

白木香气生根细胞程序性死亡与 2-(2-苯乙基)色酮关系

赵 桐, 周 亦, 唐 云, 马新业, 詹若挺, 陈蔚文

(广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室,
国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室, 广东 广州 510006)

摘 要:以白木香气生根为试材, 采用 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯(MeJA)分别处理 0 (CK)、3、5、7 d 后, 通过显微观察、TUNEL 检测、DNA 降解和 GC/MS 检测方法, 探讨 MeJA 对程序性细胞死亡(PCD)和沉香色酮产生之间的关系。结果表明: MeJA 处理 5、7 d 后检测到 PCD 的发生, 同时通过 GC/MS 检测到 2-(2-苯乙基)色酮的产生且相对含量逐渐增加。推测白木香气生根在 MeJA 处理后, PCD 的发生可能与 2-(2-苯乙基)色酮的产生存在正相关性, 为进一步研究沉香色酮的形成机制提供参考依据。

关键词:白木香; 气生根; 细胞程序性死亡; 2-(2-苯乙基)色酮

中图分类号:S 792.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)20-0157-06

白木香(*Aquilaria sinensis*)属瑞香科沉香属植物, 其树木的茎、枝或根受伤(自然条件下, 风、雷电、虫咬或微生物侵染)后形成的黑色树脂木材, 称为沉香^[1-2], 而白木香是我国生产沉香的唯一植物资源^[3]。不仅有温中止呕、纳气平喘的药用价值^[4], 还具有用于香料和收藏的经济价值^[5]。然而, 目前野生资源面临濒危, 同时人工结香技术尚不能满足沉香市场需求^[6], 因此研究沉香结香机制是解决问题的根源。

倍半萜和 2-(2-苯乙基)色酮类化合物是沉香

的主要化学成分, 并且只有受到伤害才可形成^[7]。LIU 等^[8]和刘娟^[9]借助 H_2O_2 和 MeJA 诱导沉香悬浮细胞, 证明沉香倍半萜与程序性细胞死亡(PCD)存在间接关系, 但并未诱导出色酮类化合物, 同时 OKUDER 等^[2]推测色酮衍生物伴随着细胞死亡产生。因此, 该试验对白木香气生根进行 MeJA 胁迫处理, 考察处理期间气生根的细胞学特点与沉香色酮之间的关系, 以期研究沉香色酮的生物合成提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以一年生健壮白木香实生苗(*Aquilaria sinensis*)为试材, 苗高约 40 cm, 根茎 0.5 cm。

1.2 试验方法

气雾培养装置为实验室自制, 气雾培养箱 $52 \text{ cm} \times 42 \text{ cm} \times 22 \text{ cm}$, 黑白膜布遮光, 透明罩 $50 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ 。将苗从营养袋取出, 清洗干净根部泥土后剪除所有侧根, 用 0.1% KMnO_4 根系消毒 1 min, 再用纯水清洗后, $1500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

第一作者简介:赵桐(1989-), 男, 硕士, 现主要从事中药资源利用与开发等研究工作。E-mail: 13535458015@163.com.

责任作者:马新业(1976-), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 现主要从事中药资源学等研究工作。E-mail: usermxy@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81102764); 广东省大学学科和专业建设专项基金资助项目(2013CXZDA011); 广东省普通高等教育创新团队—传统中药资源创新研究资助项目(2016KYTD02)。

收稿日期:2017-04-05

IBA 诱导生根并以体积为 3 L 的 1/6 MS 营养液(青岛海博生物公司,不含蔗糖,pH 5.8)通过内径为 8 mm 的 PE 管循环供给,喷雾循环设置为 30 min 关/5 min 开,室内温度控制在 25~27 ℃,湿度在 60%以上。培养 25 d 后,以 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯(MeJA, Sigma)分别处理 0(CK)、3、5、7 d。

1.2.1 显微观察

分别取试验材料的根节段(距根顶端 3~4 cm)用蒸馏水冲洗,徒手切成薄片(横切),切片放置蒸馏水中,用荧光生物显微镜(OLYMPUS BX51, 日本)观察显微结构,并拍摄。

1.2.2 TUNEL 标记和 PI 染色

荧光检测采用荧光显微镜观察,TUNEL 检测采用细胞凋亡荧光检测试剂盒(Promega G3250, 美国),试验操作完全按照试剂盒说明书进行^[10];将样品切片放置 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PI 溶液,室温避光反应 5 min,磷酸盐缓冲液(PBS; 137 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 2.7 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 1.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 , 8.0 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaHPO_4 , 用盐酸校正 pH 7.3)漂洗并制片^[9]。激发光波长为 450~490 nm。绿色荧光(TUNEL-标记)表示 DNA 发生断裂的细胞核,红色荧光(PI 染色)表示死亡细胞,并以不添加 rTdT 酶的切片为阴性对照。

1.2.3 DNA 降解检测

试验材料的 DNA 提取方法按照植物基因组 DNA 提取试剂盒(Plant Genomic DNA Kit, TIANGEN)说明书进行。DNA 电泳用 1.0 % 琼脂糖凝胶,EB 染色后在凝胶成像仪(INFINITY-

1000, 法国)上观察、拍照。

1.2.4 GC-MS 检测

以试验材料为待检样品,沉香标准药材(购于中国食品药品检定研究院,批号:121222-201203)为阳性对照品(SM)。精密称取 0.5 g 样品(干质量)浸泡于 20 mL 乙醚(24 h)并重复操作一次,将 2 次提取液共 40 mL 过滤后,减压挥干溶剂乙醚,获得棕黄色油状析出物,乙醚溶解定容至 1 mL 用于 GC-MS 检测。气相色谱条件:石英毛细管柱 HP-5MS(30 m \times 0.25 mm,膜厚 0.25 μm);升温程序:初始温度 90 ℃,以 5 $^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 220 ℃,以 3 $^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 280 ℃,保持 15 min。进样量 5 μL ,不分流,气化室温度 250 ℃,载气为高纯度 He(99.999%)。质谱条件:EI 离子源;四级杆温度 150 ℃;EM 电压 2 165 V;接口温度 280 ℃;溶剂延迟 3 min; m/z :50-550。

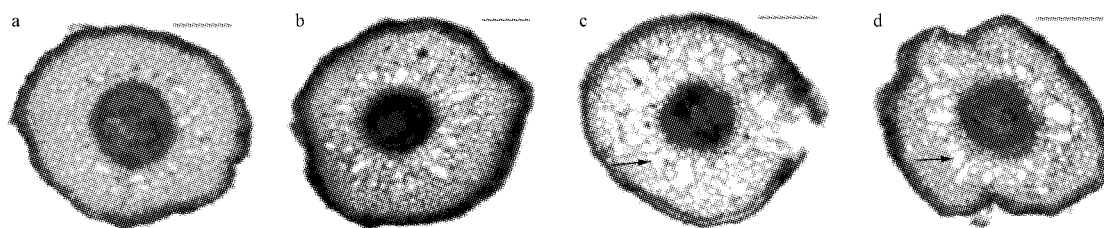
1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 2003 软件整理分析。

2 结果与分析

2.1 显微结构观察

MeJA 处理后,气生根皮层细胞逐渐死亡和溶解,形成通气组织,0 d 根细胞排列规则紧密;3 d 开始出现细胞壁溶解,通气组织开始形成;胁迫 5~7 d,通气组织进一步扩展,并且 7 d 皮层中部大部分细胞溶解消失,剩下几行链状的细胞和残留的细胞壁链接着表皮和中柱,而外皮层和内皮层 2 层细胞仍然完整(图 1a)。



注:a~d. MeJA 处理 0、3、5、7 d,箭头指示通气组织部位,标尺=50 μm 。

Note: a~d. MeJA processing 0, 3, 5, 7 days. Arrows indicate the aerenchymatous spaces, bar=50 μm .

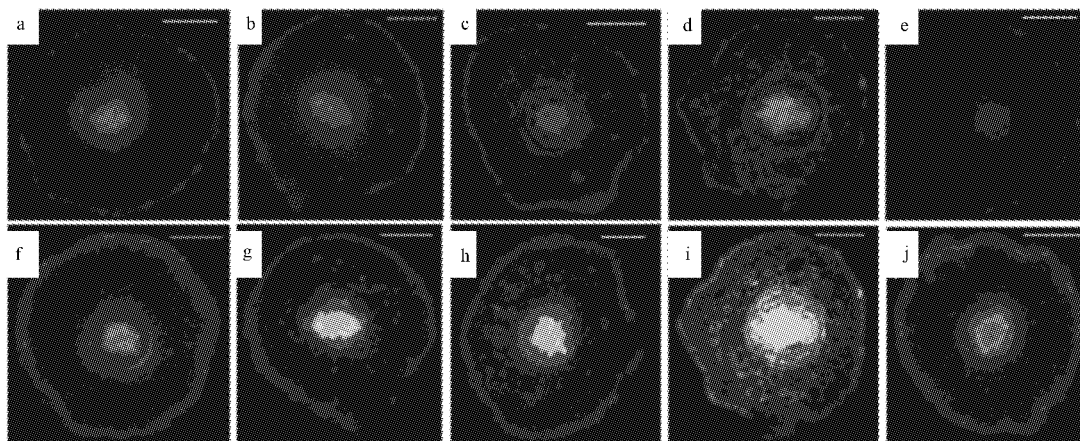
图 1 试验材料中通气组织的形成过程

Fig. 1 Process of aerenchyma formation in experiment materials

2.2 TUNEL 标记及 PI 染色

由图 2 可知,处理组第 3 天开始有少量的根皮层细胞死亡(图 3a,b),5、7 d 根皮层细胞开始出现大量 TUNEL 阳性细胞核(图 3c,d),表明根

皮层细胞逐渐凋亡。而阴性对照(图 3e)中仅仅观察到了背景荧光。此外,所有试验材料的根中柱 TUNEL 阳性结果一致,无显著变化,表明气生根细胞的凋亡主要发生在根皮层细胞。



注:a~e. TUNEL 荧光标记,绿色荧光显示 TUNEL 阳性细胞核,f~j. 分别为 a~e 对应的切片,用 PI 染色显示死亡细胞。a~d. MeJA 处理 0、3、5、7 d;e. 阴性对照(标记反应中不加 rTdT 酶),标尺=50 μm。

Note:a~e. TUNEL staining, green fluorescence indicates TUNEL positive nuclei; f~j. the same sections in a~e, respectively, showing dead cells (red fluorescence) by PI staining; a~d. MeJA processing 0, 3, 5, 7 days; e. negative control (omitting rTdT enzyme from the staining procedure), bar=50 μm.

图 2 试验材料的 TUNEL 标记及 PI 染色

Fig. 2 TUNEL fluorescence labelling and PI staining of experiment materials

2.3 DNA 降解

运用 DNA 降解的方法判断细胞死亡情况,从图 3 可以初步看出,MeJA 处理 3 d 后开始有较弱的 DNA 降解程度,并且 5~7 d 降解逐渐明显,以 7 d 样品降解非常明显。总体而言,MeJA 处理时间越长,气生根 DNA 损伤越明显,与荧光检测结果相符。

2.4 GC-MS 检测结果

用 GC-MS 技术分别对各样品乙醚提取物进行分析,见图 4。多数化合物通过质谱数据系统检索及核对 NIST14 标准质谱图得到鉴定,同时 2-(2-苯乙基)色酮化合物的鉴定结合标准药材的质谱图对照鉴定而得。由表 1 可知,MeJA 处理 0、3、5、7 d 的气生根乙醚提取物中分别鉴定到 5、12、12、18 个色谱峰,并用峰面积归一化法测定了这些色谱峰在样品中的相对含量。标准药材检测到 4 种色酮,分别为 2-(2-苯乙基)色酮、6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮、6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色

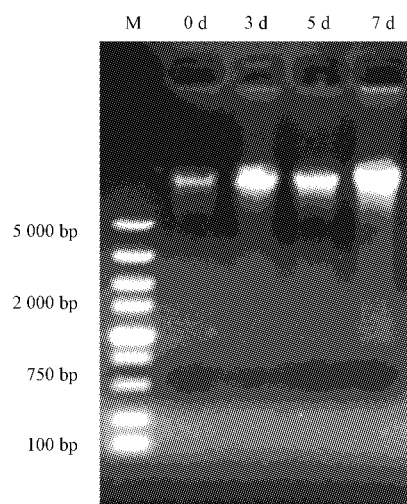


图 3 试验材料的 DNA 降解电泳分析

Fig. 3 DNA degradation analysis of experiment materials

酮和 6,7-二甲氧基-4'-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮(表 1),MeJA 处理 0 d 和 3 d 的气生根中并未检

测到 2-(2-苯乙基)色酮类化合物,以碳氢化合物为主。而 5 d 和 7 d 气生根中有 2-(2-苯乙基)色

酮,且相对含量分别为 0.09%和 3.64%,呈累积趋势。

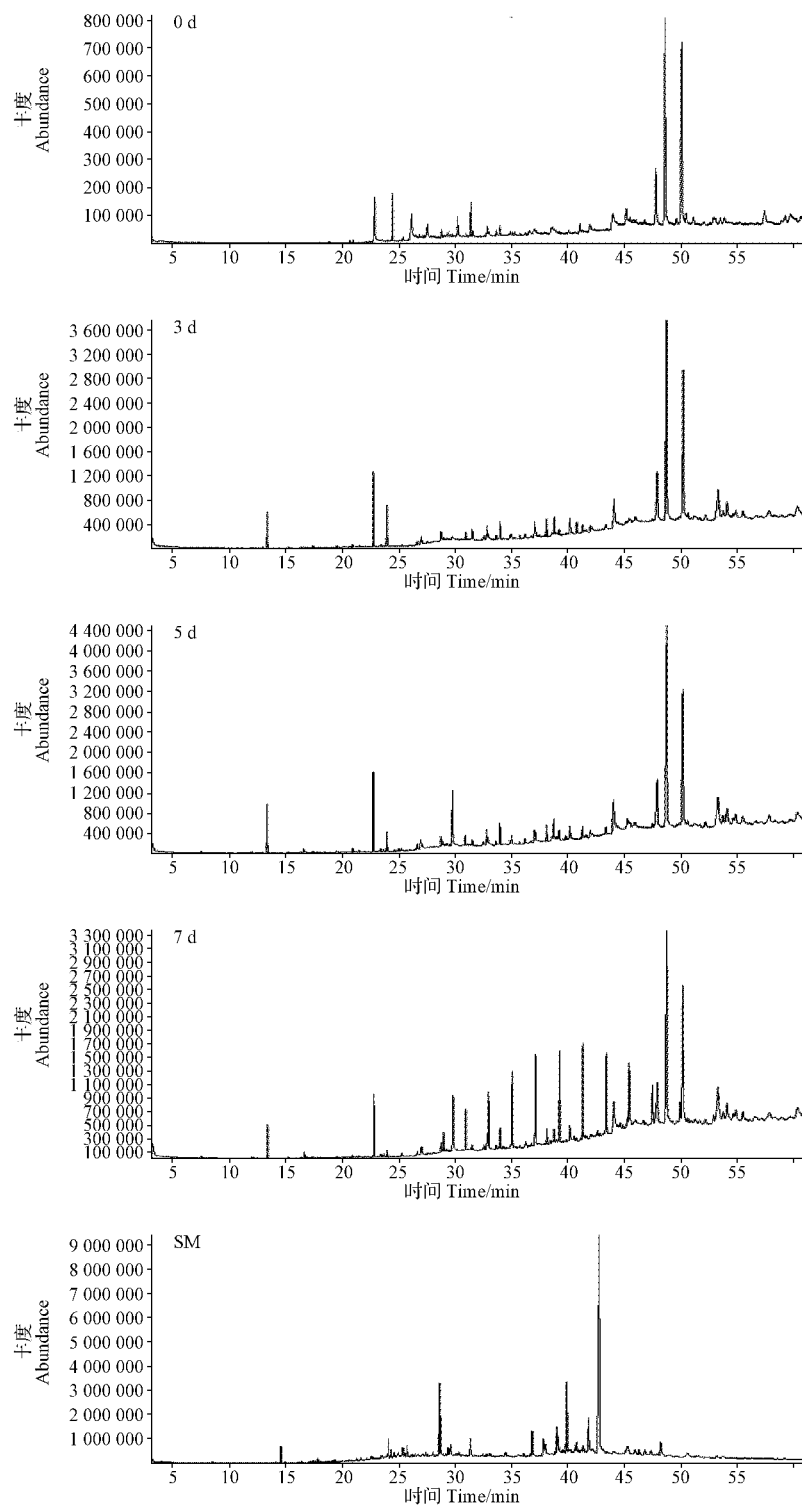


图 4 试验材料及标准药材的 GC/MS 总离子流

Fig. 4 GC/MS total ion chromatogram of experiment materials and standard medicinal material

表 1 试验材料及标准药材乙醚提取物的主要化学成分

Table 1 Main chemical constituents of ether extracts from experiment materials and standard medicinal material

序号 No.	化合物 Compound	分子式 Formula	分子量 Molecular mass	相对含量 Relative content/%				SM
				0 d	3 d	5 d	7 d	
1	Dibutyl phthalate+	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278	—	5.48	4.71	2.92	—
2	3-Pentanone,1,5-diphenyl+	C ₁₇ H ₁₈ O	238	—	—	—	0.30	—
3	1-Penten-3-one,1,5-diphenyl+	C ₁₇ H ₁₆ O	236	—	—	—	0.21	—
4	Hexadecane #	C ₁₆ H ₃₄	226	—	1.73	0.59	0.33	—
5	1-Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	186	—	1.08	0.86	0.62	—
6	Eicosane #	C ₂₀ H ₄₂	282	—	1.89	1.89	12.49	—
7	2-Phenethyl-4H-chromen-4-one *	C ₁₇ H ₁₄ O ₂	250	—	—	0.09	3.64	0.32
8	Hexadecane,7-methyl- #	C ₁₇ H ₃₆	240	—	4.71	—	2.16	—
9	Pentadecanal-	C ₁₅ H ₃₀ O	226	—	0.28	0.8	0.40	—
10	1-Hexadecanol	C ₁₆ H ₃₄ O	242	—	1.13	1.03	1.09	—
11	Heneicosane #	C ₂₁ H ₄₄	296	—	—	2.48	8.67	—
12	Phthalic acid,di(2-propylpentyl) ester	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	—	—	—	1.30	—
13	Tetracosane #	C ₂₄ H ₅₀	338	—	19.52	0.04	4.64	—
14	1-Cyclohexyl-1-(4-methylcyclohexyl)ethane #	C ₁₅ H ₂₈	208	—	—	—	0.62	—
15	1,4-Benzenedicarboxylic acid,bis(2-ethylhexyl) ester	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	—	—	—	1.04	—
16	4H-1-Benzopyran-4-one,5-hydroxy-7-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	298	0.84	1.81	0.52	0.41	—
17	Genkwanin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284	—	—	—	2.99	—
18	Dodecyl nonyl ether	C ₂₁ H ₄₄ O	312	—	—	—	0.94	—
19	2-Butanone,4-phenyl+	C ₁₀ H ₁₂ O	148	2.00	—	—	—	15.57
20	n-Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	3.53	—	—	—	—
21	Docosanal	C ₂₂ H ₄₄ O	324	0.81	—	—	—	—
22	Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	412	16.80	—	—	—	—
23	Carbonic acid,eicosyl vinyl ester	C ₂₃ H ₄₄ O ₃	368	—	5.30	1.25	—	—
24	4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavanone	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286	—	—	1.96	—	—
25	Bis(2-ethylhexyl) phthalate +	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	—	1.82	—	—	—
26	1,14-Tetradecanediol	C ₁₄ H ₃₀ O ₂	230	—	0.43	—	—	—
27	6,7-Dimethoxy-2-phenethyl-4H-chromen-4-one *	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	310	—	—	—	—	7.23
28	6,7-Dimethoxy-2-(4-methoxyphenethyl)-4H-chromen-4-one *	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	340	—	—	—	—	0.37
29	6-Methoxy-2-phenethyl-4H-chromen-4-one *	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	280	—	—	—	—	0.53

注: * 2-(2-苯乙基)色酮; + 芳香族类化合物; # 烷烃类化合物; — 表示未检测到。

Note: * indicates 2-(2-phenylethyl)chromone; + indicates aromatic compounds; # indicates alkane compounds; — indicates not detected.

3 结论与讨论

已有研究表明,植物通过根皮层细胞发生 PCD 而形成通气组织^[11-13]。该研究结果表明,白木香气生根通气组织的形成过程中,伴随着根皮层细胞死亡的发生。MeJA 条件下,白木香气生根通气组织最先开始于根皮层中央,然后不断扩大。试验表明,MeJA 处理 5~7 d 的根皮层细胞逐渐发生细胞核 DNA 断裂,而中柱情况保持相同水平,说明胁迫诱导的细胞死亡主要发生在通气组织形成的根皮层中。

白木香悬浮细胞^[14]、离体根^[15]及愈伤组织^[16],均可在某种胁迫条件下诱导产生沉香2-(2-苯乙基)色酮类化合物,表明健康白木香并不能产

生色酮类化合物,该研究也证明了只有受到胁迫伤害后才能产生沉香色酮次生代谢产物。根据 GC-MS 分析结果可知,MeJA 能够诱导白木香气生根形成 2-(2-苯乙基)色酮并且相对含量随着处理时间逐渐增加,与根皮层细胞死亡程度呈正相关关系。此外,MeJA 胁迫过程,气生根开始逐渐形成一种植保素—黄酮类化合物^[17]。有研究发现,邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate)和碳氢化合物具有一定毒副作用^[18],这可能也是引起 PCD 的因素,有待进一步研究。综上,该研究初步表明,PCD 有可能与 2-(2-苯乙基)色酮的形成有关,但是 PCD 在其形成过程中的作用及分子机制有待进一步的探索研究。

参考文献

- [1] XU Y, ZHANG Z, WANG M, et al. Identification of genes related to agarwood formation: Transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis* [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 227.
- [2] OKUDER A Y, ITO M. Production of agarwood fragrant constituents in *Aquilaria* calli and cell suspension cultures [J]. Plant Biotechnology, 2009, 26(3): 307-315.
- [3] 傅立国. 中国植物红皮书: 稀有濒危植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2010 年版) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [5] YANG J, DONG W, KONG F, et al. Characterization and analysis of 2-(2-phenylthyl)-chromone derivatives from agarwood (*Aquilaria crassna*) by artificial holing for different times [J]. Molecules, 2016, 21(7): 911.
- [6] 刘军民. 国产沉香资源开发利用及化学成分研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2012(1): 55-58.
- [7] 杨峻山. 沉香化学成分的研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 1998(1): 99-103.
- [8] LIU J, XU Y, ZHANG Z, et al. Hydrogen peroxide promotes programmed cell death and salicylic acid accumulation during the induced production of sesquiterpens of *Aquilaria sinensis* [J]. Function Plant Biology, 2015, 42(4): 337.
- [9] 刘娟. 程序性细胞死亡与沉香倍半萜次生代谢关系的探索研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
- [10] 邓祥宜, 李继伟, 阳超男, 等. 淹水胁迫下小麦根通气组织形成的 PCD 特征及活性氧作用初探 [J]. 麦类作物学报, 2009, 29(5): 832-838.
- [11] DREW M C, HE C J, MORGAN P W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots [J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(3): 123-127.
- [12] 孔好, 王忠, 顾蕴洁, 等. 植物根内通气组织形成的研究进展 [J]. 植物学报, 2008, 25(2): 248-253.
- [13] 倪细炉. 三种植物通气组织的形成与细胞程序性死亡的关系 [D]. 西安: 西北大学, 2014.
- [14] 何梦玲, 戚树源, 胡兰娟, 等. 白木香悬浮培养细胞中 2-(2-苯乙基)色酮化合物的诱导形成 [J]. 广西植物, 2007, 27(4): 627-632.
- [15] 何梦玲, 戚树源, 胡兰娟. 白木香离体侧根中色酮类化合物的诱导形成 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 281-284.
- [16] WANG X, GAO B, LIU X, et al. Salinity stress induces the production of 2-(2-phenylthyl)-chromones and regulates novel class responsive genes involved in signal transduction in *Aquilaria sinensis* calli [J]. BMC Plant Biology, 2016, 16(1): 1-20.
- [17] 方从兵, 宛晓春, 江昌俊. 黄酮类化合物生物合成的进展 [J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32(4): 498-504.
- [18] CUI J, GUO S, FU S, et al. Effects of inoculating fungi on agarwood formation of *Aquilaria sinensis* [J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(26): 3280-3287.

Relationship Between PCD and Chromones Derivatives in Aerial Roots of *Aquilaria sinensis*

ZHAO Tong, ZHOU Yi, TANG Yun, MA Xinye, ZHAN Ruoting, CHEN Weiwen

(Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine/Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan/Ministry of Education Joint Laboratory of National Engineering Research Center for the Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicines, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract: Aerial roots of *Aquilaria sinensis* were used as experimental material, the effects of MeJA on programmed cell death (PCD) and the production of aloes ketones were studied by 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ methyl jasmonate (MeJA) treatment for 0, 3, 5, 7 days respectively, and the materials were observed and detected by microscopic observation, TUNEL detection, DNA degradation and GC/MS method respectively. The results showed that the occurrence of PCD was detected in the experimental material that had been processed by MeJA for 5 days and 7 days, at the same time, the production of 2-(2-phenylethyl) chromone was detected by GC/MS method and the relative content was increased gradually. This study speculated that the occurrence of PCD might be positively correlated with the production of 2-(2-phenylethyl) chromone after MeJA treatment, which could provide reference for the further study of the formation mechanism of the agarwood chromone.

Keywords: *Aquilaria sinensis*; aerial roots; programmed cell death (PCD); 2-(2-phenylethyl) chromone