

卷柏复苏过程中抗氧化系统响应机制及海藻糖含量变化

李红芳¹, 谷巍^{2,*}, 席彩彩², 孙红梅², 刘青芝²

¹江苏联合职业技术学院连云港中医药分院, 江苏连云港222007; ²南京中医药大学药学院, 南京210023

摘要: 本文模拟卷柏复苏过程, 检测在不同脱水和复水时间条件下卷柏超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性、丙二醛(MDA)含量、膜透性及海藻糖含量, 研究卷柏复苏过程中抗氧化系统响应机制及海藻糖变化规律, 并探讨其复苏机理。研究结果表明: 卷柏在含水量极低的情况下, 通过复苏作用可基本恢复至初始状态; SOD、CAT和POD活性, MDA含量以及细胞膜透性均随着脱水时间的延长而上升, 随着复水时间的延长而下降; 海藻糖含量亦随着脱水时间的延长而增加, 随着复水时间的延长而减少。卷柏抗氧化系统在复苏过程中启动其保护酶防御机制抵抗水分胁迫, 而海藻糖在卷柏保护生物分子过程中发挥着重要作用。

关键词: 卷柏; 复苏; 抗氧化系统; 海藻糖

卷柏[*Selaginella tamariscina* (Beauv.) spring], 多年生草本, 为蕨类卷柏科(Selaginellaceae)卷柏属(*Selaginella*)植物, 具有破血散瘀、活血止血的功能, 现代药理研究表明卷柏具有防癌治癌、抗炎、抗病毒、镇痛、降血压、降血糖和增强人体免疫功能等作用, 被广泛应用于临床实践(Banks等2011; Zheng等2013; Li等2014)。卷柏亦是典型极端耐旱的复苏植物, 干旱时植株向内卷成一团, 颜色枯黄, 但它能在相当长时间里保持生命, 一旦遇水, 便会植株伸展, 返绿, 因此民间常称其为“九死还魂草”(Gu等2013; Zheng等2011)。水资源匮乏已成为药用植物栽培的制约因素, 卷柏因其独特的生活习性成为抗旱研究中不可多得的种质资源, 目前对卷柏的研究主要集中在化学成分和药理活性等方面, 而对卷柏复苏机理的研究稀见报道。

研究干旱胁迫下植物体内抗氧化酶类活性是揭示植物体在长期进化过程中所演化出适应干旱机制和策略的重要途径(潘昕等2014)。当植物处于逆境条件下(如干旱), 活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生和清除动态平衡遭到破坏, 其体内抗氧化系统负责对活性氧的抵御和清除, 保护植物细胞免受伤害(刘承等2015)。海藻糖是植物适应环境胁迫的应激代谢产物, 协助植物细胞内组分抵御外界不良环境, 广泛存在于耐旱植物中(Williams等2015)。本文模拟卷柏复苏过程, 检测在不同脱水和复水时间条件下卷柏超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、膜透性及海藻糖含量, 研究卷柏复苏过程中抗氧化系统响应

机制及海藻糖变化规律, 为揭示其复苏机理提供科学依据。

材料与方法

1 试验材料

卷柏于2015年10月采自江苏省连云港柳河自然保护区, 经南京中医药大学中药资源教研室谷巍教授鉴定为卷柏科植物卷柏*Selaginella tamariscina* (Beauv.) spring。自然状态下盆栽土培, 正常供水。本文实验方案和取材时间参考Yobi等(2012)的实验方案进行, 实验时取大小相似, 长势相同的卷柏植株, 浸没在蒸馏水中, 恒重后将植株置于干燥托盘中, 并在温度25°C, 相对湿度37%的人工气候室中进行复苏处理。在脱水前(t0)、脱水[1 h (t1)、4 h (t4)、6 h (t6)、12 h (t12)]、复水[4 h (f4)、8 h (f8)、12 h (f12)、48 h (f48)]三个阶段不同时间分别取样, 进行相关指标的测定。

2 生理指标测定方法

叶片相对含水量(relative water content, RWC)测定采用饱和含水量法(张丹等2016); SOD活性测定采用氮蓝四唑光还原法; CAT含量测定采用紫外分光光度法; POD活性测定采用愈创木酚法; MDA含量测定采用硫代巴比妥酸显色法; 细胞膜相对透性测定采用电导法(孙昊等2013), 以上测定均重复5次。

收稿 2016-09-09 修定 2016-10-27

资助 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心(ZDXM-HT-1-5)、国家自然科学基金(81102772)和江苏省高校优势学科建设(ysxk-2014)。

* 通讯作者(E-mail: guwei9926@126.com)。

3 海藻糖含量测定

3.1 仪器与色谱条件

仪器: Agilent 1100液相色谱仪、Alltech 500 蒸发光散射检测器、WDL-95液相色谱工作站、Prevail™ Carbohydrate ES糖色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm)。

色谱条件为流动相乙腈:水(65:35), 流速0.8 mL·min⁻¹, 柱温25.0°C, 等度洗脱。ELSD参数: 漂移管温度80.0°C, 载气为氮气, 流速4.0 L·min⁻¹, 增益10, 进样量20 μL。

3.2 样品溶液的制备

对照品: 精密称取海藻糖对照品50.0 mg, 加乙腈水溶液(乙腈:水=60:40)定容至10 mL, 配制成5 mg·mL⁻¹的储备液。

供试品: 将卷柏样品粉碎, 精确称取卷柏粉末5.0 g, 加入50 mL蒸馏水, 100°C水浴条件下加热1 h。收集提取液, 于8 000 r·min⁻¹条件下离心10 min, 取上清液。将上清液转移到50 mL的容量瓶中, 用无水乙醇定容, 静置24 h。取上清液10 000 r·min⁻¹条件下离心10 min, 精密量取1 mL, 用0.22 μm水系微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

实验结果

1 复苏过程对卷柏相对含水量(RWC)的影响

RWC的变化是反映植物抗旱能力的重要指标之一(徐颖等2016)。温度25°C, 相对湿度37%条件下, 卷柏的相对含水量在脱水12 h后达到4.24%, 而复水24 h相对含水量基本与脱水前的相对含水量持平, 达到99.89% (图1)。卷柏在含水量极低的情况下, 通过复苏作用可基本恢复至初始状态。

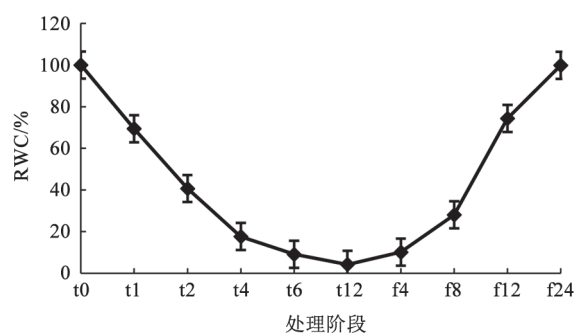


图1 卷柏复苏过程中相对含水量的变化

Fig.1 The change of RWC in the resurrection process of *S. tamariscina* (Beauv.) spring

2 复苏过程对卷柏SOD活性的影响

SOD、CAT、POD是植物体清除逆境胁迫产生的ROS的保护酶, SOD作为植物体清除ROS的第一道防线, 可催化超氧阴离子发生歧化反应生成H₂O₂和O₂, 处于ROS清除反应的核心地位, 是评价植物抗逆性的重要指标(董亮等2013)。复苏过程中, 卷柏SOD的活性随脱水时间的增长而逐渐上升, 在脱水12 h达到最大值; 随着复水时间的延长而逐渐下降, 逐渐恢复其活性至脱水前水平(图2)。

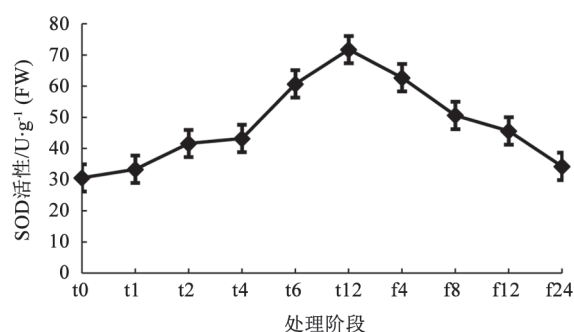


图2 卷柏复苏过程中SOD活性的变化

Fig.2 The change of SOD activity in the resurrection process of *S. tamariscina* (Beauv.) spring

3 复苏过程对卷柏CAT活性的影响

CAT是一种包含血红素的四聚体酶, 它可将H₂O₂迅速分解为H₂O和O₂, 与SOD协同作用清除O₂⁻和H₂O₂ (荣智媛等2012)。由图3可知: 复苏过程中, 卷柏中CAT的活性随脱水时间的增长而逐渐上升, 在脱水12 h后达到最大值; 随着复水时间的延长而逐渐下降, 复水24 h后活性和脱水前基本持平。

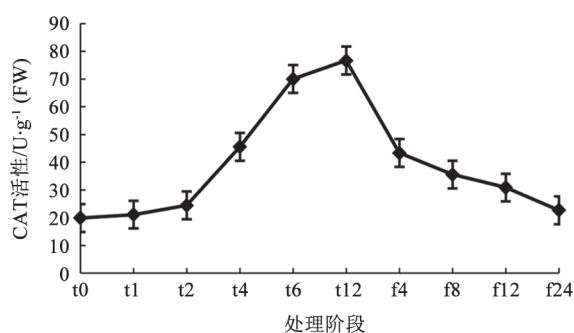


图3 卷柏复苏过程中CAT活性的变化

Fig.3 The change of CAT activity in the resurrection process of *S. tamariscina* (Beauv.) spring

4 复苏过程对卷柏POD活性的影响

POD与SOD、CAT相互协调配合,催化过氧化物分解(张丹等2016)。由图4可知:复苏过程中,卷柏POD的活性随着脱水时间的增长而逐渐上升,在脱水12 h时达到最高值;随着复水时间的延长而逐渐下降,在复水24 h后,变化趋势与SOD、CAT一致,亦逐渐恢复到初始状态。

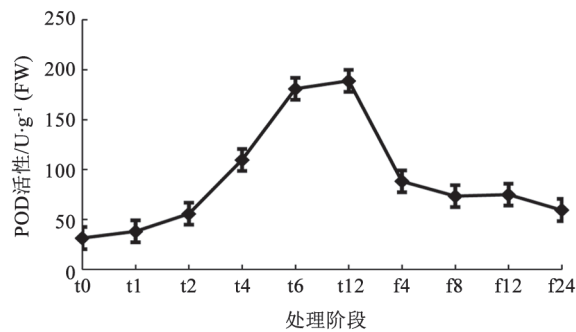


图4 卷柏复苏过程中POD活性的变化

Fig.4 The change of POD activity in the resurrection process of *S. tamariscina* (Beauv.) spring

5 复苏过程对卷柏MDA含量的影响

MDA在过氧化物自由基从另外的不饱和脂肪酸夺取氢引发的链式过氧化反应过程中产生,是膜脂过氧化最主要的产物之一。通过MDA含量变化可了解膜脂过氧化程度,衡量膜系统受损程度以及植物的抗逆性(苏昊等2013)。由图5可知:复苏过程中,卷柏MDA的含量随脱水时间的增长而逐渐上升,在脱水12 h后达到最大值;随着复水的进行MDA的含量逐渐下降,在复水24 h后,MDA的含量水平与脱水前基本持平。

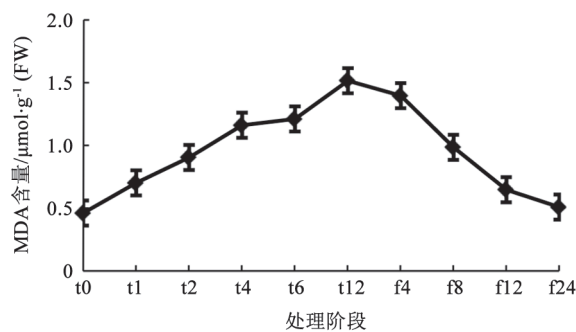


图5 卷柏复苏过程中MDA的含量变化

Fig.5 The change of MDA in the resurrection process of *S. tamariscina* (Beauv.) spring

6 复苏过程对卷柏细胞膜透性的影响

膜脂过氧化的最终产物MDA,可与质膜内的氨基酸、蛋白质、不饱和脂肪酸等生物大分子发生反应,损伤膜结构,改变膜透性(孙继亮等2012)。卷柏细胞膜相对透性随脱水时间的增长而逐渐上升,在脱水12 h后达到最大值;随着复水时间的延长细胞膜透性逐渐下降,在复水24 h后基本达到初始水平(图6)。

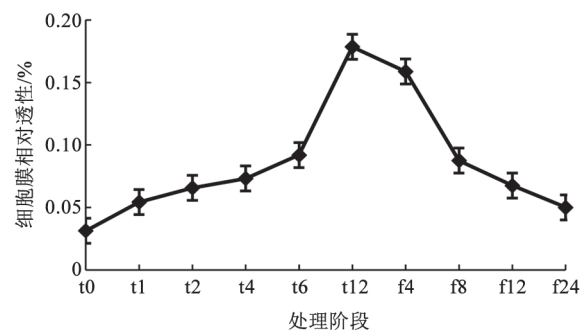


图6 卷柏复苏过程中细胞膜相对透性的变化

Fig.6 The change of cell membrane permeability in the resurrection process of *S. tamariscina* (Beauv.) spring

7 卷柏复苏过程中海藻糖含量的测定

海藻糖是一种非还原性糖,由于其不具有自由醛基,也不与氨基酸在非酶催化的糖基化反应中发生反应,是糖类物质中性质最为稳定的双糖,具有较强的束缚水的能力(张建波等2015; Weng等2016)。本文采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD)检测卷柏复苏过程中的海藻糖含量变化,由图7可知:随着脱水时间的延长卷柏中海藻糖的相对含量逐渐增加,脱水12 h时达到最高,随着复水时间的延长而减少,复水8 h后基本达到脱水前水平并保持在这个水平。

讨论

卷柏是典型复苏耐旱植物,本文相对含水量测定结果表明,卷柏在含水量极低的情况下,依然可以复苏存活。我国水资源匮乏,干旱缺水是影响植物生长发育和农业生产的重要因素,如今干旱半干旱区域不断扩散,筛选耐旱性强的品种,揭示其抗旱机理,开发其潜在应用价值已成为当前研

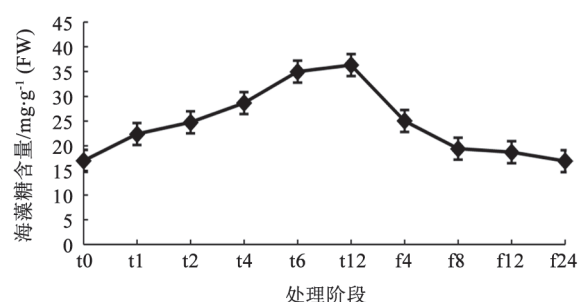


图7 卷柏复苏过程中海藻糖含量的变化

Fig.7 The change of trehalose in the resurrection process of *S. tamariscina* (Beauv.) spring

究的重要课题, 卷柏因其独特的复苏生活习性在抗旱机制研究中具有重要理论价值和实践意义。

卷柏复苏过程中MDA和膜透性随着脱水时间的延长而上升, MDA含量越高, 膜脂过氧化程度越严重, 膜透性增加, 体内细胞受到的破坏越严重。SOD、POD、CAT是植物体内主要的抗氧化酶, 能够有效地清除ROS, 保护植物细胞膜免受逆境损伤。复苏过程中卷柏SOD、POD、CAT均随着脱水时间的延长而逐渐上升, 随着复水时间的延长而逐渐下降, 并逐渐恢复到初始水平, 说明卷柏抗氧化系统在复苏过程中启动其保护酶防御机制抵抗水分胁迫, 以降低细胞膜的膜脂过氧化程度, 而随着复水过程的进行, 卷柏植物体内的抗氧化酶活性逐渐恢复到脱水前水平, MDA的含量及细胞膜透性也逐渐恢复至正常。

本文复苏过程中海藻糖的相对含量变化说明其在卷柏复苏过程中发挥着重要的作用。关于海藻糖的生物保护机制, 前人提出了“水替代”、“玻璃态”和“优先排阻”三种假说: 在缺水条件下, 海藻糖可以取代水与生物分子相互作用来维持蛋白的正常结构及脂质双分子层的流动性; 亦可通过取代水、浓缩生物分子周围的水, 以一种玻璃化剂的形式在缺水或冰冻条件下维持生物分子的生物学结构和功能; 其优先与蛋白质表面的水分子结合, 使蛋白质的溶剂化层半径减小, 分子结构更稳定, 有利于抵御干旱等逆境环境的影响(Olsson等2016; Siri等2016)。我们推测卷柏海藻糖有很强的抗脱水作用, 可以在卷柏复苏过程中保护生物膜以及蛋白质免受伤害。本文研究结果为揭示卷柏复苏机制及抗旱机制提供科学依据, 为其综合开发利用奠定基础。

参考文献

- Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M, Bowman JL, Gribskov M, dePamphilis C, Albert VA, Aono N, Aoyama T, Ambrose BA, et al (2011). The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science*, 332: 960–963
- Dong L, He YZ, Wang YL, Dong ZY (2013). Research progression application of superoxide dismutase (SOD). *J Agric Sci Technol*, 15 (5): 53–58 (in Chinese with English abstract) [董亮, 何永志, 王运亮, 董志扬(2013). 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展. *中国农业科技导报*, 15 (5): 53–58]
- Gu W, Song JY, Cao Y, Sun QW, Yao H, Wu QN, Chao JG, Zhou JJ, Xue WD, Duan JA (2013). Application of the ITS2 region for barcoding medicinal plants of Selaginellaceae in Pteridophyta. *PLoS One*, 8 (6): e67818
- Li J, Lei X, Chen KL (2014). Comparison of cytotoxic activities of extracts from *Selaginella* species. *Pharmacogn Mag*, 10 (40): 529–535
- Liu C, Li ZT, Yang KJ, Xu JY, Wang YF, Zhao CJ, Zhang YF, Li Z, Sun SH, Fu SJ, et al (2015). Effects of water stress and subsequent rehydration on physiological characteristics of maize (*Zea mays*) with different drought tolerance. *Plant Physiol J*, 51 (5): 702–708 (in Chinese with English abstract) [刘承, 李佐同, 杨克军, 徐晶宇, 王玉凤, 赵长江, 张翼飞, 李竹, 孙少慧, 富士江, 等 (2015). 水分胁迫及复水对不同耐旱性玉米生理特性的影响. *植物生理学报*, 51 (5): 702–708]
- Olsson C, Jansson H, Swenson J (2016). The role of trehalose for the stabilization of proteins. *J Phys Chem B*, 120: 4723–4731
- Pan X, Qiu Q, Li JY, Wang JH, He Q, Su Y, Ma JW, Du K (2014). Physiological indexes of six plant species from the tibetan plateau under drought stress. *Acta Ecol Sin*, 34 (13): 3558–3567 (in Chinese with English abstract) [潘昕, 邱权, 李吉跃, 王军辉, 何茜, 苏艳, 马建伟, 杜坤(2014). 干旱胁迫对青藏高原6种植物生理指标的影响. *生态学报*, 34 (13): 3558–3567]
- Rong ZY, Zhang XH, Yang SL, Xu ZL, Li JY, Huang GB, Zhao J, Gong M (2012). Involvement of antioxidant defense system in enhancement of drought resistance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants through circular drought hardening. *Plant Physiol J*, 48 (7): 705–713 (in Chinese with English abstract) [荣智媛, 张晓海, 杨双龙, 徐照丽, 李军营, 黄国宾, 赵静, 龚明 (2012). 抗氧化系统参与循环干旱锻炼提高烟草植株抗旱性的形成. *植物生理学报*, 48 (7): 705–713]
- Siri M, Grasselli M, Alonso SV (2016). Albumin-based nanoparticle trehalose lyophilisation stress-down to preserve structure/function and enhanced binding. *J Pharmaceut Biomed*, 126: 66–74
- Sun H, Wang Q, Guan Y, Liu BD (2013). Effects of *Microlepis strigose* under drought stress on physiological change laws. *Plant Sci J*, 31 (6): 576–582 (in Chinese with English abstract) [孙昊, 王茜, 关昉, 刘保东(2013). 粗毛鳞盖蕨干旱胁迫下生理变化规律的研究. *植物科学学报*, 31 (6): 576–582]
- Sun JL, Li LL, Tao ST, Zhang SL (2012). Effects of drought stress and rewatering on physiological characteristics of pear seedling. *Chin J Appl Environ Biol*, 18 (2): 218–223 (in Chinese with En-

- glish abstract) [孙继亮, 李六林, 陶书田, 张绍玲(2012). 干旱胁迫和复水对梨幼树生理特性的影响. 应用与环境生物学报, 18 (2): 218–223]
- Weng LD, Ziaei S, Elliott GD (2016). Effects of water on structure and dynamics of trehalose glasses at low water contents and its relationship to preservation outcomes. *Sci Rep*, 6: 28795
- Williams B, Njaci I, Moghaddam L, Long H, Dickman MB, Zhang X, Mundree S (2015). Trehalose accumulation triggers autophagy during plant desiccation. *PLoS Genet*, 11 (12): e1005705
- Xu Y, Zhang RX, Cao H, Ning LF, Zhou CR, Lü TW, Yang HQ (2016). Effect of drought and rehydration on photosynthetic transpiration and water use efficiency of crabapple. *Plant Physiol J*, 52 (4): 514–524 (in Chinese with English abstract) [徐颖, 张瑞雪, 曹辉, 宁留芳, 周春然, 吕婷雯, 杨洪强(2016). 干旱复水对海棠叶片光合蒸腾及水分利用效率的影响. 植物生理学报, 52 (4): 514–524]
- Yobi A, Wone BWM, Xu WX, Alexander DC, Guo L, Ryals JA, Oliver MJ, Cushman JC (2012). Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of *Selaginella* reveals insights into the resurrection trait. *Plant J*, 72: 983–999
- Zhang D, Ren J, Wang HM (2016). Response of photosynthetic characteristics and antioxidant system in needles and bark chlorenchyma of Korean pine to drought stress and rehydration. *Chin J Ecol*, 35 (10): 2606–2614 (in Chinese with English abstract) [张丹, 任洁, 王慧梅(2016). 干旱胁迫及复水对红松针叶和树皮绿色组织光合特性及抗氧化系统的影响. 生态学杂志, 35 (10): 2606–2614]
- Zhang JB, Wang SS, Hao DH, Yang HQ, Ma WG, Gao X, Cui MK, Gong M (2015). Comparison of metabolic differences of trehalose in *Nicotiana tabacum* seedlings under drought and chilling stress. *Biotechnol Bull*, 31 (10): 111–118 (in Chinese with English abstract) [张建波, 王莎莎, 郝大海, 杨慧芹, 马文广, 高雪, 崔明昆, 龚明(2015). 干旱和低温胁迫影响烟草幼苗海藻糖代谢的差异比较. 生物技术通报, 31 (10): 111–118]
- Zheng XK, Li YJ, Zhang L, Feng WS, Zhang X (2011). Antihyperglycemic activity of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *J Ethnopharmacol*, 133: 531–537
- Zheng XK, Wang WW, Zhang L, Su CF, Wu YY, Ke YY, Hou QW, Liu ZY, Gao AS, Feng WS (2013). Antihyperlipidaemic and antioxidant effect of the total flavonoids in *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in diabetic mice. *J Pharm Pharmacol*, 65 (5): 757–766

Antioxidative system responses mechanism and content of trehalose in the resurrection process of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) spring

LI Hong-Fang¹, GU Wei^{2*}, XI Cai-Cai², SUN Hong-Mei², LIU Qing-Zhi²

¹Lianyungang TCM Branch of Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang, Jiangsu 222007, China; ²College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: To study the antioxidative system responses mechanism and the change pattern of trehalose content during the resurrection process of *Selaginella tamariscina* (Beauv.), we measured the enzyme activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD), the content of malondialdehyde (MDA) and trehalose, and the membrane permeability during the different dehydration and recovery water time. The results showed *S. tamariscina* (Beauv.) spring can be recovered to the initial state in the case of low water content through the resurrection process. The enzyme activity of SOD, CAT and POD, the content of MDA and the cell membrane permeability were all increased associated with the extension of dehydration time, and declined associated with the extension of recovery water time. The change pattern of trehalose content was similar as the antioxidant enzymes and membrane system during this process. The antioxidative system launched its protective enzyme defense mechanism to resist water stress in the resurrection process of *S. tamariscina* (Beauv.) spring. Trehalose play an important role in the protection of resurrection process of *S. tamariscina* (Beauv.) spring.

Key words: *Selaginella tamariscina* (Beauv.) spring; resurrection; antioxidative system; trehalose

Received 2016-09-09 Accepted 2016-10-27

This work was supported by Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization (Grant No. ZDXM-HT-1-5), National Natural Science Foundation of China (Grant No. 81102772), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (Grant No. ysxk-2014).

*Corresponding author (E-mail: guwei9926@126.com).