

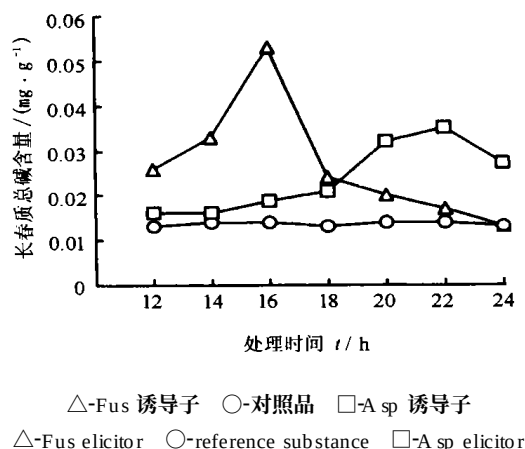


图5 真菌诱导子对长春质碱含量的影响

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 cell induced by *Agrobacterium* C58 [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 1937.7 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, LIU 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、老年血液枯竭, 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。先后在国内外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

被作为增强体质的保健品^[1]。近年来分离肉苁蓉活性成分的研究十分活跃,到目前为止已经分离到数10种化学成分^[2~6]。其中松果菊苷和洋丁香酚苷(类叶升麻苷)对抗衰老和增强记忆功能具有显著疗效^[7,8]。由于其具有特殊的保健作用,在保健品市场上被广泛应用。但随之而来的是野生肉苁蓉资源遭到严重破坏。为了保护野生肉苁蓉资源,必须尽快找到其代用资源。

人工栽培肉苁蓉虽然可以获得野生肉苁蓉的替代产品,但是由于其生产周期较长,容易受自然环境的限制。利用植物细胞培养技术生产肉苁蓉的有效成分也是一种有效方法。植物细胞培养技术可以将肉苁蓉的自然生产转变为工业化生产,并且可以通过代谢调控等手段大幅度提高其特定有效成分的含量。本研究以盐生肉苁蓉 *Cistanche salsa* (C. A. Mey.) Benth. et Hook. f. 作为实验材料,重点探讨细胞培养与苯乙醇苷类化合物合成的关系。

1 材料

盐生肉苁蓉 *C. salsa* (C. A. Mey.) Benth. et Hook. f. 植株采自宁夏盐池县,利用其茎韧皮部组织作为外植体,经过杀菌消毒后接种在改良的MS培养基上,经过近一个月的脱分化培养诱导出愈伤组织。经过5个世代的驯化筛选培养,获得CS2001株系并以此作为实验材料用于优化碳源、筛选生长素种类以及优化培养条件等研究。

2 方法

2.1 碳源实验:在改良的MS培养基中添加吲哚乙酸(IAA) 2 mg/L, 6-苊氨基嘌呤(6-BA) 1 mg/L, Gellan gum 2 g/L。碳源有葡萄糖和蔗糖两种,其添加浓度分别为20、30和40 g/L,每个处理为150 mL培养基,分装在5个100 mL的锥形瓶中,即重复5次。选择浅黄色盐生肉苁蓉愈伤组织接种,接种量为(1.05±0.1) g/瓶。25℃暗培养30 d,收获称鲜重和干重,并测其苯乙醇苷的含量。

2.2 生长素实验:以改良的Miller培养基为基本培养基,在添加6-BA 1 mg/L的基础上,分别添加吲哚乙酸(IAA) 1, 2 mg/L; 2, 4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D) 1, 2 mg/L;对照实验添加了2 mg/L的NAA。然后再加入30 g/L的蔗糖和6 g/L的琼脂做成平板培养基。每个处理接种5瓶,每瓶接种6块愈伤组织,愈伤组织鲜重(140±40) mg/块(干重12.6 mg/块)。然后在25℃黑暗条件下培养25 d收获,测定生物量及苯乙醇苷的积累情况。

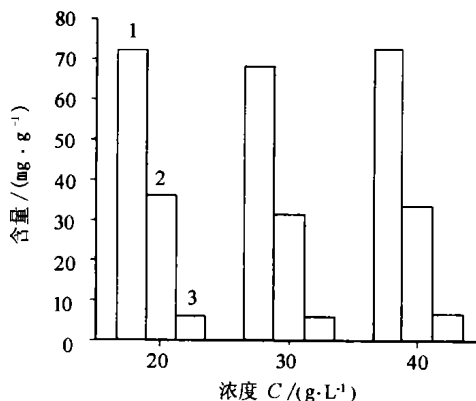
2.3 环境优化:为了优化适宜的培养温度我们设计

了在黑暗条件下15℃、20℃和25℃3个处理,同时设计了25℃黑暗和光照两个处理。基本培养基为改良Miller培养基,添加IAA 2 mg/L, 6-BA 1 mg/L, 蔗糖30 g/L, 琼脂6 g/L后做成固体培养基。每瓶接种6块愈伤组织,每块愈伤组织鲜重(120±20) mg(干重11.5 mg),每个处理重复3次。培养25 d后收获,测定生物量及苯乙醇苷的积累情况。

2.4 分析方法:苯乙醇苷类化合物的标准样品为本实验室分离纯化并通过质谱(Bruker Esquire-LC)和核磁共振(Bruker AM 400 MHz)鉴定的松果菊苷、洋丁香酚苷和2'-乙酰基洋丁香酚苷。将实验样品经真空冷冻干燥、研磨,称取0.5 g,以甲醇10 mL浸泡24 h后再移至超声条件下萃取20 min。溶液以微孔滤膜(0.45 μm)滤过。采用岛津SPD-10A_{vp}型高效液相色谱(HPLC)分析系统,检测波长335 nm,色谱柱为C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),进样量均为2 μL,流动相为甲醇-水(水相含1.5%乙酸),流速:0.8 mL/min;洗脱梯度:8%^{2 min} 34%^{30 min} 60%^{10 min} 8%。

3 结果

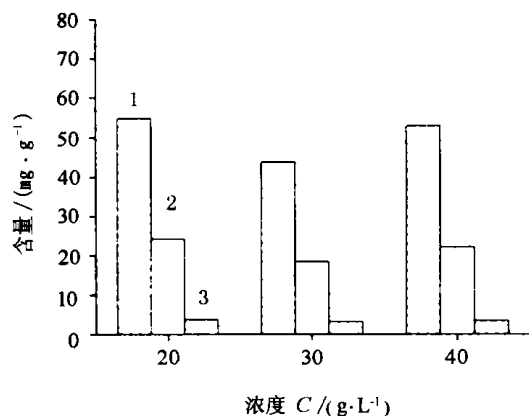
3.1 碳源的影响:结果表明,葡萄糖比蔗糖更有利于3种苯乙醇苷类化合物的合成,其中40 g/L葡萄糖处理的松果菊苷含量是同浓度蔗糖处理的140%左右(图1, 2)。从3种苯乙醇苷类成分的含量来看,松果菊苷的含量最高,洋丁香酚苷次之,2'-乙酰基洋丁香酚苷的含量较低。从糖的浓度处理来看,各处理之间的每种苯乙醇苷类化合物的含量没有显著性差异。



1-松果菊苷 2-洋丁香酚苷 3-2'-乙酰基洋丁香酚苷
1-echinacoside 2-acteoside 3-2'-acetylacteoside

图1 葡萄糖对于苯乙醇苷化合物合成的影响

Fig 1 Effect of glucose on synthesis of phenylethanoid glycosides



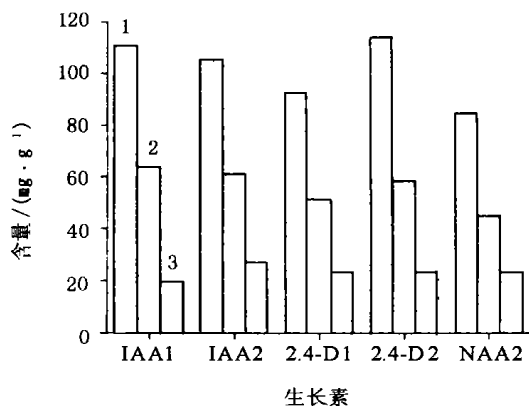
1-松果菊苷 2-洋丁香酚苷 3-2'-乙酰基洋丁香酚苷
1-echinacoside 2-acteoside 3-2'-acetylacteoside

图2 蔗糖对苯乙醇苷类化合物合成的影响

Fig 2 Effect of sucrose on synthesis of phenylethanoid glycosides

结合生物量的积累计算其产量(干细胞产量 g/L × 苯乙醇苷含量 mg/g) 时会发现,虽然葡萄糖有利于松果菊苷和洋丁香酚苷的合成,但是不利于细胞增殖,这样其产量反而低于蔗糖处理。从表1 可以看到,40 mg/L 蔗糖处理细胞中的3种苯乙醇苷的产量均高于葡萄糖处理。

3.2 生长素的影响:结果见图3。IAA 和 2,4-D 可以促进松果菊苷和洋丁香酚苷的合成,其中 1 mg/L 的 IAA 和 2 mg/L 的 2,4-D 的促进效果较好。NAA 与 2,4-D 的效果基本相同。此外,3种生长素对 2'-乙酰基洋丁香酚苷的合成没有显著影响。如果加上生长素对生物量积累的影响进行综合考察,IAA 可以显著提高松果菊苷和洋丁香酚苷的产量(表1)。2,4-D 虽然也可以促进松果菊苷和洋丁香



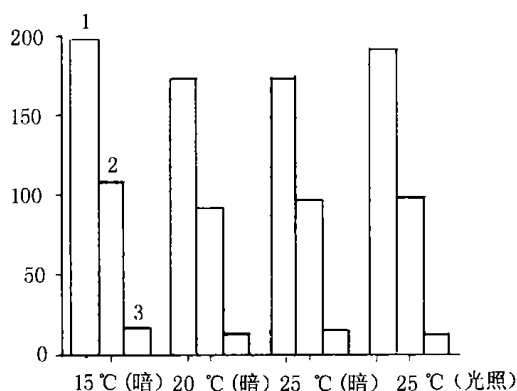
1-松果菊苷 2-洋丁香酚苷 3-2'-乙酰基洋丁香酚苷
1-echinacoside 2-acteoside 3-2'-acetylacteoside

图3 生长素对苯乙醇苷类化合物合成的影响

Fig 3 Effect of auxin on synthesis of phenylethanoid glycosides

酚苷的合成,但是由于其不利于生物量积累,所以其3种苯乙醇苷类成分的总产量与NAA处理基本相同(表1)。

3.3 环境影响:图4 温度和光照对苯乙醇苷类物质合成的影响。在黑暗条件下,15℃ 低温有利于松果菊苷和洋丁香酚苷的合成,20℃ 和 25℃ 的结果基本相同。温度变化对 2'-乙酰基洋丁香酚苷的合成几乎没有影响。此外,光照有利于松果菊苷的合成,但是对洋丁香酚苷的合成稍有抑制。虽然在黑暗条件下15℃ 低温均有利于3种苯乙醇苷类化合物的合成(图4),但是由于15℃ 低温不利于生物量积累,所以从3种化合物的产量来看,却随着培养温度的



1-松果菊苷 2-洋丁香酚苷 3-2'-乙酰基洋丁香酚苷
1-echinacoside 2-acteoside 3-2'-acetylacteoside

图4 温度和光照对苯乙醇苷类化合物合成的影响

Fig 4 Effect of temperature and illumination on synthesis of phenylethanoid glycosides

表1 各种处理对松果菊苷、洋丁香酚苷和 2'-乙酰基洋丁香酚苷产量的影响

Table 1 Effect on yield of echinacoside, acteoside, and 2'-acetylacteoside for different treatment

实验处理	松果菊苷 /(mg·L ⁻¹)	洋丁香酚苷 /(mg·L ⁻¹)	2'-乙酰基洋丁香 酚苷/(mg·L ⁻¹)	产量 /(mg·L ⁻¹)
蔗糖 20 g/L	412.7	182.3	27.8	622.8
蔗糖 30 g/L	377.3	159.4	27.4	564.1
蔗糖 40 g/L	533.0	222.7	34.4	790.1
葡萄糖 20 g/L	342.2	172.4	28.9	543.5
葡萄糖 30 g/L	346.4	159.7	29.9	536.0
葡萄糖 40 g/L	368.2	162.9	34.0	565.1
IAA 1 mg/L	655.2	375.2	58.1	1 088.5
IAA 2 mg/L	634.7	366.6	78.6	107.9
2,4-D 1 mg/L	470.1	257.5	66.9	794.5
2,4-D 2 mg/L	550.0	280.4	66.9	897.3
NAA 2 mg/L	490.4	260.7	66.1	817.2
15℃/黑暗	859.0	471.7	71.7	1 402.4
20℃/黑暗	940.2	498.8	73.2	1 512.2
25℃/黑暗	1 176.8	656.4	104.5	1 937.7
25℃/光照	1 051.2	534.9	69.9	1 656.0

升高而增加。其中 25 ℃ 暗培养的 3 种化合物总产量达到了 1.9 g/L。同样光照也可以促进松果菊苷和洋丁香酚苷的合成,但是由于光照不利于愈伤组织增殖,所以 25 ℃ 光照培养的 3 种苯乙醇苷类化合物的产量却低于 25 ℃ 黑暗培养(表 1)。

根据以上试验结果得知,盐生肉苁蓉愈伤组织的生长条件与其苯乙醇苷类化合物的合成条件有所不同,因此为了提高苯乙醇苷类活性成分的产量,必须采取两步培养法,即首先给以蔗糖、IAA、25 ℃ 黑暗培养促进生物量的积累,再改变培养条件以葡萄糖、IAA、15 ℃、光照培养促进苯乙醇苷类化合物的合成。

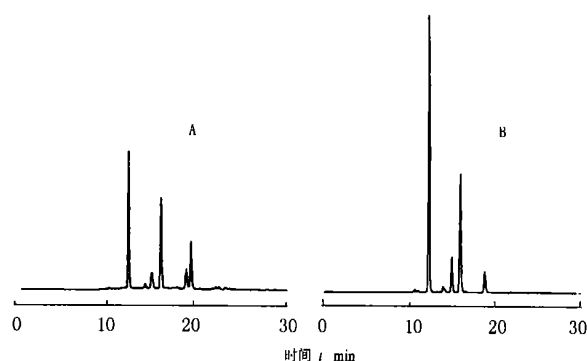
此外,我们还把在药店购买的生苁蓉、熟苁蓉、野外采摘的天然盐生肉苁蓉和盐生肉苁蓉细胞以及荒漠肉苁蓉细胞的 3 种苯乙醇苷类化合物的含量进行了分析比较(表 2),其中荒漠肉苁蓉的培养细胞的松果菊苷含量达到 151.9 mg/g,是熟苁蓉或生苁蓉的 40~70 倍,3 种化合物的总量为 158.7 mg/g,是药店销售苁蓉的 20~50 倍。而盐生肉苁蓉培养细胞的松果菊苷含量是药店销售的 25~50 倍,洋丁香酚苷含量是药店的 25~40 倍,2'-乙酰基洋丁香酚苷的含量是药店的 6~13 倍,总产量是药店的 25~60 倍。与冷冻干燥处理的新鲜盐生肉苁蓉相比,培养细胞的松果菊苷、洋丁香酚苷和 2'-乙酰基洋丁香酚苷含量也远远高于冷冻干燥处理。结果表明培养细胞的苯乙醇苷类成分含量较高,不良的干燥处理方法会造成苯乙醇苷类化合物的严重衰变。

表 2 药用苁蓉与肉苁蓉细胞的苯乙醇苷类物质含量比较 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

Table 2 Comparison of content in phenylethanoid glycosides of *C. salsa* and *C. salsa* cell $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

样品	松果菊苷含量	洋丁香酚苷含量	2'-乙酰基洋丁香酚苷含量	合计
生苁蓉	1.91	0.94	0.097	2.947
熟苁蓉	3.64	1.39	2.05	7.08
天然盐生肉苁蓉	49.83	40.44	11.99	102.26
盐生肉苁蓉细胞	105.60	60.99	13.07	179.66
荒漠肉苁蓉细胞	151.89	5.05	1.78	158.72

图 5-A、B 分别是天然盐生肉苁蓉与盐生肉苁蓉细胞的苯乙醇苷类物质 HPLC 分析图谱,可以看到其主要成分的出峰时间和顺序基本相同。表明采取肉苁蓉细胞培养法可以生产苯乙醇苷类活性物质。



A-天然盐生肉苁蓉 B-盐生肉苁蓉培养细胞

A-*C. salsa* B-cell in *C. salsa*

图 5 HPLC 图谱

Fig 5 HPLC chromatogram

4 讨论

以上实验结果表明,添加葡萄糖比蔗糖更有利于苯乙醇苷类化合物的合成,添加 2,4-D 可以促进松果菊苷和洋丁香酚苷的合成,15 ℃ 黑暗和 25 ℃ 光照处理可以促进松果菊苷和洋丁香酚苷的合成。盐生肉苁蓉愈伤组织中的主要成分与肉苁蓉药材基本相同,只是盐生肉苁蓉愈伤组织中的松果菊苷、洋丁香酚苷和 2'-乙酰基洋丁香酚苷的含量远远高于药用肉苁蓉。因此采用盐生肉苁蓉的愈伤组织或细胞大规模培养技术可以生产出肉苁蓉的有效成分。

References

- [1] Zhu Y H, Luo Z M. Study progress and prospect analysis of *Cistanche salsa* (C. A. Mey.) [J]. *J. Hunan Forest Sci Tech*, 2000, 27(4): 19-22.
- [2] Jin X L, Zhang Q R. Chemical constituents of desertliving *cistanche* (*Cistanche deserticola*), research and development [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1994, 19(11): 695-697.
- [3] Xu W H, Qiu S X, Zhao J H, et al. Studies on the chemical constituents of desertliving *cistanche* (*Cistanche deserticola*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(10): 509-513.
- [4] Tu P F, He Y P, Lou Z C. Studies on the chemical constituents of the cultivated desertliving *cistanche* (*Cistanche deserticola*) [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1997, 9(2): 6-10.
- [5] Xu Z H, Yang J S, Lü R M, et al. Studies on the chemical constituents of desertliving *cistanche* (*Cistanche deserticola*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(4): 244-246.
- [6] Song Z H, Tu P F, Zhao Y Y, et al. Phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(11): 808-810.
- [7] Xue D J, Zhang M, Wu X H, et al. Studies on the active antisenile constituents in *Cistanche deserticola* Y. C. Ma [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20(11): 687-689.