

不同浓度铁离子对黄芩抗氧化酶活性等生理特性的影响

吴晓玲¹, 徐占明²

(1. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏石嘴山惠农区礼和农业服务中心, 宁夏 惠农 753002)

摘要: 对不同浓度铁离子处理下黄芩抗氧化酶活性等生理特性进行了研究, 结果表明: M4 处理(Fe^{2+} 浓度为 6.95 mg/kg)下黄芩的株高最高, 其叶绿素含量、SOD 酶活性、POD 活性、可溶性蛋白质含量均显著高于其他处理, 而其丙二醛含量却显著低于其他处理。研究结果提示, Fe^{2+} 浓度为 6.95 mg/kg 可有效增强黄芩细胞活性, 促进黄芩生长, 是黄芩生长的最佳铁离子浓度。

关键词: 黄芩; 铁离子浓度; 抗氧化酶活性; 可溶性蛋白含量

中图分类号: S567.101 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2012)04-0125-04

黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi.) 为唇形科黄芩属多年生草本植物, 是我国的传统大宗中药材。黄芩中含有黄芩甙、黄芩素和汉黄芩甙等次生代谢产物, 这些次生代谢产物具有清热解毒、抗炎利胆、保肝和抗肿瘤作用^[1-4]。据报道, 黄芩苷元和千层纸黄素 A 分别对大肠癌细胞 WiDr 的增殖和人宫颈癌细胞 HeLa S3 具有强烈抑制作用^[5], 而黄芩配合其他中药治疗肝癌亦有特效^[6]。由此可见, 开发黄芩及其活性成分作为降血压、治疗冠心病和糖尿病以及防治肿瘤的新药前景十分广阔。

随着对黄芩研究的深入, 黄芩的需求量也随之大幅度上升, 据不完全统计, 我国仅黄芩甙的年需求量就在 300 t 以上。但野生黄芩资源由于大量采挖已濒临灭绝, 目前在市场上流通的主要是栽培黄芩, 就黄芩栽培方法我国研究者做了大量的基础工作。但是就不同营养元素对黄芩的生长和生理特性的研究涉猎较少。微量元素对药用植物的生长和药材质量具有重要的影响。其中铁离子的作用尤为重要, 铁可提高光合作用、蛋白质的形成效率, 改善原生质的胶体性质、调节植物的水分状况, 从而促进植物生长和对不良环境的抵抗力^[7]。缺铁是一个世界性植物营养问题。土壤中铁含量虽然很高, 但常以较稳定的氧化态存在, 故植物难以利用; 尤其在 pH 较高的石灰性土壤中, 植物缺铁现象更为严重^[8]。但是对植物而言, 不能盲目补充铁, 缺铁和铁过量都会对其造成伤害, 因此, 维持植物铁离子的动态平衡就显得尤为重要^[9]。选择合适的铁离子浓度, 不仅能促

进药用植物植株正常生长发育, 还可以使其次生代谢产物积累量达到最大。而且适宜的铁离子浓度是抗氧化酶发挥活性所必需的。

因此, 本研究利用含有不同浓度二价铁离子的培养基来培养黄芩, 测定各处理下黄芩植株的株高及抗氧化酶活性等生理指标, 以期探索黄芩生长的最佳铁离子浓度, 为黄芩的大规模科学种植提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 种子 2009 年购于甘肃, 筛选饱满的种子消毒后接种在相应的培养基内。

1.2 试验设计

各处理基本培养基为 MS 培养基, 并且含有 6-BA 0.5 mg/kg 和 NAA 0.1 mg/kg, pH 值 6.8, 培养条件 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 12 h 光照, 12 h 黑暗, 每隔 10 d 转接一次。确定 5 个不同浓度的 $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 处理和一个空白对照, 各处理重复 3 次, 具体设计如下 (以下为二价铁离子浓度):

M1: 0 mg/kg; M2: 1.74 mg/kg; M3: 3.48 mg/kg; M4: 6.95 mg/kg; M5: 13.90 mg/kg; M6: 27.80 mg/kg。

1.3 测定项目和方法

1.3.1 株高的测定 接种后 20 天测量, 培养瓶外用刻度尺测量植株垂直高度, 每个样本随机测量 30

收稿日期: 2011-10-21

基金项目: 2011 年宁夏自然科学基金项目部分内容 (NZ1130)

作者简介: 吴晓玲 (1973—), 女, 宁夏同心县人, 硕士, 副教授, 主要从事细胞工程方面的教学研究工作。E-mail: wuxiaoli@nxu.edu.cn。

株,计算平均株高。

1.3.2 叶绿素含量的测定^[10] 在第23天时取各处理叶片,利用分光光度法测定叶绿素含量。

1.3.3 可溶性蛋白质含量的测定^[11] 可溶性蛋白质含量的测定采用考马斯亮兰 G-250 法,鲜样用 pH 7.0 缓冲液浸提,以牛血清(BSA)制作标准曲线,求得样品中蛋白质含量。样品中蛋白的含量 (mg/g) = $C \times V_T V_1 \times FW \times 1000$

式中, C 为查标准曲线值 (μg); V_T 为提取液总体积 (mL); FW 为样品鲜重 (g); V_1 为测定时加样量 (mL)。

1.3.4 丙二醛含量的测定^[12] 在第28天时取各处理叶片利用分光光度法测定丙二醛含量。MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg FW}$) = $[6.452 \times (A_{652} - A_{600}) - 0.559 \times A_{450}] \times V_i / V_e \times FW$

式中, V_e 为提取液总体积 (mL); V_i 为测定用提取液体积; FW 为样品鲜重。

1.3.5 超氧化物歧化酶活性(SOD)测定^[13] 在第20天时取各处理叶片利用分光光度法测定 SOD 活性,通过测定计算得到各处理 SOD 总活力。计算公式如下:

$$\text{SOD 总活性} = [(A_0 - A_s) \times V_T] / (0.5 \times A_0 \times W_F \times V_1)$$

式中, SOD 总活性以每克鲜重的酶单位表示 (U/g); A_0 为对照的光吸收值; A_s 为样品的光吸收值; V_T 为样品液总体积 (mL); V_1 为测定时样品用量 (mL); W_F 为样品鲜重 (g)。

1.3.6 过氧化物酶活性(POD)的测定^[13] 在有过氧化氢存在下,过氧化物酶能使愈创木酚氧化,生成茶褐色物质,该物质在 470 nm 处有最大吸收,可用分光光度计测量 470 nm 的吸光度变化测定过氧化物酶活性

$$\text{酶活性} [\triangle A_{470} / (\text{g} \cdot \text{min FW})] = \frac{\triangle A_{470} \times \text{酶提取液总量 (mL)}}{\text{样品鲜重 (g)} \times \text{测定时酶液用量 (mL)}}$$

2 结果与分析

2.1 不同浓度铁离子处理对黄芩幼苗株高的影响

由图 1 可知,随铁离子含量的增加,黄芩幼苗株高也逐渐增高,当 Fe^{2+} 达到 6.95 mg/kg (M4 处理) 时,黄芩幼苗株高达最高,之后趋于下降,这表明在一定范围内,铁离子可促进植物生长,但是其含量过高也会限制黄芩植物的生长,故对黄芩而言, Fe^{2+} 含

量 6.95 mg/kg 时黄芩生长最快。

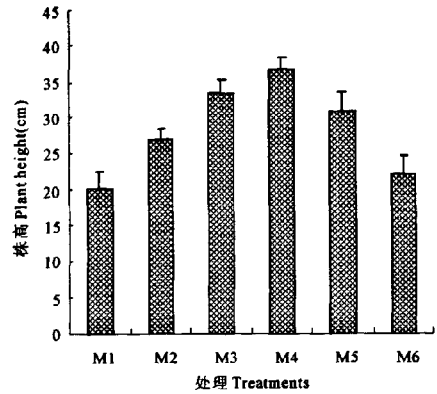


图 1 不同浓度铁离子处理对黄芩株高的影响

Fig.1 Effect of Fe^{2+} on the height of *Scutellaria baicalensis* Georgi.

2.2 不同浓度铁离子处理对黄芩叶绿素含量的影响

叶绿体是铁的主要储存器官,叶片中的铁有 90% 以上都储存在叶绿体中^[14-15]。铁主要以铁蛋白的形式储存在叶绿体基质中。缺铁容易导致植物叶绿体结构破坏,叶绿体基粒数目减少,基粒类囊体的片层数目下降,基粒类囊体和基质类囊体排列混乱,严重缺铁时叶绿体被解离或液泡化,从而影响叶绿素的形成^[16]。

各处理叶绿素含量均高于对照 M1 处理,从 M1 到 M6 黄芩体内的叶绿素含量逐渐增加,其中以 M4 (Fe^{2+} 含量为 6.95 mg/kg) 处理的黄芩幼苗叶绿素含量最高(见图 2),生长状况最好,这主要是由于该浓度下黄芩细胞内叶绿体片层结构完整,利于叶绿素的合成所致。

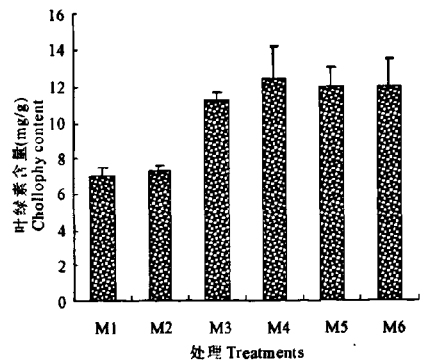


图 2 不同浓度铁离子处理对黄芩叶绿素含量的影响

Fig.2 Effect of Fe^{2+} on chlorophyll content of *Scutellaria baicalensis* Georgi.

2.3 不同浓度铁离子处理对黄芩可溶性蛋白含量的影响

近年来的研究表明,铁直接参与了蛋白质的合成,缺铁时,植物体内蛋白质含量下降,硝酸盐、氨基酸和酞胺明显累积。由图 3 可知,M4 处理(Fe^{2+} 含量为 6.95 mg/kg)时,可溶性蛋白质含量最高,铁含量过低或过高都对黄芩的可溶性蛋白合成具有抑制作用。

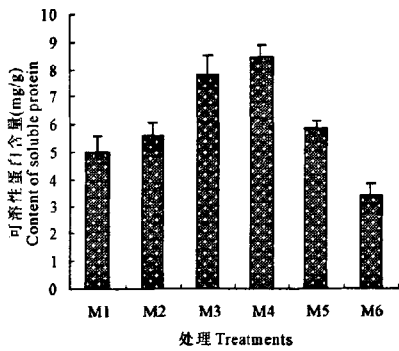


图 3 不同浓度铁离子对黄芩可溶性蛋白含量的影响
Fig.3 Effect of Fe^{2+} on soluble protein of *Scutellaria baicalensis* Georgi.

2.4 不同浓度铁离子处理对黄芩幼苗丙二醛(MDA)含量的影响

丙二醛(MAD)含量可以反映植物遭受逆境伤害的程度,在体外影响线粒体呼吸链复合物及线粒体内关键酶活性^[17]。由图 4 可知,M1~M4 丙二醛含量降低,M4~M6 随着铁离子浓度的逐渐升高,丙二醛含量也逐渐升高。经 M4 (Fe^{2+} 含量为 6.95 mg/kg)处理的丙二醛含量最低,这是由于该处理铁

含量促进黄芩细胞生长旺盛,叶绿素含量高,其氧化的能力较高。铁含量过高会导致细胞内氧自由基增多,因而丙二醛含量增加。

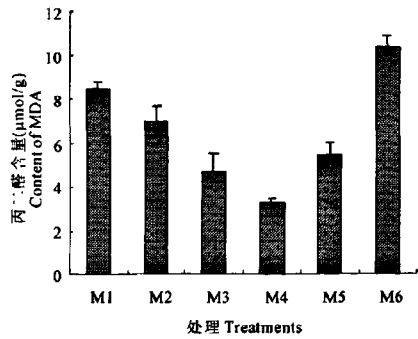


图 4 不同浓度铁离子对黄芩丙二醛含量的影响
Fig.4 Effect of Fe^{2+} on the content of MDA of *Scutellaria baicalensis* Georgi.

2.5 不同浓度铁离子处理对黄芩幼苗抗氧化酶活性的影响

超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)是植物细胞内重要的保护酶,各处理黄芩幼苗 SOD 和 POD 活性以 M4(Fe^{2+} 含量为 6.95 mg/kg)处理下最高(见表 1),表明此时细胞膜受伤害程度最低。但是铁离子浓度过高也会导致 SOD 和 POD 的合成减少,可能是由于铁离子含量过高,导致细胞渗透压过低,黄芩细胞合成 SOD 和 POD 能力下降。这与唐建军在水稻上的试验结果一致^[18]。而且适合的铁浓度有利于水稻植株的愈创木酚过氧化物酶、超氧化物歧化酶及硝酸还原酶等活性的增加,这些物质可抵御和消除逆境胁迫所产生的活性氧,阻抑膜脂过氧化,维持膜系统的稳定性^[19-20]。

表 1 不同浓度铁离子处理对黄芩超氧化物歧化酶(SOD)活性和过氧化物酶活性的影响
Table 1 Effect of Fe^{2+} on superoxide dismutase and peroxidase activity of *Scutellaria baicalensis* Georgi

酶 Enzymes	M1	M2	M3	M4	M5	M6	F 值
SOD(100 u/g)	5.33C	12.45B	15.70B	23.53A	12.17B	7.56C	824.77**
POD[A ₄₇₀ /(g·min)]	20.4D	39.1C	53.83B	70.43A	42.34C	18.91D	28648.47**

注:同列不同字母为差异极显著($P < 0.01$)。
Note: Values within a column with the same letter indicate significant difference($P < 0.01$).

3 结论与讨论

1) 不同处理间,随铁离子浓度的逐渐升高,各处理黄芩株高呈现出先逐渐升高后又降低的趋势,其中用 M4 处理的黄芩幼苗生长最佳,株高最高。

2) 各处理黄芩幼苗 SOD 活性、POD 活性以 M4 处理为最高,说明过高或高低的铁离子都会抑制其体内酶的活性或者蛋白质含量。这与前人的许多研究是一致的^[21]。而 M4 处理的黄芩幼苗丙二醛含量最低,表明 M4 处理的铁含量较适于黄芩生长,其物

质合成力较强,膜质过氧化程度最低。而经 M6 处理的黄芩幼苗丙二醛含量最高,是因为铁离子含量太高,导致细胞内渗透压过高。

3) 各处理黄芩幼苗可溶性蛋白质、叶绿素含量以 M4 处理为最高,当其浓度达到 M4(Fe^{2+} 含量为 6.95 mg/kg)时,黄芩生长最旺盛,可促进其生长。

参考文献:

- [1] Guo X, Wang X, Su W, et al. DNA barcodes for discriminating the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(8):1198-1203.
- [2] Ikemoto S, Sugimura K. Antitumor effects of *scutellariae radix* and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines[J]. *Urology*, 2000, 55(6):951-955.
- [3] Polier G, Ding J, Konkimalla BV, et al. Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apoptosis in cancer cells by transcriptional suppression of *Mcl-1* [J]. *Cell Death Dis*, 2011, 21(2):182.
- [4] Hu JZ, Bai L, Chen DG, et al. Computational investigation of the anti-HIV activity of Chinese medicinal formula Three-Huang Powder [J]. *Interdiscip Sci*, 2010, 2(2):151-156.
- [5] [日]西井奈绪美.黄芩苷元对大肠癌细胞 WiDr 增殖的抑制作用[J].国外医学中医中药分册,2004,26(3):185.
- [6] [日]小西真由子.黄芩中的千层纸黄素 A 对子宫颈癌细胞 HeLa S3 的作用[J].国外医学中医中药分册,2004,26(3):85.
- [7] 李利敏,吴良次,马国瑞.植物吸收铁机理及其相关基因研究进展[J].土壤通报,2010,41(4):994-999.
- [8] Kim SA, Gueriaot ML. Mining iron:iron uptake and transport in plants [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581:2273-2280.
- [9] 王育花,肖国樾.烟酰胺合成酶基因在植物铁胁迫应答反应中的功能[J].生命科学研究,2009,13(4):354-359.
- [10] 朱广廉,钟海文,张爱琴.植物生理学试验[M].北京:北京大学出版社,1990:51-54,245-252.
- [11] 张志良.植物生理学实验指导[M].第三版.北京:高等教育出版社,2006.
- [12] 李合生,陈翠莲,洪玉枝,等.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2006.
- [13] 马旭俊,朱大海.植物超氧化物歧化酶(SOD)的研究进展[J].遗传,2003,(2):225-231.
- [14] Petit JM, Briat JF, Lobreaux S. Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family [J]. *Biochem J*, 2001, 359:575-582.
- [15] 刘士平,郑录庆,田伟,等.高等植物中铁的代谢机制[J].植物生理学报,2011,47(10):967-975.
- [16] Alicia Sivitz, Claudia Grinvalds, Marie Barberon, et al. Proteasome mediated turnover of the transcriptional activator FIT is required for plant iron-deficiency responses [J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(6):1044-1052.
- [17] 刘洁芳,江世平,刘辉,等.香蕉发/淋巴引流术对 SOD、MDA 影响的床观察[J].中国美容医学,2007,(12):1721-1723.
- [18] 唐建军,王永锐,傅家瑞.属间远缘杂交水稻耐铁毒性研究[J].中山大学学报论丛,1996,(2):164-168.
- [19] 胡彬,吴平,廖春燕,等.水稻依赖抗坏血酸 H_2O_2 清除系统在抗铁中毒的作用[J].植物生理学报,1999,25(1):43-48.
- [20] 蔡妙珍,罗安成,林咸永,等. Ca^{2+} 对过量 Fe^{2+} 胁迫下水稻保护酶活性及膜脂过氧化的影响[J].作物学报,2003,29(3):447-451.
- [21] 安华明,樊卫国.铁胁迫对川梨的生理影响[J].中国农业科学,2003,(8):935-940.

Effects of Fe^{2+} on antioxidase activity and other physiological characteristics of *Scutellaria Baicalensis* Georgi

WU Xiao-ling¹, XU Zhan-ming²

(1. School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China;

2. Agricultural Service Center of Huinong District, Shizuishan, Ningxia 753002, China)

Abstract: Effects of Fe^{2+} on antioxidase activity and other physiological characteristics of *Scutellaria baicalensis* Georgi were studied. The results show that the plant height, chlorophyll content, superoxide dismutase and peroxidase activity and the soluble protein content of *Scutellaria baicalensis* Georgi under M4 treatment (the Fe^{2+} content is 6.95 mg/kg) are significantly higher than other's, while the content of MDA under M4 treatment (the Fe^{2+} content is 6.95 mg/kg) is the lowest. The results indicate that 6.95 mg/kg Fe^{2+} can enhance cellular activity and promote the growth of *Scutellaria baicalensis* Georgi, which will provide technical and theoretical support for cultivation of *Scutellaria baicalensis* Georgi.

Keywords: *Scutellaria baicalensis* Georgi; Fe^{2+} concentration; antioxidase activity; soluble protein content