



# 土壤缺水对黄芩过氧化氢清除系统相关酶基因表达的影响

伍肿<sup>1,2</sup>, 秦双双<sup>1,2</sup>, 袁媛<sup>1\*</sup>, 陈平<sup>2</sup>, 林淑芳<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 武汉工业学院, 湖北 武汉 430023)

**[摘要]** 目的:分析土壤缺水对黄芩 *SOD*, *APX*, *DHAR*, *MDHAR* 基因表达的影响。方法:利用受控实验对黄芩进行土壤缺水胁迫;利用半定量 RT-PCR 对基因转录水平进行分析。结果:与对照组相比,胁迫 70 d 后, *APX* 基因转录水平显著降低;胁迫 30, 50 d 后, *DHAR* 基因转录水平显著降低;胁迫 50 d 后, *MDHAR1* 基因有显著降低。结论:在土壤缺水的条件下,维生素 C (AsA) 作为一种重要的抗氧化剂在过氧化氢清除系统中可能发挥主要作用,其与黄芩素积累可能处于竞争的关系。

**[关键词]** 土壤水分;黄芩;抗坏血酸氧化酶;脱氢抗坏血酸还原酶

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 为唇形科黄芩属植物,黄酮类化合物是黄芩体内重要的有效成分,主要包括黄芩苷、黄芩素等。生态学研究结果表明,水分是影响黄芩活性成分的主要因素之一<sup>[1]</sup>,秦双双<sup>[2]</sup>也报道在土壤缺水的条件下,黄芩根组织中黄芩素含量会显著上升。黄芩素在植物体内作为抗氧化剂参与过氧化氢的清除,帅凌飞等<sup>[3]</sup>报道黄芩悬浮细胞在 PEG 模拟水分胁迫的条件下,黄芩素在过氧化物酶(POD)的作用下清除过氧化氢,以维持细胞中过氧化氢含量在稳定水平以避免氧化伤害。

然而,植物体内过氧化清除系统存在着多条途径,包括酶促抗氧化系统和非酶促抗氧化系统。高等植物拥有一套高效而专一的抗氧化酶促系统,包括 POD、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶(GPX)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)等。而非酶促抗氧化体系包括维生素 E,维生素 C (AsA), $\beta$ -胡萝卜素,还原型谷胱甘肽,类黄酮,黄酮醇,生物碱,

多元醇等<sup>[4]</sup>。本实验室前期实验结果也证实黄芩活性成分含量变化可能对 POD 以及其他抗氧化酶活性产生影响<sup>[3]</sup>。

本文拟通过分析土壤缺水对黄芩 *SOD*, *APX*, *DHAR*, *MDHAR* 基因表达的影响,旨在筛选可能与活性成分积累有关的抗氧化酶基因,为进一步研究黄芩活性成分积累的环境影响机制提供了物质和理论基础。

## 1 材料

采用室内人工气候箱栽培的方法,将收集于甘肃陇西的黄芩种子撒播于花盆(800 cm<sup>3</sup>)混合土中,土壤烘干后质量为 500 g、泥炭-岩沙(2:1),设置 6 根日光灯(光照强度 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ),光周期设置为光照 16 h/黑暗 8 h,温度控制在 25  $^{\circ}\text{C}$ ,湿度为 60%左右。在栽培 3 个月后,从 30 盆盆栽黄芩中筛选大小基本一致的 18 盆,随机分成 2 组,每组 9 盆(3 个重复),每盆黄芩植株为 10 株。每日 14:00 采用称重法控制土壤含水量水分胁迫组(土壤含水量为 12%)、对照组(土壤含水量为 16%)。分别在处理后的 30, 50, 70 d 的上午 9:00 统一取样,每盆混合取黄芩全根,将样品保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

## 2 方法

### 2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

用 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取根总 RNA,利用紫外分光光度仪测定总 RNA 的  $A_{260\text{nm}}$  和  $A_{280}$ 。选择  $A_{260/280}$  为 1.8~2.0 的总 RNA 进行反转录,反转录反应

**[稿件编号]** 20110722001

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-005-03);北京市科技新星项目(2008B82);中国博士后科学基金特别资助项目(201003228)

**[通信作者]** \*袁媛, E-mail: yuanyuan0732@gmail.com



按 cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书进行。

**2.2 半定量 RT-PCR** 取上述反转录产物 1 μL, 分别加入各基因正向引物 0.5 μL (10 mmol · L<sup>-1</sup>), 反向引物 0.5 μL (10 mmol · L<sup>-1</sup>), 引物序列见表 1。dNTP 1 μL, 10 × buffer 2.5 μL, ExTaq 酶 0.5 μL, 灭菌 H<sub>2</sub>O 19 μL。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 充分延伸 10 min。通过扩增 18S rRNA 基因片段, 调整 cDNA 加入量使各样本的模板浓度一致。采用上述体系扩增相关功能基因的表达情况, 以 18S rRNA 基因片段为内标, 在目标 PCR 产物长度位置出现条带为相关酶基因有表达。以凝胶成像仪上扫描的各目标基因与 18S rRNA 的光吸收比值差异来表示目标基因在不同处理和取样时间的表达量。

表 1 基因序列引物

Table 1 Sequences of primers used in this study

基因名称	引物序列	退火温度 / °C
SOD1 (HQ395746)	5'-AGTCTCCCTTTTCGTTC-3' 5'-ACCGTTCTGGGTTTGTG-3'	55
SOD2 (HQ395747)	5'-GGTGACCTGGGAAACATAG-3' 5'-AAAGAGGAGCAACCTTAGAG-3'	55
DHAR (HQ395748)	5'-ATTGATCGCGCTCTTCCC-3' 5'-CTGCGATAACATACTCTTCTGC-3'	46
MDHAR1 (HQ395749)	5'-TGTTTCTGATGGTCGTGT-3' 5'-GCAGTTAGCAGGATTTA-3'	40
MDHAR2 (HQ395750)	5'-TGTTGGATACATAGGTCTG-3' 5'-TCGCATAATAGCCTTCAT-3'	40
APX (HQ395752)	5'-TACGCCAAGAGGATAGCA-3' 5'-GGTAAATCGTCTGGGAAG-3'	40
18S (FJ527609)	5'-CGTTGACTACGTCCTGCCCTT-3' 5'-GTTCACTACGGAAACCTTGTTA CGAC-3'	60

### 3 结果与分析

与对照组相比, 30, 70 d 后, 胁迫组 SOD1 及 SOD2 基因转录水平差异均不显著, 见表 2。与对照组相比, 处理 30, 50 d 后, 胁迫组 APX 基因转录水平差异不显著; 70 d 时, 胁迫组 APX 基因转录水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。处理 30, 50 d 后, 胁迫组 DHAR 基因转录水平显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 但处理 70 d 后基因转录水平差异不显著。在 30, 50, 70 d 时, 处理组的 MDHAR2 基因的转录水平与对照组相

比均不显著。50 d 后 MDHAR1 基因转录水平显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 30, 70 d 时与对照组相比不显著。

表 2 土壤缺水对黄芩过氧化氢清除系统相关基因转录水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of water deficit on gene expression of enzymes related with hydrogen peroxide detoxification system in *Scutellaria baicalensis*

基因	处理时间 /d	基因转录水平 (18S)	
		胁迫组	对照组
SOD1	30	5.49 ± 1.24	3.52 ± 0.76
	50	0 ± 0	1.58 ± 1.53
	70	1.04 ± 0.97	4.12 ± 3.59
SOD2	30	17.8 ± 8.46	14.89 ± 1.04
	50	5.36 ± 4.02	8.23 ± 2.59
	70	6.94 ± 1.47	3.1 ± 2.08
DHAR	30	3.53 ± 1.74 <sup>1)</sup>	11.4 ± 2.45
	50	5.65 ± 2.27 <sup>1)</sup>	18.87 ± 4.1
	70	5.7 ± 2.32	10.54 ± 3.82
MDHAR1	30	3.44 ± 2.51	2.17 ± 0.63
	50	1.98 ± 0.17 <sup>1)</sup>	3.07 ± 0.66
	70	1.34 ± 0.37	4.23 ± 2.24
MDHAR2	30	11.81 ± 7.25	7.66 ± 3.14
	50	6.33 ± 0.3	8.49 ± 1.4
	70	4.44 ± 1.43	11.47 ± 4.18
APX	30	2.33 ± 1.54	1.54 ± 0.75
	50	0.72 ± 0.62	1.12 ± 1.09
	70	0.72 ± 0.32 <sup>1)</sup>	2.44 ± 0.91

注: <sup>1)</sup> 处理组与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 4 讨论

**4.1 土壤水分胁迫对黄芩 APX 和 DHAR 基因转录水平的影响** APX 和 DHAR 在植物体清除活性氧、抵御外界氧化胁迫的重要循环系统 AsA-GSH 循环中发挥重要作用, 它对于保护叶绿体和其他细胞组分免受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及其所产生的羟基自由基的破坏有很重要的意义。在 AsA-GSH 循环中 APX 和 DHAR 等协同控制着 AsA 代谢。当植物体内的活性氧积累时, APX 能催化 AsA 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应而使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 被分解。DHAR 以谷胱甘肽为底物, 催化脱氢抗坏血酸还原为 AsA<sup>[5]</sup>。但叶片抗坏血酸和谷胱甘肽合成及循环代谢对不同水平干旱胁迫的响应, 随胁迫时间的延长而不同<sup>[6]</sup>。本文研究表明, 在土壤缺水胁迫 30, 50 d 后, 黄芩根组织中 DHAR 基因转录水平显著降低, 而胁迫 70 d 后 APX 基因转录水平显著降低, 二



者表现出一定的负相关趋势,说明其在循环利用AsA、保护细胞组分抵御氧化损伤中发挥重要的作用。

**4.2 过氧化氢清除系统相关酶基因表达与黄芩活性成分积累的相关性** 黄芩的活性成分黄芩素是一种抗氧化剂,其在POD作用下参与清除过氧化氢已通过体外实验被证实<sup>[7]</sup>。在土壤缺水的条件下,胁迫30,50 d后黄芩素的含量显著提高<sup>[2]</sup>,而POD活性变化不显著。黄芩素含量的变化趋势与本研究中APX基因转录水平变化趋势具有一致性。暗示黄芩素和AsA过氧化氢清除系统中处于竞争关系,在土壤缺水胁迫下,AsA作为一种重要的抗氧化剂在过氧化氢清除系统中发挥了主要作用,使得黄芩素参与清除过氧化氢的过程受到抑制,黄芩素含量显著上升。

[参考文献]

[1] Yuan Y, Hao J D, Yang B, et al. Climate change affected the

best producing area of Chinese herbal medicine *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. J Trad Med(Russia), 2010, 3s: 241.  
[2] 秦双双,陈顺钦,黄璐琦,等.水分胁迫对黄芩内源激素与有效成分相关性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):99.  
[3] 帅凌飞,袁媛,陈平,等.黄芩体内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除系统和黄酮类活性成分积累的相关性研究[J].中国中药杂志,2011,36(13):1707.  
[4] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7(9): 405.  
[5] 靳月华,陶大立,郝占庆,等.环境胁迫和抗坏血酸的氧化还原状态(英文)[J]. Acta Bot Sin, 2003(7): 795.  
[6] 单长卷,韩蕊莲,梁宗锁.黄土高原冰草叶片抗坏血酸和谷胱甘肽合成及循环代谢对于旱胁迫的生理响应[J].植物生态学报,2011(6):653.  
[7] Morimoto S, Tateishi N, Matsuda T, et al. Novel hydrogen peroxide metabolism in suspension cells of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. J Biol Chem, 1998, 273(20): 12606.

## Effect of water deficit on gene expression of enzymes related with hydrogen peroxide detoxification system in *Scutellaria baicalensis*

WU Chong<sup>1,2</sup>, QIN Shuangshuang<sup>1,2</sup>, YUAN Yuan<sup>1\*</sup>, CHEN Ping<sup>2</sup>, LIN Shuifang<sup>2</sup>

(1. Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To analysis the effects of water deficit on the transcript level of *SOD*, *APX*, *DHAR* and *MDHAR* genes in *Scutellaria baicalensis*. **Method:** Three-month-old *S. baicalensis* was in glasshouse under water deficit stress, and the transcript level of *SOD*, *APX*, *DHAR* and *MDHAR* genes were analysis utilized semi-quantitative RT-PCR. **Result:** Compared with the control group, a significant decline of the transcriptional level of *APX* gene was observed at 70 days after water deficit. The transcript level of *DHAR* gene was reduced at 30 and 50 days after water deficit. And *MDHAR1* gene was significant declined at 50 days. **Conclusion:** AsA which is an important antioxidant plays a major role in hydrogen peroxide clear system under water deficit, and maybe have an antagonistic effect to the accumulation of baicalein.

[Key words] soil water; *Scutellaria baicalensis*; APX; DHAR

doi:10.4268/cjcm20120213

[责任编辑 吕冬梅]