

硒对藤茶抗氧化酶活性及有效成分的影响*

雷红灵^{1,2} 陆海波³ 蔡金洲³ 邱松³ 郑小江¹ 李世荣¹

1. 湖北民族学院生物资源保护与利用湖北省重点实验室,恩施 445000;

2. 湖南农业大学生物科学技术学院,长沙 410128; 3. 湖北民族学院化学与环境工程学院,恩施 445000

摘要 为了探讨硒对藤茶生长发育、生理生化特性的影响,以亚硒酸钠作为硒源,设置 0、50、75、100、125、150、175 mg/L 7 个质量浓度梯度,对盆栽藤茶进行叶面喷施,研究了不同质量浓度硒对藤茶含硒量、抗氧化酶活性、藤茶的黄酮、可溶性蛋白、可溶性糖、游离氨基酸的动态变化的影响。结果表明:当喷施硒质量浓度小于 100 mg/L,藤茶叶片的含硒量随着硒质量浓度的增大而增加,施硒质量浓度在 100~175 mg/L,藤茶含硒量无显著变化;硒处理可以明显提高藤茶的 GSH-Px 活性,硒的质量浓度在 125 mg/L 时,酶活性最强;当硒质量浓度小于 125 mg/L 时,可以提高 APX、CAT 的活性;硒对藤茶 SOD 活性无明显促进作用;施硒质量浓度在 75~125 mg/L,可以增加藤茶的可溶性蛋白、游离氨基酸、黄酮、可溶性糖的含量,在 125 mg/L 硒处理时,黄酮含量最高,其他 3 种有效成分的含量在 100 mg/L 时最高。低质量浓度的硒能促进藤茶抗氧化酶活性及藤茶中有效成分的合成,最适施硒质量浓度为 100 mg/L。

关键词 藤茶; 硒; 抗氧化酶; 黄酮; 可溶性蛋白质; 游离氨基酸; 可溶性糖

中图分类号 S 567.9; R 151.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)03-0321-05

硒是人和动物的必需微量元素,缺硒是诱发克山病、大骨节病等的主要因素,还与人体的免疫功能、抗氧化及抗癌作用密切相关^[1]。我国营养学会推荐正常成人摄入硒的安全质量浓度范围为 50~250 μg/d,膳食硒最高安全摄入量为 400 μg/d,中毒剂量为 800 μg/d^[2]。目前,补硒方法主要有口服亚硒酸钠片、食盐加硒、口服富硒酵母及通过土壤或叶面喷施无机硒提高作物的含硒量。由于无机硒毒性大,在人体内易发生积累,反而导致硒中毒;而人们对小麦^[3]、大豆^[4]、魔芋^[5]、茶叶^[6]等的富硒栽培研究表明,适量的亚硒酸钠不仅可以提高作物的含硒量,将作物中的无机硒转化为低毒高效的有机硒为人和动物利用,还可以促进作物的生长、提高产量、改善品质。藤茶为葡萄科(Vitaceae)蛇葡萄属(*Ampeopsis michaux*)显齿蛇葡萄(*A. grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang)的嫩茎芽和叶,富含黄酮、蛋白质、氨基酸、可溶性糖、多酚、维生素等多种有效成分^[7-8]及丰富的微量元素^[9],硒是植物的有益元素,但不同的植物、同一植物不同部位,富聚硒能力都不一样,而目前关于藤茶吸收硒的机理、聚硒能力以及硒对藤茶化学成分的研究报道不多。为了解硒对藤

茶生长发育、生理生化特性的影响,藤茶的耐硒、富硒能力,本研究采用盆栽试验,叶面喷施亚硒酸钠,探讨了施硒对藤茶含硒量、叶片抗氧化酶及主要有效成分的影响,旨在为人工培育含硒量高的藤茶提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为湖北省恩施州来凤县藤茶生产基地的绿凤藤茶(*Ampeopsis grossedentata*)。

1.2 主要仪器与试剂

Beckman Avanti 30 Centrifuge 高速冷冻离心机;北京吉天仪器有限公司 AFS-930 氢化物发生双道原子荧光光度计;北京普析通用仪器有限责任公司 TU-1810 紫外/可见分光光度计;金坛市佳美仪器有限公司 DB-4C 不锈钢电热板。

还原型谷胱甘肽(GSH)、5,5'-二硫代对二硝基苯甲酸(DTNB)、氮蓝四唑(NBT)、考马斯亮蓝 G250 为进口分装;硝酸、盐酸、过氧化氢、高氯酸为优级纯;甲硫氨酸、核黄素、牛血清白蛋白、L-谷氨酸为生化试剂;硒标准液(GSB07-1253-2000, 100

收稿日期:2009-10-11; 修回日期:2010-01-20

* 国家民委科研项目(07HB03,08HB04)、湖北民族学院创新团队项目(MYT2007005)和武汉市科技攻关计划项目(200920322147)资助
雷红灵,女,1967年生,博士研究生,副教授,研究方向:植物生化与分子生物学。E-mail:leihl123366@163.com

$\mu\text{g}/\text{mL}$)来自国家环境保护部标准样品研究所。其他试剂均为国产分析纯,试验用水为 2 次蒸馏水。

1.3 藤茶富硒栽培及样品预处理

将来自湖北来凤藤茶生产基地的绿凤藤茶的宿年老根移栽到 $30\text{ cm} \times 30\text{ cm}$ 的圆柱形塑料盆中,土壤为黄棕壤, pH 5.3,全硒含量为 $1.25\text{ mg}/\text{kg}$ 。待新枝条长出后,不定期喷施 Hoagland 完全培养液,待枝叶茂盛时,选取长势基本一致的藤茶,设置 0、50、75、100、125、150、175 mg/L 7 个亚硒酸钠质量浓度梯度,选择阴天的下午 16:00 左右进行叶面均匀喷施,每株 100 mL,5 个重复。施硒后 15 d 采成熟的深绿色叶片,蒸馏水漂洗 3 次,滤纸擦干,取新鲜叶片用于抗氧化酶的测定,其余叶片 $105\text{ }^\circ\text{C}$ 杀青 5 min, $55\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干,粉碎过孔径 0.085 mm 筛备用。

1.4 藤茶叶片中硒含量的测定

称取粉碎样品 0.1 g (精确至 0.0001 g),加 4 mL HNO_3 、1 mL HClO_4 、1 mL H_2O_2 ,参考 GB/T 5009.3—2003,食品中硒的测定方法测定硒含量。

原子荧光光度计的工作及测量条件: B 道 Se 高性能空心阴极灯,灯电流 80 mA,光电倍增管负高压 270 V,原子化器温度 $400\text{ }^\circ\text{C}$,原子化器高度 8 mm,载气流速 $400\text{ mL}/\text{min}$,屏蔽气流速 $800\text{ mL}/\text{min}$;测量方式为标准曲线法,读数方式为峰面积,延迟时间 1.5 s,读数时间 7 s,进样量 1.5 mL。

1.5 抗氧化酶活性的测定

1) 粗酶液的提取。准确称取鲜叶 2.0 g (精确至 0.0001 g),加适量提取液 ($50\text{ mmol}/\text{L}$ PBS, pH 7.0,内含 0.1% PVP, $1\text{ mmol}/\text{L}$ AsA, $1\text{ mmol}/\text{L}$ EDTA- Na_2),于冰浴中充分研磨成匀浆。再取适量酶提取液洗至离心管中, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻离心 ($10\,000\text{ r}/\text{min}$, 30 min),取上清酶液,定容至 20 mL,于 $0\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2) 抗氧化酶活性的测定。谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性采用 DTNB 比色法改良测定;抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性测定参照文献 [10];超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性用 NBT 光化还原法 [11] 测定。

1.6 藤茶的主要有效成分的测定

1) 黄酮的测定。称取藤茶粉末 0.1 g (精确至 0.0001 g),加入 20 mL 石油醚于 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 回流脱脂 1 h,倾去并挥干石油醚,再加入 20 mL 60% 乙醇,

于 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 回流提取 1 h,抽滤,滤渣同法重复提取 1 次,合并 2 次滤液,用 30% 乙醇定容至 50 mL。以芦丁为标准品,测定黄酮含量。

2) 蛋白质、游离氨基酸、可溶性糖的测定。称取藤茶粉末 0.1 g (精确至 0.0001 g) 置于烧瓶中,加入 20 mL 蒸馏水,超声处理 20 min,然后放入 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中浸提 30 min,趁热过滤,用蒸馏水定容至 25 mL,即得待测液。

蛋白质以牛血清白蛋白为标准品,参照 Bradford 法改良测定;游离氨基酸以谷氨酸作为标准品,采用茚三酮比色法测定;可溶性糖以蔗糖作为标准品,采用蒽酮法测定。

1.7 数据处理

数据处理采用 DPS6.2 统计软件, LSD 法多重比较。

2 结果与分析

2.1 硒对藤茶含硒量及鲜叶中可溶性蛋白质的影响

不同质量浓度硒处理的藤茶叶片中硒含量的变化如图 1。可以看出,当亚硒酸钠质量浓度为 50 mg/L 时,藤茶叶片中硒含量增加不明显;在 $50\sim 100\text{ mg}/\text{L}$ 范围变化时,藤茶叶片的含硒量明显增加,硒的含量可以达到 $24.327\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 。再增加硒质量浓度,在 125、150、175 mg/L 的硒质量浓度处理,藤茶的含硒量与 100 mg/L 的处理无显著性差异。这说明,当外源施硒质量浓度为 100 mg/L 时,藤茶富硒能力已经趋于饱和。而且,从图 1 还可以看出,在新鲜叶片中,当硒质量浓度小于 100 mg/L 时,藤茶可溶性蛋白质含量随硒质量浓度增加而增多,以后增加的趋势减小,硒质量浓度大于 150 mg/L 后,蛋白质含

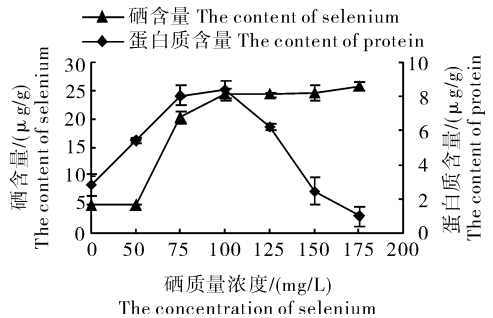


图 1 不同质量浓度硒对藤茶硒含量及鲜叶蛋白质含量的影响

Fig. 2 The effects on the content of selenium and protein of fresh leaves in *Ampelopsis grossedentata* with different concentration of selenium

量低于对照。可见,当外源施硒质量浓度大于 150 mg/L,硒对植物的生长已经产生了抑制作用。从以上结果来看,藤茶的最适硒处理质量浓度为 100~125 mg/L。

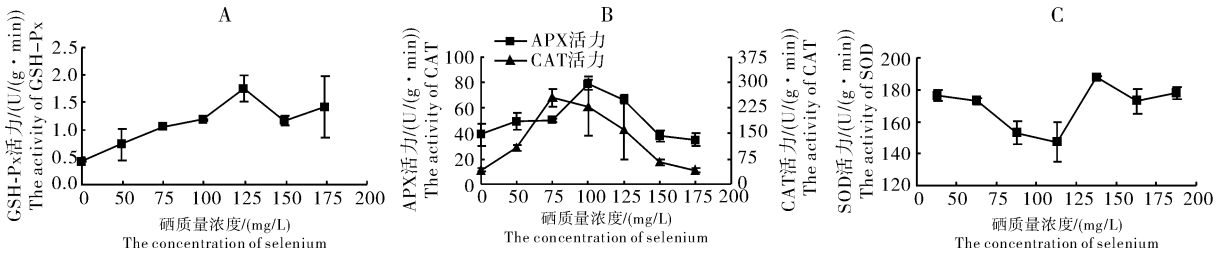
2.2 硒对藤茶叶片抗氧化酶的影响

硒对藤茶鲜叶的 GSH-Px、APX、CAT、SOD 抗氧化酶活性影响见图 2。由图 2-A 可以看出,硒处理后的藤茶叶片的 GSH-Px 活性都要显著高于对照;当硒质量浓度小于 125 mg/L 时,GSH-Px 活性随质量浓度的加大而增加,超过此质量浓度,酶活性的增加趋势减缓。由图 2-B 可以看出,在硒质量浓度为 125 mg/L 时,藤茶叶片中的 APX 活性高于对照,在 100 mg/L 时酶活性最大,而在硒质量浓度大于 150 mg/L 后酶活性低于对照。CAT 活性在硒质量浓度 50~150 mg/L 硒处理时均高于对照,75 mg/L 达到最大。由图 2-C 可以看出,经硒处理后,藤茶 SOD 酶活性在硒质量浓度 50~100 mg/L 时还有所下降,125 mg/L 时略高于对照,而在 150、175 mg/L 时与对照无显著差异。

在植物体的抗氧化酶系统中,GSH-Px 是一种

含硒酶。薛泰麟等^[12]认为在植物中,硒主要是以 GSH-Px 的形式参与植物体抗氧化作用,硒作为一种诱发因子,启动 GSH-Px 酶合成的有关基因,而硒本身以硒代甲硫氨酸或硒代半胱氨酸的形式掺入到 GSH-Px 的结构中去,合成 GSH-Px,从而提高酶的活性。但随着硒质量浓度的增加,植物体内 GSH-Px 酶的合成达到饱和,再增加硒的质量浓度,酶的总活性不会再增加。

低硒质量浓度促进 APX、CAT 的合成(图 2-B),提高酶的活性,但随着质量浓度的提高,硒开始对植物产生不利影响,蛋白质合成减少,所以酶的总活性趋于下降。在硒处于低质量浓度时,SOD 总活性降低(图 2-C),这可能是因为在抗氧化酶系统中,SOD 是唯一将超氧自由基歧化生成毒性较低的过氧化氢的一类酶,而无机态的亚硒酸盐、硒酸盐本身对 O₂⁻·也具有较弱的清除能力,从而导致 O₂⁻·水平的降低和 O₂⁻·对 SOD 活性诱导能力的下降^[13]。而在后期,较高质量浓度硒导致大量的 O₂⁻·的产生,使得 SOD 活性回升,但硒质量浓度过高,会对植物产生毒害而降低其活性。



A. GSH-Px; B. APX、CAT; C. SOD.

图 2 硒对藤茶抗氧化酶活性的影响

Fig. 2 Effect of selenium on the activity of antioxidantase in *Ampelopsis grossedentata*

2.3 硒对藤茶有效成分的影响

施硒处理后藤茶有效成分的动态变化见图 3。由图 3 可见,硒质量浓度为 50~125 mg/L 时,藤茶中的黄酮、可溶性糖、可溶性蛋白质、游离氨基酸含量都高于对照;硒质量浓度为 125 mg/L 时黄酮最高,其它 3 种成分均在硒质量浓度为 100 mg/L 时达到最高;其中,黄酮和游离氨基酸的含量在所有硒处理组中都高于对照。说明在一定的施硒质量浓度范围内,硒可以提高藤茶中的有效成分含量,最适硒质量浓度为 100~125 mg/L。

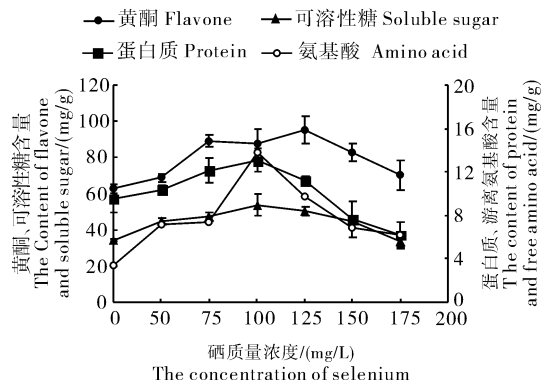


图 3 不同施硒处理藤茶有效成分的含量的动态变化

Fig. 3 The dynamic variation of the mass fraction of effective ingredient in *Ampelopsis grossedentata* with different concentration of selenium

3 讨论

硒在植物体内具有多种生理功能,最主要的是作

为 GSH-Px 的组成成分参与生物抗氧化作用和作为 tRNA 的组成成分参与蛋白质的合成^[14]。不同的植物聚硒能力不一样,耐受性也不同。

3.1 藤茶的耐硒、富硒能力

笔者在预备试验中发现,当叶面喷施亚硒酸钠质量浓度大于 200 mg/L 时,第 2 天便可见到叶片坏死脱落,特别是成熟的老叶,所以本试验的最高质量浓度设定在 175 mg/L。在施硒质量浓度为 100 mg/L 时,藤茶的富硒能力已接近最大,再提高硒质量浓度,藤茶的富硒能力无显著提高。这与藤茶中蛋白质含量的动态变化也是相关联的,无机硒进入植物体,转化成有机硒的主要形式是可溶性硒蛋白^[14],从硒对藤茶蛋白质含量的影响来看,在硒质量浓度为 100 mg/L 时,藤茶中的可溶性蛋白质含量最高。再增加外源硒的质量浓度,硒的吸收和转化受到限制,因而蛋白质含量增加不明显。

3.2 硒与藤茶抗氧化酶活性的关系

硒可以通过酶促系统和非酶机制参与自由基的清除^[12]。硒诱导各种抗氧化酶活性的机制可能也不一样,有的可能是通过酶的合成,而有的可能是通过酶的活性形式的变构,所以表现出了不一样的诱导效应。此外,各种抗氧化酶的作用也相互影响、相互协调。低质量浓度的硒进入藤茶叶片后,发挥着多重生理效应,通过促进抗氧化酶的合成来提高酶的活性,如 GSH-Px、APX、CAT,所以当藤茶叶片中蛋白质的含量减少时,这些酶的活性也表现出下降。当硒质量浓度较高时,对于 SOD 和 POD 的诱导机制可能更多。非酶机制清除自由基对于 SOD 活性影响较大,在低质量浓度时,依赖于无机硒等直接清除 $O_2^{\cdot-}$,因而诱导 SOD 活性不明显。

3.3 硒对藤茶有效成分的影响

田秀英等^[15]的研究表明,施硒质量浓度低于 1.0 mg/kg 时,能提高苦荞各器官硒、总黄酮和芦丁含量。程嘉翎等^[16]的研究显示,根部施 0.25~1.00 mg/L 的亚硒酸钠,桑叶中的氨基酸、可溶性蛋白、可溶性多糖以及桑叶黄酮类成分含量高于对照;本研究也显示,施硒质量浓度为 50~125 mg/L 时,藤茶中的黄酮、蛋白质、可溶性糖、游离氨基酸的含量均高于对照,而且多在 100 mg/L 达到最高。低质量浓度的硒对这些有效成分的促进作用可能都是通过影响植物的新陈代谢来调节各种物质的合成,硒质量浓度过高,会对植物产生毒害,从而使各种有效成分减少。

世界卫生组织公布的资料表明,全球有 40 多个国家属于低硒或缺硒地区,中国有 72% 的县(市)低硒或缺硒,我国 20 世纪 90 年代初进行的总膳食结构调查结果显示,我国居民日常饮食中硒摄入量平均值为 43.3 $\mu\text{g}/\text{d}$,低于中国营养学会推荐的硒适宜摄入量下限 50 $\mu\text{g}/\text{d}$,生活在严重缺硒地区的居民硒摄入量低于 20 $\mu\text{g}/\text{d}$ ^[17]。缺硒给人和动物的健康带来了严重危害,补硒成为全世界共同关注的营养话题。利用植物有机硒源,可以从源头调控硒营养和预防有关硒缺乏疾病,研究也表明,通过食物链转化,从天然食品中摄取适量硒营养是一条安全、价廉、可行的途径^[18]。我国在克山病、大骨节病等低硒地区施用亚硒酸钠提高农作物硒水平,已经取得成效^[19],而富硒区的农作物更是人们最好的补硒来源。藤茶以其特殊的药理和保健作用已经受到了人们的青睐,本研究显示,叶片喷施亚硒酸钠 100 mg/L,可以使藤茶的含硒量达到 24.327 $\mu\text{g}/\text{g}$,而且还可以通过促进抗氧化酶活性提高藤茶的抗逆、抗衰老能力,通过促进物质合成提高黄酮、蛋白质、多糖和氨基酸等有效成分的含量,从而提高藤茶品质,说明了藤茶富硒栽培的可行性。当然藤茶在不同的采收时间、不同产地,其有效成分也会发生变化,笔者所在课题组将对藤茶的富硒栽培技术、硒进入藤茶后的变化、施硒后不同时间采摘的藤茶的含硒量及有效成分的动态变化进行深入的研究。

参 考 文 献

- [1] RAYMAN M P. The importance of selenium to human health [J]. *Lancet*, 2000, 356: 233-241.
- [2] 张俊杰. 硒的生理功能及富硒强化食品的研究进展 [J]. *微量元素与健康研究*, 2006, 23(3): 58-60.
- [3] 高新楼, 秦中庆, 苏利. 喷施富硒液对富硒小麦籽粒硒含量及产量的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(18): 5498-5499.
- [4] 唐巧玉, 吴永尧, 周毅峰. 硒对大豆生长和某些生理生化指标的影响 [J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(1): 53.
- [5] 万佐玺, 易咏梅, 杨兰芳, 等. 土壤施硒对魔芋含硒量与吸硒特性的影响 [J]. *华中农业大学学报*, 2005, 24(4): 359-363.
- [6] 李静, 夏建国, 李廷轩, 等. 喷施亚硒酸钠对茶叶硒含量及化学品质的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2007(3): 186-187.
- [7] 张学娟. 藤茶的形态学、生物学特性及主要化学成分研究 [D]. 武汉: 华中农业大学园艺林学学院, 2008.
- [8] 陈玉琼, 曾维超, 孟燕, 等. 藤茶新工艺加工过程品质化学成分的变化 [J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(3): 441-444.
- [9] 薛慧. 恩施来凤藤茶微量元素的分析及其保健功能探讨 [J]. *广东微量元素科学*, 2004, 11(8): 56-58.

- [10] JIANG M Y, ZHANG J H. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings[J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42:1265-1273.
- [11] 刘碧容, 甄畅迪, 萧洪东, 等. 硼对草坪草超氧化物歧化酶活性、超氧阴离子产生速率和丙二醛含量的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(3): 378-381.
- [12] 薛泰麟, 侯少范, 谭见安, 等. 硒在高等植物体内抗氧化作用——硒对过氧化作用的抑制效应及酶促机制的探讨[J]. *科学通报*, 1993, 38(3): 274-277.
- [13] 尚庆茂, 陈淑芳, 张志刚. 硒对高温胁迫下辣椒叶片抗氧化酶活性的调节作用[J]. *园艺学报*, 2005, 32(1): 35-38.
- [14] 王芳, 林克惠. 植物硒素的营养研究进展[J]. *云南农业大学学报*, 2004, 19(4): 417-422.
- [15] 田秀英, 王正银. 硒对苦荞硒、总黄酮和芦丁含量、分布与累积的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2008, 14(4): 721-727.
- [16] 程嘉翎, 肖龙云, 张波. 外源硒对桑叶中硒及若干化学成分含量的影响[J]. *蚕业科学*, 2006, 32(4): 575-577.
- [17] 王景怀, 施辰子. 富硒农产品开发及含硒量标准的探讨[J]. *天津农林科技*, 2005(3): 15-17.
- [18] FINLE Y, JOHN W. Selenium accumulation in plant foods [J]. *Nutrition*, 2005, 63(6): 196-202.
- [19] 李日邦, 谭见安, 王五一, 等. 提高食物链硒通量防治大骨节病和克山病示范研究[J]. *地理学报*, 1999, 54(2): 158-168.

Effects of Selenium on Activity of Antioxidase and Effective Ingredient in *Ampelopsis grossedentata*

LEI Hong-ling^{1,2} LU Hai-bo³ CAI Jin-zhou³ QIU Song³ ZHENG Xiao-jiang¹ LI Shi-rong¹

1. Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China;

2. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

3. School of Chemistry and Environmental Engineering, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China

Abstract *Ampelopsis grossedentata* is a kind of medical-edible plant with many medical and health care functions. In order to explore the effects of selenium on growing development, physiological-biochemical characteristic of *A. grossedentata*, Na_2SeO_3 was sprayed on the leaf of potted *A. grossedentata* with different concentration (0, 50, 75, 100, 125, 150 and 175 mg/L). The effects of selenium on the content of selenium and the activity of antioxidantase, the dynamic variation of soluble protein, free amino acid, soluble sugar and flavone in *A. grossedentata* were studied. The results showed that when the concentration of selenium was lower than 100 mg/L, the higher the concentration is, the higher the selenium content was. When the concentration of selenium was ranged from 100 to 175 mg/L, the content of selenium in *A. grossedentata* has no significant change. The activity of GSH-Px could be promoted by selenium, and reached to maximum when the concentration of selenium was 125 mg/L. The activity of APX and CAT could be promoted when the concentration of selenium was lower than 125 mg/L. However, the activity of SOD could not be promoted in low concentration of selenium. When the concentration of selenium was ranged from 75 to 125 mg/L, the content of soluble protein, free amino acid, soluble sugar and flavone in *A. grossedentata* were increased. The activity of antioxidantase and the synthesis of effective ingredient in *A. grossedentata* can be promoted with suitable concentration of selenium, and the optimum spraying concentration of selenium is 100 mg/L.

Key words *Ampelopsis grossedentata*; selenium; antioxidantase; flavone; soluble protein; free amino acid; soluble sugar