

生物和非生物诱导子对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响

晏琼^{1,2}, 胡宗定¹, 吴建勇^{2*}

(1. 天津大学化工学院, 天津 300072; 2. 香港理工大学 应用生物与化学科技学系, 香港)

摘要:目的 比较几种生物诱导子〔酵母提取物(yeast extract)、寡半乳糖醛酸(oligogalacturonides)、真菌诱导子(fungal elicitor)〕和非生物诱导子(Ag^+ 、 Co^{2+} 和 α -氨基异丁酸)对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响。方法 高效液相色谱法测定3种丹参酮。结果 生物诱导子一般都能有效地提高丹参酮的产量,不同诱导子的诱导效果之间存在差别。最高的丹参酮产量由100 $\mu\text{g/mL}$ 的真菌诱导子获得,是对照组产量(0.42 mg/g)的4.7倍。非生物诱导子对丹参酮的诱导能力相对生物诱导子较差,其中50 $\mu\text{mol/L}$ Co^{2+} 获得了最高的丹参酮产量(1.75 mg/g),是对照组产量的4.1倍。生物诱导子和非生物诱导子表现出了一定的诱导选择性。所有的生物诱导子都显著提高了隐丹参酮的量而所有的非生物诱导子都选择性地提高了丹参酮I的量。并且在大部分情况下,添加的诱导子都没有对丹参毛状根的生长造成明显的抑制作用。结论 在丹参毛状根培养中添加不同的生物和非生物诱导子都可以选择性地提高丹参酮的积累,并且不影响毛状根的生长。

关键词:丹参毛状根;丹参酮;生物诱导子;非生物诱导子

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)02-0262-04

Influence of biotic and abiotic elicitors on production of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture

YAN Qiong^{1,2}, HU Zong-ding¹, WU Jian-yong²

(1. College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Department of Applied Biology and Chemical Technology, the Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong)

Abstract: **Objective** To compare influence of several biotic elicitors (yeast extract, oligogalacturonides, and fungal elicitor) and abiotic elicitors (Ag^+ , Co^{2+} , and α -amino isobutyric acid) on tanshinone production in the hairy root culture of *Salvia miltiorrhiza*. **Methods** The contents of three tanshinones were analyzed by high performance liquid chromatography. **Results** Biotic elicitors increased effectively the yield of tanshinones and there were difference among different elicitors' effects. The highest content of tanshinones was achieved by fungal elicitor at 100 $\mu\text{g/mL}$, which was 0.42 mg/g, 4.7-fold of the control. The elicitation effects of abiotic elicitors were relatively lower than those of biotic elicitors, with Co^{2+} at 50 $\mu\text{mol/L}$ giving the highest content of tanshinone (1.75 mg/g, 4.1-fold of the control) among abiotic elicitors. Biotic and abiotic elicitors showed the selectivity of elicitation. All biotic elicitors notably increased the cryptotanshinone content and all abiotic elicitors selectively enhanced the tanshinone I content. And in most cases, the elicitors added did not cause any obviously inhibitory effect on the hairy root growth. **Conclusion** Adding different biotic and abiotic elicitors may selectively promote tanshinone accumulation and not affect the hairy root growth in the hairy root cultures of *S. miltiorrhiza*.

Key words: the hairy root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge; tanshinones; biotic elicitor; abiotic elicitor

丹参 *Salvia miltiorrhizae* Bunge 是治疗心血管系统疾病的重要中药,主要的一大类生物活性成分是脂溶性的二萜醌类化合物(各种丹参酮)。丹参酮类化合物具有改善血液循环、抗炎抗菌、抑制血小板

聚集、耐缺氧等药理作用^[1]。供临床使用的总丹参酮是混合物,其中3种丹参酮抗炎作用明显,即隐丹参酮(cryptotanshinone)、丹参酮I(tanshinone I)和丹参酮II_A(tanshinone II_A)。野生丹参根由于有效

收稿日期:2005-05-21

基金项目:香港理工大学资助项目(G-YD28 and ASD fund)

作者简介:晏琼(1977—),女,湖南省邵东县人,博士研究生,研究方向:植物细胞和组织培养。

Tel: (0852) 27665649 Fax: (0852) 23649932 E-mail: yanqiongdx@eyou.com

* 通讯作者 吴建勇 Tel: (0852) 27666687 Fax: (0852) 23649932 E-mail: bcjywu@polyu.edu.hk

活性成分不稳定,且生长周期长,不能满足市场的需求。由发根农杆菌感染植物形成的丹参毛状根系统,生长速度较快,遗传性稳定,是生产丹参药理活性物质的良好培养系统。但是建立起来的丹参毛状根培养系统仍然存在着丹参酮产量低的问题,影响着培养的进一步放大和工业化。

诱导已经成为植物细胞和组织培养中提高次生代谢产物生产最有效的方法之一;最初对诱导作用的研究大部分是在悬浮培养的植物细胞中进行的,后来有一些文献报道在毛状根培养体系中一些生物的或者非生物的诱导子也可以成功地诱导次生代谢产物的生产^[2]。但是就目前的研究结果来看,不同植物细胞或组织培养体系适用的诱导子不具有普遍性^[3]。已有文献报道在丹参毛状根培养中使用真菌发酵物可以诱导丹参酮积累,但没有对诱导子的种类以及添加浓度进行优化^[4]。本实验的目的是比较不同种类(生物和非生物)诱导子对丹参毛状根培养积累丹参酮的影响,以找到能够有效提高丹参酮生产的诱导子及其最优浓度,为进一步的生产放大和研究做好基础。

1 材料与方法

1.1 丹参毛状根的培养:本试验使用的丹参毛状根是用发根农杆菌 ATCC15834 感染丹参苗获得的^[5],并在无激素的 MS-N(不含硝酸铵,蔗糖质量分数 30 g/L)培养基上进行继代培养。所有试验都使用液体悬浮培养的毛状根,将 0.3 g 湿根(液体培养了 3~4 周的嫩根)接于装有 40 mL MS-N 液体培养基的 200 mL 摇瓶中作为试验材料。25 ℃、110~120 r/min,黑暗下悬浮培养。

1.2 生物诱导子的制备:真菌诱导子(fungal elicitor,尖孢镰刀菌的细胞壁粗提物)和酵母提取物(yeast extract)的制备分别参见文献报道^[6,7]。寡半乳糖醛酸(oligogalacturonides)的制备方法:将 60 mg/mL 柑桔果胶溶液和 30 μg/mL 果胶酶溶液(美国 Sigma)在室温下混合 20 min,然后将溶液煮沸并且滤过。将滤液收集起来冷冻干燥。取 1.0 g 冷冻收集的固体粉末溶于 150 mL 去离子水中,121 ℃下高压灭菌 20 min 后置于 4 ℃冰箱中保存待用。所有生物诱导子的质量浓度均以糖的质量浓度标定,糖的质量浓度用蒽酮比色法^[8]测定,测得真菌诱导子、酵母提取物和寡半乳糖醛酸的糖质量浓度分别为 1 443.2、5 678.0 和 1 210.6 mg/L。

1.3 非生物诱导子的制备:Ag⁺的制备参见文献报道^[5]。CoCl₂ 和 α-氨基异丁酸(α-amino isobutyric

acid, AIB)配制成母液。所有母液均用滤膜(0.22 μm)滤过灭菌后待用。上述化学试剂均由 Sigma 公司获得。

1.4 毛状根干重的测定:将收获的毛状根用蒸馏水清洗和滤过 3 遍,然后用滤纸吸去多余水分,放入温度为 45~50 ℃的烘箱中干燥直至其质量恒定,测其干重。以每升培养液中根干重进行比较。

1.5 毛状根中丹参酮的提取和测定:按文献报道^[5]方法。取 100 mg 干根粉末置于 8 mL 甲醇中研磨 5 min,然后超声萃取 1 h。提取混合物静置过夜后,离心,将得到的提取液真空干燥。残余物重新用 0.5 mL 色谱甲醇溶解,用 0.45 μm 的滤膜滤过待测。丹参酮的 HPLC 分析:利用 C-18 反相硅胶柱(Econosphere C₁₈ 5 μm, 250 mm×4.6 mm)进行恒速洗脱,体积流量控制在 1 mL/min,流动相组成为色谱甲醇-水(61:39),检测波长为 270 nm。

1.6 诱导试验方案:向培养到 18 d 的丹参毛状根中分别加入各种剂量的诱导子,继续培养 7 d 后收获,测定毛状根的干重及毛状根中丹参酮(隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A)的量。

2 结果

2.1 生物诱导子对丹参毛状根生长和总丹参酮产量的影响:选用的 3 种生物诱导子在各质量浓度下都没有对丹参毛状根的生长造成抑制,毛状根的干重反而比对照组有较大的提高。3 种生物诱导子都可以提高丹参酮的生产,虽然在诱导效果上存在一定的差别。与文献报道^[4]比较,本试验选用的 3 种生物诱导子对丹参酮积累的诱导效果更好,丹参酮的质量分数接近甚至超过了生药水平(0.153 mg/g)。真菌诱导子获得了最好的诱导效果,其次是寡半乳糖醛酸,最后是酵母提取物。并且 3 种生物诱导子都表现出了剂量相关性,即较低质量浓度诱导子比较高质量浓度诱导子有相对更好的诱导效果。见表 1。

表 1 生物诱导子对丹参毛状根生长和总丹参酮产量的影响(n=3)

Table 1 Effect of various biotic elicitors on hairy root growth and total tanshinone yield (n=3)

处理类别	质量浓度 (μg·mL ⁻¹)	根干重 (g·L ⁻¹)	丹参酮产量 (mg·g ⁻¹)	提高倍数
对照	—	3.60±0.46	0.43±0.03	—
酵母提取物	100	5.03±0.85	1.37±0.33	3.2
	200	4.62±0.29	1.06±0.12	2.5
寡半乳糖醛酸	100	6.41±0.83	1.79±0.03	4.2
	200	7.03±1.15	1.60±0.16	3.7
真菌诱导子	100	4.31±0.13	2.00±0.27	4.7
	200	5.19±0.67	1.61±0.15	3.8

2.2 非生物诱导子对丹参毛状根生长和总丹参酮产量的影响:本试验选用的 3 种非生物诱导子对丹参毛状根的生长造成了不同的影响,银离子和 α -氨基异丁酸在各质量浓度下对毛状根的生长都没有明显的抑制作用,而钴离子对毛状根的生长有一定的抑制作用。总体来看 3 种非生物诱导子对丹参酮的诱导效果比生物诱导子相对要差,只有 50 $\mu\text{mol/L}$ 的钴离子表现出了与生物诱导子相当的诱导效果。见表 2。

表 2 非生物诱导子对丹参毛状根生长和总丹参酮产量的影响 ($n=3$)

Table 2 Effect of various abiotic elicitors on hairy root growth and total tanshinone yield ($n=3$)

处理类别	质量浓度 /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	根干重 /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	丹参酮产量 /($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	提高倍数
对照	—	3.60 $\pm$ 0.46	0.43 $\pm$ 0.03	—
硝酸根	30	4.00 $\pm$ 0.57	0.89 $\pm$ 0.49	2.1
	50	4.80 $\pm$ 0.00	0.83 $\pm$ 0.20	1.9
α -氨基异丁酸	100	4.40 $\pm$ 1.13	0.99 $\pm$ 0.16	2.3
	200	5.00 $\pm$ 0.28	0.78 $\pm$ 0.04	1.8
氯化钴	50	3.30 $\pm$ 0.56	1.75 $\pm$ 0.32	4.1
	100	3.70 $\pm$ 0.42	1.13 $\pm$ 0.41	2.6
	300	4.00 $\pm$ 0.57	1.00 $\pm$ 0.23	2.4

2.3 诱导子对不同丹参酮诱导效果的比较:本试验分析测定了 3 种丹参酮(隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A)。结果表明诱导子对丹参酮的诱导有一定的诱导选择性:各种生物诱导子都极大地提高了隐丹参酮的质量分数,而各种非生物诱导子对隐丹参酮质量分数的提高很不明显;各种生物诱导子都没有诱导提高丹参酮 I 的产量,但各种非生物诱导子却显著提高了丹参酮 I 的产量;各种生物诱导子对丹参酮 II_A的质量分数有一定的提高,而非生物诱导子对丹参酮 II_A的质量分数影响无规律可言。见表 3。

表 3 诱导子对不同丹参酮诱导效果的比较 ($n=3$)

Table 3 Comparison of various elicitors on elicitation effect of different tanshinones ($n=3$)

诱导子类别	诱导子浓度	丹参酮产量/%			
		隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II _A	
对照	—	100	100	100	
酵母提取物	100 $\mu\text{g/mL}$	1174.20 $\pm$ 89.87	77.19 $\pm$ 5.41	120.91 $\pm$ 13.12	
羧半乳糖醛酸	100 $\mu\text{g/mL}$	1488.89 $\pm$ 128.44	114.70 $\pm$ 6.59	155.56 $\pm$ 9.77	
真菌诱导子	100 $\mu\text{g/mL}$	1981.09 $\pm$ 173.72	77.00 $\pm$ 8.03	105.42 $\pm$ 5.11	
硝酸银	30 $\mu\text{mol/L}$	120.45 $\pm$ 8.11	215.32 $\pm$ 9.57	82.27 $\pm$ 8.37	
α -氨基异丁酸	100 $\mu\text{mol/L}$	108.24 $\pm$ 15.21	257.85 $\pm$ 13.23	69.09 $\pm$ 6.19	
氯化钴	50 $\mu\text{mol/L}$	129.00 $\pm$ 5.94	429.74 $\pm$ 30.09	203.11 $\pm$ 12.50	

3 讨论

诱导技术已经成为了提高植物细胞或组织培养生产次生代谢产物的有效方法,从目前的研究结果看诱导作用效果可以分为 3 个方面:(1)提高植物细胞或组织内已经存在的某个次生代谢产物的量;(2)

选择性地提高不同次生代谢产物的量,改变不同次生代谢产物之间的合成比例;(3)诱导产生出新的次生代谢产物,改变植物细胞或组织内原有的代谢产物谱。尤其是后两个方面的作用效果使得诱导研究有了更深的意义和作用。毛状根体系是很适合于使用诱导技术的体系,因为毛状根的固定特性,使得毛状根的诱导比悬浮培养细胞的诱导更有效^[2]。在不同毛状根培养体系中已经找到了一些能有效提高次生代谢产物的生物或非生物的诱导子^[9,10]。

丹参毛状根培养体系虽然已经成功地建立,但是其中主要的次生代谢产物丹参酮的质量分数很低^[7,11,12]。丹参毛状根中丹参酮的积累可以被某些真菌发酵物诱导^[4],本试验结果进一步证实了诱导子(生物和非生物的)是调节丹参毛状根中丹参酮积累的有效物质,选择的几种诱导子都可以在不同程度上提高丹参酮的质量分数。并且从总体上看选择的生物诱导子比非生物诱导子对丹参酮积累的诱导效果更好,这可能是由于丹参毛状根对生物诱导子的刺激作用更加敏感。丹参毛状根中的不同丹参酮还可以被选择性地诱导提高,生物诱导子选择性地提高了隐丹参酮的量而非生物诱导子选择性地提高了丹参酮 I 的量。这可能与生物和非生物诱导子引起植物防御响应的具体机制和途径之间的差别有关。目前临床应用的丹参制剂中,虽然大部分使用的是丹参混合提取物,使用纯化或半纯化的丹参酮类化合物的也有几例,且有上升的趋势^[13],因此利用不同诱导子的选择性诱导效果有助于针对性地提高所需丹参酮的量。

本实验结果表明应进一步研究生物和非生物诱导子对丹参毛状根作用机制之间的差异,以找到最根本的诱导调节方式。其次,在这一试验结果的基础上,可以进一步考察诱导子之间的协同作用,以筛选适合丹参毛状根积累丹参酮的最佳条件,为工业化培养丹参毛状根生产次生代谢产物打下理论基础。

References:

- [1] Tang W. *Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- [2] Doran P M. *Hairy roots: Culture and Application* [M]. Singapore: Harwood Academic Publishers, 1997.
- [3] Buitelaar R M, Cesario M T, Tramper J. Elicitation of thiophene production by hairy roots of *Tagetes patula* [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 1992, 14: 2-7.
- [4] Zhang Y L, Song J Y, Lü G L, et al. Establishment of *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture and tanshinone production [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20(5): 269-271.
- [5] Zhang C H, Yan Q, Cheuk W K, et al. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag^+ elicitation and nutrient feeding [J]. *Planta Med*, 2004, 70: 147-151.

- [6] Yan Q, Yuan Y J, Hu Z D. Synergistic effects of fructose feeding and fungal elicitor on *Taxus chinensis* var. *mairei* suspension cultures [J]. *Chem Eng* (化学工程), 2003, 31(5): 46-49.
- [7] Chen H, Chen F, Chiu F C K, et al. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 2001, 28: 100-105.
- [8] Yuan Y S, Zhu W H, Chen J H. *Biochemistry Experiment* (生物化学实验) [M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Publishing House, 1988.
- [9] Pitta-Alvarez S I, Spollansky T C, Giulietti A M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida* [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 2000, 26: 252-258.
- [10] Furze J M, Rhodes M J C, Parr A J, et al. Abiotic factors elicit sesquiterpenoid phytoalexin production but not alkaloid production in transformed root cultures of *Datura stramonium* [J]. *Plant Cell Rep*, 1991, 10: 111-114.
- [11] Hu Z B, Alfermann A W. Diterpenoid production in hairy root culture of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(3): 699-703.
- [12] Chen H, Chen F. Induction of phytoalexin formation in crown gall and hairy root culture of *Salvia miltiorrhiza* by methyl viologen [J]. *Biotechnol Lett*, 2000, 22: 715-720.
- [13] Du G H, Zhang J T. The General situation and progress of the modern research of Red Sage Root (*Radix Salviae Miltiorrhizae*) [J]. *Her Med* (医药导报), 2004, 23(7): 435-440.

甘草耐盐性愈伤组织的诱导及植株再生研究

计巧灵

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:目的 通过对耐盐性甘草愈伤组织再生植株研究, 促进在盐碱滩人工栽培甘草技术的发展。方法 诱导乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 无菌苗子叶块和胚轴段在含盐培养基上脱分化均成功。逐步提高盐质量浓度诱导愈伤组织扩增, 继之诱生不定芽, 芽经扶壮后诱根, 得到大量试管苗。结果 子叶块和胚轴段在 MS+BA 1.5 mg/L+2.4-D 1.2 mg/L+NaCl 100 mg/L 中脱分化效果好, 愈伤多为淡黄色, 稍透明。NaCl 质量浓度增至 250 mg/L 后愈伤组织长势很快下降, 色暗, 有些死亡。愈伤组织经无盐培养继代两轮后, 转入 MS+BA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+NaCl 200 mg/L 上分化出大量不定芽, 说明不定芽的耐盐性是遗传所致。降温(18~22℃)、自然光照, 并添加适量的 GA₃ 有利于壮芽形成, 在诱导生根的 83 个芽中的 55 个生根, 其中 1/2MS+IAA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+NaCl 200 mg/L 最适宜生根, 生根率达 66.26%。结论 通过对耐盐性甘草愈伤组织的诱导可得到耐盐性甘草的再生植株。

关键词: 乌拉尔甘草; 组织培养; 再生植株

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)02-0265-04

Regenerated plantlet from salt-tolerant callus of *Glycyrrhiza uralensis*

Ji Qiao-ling

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Objective To develop the technique of artificial cultivation of *Glycyrrhiza uralensis* on salina by exploring regenerated plantlet from the salt-tolerant callus. **Methods** The experiments of dedifferentiation were successful in inducing cotyledon sections and embryonic axle sections from sterilized shoot, as explants, on salty media. The induced callus was to be multiplied and adventitious buds to be produced when the salt concentration of medium increased gradually. Then the buds were rooting and a lot of plantlet occurring. **Results** Dedifferentiation of cotyledon sections and embryonic axle sections was preferable on MS+BA 1.5 mg/L+2.4-D 1.2 mg/L+NaCl 100 mg/L. Callus was hazel and just a little translucent. Growth of callus became weaker and weaker after increasing concentration of NaCl to 250 mg/L, the color got darker, and much callus died. A lot of adventitious buds came into being on MS+BA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+NaCl 200 mg/L after inoculating the callus on non-salty media for multiplying twice. It proved that the salt-tolerant character of the buds was induced by reason of genetics. Decreasing temperature (18—22℃) at natural light and adding an appropriate quantity of GA₃ in medium were helpful for the formation of strong sprouts. The rooting rate was 66.26% with rooting 55 adventi-