]. 生物学教学, 2010, 35(2): 4-5.
[4] 王聪, 朱月林, 杨立飞, 等. NaCl 胁迫对菜用大豆种子抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(5): 1209-1216.
[5] 邓苕明, 熊格生, 袁小玲, 等. 棉花不同耐高温品系的 SOD、POD、CAT 活性和 MDA 含量差异及其对盛花期高温胁迫的响应[J]. 棉花学报, 2010, 22(3): 242-247.
[6] Ma F C L. The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shaded peel[J]. *Plant Sci*, 2003, 165(4): 819-827.
[7] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22(5): 867-880.
[8] Griffith O W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine[J]. *Anal Biochem*, 1980, 106(1): 207-212.
[9] Hodges D M, Lester G E, Munro K D, et al. Oxidative stress: Importance for postharvest quality: Oxidative stress: Postharvest fruits and vegetables[J]. *Hortscience*, 2004, 39: 924-929.
[10] 王锦锦, 李重阳, 俞诗源, 等. 中药小复方(液)对麻黄素致损伤中肾 SOD、CAT 活性及 Bax 蛋白与 TGF- β 1 表达的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(7): 943-949.
[11] 杨宁, 丁芳霞, 李宜坤, 等. 低温胁迫对高山离子芥试管苗膜脂过氧化及 AsA-GSH 循环系统的影响[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2014(5): 79-84.
[12] 王曼莹, 靳雯棋, 郭海洋, 等. 人参根组织形态及其生理生化活性成分相关性研究[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2015, 49(3): 428-433.
[13] Zhang D Q, Xie B, Gao L X, et al. Intramolecular synergistic effect of glutamic acid, cysteine and glycine against copper corrosion in hydrochloric acid solution[J]. *Thin Solid Films*, 2011, 520(1): 356-361.
[14] 王咏梅. 自由基与谷胱甘肽过氧化物酶[J]. 解放军药学学报, 2005, 21(5): 369-371.
[15] 苗雨晨, 白玲, 苗琛, 等. 植物谷胱甘肽过氧化物酶研究进展[J]. 植物学报, 2005, 22(3): 350-356.
[16] 段喜华, 唐中华, 郭晓瑞. 植物谷胱甘肽的生物合成及其生物学功能[J]. 植物研究, 2010, 30(1): 98-105.