

干旱胁迫对管花肉苁蓉组织培养体系中苯乙醇苷类成分含量的影响

闫雅如, 杨洪芸, 齐博文, 徐溪平, 刘雨雨, 王晓晖, 赵云芳, 史社坡, 刘 晓*, 屠鹏飞*

北京中医药大学中药学院 中药现代研究中心, 北京 100029

摘 要: 目的 建立管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* 组织培养体系, 并考察干旱胁迫对其中苯乙醇苷类成分含量的影响。方法 通过液质联用技术分析管花肉苁蓉愈伤组织与悬浮培养体系中的主要化学成分, 绘制其生长曲线, 并通过渗透压调节剂 (NaCl、甘露醇和 PEG6000) 模拟干旱胁迫环境, 考察组织培养体系中松果菊苷和毛蕊花糖苷含量的变化。结果 管花肉苁蓉愈伤组织与悬浮培养细胞均能生成松果菊苷和毛蕊花糖苷; 绘制管花肉苁蓉愈伤组织生长曲线, 确定 30 d 为最佳继代时间; NaCl 和甘露醇所诱导的干旱胁迫不利于愈伤组织细胞的生长及其苯乙醇苷类成分的积累, 而 6% PEG6000 能显著促进悬浮细胞中苯乙醇苷类化合物的生成, 诱导 15 d 后, 松果菊苷和毛蕊花糖苷的生物量分别为 (1.07 ± 0.10) g/L 和 (0.12 ± 0.01) g/L, 分别可达细胞干质量的 20.94% 和 2.27%, 为对照组的 1.29 倍和 1.19 倍。结论 PEG6000 介导的干旱胁迫对管花肉苁蓉悬浮细胞中松果菊苷和毛蕊花糖苷的积累有明显促进作用。

关键词: 管花肉苁蓉; 愈伤组织; 悬浮细胞; 干旱胁迫; 苯乙醇苷; 松果菊苷; 毛蕊花糖苷

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)10-2452-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.028

Effect of drought stress on accumulation of two respective phenylethanoid glycosides in tissue culture of *Cistanche tubulosa*

YAN Ya-ru, YANG Hong-yun, QI Bo-wen, XU Xi-ping, LIU Yu-yu, WANG Xiao-hui, ZHAO Yun-fang, SHI She-po, LIU Xiao, TU Peng-fei

Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To establish the plant tissue culture system of *Cistanche tubulosa*, and determine the effect of drought stress on accumulation of two respective phenylethanoid glycosides in it. **Methods** The major chemical constituents of *C. tubulosa* by tissue culture were analyzed by HPLC-UV and HR-MS. The cell growth curves were also determined. In addition, the effects of drought stress on the phenylethanoid glycosides (echinacoside and acteoside) content in the tissue culture system of *C. tubulosa* were also studied by using NaCl, mannitol and PEG6000 as osmotic regulators, respectively. **Results** Chemical constituents analyses revealed that callus and suspension cultures of *C. tubulosa* could produce the respective phenylethanoid glycosides of echinacoside and acteoside as in wild plant; Cell growth curves indicated that 30 d were the optimum culture period of callus culture; The cell growth rate and the accumulation of echinacoside and acteoside were mostly inhibited when the callus cells were under drought stress induced by NaCl or mannitol. Meanwhile, the accumulation of echinacoside and acteoside in cell suspension culture of *C. tubulosa* could be effectively enhanced by treatment with PEG6000. The maximum biomass of echinacoside and acteoside could reach to (1.07 ± 0.10) g/L and (0.12 ± 0.01) g/L 15 d after induction, respectively. And their contents were 20.94% and 2.27% separately based on the cell dry weight (DW) after 15 d of treatment with 6% PEG6000, which were 1.29 and 1.19 fold higher than the control group. **Conclusion** Drought stress induced by PEG6000 could effectively enhance the accumulation of echinacoside and acteoside in cell suspension culture of *C. tubulosa*.

Key words: *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight; callus culture; cell suspension culture; drought stress; phenylethanoid glycosides; echinacoside; acteoside

肉苁蓉为列当科肉苁蓉属多年生寄生草本植物
肉苁蓉 *Cistanches tubulosa* (Schenk) Wight 的干燥带

鳞叶的肉质茎, 是一种珍稀、传统、名贵中药材,
始载于《神农本草经》, 列为上品, 具有补肾阳、益

收稿日期: 2018-12-09

基金项目: 中国科协青年人才托举项目 (CACM-2018-QNRC1-02); 北京中医药大学杰出青年人才资助项目 (2018-JYB-XJQ006)

作者简介: 闫雅如 (1993—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为活性天然产物生物合成。Tel: 18810820890 E-mail: yanyr106@163.com

*通信作者 屠鹏飞, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药活性成分与中药复方。E-mail: pengfeitu@163.com

刘 晓, 助理研究员, 研究方向为天然产物合成生物学。E-mail: fclixiao@163.com

精血、润肠通便、延缓衰老的功效,素有“沙漠人参”之美誉,具有极高的药用价值^[1-2]。肉苁蓉属植物主要含有苯乙醇苷类、环烯醚萜及其苷类等多种化学成分^[3-7],其中以松果菊苷和毛蕊花糖苷为代表的苯乙醇苷类(phenylethanoid glycosides)化合物在原药材中含量最高,是肉苁蓉属植物的主要活性成分。此外,近代药理学研究显示,苯乙醇苷类化合物具有广泛而显著的药理活性,如神经保护^[8]、抗衰老^[9]、抗肿瘤^[10]、肝保护^[11]、抗氧化^[12]、改善学习记忆^[13]、免疫调节^[14]等,是药物活性先导化合物的理想来源。近年来,肉苁蓉的市场需求量逐渐增大。但由于原植物遭到不合理采挖,导致其野生资源受到严重破坏,加之肉苁蓉的种子需在寄主植物的作用下方能萌发,繁殖较为困难,使得其资源极度匮乏;而苯乙醇苷类化合物具有分离纯化困难、化学合成成本较高、位置选择性差、合成路线复杂等特点,这些均制约了该类化合物作为药物先导物/候选物、甚至创新药物的系统研究。因此,寻找高效合成苯乙醇苷类化合物的新方法具有重要意义。

荒漠肉苁蓉 *C. deserticola* Y. C. Ma 与管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schenk) Wight 为《中国药典》2015 年版中所收录肉苁蓉药材来源的 2 种品种。目前已报道的肉苁蓉属植物组织培养的研究多集中于荒漠肉苁蓉,其组织培养体系能大量生产与野生植物类似的苯乙醇苷类化合物^[15],且通过生物诱导剂诱导^[16]、渗透压胁迫^[17]、氨基酸等生物前体饲喂^[18-19]、真菌诱导子诱导^[20]等方法,能显著提高荒漠肉苁蓉组织培养体系中苯乙醇苷类化合物的积累量。而相比之下,管花肉苁蓉的组织培养研究鲜有报道。鉴于管花肉苁蓉中苯乙醇苷类化合物的产量显著高于荒漠肉苁蓉^[21],因此有必要对管花肉苁蓉组织培养体系进行深入研究。

本课题以管花肉苁蓉为材料,对其植物组织培养体系进行了诱导,获得了在实验室条件下能够稳定生长增殖的管花肉苁蓉愈伤组织及悬浮细胞培养体系^[22]。分别对 2 种培养体系的生长曲线及代表性苯乙醇苷类化合物松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量进行了动态考察;并进一步以 NaCl、甘露醇和聚乙二醇 6000 (PEG6000) 为渗透调节剂,分别对管花肉苁蓉愈伤组织及悬浮培养体系在干旱胁迫条件下的细胞生长量、苯乙醇苷类成分的含量及生物量积累的变化进行了研究,为通过植物细胞组织培养大量生产苯乙醇苷类活性成分提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

样品植株采自中国新疆维吾尔自治区和田市于田县,并经由北京大学医学部屠鹏飞教授鉴定为管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schenk) Wight。

以管花肉苁蓉新鲜肉质茎为材料,以 B5 固体培养基为基本培养基,在激素配比为 2 mg/L 萘乙酸和 1 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤的条件下,25 °C 黑暗培养 30 d 后可观察到明显的愈伤组织,将其移至继代培养基(B5 固体培养基+25 g/L 蔗糖、0.8 g/L 酪蛋白水解物、1 mg/L 萘乙酸、0.5 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤和 0.2 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸) 25 °C 黑暗培养,可获得稳定生长的管花肉苁蓉愈伤组织培养体系。

管花肉苁蓉细胞悬浮培养体系最适培养基为 MS 液体培养基,外源添加 30 g/L 蔗糖、0.8 g/L 酪蛋白水解物、1 mg/L 萘乙酸、0.5 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤和 0.2 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸。25 °C、120 r/min 黑暗培养,培养周期为 30 d。目前,上述管花肉苁蓉愈伤组织和悬浮细胞培养体系已在实验室稳定培养 4 年以上。

1.2 试剂

诱导剂 NaCl、甘露醇、PEG6000 (北京拜尔迪生物科技有限公司), Murashige and Skoog (MS) 盐 (Sigma 公司,德国),对照品松果菊苷及毛蕊花糖苷(质量分数>98.5%,成都普思生物有限公司),甲醇(分析纯,北京化工厂);甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯, Fisher 公司);高纯水(实验室自制)。

2 方法

2.1 管花肉苁蓉组织培养体系生长曲线测定^[22]

无菌条件下称取鲜质量为 2.00 g 的愈伤组织接种在 40 mL B5 继代培养基上,25 °C 黑暗培养 36 d。每 3 天随机取样,每组 3 个平行。收集培养基上的所有愈伤组织细胞,用蒸馏水冲洗表面,滤纸减压抽滤至无液体滤出,称量细胞质量记录其鲜质量。随后将收获的细胞于烘箱 48 °C 烘干至恒定质量,冷却至室温后称量记录干质量。以培养时间为横坐标,愈伤组织鲜质量和干质量为纵坐标绘制管花肉苁蓉愈伤组织生长曲线。

2.2 组织培养样品处理及松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量测定方法^[22]

测定每个样本中化合物松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量,绘制松果菊苷、毛蕊花糖苷在管花肉苁蓉中的含量随细胞生长周期的变化曲线。

2.2.1 供试品溶液的制备 取管花肉苁蓉干燥组织细胞培养物, 研细, 过筛, 精密称取细粉 100.0 mg, 置于 50 mL 具塞试管中, 加入 20 mL 70% 甲醇溶液, 超声提取 1 h, 用甲醇补足减失质量, 离心, 取上清液过 0.45 μm 滤膜, 备用。

2.2.2 色谱条件 采用 HPLC 法测定样品中松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量。使用 Agilent 1260 HPLC 进行检测, 色谱条件如下: 色谱柱 SHESHIDO C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B)。梯度洗脱程序为 0~20 min, 95%~85% A; 20~50 min, 85%~70% A; 50~60 min, 70%~50% A; 60~70 min, 50%~5% A; 70~75 min, 5% A; 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 在 334 nm 波长下测定各自的峰面积。使用标准曲线法计算松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量。

使用 LCMS-IT-TOF 进行质谱分析, 质谱条件: 碰撞气体 (collision gas) 为超高纯氦气, 雾化气体 (nebulizing gas) 为氮气, 体积流量为 1.5 mL/min, 喷雾电压 4.5 kV, CDL 温度为 200 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱设为自动多级 MS¹、MS²、MS³ 全扫描模式。

2.2.3 松果菊苷、毛蕊花糖苷的标准曲线测定 分别精密称取对照品置于 5 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制松果菊苷 (5.0 mg/mL)、毛蕊花糖苷 (5.0 mg/mL) 单组分对照品储备溶液。精密量取各单组分对照品溶液适量置于容量瓶中, 加 70% 甲醇稀释至不同质量浓度, 按“2.2.2”项下的色谱条件方法测定, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程分别为松果菊苷: $Y=1113.3 X-14.82$, $r^2=0.9999$; 毛蕊花糖苷: $Y=1571.1 X-26.467$, $r^2=0.9998$ 。结果表明, 松果菊苷和毛蕊花糖苷质量浓度在进样量 0.1~5 μg 内线性关系良好。

2.3 NaCl 或甘露醇介导的干旱胁迫对管花肉苁蓉愈伤组织生长及其松果菊苷、毛蕊花糖苷含量的影响

选用 NaCl 和甘露醇作为渗透压调节剂, 以肉苁蓉愈伤组织为试验材料, 模拟制造干旱胁迫环境。参考文献中常用浓度, 在上述愈伤组织继代培养基中分别加入终浓度为 0.15 mol/L 的 NaCl 或 0.75 mol/L 的甘露醇, 调节 pH 值至 5.8, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min。以 50 g/L 的接种量将新鲜愈伤组织分别接种在含 0.15 mol/L NaCl 或 0.75 mol/L 甘露醇的 B5 继代培养基中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养, 分别在接种后的第 0、

12、24、36、48 小时后取样, 收集愈伤组织细胞, 蒸馏水冲洗 3 次, 减压抽滤后于 48 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干至恒定质量, 每组 3 个平行。同时, 参照“2.2”项方法, 测定每个样本中松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量, 绘制松果菊苷、毛蕊花糖苷在不同浓度 NaCl/甘露醇的干旱胁迫下, 其在管花肉苁蓉愈伤组织中的含量随时间的变化曲线。

2.4 不同浓度 PEG6000 介导的干旱胁迫对管花肉苁蓉悬浮细胞培养体系中松果菊苷、毛蕊花糖苷含量的影响

将生长状态良好的悬浮细胞以 40 g/L 的接种量分别接种于 180 mL 含 PEG6000 的 MS 液体培养基中, PEG6000 的终浓度分别为 6%、7.5%、9%。以不含 PEG6000 的 MS 培养基为对照, 每组 3 个平行。25 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 黑暗条件下恒温培养, 分别在接种后的第 9、15 天取样, 收集悬浮细胞, 蒸馏水冲洗表面, 减压抽滤后于 48 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干至恒定质量。同时, 参照“2.2”项方法, 测定每个样本中松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量, 绘制松果菊苷、毛蕊花糖苷在不同的干旱胁迫浓度下, 其在管花肉苁蓉悬浮培养细胞中的含量变化曲线, 以摸索 PEG6000 的最适工作浓度。

2.5 6% PEG6000 介导的干旱胁迫对管花肉苁蓉悬浮细胞培养体系中松果菊苷、毛蕊花糖苷含量及生物量积累的影响

将生长状态良好的悬浮细胞以 40 g/L 的接种量接种于 180 mL 含 6% PEG6000 的 MS 液体培养基中, 以不含 PEG6000 的 MS 培养基为对照。每个浓度设 3 个平行。25 $^{\circ}\text{C}$, 120 r/min 黑暗培养, 分别在接种后的第 3、6、9、12、15、18、21 天取样, 减压抽滤收集悬浮细胞, 蒸馏水冲洗 3 次, 减压抽滤后于 48 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干至恒定质量, 冷却至室温后称量记录细胞干质量。同时, 参照“2.2”项方法, 测定每个样本中松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量, 绘制 6% PEG6000 介导的干旱胁迫条件下, 松果菊苷、毛蕊花糖苷在管花肉苁蓉悬浮培养细胞中的含量及生物量 (生物量=细胞干质量 $\times$ 化合物百分含量) 随时间的变化曲线。

3 结果与分析

3.1 管花肉苁蓉愈伤组织及悬浮培养体系中苯乙醇苷类化合物松果菊苷、毛蕊花糖苷的 HPLC-UV-HR-MS 分析

管花肉苁蓉愈伤组织与悬浮培养体系 70% 甲醇提取物 HPLC-UV 色谱图如图 1 所示。在愈伤组

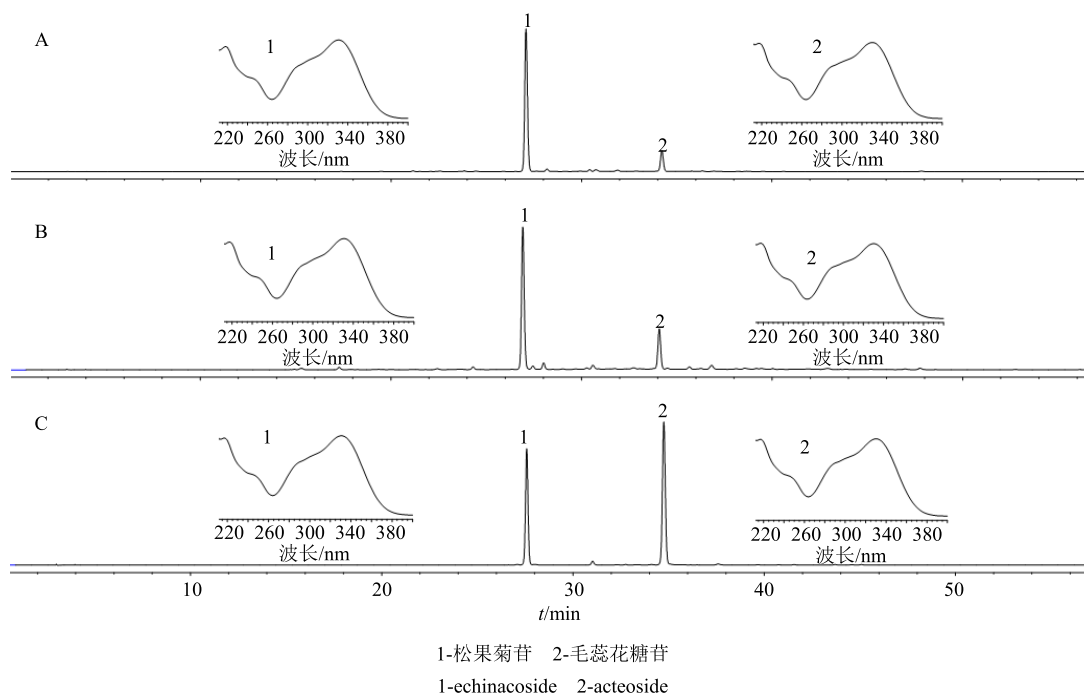


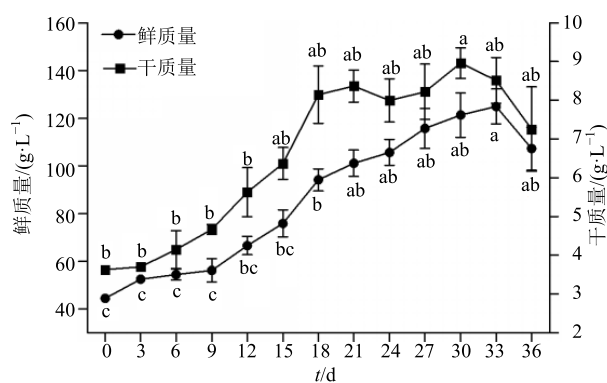
图 1 管花肉苁蓉愈伤组织 (A) 与悬浮培养体系 (B) 70% 甲醇提取物 HPLC-UV 色谱图及松果菊苷、毛蕊花糖苷对照品 HPLC-UV 色谱图 (C)

Fig. 1 HPLC chromatogram and UV spectra of 70% methanol extracts of callus culture (A), suspension culture (B) of *C. tubulosa*, and reference standards (C)

组织与悬浮培养体系中均检测到 2 个主要的色谱峰。紫外吸收图谱显示其在 332~334 nm 处有紫外吸收, 与苯乙醇苷类化合物的特征吸收图谱一致。对 2 个色谱峰进行高分辨质谱 (HR-MS) 分析, 结果显示: 化合物 1 在 m/z 785.247 3 $[M-H]^-$ 处有分子离子峰, 提示其分子式为 $C_{35}H_{46}O_{20}$ (计算相对分子质量 785.251 0), 此外二级质谱显示其在 m/z 623, 605, 477 和 315 处有明显的碎片峰, 与文献中报道的松果菊苷的质谱行为一致^[21]; 化合物 2 在 m/z 623.195 0 $[M-H]^-$ 处有分子离子峰, 提示其分子式为 $C_{29}H_{36}O_{15}$ (计算相对分子质量 623.198 1), 二级质谱显示其在 m/z 461 和 315 处有明显的碎片峰, 与文献中报道的毛蕊花糖苷的质谱行为一致^[21]。进一步通过与对照品进行比对分析, 证实化合物 1、2 分别为松果菊苷和毛蕊花糖苷。

3.2 管花肉苁蓉愈伤组织及悬浮培养体系生长曲线及其中苯乙醇苷类化合物松果菊苷、毛蕊花糖苷的积累

考察了 36 d 培养周期下管花肉苁蓉愈伤组织的生长量变化, 见图 2。细胞干质量与鲜质量的变化都呈“S”型生长曲线, 0~6 d 愈伤组织生长处于迟滞期, 生长缓慢, 推测是由于接种初期细胞需要适应新环境所致; 6 d 以后进入对数生长期, 接



不同字母表示差异显著 $P < 0.05$, 下同
Different letters means significant difference $P < 0.05$, same as below

图 2 管花肉苁蓉愈伤组织生长曲线

Fig. 2 Growth curve of *C. tubulosa* callus culture

种 3~18 d 内, 愈伤组织生物量增长迅速, 18 d 时, 其干质量能达到原始接种量的 1.31 倍。18~30 d 内, 愈伤组织生长速度逐渐减缓, 推测此阶段培养基中的水分和营养物质已消耗较多, 细胞逐渐开始老化。接种 30 d 后, 细胞鲜质量和干质量都达到最高值, 分别为 (121.33 ± 16.08) g/L、 (8.96 ± 0.68) g/L, 是初始接种量的 1.73、1.50 倍; 培养 30 d 后愈伤组织开始明显褐化死亡, 细胞质量减少。

管花肉苁蓉愈伤组织生长过程中松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量变化如图 3 所示, 整个培养周期中, 松果菊苷的含量在 19.27%~22.05%, 毛蕊花糖苷的含量在 2.74%~3.37%, 两者含量均保持相对平稳, 并随细胞生长周期稍有浮动, 且 2 个化合物变化趋势一致: 如愈伤组织在生长初期 (0~6 d) 松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量有所下降, 推测这一阶段细胞所吸收的营养物质主要用于初级代谢, 从而抑制了次级代谢的合成; 进入快速生长期后, 松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量也开始逐渐上升; 21 d 后增速变慢, 推测细胞逐渐进入衰亡期, 次级代谢放缓所致; 培养 30 d 后松果菊苷和毛蕊花糖苷含量达到最高, 分别为细胞干质量的 22.05% 和 3.27%; 30 d 后, 随着愈伤组织的加速衰老死亡, 松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量明显降低。因此, 综合愈伤组织生长曲线和松果菊苷、毛蕊花糖苷含量变化曲线的分析可知, 实验室培养条件下管花肉苁蓉愈伤组织的最佳继代时间为 30 d。

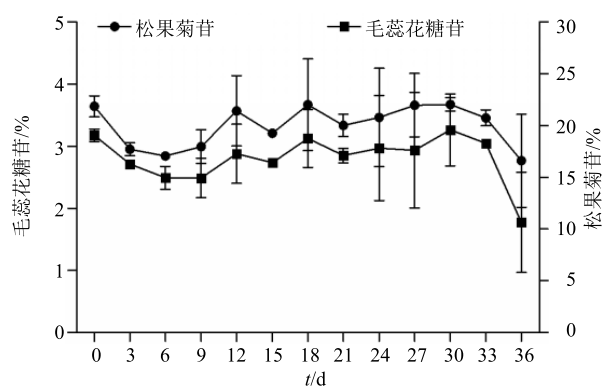


图 3 管花肉苁蓉愈伤组织中松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量随时间的变化

Fig. 3 Time-variation of echinacoside and acteoside content in callus culture of *C. tubulosa*

3.3 甘露醇或 NaCl 介导的干旱胁迫对管花肉苁蓉愈伤组织生长及其松果菊苷、毛蕊花糖苷含量的影响

NaCl 和甘露醇为一类常用的渗透压调节剂, 用来模拟干旱环境以考察植物细胞在干旱环境下的应激反应或次级代谢产物积累量的变化。根据报道^[23-26], 分别选择了 0.15 mol/L 的 NaCl 和 0.75 mol/L 的甘露醇作为渗透压调节剂来制造模拟干旱的条件, 并考察管花肉苁蓉愈伤组织生物量的变化及其松果菊苷和毛蕊花糖苷含量的变化, 如图 4、5 所示, 结果发现, 经 0.15 mol/L NaCl 或

0.75 mol/L 甘露醇诱导后, 愈伤组织褐化较严重, 在接种 48 h 内即出现明显的衰亡现象, 其中活性成分松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量也显著降低。尝试将甘露醇的浓度降低至 0.34 mol/L, 细胞褐化现象仍较严重, 提示 NaCl 和甘露醇所制造的干旱胁迫条件并不适合管花肉苁蓉愈伤组织的生长, 相反, 过高的渗透压还干扰了细胞的新陈代谢, 导致严重的生长抑制和苯乙醇苷类活性成分生物合成的下降。

3.4 PEG6000 介导的干旱胁迫对管花肉苁蓉愈伤组织培养体系中松果菊苷、毛蕊花糖苷含量的影响

PEG6000 是一种非离子、非穿透性的高分子渗透剂, 能够迅速夺取水分对植物造成渗透胁迫, 目前已经被广泛用于模拟植物的干旱胁迫。研究表明

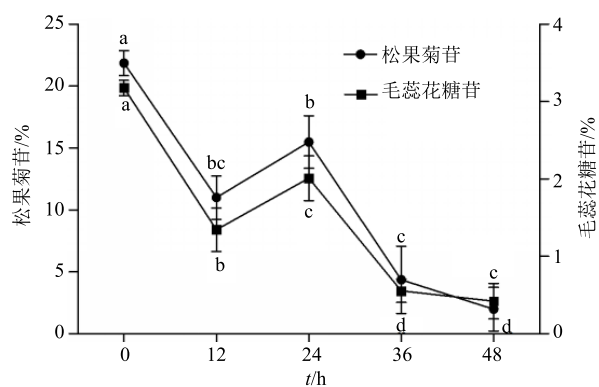


图 4 0.15 mol/L NaCl 诱导的干旱胁迫下管花肉苁蓉愈伤组织中松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量变化

Fig. 4 Effect of drought stress on accumulation of echinacoside and acteoside in callus cultures of *C. tubulosa* treated with 0.15 mol/L NaCl

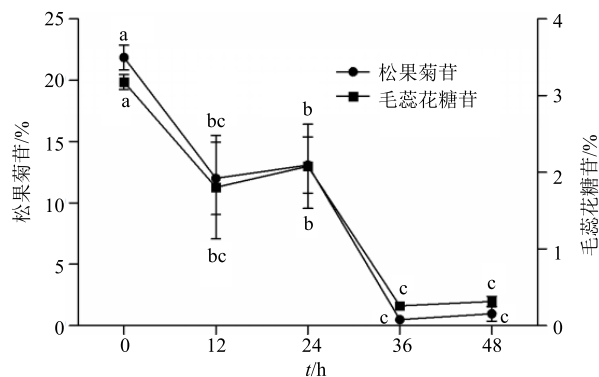


图 5 0.75 mol/L 甘露醇胁迫条件下管花肉苁蓉愈伤组织中松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量变化

Fig. 5 Effect of drought stress on accumulation of echinacoside and acteoside in callus cultures of *C. tubulosa* treated with 0.75 mol/L mannitol

PEG 能够显著促进红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. 悬浮细胞培养物中紫杉醇的积累^[27]及丹参毛状根中丹参酮类成分的积累^[28]。为此本研究以不同浓度 PEG6000 诱导管花肉苁蓉悬浮细胞来考察干旱胁迫对其活性成分松果菊苷和毛蕊花糖苷含量的变化, 选择文献中常用诱导浓度, 设计 6%、7.5%、9% 3 个浓度梯度, 分别在诱导的第 9 天和第 15 天取样, 以不加 PEG6000 的悬浮细胞体系为对照, 测定不同浓度 PEG6000 干旱胁迫下悬浮细胞中松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量变化, 结果分别见图 6、7。其中 PEG6000 胁迫条件下悬浮细胞中松果菊苷的含量较对照组有明显升高, 15 d 诱导组均高于 9 d 诱导组, PEG6000 浓度为 6% 时, 松果菊苷含量升高最为显著, 诱导 15 d 后其含量达到 20.94%, 是相同取样时间下对照组的 1.29 倍。而随着 PEG6000 浓度的继续升高, 松果菊苷的含量开始下降, 当 PEG6000 的诱导浓度达到 9% 时, 松果菊苷的含量降至与对照相当的水平。

PEG6000 诱导下的毛蕊花糖苷含量变化与松果菊苷略有不同, 9 d 取样组其变化趋势相对平缓: 当 PEG6000 诱导浓度为 6% 时, 毛蕊花糖苷含量相比对照组有所升高, 而当 PEG6000 浓度升至 7.5% 和 9% 时, 毛蕊花糖苷含量明显降低。而 15 d 取样组毛蕊花糖苷的含量变化较为明显, 当 PEG6000 诱导浓度为 6%, 诱导 15 d 后毛蕊花糖苷的含量能达到 2.27%, 是对照的 1.19 倍, 而当 PEG6000 浓度升至 7.5% 和 9% 时, 毛蕊花糖苷的含量下降至与对照组相当 (1.94%, 7.5% PEG6000) 或略低 (1.82%, 9% PEG6000) 的水平。综合以上结果可以看出, 在

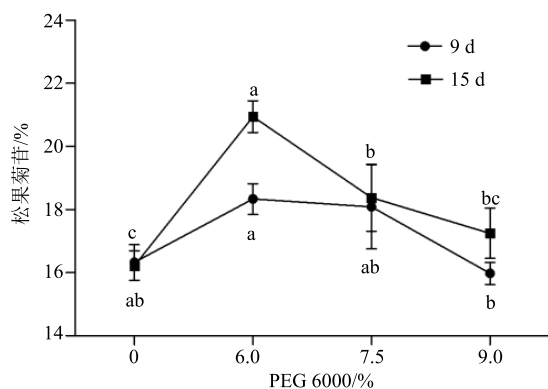


图 6 不同浓度 PEG6000 诱导下管花肉苁蓉悬浮细胞中松果菊苷含量变化曲线

Fig. 6 Effect of PEG6000 on echinacoside content in cell suspension culture of *C. tubulosa*

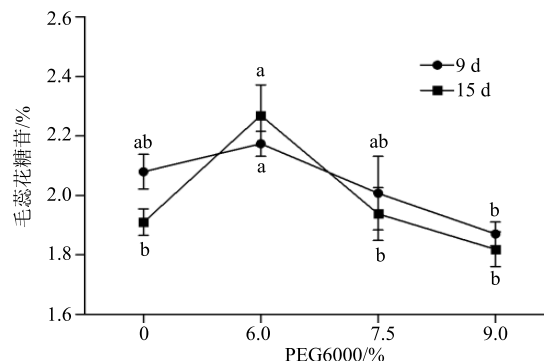


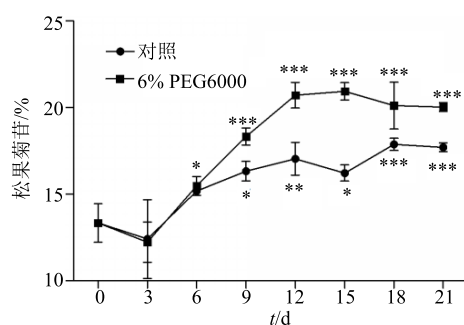
图 7 不同浓度 PEG6000 诱导下管花肉苁蓉悬浮细胞中毛蕊花糖苷含量变化

Fig. 7 Effect of PEG6000 concentration on acteoside content in cell suspension culture of *C. tubulosa*

PEG6000 为 6% 的诱导条件下, 松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量均有显著提高。证实 PEG6000 诱导的干旱胁迫对管花肉苁蓉悬浮细胞中苯乙醇苷类化合物的积累有明显的促进作用, 6% 为其最适诱导浓度。

3.5 6% 浓度 PEG6000 介导的干旱胁迫对管花肉苁蓉悬浮细胞培养体系中松果菊苷、毛蕊花糖苷的积累量的影响

在确定 PEG6000 干旱胁迫的最佳诱导浓度为 6% 后, 进一步对此诱导条件下的最佳取样时间进行了研究, 将生长状态良好的悬浮细胞接种于含 6% PEG6000 的 MS 液体培养基中, 分别在接种后的第 3、6、9、12、15、18、21 天取样, 测定悬浮细胞中松果菊苷 (图 8) 和毛蕊花糖苷的含量 (图 9) 变化动态曲线。同时记录细胞干质量, 计算不同诱导时间下松果菊苷 (图 10) 及毛蕊花糖苷 (图 11) 在细胞中的总生物量累。结果显示, 松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量变化趋势大体一致, 在诱导初期 0~3 d, 2 个化合物的含量相比对照组无明显提高, 推测此阶段细胞主要将吸收的营养物质应用于初级代谢以增强细胞对干旱胁迫环境的适应。诱导 3~12 d 后, 松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量均出现显著升高。12~15 d 时, 2 个化合物含量相对稳定, 并在 15 d 时达到最大值, 之后随培养时间的延长, 两者含量逐渐下降。由动态曲线可知, 6% PEG6000 诱导的干旱胁迫能有效增加管花肉苁蓉悬浮细胞中松果菊苷和毛蕊花糖苷的积累, 诱导 15 d 后, 松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量分别达到细胞干质量的 20.94% 和 2.27%, 为对照组的 1.29 倍和 1.19 倍。而与含量变化不同, 在整个培养周期内, 由于细胞生物量的逐渐累积, 松果菊苷和毛蕊花糖苷的生物量



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below

图 8 6% PEG6000 诱导下管花肉苁蓉悬浮细胞中松果菊苷的含量变化

Fig. 8 Time-variation course of echinacoside content in cell suspension cultures of *C. tubulosa* treated with 6% PEG6000

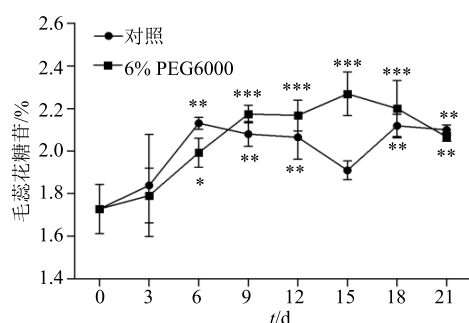


图 9 6% PEG6000 诱导下管花肉苁蓉悬浮细胞中毛蕊花糖苷的含量变化

Fig. 9 Time-variation course of acteoside content in cell suspension cultures of *C. tubulosa* treated with 6% PEG6000

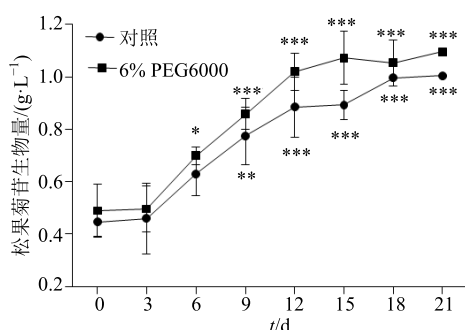


图 10 6% PEG6000 诱导下管花肉苁蓉悬浮细胞中松果菊苷的生物量积累变化

Fig. 10 Time-variation course of echinacoside biomass accumulation in cell suspension cultures of *C. tubulosa* treated with 6% PEG6000

积累也不断增加,在对照组接种后 3~12 d 内,细胞处于对数生长期,细胞生物量增长较快,因此相应的松果菊苷、毛蕊花糖苷的总生物量积累也增长较快,15 d 后细胞生物量增长趋于平稳,松果菊苷、毛蕊花糖苷的总生物量积累也逐渐趋于平衡,并在

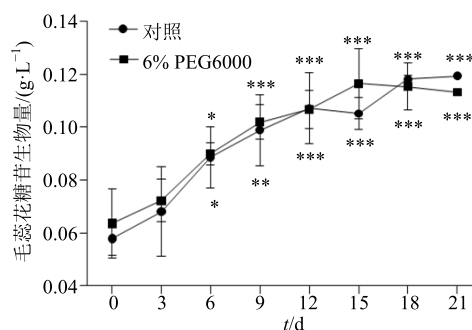


图 11 6% PEG6000 诱导下管花肉苁蓉悬浮细胞中毛蕊花糖苷的生物量积累变化

Fig. 11 Time-variation course of acteoside biomass accumulation in cell suspension cultures of *C. tubulosa* treated with 6% PEG6000

21 d 后达到最大值;而在 PEG6000 诱导组中,细胞生物量的变化与对照组一致,说明 PEG6000 对肉苁蓉悬浮细胞的生长无显著影响,而由于 PEG6000 诱导能显著上调悬浮细胞中松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量,因此诱导组松果菊苷、毛蕊花糖苷总生物量积累整体均高于对照组,且变化趋势略有不同,在诱导接种后的 3~15 d 内,细胞中松果菊苷、毛蕊花糖苷的总生物量积累不断升高,并于第 15 天达到最大值,而在 18~21 d,细胞干质量仍不断积累,但由于此时细胞中松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量相比 15 d 有所下降,故松果菊苷、毛蕊花糖苷的总生物量积累无明显增长,其中诱导 15 d 后松果菊苷、毛蕊花糖苷总生物量略高于诱导 18 d,与诱导后 21 d 持平。这也说明 PEG6000 干旱胁迫能促进松果菊苷和毛蕊花糖苷在肉苁蓉悬浮细胞中的生物量积累,且诱导 15 d 为最佳收样时间。

4 讨论

管花肉苁蓉为珍稀名贵传统中药材,结构多样性的苯乙醇苷类化合物是其主要化学成分且具有多种药理学活性。由于肉苁蓉为寄生植物,加之其寄主主要生长于干旱沙漠环境中,野生植物资源的短缺已远远满足不了肉苁蓉的市场需求。植物组织培养能在实验室条件下实现植物细胞的增殖,是解决一些药用资源短缺植物来源的有效手段。已有的诸多研究均显示,植物组织培养体系能够产生与原植物相同或相似的次生代谢产物,且由于组织培养体系的可操控性,通过外源诱导或环境胁迫等方式,可以有效刺激植物组织培养体系中的次级代谢途径,从而提高目的产物的合成量。

干旱胁迫是一种常见的生物胁迫方法,主要用

来模拟考察干旱环境下生物的应激反应变化及次级代谢产物积累量的变化。肉苁蓉作为一类沙漠寄生植物,其天然生境即属于干旱缺水环境,因此推测在体外对肉苁蓉植物组织培养体系进行干旱胁迫,会对其次级代谢产物的生成有较大影响。基于此,本实验以采自新疆和田地区的管花肉苁蓉为材料,成功建立了管花肉苁蓉愈伤组织及悬浮细胞培养体系,并对组织培养细胞中的主要苯乙醇苷类活性成分进行了液质分析,结果发现,肉苁蓉植物的主要活性成分松果菊苷及毛蕊花糖苷在肉苁蓉组织培养体系中也大量存在,约占细胞干质量的20%以上。进一步对愈伤及悬浮组织培养体系的生长曲线及代表性苯乙醇苷类化合物的含量进行了动态考察,发现30 d为肉苁蓉愈伤组织的最佳继代周期,其生物量及有效成分的含量都在培养30 d后达到最高值。此外,尝试利用PEG6000、NaCl、甘露醇在愈伤组织及悬浮细胞培养体系中模拟制造干旱环境,考察干旱胁迫下松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量变化。结果发现PEG6000加入愈伤组织固体培养基之后,会造成培养基黏度增加,细胞接种后很快褐化死亡;与此同时,NaCl/甘露醇诱导的干旱胁迫同样不利于愈伤组织细胞的生长及次级代谢产物的积累。而相比之下,悬浮细胞培养体系对PEG6000模拟制造的干旱胁迫表现出了良好的适应能力,考察其中松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量变化,结果显示PEG6000所诱导的干旱胁迫环境对肉苁蓉悬浮细胞中次级代谢产物的生成有显著的促进作用,在最佳浓度条件下(6% PEG6000)诱导15 d后,悬浮细胞中松果菊苷和毛蕊花糖苷的生物量积累分别为 (1.07 ± 0.10) g/L和 (0.12 ± 0.01) g/L,其含量能分别达到细胞干质量的20.94%和2.27%,为对照组的1.29倍和1.19倍。以上结果证实利用肉苁蓉植物组织培养体系来提取药用有效成分是可行的,结合外源诱导及环境胁迫,能有效促进许多次级代谢产物的合成,提示组织培养技术能够为解决资源短缺药用植物中活性成分的来源问题提供有力的补充,亦为管花肉苁蓉组织培养体系的深入研究及进一步应用于活性苯乙醇苷类成分的生产奠定了基础,具有理论与实际应用意义。

参考文献

[1] Moriya A, Tu P, Karasawa D. Pharmacognostical studies of *Cistanche herba* (II): Comparison of the components of *Cistanche* plants [J]. *Nat Med*, 1995, 49(4): 395-400.

[2] Jiang Y, Tu P F. Analysis of chemical constituents in *Cistanche* species [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1970-1979.

[3] 雷 丽, 宋志宏, 屠鹏飞. 肉苁蓉属植物的化学成分研究进展 [J]. *中草药*, 2003, 34(5): 473-476.

[4] 宋志宏, 屠鹏飞, 赵玉英, 等. 管花肉苁蓉的苯乙醇苷类成分 [J]. *中草药*, 2000, 31(11): 808-810.

[5] Tu P F, Song Z H, Jiang Y, et al. Chemical constituents of *Cistanche sinensis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(1): 79-84.

[6] Tu P F, Song Z H, Shi H M, et al. Aryethyl glycosides and oligosaccharide from the stem of *Cistanche tubulosa* [J]. *Helv Chim Acta*, 2006, 89(5): 927-935.

[7] Tu P F, Shi H M, Song Z H, et al. Chemical constituents from *Cistanche sinensis* (Orobanchaceae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2013, 47: 21-24.

[8] Zhao Q, Gao J P, Li W W, et al. Neurotrophic and neurorescue effects of echinacoside in the subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *Brain Res*, 2010, 1346: 224-236.

[9] Xue D J, Zhang M, Wu X H, et al. Studies on the active antisenile constituents in *Cistanche deserticola* Y. C. Ma. [J]. *Plant Med*, 1995, 20(11): 687-704.

[10] Piao H, Kamiya N, Hirata A, et al. A novel solid-in-oil nanosuspension for transdermal delivery of diclofenac sodium [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(4): 896-901.

[11] Zhao J, Liu T, Ma L, et al. Protective effect of acteoside on immunological liver injury induced by *Bacillus Calmette-Guerin* plus lipopolysaccharide [J]. *Plant Med*, 2009, 75(14): 1463-1469.

[12] Nour-Eddine E S, Albert K, Samira K, et al. Anti-oxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure-activity relationship [J]. *Lwt-food Sci Technol*, 2007, 40(7): 1246-1252.

[13] 皋 聪, 王传社, 屠鹏飞, 等. 苁蓉总苷对血管性痴呆大鼠学习记忆的影响及机制研究 [J]. *中草药*, 2005, 36(12): 1852-1855.

[14] Chen C H, Song T Y, Liang Y C, et al. Acteoside and 6-O-acetylacteoside downregulate cell adhesion molecules induced by IL-1 β through inhibition of ERK and JNK in human vascular endothelial cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(19): 8852-8859.

[15] Ouyang J, Wang X D, Zhao B, et al. Formation of phenylethanoid glycosides by *Cistanche deserticola* callus grown on solid media [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(3): 223-225.

[16] Hu G S, Hur Y J, Jia J M, et al. Effects of 2-aminoindan-2-phosphonic acid treatment on the

- accumulation of salidroside and four phenylethanoid glycosides in suspension cell culture of *Cistanche deserticola* [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 30(4): 665-674.
- [17] Liu C Z, Cheng X Y. Enhancement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in cell cultures of *Cistanche deserticola* by osmotic stress [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(2): 357-362.
- [18] Hu G S, Jia J M, Kim D H. Effects of feeding tyrosine and phenylalanine on the accumulation of phenylethanoid glycosides to *Cistanche deserticola* cell suspension culture [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(2): 367-372.
- [19] Ouyang J, Wang X D, Zhao B, *et al.* Enhanced production of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to cell culture of *Cistanche deserticola* [J]. *Process Biochem*, 2005, 40(11): 3480-3484.
- [20] Lu C T, Mei X G. Improvement of phenylethanoid glycosides production by a fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola* [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(17): 1437-1439.
- [21] Song Y L, Song Q Q, Li J, *et al.* An integrated strategy to quantitatively differentiate chemome between *Cistanche deserticola* and *C. tubulosa* using high performance liquid chromatography-hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1429: 238-247.
- [22] Liu X, Yan Y R, Liu Y Y, *et al.* Cell culture establishment and regulation of two phenylethanoid glycosides accumulation in cell suspension culture of desert plant *Cistanche tubulosa* [J]. *Plant Cell Tissue Organ*, 2018, 134(1): 107-118.
- [23] Ehsanpour A A, Amini F. Effect of salt and drought stress on acid phosphatase activities in alfalfa (*Medicago sativa* L.) explants under *in vitro* culture [J]. *Afr J Biotechnol*, 2003, 2(5): 133-135.
- [24] Tonon G, Kevers C, Faivre-Rampant O, *et al.* Effect of NaCl and mannitol *iso*-osmotic stresses on proline and free polyamine levels in embryogenic *Fraxinus angustifolia* callus [J]. *J Plant Physiol*, 2004, 161(6): 701-708.
- [25] 王兰兰, 张立军, 陈 贵, 等. 甘薯愈伤组织对干旱胁迫和盐胁迫的生理反应对比 [J]. 生态学杂志, 2006, 12(12): 1508-1514.
- [26] 曾丽兰, 林玉玲, 王亚婷, 等. 渗透胁迫对龙眼胚性愈伤组织 SOD 活性的影响 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2014, 43(1): 14-19.
- [27] Kim S I, Choi H K, Kim J H. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis* [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2001, 28(2/3): 202-209.
- [28] 盛东峰, 陈 龙. 聚乙二醇-6000 胁迫对丹参毛状根中丹参酮积累的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1181-1185.