

## 聚乙二醇-6000 胁迫对丹参毛状根中丹参酮积累的影响

盛东峰, 陈 龙

周口师范学院 生命科学系, 河南 周口 466001

**摘要:**目的 研究聚乙二醇-6000 (polyethylene glycol-6000, PEG-6000) 胁迫对丹参毛状根丹参酮类成分积累的影响。方法 用发根农杆菌 ATCC15834 诱导生产丹参毛状根, 经 20 d 悬浮振荡培养后, 分别采用 1.2%、2.0%、5.5%、10% 的 PEG-6000 处理, 并用 HPLC 法测定 PEG-6000 处理 1 周后丹参毛状根中丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I、丹参酮 II<sub>A</sub> 的量。结果 PEG-6000 能够抑制丹参毛状根的生长, PEG-6000 为 1.2%、2.0%、5.5% 和 10% 处理条件下, 丹参毛状根干质量分别减少为对照组的 75.1%、83.0%、76.2%、76.1%; PEG-6000 处理能够显著提高丹参毛状根中 4 种丹参酮的量, 2.0%、5.5% 的 PEG-6000 能够显著促进丹参酮 I 量的提高, 1.2% PEG-6000 能够显著提高隐丹参酮量的; 二氢丹参酮 I 的量以 2.0% PEG-6000 处理条件下最高; 丹参酮 II<sub>A</sub> 的量以 5.5% PEG-6000 处理条件下最高。结论 PEG-6000 能显著促进丹参毛状根中丹参酮类成分的积累。

**关键词:** 聚乙二醇; 发根农杆菌; 丹参毛状根; 丹参酮; 积累

**中图分类号:** R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)09-1181-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.09.022

## Effects of PEG-6000 stress on tanshinones accumulation in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza*

SHENG Dong-feng, CHEN Long

Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China

**Abstract: Objective** To study the effects of polyethylene glycol-6000 (PEG-6000) stress on the accumulation of tanshinones in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza*. **Methods** *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 was used to induce the hairy roots of *S. miltiorrhiza*. After 20 d suspension culture, the PEG-6000 (1.2%, 2.0%, 5.5%, and 10%, respectively) was added into the suspension cultures and at the same time, the contents of tanshinones (including tanshinone I, cryptotanshinone, dihydrotanshinone I, and tanshinone II<sub>A</sub>) were quantified by HPLC on day 7. **Results** The growth of the hairy roots of *S. miltiorrhiza* was inhibited by PEG-6000. After PEG-6000 (1.2%, 2.0%, 5.5%, and 10%) treatment, the dry weights of the hairy roots of *S. miltiorrhiza* were reduced to 75.1%, 83.0%, 76.2%, and 76.1% of the control group, respectively. Addition of PEG-6000 at different levels could significantly increase the yields of four tanshinones in the hairy roots of *S. miltiorrhiza*. The yields of tanshinone I, cryptotanshinone, dihydrotanshinone I, and tanshinone II<sub>A</sub> were significantly increased by 2.0%—5.5%, 1.2%, 2.0%, and 5.5% PEG-6000, respectively. And the tanshinone II<sub>A</sub> increased most. **Conclusion** PEG-6000 could stimulate the accumulation of tanshinones in the hairy roots of *S. miltiorrhiza*.

**Key words:** polyethylene glycol-6000; *Agrobacterium rhizogenes*; hairy roots of *Salvia miltiorrhiza*; tanshinones; accumulation

随着世界各国对中医中药的广泛关注, 人们对中药的研究也正成为热点。丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge. 的干燥根及根茎, 由于其对血液循环系统的显著疗效, 常被广泛应用于微循环系统疾病的治疗<sup>[1]</sup>。丹参主要活性成分为丹参酮, 是一种二萜醌类化合物, 包括丹参酮 I、丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 等。丹参酮主要通

过位于细胞质的甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径<sup>[2]</sup>和位于质体的非甲羟戊酸 (non-mevalonate, NMVA) 途径<sup>[3]</sup>进行合成。

毛状根是发根农杆菌中 Ri 质粒的一段 T-DNA 嵌入植物基因组中并表达的结果, 许多植物受到发根农杆菌的感染后均会在受伤部位长出大量毛状根<sup>[4]</sup>。丹参毛状根由于其生长速度快, 不需要外

收稿日期: 2012-12-24

作者简介: 盛东峰(1978—), 男, 河南周口人, 研究生, 讲师, 主要从事生物学教学及研究工作。Tel: 13461379019 E-mail: shengdongfeng@126.com

源植物激素,合成次生代谢物的能力强且稳定,常被用于丹参酮合成机制及丹参酮生产的研究<sup>[5-8]</sup>。干旱是影响作物生长发育及最终产量的重要逆境因子,大量研究表明干旱能降低作物的产量,但也有研究显示干旱胁迫能够诱导植物次生代谢产物的积累,如萜类成分<sup>[9]</sup>。然而迄今为止,水分胁迫诱导丹参酮积累的机制尚不清楚。聚乙二醇-6000(PEG-6000)是平均相对分子质量在200~6 000的乙二醇高聚物的总称,由于其能改变各类细胞的生物膜结构,目前已经被广泛应用于植物水分胁迫的响应。大量的研究表明PEG处理能够诱导植物中ABA的积累<sup>[10-12]</sup>。本研究以丹参毛状根为材料,对PEG-6000胁迫下丹参酮的积累规律进行了研究,以期揭示水分胁迫对丹参酮合成的调控机制。

## 1 仪器与材料

Waters 1525 二元高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Smartcycler 荧光定量 PCR(美国 Cepheid 公司); SY—360 超声波提取仪(上海,宁商超声仪器有限公司); RO-MB—10D 高纯水机(杭州永洁达膜分离设备厂); 360EP 电子天平(上海精科仪器有限公司)。

以丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 无菌苗叶为实验材料,由笔者鉴定。发根农杆菌菌株 15834,中国林业科学院提供。脱羧酸(美国 Sigma 公司); 乙腈(山东齐鲁石化有限公司); 磷甘霉素(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 洛伐他汀(美国 Sigma 公司); 钨酸钠(江苏姜堰贝斯特钼制品有限公司); 丹参酮 I(110867-200003)、隐丹参酮(110852-200806)、二氢丹参酮 I(110868-200002)和丹参酮 II<sub>A</sub>(110766-200619)对照品购自中国食品药品检定研究院; RNAisoTM Plus 试剂盒(大连宝生物工程有限公司); cDNA 合成试剂盒(美国 Promega 公司); Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix 试剂盒(美国 Agilent 公司)。

## 2 方法

### 2.1 毛状根培养及处理

用无硝酸铵的 MS 培养基培养, ATCC15834 发根农杆菌诱导丹参无菌苗叶的方法生产丹参毛状根。然后取生长良好的毛状根 0.31 g 置于含 50 mL MS 液体培养基的三角瓶内,于 25 °C 培养箱中黑暗下悬浮继代培养培养。

**2.2 PEG-6000 和抑制剂对丹参毛状根生长的影响**  
继代培养 20 d 后,分别用不同质量分数(1.2%、

2.0%、5.5%、10%)的 PEG-6000 处理。同时分别用 145 μmol/L 磷甘霉素(FOS)和 15 μmol/L 洛伐他汀(MEV)与 2.0% PEG-6000 联合处理毛状根,研究抑制剂对丹参活性成分积累的影响。对照(CK)处理为用等体积的无菌蒸馏水处理的毛状根,每个处理组重复 3 次。处理 1 周后收获毛状根,并 45 °C 烘干至恒质量。

### 2.3 丹参酮的提取

取干燥至恒质量的丹参毛状根适量研钵磨碎,过 0.45 目筛,混匀后精密称取 0.100 0 g 细粉,加入 2 mL 甲醇-水(7:3)溶液,精密称质量,超声处理 40 min,用溶剂补充损失量,10 000 r/min 高速离心 15 min,取上清液过 0.45 μm 滤膜,即得。

### 2.4 丹参酮的测定<sup>[13]</sup>

采用 RP-HPLC 色谱方法测定丹参酮的量。色谱条件:色谱柱 Waters SunFire C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 °C,进样量 20 μL,检测波长 270 nm,流动相为乙腈和水,线性梯度洗脱,0~5 min,40%乙腈;5~20 min,60%乙腈;20~23 min,60%乙腈;23~25 min,80%乙腈;25 min,100%乙腈。

### 2.5 RNA 分离、cDNA 合成及荧光实时定量分析

把 2.0% PEG-6000 处理 25 h 的毛状根置于液氮中研磨成粉,采用购至大连宝生物工程有限公司 RNAisoTM Plus 试剂盒提取总 RNA,并以提取的 RNA(500 ng)为模板,采用美国 Promega 公司生产的 cDNA 试剂盒合成第一链 cDNA。荧光 RT-PCR 实时定量分析采用 Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix 试剂盒(美国)。PCR 反应体积为 25 μL,PCR 反应程序为:95 °C,10 min,1 个循环;95 °C,30 s,60 °C,1 min,72 °C,30 s,40 个循环。实验共设置 3 个重复,内参基因为 β-actin, Oligo6 软件设计 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)和 1-去氧木糖-5-磷酸还原酶(DXR)基因引物(表 1)。

## 3 结果

### 3.1 PEG-6000 胁迫对丹参毛状根生长的影响

PEG-6000 对丹参毛状根生长的影响见图 1。可知,经 1.2%、2.0%、5.5%和 10%的 PEG-6000 模拟干旱胁迫处理后,收获的丹参毛状根干质量分别减少为对照组的 75.1%、83.0%、76.2%、76.1%,说明 PEG-6000 对丹参毛状根的生长有抑制作用,通过比较 4 组处理,发现 2.0%质量浓度的 PEG-6000 对丹参毛状根生长的影响最小。

表1 RT-PCR 分析引物设计

Table 1 Primers design of genes used in RT-PCR analysis

基因名称	引物序列
HMGR-F	5'-GCAACATCGTCTACGCCGTCTACA-3'
HMGR-R	5'-GATGGTGGCCATCAGCCTGGAGTT-3'
DXR-F	5'-CATGCGTATGCCTATTCTGTAC-3'
DXR-R	5'-ACTAAGAACTACGGTCATGGTG-3'
$\beta$ -actin-F	5'-AGGAACCCGATCCAGACA-3'
$\beta$ -actin-R	5'-GGTGCCCTGAGGTCCTGTT-3'

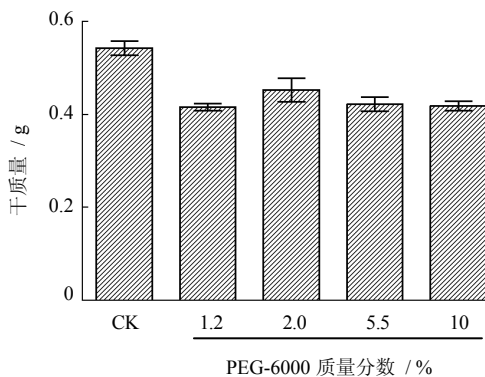


图1 PEG-6000 对丹参毛状根生长的影响

Fig. 1 Effects of PEG-6000 on growth of hairy roots of *S. miltiorrhiza*

### 3.2 PEG-6000 胁迫对毛状根丹参酮积累的影响

PEG-6000 胁迫对丹参毛状根中丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 量的影响见图 2。由图 2 可知，丹参毛状根在培养过程中经不同质量分数的 PEG-6000 处理后，4 种丹参酮的质量分数均有显著增加。其中丹参酮 I 的质量分数在 PEG-6000 为 2.0%、5.5% 时显著增加，且以质量分数为 5.5% 时最高；隐丹参酮的质量分数在 PEG-6000 为 1.2%、2.0% 时比对

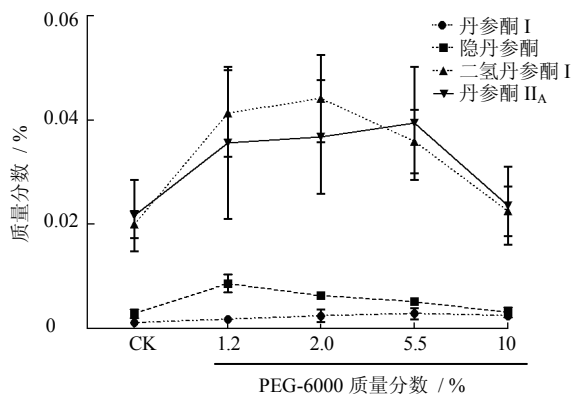


图2 不同质量分数 PEG-6000 处理对丹参酮积累的影响

Fig. 2 Effects of PEG-6000 at different concentration on tanshinones accumulation

照组显著增加，但以 PEG-6000 在 1.2% 条件下最高 (86.4  $\mu\text{g/g}$ )；二氢丹参酮 I 的量以 2.0% PEG-6000 处理为最高，为 441.8  $\mu\text{g/g}$ ；丹参酮 II<sub>A</sub> 的量以 5.5% PEG-6000 处理为最高，达到 394.5  $\mu\text{g/g}$ 。

以上实验结果说明，PEG-6000 胁迫能够增加毛状根中丹参酮类的积累，且以 PEG-6000 为 2.0%~5.5% 时积累促进作用最为显著。

### 3.3 抑制剂和 PEG-6000 联合作用对丹参酮积累的影响

FOS 是丹参酮非 MEP 合成过程中重要酶 DXR 的专一性抑制剂，MEV 是 MVA 合成途径限速酶 HMGR 的专一性抑制剂。2 种抑制剂可分别抑制 MEP 和 MVA 途径下游产物的积累。抑制剂与 PEG-6000 联合作用结果见图 3，FOS 和 PEG-6000 联合处理 (PF) 可显著抑制 4 种丹参酮成分量的增加，丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 的质量分数分别降至 PEG-6000 单独处理 (P) 水平的 32%、11%、33% 和 16%。与 PEG-6000 单独处理 (P) 相比，MEV 和 PEG-6000 联合处理 (PM) 能够显著抑制二氢丹参酮 I 质量分数的增加，但其抑制效果弱于 PF 处理，对其他丹参酮类成分影响不显著。这表明 PEG-6000 可能主要通过诱导 MEP 途径，促进了丹参酮的累积，但结果也表明，MVA 途径对丹参酮的积累可能也起着重要作用。

### 3.4 PEG-6000 对丹参毛状根 HMGR 和 DXR 基因表达的影响

PEG-6000 对丹参毛状根 HMGR 和 DXR 基因表达的影响见图 4，从图 4 可以看出，PEG-6000 能够显著诱导丹参毛状根 MVA 途径中限速酶 HMGR 和 MEP 途径重要酶 DXR 基因的表达。

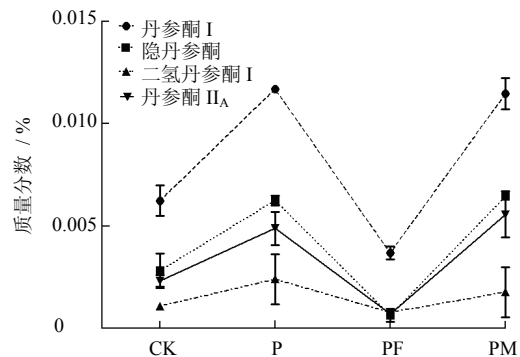


图3 抑制剂 FOS 和 MEV 对 PEG 处理条件下丹参酮积累的影响

Fig. 3 Effects of FOS and MEV on tanshinones accumulation treated by PEG

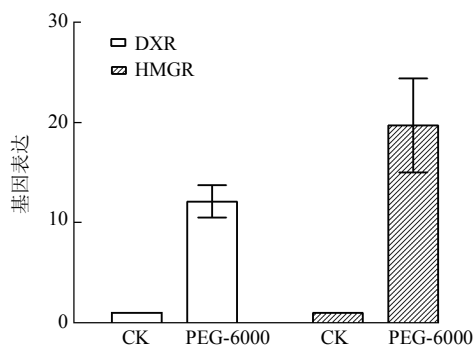


图4 PEG对丹参毛状根HMGR和DXR基因表达的影响

Fig. 4 Effects of PEG on expression of HMGR and DXR genes in hairy roots of *S. miltiorrhiza*

#### 4 讨论

干旱胁迫不仅能抑制植物的生长,而且能够改变细胞的初生代谢和次生代谢的代谢流。虽然次生代谢产物可能不是植物生长发育必需的,但其在植物与环境间的相互作用中起着重要作用<sup>[14]</sup>。有研究发现,植物在干旱胁迫的环境中会改变细胞内次生代谢产物的积累<sup>[15-17]</sup>。

本研究结果显示,PEG-6000模拟干旱胁迫处理丹参毛状根后,4种丹参酮类成分的积累都受到影响,但被影响程度各有不同,其中丹参酮I的质量分数以5.5%PEG-6000处理组最高;隐丹参酮的质量分数以1.2%PEG-6000处理组最高;二氢丹参酮I和丹参酮II<sub>A</sub>的质量分数均受到了1.2%~5.5%PEG-6000的显著诱导。本研究进一步证实,水分胁迫能够影响植物次代谢产物积累。

作为植物中萜类成分重要合成途径MVA途径和MEP途径中关键酶的抑制剂FOS和MEV已经被广泛应用于萜类成分合成的调控研究<sup>[18-20]</sup>。尽管植物二萜类成分主要由MEP途径合成<sup>[18]</sup>,但两条途径之间的相互作用对萜类的合成影响不能忽视<sup>[21]</sup>。Ge等<sup>[22]</sup>认为YE和Ag<sup>+</sup>主要通过MEP途径诱导丹参酮积累,但可能也依赖于两条途径间的交流。本实验的结果显示,FOS和PEG-6000联合处理能显著抑制毛状根中4种丹参酮的积累;MVE和PEG-6000联合处理对丹参酮I、二氢丹参酮I和丹参酮II<sub>A</sub>的积累具有抑制作用。PEG-6000能促进丹参毛状根中丹参酮的积累,可能与其能诱导DXR和HMGR基因的表达,进而激活MVA和MEP途径,特别是MEP途径有关。

本实验通过研究PEG-6000处理对丹参毛状根

的产量、活性成分的质量分数及其积累规律和相关萜类合成途径主要酶类关键基因表达的影响,实验结果说明2.0%的PEG-6000对丹参毛状根的生长有显著抑制,但能有效诱导丹参酮类成分的积累和主要合成途径中限速酶HMGR与DXR基因的表达;FOS几乎能完全抑制PEG-6000对4种丹参酮的积累作用,但MEV仅能部分抑制丹参酮类的积累;PEG-6000对2种丹参酮合成途径MVA和MEP都有激活作用,但可能主要通过激活MEP途径诱导丹参酮的积累。

#### 参考文献

- [1] Han J Y, Fan J Y, Horie Y, *et al.* Ameliorating effects of compounds derived from *Salvia miltiorrhiza* root extract on microcirculatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 117: 280-295.
- [2] Lichtenthaler H K. Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors [J]. *Biochem Soc Trans*, 2000, 8: 785-789.
- [3] Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants [J]. *Nat Prod Rep*, 1999, 16: 565-574.
- [4] 晏琼, 胡宗定, 吴建勇. 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 [J]. *中草药*, 2006, 37(2): 262-265.
- [5] Hu Z B, Alfermann A W. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32: 699-703.
- [6] 潘雪梅, 韦辉, 刘毅, 等. 不同产地丹参药材质量研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(9): 1833-1836.
- [7] 李秀兰, 陈力. 三倍体丹参的培育及其可持续利用研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(2): 375-379.
- [8] Wang J W, Wu J Y. Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88: 437-449.
- [9] Foito A, Byrne S L, Shepherd T, *et al.* Transcriptional and metabolic profiles of *Lolium perenne* L. genotypes in response to a PEG-induced water stress [J]. *Plant Biotechnol J*, 2009, 7: 719-731.
- [10] Jiang M, Zhang J. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53: 2401-2410.
- [11] Planchet E, Rannou O, Ricoult C, *et al.* Nitrogen metabolism responses to water deficit act through both

- abscisic acid (ABA)-dependent and independent pathways in *Medicago truncatula* during post-germination [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62: 605-615.
- [12] Liu H, Wang X, Wang D, *et al.* Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Ind Crop Prod*, 2011, 33: 84-88.
- [13] 蓝天凤, 王 晓, 王岱杰, 等. 一测多评法测定丹参中 4 种丹参酮类成分 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 2420-2423.
- [14] Hartmann T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68: 2831-2846.
- [15] Singh K, Kumar S, Rani A, *et al.* Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea [J]. *Funct Integr Genomics*, 2009, 9: 125-134.
- [16] Liu H, Wang X, Wang D, *et al.* Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Ind Crop Prod*, 2011, 33: 84-88.
- [17] Wang D H, Du F, Liu H Y, *et al.* Drought stress increases iridoid glycosides biosynthesis in the roots of *Scrophularia ningpoensis* seedlings [J]. *J Med Plants Res*, 2010, 4: 2691-2699.
- [18] Hemmerlin A, Hoeffler J F, Meyer O, *et al.* Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in Tobacco Bright Yellow-2 cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 26666-26676.
- [19] Skorupinska-Tudek K, Poznanski J, Wojcik J, *et al.* Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of dolichols in plants [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 21024-21035.
- [20] Roberts S C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 387-395.
- [21] Bamba T, Murayoshi M, Gyoksen K, *et al.* Contribution of mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to polyisoprenoid biosynthesis in the rubber-producing plant *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. *Z Naturforsch C*, 2010, 65: 363-372.
- [22] Ge X C, Wu J Y. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag<sup>+</sup> and yeast elicitor [J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 487-491.