

人参毛状根培养过程中对活性氧清除能力的动态变化

刘峻, 丁家宜, 周倩耘

(中国药科大学中药学院生物技术研究室, 江苏南京 210038)

摘要: 采用化学发光法, 考察了人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)毛状根培养过程中对3种重要活性氧 ROS(O_2^- 、 $OH\cdot$ 、 H_2O_2)清除能力的动态变化, 发现在毛状根生长对数期时对3种 ROS 都有很强的清除能力, 而在生长停滞期较低, 符合人参毛状根生长的 S 型曲线, 印证了人参毛状根的生长和衰老过程。

关键词: 人参毛状根; 活性氧; 化学发光法

中图分类号: S567.5⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2002)04-0022-03

Dynamic change of scavenge reactive oxygen species (ROS) of hairy root of *Panax ginseng* during its culture process LIU Jun, DING Jia-yi, ZHOU Qian-yun (Department of Biotechnology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2002, 11(4): 22-24

Abstract: Dynamic changes of scavenging reactive oxygen species ROS (O_2^- 、 $OH\cdot$ 、 H_2O_2) in hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey (HRPG) were studied during its culture process by luminescence. The results showed that HRPG has significant scavenging effect on ROS at the logarithmic multiplication phase but the effect decreased after the logarithmic multiplication phase. The results coincide with growth 'S' curve of HRPG and show growth and aging process of HRPG.

Key words: hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey (HRPG); reactive oxygen species (ROS); luminescence

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)系五加科人参属植物, 是一种贵重药材。随着植物生物技术的发展, *Ri* 质粒介导产生的植物毛状根培养成为植物基因工程和细胞工程相结合的一项新技术, 人参毛状根系统的建立是对人参资源开发和利用的新形式^[1-3]。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^[4]。由于人参毛状根中含有的 SOD 酶和过氧化物酶等大分子物质以及其他小分子抗氧化物质(人参皂甙和人参黄酮等), 通过测定其清除 ROS 的能力, 不但可以了解人参毛状根培养过程中 ROS 的动态变化, 还可以了解人参毛状根中具有清除 ROS 作用的活性物质积累情况。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

SHG-C 生物化学发光测量仪(上海上立检测仪

器厂), 旋涡混合器(上海环宇仪器厂), 800 型离心沉淀器(上海手术器械厂), SHG-C 微机工作站, 其余试剂均为分析纯。

1.2 实验材料

人参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 方 法

1.3.1 人参毛状根培养方法 无菌条件下, 选取悬浮培养的人参毛状根中生长旺盛的幼嫩部位, 且分支较多的外植体。用无菌滤纸吸干表面水分后, 接种量控制在每 250 mL 营养液接种 100~110 mg。液体悬浮培养, $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$, 100~110 r/min, 暗培养, 每个处理各 5 瓶, 3 次重复, 培养时间为 30 d。

1.3.2 人参毛状根动态生长周期的测定 人参毛状根培养时间为 30 d, 定期测定人参毛状根的生物量。以培养物的增长倍数为指标。增长倍数 = (收获生物量 - 接种量) / 接种量 (所有生物量均以鲜质

收稿日期: 2002-06-13

作者简介: 刘峻(1971-), 男, 山东青州人, 博士研究生, 主要研究方向为中药生物技术。

量FW计算)

1.3.3 样品处理 取新鲜人参毛状根1g,加液氮充分研磨后,加入1mL预冷的0.05 mol/L的磷酸缓冲液(pH 6.2)混匀,4℃ 4 000 r/min离心5 min。取上清液配成1、0.3和0.03 g/mL(单位体积中含有的样品鲜质量)的样品溶液。

1.3.4 ROS定量方法 生物化学发光法测定ROS时,一定浓度范围内发光强度(CL)与ROS呈线性关系,故可用CL表示ROS的产生量。清除自由基的物质可以降低CL,根据CL下降程度可以判断物质清除ROS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,绘制发光抑制曲线。以发光抑制率为50%时的浓度 IC_{50} (g/mL)值来衡量样品对ROS的清除能力, IC_{50} 值越小,表明样品清除ROS的能力越强。

1.3.4.1 邻苯三酚-鲁米诺(pH10.2)体系检测 O_2^- ^[5,6] 邻苯三酚在碱性条件下(1×10^{-3} mol/L邻苯三酚,pH 10.2碳酸缓冲液)自氧化产生 O_2^- , O_2^- 与鲁米诺(1 mmol/L)反应使之氧化,产生一个电子激发态的中间物并发光,抑制能力以 IC_{50} 表示。

1.3.4.2 邻菲罗啉- Cu^{2+} -抗坏血酸- H_2O_2 体系检测 $OH\cdot$ ^[7] 测定原理以Fenton反应为基础,抗坏血酸还原 Cu^{2+} 为 Cu^+ , Cu^+ 还原 H_2O_2 形成羟自由基 $OH\cdot$, $OH\cdot$ 氧化邻菲罗啉,使其处于激发态并发光,抑制能力以 IC_{50} 表示。

1.3.4.3 H_2O_2 -鲁米诺(pH 9.5)体系检测 H_2O_2 ^[8,9] 碱性条件下(pH>9), H_2O_2 氧化鲁米诺,使鲁米诺产生内过氧化物,后者分解时部分能量以光子的形式释放,抑制能力以 IC_{50} 表示。

2 结果与分析

2.1 人参毛状根生长曲线

人参毛状根生长过程中呈现出一般生物学的“S”形曲线生长规律(见图1),可以看出10~15d是延滞期,从15d开始到25d为对数生长期,毛状根生长呈直线上升的趋势,这个阶段生长迅速,代谢旺盛进入生长对数期,是最佳的生长时期。在25d后毛状根生长速度又开始减缓,进入平台期,基本上不

再增加重量,毛状根的颜色明显变黄,出现生长停滞现象。通过对人参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。

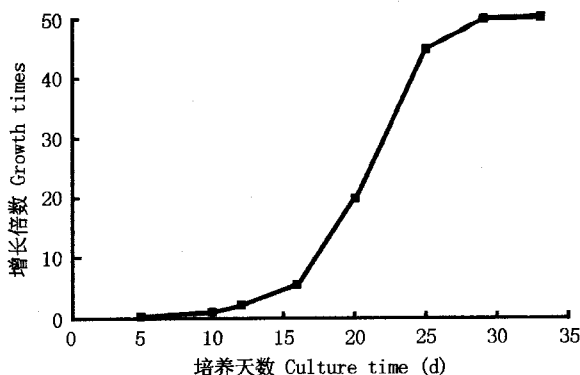


图1 人参毛状根生长曲线

Fig. 1 Growth curve of hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey

2.2 人参毛状根培养过程中清除 O_2^- 的动态变化

人参毛状根培养过程中清除 O_2^- 能力的动态变化见图1。由图1可见,在人参毛状根培养过程中15~20d的对数生长期对 O_2^- 的清除能力最强,在18d时 IC_{50} 达0.28 g/mL,随着培养时间的延长清除能力下降。

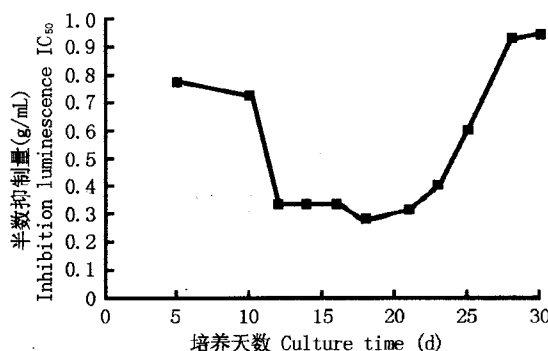


图2 人参毛状根培养过程中清除 O_2^- 的动态变化

Fig. 2 Dynamic change of scavenging O_2^- of hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey during its culture process

2.3 人参毛状根培养过程中清除 $OH\cdot$ 的动态变化

人参毛状根培养过程中清除 $OH\cdot$ 能力的动态变化见图2。由图2可看出,在人参毛状根培养过程中15~20d的对数生长期对 $OH\cdot$ 的清除能力最强,在16d时 IC_{50} 达0.22 g/mL,随着培养时间的延长清除能力下降。

2.4 人参毛状根培养过程中清除 H_2O_2 的动态变化

人参毛状根培养过程中清除 H_2O_2 能力的动态变化见图3。由图3可见,在人参毛状根培养过程

中 15~20 d 的对数生长期对 H_2O_2 的清除能力最强, 在 18 d IC_{50} 达 0.42 g/mL, 随着培养时间的延长清除能力下降。

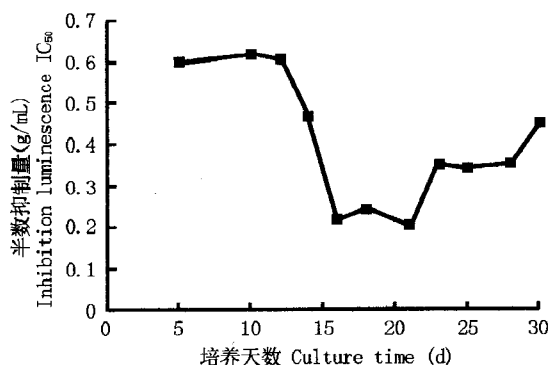


图 3 人参毛状根培养过程中清除 $OH\cdot$ 的动态变化
Fig. 3 Dynamic change of scavenging $OH\cdot$ of hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey during its culture process

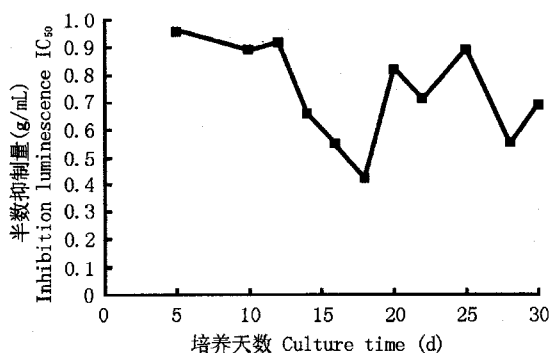


图 4 人参毛状根培养过程中清除 H_2O_2 的动态变化
Fig. 4 Dynamic change of scavenging H_2O_2 of hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey during its culture process

3 讨论

正常状态下, 生物体内的 ROS 产生和清除是处于平衡状态的。而当生物体衰老时, 组织内的活性氧水平升高, 表现为组织内酶 (SOD 和 CAT 等) 的活性随组织衰老而下降。而 $O_2\cdot$ 、 $OH\cdot$ 和 H_2O_2 等 ROS 随衰老伴有明显的氧毒性; ROS 与酶的巯基或色氨酸残基反应, 导致酶失活; ROS 会破坏核酸结构, 攻击

核酸碱基导致细胞的凋亡或妨碍蛋白质的合成。 $O_2\cdot$ 是体内最早形成的自由基也是最主要的自由基, 经化学歧化或经组织细胞内超氧化歧化酶 (SOD) 歧化形成 H_2O_2 , 当 $O_2\cdot$ 在 Fe^{3+} 存在下, 经 Fenton 型 Haber-Weiss 反应产生 $OH\cdot$, 而 $OH\cdot$ 和 H_2O_2 则是导致体内脂质氧化的主要活性氧。本文考察了人参毛状根培养过程中对这 3 种重要 ROS ($O_2\cdot$ 、 $OH\cdot$ 和 H_2O_2) 清除能力的动态变化, 发现在毛状根生长的对数期对 3 种 ROS 都有很强的清除能力, 反映了这一时期毛状根处于生长和代谢的旺盛时期。随着培养时间的延长, 人参毛状根对 3 种 ROS 的清除能力明显降低, 反映了毛状根在衰老过程中清除 ROS 的能力衰减和体内 ROS 的增加。人参毛状根生长过程中对 3 种 ROS 的清除能力都是在对数生长期最高而在生长停滞期较低, 其结果符合人参毛状根生长的 S 型曲线, 印证了人参毛状根的生长和衰老过程。通过人参毛状根对 ROS 清除作用的研究, 可部分了解人参毛状根的生长及生理特性。

参考文献:

- [1] 何玉科, 巩振辉. 高等植物在发根农杆菌介导下的遗传转化[J]. 细胞生物学杂志, 1993, 13(3): 97-100.
- [2] 王关林. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 237.
- [3] 刘峻, 丁家宜, 徐红, 等. *Ri* 质粒人参转化系统的建立及鉴定[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(2): 95-98.
- [4] 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.
- [5] 刘峻, 黄山, 丁家宜, 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.
- [6] 郭嵩光, 王振铨. 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 刘峻, 张婷, 丁家宜. 生物化学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.