

外源 NO 对龙胆次生代谢调控及质量形成机制研究

宋 雪, 刘思佳, 何录文, 孟祥才*

黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: **目的** 探讨外源一氧化氮(nitric oxide, NO)对龙胆 *Gentiana scabra* 次生代谢产物环烯醚萜苷积累及其质量形成机制的影响。**方法** 分别用水及 0.02、0.10、0.50、2.00 mmol/L 硝普纳(sodium nitroprusside, SNP)溶液处理龙胆鲜根, 研究活性氧、抗氧化酶活性、次生代谢产物相关酶活性及次生代谢产物积累之间的关系。**结果** 0.50、2.00 mmol/L SNP 处理组龙胆超氧阴离子、过氧化氢(H₂O₂)、NO 含量在 0~2 d 显著增加, 第 2 天之后逐渐降低。丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量呈现先升高后降低的趋势, 表明 SNP 可模拟再现生态胁迫的生理状态。SNP 处理组超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性在 0~6 d 均显著升高, 0.50 mmol/L SNP 处理组过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(oxidases, POD)活性分别在 0~2 d 和 2~4 d 显著升高。1,3-二磷酸甘油酸(1,3-bisphosphoglycerate, 1,3-BPG)含量及磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)活性在 0~4 d 显著增加, 其中 0.50、2.00 mmol/L SNP 处理组效果显著($P < 0.01$)。0.50 mmol/L SNP 处理组羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, HMGR)和 1-脱氧-D-木酮糖醇-5-磷酸还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR)活性在 0~6 d 显著升高, 第 6 天 0.50 mmol/L SNP 处理组龙胆中龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷和马钱苷酸含量比第 0 天分别增加了 34.5%、35.3%、1.8%和 53.7%。**结论** SNP 能够再现龙胆逆境条件下的生理状态, 促进龙胆中环烯醚萜类化合物的生物合成, 提高龙胆药材质量。

关键词: 一氧化氮; 龙胆; 环烯醚萜苷; 抗氧化酶; 龙胆苦苷; 獐芽菜苦苷; 獐芽菜苷; 马钱苷酸

中图分类号: R286 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)17-5716-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.024

Regulation of exogenous NO on secondary metabolism of *Gentiana scabra* and its quality formation mechanism

SONG Xue, LIU Si-jia, HE Lu-wen, MENG Xiang-cai

Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To explore the effect of exogenous nitric oxide (NO) on the accumulation of iridoid glycosides, a secondary metabolite of Longdan (*Gentiana scabra*), and its quality formation mechanism. **Methods** The fresh roots of *G. scabra* were treated with water, 0.02, 0.10, 0.50 and 2.00 mmol/L nipponate solution (SNP), respectively, the relationships between the activities of reactive oxygen species, antioxidant enzymes, enzyme activities related to secondary metabolites and the accumulation of secondary metabolites were investigated. **Results** The contents of superoxide anion, hydrogen peroxide (H₂O₂) and NO in *G. scabra* treated with 0.50 and 2.00 mmol/L SNP increased significantly from 0—2 d, then decreased gradually. Malondialdehyde (MDA) contents were increased first and then decreased, indicating that SNP can simulate and reproduce the physiological state under ecological stress. The activity of superoxide dismutase (SOD) in SNP treatment group increased significantly from 0 to 6 d, the catalase (CAT) and peroxidase (POD) activities in 0.50 mmol/L SNP treatment group were increased significantly at 0—2 d and 2—4 d, respectively. The contents of 1,3-bisphosphoglyceride (1,3-BPG) and the activities of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) were increased significantly at 0—4 d the effects of 0.50 and 2.00 mmol/L SNP treatment groups were the most significant and ($P < 0.01$). The activities of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGR) and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) in the 0.50 mmol/L SNP treatment group were significantly increased from 0—6 d, with this, the contents of gentiopicroside, swertiamarin, sweroside and loganic acid, the main active ingredients in *G. scabra*, were increased by 34.5%, 35.4%, 1.8% and 53.7% respectively compared with those on the 0 day. **Conclusion** SNP can rebuilt physiological status of *G. scabra* under ecological stress, promote

收稿日期: 2023-02-02

基金项目: 2020 年国际自然科学基金区域联合项目(U20A2040); 黑龙江中医药大学校基金面上项目(2019MS27)

作者简介: 宋 雪, 在读研究生, 研究方向为生物技术与生药资源开发。E-mail: Songxue1724@163.com

*通信作者: 孟祥才, 教授, 研究方向为药用植物生物学、栽培及质量评价。E-mail: Mengxiangcai000@163.com

the biosynthesis of iridoid compounds, and improve the herbal medicine quality.

Key words: NO; *Gentiana scabra* Bge.; iridoid glycoside; antioxidant enzymes; gentiopicroside; swertiamarin; sweroside; loganic acid

植物在环境胁迫下可产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 环境胁迫对植物伤害的本质就是 ROS^[1]。植物对 ROS 的消除是个负反馈过程, ROS 增多会激发植物自身的免疫系统, 即活性氧能够从细胞的基因表达、酶的合成和活性调节及酶促反应等不同层次调控抗氧化酶活性及次生代谢, 次生代谢产物多为药用成分, 在生态胁迫条件下能够大量合成, 因此生态胁迫可通过活性氧影响药材质量^[2-3]。药材质量的形成是通过增加次生代谢形成的, 通过人为调节植物的次生代谢, 从而提高栽培药材的质量是中药资源学的重点研究方向^[4]。

龙胆为龙胆科植物条叶龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag.、龙胆 *G. scabra* Bge.、三花龙胆 *G. triflora* Pall.或坚龙胆 *G. rigescens* Franch.的干燥根及根茎^[5], 其主要药用成分为环烯醚萜苷类, 如龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷与马钱苷酸等, 这类成分具有较好的保肝、抗炎、解热、抗病毒等药理作用, 广泛应用于临床^[6], 历史上龙胆主产区黑龙江省龙胆开发盛期 1965 年产量为 514.5 t, 由于人口增加及中医药的发展导致中药材的需求量不断增加和野生资源也遭到严重破坏, 近年来主产区野生东北龙胆蕴藏量已不到 100 t, 野生资源基本停止开发, 目前栽培已成为商品基本来源, 质量下降, 直接影响临床疗效^[7-8], 如何提高栽培药材质量是当今中药资源研究领域急需解决的重点和难点问题。一氧化氮(NO)是一种重要的信号分子, 可以以浓度相关的方式与清除 ROS 酶类共同应对抗氧化胁迫, 或者直接作为抗氧化剂消除 ROS^[9]。植物组织具有完整的代谢系统, 研究显示丹参、黄芩等某些药用成分是在干燥过程中大量合成的^[10-11]。本研究团队对黄芩研究证明对处理鲜根提高次生代谢含量的效果优于处理植株^[12-14], 这可能是对药用部位处理可避免光合作用的干扰, ROS 也更容易到达药用部位的缘故。因此本研究采用 NO 载体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)处理龙胆鲜根, 以不同浓度的 SNP 模拟环境胁迫, 使栽培龙胆再现野生条件下的生理状态, 探究 SNP 对龙胆主要药效成分环烯醚萜苷类的影响。

1 材料

1.1 样品

样品采自吉林省蛟河市, 经黑龙江中医药大学

孟祥才教授鉴定为龙胆科植物龙胆 *G. scabra* Bunge 的根。

1.2 仪器

1200 型高效液相色谱仪(安捷伦有限公司); TGL-16LM 型台式高速冷冻离心机(湖南星科科学仪器有限公司); SD40 型制冰机(广州市广坤电器制造有限公司); 752 型紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司); DHG-9015A 型鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); CP225D 型电子天平(上海精密仪器仪表有限公司); 多功能酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

1.3 试剂

SNP、30% H_2O_2 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、L-甲硫氨酸、乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)、核黄素、氮蓝四唑(nitro-blue tetrazolium, NBT)、愈创木酚、三氯乙酸、硫代巴比妥酸、植物超氧阴离子 ELISA 试剂盒(批号 R30343)均购于上海源叶生物科技有限公司; 过氧化氢(H_2O_2)试剂盒(批号 A064-1-1)、NO 测定试剂盒(批号 A012-1)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)活性测定试剂盒(批号 A130-1-1)均购于南京建成生物工程研究所; 植物 1,3 二磷酸甘油酸(1,3-disphosphoglycerate, 1,3-DPG) ELISA 检测试剂盒(批号 JM-110208P1)、植物羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, HMGR) ELISA 试剂盒(批号 JM-110182P1)、植物 1-脱氧-D-木酮糖醇-5-磷酸还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR) ELISA 检测试剂盒(批号 JM-110212P1)均购于江苏晶美生物科技有限公司; 龙胆苦苷(质量分数大于 98%, 批号 20201018)、马钱苷酸(质量分数大于 98%, 批号 20201115)、獐芽菜苦苷(质量分数大于 98%, 批号 20210122)、獐芽菜苷(质量分数大于 98%, 批号 20210120)均购于成都植标化纯生物技术有限公司。

2 方法

2.1 样品处理

将龙胆鲜根洗净, 均匀分为 5 组, 各组植株大小和质量相近。连续 8 d 分别早晚 2 次喷洒水及 0.02、0.10、0.50、2.00 mmol/L SNP 溶液至鲜根表

面湿润不滴水,放于室温环境中。于第 0、2、4、6、8 天(即 2 次取样时间间隔 48 h)按下述方法取样:(1) 每组取适量鲜根组织,来源于 4 株以上,切成碎块,精密称取每份 0.30 g 共 35 份,置-80 ℃冰箱供各种酶活性测定;(2) 每组取 30 g 以上样品,来源于 5 株以上,于 55 ℃下干燥,粉碎过四号筛,用于测定龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷和马钱苷酸含量。以传统加工方法(即 0 d)作对照,比较处理后各种指标的差异。样品重复 3 次。

2.2 植物超氧阴离子、H₂O₂、NO 含量测定

2.2.1 超氧阴离子含量测定方法 取“2.1”项制备的 0.30 g 的样品,加入 5 mL 预冷的生理盐水,冰浴研磨,4 ℃、10 000 r/min 离心 15 min,取上清液 4 ℃保存备用。采用植物超氧阴离子酶联免疫分析试剂盒测定。用紫外分光光度计在 530 nm 波长处,1 cm 光径,双蒸水调零,测定吸光度(A)。以系列 NO₂ 标准含量为横坐标,以对应的 A 值为纵坐标,制作标准曲线,根据测定管的 A 值进而计算 NO₂ 含量。平行测定 3 次。将所测得数据代入公式计算。

$$\text{超氧负离子含量} = 2 \times n \times VT / (W \times VS)$$

n 为从标准曲线上查得的 NO₂ 含量,VT 为超氧阴离子提取液总体积,W 为样品鲜质量,VS 为测定时加入提取液体积

2.2.2 H₂O₂ 含量测定方法 取“2.1”项制备的 0.30 g 每份的样品,按照质量:体积=1:9 加入 9 倍预冷的缓冲液(pH 7.8),冰浴研磨,4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min,取上清液 4 ℃保存备用。采用过氧化氢测试盒测定的方法,将上清液加反应试剂混匀,于 405 nm 处测定 A 值,双蒸水调零。平行实验 3 次。将测得数据代入公式计算。

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} / C_{\text{pr}}$$

C_{标准} 为标准品浓度,C_{pr} 为组织匀浆蛋白浓度

2.2.3 NO 含量测定方法 取“2.1”项制备的 0.30 g 每份的样品,放入冰浴的研钵中,加入预冷的缓冲溶液(PBS)研磨成匀浆,定容至 5 mL,4 ℃ 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液 4 ℃保存备用,此液即为粗酶提取液。采用 NO 测定试剂盒,把酶液与反应试剂混匀,于波长 550 nm 测定 A 值,双蒸水调零,平行实验 3 次。将测定值代入公式计算。

$$\text{NO 含量} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} / C_{\text{pr}}$$

C_{标准} 为标准品浓度,C_{pr} 为组织匀浆蛋白浓度

2.3 抗氧化酶活性测定

采用参考文献方法^[15]测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、过氧化氢酶

(catalase, CAT)活性、过氧化物酶(oxidases, POD)活性。

2.4 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定

采用硫代巴比妥酸-分光光度法测定 MDA 含量^[15]。

2.5 初生代谢途径关键酶活性测定

2.5.1 1,3-DPG 含量测定方法 取“2.1”项制备的 0.30 g 每份的样品,放入冰浴的研钵中,加入预冷的 PBS(pH 7.8)研磨成匀浆,定容至 5 mL,4 ℃ 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液 4 ℃保存备用,用于测定 1,3-DPG 的含量。采用植物 1,3-DPG ELISA 检测试剂盒进行测定,严格按照说明书中标明的时间、加液量及顺序进行温育操作。用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔 A 值。

2.5.2 PEPC 活性测定方法 取“2.1”项制备的 0.30 g 每份的样品,放入预冷的研钵中,加入适量预冷的提取液研磨成匀浆,定容于 10 mL,4 ℃ 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液 4 ℃保存备用。采用植物 PEPC ELISA 检测试剂盒,上清液与试剂按顺序加入 1 mL 比色皿中,立即混匀,蒸馏水调零,加样本的同时开始计时,记录在 340 nm 波长下的初始吸光度(A₁)值和 5 min 后的吸光度(A₂)值,按公式计算 PEPC 活性。

$$\text{PEPC} = 1624 \times (A_1 - A_2) / \text{样品鲜质量}$$

2.6 次生代谢途径关键酶活性测定

2.6.1 HMGR 活性测定 取“2.1”项制备的 0.30 g 每份的样品,放入预冷的研钵中,加入适量预冷的 PBS(pH 7.8),研磨成匀浆,定容于 5 mL,10 000 r/min、4 ℃离心 20 min,取上清液 4 ℃保存备用。采用植物经 HMGR 试剂盒,用酶标仪在 450 nm 波长下测定 A 值。

2.6.2 DXR 活性测定 取“2.1”项制备的 0.30 g 每份的样品,放入预冷的研钵中,加入适量预冷的 PBS(pH 7.8),研磨成匀浆,定容于 5 mL,10 000 r/min、4 ℃离心 20 min,取上清液 4 ℃保存备用。采用植物 DXR 试剂盒,用酶标仪在 450 nm 波长下测定 A 值。

2.7 活性成分含量测定

2.7.1 混合对照品溶液的制备 精密称取对照品龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐牙菜苷、马钱苷酸各适量,用甲醇溶液制成质量浓度分别为 2.799 2、1.009 2、0.103 5、1.017 6 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.7.2 供试品溶液的制备 精密称取 1.00 g 龙胆药

材粉末,置于 50 mL 的锥形瓶中,加入甲醇溶液 30 mL,摇匀,超声提取 60 min,放冷后称定质量,用甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.7.3 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$;流动相为甲醇(A)-0.3%磷酸水溶液(B),洗脱梯度:0~15 min, 20%~30% A; 15~25 min, 30%~37% A; 25~30 min, 37%~20% A; 30~50 min, 20% A; 体积流量 1 mL/min;检测波长为 240 nm,进样量 10 μL 。

2.7.4 标准曲线的制备 取“2.7.1”项下对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0 mL,分别用甲醇溶

液定容至 1 mL,制成系列质量浓度龙胆苦苷对照品溶液,依法进样测定龙胆苦苷的峰面积。取“2.7.1”项下对照品溶液 0.1、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mL,分别用甲醇溶液定容至 5 mL,制成系列质量浓度獐牙菜苦苷、马钱苷酸对照品溶液,依法进样测定獐牙菜苦苷、马钱苷酸的峰面积。取“2.7.1”项下对照品溶液 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL,分别用甲醇溶液定容至 1 mL,制成系列质量浓度獐牙菜苷对照品溶液,依法进样测定獐牙菜苷的峰面积。分别以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得成分回归方程、相关系数(R^2)和线性范围,见表 1。

表 1 龙胆中 4 种成分的线性关系

Table 1 Linear relationship of four components in *G. scabra*

成分	回归方程	R^2	线性范围/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
龙胆苦苷	$Y=10\,393\,X+282.22$	0.999 8	0.279 9~2.799 2
獐牙菜苦苷	$Y=16\,174\,X-145.99$	0.999 9	0.020 2~0.302 8
獐牙菜苷	$Y=15\,076\,X-8.683\,8$	0.999 9	0.005 2~0.051 8
马钱苷酸	$Y=11\,807\,X-65.656$	0.999 9	0.020 4~0.305 3

2.7.5 精密度试验 取同一供试品(0.50 mmol/L SNP 处理后第 4 天样品),按“2.7.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.7.3”项下方法连续测定 6 次,计算日内精密度;连续 3 d 进样分析,计算日间精密度。龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、马钱苷酸的日内和日间精密度的 RSD 分别为 0.57%、0.88%、0.71%、1.08%,0.46%、0.98%,0.92%、0.82%,表明仪器精密度良好。

2.7.6 稳定性试验 取同一供试品(0.50 mmol/L SNP 处理后第 4 天样品),按“2.7.2”项下方法制备供试品溶液,于制备后 0、4、8、16、24 h 按“2.7.3”项下色谱条件进样分析,得到龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、马钱苷酸峰面积的 RSD 值分别为 0.77%、0.42%、1.10%、0.40%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7.7 重复性试验 取同一供试品(0.10 mmol/L SNP 处理后第 2 天样品),按“2.7.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,按“2.7.3”项下色谱条件进样分析,得到龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、马钱苷酸质量浓度的 RSD 值分别为 1.21%、1.23%、1.42%、1.12%,表明该分析方法重复性良好。

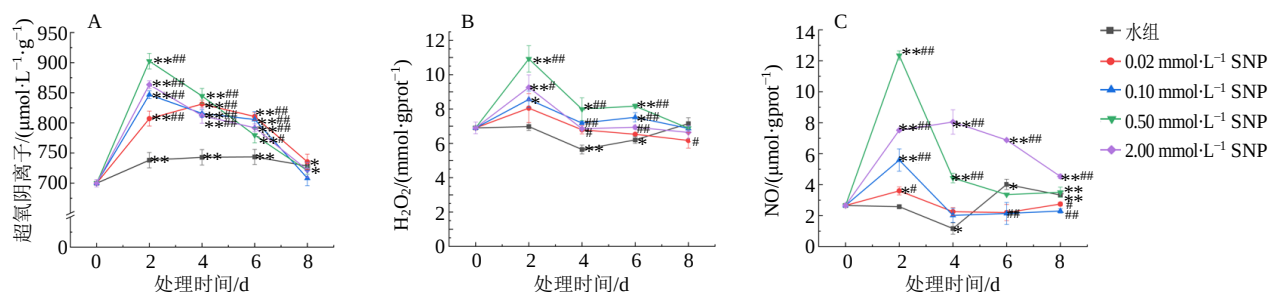
2.7.8 加样回收率试验 取已测定的龙胆粉末(0.1mmol/L SNP 处理后第 4 天样品)0.10 g,共 6 份,精密称定,分别加入适量质量浓度的对照品,按“2.7.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.7.3”

项下色谱条件进样分析,计算加样回收率得龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、马钱苷酸加样回收率分别为 99.01 %、98.91%、98.98%、98.45%,RSD 分别为 1.11 %、1.05%、1.56%、1.44%。

3 结果与分析

3.1 不同浓度 SNP 溶液对超氧阴离子、 H_2O_2 、NO 含量的影响

SNP 处理组超氧阴离子含量呈先升高后降低的趋势,而水组变化趋势不明显(图 1-A)。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 2 天超氧阴离子含量最高,相比第 0 天增加了 29.0%,极显著高于水组($P<0.01$)。0.5、2.0 mmol/L SNP 处理组 H_2O_2 含量呈先升高后降低再恢复到初始水平,而水组和低浓度组(0.02、0.10 mmol/L) H_2O_2 含量变化趋势不明显(图 1-B)。0.50 mmol/L SNP 处理组第 2 天时 H_2O_2 含量达到最高,比第 0 天增加了 58.3%,极显著高于水组($P<0.01$);在第 6 天呈降低的趋势,比第 0 天增加 18.4%。0.10、0.50、2.0 mmol/L SNP 处理组 NO 含量呈先升高后降低的趋势,而水组和 0.02 mmol/L SNP 处理组无明显变化趋势(图 1-C)。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 2 天 NO 含量达到最高值,比对照组增加了 364.3%,并且极显著高于水组($P<0.01$);在第 6 天比对照组增加了 26.3%。研究结果表明,龙胆鲜根在 0.5 mmol/L 外源 NO 施加下 ROS 显著且快速响应。



第 0 天比较: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$; 与水组比较: # $P < 0.01$, ## $P < 0.05$, 下同

compared with day 0, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$; compared with the water group, # $P < 0.01$, ## $P < 0.05$, same as below figures

图 1 不同浓度 SNP 溶液对龙胆中超氧阴离子 (A)、 H_2O_2 (B)、NO (C) 质量分数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of different concentrations of SNP solution on mass fractions of superoxide anion (A), H_2O_2 (B), NO (C) in *G. scabra* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 不同浓度 SNP 溶液对 MDA 含量的影响

0.10、0.50、2.00 mmol/L SNP 处理组 MDA 含量呈先上升后下降再上升的趋势, 0.02 mmol/L SNP 处理组 MDA 含量呈先上升后下降的趋势, 水组 MDA 含量呈缓慢增长趋势 (图 2)。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 2 天 MDA 含量最高, 比第 0 天增加了 98.4%, 在第 6 天比第 0 天增加了 57.6%, 并且都极显著高于水组 ($P < 0.01$)。研究结果表明, 龙胆鲜根在 0.50 mmol/L 外源 NO 施加下对 MDA 含量有显著影响。

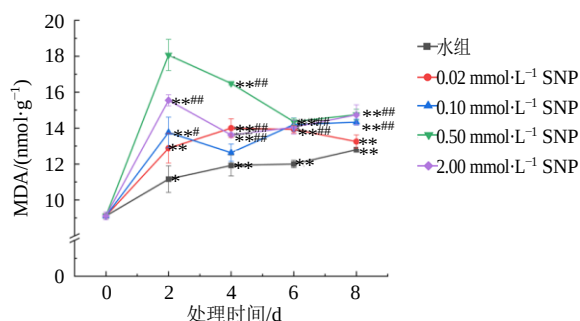


图 2 不同浓度 SNP 溶液对 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of different concentrations of SNP solution on MDA content ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 不同浓度 SNP 溶液对 SOD、CAT 和 POD 活性的影响

SNP 处理组 SOD 活性呈先升高后降低的趋势, SNP 处理组比水组变化趋势明显 (图 3-A)。0.10、0.50 mmol/L SNP 处理组在第 6 天 SOD 活性达到最高, 分别比第 0 天增加了 284.8% 和 235.5%, 并且都极显著高于水组 ($P < 0.01$)。0.10、0.50、2.00 mmol/L SNP 处理组 CAT 活性在第 2 天达到峰值, 水组和 0.02

mmol/L SNP 处理组 CAT 活性无明显变化 (图 3-B)。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 2 天时 CAT 活性最高, 比第 0 天增加了 66.0%, 并且极显著高于水组 ($P < 0.01$)。水组、0.50、2.00 mmol/L SNP 处理组 POD 活性呈先降低后升高再降低最后基本恢复到初始水平的趋势, 低浓度组 (0.02、0.10 mmol/L) POD 活性无明显变化 (图 3-C)。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 4 天时 POD 活性达到最高, 较第 0 天升高了 72.9%, 并且极显著高于水组 ($P < 0.01$); 在第 6 天活性最低, 比第 0 天降低了 29.1%。研究结果表明, 龙胆鲜根在 0.50 mmol/L 外源 NO 施加下 SOD、CAT 和 POD 显著且快速响应。

3.4 不同浓度 SNP 溶液对 1,3-DPG 含量及 PEPC 活性的影响

SNP 处理组 1,3-DPG 含量总体呈先上升后下降的趋势, SNP 处理组比水组变化趋势明显 (图 4-A)。0.50、2.00 mmol/L SNP 处理组在第 4 天活性达到最高, 较第 0 天分别提高了 176.1%、214.1%, 第 6 天分别较第 0 天提高了 136.9% 和 187.0%, 都极显著高于水组 ($P < 0.01$)。SNP 处理组 PEPC 活性总体呈先上升后下降的趋势, SNP 处理组比水组变化趋势明显 (图 4-B)。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 4 天和第 6 天 PEPC 活性达到最高, 较第 0 天提高了 104.3% 和 90.7%, 并且极显著高于水组 ($P < 0.01$)。研究结果表明, 龙胆鲜根在 0.50 mmol/L 外源 NO 施加下对 1,3-DPG 含量及 PEPC 活性有显著影响。

3.5 不同浓度 SNP 溶液对 HMGR、DXR 活性的影响

SNP 处理组 HMGR 活性呈先上升后下降的趋

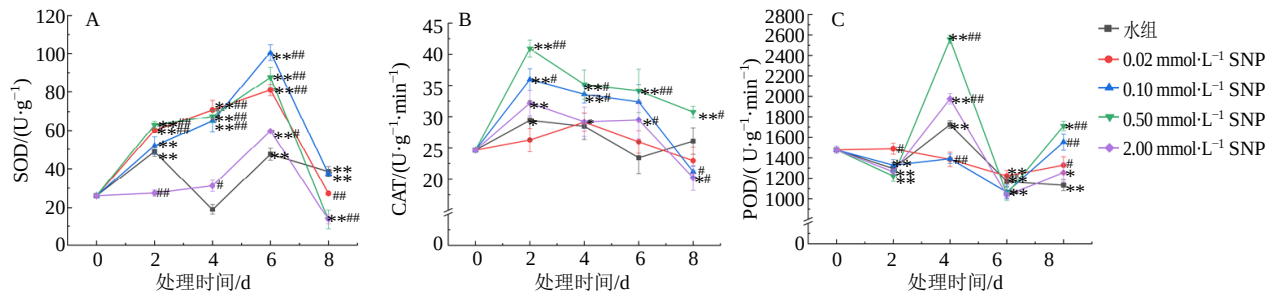


图 3 不同浓度 SNP 溶液对 SOD (A)、CAT (B)、POD (C) 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of different concentrations of SNP solution on activities of SOD (A), CAT (B) and POD (C) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

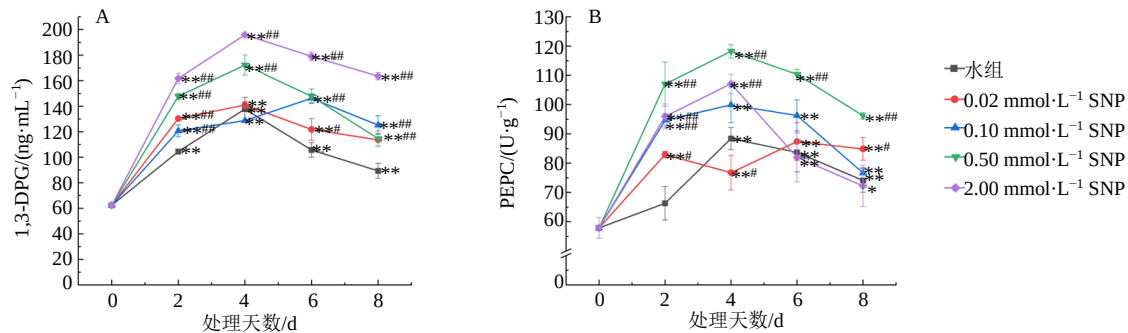


图 4 不同浓度 SNP 溶液对 1,3-DPG 含量 (A) 及 PEPC 活性 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of different concentrations of SNP solution on content of 1,3-DPG (A) and PEPC activity (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

势,水组变化趋势不明显(图 5-A)。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 2 天 HMGR 活性达到最高,比第 0 天提高了 680.0%,第 6 天比第 0 天增加了 205.0%,并且都极显著高于水组 ($P < 0.01$)。SNP 处理组 DXR 活性呈先升高后降低的趋势,水组 DXR 活性变化趋势不明显(图 5-B)。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 2 天 DXR 活性达到最高,比第 0 天提高了 94.5%,第 6 天比第 0 天增加了 62.5%,都极显著高于水组 ($P < 0.01$)。研究结果表明,龙胆鲜根在 0.50 mmol/L 外源 NO 施加下对 HMGR、DXR 活性有显著影响。

3.6 不同浓度 SNP 溶液对环烯醚萜苷含量的影响

SNP 处理组龙胆苦苷与獐芽菜苦苷含量变化趋势基本相同,呈现先升高后降低的趋势,水组变化趋势不明显(图 6-A、B)。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 6 天龙胆苦苷与獐芽菜苦苷含量最高,分别比第 0 天增加了 34.5%和 35.3%,并且极显著高于水组 ($P < 0.01$)。低浓度组(0.02、0.10 mmol/L)在第 2 天含量达到最高,但不如在第 6 天 0.50 mmol/L SNP 处理组含量升高显著。SNP 处理组獐芽菜苦苷含量先升高后降低的趋势(图 6-C)。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 6 天獐芽菜苦

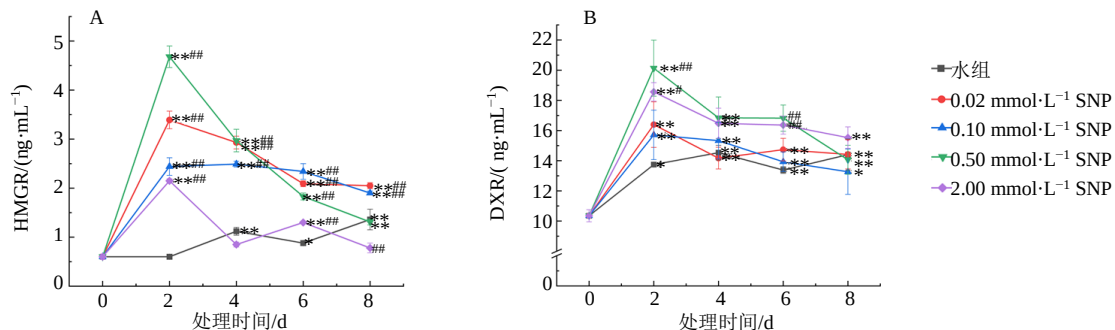


图 5 不同浓度 SNP 溶液对 HMGR (A)、DXR (B) 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of different concentrations of SNP solution on activities of HMGR (A) and DXR (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

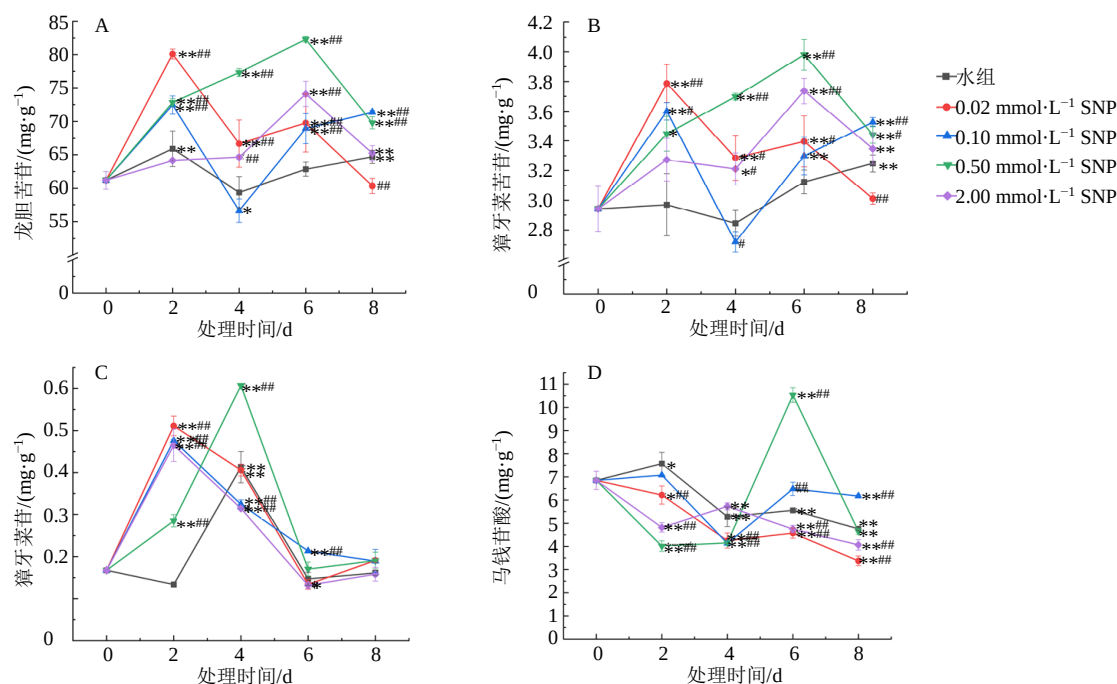


图6 不同浓度 SNP 溶液对龙胆中龙胆苦苷 (A)、獐芽菜苦苷 (B)、獐芽菜苷(C)、马钱苷酸 (D) 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 6 Effects of different concentrations of SNP solution on content of gentiopicoside (A), swertiamarin (B), sweroside(C) and loganic acid (D) in *G. scabra* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

含量比第 0 天增加了 1.8%。0.50 mmol/L SNP 处理组马钱苷酸含量呈先降低后升高再降低的趋势,其它处理组马钱苷酸含量呈现降低的趋势(图 6-D)。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 6 天马钱苷酸含量最高,比第 0 天增加了 53.7%,并且极显著高于水组 ($P<0.01$)。研究表明,龙胆鲜根在 0.50 mmol/L 外源 NO 施加下主要药用成分环烯醚萜苷有显著影响,在第 6 天含量达到最高值,龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷和马钱苷酸含量分别较第 0 天提高了 34.5%、35.3%、1.8%和 53.7%。

4 讨论

生态胁迫对植物伤害的生物学本质是 ROS。在植物受到环境胁迫时,会导致体内 ROS 含量升高,超氧负离子是最先产生的 ROS,而且很强的毒害作用^[16]。H₂O₂ 虽然具有较低的破坏作用,但如果不及时消除,它也会通过芬顿反应(Fenton)转化为性质活泼、破坏力极强的·OH。ROS 可使抗氧化酶的活性升高或者次生代谢产物含量升高,或者二者均升高,来减少过量 ROS 积累对生物体的毒害作用,保证活性氧水平的相对稳定^[4,14]。

4.1 外源 NO 对 NO、超氧阴离子、H₂O₂ 含量的影响

NO 是一种重要的信号分子,ROS 可以介导

NO 生成,NO 也可以通过调节 ROS 代谢,促进 ROS 生成^[17]。本实验中超氧负离子、H₂O₂ 含量在前 2 天显著增加,说明在 SNP 的作用下,导致 ROS 在前 2 天显著增加,但在第 2 天后含量降低,其原因可能是由于植物代谢系统发生改变,加强了对过量 ROS 的消除^[18]。在 SNP 作用下 MDA 含量总体呈上升的趋势,但在第 2~6 天有下降的趋势(图 2),与 ROS 含量变化结果相一致。MDA 的含量常被用来表征植物遭受逆境胁迫的危害程度^[19],ROS 的累积导致膜脂过氧化形成 MDA。SNP 可增加 ROS 和 MDA 含量,表明外源 NO 再现逆境下的生理状态。

NO 在较高浓度条件下对细胞具有毒害作用,而在较低浓度条件下具有细胞保护和刺激作用^[20-21],而 NO 对 ROS 的调节作用是通过抗氧化系统的蛋白质巯基亚硝基化^[22-23],因此 NO 对 ROS 的调节作用是通过酶来完成的,在较高浓度条件下,NO 也会破坏酶,这可能是 2.00 mmol/L 组 ROS 含量较低的原因。而 0.02 mmol/L 和 0.10 mmol/L 组具有明显的剂量依赖关系,表明该剂量的 NO 尚未完全启动相关酶。0.50 mmol/L 组表现较好的效果。

4.2 外源 NO 对抗氧化酶活性的影响

当植物遭受逆境胁迫时,其体内 ROS 会过量积

累, 导致发生氧化性胁迫, 抗氧化酶系统是对抗这种胁迫的主要途径之一^[24]。抗氧化酶有 SOD、POD、CAT、APX、DHAR、GR 等^[25], 其中 SOD、CAT、SOD 是其中最主要的酶。本实验中超氧负离子、 H_2O_2 含量在前 2 天显著增加, 抗氧化酶系统也做出反应, 各抗氧化酶活性显著增强。SOD 是抵御 ROS 的第一道防线, 能催化活性较高的超氧负离子生成活性很低的 H_2O_2 ^[26], SOD 活性在第 0~6 天 0.50 mmol/L SNP 处理组显著增加, 加强了对超氧负离子的消除, 使超氧负离子含量在第 2~6 天呈显著下降。CAT 和 POD 是植物消除 H_2O_2 的 2 种主要酶类, 它们分别在第 0~2 天、第 2~4 天 0.50 mmol/L SNP 处理组活性显著升高, 降低了 H_2O_2 含量。NO 可通过直接与超氧负离子作用生成对植物毒害小的 ONOO-, 还可以与 SOD、CAT、POD 等抗氧化酶类中血红素铁结合来调节它们的活性, 以此来调节超氧负离子和 H_2O_2 的含量^[17]。以上说明外源 NO 可以显著提高抗氧化酶活性, 增强活性氧清除能力, 使 ROS 水平处于动态平衡状态, 导致在第 2 天后含量降低(图 1)。较高浓度的 NO 也会破坏抗氧化酶, 2.00 mmol/L 组抗氧化酶活性并未达到最高水平, 0.02 mmol/L 和 0.10 mmol/L SNP 组剂量较低, SOD、CAT、POD 等相关酶的活性也较低。

4.3 外源 NO 对 1,3-DPG 含量及 PEPC 活性的影响

本实验中 1,3DPG 含量和 PEPC 活性升高。1,3-二磷酸甘油酸是葡萄糖糖酵解的产物, 说明在 SNP 作用下可加快葡萄糖分解速度, 为后续的次生代谢途径提供能量和物质。

在非光合组织中, PEPC 的主要作用是三羧酸循环中补充中间体, 同时也是初生代谢与次生代谢的分支点, PEPC 活性升高说明 SNP 调节了植物代谢途径, 为次生代谢产物生物合成提供更多原料^[27], 能够增强植物的次生代谢。有研究表明, 低浓度 NO 提高 PEPC 酶活性及基因表达, 可以使 PEPC 活性呈先增加后降低的趋势^[28-29]。在不同浓度处理中, 0.50 mmol/L 组 PEPC 活性较高, 可使更多的物质合成次生代谢产物。

4.4 外源 NO 对次生代谢产物环烯醚萜苷含量的影响

龙胆的主要活性成分为环烯醚萜苷类成分, 苷类成分可以保护细胞减少 ROS 的伤害^[30]。苷具有双亲性, 既含有亲水性的头部(糖类成分), 又含有疏水性的尾部(萜类成分)。苷类成分的生物学效应

主要是被动保护生物大分子或细胞器。通过膜技术与原子力显微镜研究证实植物的萜类物质能够容易整合到磷脂双分子层中^[31], 调节维持细胞膜的流动性和整体性^[32]。甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)和 2-甲基-赤藓醇-4-磷酸(2-methyl erythritol 4-phosphate, MEP) 2 条途径是合成萜烯类化合物的主要途径, HMGR 和 DXR 分别是 2 个途径的关键限速酶, 直接调控萜烯类化合物的生物合成^[33]。有研究表明, 波叶金桂在干旱胁迫下 HMGR、DXR 活性表现出先上升后下降^[34], 本实验中 HMGR 和 DXR 活性趋势也同样表现出先上升后下降(图 5), 在 0.50 mmol/L SNP 处理组第 2 天活性最高, 在第 2~6 天都高于第 0 天, 说明外源 NO 可以显著提高次生代谢酶活性, 能够促进萜烯类化合物合成, 从而抵御胁迫。HMGR 是萜类合成的最主要酶, 不同浓度 NO 对几种萜类成分的调控效果与 HMGR 活性呈明显的正相关, 其中 0.50 mmol/L SNP 处理组效果最佳。在 0.50 mmol/L SNP 处理组中, 龙胆苦苷、獐芽菜苦苷和马钱苷酸含量在第 6 天都显著高于第 0 天(图 6), 含量分别提高了 34.5%、35.3%和 53.7%, 提高幅度之大鲜有报道。獐芽菜苷在第 4 天含量最高, 第 6 天与第 0 天无显著差异, 可能有 2 方面原因: 一方面是因为獐芽菜苷含量较低, 受环境影响较大, 含量有微小的变化可能就有明显的变化趋势; 另一方面因为萜类合成途径中最先产生的是獐芽菜苷, 经过一系列酶促反应, 最后脱羧基形成龙胆苦苷^[35], 作为中间产物含量较低。

ROS 能够增强植物的次生代谢从而改变药材的质量。龙胆药材为正常采收期, 采收后处理 8 d, 虽然存在呼吸作用会消耗一定量的营养物质, 但最总体产量不会产生较大影响, 而逆境条件下对产量影响更大。通过不同浓度 SNP 对龙胆鲜根的处理, 0.50 mmol/L SNP 处理组能够显著增加超氧负离子、 H_2O_2 、NO 和 MDA 的含量, 再现植物逆境条件下的生理状态, 提高了抗氧化酶活性, 同时也增加了初生代谢和次生代谢过程中关键酶活性和关键物质的含量。0.50 mmol/L SNP 处理组在第 6 天使龙胆药材中有效成分龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷和马钱苷酸 4 种萜类化合物含量分别增加 34.5%、35.3%、1.8%和 53.7%, 药材的质量得到显著提升。通过人为调控 ROS 再现龙胆逆境条件下的生理状态, 方法简单易行, 劳动力成本很低, 还可显著提高龙胆药材质量, 可为优质药材生产提供新的途径。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孟祥才, 李晓颖, 姚杰, 等. 生态胁迫促进道地药材质量形成机制与质量评价思路 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1587-1594.
- [2] 孟祥才, 黄璐琦, 张小波, 等. 中药资源学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 23.
- [3] 孟祥才, 王喜军. 活性氧促进道地药材质量形成的假说及其探讨 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 799-804.
- [4] 黄璐琦, 郭兰萍. 中药资源生态学研究 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007: 56.
- [5] 中国药典 [S]. 三部. 2015: 96.
- [6] 董丽萍, 倪梁红, 赵志礼, 等. 龙胆属环烯醚萜类化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2116-2128.
- [7] 孟祥才, 孙晖, 韩莹, 等. 条叶龙胆药材资源变化及未来发展建议 [J]. 中国现代中药, 2011, 13(2): 10-12.
- [8] 尹大志. 道地药材—东北龙胆的保护与利用 [J]. 黑龙江医药, 2019, 32(2): 301-302.
- [9] 张玲玲, 吴丹, 赵子捷, 等. 植物一氧化氮信号分子的研究进展 [J]. 植物学报, 2017, 52(3): 337-345.
- [10] 周铜水. 丹参的主要活性成分丹酚酸 B 是采后干燥胁迫诱导的产物 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(3): 211-218.
- [11] 焦广睿, 周国军, 李焱, 等. 阴干过程中黄芪活性成分和抗氧化能力的增长与下降趋势 [J]. 安徽医药, 2013, 17(9): 1473-1477.
- [12] Meng X C, Song Q, Cao W L, et al. H₂O₂ improves quality of *Radix Scutellariae* through anti-oxidant effect [J]. *Phcog Mag*, 2016, 12(45): 84.
- [13] Meng X C, Song Q, Gao H R, et al. Exogenous intervention with sodium hydrosulfite enhances the quality of *Radix Scutellariae* by modulating antioxidases and secondary metabolites [J]. *Phcog Mag*, 2019, 15(60): 107.
- [14] 付晓莹, 郭慧敏, 丛薇, 等. 外源 H₂O₂ 对黄芩次生代谢调控及道地质量形成机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(2): 281-287.
- [15] 高俊凤. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 210-218.
- [16] 赵天宏, 孙加伟, 付宇. 逆境胁迫下植物活性氧代谢及外源调控机理的研究进展 [J]. 作物杂志, 2008(3): 10-13.
- [17] 陈世军, 张明生. 植物一氧化氮及其对活性氧代谢的影响 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(17): 7116-7118.
- [18] 李格, 孟小庆, 蔡敬, 等. 活性氧在植物非生物胁迫响应中功能的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2018, 54(6): 951-959.
- [19] 祁伟亮, 孙万仓, 马骊. 活性氧参与调控植物生长发育和胁迫应激响应机理的研究进展 [J]. 干旱地区农业研究, 2021, 39(3): 69-81.
- [20] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide: A non-traditional regulator of plant growth [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(11): 508-509.
- [21] Neill S J, Desikan R, Clarke A, et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells [J]. *Plant Physiol*, 2002, 128(1): 13-16.
- [22] Romero-Puertas M C, Camprotrini N, Mattè A, et al. Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response [J]. *Proteomics*, 2008, 8(7): 1459-1469.
- [23] Yun B W, Feechan A, Yin M H, et al. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity [J]. *Nature*, 2011, 478(7368): 264-268.
- [24] 徐松华. 逆境条件下植物体内活性氧代谢研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2021, 27(21): 29-32.
- [25] 奉斌, 代其林, 王劲. 非生物胁迫下植物体内活性氧清除酶系统的研究进展 [J]. 绵阳师范学院学报, 2009, 28(11): 50-53.
- [26] Alscher R G, Erturk N, Heath L S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(372): 1331-1341.
- [27] 于济, 沙伟, 张梅娟, 等. 植物磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的研究进展 [J]. 高师理科学刊, 2021, 41(2): 54-60.
- [28] 陈平波. 外源 NO 对高表达转玉米 C₄pepc 基因水稻光合特性调控 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [29] 贾少磊, 吕金印, 刘昌欣, 等. PEG 胁迫对抗旱性不同的小麦幼苗光合关键酶活性的影响 [J]. 麦类作物学报, 2014, 34(7): 976-982.
- [30] Ke C H, Peng Y, Yuan Z Q, et al. Ginsenoside Rb1 protected PC12 cells from A β ₂₅₋₃₅-induced cytotoxicity via PPAR γ activation and cholesterol reduction [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 893: 173835.
- [31] 乔进京, 孙润广, 王夫雨, 等. 乌苏酸/DPPE 单分子层相互作用的 Langmuir 膜技术与原子力显微镜研究 [J]. 电子显微学报, 2013, 32(2): 133-138.
- [32] Bonfils J P, Sauvaire Y, Baissac Y, et al. Iridal levels in *Iris rhizomes*—Effects of wounding and dehydration [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(3): 701-705.
- [33] Dudareva N, Klempien A, Muhlemann J K, et al. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds [J]. *New Phytol*, 2013, 198(1): 16-32.
- [34] 汪俊宇, 王小东, 马元丹, 等. ‘波叶金桂’对干旱和高温胁迫的生理生态响应 [J]. 植物生态学报, 2018, 42(6): 681-691.
- [35] 王彩云, 张晓东, 沈涛, 等. 龙胆苦苷生物合成途径研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 4-10.

[责任编辑 时圣明]