

# 亚硒酸钠诱导枸杞幼苗 GSH Px 生物合成机制研究

董卫华, 王聪睿, 付云 (新乡医学院生物化学与分子生物学教研室, 河南新乡 453003)

**摘要** [目的] 对  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  诱导枸杞幼苗 GSH Px 生物合成作初步的探讨。[方法] 采用水培试验, 以不同浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 、AMD 和 CHM 处理枸杞幼苗, 观察不同试验条件下 GSH Px 活性变化。[结果] 低浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  能够促进 GSH Px 的合成, 提高 GSH Px 活性。转录抑制剂 AMD 和翻译抑制剂 CHM 都能够抑制 GSH Px 的合成, 两者同时使用, 抑制作用高于使用单一抑制剂。处理 48 h 其活性还高于对照, 说明  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  能够通过其他途径来促进 GSH Px 合成。[结论]  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  不仅能够在转录水平和翻译水平诱导 GSH Px 合成, 而且能够通过其他的补救途径促进生物合成。

**关键词** 枸杞幼苗; GSH Px;  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; 合成机理

中图分类号 S567.1<sup>+</sup>9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)13-05975-02

## Study on the Mechanism of $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ -induced GSH Px Biosynthesis of *Lycium barbarum* Seedlings

DONG Wei-hua et al (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003)

**Abstract** [Objective] The research aimed to study the mechanism of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ -induced GSH Px biosynthesis of *Lycium barbarum* seedlings preliminarily. [Methods] The activity of GSH Px was determined with different concentration of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , AMD and CHM by water culture. [Results] Low concentration of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  can promote the biosynthesis of GSH Px and increase the activity of GSH Px. Transcription inhibitor AMD and translation inhibitor CHM can decrease the biosynthesis of GSH Px. If the seedlings were treated with AMD and CHM together, inhibitory function is higher than only using one inhibitor. The activity of GSH Px is higher than control group after treated 48 h with AMD and CHM. It is showed that  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  can induce GSH Px biosynthesis by other pathway. [Conclusion]  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  can induce the biosynthesis of GSH Px not only in transcription and translation level, but also by other pathway.

**Key words** *Lycium barbarum* seedlings; GSH Px;  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; Mechanism of biosynthesis

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH Px)是 Mills 等首次从牛红细胞中发现的, 1973 年 Rotruck 等证实了 GSH Px 是含硒酶<sup>[1]</sup>。GSH Px 的主要生物学功能是清除脂质过氧化物并在过氧化氢酶含量较少或产生  $\text{H}_2\text{O}_2$  较少的组织中, 代替过氧化氢酶清除  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。GSH Px 作为哺乳动物体内普遍存在的抗氧化酶, 20 世纪六、七十年代起就得到了广泛的研究。植物 GSH Px 研究起步较晚, 现已从多种植物体内检测到 GSH Px 的存在<sup>[2-4]</sup>。课题组前期研究表明, 外源硒的摄入能够提高枸杞 GSH Px 的活性<sup>[5]</sup>, 诱导枸杞体内 GSH Px 的合成。但是外源硒诱导植物体内 GSH Px 合成机制的研究未见报道。该研究旨在以  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  作为硒源诱导枸杞幼苗 GSH Px 的合成, 探讨其诱导合成的机制, 为后续的研究打下基础。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 选取出芽一致的优质枸杞幼苗, 采用水培试验。置于培养皿中, 用 Hbagland 完全培养液培养。培养 3 d 后进行各项处理。

**1.2 试剂** 5,5-二硫代对硝基苯甲酸, 美国 Huka 公司生产, 分析纯; 放线菌素 D(AMD) 和环己亚胺(CHM) 为美国 Sigma 公司生产, 分析纯; 其他试剂均为分析纯, 上海化学试剂厂生产。

**1.3 试验方法** 选取生长一致的幼苗, 用 Hbagland 培养液培养 3 d, 第 4 天分别根施处理, 分为: 对照, Hbagland 培养液; 含不同浓度  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  的 Hbagland 培养液; 含不同浓度 AMD 或 CHM 的 Hbagland 培养液; 含处理浓度  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  和 AMD 的 Hbagland 培养液; 含处理浓度  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  和 CHM 的 Hbagland 培养液; 含处理浓度  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  和 AMD 以及 CHM 的 Hbagland 培养液。每个处理 4 次重复, 每天更换 1 次培养液。

**1.4 测定方法** GSH Px 活性的测定: 采用 5,5-二硫代对硝基苯甲酸(DTNB)显色法<sup>[6]</sup>。分别称取枸杞幼苗 0.5 g, 加入 9 mmol/L 的三氯乙酸 3 ml 研磨至匀浆, 16 000 r/min 离心 20 min, 取上清液 0.4 ml, 分别注入酶管和非酶管中, 并将非酶管加热失活, 再取 1 支试管加入蒸馏水 0.4 ml 和 2 mmol/L 的偏磷酸沉淀液 1.6 ml 作为空白管, 并在这 3 支试管中分别加入 0.32 mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.5 ml 和 DTNB 0.5 ml, 反应 3 min, 用 752 分光光度计于波长 422 nm 比色测定。

## 2 结果与分析

**2.1 不同浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  对 GSH Px 活性的影响** 枸杞幼苗以 Hbagland 培养液培养 3 d, 第 4 天向 Hbagland 培养液中分别加入 0.0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 ng/L 的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 处理 72 h 测定枸杞叶片中 GSH Px 活性。结果在  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度 0~4.0 ng/L, GSH Px 活性分别为 (1.973 ± 0.108)、(2.201 ± 0.115)、(2.349 ± 0.110)、(2.468 ± 0.117)、(2.216 ± 0.109)、(1.825 ± 0.113) μmol/(g·min)。结果显示, 随着  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度的增加, GSH Px 活性也随之增加, 浓度达到 1.0 ng/L 时, GSH Px 活性达到最大, 继续增加  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度, GSH Px 活性下降。故选用 1.0 ng/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  为处理浓度。

## 2.2 AMD 和 CHM 对 GSH Px 活性的影响

**2.2.1 AMD 和 CHM 处理浓度的选取。** 将已用 Hbagland 培养液培养 3 d 的幼苗加入不同浓度的 AMD 和 CHM, 72 h 后测定 GSH Px 活性, 结果见表 1。随着 AMD 浓度的增加, GSH Px 活性逐渐降低。1.00~3.00 μg/L 时, GSH Px 活性下降幅度较大, 3.00 μg/L 后 GSH Px 活性下降幅度较小, 故该研究选取 3.00 μg/L 为 AMD 的处理浓度。GSH Px 活性随着 CHM 浓度的增加逐渐降低, 0.75 μg/L 后 GSH Px 活性下降较少, 故该研究选取 0.75 μg/L 为 CHM 的处理浓度。

**2.2.2 处理浓度的 AMD 和 CHM 对  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  诱导枸杞幼苗合成的影响。** 将已用 Hbagland 培养液培养 3 d 的幼苗分别做以下处理: 对照, 继续用 Hbagland 培养液培养; Hbagland 培

基金项目 河南省医学科技攻关计划项目(200804050)。

作者简介 董卫华(1975-), 女, 河南新乡人, 硕士, 讲师, 从事微量元素和中药品质方面的研究。

收稿日期 2009-02-16

养液里加入1.0 ng/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; Hbagand 培养液里加入1.0 ng/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  和3.00  $\mu\text{g/L}$  AMD; Hbagand 培养液里加入1.0 ng/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  和0.75  $\mu\text{g/L}$  CHM; Hbagand 培养液里加入1.0 ng/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  3.00  $\mu\text{g/L}$  AMD 和0.75  $\mu\text{g/L}$  CHM。处理后逐日测定 GSH Px 活性,结果如图1 所示。

表1 不同浓度的 AMD 和 CHM 对 GSH Px 活性的影响

Table 1 Effect of different concentrations of AMD and CHM on the activity of GSH Px

AMD 浓度 $\mu\text{g/L}$ AMD concentration	GSH Px 活性 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ GSH Px activity	CHM 浓度 $\mu\text{g/L}$ CHM concentration	GSH Px 活性 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ GSH Px activity
0	1.976 $\pm$ 0.103	0	1.976 $\pm$ 0.103
1.00	1.891 $\pm$ 0.109	0.25	1.880 $\pm$ 0.118
2.00	1.814 $\pm$ 0.114	0.50	1.802 $\pm$ 0.107
3.00	1.737 $\pm$ 0.105	0.75	1.719 $\pm$ 0.111
4.00	1.711 $\pm$ 0.103	1.00	1.703 $\pm$ 0.104
5.00	1.690 $\pm$ 0.110	1.50	1.684 $\pm$ 0.106

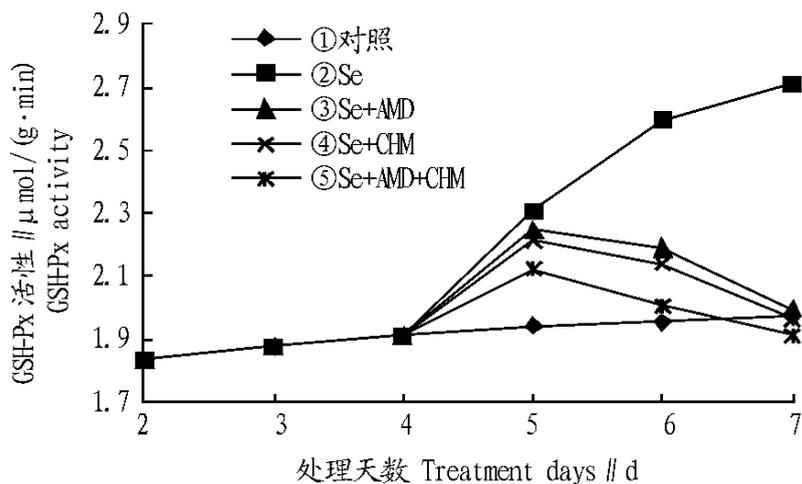


图1 AMD 和 CHM 对  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  诱导枸杞幼苗合成的影响

Fig.1 Effects of AMD and CHM on  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  induced biosynthesis of Lycium barbarum seedlings

从图1 可看出,1.0 ng/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  处理后,枸杞幼苗 GSH Px 活性逐日提高,明显高于对照(曲线 )。加入 AMD 后, GSH Px 活性先升高后降低,72 h 后接近对照的水平。加入 CHM 后, GSH Px 活性先升高后降低,72 h 后略低于对照。加入抑制剂后,与单独施  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  比较 GSH Px 活性降低,说明 AMD 和 CHM 都能够抑制 GSH Px 的合成。曲线表现出的 GSH Px 活性先提高后降低,可能是因为刚加入抑制剂,其作用时间较短,还没有充分发挥作用。48 h 后酶活性便逐渐降低,直至与对照接近或低于对照(曲线 、 )。同时加入 AMD 和 CHM,24 h 内活性升高,之后活性降低,48 h 略高于对照,72 h 明显低于对照。翻译抑制剂和转录抑制剂同时使用,抑制作用明显高于使用一种抑制剂(曲线 )。说明抑制剂既能从转录水平上抑制 GSH Px 的合成,也能从翻译水平抑制 GSH Px 的合成。处理 48 h 其活性还高于对照,说明虽然抑制剂能够抑制 GSH Px 的从头合成,但是植株还是能够

通过其他途径来弥补 GSH Px 合成的不足。

### 3 结论与讨论

硒是生物体内重要的抗氧化物质,可以降低或消除脂质过氧化物所产生的自由基对膜的攻击,使脂膜不致发生过氧化作用而得到保护<sup>[7]</sup>。硒作为 GSH Px 的主要成分,能够提高花生、水稻、番茄等生物体内 GSH Px 的活性<sup>[2-4]</sup>。该试验结果显示,低浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  可以促进幼苗 GSH Px 合成,1.0 ng/L 时活性达到最大;继续提高浓度, GSH Px 活性下降;浓度提高至 4.0 ng/L 时, GSH Px 活性低于无  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  的对照组。说明  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  兼具营养和毒性两方面的作用,低浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  能够促进植株 GSH Px 的合成,高浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  对植株有一定的毒害作用。这与 Acostar 等的研究结果一致<sup>[8]</sup>。

该试验在研究  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  诱导枸杞幼苗合成的机理时,使用了转录抑制剂 AMD 和翻译抑制剂 CHM。AMD 是转录的专一抑制剂,能嵌入 DNA 模板,破坏其模板作用。CHM 是蛋白质合成抑制剂,作用于真核细胞 80S 核蛋白体,抑制蛋白质合成过程中转位酶的活性。试验结果表明,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  可能从 2 个方面诱导枸杞幼苗 GSH Px 合成:一是  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  能够从翻译水平和转录水平诱导 GSH Px 合成,即诱导 GSH Px 的从头合成。二是  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  能够从其他的补救途径促进 GSH Px 的生物合成。由图1 可以看出,单独使用 AMD 或 CHM 以及两者共同作用对  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  诱导 GSH Px 合成的抑制效果相似,说明  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  参与了 GSH Px 的从头合成。该试验所采用的 2 种抑制剂均作用于多肽链形成之前,说明外源 Se 可能是通过硒代半胱氨酸(Se-Cys) 的形式直接掺入到多肽链中的,而不是在翻译后通过修饰加入的。这就印证了关于 Se-Cys 为第 21 种氨基酸的理论,即作为终止密码的 UGA 编码的硒代半胱氨酸<sup>[9]</sup>。其他的机理有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] ROTRUCKJT, POPE AL, CANTHER HE, et al. Biochemical role as a component of glutathione peroxidase[J]. Science, 1973, 179: 588 - 590.
- [2] 吴秀峰, 陈平. 硒对水稻幼苗生长和生理特性的影响[J]. 农业与技术, 2004, 24(5): 76 - 79.
- [3] 翟红强, 赵会杰. 硒对花生抗氧化作用的初步研究[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(1): 58 - 62.
- [4] 李彦, 罗盛国, 刘元英, 等. 硒对番茄叶片中谷胱甘肽过氧化物酶活性及产量品质的影响[J]. 山东农业科学, 1999, 17(6): 323 - 326.
- [5] 董卫华, 赵长安, 咎玉玺. 微量元素硒对宁夏枸杞抗氧化系统的影响[J]. 新乡医学院学报, 2007, 24(4): 355 - 357.
- [6] 董卫华, 赵春澎, 谷兆侠, 等. 宁夏枸杞谷胱甘肽过氧化物酶的测定法[J]. 新乡医学院学报, 2006, 23(1): 31 - 32.
- [7] 杨晓慧, 蒋卫杰, 魏琨, 等. 盐胁迫下硒对生菜生长发育的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 271 - 274.
- [8] ACCOSTAR MV, TABATABAI MA. Aylaniiridase activity in soil: Effect of trace elements and relationships to soil properties and activities of aridohydro-lases[J]. Soil Biol Biochem, 2001, 33: 17 - 23.
- [9] JOHN F, RAYMOND F, GESIELAND A. The twenty-first amino acid[J]. Nature, 2000, 407: 464 - 465.