

· 中药农业 ·

外源 H_2O_2 处理对药用大麻中大麻素含量的影响[△]李晓颖¹, 姚杰¹, 张利国², 胡莹莹², 何录文¹, 孟祥才^{1*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040;

2. 黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086

[摘要] 目的: 通过外源活性氧调节大麻的次生代谢, 提高大麻二酚(CBD)含量, 为优质药用大麻生产提供新的技术。方法: 在大麻始果期采摘大麻植株顶端苞片, 分别采用清水和20、200、2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢(H_2O_2)对大麻苞片进行喷洒处理, 连续4 d 分析大麻体内活性氧含量、抗氧化酶活性、大麻素生物合成途径关键基因表达量及大麻素类成分含量的变化规律。结果: 外源 H_2O_2 使大麻苞片中的 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 及丙二醛(MDA)含量均有所提升。20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理使大麻超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活力提升最大, 在处理第1~2天达到峰值。过氧化物酶(POD)在 H_2O_2 处理第3天达到峰值。外源 H_2O_2 能够明显提升聚酮合酶、四氢大麻酚酸合成酶、大麻二酚酸合成酶的基因表达量。20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理第1天大麻苞片中 CBD 含量比对照组提高了72.9%。结论: 外源活性氧能够诱导出植物的逆境生理状态, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理能够极显著提高大麻 CBD 含量。

[关键词] 大麻; 大麻素; 过氧化氢; 活性氧**[中图分类号]** R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)01-0137-07**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20220808001Effect of Exogenous H_2O_2 Treatment on Cannabinoid Content in Medicinal *Cannabis sativa*LI Xiao-ying¹, YAO Jie¹, ZHANG Li-guo², HU Ying-ying², HE Lu-wen¹, MENG Xiang-cai^{1*}

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Cash Crops Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China

[Abstract] **Objective:** To regulate the secondary metabolism of *Cannabis sativa* with exogenous reactive oxygen species, so as to improve the cannabidiol (CBD) content in this medicinal species, and to provide a new technique for the culture of quality *C. sativa*. **Methods:** The bracts at the top of *C. sativa* in the initial fruiting stage were collected, which were classified into four groups and sprayed with clear water, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 , 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 , and 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 solution, respectively, for 4 days. The changing rules of reactive oxygen species content, antioxidant enzyme activity, expression of genes involved in cannabinoid biosynthesis pathway, and cannabinoid content in *C. sativa* were analyzed. **Results:** Exogenous H_2O_2 significantly increased the content of H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, and malondialdehyde (MDA) in *C. sativa* bracts. The 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 topped the treatments in improving the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), which peaked on the 1st-2nd day of treatment. In this treatment, the activity of peroxidase (POD) peaked on the 3rd day. Exogenous H_2O_2 can significantly raise the expression of genes encoding polyketide synthase (Ols), tetrahydrocannabinolic acid (Thcas) synthase, and cannabidiolic acid (Cbdas) synthase. Compared with the control group, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 improved the CBD content in bracts of *C. sativa* by 72.9% on the first day. **Conclusion:** Exogenous reactive oxygen species can induce the physiological state of plants in response to stress, and the spray with 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 can significantly increase the CBD content of *C. sativa*.

[Keywords] *Cannabis sativa* L.; cannabinoids; H_2O_2 ; reactive oxygen species

大麻 *Cannabis sativa* L. 又名线麻、火麻、胡麻, 为大麻科大麻属1年生草本植物, 是一种古老的经济

作物, 可用于获取纤维和药物, 其中大麻种子含有丰富的脂肪油, 对便秘和腹泻有双向治疗作用^[1]。大麻

[△] [基金项目] 国家自然科学基金联合基金项目(U20A20407)

* [通信作者] 孟祥才, 教授, 研究方向: 药用植物生物学、栽培及质量评价; E-mail: Mengxiangcai000@163.com

花序和叶片的主要活性成分是大麻二酚(CBD)、四氢大麻酚(THC)等大麻素类化合物,该类化合物具有镇痛、抗抑郁、抗癫痫、降眼压、抗肿瘤、抗炎杀菌、镇吐等作用^[2],在医药健康、食品保健、美容护肤等领域有广阔的应用前景。

THC是大麻中的主要毒性成分,有强烈的中枢神经刺激性,个体吸食大麻会导致妄想、错觉、幻觉、感受性增强、时间及空间感知综合障碍等精神问题^[3],因此,多年来大麻被管制使用。而CBD是大麻中的非精神活性物质,没有致幻、成瘾风险,还能够拮抗THC的精神毒性,随着对大麻研究的深入,CBD的安全性得到广泛认可,目前全球已有50多个国家将CBD的应用合法化^[4]。2020年12月,联合国麻醉品委员会(CND)将大麻和大麻脂从《麻醉品单一公约》中删除,使大麻的应用开发成为热点,目前全球合法大麻产值约300亿美元,CBD产业价值将达到57亿美元,且呈上升趋势^[5]。

优质的药用大麻需要兼顾生物活性及安全性,因此培育高CBD含量、低THC含量的大麻是推进大麻药学应用的关键。CBD与THC均是大麻的次生代谢产物。次生代谢产物的生态作用是增强植物对外界环境的适应能力,通常随外界环境和植物自身的生长发育状态而变化。当环境发生变化,如遭遇干旱、高温、盐害、寒冷、强光等极端情况,植物的次生代谢产物可能会大量合成或急剧减少。有研究表明,环境胁迫对次生代谢影响的生物学本质是活性氧(ROS),环境胁迫会导致植物体内的ROS过多累积,ROS对蛋白质(包括酶)、DNA、生物膜具有很强的破坏作用,但其又能够作为信号因子激发植物自身的防御保护机制,使植物体内抗氧化酶活性及次生代谢产物含量发生改变,从而影响植物中活性成分的含量^[5-6]。大麻素类成分主要存在于大麻植株的腺体毛中,大麻苞片上有大量的腺体分布^[7],因此含有大量的大麻素类化合物。过氧化氢(H₂O₂)是植物体内最重要的一种ROS,稳定性相对较好,易于透过生物膜,在细胞中能够进行远距离传输^[8-9]。本研究通过H₂O₂溶液处理大麻苞片,模拟环境胁迫的生理状态以达到调节大麻的次生代谢、提升药用大麻活性成分含量的目的。

1 材料

1.1 样品

样品采自黑龙江中医药大学药用植物园,经黑

龙江中医药大学孟祥才教授鉴定为大麻 *Cannabis sativa* L.。

1.2 仪器

TGL-16LM型台式高速冷冻离心机(湖南星科学仪器有限公司);SD40型制冰机(广州市广坤电器制造有限公司);752型紫外-可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);DKZ-3B型水浴恒温振荡器(常州迅生仪器有限公司);DHG-9015A型鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);CP225D型电子天平(上海精密仪器仪表有限公司);2695型超高效液相色谱仪(美国Waters公司);RODI型超纯水机器(厦门锐思捷水纯化技术有限公司);KQ-250DB型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);StepOne型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司)。

1.3 试剂

H₂O₂(分析纯,天津市北联精细化学品开发有限公司);蒸馏水(实验室自制);蛋白定量(TP)测定试剂盒、H₂O₂测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒、植物过氧化物酶(POD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);无水对氨基苯磺酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂); α -萘胺(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);盐酸羟胺(分析纯,天津市天新精细化工开发中心);亚硝酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾(分析纯,天津市致远化学试剂有限公司);无水乙醇、甲醇(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);冰醋酸(分析纯,天津市天力化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,北京迪科马科技有限公司);磷酸(色谱纯,天津科密欧化学试剂有限公司);CBD(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,批号:1ST10160)、THC(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,批号:1ST14691)均购于天津阿尔塔科技有限公司。

2 方法

2.1 样品处理

采集大麻始果期顶部新鲜苞片,平均分为4份,分别喷洒清水(对照)和20、200、2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂,早晚各1次,边喷雾,边翻倒,直至样品表面全部淋湿,达到饱和状态,连续处理4 d。样品放

置于常温(20~25℃)环境中,每天均匀取样。一部分样品放入烘箱50℃烘干后保存待测,该部分样品每次取样15g;另一部分样品放入-80℃冰箱保存待测,该部分样品每次取样0.2g×10份。样品进行平行处理,取样3次。

2.2 ROS含量测定

按试剂盒说明书方法在冰浴下研磨样品制备粗酶提取液,羟胺氧化法测定样品 $O_2^{\cdot-}$ 含量; H_2O_2 测定试剂盒测定样品中 H_2O_2 含量。

2.3 抗氧化酶活性测定

T-SOD测定试剂盒、CAT测定试剂盒、POD测定试剂盒分别测定大麻体内不同抗氧化酶活性。

2.4 基因表达量测定

从美国国立生物技术信息中心(NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)获取大麻聚酮合酶(Ols)、四氢大麻酚酸合成酶(Thcas)、大麻二酚酸合成酶(Cbdas)及内参基因 $EF-1\alpha$ 的全基因序列。取第0天样品(空白)、清水处理第1天样品、 $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理第1天样品进行实时荧光定量PCR测定,通过循环数阈值(C_t)计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对起始模板进行定量分析。

2.5 大麻素含量测定

2.5.1 对照品溶液制备 移液枪分别吸取THC、CBD对照品溶液,甲醇稀释成质量浓度为0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。

2.5.2 供试品溶液制备 取烘干后的大麻样品粉碎,过40目筛。取各组样品粉末各0.2g于锥形瓶中,加入甲醇10mL超声萃取15min后浸泡20min。将提取后的样品溶液4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min(离心半径为12.5cm),取上清液于10mL量瓶定容,得到几种大麻素的混合粗提物。粗提物溶液经0.45 μm 微孔滤膜滤过制成供试品溶液。

2.5.3 色谱条件 色谱柱: Thermo C_{18} 色谱柱(250mm×4.6mm, 5 μm);流动相为乙腈-磷酸氢二钾缓冲液(75:25);流速为1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温为25℃;检测波长为220nm;进样量为10 μL 。

3 结果

3.1 H_2O_2 处理对大麻体内ROS含量的影响

3.1.1 H_2O_2 含量 外源 H_2O_2 处理对大麻苞片中 H_2O_2

含量的影响见图1。不同浓度外源 H_2O_2 均使大麻中 H_2O_2 含量升高。其中, $2000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 使大麻苞片中 H_2O_2 含量提升幅度最大,在处理第1天达到峰值,与对照组相比大麻苞片中 H_2O_2 含量提升了480.4%。处理第2天开始各组 H_2O_2 含量呈下降趋势。

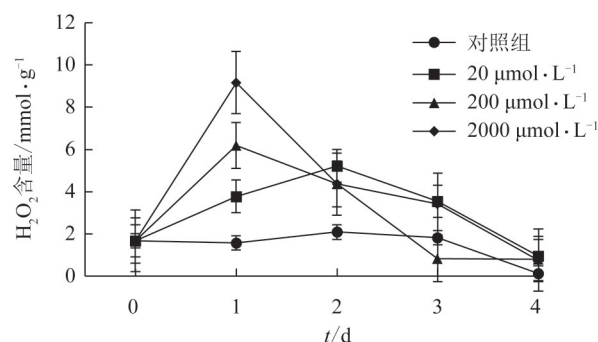


图1 外源 H_2O_2 处理对大麻苞片中 H_2O_2 含量的影响
($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.1.2 $O_2^{\cdot-}$ 含量 外源 H_2O_2 对大麻苞片中 $O_2^{\cdot-}$ 含量的影响见图2。对照组 $O_2^{\cdot-}$ 含量变化不大,而不同浓度外源 H_2O_2 均能使大麻苞片中 $O_2^{\cdot-}$ 含量升高。其中, $2000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 使大麻苞片中 $O_2^{\cdot-}$ 含量提升幅度最大,在处理第1天达到峰值,与对照组比较,使大麻苞片中 $O_2^{\cdot-}$ 含量提升33.7%。处理第2天开始,各组 $O_2^{\cdot-}$ 含量呈下降趋势。

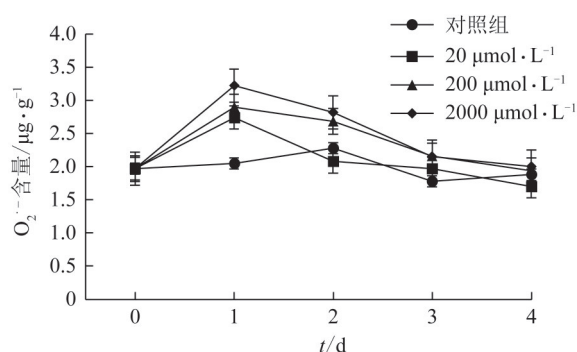


图2 外源 H_2O_2 处理对大麻苞片中 $O_2^{\cdot-}$ 含量的影响
($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.2 H_2O_2 处理对大麻体内MDA含量的影响

外源 H_2O_2 对大麻苞片中MDA含量的影响见图3。对照组MDA含量变化不大,而不同浓度外源 H_2O_2 均能使大麻苞片中MDA含量升高,随 H_2O_2 浓度升高,大麻苞片中MDA升高幅度增大。 $2000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 使大麻苞片中MDA含量升高幅度最大。与对照组比较, $2000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理大麻苞片第4天的MDA含量

提升了96.4%。处理第2天开始,MDA含量上升趋势逐渐趋缓。

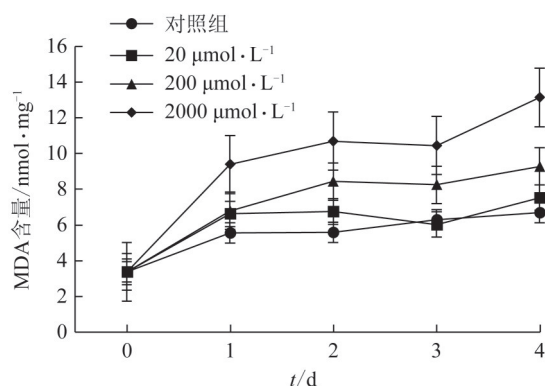


图3 外源H₂O₂处理对大麻苞片中MDA含量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.3 H₂O₂处理对大麻体内抗氧化酶活性的影响

3.3.1 SOD活性 外源H₂O₂对大麻苞片中SOD活力的影响见图4。200、2000 μmol·L⁻¹ H₂O₂处理组SOD活力在处理第1、2天略高于对照组,在处理第3、4天略低于对照组,整体变化幅度较为和缓,与对照组差别不大。20 μmol·L⁻¹ H₂O₂处理组SOD活力呈先升高再降低趋势,处理第1天达到峰值,与对照组比较升高了60.7%。

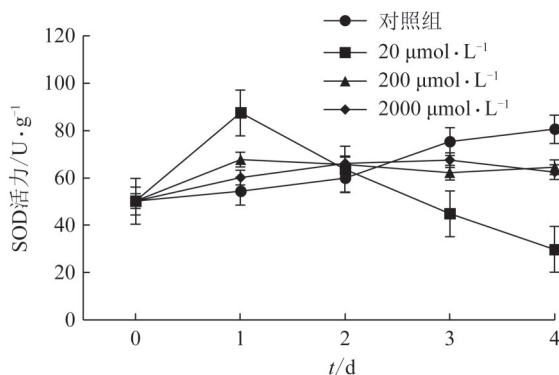


图4 外源H₂O₂处理对大麻苞片中SOD活力的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.3.2 CAT活性 外源H₂O₂对大麻苞片中CAT活力的影响见图5。各组CAT活力均呈先上升再下降趋势。20 μmol·L⁻¹ H₂O₂处理组大麻CAT活力上升幅度最大,且在处理第2天达到峰值,较对照组提升了69.9%。从处理第3天开始,各组CAT活力呈下降趋势。

3.3.3 POD活性 外源H₂O₂对大麻苞片中POD活力的影响见图6。在样品处理第1天,各浓度H₂O₂处

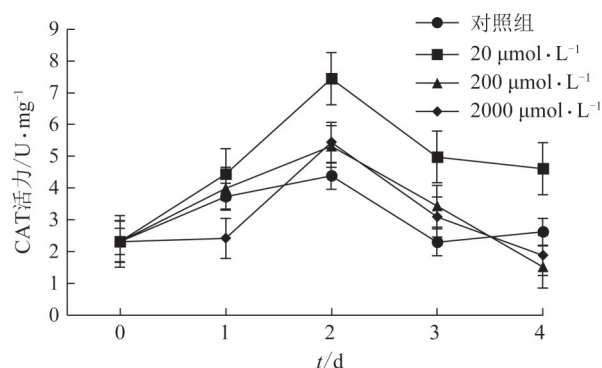


图5 外源H₂O₂处理对大麻苞片中CAT活力的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

理组POD活力均低于对照组。处理第2天开始,H₂O₂处理组POD活力上升并高于对照组。20 μmol·L⁻¹ H₂O₂处理组大麻POD活力上升幅度最大,且在处理第3天达到峰值,使POD活力较对照组提升了72.1%。

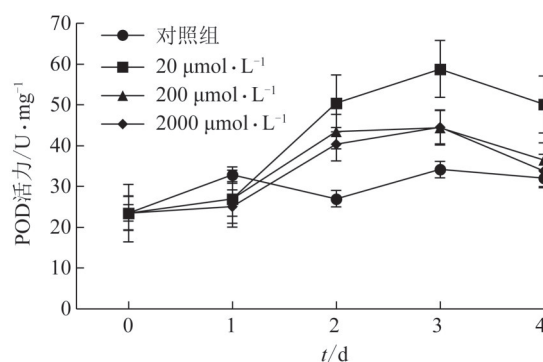


图6 外源H₂O₂处理对大麻苞片中POD活力的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.4 H₂O₂处理对大麻素合成相关酶基因表达的影响

荧光PCR定量结果见图7。对比空白0 d样品,对照组大麻与20 μmol·L⁻¹ H₂O₂处理组大麻的3种基因表达均有提高,H₂O₂处理组大麻的3种基因表达量明显高于对照组。与对照组相比,20 μmol·L⁻¹ H₂O₂处理的大麻Ols基因表达量提升了49.2%、Thcas基因表达量提升了92.3%、Cbdas基因表达量提升了114.2%。

3.5 H₂O₂处理对大麻次生代谢产物含量的影响

3.5.1 方法学考察 对标准品色谱峰面积(Y)和质量浓度(X, μg·mL⁻¹)进行线性回归,分别得THC的回归方程:Y=30 286X+6 283.8 ($r=0.9998$);CBD的回归方程:Y=29 211X+37 112 ($r=0.9995$)。HPLC图见图8。

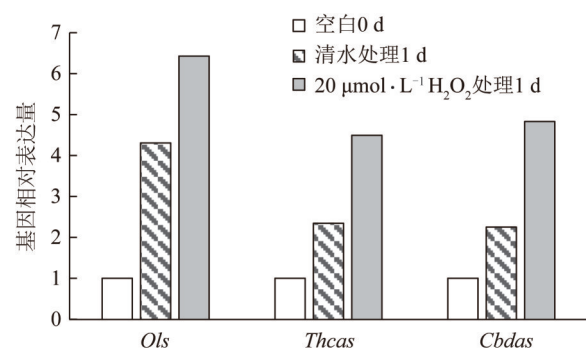
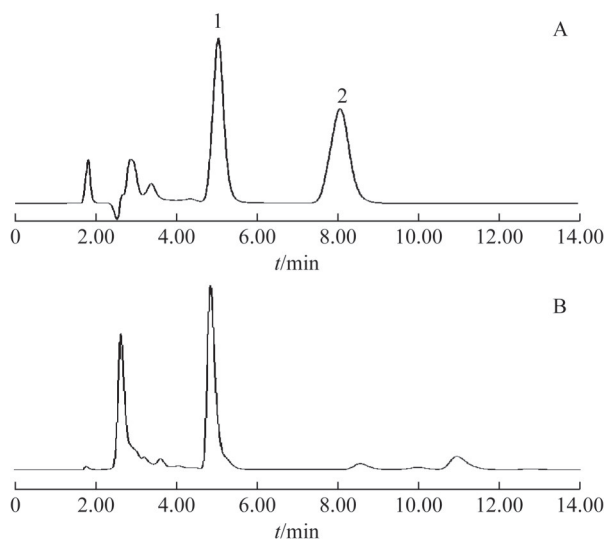


图7 外源 H_2O_2 处理对大麻 Ols 、 $Thcas$ 、 $Cbdas$ 3种基因表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: A. 对照品; B. 样品; 1. CBD; 2. THC。

图8 对照品及 H_2O_2 处理0 d大麻苞片样品HPLC图

取同一供试品溶液,连续进样6次分析,计算日内精密度;连续3 d进样分析,计算日间精密度。CBD、THC日内精密度RSD分别为1.47%、1.55%,日间精密度的RSD分别为1.24%、1.15%,表明该实验仪器精密度良好。

取同一供试品溶液,于样品制备后0、2、4、8、12、24 h进样分析,CBD、THC峰面积RSD分别为1.14%、1.38%,表明该供试品溶液在24 h内稳定性良好。

取同一供试品制备6份供试品溶液,进样分析,得到CBD、THC质量浓度RSD分别为2.80%、2.55%,表明该方法重复性良好。

取已知含量的大麻样品粉末0.2 g,共6份,精密称定,分别加入适量质量浓度的对照品,制备供试品溶液进样分析,得到CBD、THC的平均回收率分别为99.16%、98.33%,RSD分别为1.15%、2.38%,

表明该方法加样回收率良好。

3.5.2 大麻中CBD含量的变化 不同浓度外源 H_2O_2 对大麻苞片中CBD质量分数的影响见图9。与对照组比较,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理组大麻CBD质量分数提升幅度最大,且在处理第1天达到峰值,大麻苞片CBD质量分数比对照组提升了72.9%。处理第2天开始,大麻中THC质量分数呈下降趋势。

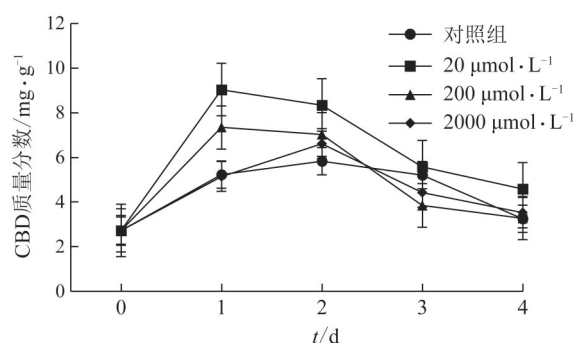


图9 外源 H_2O_2 处理对大麻苞片中CBD质量分数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.5.3 大麻中THC含量的变化 不同浓度外源 H_2O_2 对大麻苞片中THC质量分数的影响见图10。与对照组比较,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理组大麻THC质量分数提升幅度最大,且在处理第2天达到峰值,使大麻苞片中THC质量分数提升了69.4%。处理第3、4天,大麻中的THC质量分数呈下降趋势。

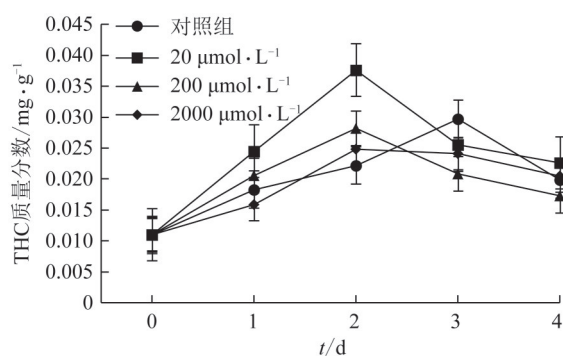


图10 外源 H_2O_2 处理对大麻苞片中THC质量分数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

大麻素类成分是大麻植物中重要的天然活性物质,该类成分主要在大麻的盛蕾期、盛花期和始果期快速累积^[10],且主要存在于生长旺盛的幼嫩组织中。始果期的大麻苞片处于旺盛生殖期,会大量吸收水分及

氧气,对外界环境的变化极为敏感,对生态胁迫会迅速产生应答。 H_2O_2 是一种稳定性相对较好,能够跨膜运转的ROS分子^[8],外源 H_2O_2 能够快速进入大麻细胞,从而影响大麻生理活动。

4.1 外源 H_2O_2 处理对大麻ROS、MDA含量的影响

在外源 H_2O_2 处理第1~2天,大麻苞片中的 H_2O_2 含量较对照组急速提升并达到峰值,在处理第2~3天开始各组大麻ROS呈不同程度的下降趋势,可能由于 H_2O_2 激活了大麻自身的抗氧化系统,对体内ROS进行了有效清除,或者由于外源胁迫的程度超过了大麻自身调节的能力,不可逆的伤害导致了大麻细胞的凋亡。外源 H_2O_2 同样能提升大麻苞片中的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量,此时植物体内的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 可能由外源 H_2O_2 转化而来。

MDA是生态胁迫导致细胞膜脂过氧化的产物,其含量直接反映植物受到的氧化伤害的程度^[11],MDA含量升高表明外源可再现环境胁迫条件下的生理状态。在处理的前2 d,大麻2种组织中的MDA提升幅度与施加的外源ROS浓度均呈正相关。从第2天开始,组织内MDA含量上升幅度变得缓和,其可能与抗氧化酶、次生代谢产物对ROS的消除有关。

4.2 外源 H_2O_2 处对大麻抗氧化酶活性的影响

当ROS浓度过高时,氧化损伤致使植物体内细胞膜的稳定性降低,碳水化合物、脂质、蛋白质和DNA等生物分子被破坏,阻碍了正常的细胞功能,甚至导致了细胞死亡^[12]。为了避免ROS的伤害,生物进化出了消除ROS的一系列途径,其中抗氧化酶是最为基础的之一的途径。SOD是植物最重要的抗氧化酶,在植物响应环境胁迫时第一个作出反应,SOD能够将 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 歧化成 H_2O_2 和 O_2 ^[13],再由CAT、POD将 H_2O_2 歧化成 H_2O 和 O_2 。在ROS含量急速提升的第1~2天,SOD活力也有不同程度的提升,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理第1天SOD活力达到峰值,上升1.74倍,说明适当浓度的外源ROS能激活大麻体内的SOD。此外抗氧化酶也是一种蛋白质,且SOD中有多个-SH基团^[14],易发生氧化反应,过量的 H_2O_2 氧化会破坏SOD的活性,导致了SOD呈现先上升后下降的趋势。

CAT的主要作用是消除 H_2O_2 。在胁迫处理的前2 d,CAT活力大幅上升且达到峰值,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 组CAT酶活力上升最大,提升了3.21倍,更高浓度的外源ROS对CAT活力的影响反而降低,而且在第3~4天,各组CAT活力均呈现下降趋势,可能是ROS

对于CAT产生破坏。CAT的结构中同样含有多个易发生氧化反应的-SH基团,稳定性较差^[14],高浓度的ROS氧化-SH成为-S-S-,也可导致CAT失活。另一个原因可能是大麻体内 H_2O_2 含量降低,同时对于CAT的需求量降低。

POD同样是主要清除 H_2O_2 的抗氧化酶,在外源 H_2O_2 处理的第0天,各组POD活力无明显变化,处理第1天开始,POD的活力呈现上升趋势,且在第1~3天,始终呈上升趋势,在第4天才出现轻微的下降。与CAT不同,POD在植物体内主要以糖蛋白形式存在,稳定性较强^[15],所以POD在较强的环境胁迫下仍能表现出较高的活力。此外,POD的催化反应需要供电子体(AH_2)的存在,当有足量的 AH_2 时,POD也能发挥较强的催化作用^[16]。

4.3 外源 H_2O_2 处理对大麻素合成基因表达及次生代谢产物含量的影响

Ols、Thcas、Cbdas为大麻素合成途径中3种关键酶。Ols是大麻素途径的第一个关键酶,主要将乙酰辅酶A转化生成戊基二羟基苯酸;Thcas可将大麻萜酚酸(CBGA)催化生成四氢大麻酸(THCA),以合成THC为主,同时合成微量的CBD;Cbdas可将CBGA催化生成CBDA,以合成CBD为主,同时合成微量的THC^[17]。THC与CBD是互为同分异构体的2种大麻素,两者生物合成途径高度重合,且由同一种底物CBGA合成而来。因此,这2种大麻素成分在大麻体内的含量总是有相似的变化趋势。蛋白质具有一定的空间结构,主要是氢键、盐键、酯键、二硫键、疏水相互作用、范德华力等维持,而ROS对这些因素均产生显著影响,因此能够作为信使调节次生代谢产物的基因表达和酶的活性,Ols、Thcas、Cbdas 3种酶的表达量分别提升了6.43、4.50、4.84倍,可促进大麻中的CBD、THC含量大幅度提升。

在20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源 H_2O_2 处理大麻苞片的第1天,CBD质量分数由2.73 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 提高到9.04 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,提高了2.31倍,达到峰值;THC质量分数由0.011 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 提高到0.025 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,提高了1.27倍,CBD提高的幅度远远高于THC。在处理第2天,大麻苞片中CBD质量分数由2.73 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 升到8.34 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,提高了2.05倍,提高幅度也较大,但THC质量分数由0.011 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 提高到0.038 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,提高了2.46倍,达到峰值。鉴于THC是大麻主要的精神毒性成分,故采用20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理1 d,可以使CBD与THC含量比最优,能够保

证药用安全。

大麻中CBD、THC均可作为POD的供电子体,此时大麻体内POD具有较高的活性,两者共同作用增强ROS的消除作用,使ROS含量趋于平衡。

5 结论

外源H₂O₂处理能够模拟环境胁迫,改变大麻抗氧化酶SOD、CAT、POD的活性,提升大麻素生物合成途径关键酶Ols、Cbdas、Thcas的基因表达量,使离体新鲜大麻苞片中有效成分CBD含量得到提升。20 μmol·L⁻¹ H₂O₂处理1 d,大麻苞片中CBD质量分数由2.73 mg·g⁻¹提升到9.04 mg·g⁻¹,提高了3.31倍,而THC质量分数提升幅度较小。通过H₂O₂对离体大麻苞片进行处理,能够在短期内提高植物大麻中的活性成分含量,提高大麻药材利用率。

参考文献

- [1] 贺海波,石孟琼. 大麻仁的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国民族民间医药,2010,19(15):56-57.
- [2] 弓佩含,杨洋,刘玉婷,等. 大麻化学成分及药理作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(13):212-219.
- [3] 常祥文,陈文茜,孙艳. 大麻的潜在医疗价值及使用风险[J]. 中国药物依赖性杂志,2020,29(3):161-168.
- [4] 宁康,董林林,李孟芝,等. 非精神活性药用大麻的应用及开发[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(8):228-240.
- [5] 孟祥才,李晓颖,姚杰,等. 生态胁迫促进道地药材质量形成机制与质量评价思路[J]. 中草药,2022,53(5):1587-1594.
- [6] 苏文华,张光飞,李秀华,等. 植物药材次生代谢产物的积累与环境的联系[J]. 中草药,2005,36(9):1415-1418.
- [7] 陈建华,臧巩固,赵立宁,等. 大麻化学成分研究进展与开发我国大麻资源的探讨[J]. 中国麻业,2003,25(6):266-271.
- [8] 徐芳杰. 过氧化氢作为信号分子在小麦耐铝性中的作用及机理[D]. 杭州:浙江大学,2011.
- [9] BIENERT G P, CHAUMONT F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide[J]. BBA-Gen Subj, 2014, 1840(5): 1596-1604.
- [10] 陈璇,张庆滢,郭蓉,等. 不同发育时期大麻素合成相关酶基因表达特征与大麻素含量的相关分析[J]. 分子植物育种,2018,16(2):583-590.
- [11] 李格,孟小庆,蔡敬,等. 活性氧在植物非生物胁迫响应中功能的研究进展[J]. 植物生理学报,2018,54(6): 951-959.
- [12] HASANUZZAMAN M, BHUYAN M H M B, PARVIN K, et al. Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8695.
- [13] 李璇,岳红,王升,等. 影响植物抗氧化酶活性的因素及其研究热点和现状[J]. 中国中药杂志,2013,38(7):973-978.
- [14] SHARMA P, JHA A, DUBEY R, et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions[J]. J Bot, 2012, 2012: 217037.
- [15] 田国忠,李怀方,裴维蕃. 植物过氧化物酶研究进展[J]. 武汉植物学研究,2001,19(4):332-344.
- [16] 林洁. 生物体内的活性氧清除系统——抗氧化酶[J]. 日本医学介绍,1994(7):293-294.
- [17] SUSUMU H, KATSUTOMO S, HIROYUKI I, et al. A large family of class III plant peroxidases[J]. Plant Cell Physiol, 2001(5): 462.

(收稿日期: 2022-08-08 编辑: 戴玮)