

图 1 绿原酸 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of chlorogenic acid

瑚苷含量为 0.849%，总黄酮含量为 0.516%。所测定的 3 种主要次生代谢物桃叶珊瑚苷、绿原酸、总黄酮的含量，在原生皮和再生皮中均无显著差异。

通过对 3 株 17 年原生皮与 7 年再生皮的比较分析认为，原生皮与再生皮的厚度基本相同；3 株中主要次生代谢物（药用有效成分）的含量无显著差异。从而可以认为，原生皮和再生皮在药理作用方面基本一致。

原生皮与再生皮的厚度（总皮和内皮）之所以无显著差异，这主要是由于再生皮比原生皮生长迅速的缘故。研究资料证实，再生皮的厚度虽然在剥皮后 3 年内都比同株树上的原生皮薄，但差距在逐年减少。而且，与对照（原生皮）同样位置的树皮厚度比较，再生皮只有在剥皮当年明显比对照薄，第 2 年

就与对照相似，第 3 年比对照还厚。可见，新皮（再生皮）的生长比原生皮快^[1-3]。

所测定的 3 种主要次生代谢物桃叶珊瑚苷、绿原酸、总黄酮的含量在原生皮和再生皮中均无显著差异，这是由于新生皮与原生皮结构基本相同的缘故^[1,2]。虽然新皮（再生皮）生长的时间短，但由于受伤刺激，使它生长速度快，很快就与原生皮相连相通，形成了一个整体的营养运输通道，次生代谢物的合成积累自然就达到了一致。

References:

[1] Zhang K J, Zhang T. *The Magical Tree in China—Eucamnia umoides* (中国神树—杜仲) [M]. Beijing: Publishing Company of Economic Management, 1997.
 [2] Li Z L, Cui K M, Yu C S, et al. Anatomical studies of regeneration after ringing of *Eucamnia umoides* [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1981, 23(1): 6-11.
 [3] Li Z L, Cui K M, Yu C S, et al. Effect of envelop by plastic film after peeling stem bark of Duzhong [J]. *Scientia Sinica (A)* (中国科学 A 辑), 1981, 12: 1524-1527.
 [4] Li J S, Yan Y N. Primary study of constituents of Duzhong leaf and bark [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1986, 11(8): 419-422.
 [5] Feng X, Li H Y. Study on the comparison of flavonoids in Honewort and Yantai Bupleurum [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(8): 5-6.
 [6] Dong J E, Ma B L, Jia E H. Study on measuring method of acubin in *Eucamnia umoides* leaf [J]. *J Northwest Forestry Univ* (西北林学院报), 2001, 16(1): 53-55.
 [7] Takahashi T, Matsumoto N, Oshio H. The stability of bioactive components in the bark of *Eucamnia umoides* [J]. *Shoyakugaku Zasshi*, 1988, 42(2): 111-115.

真菌诱导子对长春花愈伤组织中吲哚生物碱积累的影响

张向飞, 张荣涛, 王宁宁, 王 勇, 王淑芳*

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 目的 研究分别来源于镰刀菌 *Fusarium solani* 和黑曲霉 *Aspergillus niger* 的真菌诱导子 (fungal elicitors) 对长春花愈伤组织中吲哚生物碱积累的影响。方法 用真菌诱导子对长春花愈伤组织进行诱导处理后提取吲哚总碱, 并用 RP-HPLC 法测定其中阿玛碱和长春质碱含量。结果 两种真菌诱导子对吲哚总碱及其中阿玛碱和长春质碱的积累均有较明显的正向调节作用, 并且确立了真菌诱导子最佳处理时间。结论 这两种真菌诱导子对长春花愈伤组织中吲哚生物碱的积累有显著影响。

关键词: 长春花; 真菌诱导子; 阿玛碱; 长春质碱; 愈伤组织

中图分类号: R 282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)02-0201-04

Effects of fungal elicitors on accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus calli*

ZHANG Xiang-fei, ZHANG Rong-tao, WANG Ning-ning, WANG Yong, WANG Shu-fang

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

* 收稿日期: 2003-05-12

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (013609211)

作者简介: 张向飞(1978—), 女, 山东淄博人, 现为南开大学植物学专业硕士研究生。Tel: (022) 23503714

Abstract: Object To investigate the effects of fungal elicitors derived from the fungi *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* on the accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* calli. **Methods** The total indole alkaloid was extracted after the calli were treated with fungal elicitors. Then, the determination of ajmalicine and catharanthine was carried out by RP-HPLC. **Results** The two fungal elicitors stimulate the accumulation not only the total indole alkaloid but the ajmalicine and catharanthine. The optimal exposure time of the two fungal elicitors for different kinds of indole alkaloid was investigated. **Conclusion** The two fungal elicitors have obvious effect on the accumulation of indole alkaloid in *C. roseus* calli.

Key words: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; fungal elicitor; ajmalicine; catharanthine; callus

长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 是夹竹桃科长春花属一种重要的药用植物, 它的次生代谢产物中含有 100 多种吲哚生物碱, 其中多数具有生物活性。如阿玛碱 (ajmalicine) 可用于治疗高血压、心律不齐等疾病; 长春碱 (vinblastine) 和长春新碱 (vincristine) 是目前应用最广泛的天然植物抗肿瘤药物; 而长春质碱 (catharanthine)、文多灵 (vindoline) 则是长春碱和长春新碱的合成前体^[1]。目前这些药用成分主要从天然植物中获取, 但在植物中的含量极低, 远远满足不了市场需求, 因此利用长春花的组织培养技术生产吲哚生物碱类药用成分被认为是一条很有希望的替代途径。这方面工作国外已取得很大进展, 如加拿大用长春花愈伤细胞生产阿玛碱已达到中试水平。

近年来, 利用诱导子 (elicitor) 对长春花细胞培养物进行诱导处理, 刺激吲哚生物碱的产生, 倍受国内外关注。诱导子种类很多, 包括一些生物多为真菌诱导子 (fungal elicitor) 或非生物分子^[2], 它们能够通过信号传导途径, 刺激植物发生防御反应, 诱导特定次生代谢产物形成和积累。真菌诱导子来源于真菌, 通过所含葡聚糖调节次生代谢相关酶活性, 进而影响生物碱的积累。Eilert 等人研究了不同来源真菌诱导子对长春花愈伤细胞吲哚生物碱含量的影响, 效果很好^[2,3]。本室也曾研究了来源于大丽花轮枝孢菌 *Verticillium dahliae* 的真菌诱导子对长春花冠瘿细胞吲哚生物碱含量的影响^[4]。为筛选出更佳效果的真菌诱导子, 在原有工作的基础上, 进一步探讨了 Fus 诱导子 (Fus elicitor) (来源于 *Fusarium solani* 的诱导子) 和 Asp 诱导子 (Asp elicitor) (来源于 *Aspergillus niger* 的诱导子) 对长春花愈伤组织生长及吲哚生物碱积累的影响, 为以后工业化生产长春花吲哚生物碱类药用有效成分提供理论和实践依据。

1 材料、仪器与药品

1.1 材料

1.1.1 长春花愈伤组织的培养: 长春花愈伤组织由

本室选育。将继代 12 次的愈伤组织培养 20 d 后, 由 MS 固体培养基转入含有 50 mL MS 培养液的 250 mL 三角瓶中进行摇床 (80~100 r/min) 培养, 接种量为 1.5~2 g/瓶, 培养液中还含 NAA、2,4-D、KT 各 1 mg/L, 3% 蔗糖, pH 6.0 (灭菌前), 26~28 °C 光培养。

1.1.2 真菌诱导子的制备: 参考 Eilert 方法^[2], 将真菌接种于同上的 MS 培养液中, 与愈伤组织在相同条件下培养 7 d 后, 高压灭菌, 高速匀浆, 定容至 5 mL, 3 000 r/min, 离心 15 min, 取上清液备用。

1.2 仪器与药品: LC-4A 高效液相色谱仪; SPD-2A S 紫外检测仪; Anaster 色谱数据工作站。RP-HPLC 用甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为去离子水, 长春质碱对照品由上海康爱生物制品有限公司提供, 阿玛碱对照品为 Sigma 公司产品。

2 方法

2.1 愈伤组织生长的测定: 收获悬浮培养的愈伤组织细胞, 真空抽滤至不滴水后称鲜重 (FW); 然后 80 °C 烘至恒重, 称干重 (DW)。

2.2 吲哚生物碱的提取及含量测定: 按前文^[5]方法提取吲哚总碱, 并称质量; 然后将吲哚总碱用甲醇定容至 1 mL, 过 0.22 μm 滤膜, 再采用 RP-HPLC 对其中的阿玛碱及长春质碱进行定量分析。色谱条件: Kromasil ODS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 7 μm) 柱; 检测波长 284 nm; 流动相: 甲醇-0.005 mol/L NH₄H₂PO₄ (7:3, pH 7.0); 流速 1.0 mL/min; 柱温 28 °C; 分析图谱见图 1。长春质碱和阿玛碱的峰面积与浓度 (0.05~15 mg/L) 呈线性关系, 回归方程分别为: $Y = 8\,560 X - 113\,78$, $r = 0.999\,2$, $RSD = 1.65\%$; $Y = 8\,031.3 X - 528.2$, $r = 0.999\,3$, $RSD = 1.83\%$ 。所有数据均为 3 次平行重复测定的结果, 标准偏差不超过 10%。

3 结果与讨论

3.1 愈伤组织生长及吲哚总碱积累的动态变化: 每 4 天收获一次愈伤组织, 按前述方法称质量, 并测其吲哚总碱含量, 结果如图 2 所示: 液体培养的愈伤组

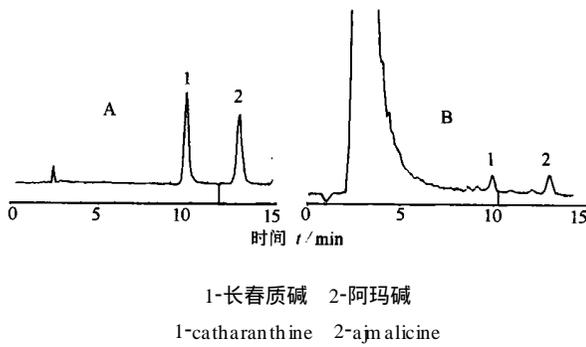


图 1 吲哚生物碱对照品 (A) 及样品 (B) 的色谱图

Fig 1 Chromatogram of reference substance (A) and sample (B) of indole alkaloids separated by RP-HPLC

织生长周期较短, 初期生长迟缓, 8 d 左右生长速度迅速增加, 20 d 达到最大生物产量。在培养的前期阶段吲哚总碱含量变化不大, 这是因为这段时期愈伤组织以生长为主, 次生代谢水平较低。16 d 后总碱含量迅速增加, 24 d 达最大值 58.67 mg/g DW。

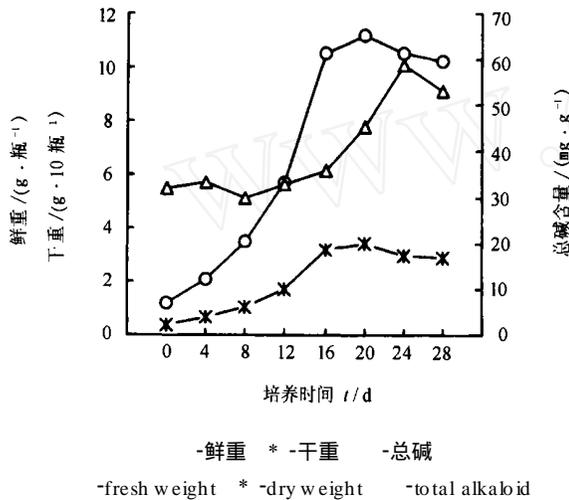


图 2 愈伤组织生长及吲哚总碱的动态变化

Fig 2 Kinetics of growth and accumulation of total indole alkaloid in calli

3.2 真菌诱导子对吲哚生物碱含量的影响: 愈伤组织培养至 18 d 时, 其培养液中各加入 5 mL 真菌诱导子, 对照加 5 mL 水, 每隔 2 h 取材一次, 称重, 并测其吲哚总碱及其中阿玛碱和长春质碱含量。结果表明: 真菌诱导子对组织生长影响不大, 但吲哚总碱及其中阿玛碱、长春质碱含量均有较明显的提高, 而对照组吲哚生物碱含量无多大变化。

3.2.1 真菌诱导子对吲哚总碱含量的影响: 结果如图 3 所示, 用 A sp 诱导子处理 16 h, 总碱含量达最大值 73.3 mg/g DW; 而用 Fus 诱导子处理需 22 h, 效果最好, 总碱含量可达 83.4 mg/g DW, 两种真菌诱导子均使总碱含量提高了 1 倍多, 其中 Fus 诱

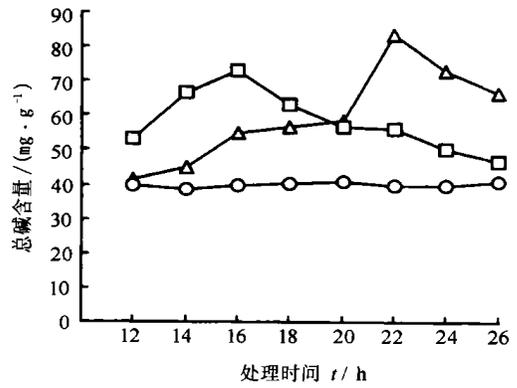


图 3 真菌诱导子对吲哚总碱含量的影响

Fig 3 Effect of fungal elicitors on total indole alkaloids content in calli

导子处理效果更好。

3.2.2 真菌诱导子对阿玛碱含量的影响: 结果见图 4, Fus 诱导子处理 12 h, 阿玛碱含量即达到最大值, 而用 A sp 诱导子处理, 需 16 h 阿玛碱含量才达到最大值, 与对照相比, 其阿玛碱含量分别增加了 1.3 和 1.6 倍。由图 3, 4 可以看出: 经 Fus 诱导子和 A sp 诱导子诱导处理的长春花愈伤组织中阿玛碱含量达最大值时, 其吲哚总碱含量仍在继续增加; 而当总碱含量达最大值时, 阿玛碱已有部分发生转化。

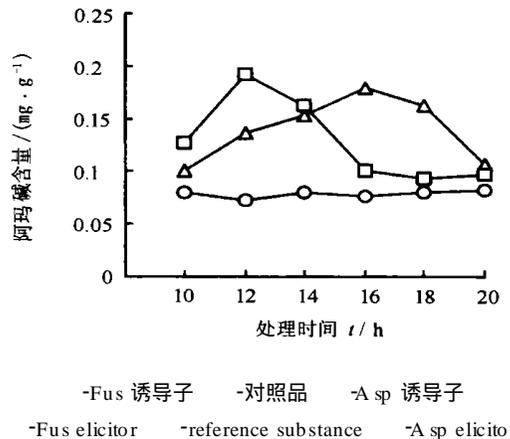


图 4 真菌诱导子对阿玛碱含量的影响

Fig 4 Effect of fungal elicitors on ajmalicine content

3.2.3 真菌诱导子对长春质碱含量的影响: 如图 5 所示, Fus 诱导子对长春质碱的诱导效果较好, 用 Fus 诱导子处理 16 h, 长春质碱含量可达 0.053 mg/g DW, 比对照增加了 2.8 倍; A sp 诱导子处理 22 h, 长春质碱含量也比对照增加了 1.5 倍。这两种真菌诱导子对长春质碱的最佳处理时间与对吲哚总碱的最佳处理时间一致。

以上研究结果表明: Fus 诱导子和 A sp 诱导子

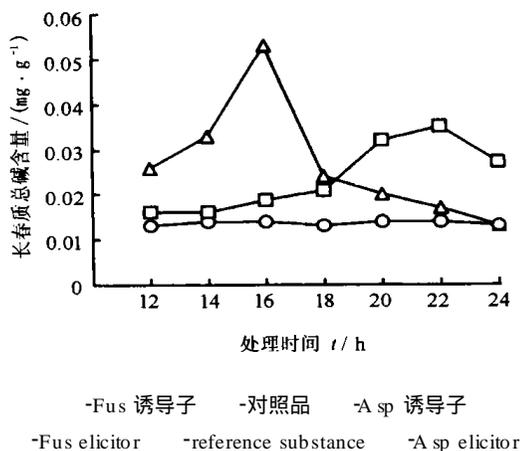


图 5 真菌诱导子对长春质碱含量的影响

Fig 5 Effect of fungal elicitors on catharanthine content
对吲哚总碱及其中阿玛碱、长春质碱的积累均有不同程度的正向调节作用,并且不同的真菌诱导子对不同的吲哚生物碱的最佳处理时间不同。Fus 诱导子对长春质碱的诱导效果最好,最佳处理时间 16 h,可使其含量比对照增加近 3 倍。有关 Fus 诱导子提高长春花愈伤组织中长春质碱含量的研究,国外

已有报道^[6],但国内尚未见到相关报道。长春质碱不仅本身具有治疗糖尿病及抗菌、止血的功效,而且还是抗癌药物长春碱、长春新碱的合成前体,因此,长春质碱的增产研究具有很高的应用价值。

References:

[1] Kutney J P, Boulet C A. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G don cell cultures XV. Synthesis of bisindole alkaloids by use of immobilized enzyme systems [J]. *Heterocycle*, 1988, 27: 621-628.
 [2] Eilert U, Constable F, Kurz W G W. Elicitor-stimulation of monoterpene indole alkaloid formation in suspension culture of *C. roseus* [J]. *Plant Physiology*, 1986, 126: 11-12.
 [3] Eilert U, Deluca V, Constable F, et al. Elicitor-mediated induction of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase activities in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 254(2): 491-497.
 [4] Wang S F, Wang N N, Wang Y, et al. Studies on the enhancing accumulation of indole alkaloids in crown gall cells of madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 1999, 30(2): 130-132.
 [5] Wang N N, Wang S F, Tian J Y, et al. Study on cell suspension culture of *Catharanthus roseus* crown gall induced by *A grobacterium* Cs8 [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1994, 10(3): 244-249.
 [6] Zhao J, Zhu W H, Hu Q. Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture [J]. *Enzyme Micro Technol*, 2001, 28: 666-672.

盐生肉苁蓉愈伤组织培养与苯乙醇苷类化合物合成的研究

郭志刚, 于金梅, 刘瑞芝, 巨 勇*, 肖 强*
(清华大学 化工系, 北京 100084)

摘要:目的 利用肉苁蓉组织培养技术生产苯乙醇苷类活性成分。方法 研究碳源、生长素和培养条件对细胞中松果菊苷、洋丁香酚苷(类叶升麻苷)和 2-乙酰基洋丁香酚苷 3 种苯乙醇苷类化合物合成的影响。结果 葡萄糖有利于上述 3 种成分的合成, 6-BA 1mg/L 与 IAA 1mg/L 或 6-BA 1mg/L 与 2,4-D 2mg/L 的激素配比有利于松果菊苷和洋丁香酚苷(类叶升麻苷)的积累。15 黑暗和 25 光照处理可以促进松果菊苷和洋丁香酚苷(类叶升麻苷)的积累。其中 IAA 2mg/L 与 6-BA 1mg/L、25 黑暗条件下培养时 3 种苯乙醇苷类的总产量达到 1 937.7 mg/L。盐生肉苁蓉愈伤组织中的主要成分与天然肉苁蓉基本相同, 而且愈伤组织中的松果菊苷、洋丁香酚苷(类叶升麻苷)和 2-乙酰基洋丁香酚苷含量高于天然肉苁蓉。结论 盐生肉苁蓉的愈伤组织或细胞可以代替肉苁蓉生产苯乙醇苷类活性成分。

关键词: 盐生肉苁蓉; 愈伤组织培养; 苯乙醇苷

中图分类号: R282.13

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)02-0204-04

Studies on culture of *Cistanche salsa* callus and synthesis of phenylethanoid glycosides

GUO Zhi-gang, YU Jin-mei, LU Rui-zhi, JU Yong, XIAO Qiang
(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Key words: *Cistanche salsa* (C. A. Mey.) Benth et Hook f; callus culture; phenylethanoid glycosides

肉苁蓉是一味传统中草药, 具有补肾、益精、强 筋健髓之功效, 主治下部虚损、老年血液枯槁, 也常

* 收稿日期: 2003-06-20

作者简介: 郭志刚(1958—), 男, 内蒙古赤峰市人, 1993 年获日本爱媛大学生物资源生产学博士学位, 现任清华大学化工系副教授, 从事药用植物细胞工程教学和研究工作。先后在国内学术杂志和学会上发表论文 50 余篇, 出版书籍 4 册近百万字。获得国家发明专利 2 项, 公开专利 1 项, 正在申请发明专利 2 项。Tel: (010) 62785603 E-mail: guozhig@tsinghua.edu.cn

* 本校化学系