

不同氮源对丹参和藏丹参毛状根有效成分积累的影响

王飞艳, 尤华乾, 杜旭红, 杨宗岐, 张晓丹, 梁宗锁*, 杨东风*

浙江理工大学生命科学与医药学院, 浙江省植物次生代谢调控重点实验室, 浙江 杭州 310018

摘要:目的 氮素是中药材有效成分积累的重要影响元素, 为探讨不同氮源对丹参 *Salvia miltiorrhiza* 和藏丹参 *Salvia castanea* 毛状根生长和活性成分积累的影响。方法 分别采用硝酸铵、水解乳蛋白、蛋白胨、牛肉浸膏、酪蛋白和酵母提取物 6 种氮源处理对丹参和藏丹参毛状根的影响, 分析毛状根生长及活性成分积累的变化。结果 硝酸铵最有利于 2 种丹参毛状根的生长。水解乳蛋白能够显著促进丹酚酸类成分的积累, 与硝酸铵对照相比, 丹参迷迭香酸和丹酚酸 B 含量分别提高了 2.94 倍和 3.27 倍, 藏丹参二者含量分别提高了 13.74 倍和 2.01 倍。酵母提取物对 2 种丹参毛状根二氢丹参酮 I 和隐丹参酮积累的促进效果最为显著, 水解乳蛋白能显著促进丹参根中丹参酮 II_A 的积累, 牛肉浸膏则对藏丹参中丹参酮 II_A 积累的促进作用最为显著。结论 硝酸铵是 2 种丹参毛状根生长的最佳氮源, 水解乳蛋白是丹酚酸积累的最佳氮源, 不同氮源对 4 种丹参酮的影响不一致, 丹参和藏丹参对不同氮源的响应也不一致。该研究不仅对丹参毛状根规模化培养及活性成分工业化生产具有一定指导意义, 也对藏丹参资源的开发利用提供了借鉴作用。

关键词: 丹参; 藏丹参; 毛状根; 氮源; 次生代谢产物; 酚酸类化合物; 丹参酮类化合物

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)09-2538-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.031

Effects of different nitrogen sources on accumulation of active components in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia castanea* f. *tomentosa*

WANG Fei-yan, YOU Hua-qian, DU Xu-hong, YANG Zong-qi, ZHANG Xiao-dan, LIANG Zong-suo, YANG Dong-feng

Zhejiang Key Laboratory of Plant Secondary Metabolism and Regulation, College of Life Science and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

Abstract: Objective Nitrogen is an important element affecting the accumulation of effective components in Chinese medicinal materials. The purpose of this study was to investigate effects of different nitrogen sources on the growth and active components accumulation of hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia castanea* f. *tomentosa*. **Methods** The hairy roots of *S. miltiorrhiza* and *S. castanea* f. *tomentosa* were treated with ammonium nitrate, hydrolyzed milk protein, peptone, beef extract, casein and yeast extract, respectively. The growth of hairy roots and the accumulation of active components were analyzed. **Results** Ammonium nitrate was the most beneficial to the growth of the two kinds of hairy roots. Hydrolyzed milk protein significantly promoted the accumulation of salvianolic acids, compared with ammonium nitrate, the contents of rosmarinic acid and salvianolic acid B in *S. miltiorrhiza* were respectively increased by 2.94 times and 3.27 times, and the contents of rosmarinic acid and salvianolic acid B in *S. castanea* f. *tomentosa* were respectively increased by 13.74 times and 2.01 times. Yeast extract had the most significant effect on the accumulation of dihydrotanshinone I and cryptotanshinone in two kinds of hairy roots. Hydrolyzed milk protein significantly promoted the accumulation of tanshinone II_A in the hairy roots of *S. miltiorrhiza*, while beef extract had the most significant effect on the accumulation of tanshinone II_A in *S. castanea* f. *tomentosa*. **Conclusion** Ammonium nitrate was the best nitrogen source for the growth of two kinds of hairy roots, and hydrolyzed milk protein was the best nitrogen source for salvianolic acids accumulation. The effects of different nitrogen sources on four kinds of tanshinones were different, and the responses of *S. miltiorrhiza* and *S. castanea* f. *tomentosa* to different nitrogen sources were also different. This study not only has certain guiding significance

收稿日期: 2019-06-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81673536); 国家自然科学基金项目 (81773835); 国家自然科学基金项目 (31871694)

作者简介: 王飞艳 (1992—), 女, 硕士研究生, 主要从事丹参次生代谢及调控方面的研究。E-mail: 2929904474@qq.com

*通信作者 杨东风, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药用植物次生代谢及调控方面研究。Tel: 15057190968 E-mail: ydf807@sina.com

梁宗锁, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物次生代谢及调控方面研究。E-mail: liangzs@ms.iswc.ac.cn

for large-scale cultivation of hairy roots of *S. miltiorrhiza* and industrialized production of active components, but also provides a reference for the development and utilization of *S. castanea* f. *tomentosa* resources.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib; hairy roots; nitrogen sources; secondary metabolites; salvianolic acids; tanshinones

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 又名赤参, 多用于治疗心脑血管, 肝脾肿大等疾病^[1]。丹酚酸 B 等酚酸类物质对干硬脉化等慢性肝病具有很好的防治作用^[2]。丹参酮 II_A 等丹参酮类物质具有较强的清除自由基能力^[3], 隐丹参酮可以抑制癌细胞增殖, 具有抗肿瘤作用^[4], 二氢丹参酮诱导 jurkat 细胞凋亡, 引起分裂周期阻滞的效果较为显著^[5]。

藏丹参 *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib, 原名绒毛鼠尾草, 又称“林芝丹参”, 是栗色鼠尾草 *Salvia castanea* Diels 的绒毛变型, 主要分布于西藏林芝地区。藏丹参根与丹参根有效成分相近, 在当地长期作为丹参的替代品用于治疗疾病^[6-7]。2007 年获得西藏自治区食品药品监督管理局批准作为地方药材标准, 并正式改名为“藏丹参”^[8-9]。藏丹参根中脂溶性成分含量显著高于丹参, 其中丹参酮 II_A 和隐丹参酮最高分别达到丹参的 6 倍和 10 倍以上, 其水溶性成分迷迭香酸含量也较高, 但丹酚酸 B 含量较低^[10]。可见藏丹参作为丹参酮和迷迭香酸的药源具有重要意义。

毛状根是根类药用植物研究的重要材料^[11], 丹参毛状根培养体系的优化已有大量文献报道。培养基组成对丹参毛状根生长和活性成分积累具有重要影响^[12]。毛莹等^[13]研究发现, 6,7-V 培养基中缺少大量元素时, 能够显著促进丹参酮类成分的积累。氮素是影响植物生长和次生代谢产物积累的重要因素^[14]。蛋白胨能够显著提高虫草素的积累^[15]; 酵母提取物有利于促进黄芩悬浮细胞鲜干质量的生长^[16]; 200 mg/L 水解乳蛋白促进红栌丛生芽增殖的效果显著^[17]; 适量的氮素有利于促进玉米叶片内可溶性蛋白和脯氨酸的积累^[18], 但不同氮源对丹参毛状根生长和活性成分积累的影响的系统比较尚未有文献报道。藏丹参虽然具有高丹参酮和迷迭香酸积累的特点, 但其根的生物量较低, 藏丹参毛状根的生长也较为缓慢, 因此研究不同氮源对藏丹参毛状根和活性成分积累的影响对于藏丹参资源的开发利用也具有重要意义。

本研究拟通过比较不同氮源对丹参和藏丹参毛状根的生长及活性成分含量和产量的影响, 以期

获得 2 种毛状根生长和活性成分积累的最佳氮源, 不仅可以为丹参毛状根的规模化培养和有效成分的工业化生产提供理论依据, 也可以帮助科研人员进一步理解藏丹参高丹参酮和迷迭香酸积累的特性, 为藏丹参资源开发利用奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

所用样品由陕西天士力公司提供, 由浙江理工大学祁哲晨副教授鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 和藏丹参 *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib 的种子。所用丹参、藏丹参毛状根由发根农杆菌 ATCC15834 分别侵染丹参、藏丹参无菌苗获得。

1.2 试剂

对照品咖啡酸 (MUST-15081916)、迷迭香酸 (MUST-15081916)、丹酚酸 B (MUST-15081916)、二氢丹参酮 (MUST-15010613)、隐丹参酮 (MUST-15010613)、丹参酮 I (17122704)、丹参酮 II_A (MUST-17022502) 均购自中国食品药品检定研究院, 质量分数均大于 98%; 色谱级甲醇、乙腈 (德国默克公司)、硝酸铵、水解乳蛋白、蛋白胨、牛肉浸膏、酪蛋白、酵母提取物、胰蛋白胨均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.3 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Waters 2998 二极管阵列检测器、Empower 3 色谱分析仪 (美国 Waters 公司); Denver TP-214 型电子天平 (北京赛多利科学仪器有限公司); KQ-500DE 型超声洗涤器 (昆山市超声仪器有限公司); 纯水仪 (康雷仪器有限公司); 超净工作台 (博迅医疗设备厂)、微型粉碎机 (杭州奥盛仪器有限公司)。

2 方法

2.1 诱导毛状根

以硝酸铵 (对照组)、水解乳蛋白、蛋白胨、牛肉浸膏、酪蛋白和酵母提取物为氮源。在超净工作台内精密称量丹参毛状根 0.2 g, 藏丹参毛状根 0.3 g (藏丹参生长缓慢), 转接到含有不同氮源 6,7-V 培养基的 100 mL 锥形瓶中, 置于温度为 25 °C, 转速 110 r/min 摇床中避光生长 24 d, 每组实验均设 4 个生物学重复。

连续生长 24 d 后,用无菌水清洗 2 种丹参毛状根表面培养液,擦干水渍,称其鲜质量。置于 50 °C 恒温烘箱中烘干至恒定质量,称其干质量。

2.2 有效成分的测定

2.2.1 色谱条件 测定咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、和丹参酮 II_A 含量。采用 Waters e2695 二元高效液相色谱 Waters 2998 紫外光检测器, Waters sunfire C₁₈ 色谱柱,柱温 30 °C,上样体积 20 μL,体积流量 1 mL/min,样品运行 96 min。丹参酮类成分色谱检测波长为 270 nm,丹酚酸类成分色谱检测波长为 288 nm。流动相为 0.02% 磷酸水(A)和色谱级乙腈(B),梯度洗脱,0~10 min,95%~80% A;10~28 min,80%~70% A;28~45 min,70%~55% A;45~85 min,55%~5% A;85~96 min,5%~95% A。对照品色谱图及丹参毛状根供试样品色谱图见图 1。

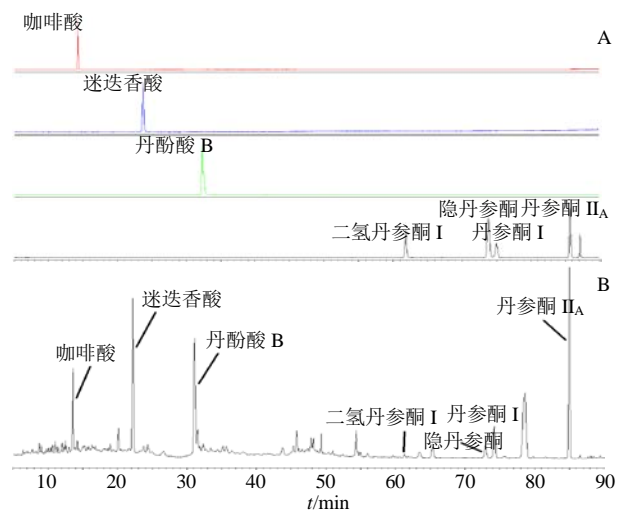


图 1 对照品 (A) 和丹参毛状根样品 (B) 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of *S. miltiorrhiza* hairy roots

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取对照品咖啡酸 2.52 mg、迷迭香酸 3.28 mg、丹酚酸 B 0.95 mg,置于 10 mL 离心管中用等体积 50% 色谱级甲醇溶解,超声 45 min 混匀,即得质量浓度均为 1 mg/mL 的酚酸类成分对照品溶液。精密称取对照品二氢丹参酮 I 1.23 mg、隐丹参酮 2.55 mg、丹参酮 I 0.72 mg、丹参酮 II_A 1.01 mg,置 10 mL 离心管中用 100% 的色谱级乙腈溶解、超声 45 min 混匀,即得质量浓度均为 1 mg/mL 的丹参酮类成分对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 将烘干的 2 种毛状根转移至装有小钢珠的 5 mL 离心管中,借助微型粉碎机将干燥毛状根粉碎,精密称取 0.05 g,转移至另

一 5 mL 离心管中,加入 2.5 mL 70% 甲醇提取液,超声提取 45 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜注入上样小瓶,备用。

2.2.4 精密度试验 本研究方法学主要参考郑丽玲等^[19]的研究方法,取丹参样品,按照“2.2.3”项下方法制备供试样品溶液,连续进样 6 次,记录色谱图。结果表明,各主要色谱峰的保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%,符合特征图谱要求,仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取丹参样品 6 份,按照“2.2.3”项下方法制备供试样品溶液,检测色谱图中各个主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%,符合特征图谱要求,表明方法重复性良好。

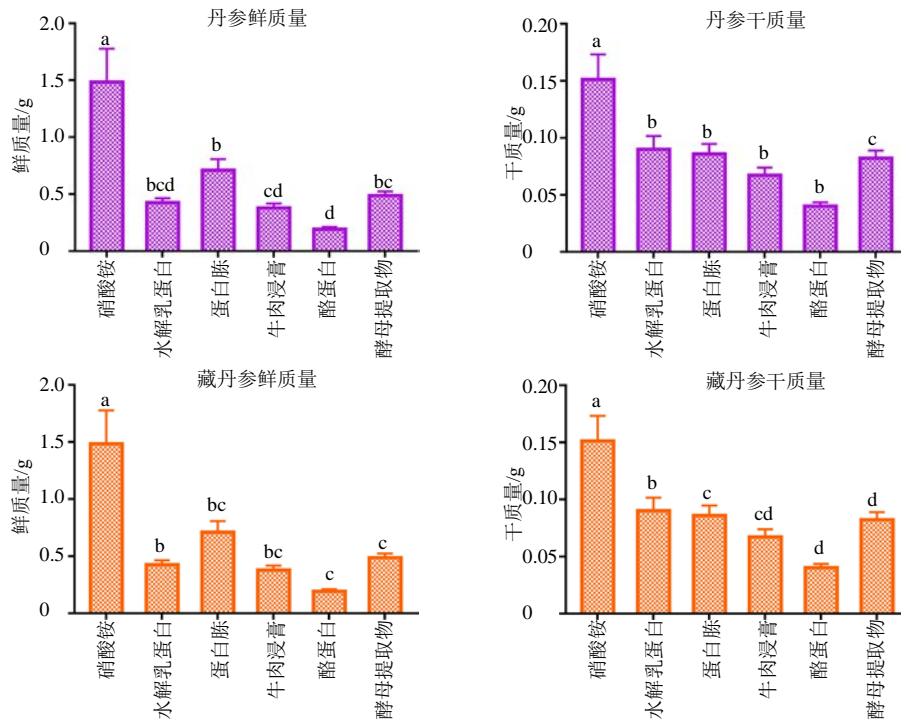
2.2.6 稳定性试验 取丹参样品 6 份,按照 2.2.3 项下方法制备供试样品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 检测色谱图,计算各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 5.0%,符合特征图谱要求,表明供试样品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取已测定的丹参样品 6 份,分别加入低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品,按照“2.2.3”项下方法制备供试样品溶液,计算各对照品成分的回收率,结果表明,7 种有效成分的加样回收率变化范围为 85.1%~96.08%,RSD 值小于 2%,表明在提取和分析过程中系统误差较小。

3 结果与分析

3.1 不同氮源对丹参和藏丹参毛状根生长的影响

分析了 6 种氮源对 2 种丹参和藏丹参毛状根生长的影响,结果如图 1 所示,对照组的 2 种毛状根生长状态较好,鲜质量和干质量均为最高,丹参毛状根鲜、干质量分别达到 1.485 g 和 0.151 g,藏丹参毛状根鲜、干质量分别为 2.118 g 和 0.170 g (藏丹参最初加入量为 0.3 g);以酪蛋白为氮源的培养基中,丹参毛状根生长状态最差,鲜、干质量均为最低,鲜质量只有 0.193 g,干质量仅有 0.040 g,与对照组相比分别降低了 87% 和 73.51%,可见酪蛋白严重抑制了丹参毛状根的生长;以酵母提取物为氮源的藏丹参毛状根生长状态较差,鲜干质量均为最低,鲜质量只有 0.406 g,干质量仅有 0.060 g,与对照组相比分别降低了 80.8% 和 64.71%,酵母提取物显著抑制了藏丹参毛状根的生长。



不同小写字母表示处理间在 0.05 水平存在显著差异，下同

Different normal letters indicated the significant different among treatments at 0.05 level, same as below

图 1 不同氮源对丹参和藏丹参毛状根鲜、干质量的影响

Fig. 1 Effects of different nitrogen sources on fresh and dry weight of hairy roots of *S. miltiorrhiza* and *S. castanea f. tomentosa*

3.2 不同氮源对丹参和藏丹参毛状根酚酸类成分积累的影响

为了研究 6 种氮源对 2 种丹参毛状根酚酸类成分积累的影响，检测分析了毛状根中咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 等 3 种成分的质量分数和产量。结果如图 2、3 所示，水解乳蛋白能够有效促进 2 种丹参毛状根中酚酸类活性成分的积累，酚酸类有效成分含量和产量均为最高。水解乳蛋白对丹参迷迭香酸和丹酚酸 B 的促进效果较为显著，迷迭香酸的质量分数和产量为 2.283 mg/g 和 4.110 mg/L，分别是对照组的 3.94 倍和 2.435 倍；丹酚酸 B 的质量分数和产量分别为 6.062 mg/g 和 10.911 mg/L，分别是对照组的 3.27 倍和 1.94 倍；水解乳蛋白对咖啡酸积累的影响不显著。6 种氮源中，酪蛋白最不利于迷迭香酸和丹酚酸 B 的积累，迷迭香酸的质量分数和产量分别为 0.117 mg/g 和 0.094 mg/L，与对照组相比含量和产量分别降低了 79.03% 和 94.43%；丹酚酸 B 的质量分数和产量仅为 0.236 mg/g 和 0.190 mg/L，与对照组相比其质量分数和产量分别降低了 87.3% 和 96.61%。

与丹参一致，水解乳蛋白对藏丹参毛状根酚酸类成分积累的促进效果最为显著。其中迷迭香酸质量分数和产量分别达到 16.298 mg/g 和 32.052 mg/L，与硝酸铵对照组相比分别提高了 13.74 倍和 7.51 倍；丹酚酸 B 的质量分数和产量分别达到 1.172 mg/g 和 3.367 mg/L，是对照组的 2.01 倍和 1.70 倍。以酵母提取物为氮源虽然能提高咖啡酸的含量，但却显著抑制了丹酚酸 B 的积累，6 种氮源处理中，酵母提取物处理丹酚酸 B 积累最低，其质量分数和产量仅为 0.023 mg/g 和 0.028 mg/L 与对照相比分别降低了 69.34% 和 89.13%。可见酵母提取物对不同的酚酸类活性成分的作用效果不同。与丹参不同的是，酪蛋白和蛋白胨均不同程度地提高了迷迭香酸和丹酚酸 B 的含量。

3.3 不同氮源对丹参和藏丹参毛状根丹参酮类成分积累的影响

为了探讨 6 种氮源对 2 种丹参毛状根丹参酮类成分积累的影响，检测分析了毛状根中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的含量与产量。结果如图 4、5 所示，5 种氮源均能够不同程度促

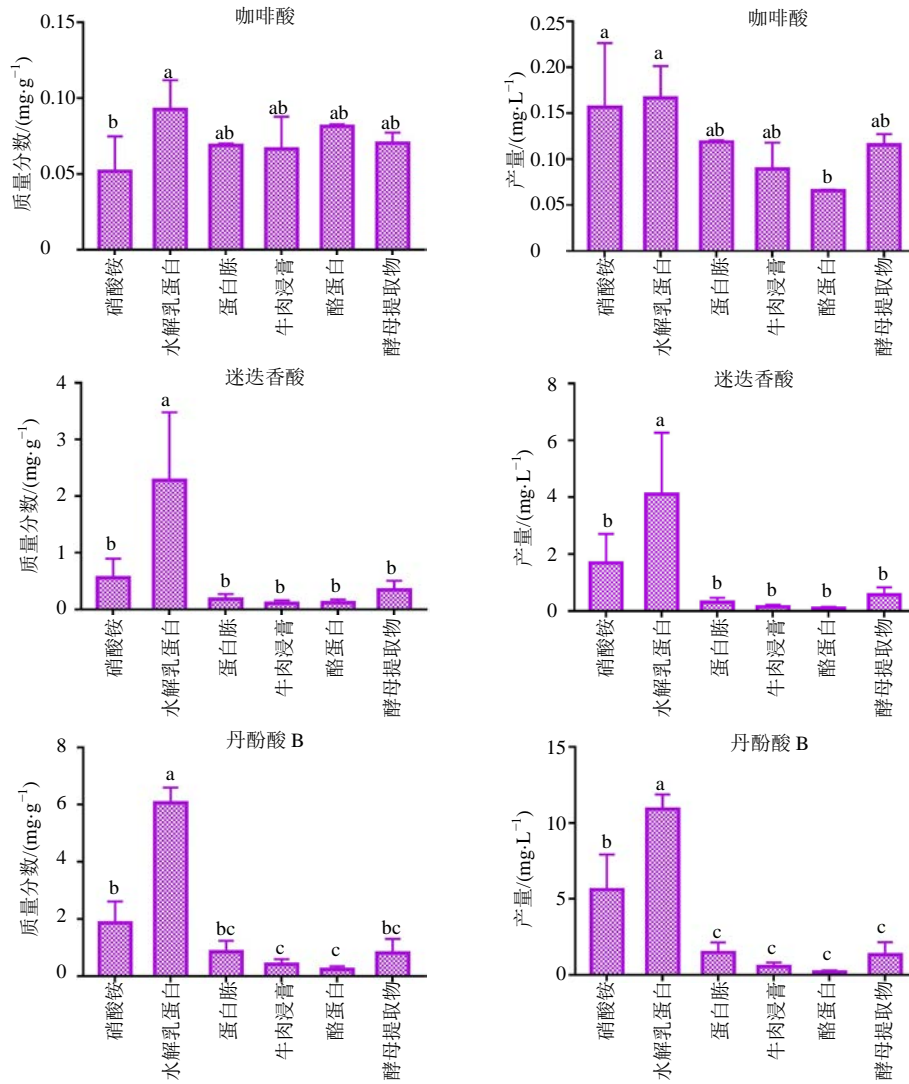


图 2 不同氮源对丹参酚酸类成分积累的影响

Fig. 2 Effects of different nitrogen sources on accumulation of salvanolic acids in *S. miltiorrhiza*

进丹参毛状根中丹参酮类成分积累。酵母提取物氮源能够显著促进丹参毛状根二氢丹参酮 I 和隐丹参酮的积累，二氢丹参酮 I 的含量和产量分别为 5.034 mg/g 和 8.281 mg/L，与对照组相比分别提高了 67.96 倍和 36.47 倍；隐丹参酮的含量和产量次之，分别为 4.126 mg/g 和 6.787 mg/L，是对照组的 53.58 倍和 29.25 倍。水解乳蛋白能有效促进丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的积累，其含量分别为 0.658 mg/g（对照组的 6.65 倍）和 0.236 mg/g（对照组的 6.05 倍），其产量分别为 1.185 mg/L（对照组的 3.963 倍）和 0.425 mg/L（对照组的 3.571 倍）。

与丹参一致，酵母提取物能够显著促进藏丹参毛状根中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 的积累，其中隐丹参酮的促进效果最显著，含量和产量均达

最高，为 11.667 mg/g 和 14.078 mg/L，分别是对照组的 466.68 倍和 165.62 倍；二氢丹参酮 I 的含量和产量次之，分别为 6.441 mg/g 和 7.773 mg/L，是对照组的 1 073.5 倍和 388.65 倍。不同的是牛肉浸膏促进藏丹参中丹参酮 II_A 积累的作用最为显著，其含量和产量分别 3.580 mg/g 和 2.570 mg/L，是对照组的 6.76 倍和 2.69 倍。可见，酵母提取物和牛肉浸膏 2 种氮源对藏丹参 4 种丹参酮类活性成分的促进效果明显不同。

4 讨论

氮素是植物生长和次生代谢积累的重要影响因素，在植物养分吸收及经济效益方面发挥着重要的作用^[19-20]。硝酸铵是一种重要的氮源已被广泛用作激发剂以刺激植物生长和发育，可以在受控条件下诱导次级代

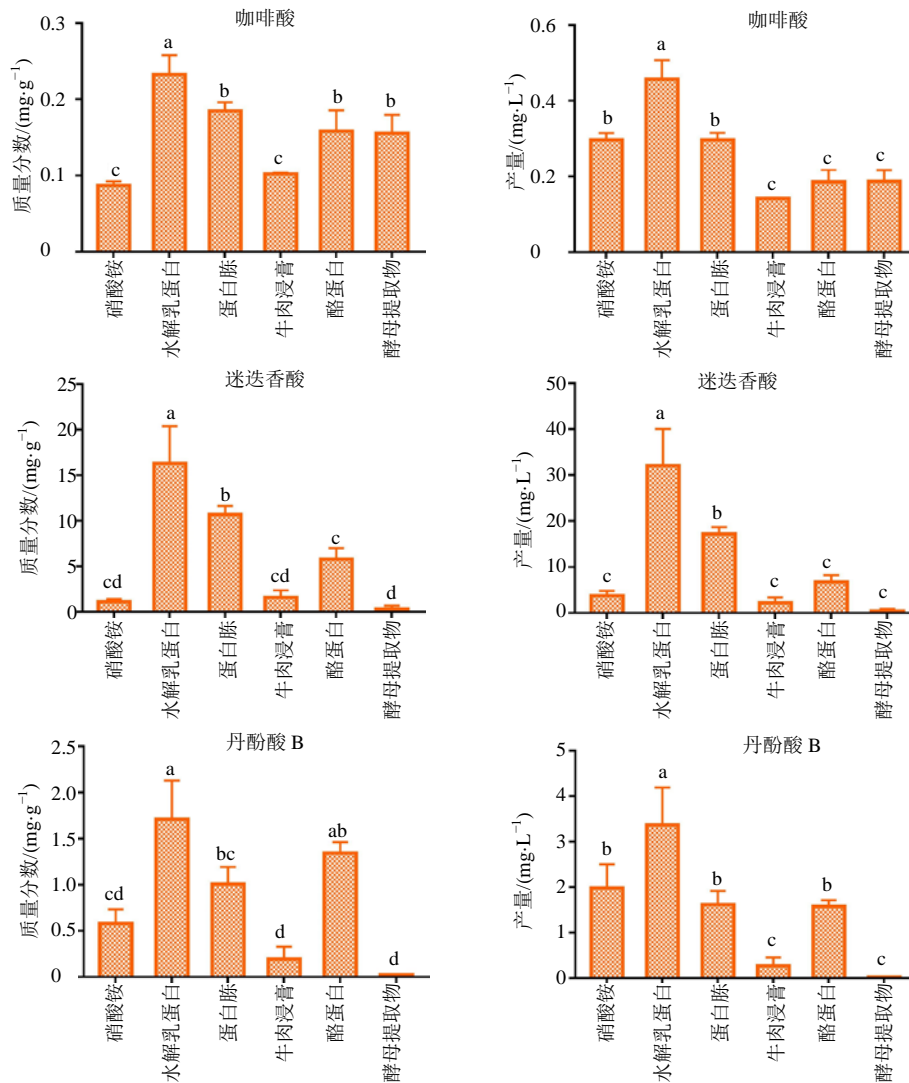


图 3 不同氮源对藏丹参酚酸类成分积累的影响

Fig. 3 Effects of different nitrogen sources on accumulation of salvianolic acids in *S. castanea f. tomentosa*

谢产物^[21], 能够显著提高叶绿素的合成, 促进营养物质的积累^[22]; 金铁锁毛状根悬浮培养的研究发现, 当培养基中 NH_4^+ 与 NO_3^- 的浓度比为 1:2 时, 金铁锁毛状根的生物量最佳^[23]; 增氮处理能够增加氮代谢的活性, 提高光合作用中光反应和暗反应速率, 施氮处理促进紫花苜蓿高、丹草等植物的生物量积累效果显著, 促进作物对氮素的吸收利用, 可以显著提高作物产量^[24-26]。周伟等^[27]认为无机氮比有机氮(水解乳蛋白、酵母粉、蛋白胨、牛肉浸膏)更有利于丹参毛状根的生长。本研究发现, 以硝酸铵为氮源的培养基, 毛状根生长状态较好, 生物量积累最高, 鲜、干质量与其他 5 种氮源培养基差异显著, 这与硝态氮和铵态氮对于毛状根的生长均有促进作用有关^[28], 与本研究结果一致。

李博华等^[29]研究表明, 1.0 g/L 的水解酪蛋白或

水解乳蛋白对四倍体菘蓝毛状根生长具有促进作用(分枝多、产量高)。但本课题组发现, 水解乳蛋白抑制了丹参和藏丹参毛状根的生长, 这与前人研究结果存在差异, 可能是由于毛状根的材料不同, 水解酪蛋白或水解乳蛋白的浓度不同以及培养基的种类不同造成的。水解乳蛋白氮源虽然不利于丹参毛状根的生长, 但在促进丹参毛状根水溶性活性成分积累方面效果最佳, 且对 4 种脂溶性丹参酮类物质的含量均有不同程度的提高。水解乳蛋白对 2 种毛状根酚酸类成分积累均有显著促进作用, 丹参迷迭香酸的含量和产量分别提高了 2.94 倍和 1.435 倍, 藏丹参迷迭香酸含量和产量分别提高了 13.74 倍和 7.51 倍, 可见 2 种丹参毛状根对水解乳蛋白的响应存在差异。蛋白胨、酪蛋白抑制了丹参

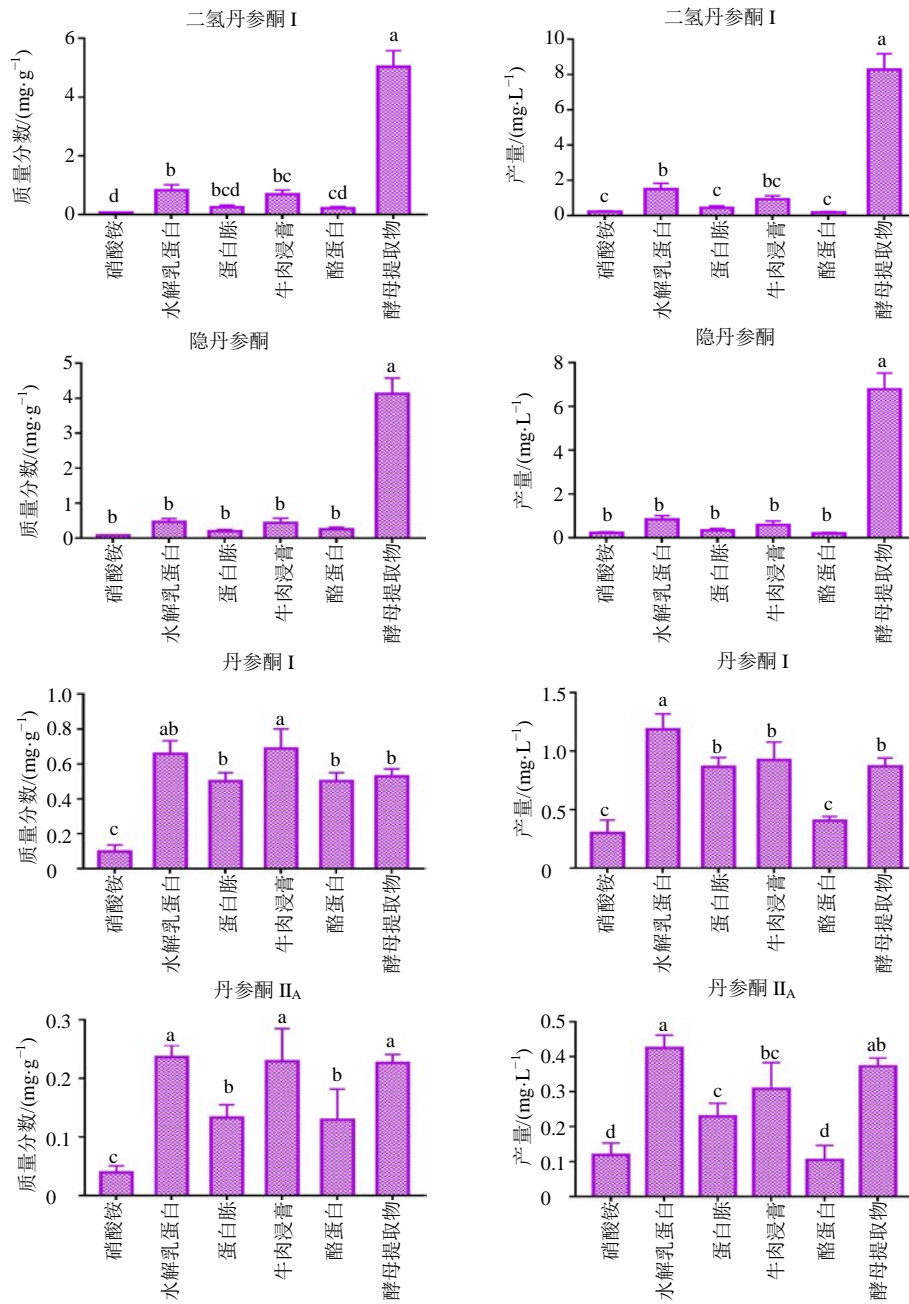


图 4 不同氮源对丹参中丹参酮类成分积累的影响

Fig. 4 Effects of different nitrogen sources on accumulation of tanshinones components in *S. multiorrhiza*

毛状根迷迭香酸和丹酚酸 B 的积累,促进了藏丹参毛状根迷迭香和丹酚酸 B 的积累,但 2 种丹参毛状根脂溶性丹参酮类物质的含量均有不同程度的提高。综合来看,酵母提取物氮源的作用效果最佳。

与硝酸铵相比,酵母提取物对丹酚酸类成分积累的影响并不明显,但却能显著促进丹参酮类成分的积累。研究发现,在基础培养基中添加酵母粉,可以显著提高灵芝中萜类化合物含量^[30];酵母提取物能够显著上调丹参酮合成途径中相关基因的

转录本,提高异戊二烯磷酸异构酶和香叶基香叶基二磷酸合成酶的表达,调控藏丹参毛状根中丹参酮次生代谢相关基因的效果显著,促进藏丹参毛状根中丹参酮积累作用显著^[31]。Kai 等^[32]研究发现酵母提取物能够不同程度提高丹参酮生物合成途径中 SmAACT、SmHMGS、SmDXR、SmDXS2 等关键酶的活性显著促进了隐丹参酮和丹参酮 II_A 的积累。研究表明酵母提取物能够激活丹参毛状根中 Ga²⁺/钙调蛋白信号传导途径,免疫蛋白表达增加,

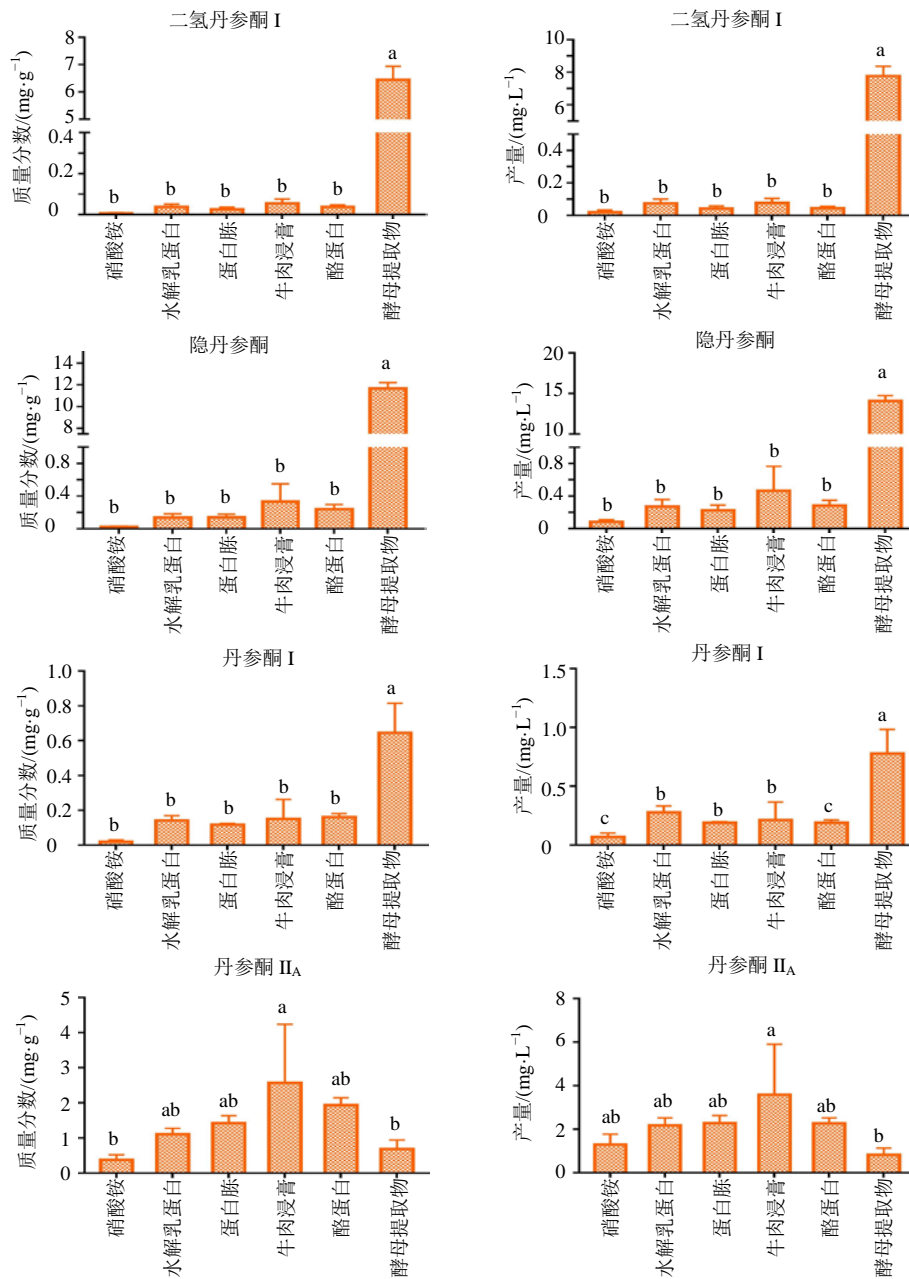


图 5 不同氮源对藏丹参中丹参酮类成分积累的影响

Fig. 5 Effects of different nitrogen sources on accumulation of tanshinones components in *S. castanea f. tomentosa*

促进丹参酮，丹酚酸等代谢产物积累^[33]。本研究发现酵母提取物对 2 种丹参毛状根丹参酮类成分积累也具有显著的促进作用，这与前人研究结果一致。但两种毛状根中丹参酮类物质的促进效果存在差异，丹参毛状根中二氢丹参酮 I 含量和产量分别是硝酸铵对照组的 68.96 倍和 37.74 倍；隐丹参酮的含量和产量分别是对照组的 53.58 倍和 29.25 倍；藏丹参毛状根中二氢丹参酮 I 的含量和产量分别是对照组的 1 073.5 倍和 388.65 倍，隐丹参酮含量和产量分别为对照组的 466.68 倍和 165.62 倍，可

见藏丹参对酵母提取物的响应较丹参效果显著。野生藏丹参脂溶性有效成分虽含量较高，但其生长缓慢，产量很低，通过优化 2 种丹参毛状根的培养条件，发现两种丹参脂溶性成分的积累对酵母提取物均有较好的响应，含量和产量均能显著提高，该研究对丹参毛状根规模化培养及丹参酮和丹酚酸工业化生产具有一定指导意义，同时为藏丹参的规模化培养和进一步开发利用藏丹参资源提供了思路 and 理论指导。前期的研究推测由丹参酮二烯衍生出 2 条合成途径分别形成不同的二萜类化合物^[34]。研

究发现, 6 种氮源对丹参毛状根二氢丹参酮 I 与隐丹参酮, 丹参酮 I 与丹参酮 II_A 的促进效果相似, 这可能是由于二氢丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 I、丹参酮 II_A 处在合成途径不同的分支上。本研究与前人研究结果一致, 而藏丹参中除丹参酮 II_A 外二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 3 种丹参酮类物质对 6 种氮源均表现出相同的响应效果。酵母提取物对藏丹参丹参酮 II_A 积累的作用不显著, 但牛肉浸膏却能显著促进藏丹参丹参酮 II_A 的积累, 但这一机制并不清楚。

5 结论

本研究发现无论是丹参还是藏丹参, 硝酸铵最有利于毛状根的生长。水解乳蛋白对 2 种丹参毛状根酚酸类成分的积累均具有显著促进作用; 蛋白胨、牛肉浸膏、酪蛋白和酵母提取物抑制了丹参迷迭香酸和丹酚酸 B 的积累。与丹参不同, 只有牛肉浸膏和酵母提取物抑制了藏丹参酚酸类成分的积累。水解乳蛋白、蛋白胨、牛肉浸膏、酵母提取物对丹参毛状根丹参酮类成分积累均有显著促进作用, 其中酵母提取物的促进效果最为显著, 酪蛋白对丹参毛状根丹参酮 I、丹参酮 II_A 产量作用效果不显著, 但却显著提高了二者的含量。与丹参不同, 牛肉浸膏对藏丹参毛状根丹参酮 II_A 的促进效果最为显著, 酵母提取物对藏丹参毛状根中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 积累的促进效果显著。

毛状根是研究根类药材的重要材料, 在规模化生产方面具有重要前景, 然而目前丹参毛状根有效成分含量和产量依然较低。氮素是植物次生代谢产物积累的重要影响因素, 合适的氮源及适量的氮素对植物活性成分积累有显著的促进作用。本研究结果不仅为丹参毛状根的规模化培养和活性成分的工业化生产提供了理论依据, 也对藏丹参资源的开发利用提供了借鉴。

参考文献

- [1] 徐丽君, 黄光英. 丹参的化学成分及其药理作用研究概述 [J]. 中西医结合研究, 2009, 1(1): 45-48.
- [2] 刘洪亮, 吕靖, 赵志敏, 等. 丹参水溶性成分抑制肝窦内皮细胞功能及血管新生的活性评价 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 938-943.
- [3] 王涵, 杨娜, 谭静, 等. 丹参化学成分、药理作用及临床应用的研究进展 [J]. 特产研究, 2018, 40(1): 48-53.
- [4] Jiang G, Liu J, Ren B, *et al.* Anti-tumor and chemosensitization effects of cryptotanshinone extracted from *Salvia miltiorrhiza* Bge. on ovarian cancer cells *in vitro* [J]. *J Ethnopharm*, 2017, 205: 33-40.
- [5] 何莹. 丹参酮化合物对血液系统恶性肿瘤作用及其机制探 [J]. 实用医学临床杂志, 2016, 13(05): 221-223.
- [6] 叶华谷, 廖文波, 李辉, 等. “林芝丹参”资源调查 [J]. 中药材, 2004, 27(11): 809-811.
- [7] 孙景波, 华荣, 欧润妹, 等. 绒毛鼠尾草(林芝丹参)抗肉芽肿形成和改善血液流变学药理试验 [J]. 中药材, 2004, 27(2): 118-120.
- [8] Cal L P, Wu C L, Wu G T. The research progress of Tibetan region “Linzi danshen” [J]. *J Guangdong Coll Pharm*, 2007, 23(3): 351-352.
- [9] 舒志明, 梁宗锁, 刘建朝, 等. 丹参和藏丹参对 UV-B 辐射的响应差异 [J]. 西北农业学报, 2016, 25(5): 738-743.
- [10] Yang D F, Yang S S, Zhang Y J, *et al.* Metabolic profiles of three related *Salvia* species [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(5): 274-278.
- [11] 刘连旺, 张永清, 李先恩. 药用植物毛状根研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2015, 21(3): 288-291.
- [12] 张萌, 高伟, 王秀娟. 药用植物毛状根的诱导及其应用 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 1956-1960.
- [13] 毛莹, 袁媛, 何希荣, 等. 不同元素对丹参毛状根生长及丹参酮类成分积累的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 6-8.
- [14] 韦悦. 氮素形态对颠茄生长及托品烷类生物碱代谢的调控研究 [D]. 成都: 西南大学, 2017.
- [15] 方华舟, 肖习明. 不同氮源对蛹虫草主要活性成分的影响及规律研究 [J]. 荆楚理工学院学报, 2016, 49(6): 5-10.
- [16] 毕宇. 前体和诱导子对黄芩悬浮细胞生物量积累及黄芩苷含量的影响 [D]. 齐齐哈尔: 齐齐哈尔大学, 2016.
- [17] 田成利. 美国红栎组培快繁体系的研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.
- [18] 刘明丽. 干旱胁迫下氮素对玉米生理特性的影响 [D]. 济南: 山东师范大学, 2016.
- [19] 张巫军. 氮素对水稻抗倒伏性的影响及其生理机制 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [20] 刘会玲, 崔江慧, 常金华. 氮素调控对边际土地甜高粱养分吸收和效益的影响 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(18): 72-75.
- [21] Sae L N, Kerdchoechuen O, Laohakunjit N. Enhancement of phenolics, resveratrol and antioxidant activity by nitrogen enrichment in cell suspension culture of *Vitis vinifera* [J]. *Molecules*, 2014, 19(6): 7901-7912.
- [22] 罗永明. 氮源对鸡骨草生长和药材质量影响的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2006.
- [23] 刘军, 陈显化, 金朝霞, 等. 氮源和磷源对金铁锁毛

- 状根悬浮培养的影响 [J]. 大连工业大学学报, 2013, 32(6): 409-412.
- [24] 刘国英. 供氮水平调控番茄低温耐性的机理研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [25] 祁瑜, 黄永梅, 王艳, 等. 施氮对几种草地植物生物量及其分配的影响 [J]. 生态学报, 2011, 31(18): 5121-5129.
- [26] 董瑜皎. 覆膜综合栽培技术对西南丘陵区水稻产量、土壤水热过程和作物氮素利用的影响机理 [D]. 北京: 中国农业大学, 2019.
- [27] 周伟. 丹参叶遗传转化体系的建立及 HMGR 基因 3' 片段的克隆 [D]. 上海: 上海师范大学, 2007.
- [28] 孙晶, Jing S, 杨洪一, 等. 不同因子对药用植物毛状根产量和次生代谢产物积累影响的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(11): 945-952.
- [29] 李博华, 张汉明, 丁如贤, 等. 四倍体菘蓝毛状根培养系统的建立及外界因子对其生长的影响 [J]. 中草药, 2000, 31(2): 132-134.
- [30] 翟双星, 冯杰, 唐庆九, 等. 复合有机氮源对灵芝三萜液态深层发酵的影响 [J]. 菌物学报, 2019, 37(12): 409-412.
- [31] Bo L, Wang B Q, Li H Y, *et al.* Establishment of *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib hairy root cultures and the promotion of tanshinone accumulation and gene expression with Ag⁺, methyl jasmonate, and yeast extract elicitation [J]. *Protoplasma*, 2016, 253(1): 87-100.
- [32] Guo K, Liao P, Xu H, *et al.* Molecular mechanism of elicitor-induced tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34(4): 1421-1433.
- [33] Wang Y, Shen Y, Shen Z, *et al.* Comparative proteomic analysis of the response to silver ions and yeast extract in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016: S0981942816302583.
- [34] Mingyu H, Wanli G, Zongsuo L, *et al.* Effects of cerous nitrate on growth and tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *J Rare Earths*, 2015, 33(11): 1228-1235.