

# 黄芩悬浮细胞培养过程中黄芩苷含量与 苯丙氨酸解氨酶活性分析

张东向, 赵 静, 刘丽杰, 焦战战, 张令昂, 毕 宇

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘 要:**以黄芩悬浮细胞为试材,研究了悬浮培养过程中黄芩苷含量与苯丙氨酸解氨酶活性变化,采用均匀设计法分析了不同激素对比对黄芩生物量积累的影响。结果表明:黄芩细胞悬浮系生长呈较典型的“S形”曲线,黄芩苷变化与生物量积累基本一致;在黄芩悬浮培养周期中,苯丙氨酸解氨酶的活性强弱与黄芩苷的积累有一定相关性,培养第12天时活性最强。经均匀设计实验法得到最适宜黄芩悬浮培养生物量积累的激素配比为MS培养基附加6-BA 0.75 mg/L, NAA 0.5 mg/L, KT 1.5 mg/L。

**关键词:**黄芩;悬浮细胞培养;黄芩苷;PAL;均匀设计

**中图分类号:**R 284 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0155-04

中药黄芩(*Scutellaria baicalensis*)为唇形科多年生草本植物,又名子芩、条芩、山茶根、黄金银条、香水水草等,是一种常用中草药,在我国有几千年的使用历史,被《神农本草经》所记载并将其列为中品。黄芩具有清热燥湿,泻火解毒,止血安胎等功效<sup>[1]</sup>。苯丙氨酸解氨酶(PAL)广泛存在于高等植物、酵母、菌类的可溶性部分,可以催化苯丙烷类代谢途径的第1步反应,是莽草酸代谢途径中苯丙烷类的关键酶和限速酶。对于次生代谢产物的产生有重要的标志作用。张宽朝等<sup>[2]</sup>总结了PAL基因作用机制、表达模式。该研究为了进一步探索黄芩苷生物合成与PAL活性之间的相互关系,测量了黄芩悬浮培养生物量、黄芩苷含量、PAL活性,分析了黄芩悬浮培养周期中黄芩苷积累与PAL活性的相关性,并采用均匀设计方案研究了适于黄芩悬浮细胞生物量积累的适宜条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试黄芩种子购自河北省安国市药材市场,由齐齐哈尔大学植物生理及代谢实验室栽培。

仪器:所使用的仪器包括HP1500GS-B型全智能人

工气候植物箱(上海精密仪器有限公司);回转式恒温调速摇瓶柜(上海皓庄仪器有限公司);T6型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);HERMLE-Z-323K型高冷速冻离心机(北京乾明基因技术有限公司)。

培养基:从黄芩无菌苗诱导获得的愈伤组织,经继代培养,选择均一性良好、结构松散的细胞进行悬浮培养。继代培养基为MS培养基附加2.0 mg/L 6-BA、0.2 mg/L 2,4-D、3%蔗糖、调pH 5.8,在回转式恒温调速摇瓶柜上(25±1)℃暗培养,转速120 r/min。

### 1.2 试验方法

1.2.1 均匀设计实验 采用 $U_9(9^4)$ 均匀设计表及 $U_9(9^4)$ 使用表<sup>[10]</sup>,选取2,4-D、6-BA、NAA、KT 4种激素的不同配比进行4因素9水平的试验(表1),以筛选不同激素下培养黄芩悬浮细胞生物量积累的最佳培养条件。

表1  $U_9(9^4)$ 均匀设计因素水平

Table 1  $U_9(9^4)$  uniform design of factors and levels

水平		2,4-D	6-BA	NAA	KT
		/mg · L <sup>-1</sup>	/mg · L <sup>-1</sup>	/mg · L <sup>-1</sup>	/mg · L <sup>-1</sup>
1	A	0.00	0.75	0.50	1.50
2	B	0.50	1.75	1.50	1.00
3	C	1.00	0.50	2.50	0.50
4	D	1.50	1.50	3.50	0.00
5	E	2.00	0.25	0.00	1.75
6	F	2.50	1.25	1.00	1.25
7	G	3.00	0.00	2.00	0.75
8	H	3.50	1.00	3.00	0.25
9	I	4.00	2.00	4.00	2.00

**第一作者简介:**张东向(1963-),男,硕士,教授,硕士生导师,现主要从事植物生理及植物细胞工程等研究工作。E-mail: zhang-dx1019@163.com.

**基金项目:**黑龙江省自然科学基金资助项目(C201013)。

**收稿日期:**2014-05-04

1.2.2 标准曲线的绘制 精确称量黄芩苷标准品 0.1 g, 用 60%乙醇定容至 100 mL, 制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, 然后用移液管分别移取上述标准溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 用 60%乙醇定容成浓度分别为 5、10、15、20、25、30  $\mu\text{g/mL}$  的溶液。用紫外分光光度计在 278 nm 处测定上述溶液的吸光度, 并绘制吸光度-溶液浓度标准曲线。根据标准曲线, 求出线性方程为  $Y=0.5201X+0.0661$  ( $X$  代表黄芩苷含量,  $Y$  代表吸光值)。

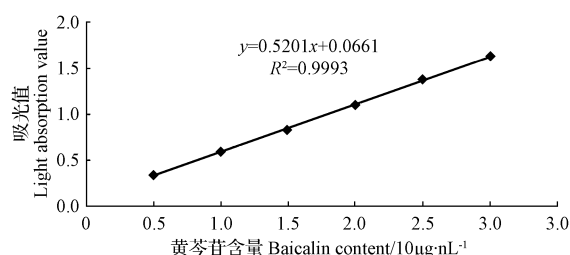


图1 黄芩苷标准曲线

Fig. 1 The standard curve of baicalin

1.2.3 黄芩悬浮培养过程中苯丙氨酸解氨酶活性的变化分析 无菌称量 1.0 g 生长良好的、继代 3~4 次、疏松的淡黄色愈伤组织, 将其转入 100 mL 三角瓶中, 其中含有培养液为 30 mL MS 液体培养基。摇瓶培养, 每 4 d 取样 1 次, 测定黄芩悬浮培养中黄芩细胞的苯丙氨酸解氨酶活性, 重复 3 次试验, 试验结果取平均值。取黄芩细胞悬浮液, 真空泵抽滤。每 0.2 g 培养物加 1 mL 0.1 mol/L、pH 8.8 的硼酸缓冲液、0.02 g PVP, 其中缓冲液内含有 5 mmol/L 巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA 冰浴研磨成浆, 1 000 r/min, 4℃ 离心 15 min, 取上清液为粗酶提取液<sup>[3]</sup>。取 4 支 10 mL 试管(3 支为测试管, 1 支作为对照), 分别加入 0.02 mol/L L-苯丙氨酸 1.0 mL、pH 8.8 硼酸缓冲液 2.0 mL、酶液 1.0 mL(根据酶活性适当稀释或增加体积), 总体积 4.0 mL, 摇匀后置 30℃ 恒温水浴保温 60 min, 加 0.2 mL 6 mol/L 盐酸终止反应, 若有沉淀需过滤或离心。在 290 nm 处检测测定管反应液的吸光度  $A_{290}$ <sup>[3]</sup>。以测定管反应液每小时  $A_{290}$  增加 0.01 为 1 个酶活性单位(U): PAL 活性 ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) =  $(A_{290} \times V_t \times v) / (0.01 \times V_s \times \text{FW} \times t)$ , 式中:  $V_t$  为酶液总体积(mL);  $\text{FW}$  为样品鲜重(g);  $V_s$  为测定时取酶液的量(mL);  $v$  为反应液总体积(mL);  $t$  为反应时间(h)。

### 1.3 项目测定

黄芩悬浮培养生物量及黄芩苷含量的测定 无菌称量 1.0 g 生长良好的、继代 3~4 次、疏松的淡黄色愈伤

组织, 将其转入 100 mL 三角瓶中, 其中含有 30 mL MS 液体培养基。摇瓶培养, 每 4 d 取样 1 次, 测定黄芩悬浮培养中黄芩细胞的生物量变化, 3 次重复, 取平均值。

每 4 d 取样 1 次, 精确称取在 60℃ 烘干至恒重的黄芩悬浮干细胞粉末, 加入 10 mL 50% 乙醇, 60℃, 温浴 6.5~7 h 提取, 冷却后用 50% 乙醇定容。用蒸馏水稀释适当倍数, 摇匀, 作为待检样。用 T6 系列紫外可见分光光度计在 278 nm 处测光密度(OD)值。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄芩悬浮细胞系培养过程中生物量及黄芩苷含量的变化

从图 2 可以看出, 黄芩悬浮细胞系生长曲线基本呈“S 型”曲线, 可划分为 4 个时期: 0~8 d, 细胞生长缓慢; 8 d 后进入对数生长期, 此时细胞增长速度加快; 第 16 天细胞增长到最大值, 细胞培养物鲜重可达 0.196 g/瓶; 到培养的第 20 天细胞生物量有所下降, 可能与底物接近耗尽、细胞开始老化有关。最佳收获期应该在 16 d 前后。由图 3 可知, 黄芩苷变化与生物量积累基本一致, 到培养的第 16 天, 黄芩苷含量可达 47.85 mg/g FW, 第 20 天含量急剧下降至 36.87 mg/g FW。

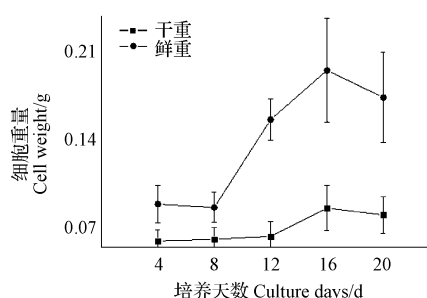


图2 黄芩悬浮细胞系培养过程中生物量的变化

Fig. 2 Change of biomass of cell suspension cultures of *Scutellaria baicalensis*

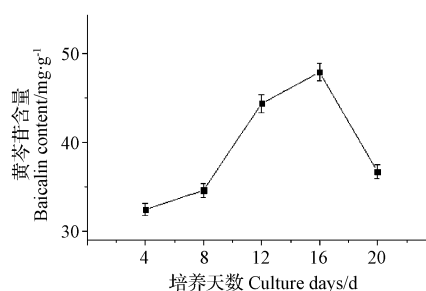


图3 黄芩悬浮细胞系培养过程中黄芩苷含量的变化

Fig. 3 Change of baicalin content in cell suspension cultures of *Scutellaria baicalensis*

## 2.2 黄芩悬浮细胞培养过程中苯丙氨酸解氨酶活性的变化

从图4可以看出,苯丙氨酸解氨酶(PAL)在培养初期没有太大变化,第9天以前都基本稳定,在12 d时达到最高值,PAL活性达 $27.36 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$ ,而后又开始下降。可见PAL活性随培养时间增加而先升高,在到达最大酶活之后开始逐渐下降,推测PAL活性的变化可能与黄芩细胞悬浮系启动黄芩苷生物合成的次生代谢过程有关。

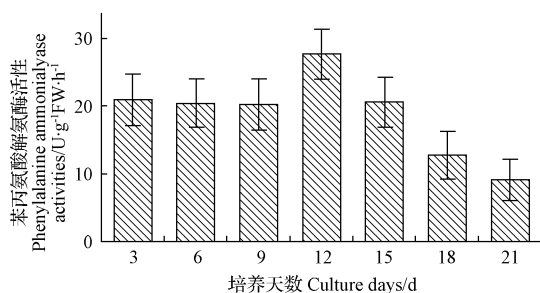


图4 黄芩悬浮细胞系培养过程中苯丙氨酸解氨酶活性的变化

Fig. 4 Change of activities of phenylalanine ammonia-lyase from cell suspension cultures of *Scutellaria baicalensis*

## 2.3 不同激素配比对黄芩悬浮细胞培养物生物量变化的影响

表2  $U_9(9^4)$ 均匀设计结果

Table 2 The result of uniform design of  $U_9(9^4)$

编号 No.	培养天数 Culture days/d									
	4		8		12		16		21	
	鲜重 /g	干重 /g	鲜重 /g	干重 /g	鲜重 /g	干重 /g	鲜重 /g	干重 /g	鲜重 /g	干重 /g
A	0.0706	0.0041	0.0948	0.0047	0.1781	0.0078	0.5224	0.0801	0.7753	0.1734
B	0.0733	0.0054	0.0637	0.0037	0.0449	0.0024	0.1331	0.0066	0.074	0.0038
C	0.055	0.0036	0.0555	0.0036	0.0469	0.0025	0.0754	0.0038	0.055	0.0027
D	0.0455	0.0028	0.0477	0.0028	0.047	0.0025	0.0669	0.0037	0.0539	0.0024
E	0.0623	0.0037	0.0622	0.0037	0.0382	0.0022	0.0776	0.0041	0.0658	0.0037
F	0.0738	0.0037	0.0702	0.0037	0.0593	0.0032	0.0679	0.0041	0.0783	0.0047
G	0.0727	0.0055	0.0576	0.0038	0.063	0.0028	0.0742	0.0042	0.0648	0.0033
H	0.0531	0.0029	0.0572	0.0031	0.0373	0.0021	0.0697	0.0039	0.0798	0.0047
I	0.0647	0.0041	0.0628	0.0038	0.0518	0.0022	0.0786	0.0045	0.1193	0.0059

注:鲜重和干重为平均值。

由表2可知,在均匀设计所选的9组激素配比中,MS培养基附加6-BA 0.75 mg/L, NAA 0.5 mg/L, KT 1.5 mg/L对黄芩细胞的生物量显著优于其它配比,是适合黄芩悬浮培养且生物量积累的最佳培养基,为复合激素配比培养基。

## 3 结论与讨论

近些年来,黄芩的药用价值受到国内外医学界及传

统中医的重视,国家中医药管理局在2013年为H7N9开出有效药方的条例中,黄芩赫然在位,黄芩资源的开发具有广阔的市场前景,其市场年需求量也是连年攀升。

植物生长调节剂是决定植物组织和细胞培养中的关键性因素,在细胞生长与分化起着重要作用。该试验通过均匀设计法比较了4种不同激素的配比对黄芩生物量积累的影响,表明在所选的9组激素配比中,MS培养基附加6-BA 0.75 mg/L, NAA 0.5 mg/L, KT 1.5 mg/L为最佳生物量积累的激素配比条件,表明复合型激素配比对植物组织生物量的积累情况优于单一激素配比。这与任民红等<sup>[11]</sup>的研究结果略有差异,可能与不同植物种类对植物生长调节剂的需求差异有关。

苯丙氨酸解氨酶是植物苯丙烷类次生代谢过程的关键酶和限速酶,黄芩苷作为黄酮类衍生物,其生物合成与PAL活性存在密切关系<sup>[12]</sup>。该试验结果表明,黄芩悬浮细胞培养过程中,苯丙氨酸解氨酶活性随培养时间而升高,在第12天时到达最大酶活,而后开始逐渐下降,这可能与黄芩苷的含量变化过程具有较好的同步性,存在着正相关关系。这与王莉等<sup>[12]</sup>研究结果一致。有关苯丙氨酸解氨酶与黄芩苷生物合成的内在联系,有待从分子生物学方面加以验证。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [2] 张宽朝, 金青, 蔡永萍, 等. 苯丙氨酸解氨酶与其在重要次生产物调控中的作用研究进展[J]. 中国农学通报, 2008(12): 59-62.
- [3] 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究-植物激素对甘薯块根植物苯丙氨酸解氨酶和肉桂酸羟化酶活性变化机器伴性的影响[J]. 植物生理学报, 1981, 7(4): 173-179.
- [4] 文芳, 苏湘鄂, 梅兴国. 红豆杉细胞悬浮培养系统激素优化的研究[J]. 湖北农学院学报, 2010, 20(3): 232-235.
- [5] 姚娜, 安新民, 杨凯, 等. 毛白杨悬浮细胞系的建立及再生植株的获得[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(11): 1114-1118.
- [6] 李蕊, 谭晓芳, 陈群, 等. 霍山石斛细胞悬浮培养及条件优化[J]. 中草药, 2011, 42(2): 358-361.
- [7] 张坚, 高文远, 王娟, 等. 杠柳细胞悬浮培养体系的建立及有效成分杠柳毒苷和4-甲氧基水杨醛含量的测定[J]. 天津中医药, 2010, 27(2): 163-165.
- [8] 王健, 郭政宏, 刘海军, 等. 魔芋细胞悬浮培养生产葡甘露聚糖的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(27): 14836-14837.
- [9] 王文星, 安琪, 汪莹, 等. 瑞香狼毒细胞悬浮培养及黄酮积累的研究[J]. 草业学报, 2010, 19(6): 132-138.
- [10] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 69-97.
- [11] 任民红, 上官新晨, 陈继光, 等. 几种理化因子对青钱柳悬浮细胞生长的影响[J]. 西北农业学报, 2012, 21(5): 179-184.
- [12] 王莉, 史玲玲, 刘玉军, 等. 不同光质对长鞭红景天悬浮细胞生长及苯丙氨酸解氨酶活性的影响[J]. 林业科学, 2007, 43(6): 52-56.

# 长白山野生膜荚黄芪不定根总黄酮积累规律研究(I)

秦嘉泽, 全雪丽, 田海丽, 吴松权

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

**摘 要:**以膜荚黄芪不定根为试材,测定了其不同生长时期不定根的生物量、总黄酮含量和体外抗氧化活性。结果表明:不定根生物量呈“S”型曲线变化,总黄酮的积累有2个波峰,抗氧化活性有1个波峰;生长至40 d时,生物量、总黄酮含量和自由基清除率最高,分别为0.513 g、2.048 mg/g和92.29%,均显著高于其它时期;因此,确定40 d为收获总黄酮的最佳时期。

**关键词:**野生黄芪;不定根;总黄酮;抗氧化活性

**中图分类号:**R 284.1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2014)16-0158-03

黄芪为豆科黄芪属多年生草本植物。其味甘、性微温,有益胃固表、利水消肿、脱毒生肌、补中益气之功效<sup>[1]</sup>。我国药典(2010版)规定,正品黄芪为黄芪属植物膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge)和蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao)的干燥根<sup>[2]</sup>。黄芪的有效成分主要为黄芪皂苷、多糖、黄酮类<sup>[3]</sup>。其化学成分决定了药理

作用,以往多数学者集中于皂苷和多糖的研究,近年来黄酮类的研究也受到关注。黄芪总黄酮无毒无害,对人类的肿瘤、衰老、心血管等疾病的治疗和预防具有重要作用<sup>[4]</sup>,其抗氧化作用明显优于黄芪皂苷,是一种天然的抗氧化剂<sup>[5]</sup>。

除了药用外,黄芪还广泛应用于食品、保健、化妆品等工业生产中,市场需求量日渐增多<sup>[6]</sup>。目前,随着野生资源锐减,只能依靠人工栽培来满足人类需求。不过由于多种原因导致栽培黄芪总黄酮明显低于野生黄芪<sup>[7]</sup>。不定根培养是植物组织培养技术之一,属于分化水平较高的植物器官培养,可以人为地调控其生长发育和环境条件,生长周期短,可排除病虫害的侵袭,有利于重要次生代谢产物的标准化、工业化生产<sup>[8]</sup>。Wu等<sup>[9]</sup>

**第一作者简介:**秦嘉泽(1991-),女,吉林四平人,硕士研究生,研究方向为植物生物技术。E-mail:qinjiaze123@sina.com.

**通讯作者:**吴松权(1972-),男,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事植物种质等研究工作。E-mail:arswsq@ybu.edu.cn.

**基金项目:**吉林省科技厅资助项目(201115228)

**收稿日期:**2014-04-25

## Analysis of Content of Baicalin and Activity of Phenylalanine Ammonia Lyase from Cell Suspension Cultures of *Scutellaria baicalensis*

ZHANG Dong-xiang, ZHAO Jing, LIU Li-jie, JIAO Zhan-zhan, ZHANG Ling-ang, BI Yu  
(College of Life Science and Agro-forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

**Abstract:** Using cell suspension cultures of *Scutellaria baicalensis* as materials, the change of baicalin contents and activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from cell suspension cultures of *Scutellaria baicalensis* were analyzed in this paper. The effects of plant hormone proportions on biomass accumulation of the cell suspension cultures were studied by uniform design. The results showed that the growth curves of the cell suspension cultures exhibited ‘S’ curve, and biomass accumulation of the cell suspension cultures matched with change of baicalin contents. There was correlation between PAL activities and change of baicalin contents. The most suitable hormone ratio to biomass accumulation of the suspension cultures was MS medium added with 6-BA 0.75 mg/L, NAA 0.5 mg/L, KT 1.5 mg/L by uniform design method.

**Key words:** *Scutellaria baicalensis*; suspension culture; baicalin; PAL; uniform design