

蜜环菌激发子诱导猪苓细胞产生活性氧及其相关酶的变化*

夏洪燕 郭顺星**

(中国医学科学院 中国协和医科大学 药用植物研究所 北京 100094)

摘要: 研究了蜜环菌激发子处理猪苓细胞后活性氧产生及相关酶的变化。结果表明: 蜜环菌激发子分别处理猪苓菌丝和菌核后, 都能引起活性氧迸发, 且出现两个迸发高峰, 高峰期分别在加入激发子后约 10min 和 90min。与此同时, 猪苓菌丝酶活性也发生相应变化, 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 活性下降, 过氧化氢酶 (CAT) 活性没有变化, 而苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性出现先下降后上升的趋势。

关键词: 猪苓, 蜜环菌, 激发子, 活性氧

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 03-0022-05

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39570012)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39570012)

** 通讯联系人

收稿日期: 2000-01-10, 修回日期: 2000-04-15

PRODUCTION OF ACTIVE OXYGEN SPECIES AND CHANGES OF ENZYMES IN *GRIFOLA UMBELLATA* INDUCED BY *ARMILLARIA MELLEAE* ELICITOR

XIA Hong-Yan GUO Shun-Xing

(*Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical
Science & Peking Union Medical College, Beijing 100094*)

Abstract: The changes of active oxygen species and some enzymes in *Grifola umbellata* induced by *Armillaria melleae* elicitor were studied. The results showed that active oxygen species appeared in both mycelia and sclerotia of *G. umbellata* after treated with *A. melleae*. There were two phases of active oxygen production upon addition of *A. melleae* elicitor. Phase I occurred at 10 minute after addition of *A. melleae* elicitor. Phase II occurred about 90 minute. The changes of some enzyme activity were also studied in this paper. Compared with control, the *A. melleae* elicitor could reduce the activity of superoxide dismutase and peroxidase. The catalase activity changed only little. The phenylalanine ammonia lyase activity declined in the early stages and then increased in the late stages.

Key words: *Grifola umbellata*, *Armillaria melleae*, Elicitor, Active oxygen species

猪苓 (*Grifola umbellata*) 菌核为常用中药, 具有利水渗湿、抗肿瘤、提高机体免疫能力等功效。近年来, 许多学者对其有效成分及其临床应用进行了研究^[1,2], 但对猪苓本身的生理特性研究较少。一般认为猪苓不能制造养料, 也不寄生于活树根部或腐生于枯朽树杆上, 而是依靠蜜环菌 (*Armillaria melleae* Fr. kerst) 侵染提供营养。据文献报道^[3], 蜜环菌侵染后, 可引起猪苓菌核防御结构改变, 如木质素及厚壁细胞生成、晶体的出现; 并产生类似植物的过敏反应, 如质壁分离、局部坏死等, 但关于其相互作用的生理及分子机制研究较少。植物受病原侵染时迸发的活性氧 (H_2O_2 , O_2^- , OH) 对引起植物过敏反应、促进细胞凋亡、直接杀死病原菌、引起富含羟脯氨酸糖蛋白的氧化交联、加固细胞壁及增强植物的防御能力等起着重要的作用。由于猪苓菌核受蜜环菌侵染后产生类似植物的防御结构, 但猪苓菌核生长慢, 试验材料难以获得, 而猪苓菌丝具有生长快, 易操作等优点, 故本文在验证菌丝代替菌核可行性的基础上选用猪苓菌丝为供试材料, 研究其在蜜环菌激发子处理后, 是否伴随着活性氧的释放及有关酶的变化。这将对深入研究猪苓与蜜环菌的共生机理有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 供试材料来源

猪苓 (*Grifola umbellata*) 菌株由本所药用真菌研究室提供; 菌核由本室栽培。

1.2 蜜环菌激发子制备

将干燥的蜜环菌 (*Armillaria melleae*) 菌索, 用蒸馏水于 70℃ 水浴锅浸提 1h, 超声波处理 10min, 再浸提 2h, 尼龙纱布过滤后再用滤纸重新过滤, 滤液浓缩至一定体积, 1×10^5 Pa 灭菌 20min, 置于冰箱中保存备用。

1.3 猪苓菌丝培养

将猪苓菌种转接到麦麸固体培养基, 活化两周后再转接入麦麸液体培养基培养, 25℃、120r/min 振荡培养 21d。麦麸固体培养基组成: 麦麸 50g/L, 葡萄糖 20g/L, $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 3g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g/L, 琼脂 12g/L。麦麸液体培养基组成: 麦麸

30g/L, 葡萄糖 20g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g/L, 淀粉 10g/L。

1.4 激发子诱导试验

将培养 21d 的猪苓菌丝细胞用试验介质洗涤 3 遍, 试验介质组成: 2% 蔗糖, 1mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25mmol/L KNO_3 , 5mmol/L 2- [N-吗啡] 乙磺酸, 用 NaOH 调 pH 至 7.0。将洗涤后的菌丝细胞按 0.5g/mL 转至相同介质中, 25℃、120r/min 振荡培养 1.5h 后加入蜜环菌激发子, 终浓度相当于 10.8mg/mL 菌索。在加入激发子不同时间后测定活性氧及 SOD、CAT、POD、PAL 活性。

1.5 猪苓菌丝的活性氧测定

用 luminol 化学发光法测定活性氧。仪器为 FH463A—自动定标器, 参照 Glazener^[4] 配制 luminol 母液, 此母液可于冰箱中保存 7d, 使用前稀释至 70 $\mu\text{mol/L}$ 。反应体系组成: 1.5mL 猪苓悬浮液, 200 μL 激发子 (对照加相同体积蒸馏水), 400 μL 20mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (须当天配制, 终浓度 1.4mmol/L), 260 μL luminol (终浓度 64 $\mu\text{mol/L}$)。所有试剂在使用之前应在黑暗中放置至少 2h, 并将 pH 调至 7.0, luminol 在测量时加入。

1.6 猪苓菌核中活性氧的测定

将猪苓菌核切成长 1cm, 宽 0.5cm, 厚 2mm 的薄片, 在蜜环菌提取液中 (对照用蒸馏水) 浸泡 5min 后取出, 不同时间取样测量。用蒸馏水冲洗菌核附着的提取液, 以滤纸擦干, 放入 0.1% NBT (氮兰四唑) 反应液中浸泡 30min, 取出猪苓薄片。反应液于 85℃ 加热 15min, 冷却后测 550nm 的吸光值 (A_{550})。

1.7 猪苓菌丝的酶活测定

SOD、POD、CAT 的活性测定参照 Auh 等^[5] 所用方法; PAL 测定参照张志良^[6] 所用方法。

各种酶的活力单位的定义 (均指在反应条件下): SOD 将 NBT 的还原抑制到一半时所需酶量, POD 以每分钟 OD 值增加 0.01 为一个酶活力单位, CAT 以每分钟 OD 值减少的数量为一个酶活力单位, PAL 以每小时 OD 值增加 0.01 为一个酶活力单位。

2 试验结果

2.1 蜜环菌激发子对猪苓菌丝细胞活性氧迸发的影响

图 1 表明, 蜜环菌处理 5min 后, 猪苓菌丝产生的活性氧开始上升, 此后急速增加, 10min 时活性氧产生量达到第一次高峰, 此后的 40min 内活性氧产生量无明显变化, 60min 时活性氧又开始增加, 到 90min 时出现第 2 次迸发高峰, 随后活性氧水平开始下降, 到 4.5h 时已降到对照相近的水平。从图中还可以看出激发子处理的猪苓菌丝在活性氧迸发高峰期产生的活性氧比对照高出 4 倍多。

2.2 蜜环菌激发子对猪苓菌核细胞活性氧迸发的影响

从图 2 可以看出, 用蜜环菌激发子处理猪苓菌核 10min 时活性氧产生水平显著高于对照, 此后活性氧产生水平急剧降低, 60min 时又开始上升, 90min 左右活性氧产生水平达到第 2 次高峰, 但峰值比第 1 次低。

2.3 激发子处理对猪苓菌丝 SOD 的影响

SOD 是 O_2 的清除剂, 用蜜环菌激发子处理猪苓后, SOD 活性发生明显变化 (图

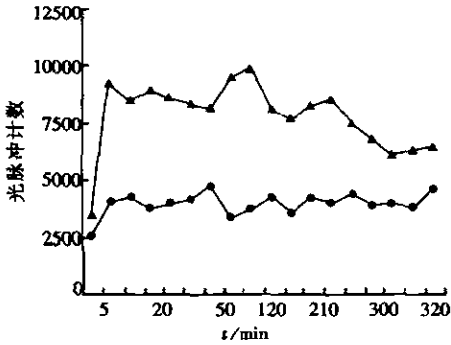


图1 激发子处理对猪苓菌丝活性氧产生的影响

—●— 对照, —▲— 处理

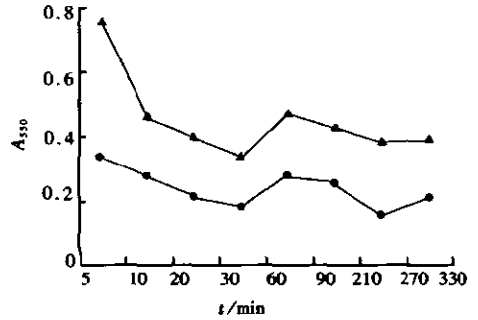


图2 激发子处理对猪苓菌核活性氧产生的影响

—●— 对照, —▲— 处理

3)。激发子处理2h的SOD活性比对照降低了64%，而在激发子处理后第4h、第8h SOD活性与对照无明显差别，到第20h处理的SOD活性又开始降低，比对照低54%，此后处理的SOD活性始终比对照低，直到第118h才与对照SOD活性达到同一水平。

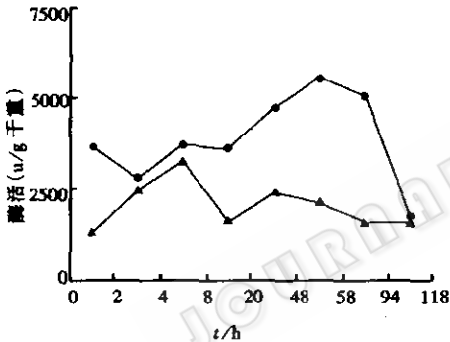


图3 激发子处理对猪苓菌丝SOD的影响

—●— 对照, —▲— 处理

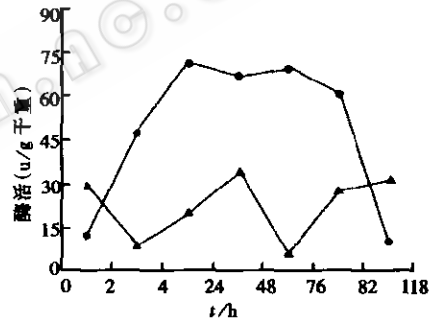


图4 激发子处理对猪苓菌丝POD的影响

—●— 对照, —▲— 处理

2.4 激发子处理对猪苓菌丝POD的影响

POD是对生物起保护作用的一类酶，从图4可以看出，蜜环菌激发子处理第2、第118h的猪苓菌丝，其POD活性高于对照，而在此间的整个过程中激发子处理后的猪苓菌丝的POD活性始终低于对照，在第4h、76h，处理与对照的差别尤为明显，处理比对照的POD活性分别降低90%、91%。

2.5 激发子处理对猪苓菌丝CAT的影响

CAT是清除体内活性氧的重要酶类，它可以催化 H_2O_2 变成 H_2O 和 O_2 ，见图5。从图5可以看出，激发子处理猪苓不引起CAT的活性的改变。

2.6 激发子处理对猪苓菌丝PAL的影响

激发子处理的猪苓菌丝，在24h之前，处理的PAL活性比对照略有降低，到第48h，处理的猪苓菌丝酶活开始升高，82h达到高峰，这反映猪苓受激发子处理后防卫功能的增强(图6)。

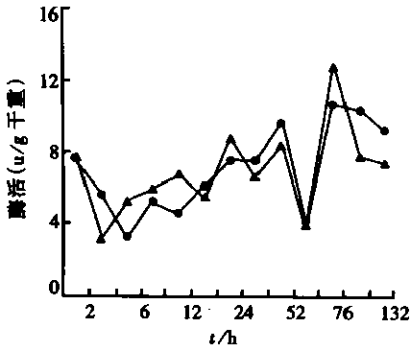


图5 激发子处理对猪苓菌CAT的影响
●—对照, ▲—处理

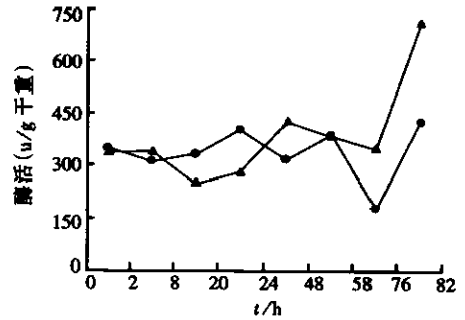


图6 激发子处理对猪苓菌PAL活性的影响
●—对照, ▲—处理

3 讨论

向猪苓菌核和菌丝的悬浮培养液中加入蜜环菌激发子, 都可以诱导活性氧的产生, 并且都出现两次迸发高峰, 分别在第10min及90min, 这说明菌丝和菌核的生理变化具有一定的对应关系。即菌丝的生理变化可以反映菌核的生理变化。

用激发子处理猪苓后导致SOD、POD活性下降, 表明猪苓菌丝对蜜环菌激发子的反应类似于植物的抗病反应, 即由于清除活性氧的防御酶系如SOD、POD的改变而导致活性氧的积累。活性氧快速、短暂的积累的意义在于引发局部坏死, 构建自身的防御体系, 从而在蜜环菌侵染猪苓菌核时将蜜环菌局限在一定范围内, 有利于两者之间共生体系的建立。在激发子处理5h后, 活性氧水平与对照基本持平, 而POD、SOD仍较为对照低, CAT则无明显变化, 说明除SOD、POD、CAT外, 猪苓可能还存在其它非酶促抗氧化物质如抗坏血酸、谷胱甘肽以消除体内的多余的自由基。此外, 猪苓细胞产生活性氧的能力降低, 也是导致活性氧维持在较低水平的原因。值得注意的是, POD既可作为活性氧的清除剂, 在 H_2O_2 作用下参与木质素的合成, 也可参与活性氧的形成^[7], 因而激发子处理5h后活性氧水平降低也与POD活性下降有关。

PAL是植物抗毒素生物合成及木质化过程中的第一个关键酶^[8]。在蜜环菌侵染猪苓菌核的过程中, 猪苓菌丝细胞发生了木质化, 且在48h后PAL活性开始增高, 说明PAL对猪苓防御结构的形成起着重要的作用。

参考文献

- [1] 徐红薇. 中国免疫学杂志, 1998, 14 (2): 109~111.
- [2] Ohta L. Natural Medicine, 1996, 50 (5): 366~368.
- [3] 郭顺星. 真菌学报, 1993, 12 (4): 283~288.
- [4] Glasener J A, Orlandi E W, Hammon G L, et al. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1991, 39: 123~133.
- [5] Chung K A, Terenceen. Plant Phythiol, 1995, 107: 1241~1247.
- [6] 张志良, 吴光耀主编. 植物生物化学技术和方法. 北京: 农业出版社, 1985, 60~61.
- [7] Vera-Estrella R, Blumwald E, Higyins V. Plant Physiol, 1992, 99: 7208~7215.
- [8] Dixon R A. Plant Cell, 1995, 7: 11055~11097.