

诱导子对黄芩悬浮细胞系的影响

张东向¹, 李康¹, 姚娜², 张磊¹

(1. 齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 161006; 2. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201)

摘要:采用植物细胞悬浮培养技术研究了2种诱导子对黄芩悬浮细胞系的影响。结果表明:酵母提取物(YE)和水杨酸(SA)对黄芩悬浮细胞的生长没有促进作用。低浓度(0.1g/L) YE 处理较长时间(10d、15d)或高浓度(0.5g/L和1.0g/L) YE 处理较短时间(6d)对总黄芩甙提高都有促进作用,其中0.5g/L的 YE 促进效果最明显。SA 在培养初期或后期加入对黄芩甙的胞外释放和总黄芩甙的积累都具有显著的促进作用。

关键词:黄芩;黄芩甙;诱导子;酵母提取物;水杨酸

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)04-0194-03

中药黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根,具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效^[1]。其主要成分黄芩甙(baicalin, Bai)具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗变态反应、抗氧化、清除氧自由基、抗癌、抗肿瘤、抗凝、抗血栓形成和保护肝脏、心脑血管、神经元等作用^[2]。诱导子能提高植物次生代谢途径中关键酶的活性或活化特定的酶基因,从而提高植物细胞中次生代谢物的含量或合成新的次生产物^[3]。在黄芩细胞悬浮培养的不同阶段添加不同浓度的酵母提取物(YE)和水杨酸(SA),研究两者对黄芩细胞悬浮系中黄芩甙含量的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料和主要试剂 黄芩种子(河北省安国市药材市场);黄芩甙标准品(昆明风山渐医药研究有限公司)。

1.1.2 仪器 HP1500GS-B型全智能人工气候植物箱(武汉瑞华仪器设备有限公司);HYG-III型迴转式恒温调速摇瓶柜(上海欣蕊自动化设备有限公司);UV755B型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导及稳定悬浮细胞系的建立 选取籽粒饱满的黄芩种子,经常规消毒后,均匀播种于温

室育苗盆中。(25±1)℃培养。待苗长到5~7cm时,选取根为外植体,将无菌外植体接种于附加0.2mg/L 2,4-D和2.0mg/L 6-BA的MS培养基中(蔗糖3%,琼脂1%,pH5.8),(25±1)℃暗培养诱导愈伤组织。选取疏松的淡黄色的愈伤组织作为继代培养的材料。每三周继代一次。

无菌称取一定量生长良好的继代3~4次的疏松的淡黄色的愈伤组织转入1000mL三角瓶中(含300mL MS培养基)制作种子瓶。MS培养基的成分同固体培养基。传代3~4次,使细胞适应液

体培养的环境,并稳定生长。试验中悬浮培养的装液量为30mL/100mL三角瓶,接种量为4.0g DW/L培养基。摇床转速为110~130r/min,温度为(25±1)℃。

1.2.2 诱导子处理黄芩悬浮细胞 在细胞继代培养的第0d、5d、9d添加浓度分别为0.1g/L、0.5g/L、1g/L的YE和0.01g/L、0.1g/L、1g/L的SA,以未经诱导子处理的培养物作对照CK。

1.2.3 黄芩甙含量测定 标准曲线绘制:参照韩会玲等的方法^[4]。当黄芩甙标准品浓度在0~60μg/mL范围内,标准品浓度C(μg/mL)与吸光值A呈良好的线性关系。用最小二乘法进行线性回归得标准曲线方程为:C=20.193A-1.2387(r=0.998)。黄芩甙含量测定:悬浮细胞培养15d后,过滤。培养物和滤液置于60℃烘箱中烘干。称取适量经过充分研磨后培养物加入10mL 50%乙醇50℃水浴浸提黄芩甙4~6h左右。烘干后的滤液也加入10mL 50%乙醇50℃水浴浸提黄芩甙4~6h左右。培养物及滤液抽提液稀释适当倍数。分别取稀释后培养物及滤液抽提液,用UV755B型紫外可见分光光度计测定278nm处OD值。50%乙醇稀释与抽提液相同的倍数后作为对照。根据标准曲线方程及①Y培养物=(C×稀释倍数×提取液体积)/干重,②Y培养液=(C×稀释倍数×提取液体积)/培养液体积,③Y=Y培养物×C培养物+Y培养液,计算培养物(Y培养物,mg/g DW)、培养液(Y培养液,g/L)中黄芩甙的含量及黄芩甙总量(Y,g/L)。C培养物为生物量(g DW/L)。

2 结果与分析

2.1 YE对黄芩悬浮细胞系的影响

与对照CK相比,在黄芩细胞培养的第0d、5d、9d分别添加不同浓度的YE对黄芩细胞的生长没有促进作用(图1)。这与张春荣研究不同浓度的YE处理不同时间

第一作者简介:张东向(1963-),男,教授,理学硕士,硕士,从事植物生理及植物细胞工程方面的研究。

基金项目:黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助项目(1054G066)。

收稿日期:2006-12-10

对野葛幼叶悬浮细胞生长的影响时得出的结论相似^[5]。在黄芩细胞培养的第0d、5d添加0.1g/L的YE,在5d、9d分别添加0.5g/L、1.0g/L的YE对细胞内黄芩甙的积累有促进作用(图2),而YE不利于野葛悬浮细胞中葛根素产量的提高,1g/L的YE抑制效果最明显^[5]。在第0d添加0.1g/L和0.5g/L的YE对黄芩甙的胞外释放具有促进作用(图3)。1g/L的YE处理3d对葛根素的释放略有促进作用^[5]。对于总黄芩甙而言,低浓度

(0.1g/L)YE处理较长时间(10d、15d)对黄芩总黄芩甙的促进作用相近,而高浓度(0.5g/L和1.0g/L)处理较短时间(6d)对总黄芩甙提高有很强的促进作用,其中0.5g/L的YE促进效果最明显,其它处理则不利于黄芩甙总产量的提高(图4)。李为等在红豆杉培养第10d时加入200mg/L的酵母提取物使培养体系中紫杉醇产量较对照增加到3.6倍^[6]。

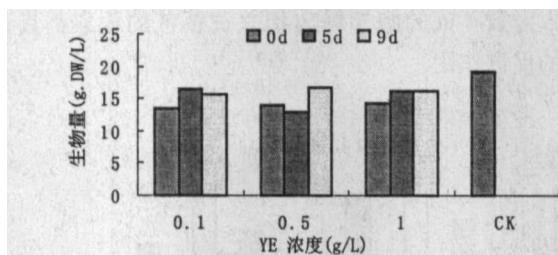


图1 YE对黄芩悬浮细胞生长的影响

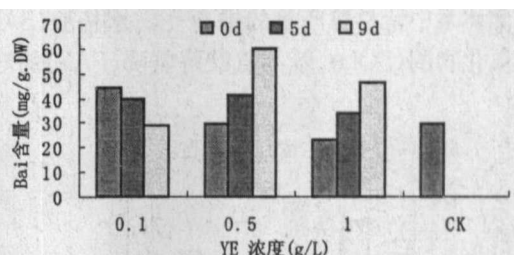


图2 YE对黄芩悬浮细胞中黄芩甙含量的影响

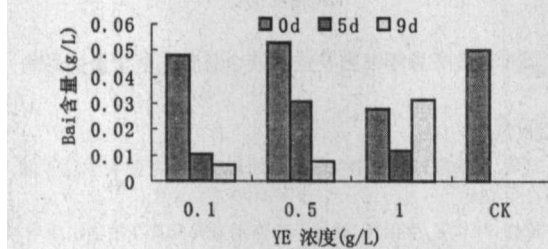


图3 YE对黄芩悬浮细胞培养液中黄芩甙含量的影响

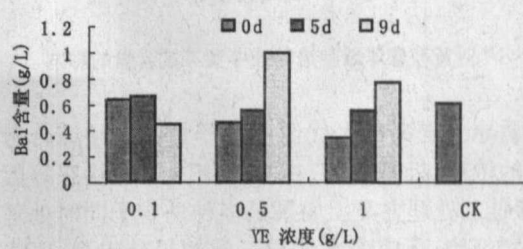


图4 YE对黄芩悬浮细胞及培养液中总黄芩甙含量的影响

2.2 SA对黄芩悬浮细胞系的影响

与对照CK相比,在黄芩细胞培养的第0d、5d、9d分别添加不同浓度的SA对黄芩细胞的生长同样没有促进作用(图5)。SA对生长的抑制作用与SA浓度、外施SA的时期及处理时间有关^[7]。1.0g/L的SA比起0.01g/L的SA对黄芩细胞内的黄芩甙的积累具有更大的促进作

用,而且在培养初期加入比在后期加入的促进效果要明显(图6)。各种浓度的SA在培养初期或后期加入对黄芩甙的胞外释放和总黄芩甙的积累都具有显著的促进作用(图7,图8),而且1.0g/L的SA处理6d对总黄芩甙的提高作用最明显,但SA对野葛悬浮细胞葛根素的总产量的影响不大^[5]。

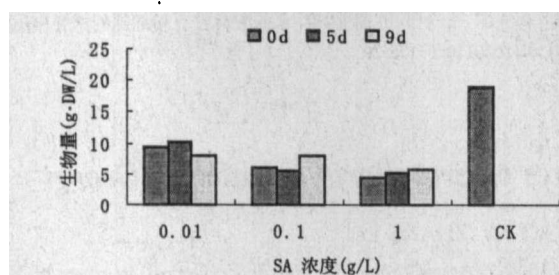


图5 SA对黄芩悬浮细胞生长的影响

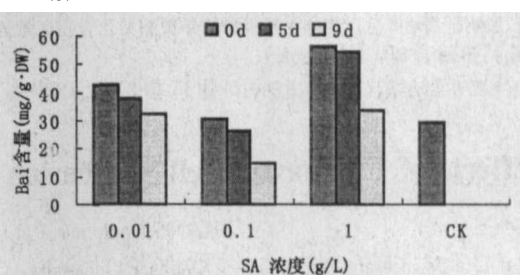


图6 SA对黄芩悬浮细胞中黄芩甙含量的影响

3 讨论

自然条件下,植物体内许多代谢产物含量很低,但在环境胁迫的条件下却能大量积累。人们尝试利用诱导子处理植物细胞,以期促进某些代谢产物的合成。诱导子从来源上分为生物诱导子和非生物诱导子。生物诱导子包括各种病原菌和植物细胞壁的分离物,目前应

用最广泛的是真菌诱导物。非生物诱导子包括重金属盐、去垢剂、乙烯、氟仿、杀真菌剂、紫外线辐射、冻融等^[8]。

一般地,外源诱导子均能通过信号转导途径诱导植物细胞防御相关基因的表达,但不同的诱导子在植物细胞表面和内部的作用位点不同,所启动的传导途径也不

同,因而它们的作用具有一定的特异性^[9],对不同细胞或不同次生代谢物往往具有不同的效应。桔青霉菌丝诱导云南红豆杉细胞中紫杉醇合成的效果最好,含量和产量分别比对照提高 113.2% 和 104.0%^[10]。2g/L 的 YE 能够促进西洋参细胞的生长^[11],但 0.5~5g/L 的 YE 显著抑制银杏细胞的生长^[12]。在红豆杉细胞培养 20d 加入 CuCl_2 浓度为 $30\mu\text{mol/L}$ 时,诱导细胞中紫杉醇合成的效果最佳^[3]。0.1mg/L 水杨酸有利于南方红豆杉细胞培养体系中紫杉醇产量的提高^[13]。水杨酸(SA)可提高过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活

性,促进红豆杉细胞内 H_2O_2 的含量上升并有利于紫杉醇的合成。其中 20mg/L 的 SA 对紫杉醇合成的促进效果最明显,紫杉醇含量可达对照组的 13 倍^[14]。本研究的结果显示:酵母提取物(YE)和水杨酸(SA)对黄芩悬浮细胞的生长没有促进作用。低浓度(0.1g/L)YE 处理较长时间(10d、15d)或高浓度(0.5g/L 和 1.0g/L)YE 处理较短时间(6d)对总黄芩甙提高都有促进作用,其中 0.5g/L 的 YE 促进效果最明显。SA 在培养初期或后期加入对黄芩甙的胞外释放和总黄芩甙的积累都具有显著的促进作用。

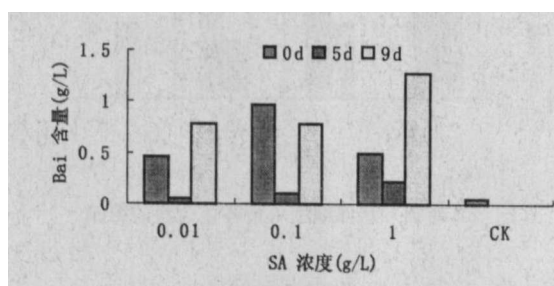


图7 SA对黄芩悬浮细胞培养液中黄芩甙含量的影响

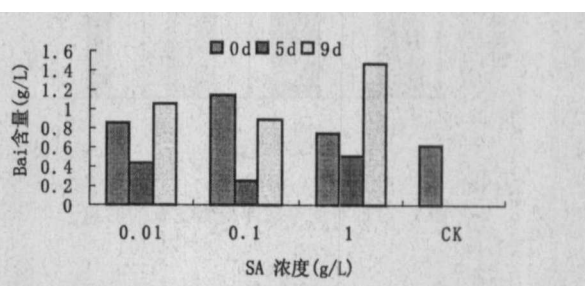


图8 SA对黄芩悬浮细胞及培养液中总黄芩甙含量的影响

利用诱导子提高次生代谢产物产量时必须综合考虑诱导子的浓度、处理时间、植物细胞的生理状态等因素,确定最佳的处理方案。如果是多种诱导子同时处理同一种植物细胞,还应考虑诱导子间的最佳组合,以便进一步提高次生代谢产物的产量。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典一部[M]. 北京, 化学工业出版社, 2005.
- [2] 许文杰, 丁启龙. 黄芩素的药理学研究进展[J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14(2): 35-39.
- [3] 李家儒, 管志勇, 刘曼西, 等. Cu^{2+} 对红豆杉培养细胞中紫杉醇形成的影响[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(2): 117-120.
- [4] 韩会玲, 宋小妹, 张选军. 黄芩甙提取工艺的改进[J]. 陕西中医学院学报, 1997, 20(4): 35-36.
- [5] 张春荣. 影响野葛幼叶悬浮细胞中葛根素等异黄酮类化合物产量的因素研究[D]. 广州: 华南师范大学, 2002.
- [6] 李为. 紫杉醇生物合成代谢调节方法的研究[J]. 华中理工大学学报, 2000, 28(7): 107-111.

- [7] 刘新. 水杨酸对植物体生理活动的影响[J]. 莱阳农学院学报, 1998, 15(4): 180-184.
- [8] 王红, 叶和春, 李国凤. 诱导子的作用方式及其在植物组织培养中的应用[J]. 植物学通报, 1999, 16(1): 11-18.
- [9] 王宁宁, 王淑芳, 王勇, 等. 外源刺激物对长春花冠腺细胞生长和吲哚生物碱含量的影响[J]. 生物工程学报, 1996, 12(增刊): 300-303.
- [10] 陈永勤, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 几种真菌诱导子对云南红豆杉细胞产生紫杉醇的影响[J]. 生物工程学报, 1999, 15(4): 522-524.
- [11] 袁丽红, 欧阳平凯. 提高西洋参细胞生长和皂甙生产的几种方法研究[J]. 南京化工学院学报, 1994, 16(1): 72-77.
- [12] 于荣敏, 赵鸿莲, 张辉, 等. 银杏细胞悬浮培养及其银杏内酯产生的研究[J]. 生物工程学报, 1999, 15(2): 207-210.
- [13] 施中东, 未作君, 元英进. 南方红豆杉细胞培养合成紫杉醇诱导子浓度的优化[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(4): 36-40.
- [14] 梅兴国, 张舟宁, 苏湘鄂, 等. 水杨酸对红豆杉细胞的诱导作用[J]. 生物技术, 2000, 10(6): 18-20.

Effects of Elicitor on Cell Suspension Cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi

ZHANG Dong-xiang¹, LI Kang¹, YAO Na², ZHANG Lei¹

(1. College of Life Science and Technology, Qiqihar University, Qiqihar 161006; 2. Animal Scientific and Technological Institute of Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Abstract: Effects of 2 elicitors on cell suspension cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi were investigated by plant cell suspension technology. It showed that yeast extract (YE) and salicylic acid (SA) had no facilitation on the growth of suspension cells of *Scutellaria baicalensis* Georgi. YE at low concentration (0.1g/L) for long time (10d, 15d) or at high concentration (0.5g/L and 1.0g/L) for short time (6d) had positive effects on the total yields of baicalin and YE at 0.5g/L was the best choice. SA when added at early or late culture period also had positive effects on the outside release and the total yields of baicalin in cell suspension cultures.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; Baicalin; Elicitor; Yeast extract; Salicylic acid