

槲皮素 - AAPH 氧化产物结构鉴定及其对 HepG2 细胞氧化还原状态的影响

温斐婷, 成向荣, 陈侃俊, 王菲, 乐国伟*, 施用晖 (江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要 [目的]探究 AAPH 诱导的槲皮素氧化产物对 HepG2 细胞氧化还原状态的影响。[方法]用紫外 - 可见波长扫描、HPLC - MS 方法分析 AAPH 和槲皮素在 37 °C 下反应 12 h 生成的产物结构;以槲皮素 - AAPH 反应产物处理 HepG2 细胞 24 h, 测定其对细胞存活率、ROS 水平及细胞总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、GSH/GSSG 比值及丙二醛(MDA)含量的影响,并测定 *Nrf2*、*Keap1*、*NQO1*、*Prdx1* 相关抗氧化基因的 mRNA 表达。[结果]AAPH 与槲皮素体系在反应 12 h 后于 294 nm 波长处有特征吸收,LC-MS 解析结果表明该体系反应生成了含 4 种主要氧化产物的混合物。与空白组相比,槲皮素与 AAPH 氧化产物孵育显著降低了细胞存活率,同时细胞内 ROS 水平和 MDA 含量升高,细胞内 T-AOC 水平、GSH-Px 及 SOD 活性显著降低,并显著下调 *Nrf2*、*NQO1*、*Prdx1* mRNA 表达,上调 *Keap1* mRNA 表达。[结论]槲皮素氧化产物可造成 HepG2 细胞出现氧化应激。

关键词 槲皮素;氧化产物;HepG2 细胞;氧化应激

中图分类号 Q2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)17-034-05

Structure Identification of the Quercetin Oxidation Products Induced by AAPH and Effects on the Redox State of HepG2 Cells

WEN Fei-ting, CHENG Xiang-rong, CHEN Kan-jun, LE Guo-wei* et al (School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122)

Abstract [Objective] The aim was to explore how the quercetin oxidation products induced by AAPH influence the redox state of HepG2 cells. [Method] Quercetin was mixed with AAPH as oxidant under 37 °C for 12 h. The structural characterization were analyzed by UV scan and LC-MS. HepG2 cells were treated with reaction product of quercetin-AAPH and incubated for 24 h. Viable cells were harvested, and the cell viability, ROS level, glutathione (GSH) and glutathione disulphide (GSSG) content, malandialdehyde (MDA) level, total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity were assayed with the appropriate test kits, the oxidant stress related genes were assayed by DNA microarray. [Result] The chromatogram showed peaks eluting at 294 nm after 12 h reaction and the structural analysis result indicated that mixture of four oxidation products were obtained in the reaction system. Compared with the blank group, Quercetin-AAPH oxidation products elevated the ROS and MDA generation, and reduced cell viability, T-AOC, CAT, GSH-Px and SOD and GSH/GSSG activity significantly. *Nrf2*, *NQO1*, *Prdx* expression level was down-regulated and *Keap1*, *Nox2*, *Cox2* expression level was up-regulated in the meanwhile. [Conclusion] These findings indicate that quercetin oxidation products could prompt HepG2 cells to generate more oxidative stress.

Key words Quercetin; Oxidation products; HepG2 cells; Oxidative stress

以槲皮素为代表的黄酮类物质是重要的植物化合物,其膳食摄入对人体心脑血管保护具有特殊意义^[1]。但随着研究的深入,已有不少体外评价实验和动物试验发现某些黄酮类化合物在高浓度、长时间作用时表现出生物毒性,且其毒性与促氧化作用密不可分^[2-3]。黄酮类化合物的还原形式主要起抗氧化作用,但其氧化形式半苯醌、苯醌和甲基醌有很强的促氧化作用,会导致谷胱甘肽(GSH)减少,与尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸[NAD(P)H]和其他细胞还原剂的协同氧化,并伴随活性氧(ROS)的产生^[4-5]。

有研究指出,槲皮素清除自由基的中间产物具有生物毒性,可能是导致高浓度槲皮素促氧化现象出现的原因之一。在清除自由基的过程中,槲皮素吸收 1 或 2 个·H 形成半苯醌和苯醌,而半苯醌和苯醌的活性形式可直接诱导 DNA 氧化损伤^[6]。此外,高浓度槲皮素(>0.2 mmol/L)会促进 O²⁻·和 H₂O₂ 的产生,导致活性酶 SH-基团的氧化^[7]。但目前直接针对槲皮素清除自由基过程中生成的氧化产物进行细胞毒性研究的报道较少。2,2-偶氮二(2-甲基丙基)二盐酸盐(AAPH)是常用的 ROS 诱导剂,能够在机体内持续稳定地促进 ROS 生成^[8]。笔者以 AAPH 作为氧化剂,模拟了槲皮素的自由基清除过程,并初步鉴定了两者在化学

体系中的反应产物结构,探究了该产物对 HepG2 细胞氧化还原状态的影响,旨在为探讨高浓度槲皮素促氧化倾向的潜在机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂。人肝癌细胞株 HepG2,中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所;槲皮素,美国 Sigma 公司;AAPH,上海阿拉丁生物科技公司;DMEM 培养基,美国 Gibco 公司;小牛血清,浙江省杭州四季青生物材料工程研究所;青霉素、链霉素、胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT)、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针,美国 Sigma 公司产品;CAT、SOD、MDA、T-AOC、GSH-PX 测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Trizol 试剂盒,上海生工生物工程公司;M-MLV 逆转录酶,Promega 公司;基因引物,上海捷瑞生物工程有限公司。

1.1.2 仪器。UV2300 双光束紫外可见分光光度计,上海天美科学仪器有限公司;高效液相色谱(HPLC)仪、质谱(MS)仪,美国 Waters 公司;二氧化碳恒温细胞培养箱,Thermo 公司;7900 HT Fast Real-Time PCR 仪,美国 ABI 公司;5804R 台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 槲皮素 - AAPH 氧化产物制备及紫外扫描。取槲皮素 100 μmol/L 与 AAPH 600 μmol/L 于 37 °C 水浴反应,分别于 0、3、6、9、12 h 取样,进行紫外 - 可见光全波长扫描(200 ~

作者简介 温斐婷(1990-),女,广西玉林人,硕士研究生,研究方向:营养与功能因子。*通讯作者,教授,博士,从事营养与功能因子研究。

收稿日期 2016-04-26

600 nm), 确定槲皮素氧化产物的特征吸收波长。

按 Q: AAPH = 1: 6 的浓度比, 取槲皮素 5 mmol/L 与 AAPH 30 mmol/L 于 37 °C 水浴, 分别于 0、6、9、12 h 取样进行高效液相色谱测定。

1.2.2 高效液相色谱条件及质谱条件。 高效液相色谱仪, Waters Acquity UPLC; 检测器: Waters Acquity PDA; 色谱柱: BEH - C₁₈ (250.0 mm × 4.6 mm); 流动相 A: 甲醇; 流动相 B: 0.1% 甲酸; 流动相的等度洗脱条件为: 45% B + 55% A (20 min); 检测波长为 200 ~ 600 nm; 分析波长为 294 nm; 进样量为 10 μL; 流速 0.3 mL/min; 柱温保持在 37 °C。

质谱离子方式为负离子; 毛细管电压: 3.0 kV; 锥孔电压: 20 V; 离子源温度: 100 °C; 溶剂温度: 250 °C; 脱溶剂气体流速: 500 L/h。锥孔气体流速: 50 L/h, 碰撞能量: 30 eV, 质量范围: 50 ~ 1 500 m/z; 检测器电压: 1 700 V。

1.2.3 细胞培养。 HepG2 细胞培养于含有 10% 小牛血清、100 U/L 青霉素、100 g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中常规培养。待细胞长至 80% 融合时, 弃去旧培养基, 加入 3 mL 0.25% 胰蛋白酶消化液消化, 按 1 × 10⁶ 个/板转入培养皿。

1.2.4 试验分组及处理。 槲皮素 5 mmol/L 与 AAPH 30 mmol/L 于 37 °C 水浴反应 9 h, 制备槲皮素 - AAPH 氧化产物。细胞贴壁后分别采用不同条件处理, 试验分组如下: 正常对照组 (CON), 槲皮素氧化产物处理组 0.1 μmol/L (Q00.1)、1.0 μmol/L (Q01)、10.0 μmol/L (Q010)、50.0 μmol/L (Q050)、100.0 μmol/L (Q0100)、200.0 μmol/L (Q0200)、300.0 μmol/L (Q0300)。

1.2.5 MTT 法测定细胞存活率。 HepG2 细胞以 8 000 个/孔接种于 96 孔板, 贴壁 24 h 后, 换无血清培养基, 分别加入 0.1、1.0、10.0、50.0、100.0、200.0、300.0 μmol/L 槲皮素氧化产物, 继续培养 6、12、24、48 h 后, 加入 0.5 mg/mL MTT, 孵育 4 h。以 150 μL DMSO 溶解沉淀, 在 525 nm 波长下测定吸光度。

存活率 = 试验组 OD 值 / 正常对照组 OD 值 × 100%

1.2.6 DCFH - DA 法测定活性氧自由基 (ROS)。 细胞分别加入 0.1、1.0、10.0、50.0、100.0 μmol/L 槲皮素氧化产物, 继续培养 12、24、48 h 后, 每孔加入 100 μL 终浓度为 10.0 μmol/L 的 DCFH - DA 探针, 避光孵育 30 min, M5 荧光酶标仪检测细胞荧光强度 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)。

ROS 水平 = (试验组荧光值 / 试验组细胞存活率) / (正常对照组荧光值 / 正常对照组细胞存活率)

1.2.7 抗氧化酶活性测定。 HepG2 细胞以 1.7 × 10⁵ 个/孔浓度接种于 6 孔板中, 分组及处理同“1.2.6”, 孵育结束后加 RPMI 细胞裂解液 150 μL 于冰上裂解细胞, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 收集细胞上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度。细胞内 T - AOC、GSH - Px、SOD 及 MDA 含量均按照试剂盒说明书测定。

1.2.8 qRT - PCR 检测基因 mRNA 表达。 Trizol 法提取细胞总 RNA, 反转录为 cDNA, -20 °C 保存。qRT - PCR 测定

相关基因的 mRNA 水平。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 20 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 72 °C 终末延伸 2 min, 循环 40 次。基因引物序列见表 1。

表 1 基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of gene

基因名称 Gene name	上下游引物 Upstream and downstream primers
<i>β-actin</i>	Forward: GGGTCAGAAGGACTCCTATG Reverse: GTAACAATGCCATGTTCAAT
<i>NQO-1</i>	Forward: GTGGTGGAGTCGGACCTCTATG Reverse: AAGCCAGAACAGACTCGGCAG
<i>Nrf-2</i>	Forward: GATGGGTGGACTGGTGGTGGTT Reverse: CTCTCGGACCGGCCTGATTTCT
<i>Keap1</i>	Forward: CCATCGGCATCGCCAATT Reverse: AGTTGGCACTGGACAGGTTGA
<i>Prdx</i>	Forward: CCCACGGAGATCATTGCTTTC Reverse: GGTCCAGTCTCTTGTTC

1.2.9 数据处理。 试验结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 应用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析, 并应用 Tukey 法检验进行组间比较。

2 结果与分析

2.1 槲皮素 - AAPH 氧化产物结构鉴定 槲皮素 100.0 μmol/L 与 600.0 μmol/L AAPH 于 37 °C 水浴反应, 溶液经过紫外 - 可见分光光度计全波长扫描后所得图谱如图 1 所示, 随着反应时间增加, 槲皮素在 254 和 374 nm 处的特征吸收峰吸光值持续下降, 而 294 nm 处的吸收持续上升, 在 12 h 后可看到明显的吸收峰, 表明新生成的槲皮素氧化产物紫外特征吸收波长为 294 nm。

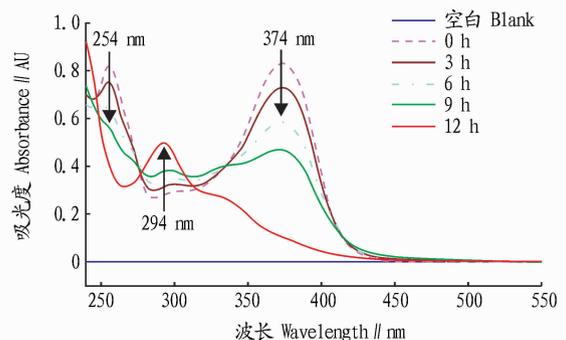


图 1 槲皮素氧化产物紫外 - 可见全波长扫描图谱

Fig. 1 UV-vis spectra of quercetin oxidation

由图 2、3 可见, 随着反应时间增加, 在 2.07、2.67、3.97、6.57 min 4 个时间点峰面积都增加, 表明这几个时间点是槲皮素氧化产物的特征出峰时间。选取高效液相色谱图谱中 4 个特征峰进行物质分析, 结果如图 4 所示, 2.07 和 3.97 min 的物质为槲皮素被氧化后, 在 A 环发生裂解后 B 环和 C 环分别加氢生成的产物, 分子量分别为 154 和 170。2.67 min 的物质为槲皮素 A 环的双键被氧化, 分别加合上甲氧基和氧的产物, 分子量为 350。6.57 min 的物质为槲皮素 B 环上的 2 个羟基脱掉 2 个氢生成的邻醌, 分子量为 300。

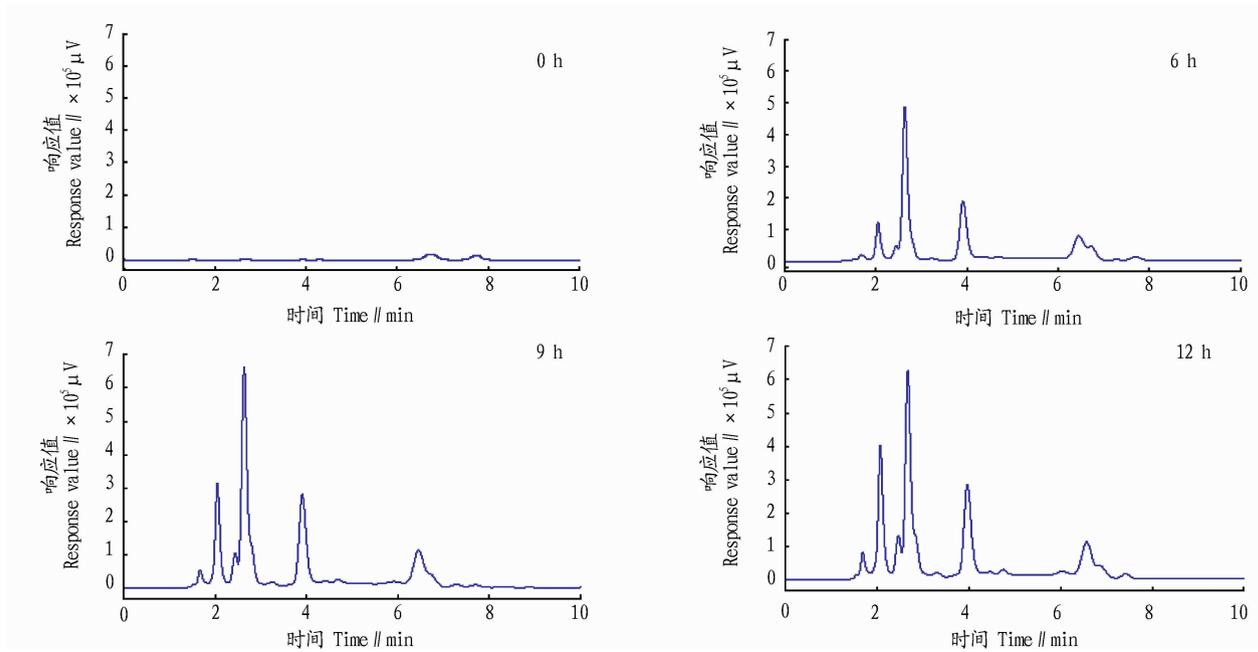
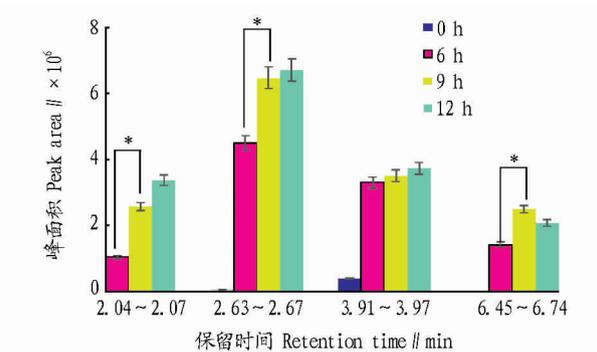


图2 槲皮素-AAPH反应不同时间产物的高效液相图谱

Fig.2 HPLC chromatogram on each reaction time of quercetin oxidation products



注: * 表示两组间存在显著差异。

Note: * stands for significant difference between two groups.

图3 槲皮素-AAPH氧化产物液相不同保留时间的峰面积变化

Fig.3 Changes of peak areas on each retention time in HPLC chromatogram of quercetin oxidation products

2.2 槲皮素氧化产物对细胞存活率及 ROS 水平的影响

正常生理状况下,细胞内 ROS 生成和清除处于动态平衡,但是一旦抗氧化功能降低或者 ROS 过多都能引起细胞氧化应激使细胞受到损伤。用不同浓度的槲皮素氧化产物分别对 HepG2 细胞进行孵育,孵育 6 h 后,与对照组相比,低浓度的槲皮素氧化产物组细胞存活率未发生显著变化,但氧化产物 200.0 和 300.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下细胞存活率显著下降,且时间越长,下降越显著;孵育 24 h 后,300.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组细胞存活率降至 70.34%。随着孵育时间的增加,较低浓度的氧化产物也使细胞存活率显著降低;孵育 48 h 后,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下存活率下降显著,半数致死剂量为 300.0 $\mu\text{mol/L}$ 。0.1、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的低浓度槲皮素氧化产物孵育 12 h,细胞 ROS 水平与空白组相比无显著差异,但随着槲皮素氧化产物浓度和作用时间的增加,细胞 ROS 水平极显著增加(图 5)。说明高浓度的槲皮素氧化产物能使细胞

在短时间内出现较大死亡,而低浓度在长时间孵育下也能够造成细胞一定程度的死亡。

2.3 槲皮素氧化产物对细胞氧化还原状态的影响

SOD、GSH-Px 是细胞受到外界刺激产生的内源性的抗氧化酶类,清除胞内活性氧物质,对维持氧化与抗氧化平衡起着重要作用,其活性可间接反映细胞内氧化应激水平^[9-10]。T-AOC 能全面衡量机体防御体系氧化还原状态。MDA 是细胞膜脂质被活性氧化后的产物,是评价细胞氧化损伤程度的重要标志物,其升高可直接反映受到的氧化应激损伤。

由图 6 可知,槲皮素氧化产物孵育细胞 12 h 后,0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 低、中浓度组中细胞 T-AOC 水平与 SOD 活力相较 CK 组无显著变化,100.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组有轻微下降。但随孵育时间延长,T-AOC 水平出现显著下降,连续孵育 48 h 后,低浓度组细胞内 SOD 活力也显著下降。与 CK 组相比,50.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 高浓度组中细胞 T-AOC 水平在 12 h 孵育后即出现显著下降。

0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 低、中浓度的槲皮素氧化产物孵育 12 h,细胞内 GSH-Px 活力较 CK 组显著增加;但随孵育时间延长,酶活力下降,24 h 时 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组的 GSH-Px 活力已低于 CK 组水平;当孵育 48 h 时,细胞内 GSH-Px 活性出现急剧下降。和低浓度组不同,100.0 $\mu\text{mol/L}$ 高浓度组中细胞 GSH-Px 活力则是在 12 h 孵育后即出现显著下降。产生这种现象的原因可能是由于低浓度的槲皮素氧化产物在短时间孵育的条件下并未对细胞造成较大影响,细胞内少量的 ROS 导致 GSH-Px 活性出现应激性的上调。但在孵育 48 h 后,ROS 产生量超过了细胞的清除能力,GSH-Px 活性受到抑制,10.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组酶活出现急剧下降。

细胞内 MDA 含量则随着加入的槲皮素氧化产物浓度的升高而升高,并与孵育时间成正比,提示槲皮素氧化产物浓

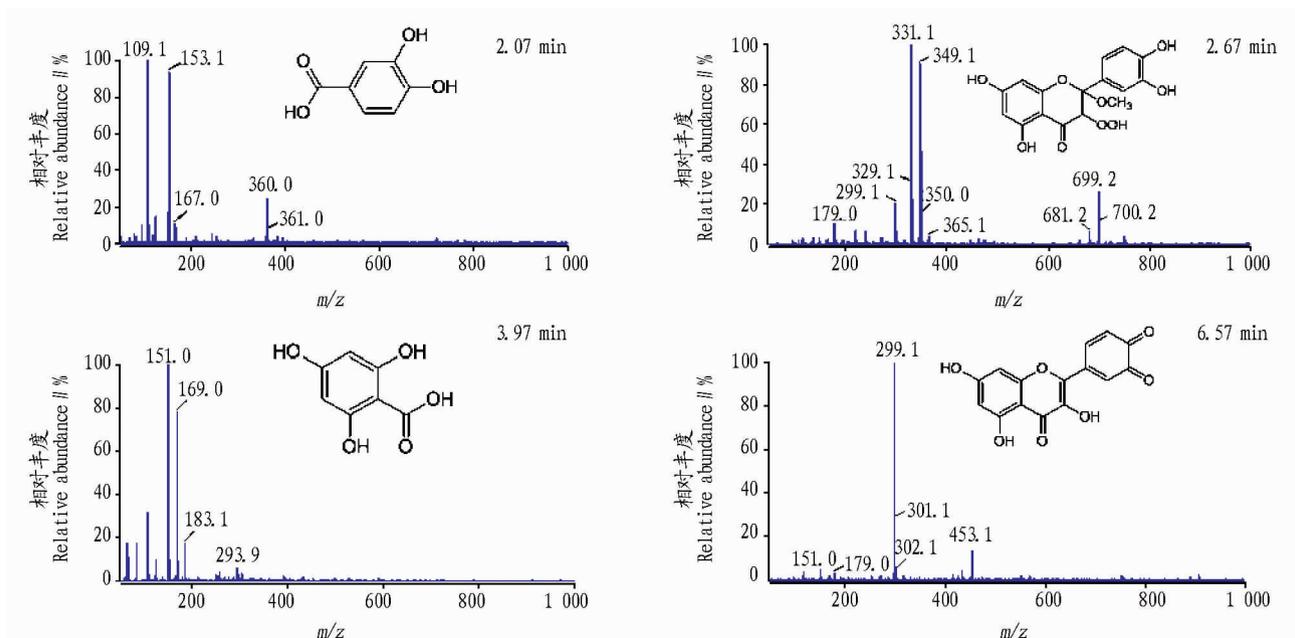


图4 槲皮素氧化产物特征峰的 MS 分析

Fig.4 MS spectrum of fractions at different retention time from HPLC

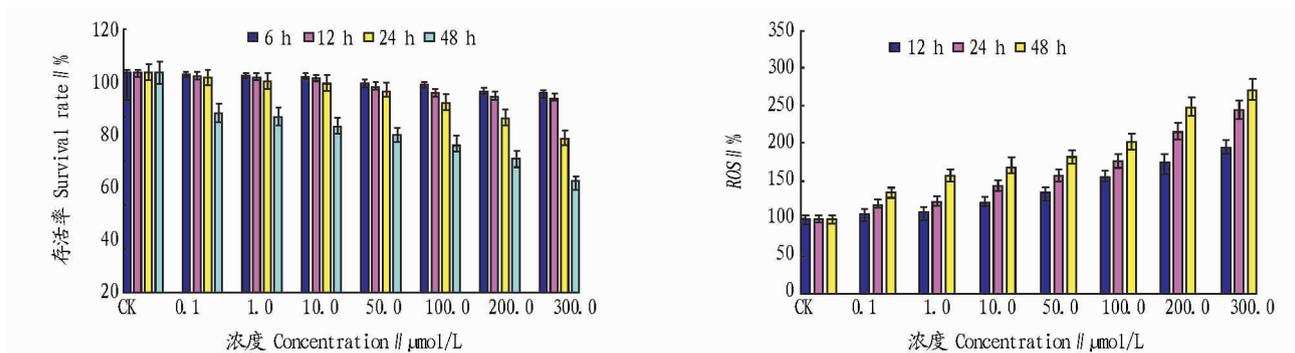


图5 槲皮素氧化产物对 HepG2 细胞存活率及 ROS 水平的影响

Fig.5 The influence of quercetin oxidation products to HepG2 cell viability and the ROS

度的升高和孵育时间的增长均造成了细胞内脂肪氧化加剧,进一步说明细胞内抗氧化机制已经不能清除 ROS,细胞内形成了氧化应激。

2.4 槲皮素及其氧化产物对细胞氧化还原相关 mRNA 表达的影响 ROS 能够损伤细胞内大分子物质并破坏其生理功能,为了缓解细胞所遭受的损伤,细胞内存在一整套复杂的氧化应激应答系统。转录调节因子核细胞因子 2 相关因子(*Nrf2*)是细胞抵抗氧化应激反应的关键基因,与 Keap1 作用,转录翻译产生一些抗氧化物,如 SOD、血红素氧合酶(HO-1)、NADPH 苯醌氧化还原酶 1(NQO-1)等 II 相解毒酶,以及过氧化还原酶(Prdx)、金属硫蛋白(MT-1)等抗氧化酶,从而对抗 ROS 引发的氧化应激,保护正常细胞不受破坏^[11-13]。该研究对 *Nrf2* 以及其部分下游靶基因 mRNA 表达。

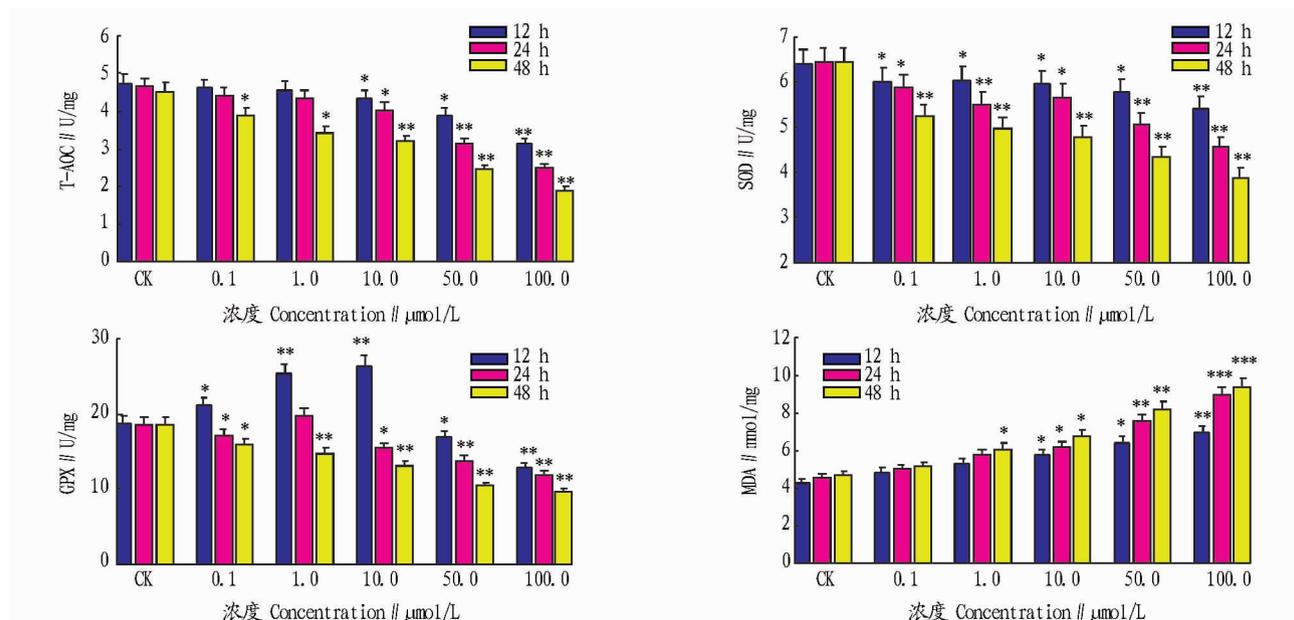
由图 7 可知,在与槲皮素氧化产物共同孵育 24 h 后,1.0 与 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 低浓度组细胞中 *Nrf2* 基因表达出现显著上调,而 50.0 与 100.0 $\mu\text{mol/L}$ 高浓度组细胞中 *Nrf2* 出现显著下调,说明在长时间作用下,低浓度槲皮素氧化产物造成细

胞出现氧化应激,*Nrf2* 代偿性表达上调,但高浓度槲皮素氧化产物则直接抑制了 *Nrf2* 的表达。而细胞中 *Keap1* 基因表达均由于槲皮素氧化产物的加入而显著上调,并随着其浓度的升高上调越显著。

NADPH 苯醌氧化还原酶 1(NQO-1)^[11] 可借助 NADP 催化体内醌类化合物发生还原反应。由图 7 可知,低浓度的槲皮素氧化产物可以显著上调 NQO-1 的表达,而 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 的氧化产物对 NQO-1 的影响与 CK 组无显著差异,100.0 $\mu\text{mol/L}$ 组则显著下调 NQO-1 的表达。过氧化物还原酶(Prdx)在细胞中的氧化还原状态调节中起着重要作用。过氧化物还原酶是通过硫氧还蛋白系统清除细胞内新陈代谢所产生的过氧化物^[14]。图 7 显示,槲皮素氧化产物低浓度组均造成了细胞内 Prdx 表达的显著升高,提示该试验条件下造成了细胞出现氧化应激。而高浓度的槲皮素氧化产物则对细胞内 Prdx 基因表达出现下调。

3 结论

通过紫外-可见分光光谱和 LC-MS 法初步鉴定了槲皮素 - AAPH 氧化产物的结构,并测定了槲皮素氧化产物对

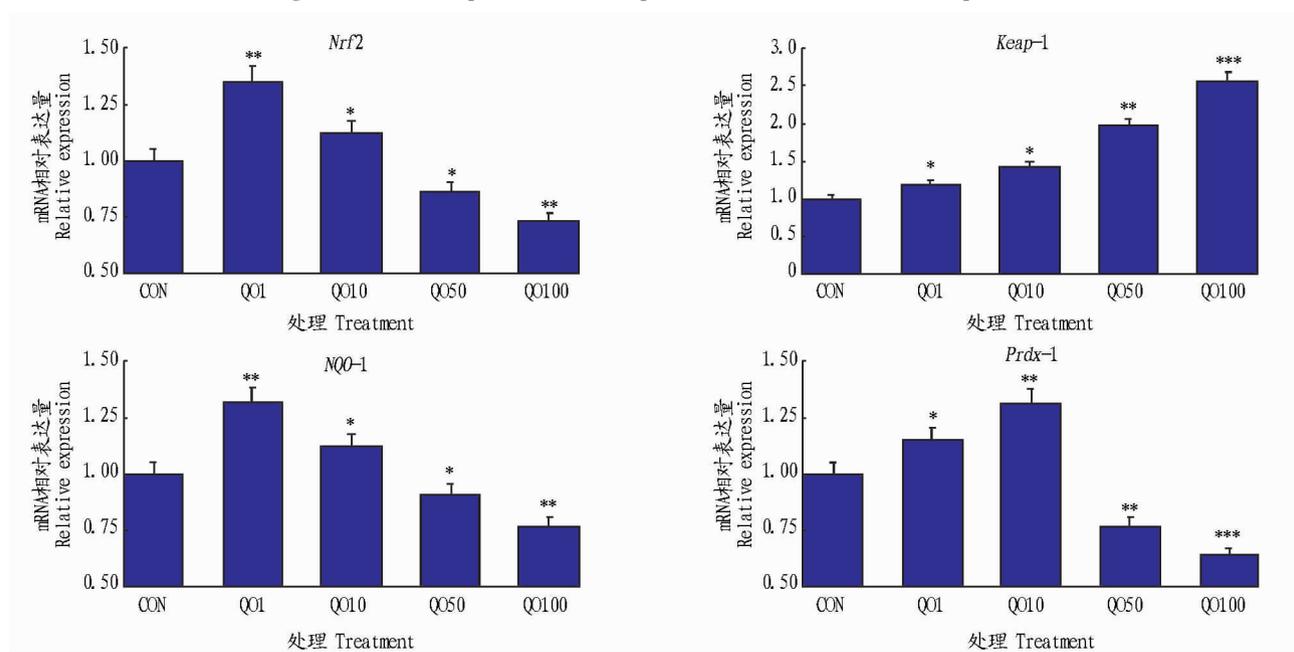


注: * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$; *** 表示 $P < 0.001$ 。

Note: * stands for $P < 0.05$; ** stands for $P < 0.01$; *** stands for $P < 0.001$.

图6 槲皮素氧化产物对 HepG2 细胞氧化还原状态的影响

Fig. 6 The effect of quercetin oxidation products on antioxidant index of HepG2 cell



注: * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$; *** 表示 $P < 0.001$ 。

Note: * stands for $P < 0.05$; ** stands for $P < 0.01$; *** stands for $P < 0.001$.

图7 槲皮素氧化产物对 HepG2 细胞 *Nrf2*、*Keap-1*、*NQO-1* 及 *Prdx* 表达的影响

Fig. 7 The influence of quercetin oxidation products to *Nrf2*, *Keap-1*, *NQO-1* and *Prdx* expression of HepG2 cell

HepG2 细胞存活率和自由基水平的影响,以及氧化还原状态、抗氧化通路相关基因的测定。结果表明,槲皮素氧化产物会加剧细胞的氧化应激,具有一定的细胞毒性,高浓度的槲皮素有可能是通过其在清除自由基过程中形成的大量氧化产物而造成促氧化现象的出现。

参考文献

[1] 陆柏益,张英,吴晓琴. 黄酮类化合物的潜在毒性作用[J]. 中国中药杂志,2006,31(7):533-536.

- [2] 汤立建,赵良才,李庆林,等. 黄酮类化合物抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. 中国中药杂志,2007,32(1):21-26.
- [3] 汪何雅,赵显峰,王茵,等. 黄酮类化合物的潜在毒性[J]. 卫生研究,2007,36(5):640-642.
- [4] NEMEIKAITĖ-CENIENĖ A, IMBRASAITĖ A. Quantitative structure-activity relationships in prooxidant cytotoxicity of poly-phenols; Role of potential of phenoxyl radical/phenol redoxcouple[J]. Arch Biochem Biophys, 2005,441(2):182-190.
- [5] FUKUMOTO L R, MAZZA G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds[J]. J Agric Food Chem, 2000,48(8):3597-3604.

(下转第 43 页)

表 2 各栽培密度下高粱产量及产量性状

Table 2 Yields and yield traits of sorghum Jiza141 under different cultivation densities

处理 Treatment	产量 Yield//kg/hm ²	千粒重 1 000-grain weight//g	生物产量 Biomass kg/hm ²	株高 Plant length cm	穗长 Ear length cm	穗粗 Ear diameter cm	单穗重 Single panicle weight//g
D ₁	8 846.67 ± 0.30b	27.35 ± 0.31a	20 442.35 ± 0.64e	101.87 ± 0.27a	24.24 ± 0.73a	13.74 ± 0.35a	74.56 ± 0.34b
D ₂	9 203.36 ± 0.15a	26.98 ± 0.44a	21 924.91 ± 0.21d	102.48 ± 0.46a	22.87 ± 0.91a	12.17 ± 0.15a	82.64 ± 0.31a
D ₃	9 006.37 ± 0.45a	23.54 ± 0.41b	22 885.28 ± 0.56c	102.21 ± 0.80a	19.41 ± 0.52b	13.24 ± 0.15a	71.32 ± 0.35b
D ₄	8 313.67 ± 0.34b	22.75 ± 0.52b	23 524.35 ± 0.14b	101.23 ± 0.42a	16.64 ± 0.34c	12.93 ± 0.45a	66.46 ± 0.35c
D ₅	7 421.33 ± 0.52c	19.07 ± 0.24c	24 593.38 ± 0.54a	103.54 ± 0.24a	16.24 ± 0.88c	11.04 ± 0.21b	56.35 ± 0.37d

注:同列数据后小写字母不同表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Different lowercases in the same row indicated significant differences at 0.05 level.

重要指标,同时也能反映群体的叶面积发展动态,进而影响光合效率,所以研究高粱叶面积指数对提高产量具有重要意义。该研究表明,叶面积指数随着栽培密度的增加而提高,但在生育后期高密度处理使叶面积指数自开花之后急剧下降。这与王岩等研究结果一致^[16-17]。也有研究结果表明,叶面积指数在开花前期就达到最高水平,这可能与品种、种植地点以及环境气候条件有关。

(2)叶绿素含量直接影响叶片的光合效率。该试验中低密度处理叶绿素含量高于高密度处理叶绿素含量,这可能是由于品种差异造成的,栽培密度越小,植株之间养分竞争越小,个体植株长势强于高密度处理植株个体,形成了良好的群体结构,充分发挥了光能利用效率。

(3)光合势就是植物进行光合生产的绿叶面积的积数,与叶面积指数有密切关系。该研究表明,高粱的叶片光合势随着栽培密度的增加而增加,说明栽培密度对叶片光合势影响较大,这与马国胜等^[18]的研究结果相一致。

该研究综合群体叶面积、光合势、叶绿素含量等群体生理指标及产量因素等特点,初步明确了高粱吉杂 141 在佳木斯地区采用平播方式适宜栽培密度为 20 万株/hm²,平均产量达 9 203.36 kg/hm²,可较好地发挥高粱产量优势,获得较高的籽粒产量水平。

参考文献

- [1] 邹剑秋. 中国高粱生产与前景展望[M]//柴岩,万福世. 中国小杂粮发展报告[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2007:44-51.
- [2] 胡萌. 密度对春玉米光合与衰老生理及产量的影响[D]. 哈尔滨:东北

农业大学,2009.

- [3] OGUNLELA V B, OKOH P N. Response of three sorghum varieties to N supply and plant density in a tropical environment[J]. Fertilizer research, 1989, 21(2): 67-74.
- [4] 刘贵锋, 白文斌, 赵建武, 等. 旱地不同种植密度对中晚熟矮秆高粱品种农艺性状及产量的影响[J]. 农学学报, 2012, 2(5): 32-35.
- [5] 汪由, 王恩杰, 王岩, 等. 种植密度对高粱食用杂交种辽杂 13 生长发育及产量的影响[J]. 辽宁农业科学, 2010(6): 24-27.
- [6] XIN Z, AIKEN R, BRUKE J. Genetic diversity of transpiration efficiency in sorghum[J]. Field crop research, 2009(1/2): 74-80.
- [7] 刘贵锋, 白文斌, 赵建武, 等. 旱地不同种植密度对中晚熟矮秆高粱品种农艺性状及产量的影响[J]. 农学学报, 2012, 2(5): 32-35.
- [8] 李世忠, 谢应忠, 徐坤. 国内外禾本科牧草种子生产的研究进展[J]. 中国种业, 2005(7): 17-19.
- [9] 韩建国, 毛培胜. 牧草种子生产的地域性[M]//洪绶曾, 任继周. 草业与西部大开发. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [10] 韩建国. 实用牧草种子学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997.
- [11] 房丽宁, 韩建国, 王培, 等. 施肥及生长调节剂对高羊茅种子产量的影响[J]. 草地学报, 2000, 8(3): 164-170.
- [12] 李宁, 翟志席, 李建民, 等. 播期与密度组合对夏玉米群体源库关系及冠层透光率的影响[J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(5): 959-964.
- [13] 李培岭, 张富全, 贾运岗. 交替沟灌灌溉棉花群体生理指标的水氮耦合效应[J]. 中国农业科学, 2010, 43(1): 206-214.
- [14] 马国胜, 薛吉全, 路海东, 等. 播种时期与密度对关中灌区夏玉米群体生理指标的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(6): 1247-1253.
- [15] SHARIFI R S, HAMLABAD H B, AZIMI J. Plant population influence on the physiological indices of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars [J]. International research journal of plant science, 2011, 2(5): 137-142.
- [16] 王岩, 黄瑞冬. 种植密度对甜高粱生长发育、产量及含糖量的影响[J]. 作物杂志, 2008(3): 49-51.
- [17] 杨楠, 丁玉川, 焦晓燕, 等. 种植密度对高粱群体生理指标、产量及其构成因素的影响[J]. 农学学报, 2013, 3(7): 11-17.
- [18] 马国胜, 薛吉全, 路海东, 等. 播种时期与密度对关中灌区夏玉米群体生理指标的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(6): 1247-1253.

(上接第 38 页)

- [6] FIORUCCI S, GOLEBIOWSKI J, CABROL-BASS D, et al. DFT study of quercetin activated forms involved in antiradical, antioxidant, and prooxidant biological processes[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(3): 903-911.
- [7] SCHMALHAUSEN E V, ZHLOBEK E B, SHALOVA I N, et al. Antioxidant and prooxidant effects of quercetin on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. Food Chem Toxicol, 2007, 45(10): 1988-1993.
- [8] BELLOMO G, VAIRETTI M, STIVALA L, et al. Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes [J]. Proceedings of national academy of science USA, 1992, 89: 4412-4416.
- [9] SUGINO N. The role of oxygen radical-mediated signaling pathway in endosome function[J]. Placenta, 2007, 28: 133-136.
- [10] ANDRIANTSITOHAINA R, DULUC L, GARCIA-RODRIGUEZ J C, et al. Systems biology of antioxidants [J]. Clinical science, 2012, 123(3):

173-192.

- [11] KOBAYASHI A, OHTA T, YAMAMOTO M. Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes [J]. Methods in enzymology, 2003, 378: 273-286.
- [12] ALEKSUNES L M, KNIGHT T R, KLAASSEN C D, et al. Nuclear factor- κ B-related factor 2 expression in liver is critical for induction of nad(p)h: Quinone oxidoreductase 1 during cholestasis [J]. Cell stress & chaperones, 2006, 11(4): 356-363.
- [13] KOBAYASHI M, YAMAMOTO M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species [J]. Adv Enzyme Regul, 2006, 46: 113-140.
- [14] NEUMANN C A, KRAUSE D S, CARMAN C V, et al. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression [J]. Nature, 2003, 424(6948): 561-565.