

光果甘草毛状根培养过程中 对活性氧清除能力和总黄酮含量的变化

王裔惟, 丁家宜, 周倩耘, 谢毛成, 刘峻

(中国药科大学中药生物技术研究室, 江苏 南京 210038)

摘要 采用化学发光法, 分析了光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.) 毛状根培养过程中对 3 种活性氧 (ROS: O_2^- 、 $HO\cdot$ 和 H_2O_2) 清除能力的动态变化, 并测定了培养过程中总黄酮含量的动态变化。实验结果表明, 毛状根在对数生长期 (20~28 d) 对 3 种 ROS 都有很强的清除能力, 在生长停滞期 (29~40 d) 对 $HO\cdot$ 和 H_2O_2 的清除能力仍维持较高的水平, 而对 O_2^- 的清除能力随培养时间的延长逐渐下降。总黄酮含量在对数生长期呈现增加的趋势, 至 31 d 时达到最高含量 (0.78%), 随培养时间的延长含量逐渐降低。

关键词: 光果甘草毛状根; 活性氧; 化学发光法; 总黄酮含量

中图分类号: S567.7⁺1.099 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2004)02-0006-04

Researches on scavenging reactive oxygen species (ROS) and total flavonoid content in hairy root of *Glycyrrhiza glabra* during culture process WANG Yi-wei, DING Jia-yi, ZHOU Qian-yun, XIE Mao-cheng, LIU Jun (Research Department of Herb Biotechnology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, 13(2): 6-9

Abstract: Dynamic changes of scavenging reactive oxygen species (ROS: O_2^- , $HO\cdot$, H_2O_2) of hairy root of *Glycyrrhiza glabra* L. were studied during its culture process by chemluminescence, and total flavonoid content was also investigated. The results showed that hairy root of *G. glabra* had significant scavenging effects on ROS at the logarithmic multiplication phase (20-28 d), and the effect on O_2^- decreased but the effects on $HO\cdot$ and H_2O_2 sustained a high level after the logarithmic multiplication phase (29-40 d). The content of total flavonoids increased at the logarithmic multiplication phase. The maximum content of total flavonoids reached 0.78% on the 31th day, and then gradually decreased.

Key words: hairy root of *Glycyrrhiza glabra* L.; reactive oxygen species (ROS); chemluminescence; content of total flavonoids

甘草系豆科 (Leguminosae) 甘草属 (*Glycyrrhiza* Linn.) 植物乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、光果甘草 (*G. glabra* L.)、胀果甘草 (*G. inflata* Batal.) 或黄甘草 (*G. korshinskyi* Chang et Peng) 的干燥根和根茎, 是中国的传统中药, 具补脾益气、清热解毒、止咳化痰、缓急止痛、调和诸药之功效^[1]。

随着中药生物技术的不断发展, *Ri* 质粒介导产生的植物毛状根培养成为药用植物基因工程和细胞工程相结合的一项新技术, 甘草毛状根系统的研究与建立对进一步开发和利用甘草药用资源有重要意义。在需氧生物中, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及其具有 ROS 样活性的关联物质参与各种生命活动, ROS 产生和清除始终都与生物体的生长、

发育、成熟、衰老乃至死亡有着密切的关系^[2], 近年来中草药清除活性氧 (ROS) 的作用受到了注意和重视。在 20 世纪 90 年代郑学钦等通过对芦丁的研究, 证实了黄酮具有清除活性氧的作用^[3]。但尚未见甘草毛状根培养过程中对活性氧清除能力和总黄酮含量的变化及相互之间关系的报道, 因此本文分析了光果甘草毛状根培养过程中活性氧清除能力和总黄酮含量的动态变化, 并分析了光果甘草毛状根培养过程中总黄酮对 ROS 清除能力的影响, 这对甘草毛状根系统的研究与建立有重要意义。

收稿日期: 2003-10-09

作者简介: 王裔惟 (1980-), 女, 北京人, 硕士研究生, 主要研究方向为药物学, 现在悉尼大学学习。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

BPCL-G-2 微弱发光测量仪及 BPCL App 2.6 数据处理工作站(中国科学院生物物理研究所);UV-753 型分光光度计(上海第三分析仪器厂);721 分光光度计(山东高密分光仪器厂);邻苯三酚(遵义第二化学仪器厂,AR);鲁米诺(luminol, Sigma 公司);邻菲罗啉(上海试剂三厂,AR)。其他试剂均为分析纯。

1.2 实验材料

光果甘草毛状根由中国药科大学中药学院生物技术研究室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 培养方法 无菌条件下,选取悬浮培养液中生长旺盛且分支较多的光果甘草毛状根幼嫩部位。用无菌滤纸吸干表面水分后接种,接种量控制在每 100 mL 营养液接种 150~160 mg。液体悬浮培养,温度(24±1)℃,100~110 r·min⁻¹,暗培养,每处理 5 瓶,3 次重复,培养时间为 40 d。

1.3.2 毛状根动态生长周期的测定 光果甘草毛状根培养时间为 40d,定期测定光果甘草毛状根的生物量。以培养物的生长量为指标。生长量/g = 收获量/g - 接种量/g(均以鲜质量计算)。

1.3.3 对活性氧清除能力的测定

1.3.3.1 样品处理 取新鲜光果甘草毛状根 1 g,加液氮充分研磨后,加入 1 mL 预冷的 0.05 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 6.2)混匀,4℃ 4 000 r·min⁻¹离心 5 min。取上清液配制成 1.00、0.30 和 0.03 g·mL⁻¹(单位体积中含有的样品鲜质量)的样品溶液。

1.3.3.2 ROS 定量方法 生物化学发光法测定自由基(ROS)时,一定浓度范围内发光强度(CL)与自由基的数量呈线性关系,故可用 CL 表示自由基的产生量。清除自由基的物质可以降低 CL,根据 CL 下降可以判断物质清除自由基的能力。

$$\text{发光抑制率}/\% = \frac{(\text{对照 CL} - \text{样品 CL})}{\text{对照 CL}} \times 100\%$$

以发光抑制率为纵坐标,样品浓度为横坐标,绘制发光抑制率曲线。以发光抑制率为 50% 时的浓度 IC₅₀(g·mL⁻¹)来衡量样品对 ROS 的清除能力。IC₅₀ 值越小,表明样品清除 ROS 的能力越强。

用邻苯三酚-鲁米诺-碳酸缓冲液(pH 10.2)体系^[4,5]检测 O₂⁻;邻菲罗啉-Cu²⁺-抗坏血酸-H₂O₂体系^[6]检测 HO·;H₂O₂-鲁米诺-碳酸缓冲液(pH 9.5)体系^[7,8]检测 H₂O₂。

1.3.4 总黄酮含量测定

1.3.4.1 芦丁标准溶液的配制 称取芦丁标准品 5 mg,以 95% 乙醇溶解,并以 50% 乙醇稀释定容至 25 mL 备用。

1.3.4.2 芦丁标准曲线的绘制 精密吸取芦丁标准溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,各加入 50% 乙醇溶液使成 5.0 mL,加入 5% NaNO₂ 0.3 mL,摇匀后放置 6 min,加入 10% Al(NO₃)₃ 0.3 mL,摇匀后再放置 6 min,加入 20% NaOH 溶液 4 mL,然后分别用 50% 乙醇稀释至刻度。摇匀放置 15 min,于 510 nm 波长处测吸收度 A 值。以吸收度 A 值为纵坐标(Y),以芦丁标准溶液浓度(g·L⁻¹)为横坐标(X),绘制标准曲线,芦丁标准曲线为:Y = 7.368 6X + 0.019 6 (r = 0.997 6)。

1.3.4.3 精密测定 精密吸取芦丁标准液各 2.0 mL,重复 5 次,然后按照标准曲线绘制项下操作,记录 510 nm 波长处吸光度 A 值。芦丁平均吸收度为 0.332 4,精密度为 0.30%。

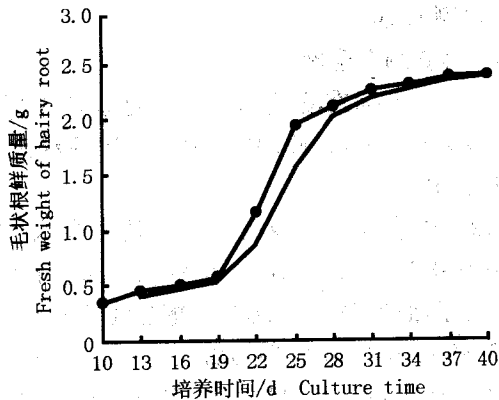
1.3.4.4 样品中总黄酮含量测定 取经过 24 h 于 -55℃ 冷冻干燥的光果甘草毛状根 150 mg,用 90% 乙醇浸泡过夜,索式提取 4 h,蒸干,浓缩至 2 mL。取该样品溶液 0.5 mL,置于 25 mL 容量瓶中,按照标准曲线绘制项下操作,记取吸收度值并根据标准曲线计算总黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 光果甘草毛状根生长曲线

光果甘草毛状根在 MS 液体培养基中的生长过程呈现出一般生物学的“S”型曲线生长规律(见图 1)。图 1 的结果表明,培养 10~19 d 是毛状根生长的延滞期,这一时期毛状根生长缓慢,这是因为光果甘草毛状根从母体上切下后转移到 MS 液体培养基中,需要有一段适应期才能迅速的生长。20~28 d 为对数生长期,这一时期毛状根生长呈直线上升的趋势,细胞分裂快速增加,生长迅速,代谢旺盛,是最佳的生长时期。在 28 d 后毛状根生长速度减缓,最后进入平台期,这一时期毛状根的生长量基本上不

再增加,颜色稍有变黄,出现生长停滞现象。通过对光果甘草毛状根生长曲线的测定,可以掌握其生长发育的情况及最佳收获期。



●—生长曲线 Growth curve; ———趋势线 Tendency curve

图1 光果甘草毛状根生长曲线

Fig. 1 Growth curve of hairy root of *Glycyrrhiza glabra* L.

2.2 光果甘草毛状根培养过程中对活性氧清除能力的动态变化

2.2.1 对 O_2^- 清除能力的动态变化 光果甘草毛状根培养过程中清除 O_2^- 能力的动态变化见图2。由图2可见,光果甘草毛状根培养过程中,在20~28 d的对数生长期,对 O_2^- 的清除能力最强,在28 d时 IC_{50} 达最高,为 $0.496 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。随着培养时间的延长,对 O_2^- 的清除能力呈现逐渐下降的趋势。

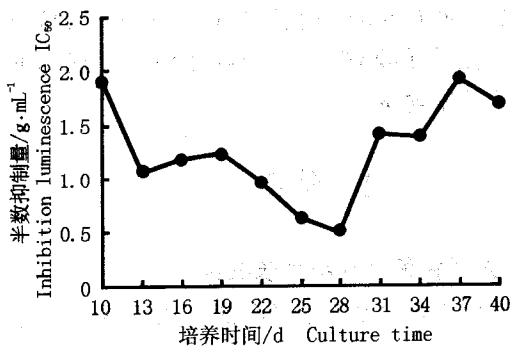


图2 光果甘草毛状根培养过程中清除 O_2^- 的动态变化

Fig. 2 Dynamic changes of scavenging O_2^- of hairy root of *Glycyrrhiza glabra* L. during culture process

2.2.2 对 $HO\cdot$ 清除能力的动态变化 光果甘草毛状根培养过程中清除 $HO\cdot$ 能力的动态变化见图3。结果表明,在光果甘草毛状根培养过程中,对 $HO\cdot$ 的清除能力随培养时间的延长逐渐增加,从19 d开始对 $HO\cdot$ 的清除能力快速增强,28 d后对 $HO\cdot$ 的清除

能力的增加幅度减小,但仍维持在最高水平,至40 d时 IC_{50} 达 $0.0375 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由图3可看出,光果甘草毛状根对 $HO\cdot$ 的清除能力的变化趋势与光果甘草毛状根的生长曲线基本一致。

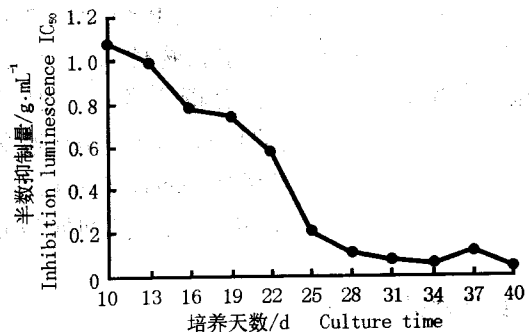


图3 光果甘草毛状根培养过程中清除 $HO\cdot$ 的动态变化
Fig. 3 Dynamic changes of scavenging $HO\cdot$ of hairy root of *Glycyrrhiza glabra* L. during culture process

2.2.3 对 H_2O_2 清除能力的动态变化 光果甘草毛状根培养过程中清除 H_2O_2 能力的动态变化见图4。结果表明,在光果甘草毛状根培养过程中,随培养时间的延长对 H_2O_2 的清除能力逐渐增加,10~16 d是快速增加的时期,25 d后对 H_2O_2 的清除能力增加幅度减缓,但仍维持在最高的水平,至37 d时 IC_{50} 达 $0.0158 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,说明在光果甘草毛状根生长的后期对 H_2O_2 仍有很强的清除能力。

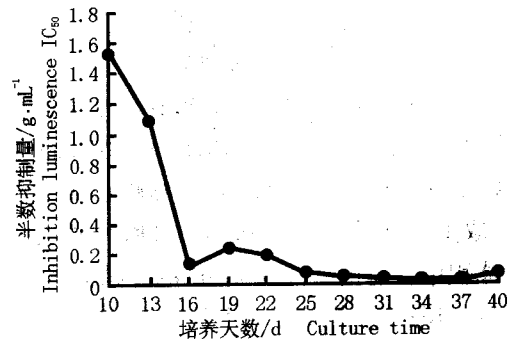


图4 光果甘草毛状根培养过程中清除 H_2O_2 的动态变化
Fig. 4 Dynamic changes of scavenging H_2O_2 of hairy root of *Glycyrrhiza glabra* L. during culture process

2.3 光果甘草毛状根总黄酮含量变化

光果甘草毛状根培养过程中总黄酮含量的动态变化见图5。结果表明,在毛状根培养初期总黄酮含量增加不明显,在20~28 d的对数生长期,毛状根的总黄酮含量明显增加,至31 d时,达到最高值0.78%,说明在光果甘草毛状根生长代谢旺盛期,总

黄酮的合成也处于较高的水平。在毛状根生长后期,即31 d后,总黄酮含量略呈下降趋势,但仍明显高于培养初期的总黄酮含量,至40d时含量达0.685%,推测可能是生长停滞期代谢水平降低,致使次生代谢产物的合成量也呈现降低的趋势。

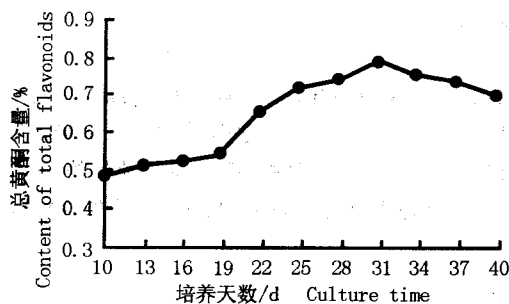


图5 光果甘草毛状根培养过程中总黄酮含量的动态变化
Fig. 5 Dynamic changes of content of total flavonoids in hairy root of *Glycyrrhiza glabra* L. during culture process

3 讨 论

实验结果表明,光果甘草毛状根总黄酮含量与其生长曲线的变化有相似的趋势,均呈“S”形曲线,说明在光果甘草毛状根培养初期由于细胞生长延滞,总黄酮的合成量较低;而在对数生长期,由于细胞生长代谢旺盛,总黄酮的合成也处于较高的水平,且积累量明显上升;进入毛状根生长的平台期后,细胞生长代谢速率减缓,生长量基本不增加,总黄酮的合成量也不再继续增加。

本实验分析了光果甘草毛状根培养过程中对3种重要的活性氧(O_2^- 、 $HO\cdot$ 、 H_2O_2)清除能力的动态变化,结果发现毛状根对数生长期对3种活性氧都有很强的清除能力,特别是对 O_2^- 自由基的清除能力明显高于适应期和平台期,当生长到第28天时清除作用最强,随培养时间的延长,对 O_2^- 的清除能力下降。而在29~40 d的平台期继续保持对 $HO\cdot$ 和 H_2O_2 的清除能力,可能是因为光果甘草毛状根在生

长后期总黄酮含量仍维持在较高水平。有研究表明^[9],光果甘草总黄酮对3种活性氧均具有较强的清除能力,而光果甘草毛状根对 $HO\cdot$ 和 H_2O_2 清除能力的动态变化与总黄酮含量的变化有相似的趋势,说明在对上述2种ROS的清除过程中,总黄酮可能起着重要的作用,因此,对光果甘草毛状根总黄酮的抗氧化作用还应进一步深入研究。

在培养过程中光果甘草毛状根对 O_2^- 和 $HO\cdot$ 及 H_2O_2 清除能力的变化动态不一致,尤其是在培养后期,对 O_2^- 清除能力明显下降,说明光果甘草毛状根对 O_2^- 的作用机理与 $HO\cdot$ 及 H_2O_2 不同。 O_2^- 是生物体内最早形成的自由基也是最主要的自由基,经化学歧化或经细胞内超氧化物歧化酶(SOD)等作用歧化并分解^[10]。甘草毛状根生长后期对 O_2^- 分解能力的降低,说明甘草毛状根中含有的SOD酶和过氧化酶等抗氧化大分子物质活性随组织衰老而下降,印证了光果甘草毛状根的生长和衰老过程。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2000年版(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2000. 65.
- [2] Hippeli S, Heiser I, Elstner E F. Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: new insights and analogies between animals and plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1999, 37(3): 167-170.
- [3] 郑学钦,胡春. 用化学发光法检测芦丁等物质清除超氧阴离子活性氧的作用[J]. *中国药理学杂志*, 1997, 32(3): 140-142.
- [4] 刘峻,丁家宜,黄山,等. 16种伞形科药用植物对超氧自由基的清除作用[J]. *植物资源与环境*, 1998, 7(4): 29-32.
- [5] 郭嵩光,王振镛. 邻苯三酚自氧化——化学发光法测定SOD活性[J]. *植物生理学通讯*, 1989(3): 54-57.
- [6] 范小兵,李慈娟,沙大年,等. 邻菲罗啉化学发光体系测定羟自由基的建立[J]. *基础医学与临床*, 1998, 18(6): 68-71.
- [7] 胡天喜,陈妃,陈克明,等. 荧光分析与医学[M]. 上海:华东师范大学出版社,1990. 48-55.
- [8] 刘峻,张婷,丁家宜. 生物发光筛选清除活性氧的天然药物[J]. *福州大学学报(自然版)*, 1999, 27(9): 48-49.
- [9] 谢毛成,丁家宜,李刚. 光果甘草与乌拉尔甘草清除活性氧能力的比较[J]. *植物资源与环境学报*, 2003, 12(1): 29-31.
- [10] 刘峻,丁家宜,周倩耘. 人参毛状根培养过程中对活性氧清除能力的比较[J]. *植物资源与环境学报*, 2002, 11(4): 22-24.