

茉莉酸甲酯与水杨酸对肉苁蓉悬浮细胞中苯乙醇甙合成的影响 Effects of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on Phenylethanoid Glycosides Synthesis in Suspension Cultures of *Cistanche deserticola*

徐亮胜^{1,2}, 薛晓锋³, 付春祥¹, 金治平¹, 陈毓荃², 赵德修^{1*}

XU Liang-Sheng^{1,2}, XUE Xiao-Feng³, FU Chun-Xiang¹, JIN Zhi-Ping¹, CHEN Yu-Quan² and ZHAO De-Xiu^{1*}

1. 中国科学院植物研究所, 北京 100093

2. 西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100

3. 中国农科院蜜蜂研究所检测中心, 北京 100093

1. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

2. College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling 712100 China

3. Institute of Apiculture Research, Chinese Academy of Agriculture & Science, Beijing 100093, China

摘 要 向肉苁蓉悬浮细胞培养系中添加茉莉酸甲酯(MJ)和水杨酸(SA), 分别考察了这两种诱导子的添加浓度及添加时间对肉苁蓉悬浮细胞系中苯乙醇甙含量的影响。研究表明: MJ 和 SA 能够促进肉苁蓉悬浮细胞系中苯乙醇甙(PeG)和松果菊甙(Echinacoside)的合成, 但两者的适用的浓度范围和最佳添加时间存在差异。与未经诱导子处理的细胞培养结果相比, MJ 在对数生长初期(培养 14d), 添加浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 条件下, 可使肉苁蓉悬浮细胞系中 PeG 含量提高 2.59 倍, Echin 含量提高 3.82 倍; 而 SA 在对数生长后期(培养 28d), 添加浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 条件下, 可使 PeG 含量提高 2.71 倍, Echin 含量提高 3.16 倍。

关键词 肉苁蓉, 细胞悬浮培养, 诱导子, 苯乙醇甙, 松果菊甙

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0402-05

Abstract The present study investigated the influence of the methyl jasmonate and salicylic acid elicitors on the formation of phenylethanoid glycosides (PeG) in the suspension cultures of *Cistanche deserticola*. The results showed that methyl jasmonate and salicylic acid enhanced greatly the accumulation of PeG and echinacoside (Echin), but their optimum elicitation dosage and addition time were different. The yields of PeG and Echin were significantly increased in the presence of 5 $\mu\text{mol/L}$ methyl jasmonate on day 14 (up to 2.59-fold and 3.82-fold, respectively), whereas treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ salicylic acid on day 28, the maximum content of them were, respectively, 2.71 and 3.16-fold higher than the untreated cell cultures.

Key words *Cistanche deserticola*, suspension cultures, elicitor, phenylethanoid glycosides, echinacoside

肉苁蓉 (*Cistanche deserticola* Ma.) 是列当科肉苁蓉属植物, 具滋肝补肾, 益精血, 润肠通便之功效, 是名贵的中药材, 素有“沙漠人参”之称^[1]。药理学研

究表明, 肉苁蓉的主要活性成分为苯乙醇甙类化合物, 其中松果菊甙、洋丁香酚甙、2-乙酰洋丁香酚甙等对抗衰老和增强记忆功能具有显著疗效^[2,3]。当

Received: December 23, 2004; Accepted: March 4, 2005.

* Corresponding author. Tel: 86-10-62836201; E-mail: zhaodx@ibcas.ac.cn

前,随着人类对肉苁蓉掠夺性开发,有限的野生资源已不能满足人们的需求。虽然人工栽培已获得成功,但受寄主植物的数量,分布与根系发育等条件的制约,其发展空间非常有限^[4]。目前,利用细胞工程技术生产药用植物有效成分,具有高效迅速、资源和季节限制性小以及保护生态环境等优点,日益受到人们关注。因此,通过植物细胞工程技术生产肉苁蓉的有效成分,成为一种切实可行的方法。

目前,国内关于肉苁蓉的组织培养研究报道比较多,已建立起稳定的愈伤组织培养体系^[5,6],为工业化生产提供了可行的依据。诱导子作为一种特殊的生化信号,在植物次生代谢过程中,能快速、专一和有选择地诱导某些特定基因的表达,从而调节细胞中次生代谢产物的合成^[7]。因此,通过向肉苁蓉悬浮细胞系中添加诱导子,能够进一步提高培养物中苯乙醇甙的含量,从而降低肉苁蓉生产成本,满足工业化生产的要求。茉莉酸甲酯(MJ)和水杨酸(SA)是两种非常有效的诱导子,已在多种药用植物细胞培养中使用,效果显著^[8-10]。但在肉苁蓉悬浮细胞的研究中尚未见诸报道。因此,本研究分别使用MJ和SA处理肉苁蓉悬浮细胞,考察了两种诱导子在不同浓度范围和添加时间对肉苁蓉悬浮细胞系中苯乙醇甙及松果菊甙合成的影响。

1 材料和方法

1.1 植物材料及培养条件

新鲜肉苁蓉采自内蒙古阿拉善盟,由内蒙古大学曹瑞教授鉴定。肉苁蓉愈伤组织由本实验室诱导选育。将在B5固体培养基上稳定继代两年的愈伤组织培养20d后,转入含有20mL MS培养液的100mL的三角瓶中进行悬浮培养,摇床转速为100 r/min,培养温度为 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$,光强为 $45\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$ 。接种量约为鲜重100g/L,培养液中附加 GA_3 10mg/L, BA 0.5mg/L, CH 800 mg/L, 2.5%蔗糖, pH 6.0(灭菌前)。每隔32d继代一次。

1.2 诱导子的准备及添加

茉莉酸甲酯购自Sigma公司,以吐温为助剂,配制浓度为 $40\mu\text{mol}/\text{mL}$ (助剂浓度为 $0.25\mu\text{L}/\text{mL}$)的母液,过滤灭菌(滤膜孔径为 $0.2\mu\text{m}$)。水杨酸购自Sigma公司,用蒸馏水溶解,母液浓度为 $40\mu\text{mol}/\text{mL}$,高压灭菌。在培养0d时,向肉苁蓉悬浮细胞培养系中分别添加浓度为0、1、5、10、 $20\mu\text{mol}/\text{L}$ 的MJ,以确定MJ最佳添加浓度。然后以此最佳浓度分别在肉苁蓉细胞生长的不同时期即0 d(培养开始)、7 d(延

迟期中期)、14 d(对数生长初期)、21 d(对数生长期中期)、28 d(对数生长期后期)添加,以确定MJ添加的最佳时间。SA的添加方法同MJ,添加浓度为0、10、50、100、 $200\mu\text{mol}/\text{L}$,添加时间分别为0、7、14、21、28 d。

1.3 悬浮细胞生长的测定

悬浮细胞每4d收获1次,用蒸馏水冲洗3遍,减压抽滤至不滴水后称鲜重(FW),然后于 60°C 下烘干至恒重,记录细胞干重(DW)。

1.4 苯乙醇甙含量的测定

苯乙醇甙的提取和含量测定方法参照文献[11]。将烘干样品研磨,用70%的乙醇回流3次,干细胞:乙醇液为1:10(W/V),减压浓缩至浸膏状,用蒸馏水混悬,过大孔树脂。甲醇洗脱液的全波长紫外吸收图谱与文献[11]一致,在333 nm处有最大吸收。松果菊甙标准品由清华大学郭志刚教授惠赠。测得其标准曲线为: $c = 0.05913A - 0.00913$ ($r = 0.9994$),其中c为苯乙醇甙浓度(单位:mg/L)A为吸光度,曲线适用浓度范围3.5~21 mg/L。

1.5 松果菊甙含量的测定

取1mL苯乙醇甙提取液,定容至5mL,用于松果菊甙的HPLC测定。HPLC分析系统为Waters,检测波长333nm,色谱柱为SymmetryC₁₈(4.6mm×250 mm, $5\mu\text{m}$),进样体积为 $10\mu\text{L}$,流动相为甲醇-水(水相含1.5%的乙酸),柱温: 30°C ;流速: $1.0\text{mL}/\text{min}$;洗脱梯度: $20\% \xrightarrow{2\text{min}} 30\% \xrightarrow{6\text{min}} 35\% \xrightarrow{10\text{min}} 40\% \xrightarrow{20\text{min}} 50\% \xrightarrow{10\text{min}} 80\%$ 。

2 结果

2.1 悬浮细胞生长与苯乙醇甙积累的动态变化

悬浮培养细胞的生长周期约为36d,初期生长缓慢,12d后生长速度增加,至28d左右生长速度开始降低,32d达到最大生物量(图1)。整个生长周期内苯乙醇甙(PeG)含量变化不大。在细胞培养前期阶段,PeG含量逐渐降低,到8d为最低,然后随着细胞的迅速生长而逐渐升高,32d以后达到最高,为 $23.97\text{mg}/\text{g}(\text{DW})$ 。

2.2 茉莉酸甲酯对肉苁蓉悬浮细胞中苯乙醇甙合成的影响

2.2.1 茉莉酸甲酯添加浓度的影响:与对照相比(吐温单独添加,对细胞的生物量和PeG含量无显著影响),MJ在1~ $10\mu\text{mol}/\text{L}$ 范围内,细胞干重随着浓度的增加逐渐降低,但下降幅度不大($<10\%$,图

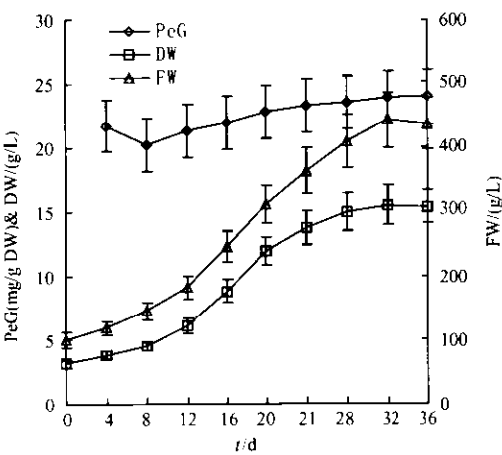


图1 悬浮细胞生长及苯乙醇甙的动态变化
Fig.1 Kinetics of growth and accumulation of PeG content in suspension cultures of *C. deserticola*.

Values are means of triplicate results and bars represent standard errors of the means.

2)。当浓度为 $10\mu\text{mol/L}$ 时,细胞干重降为对照的 90.5%。当浓度为 $20\mu\text{mol/L}$ 时,在添加后 3 d,培养基出现浑浊,细胞逐渐褐化死亡。这说明 $1\sim 10\mu\text{mol/L}$ 为 MJ 的添加适用范围。当浓度为 $5\mu\text{mol/L}$, PeG 含量 (37.77mg/g DW) 和 Echin 含量 (18.84mg/g DW) 达到最高,分别为对照的 1.82 倍和 3.37 倍。这说明 Echin 和 PeG 的变化趋势是一致的。因此,确定 $5\mu\text{mol/L}$ 为 MJ 的最佳添加浓度。

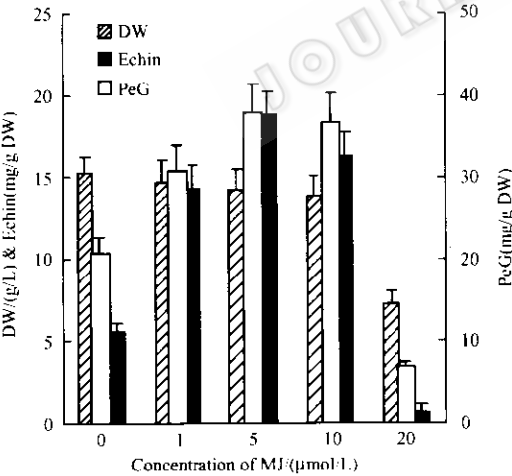


图2 不同浓度的茉莉酸甲酯对悬浮细胞的影响
Fig.2 Effect of different concentrations of methyl jasmonate on dry cell weight, PeG content and Echinacoside content in suspension cultures of *C. deserticola*

The cell were harvested on day 32. Values are means of triplicate results and bars represent standard errors of the means.

2.2.2 茉莉酸甲酯添加时间的影响: 不同培养时

间添加 MJ,影响细胞干重变化(图 3)。在 0d、7d 添加时,细胞干重分别为对照的 92.7% 和 94.6%。而在 14d、21d、28d 添加,细胞干重与对照相比无显著变化。这与 Javier^[12] 等人的报道的结果相类似。而许多有关 MJ 诱导子的报道,认为其对细胞生物量有明显抑制^[13]。MJ 对 PeG 含量的影响根据细胞所处的生长时期密切相关。在 14d 添加 $5\mu\text{mol/L}$ 的 MJ, PeG 含量 (51.89mg/g DW) 达到最高,为对照的 2.57 倍。此时, Echin 含量 (21.57mg/g DW) 达到对照的 3.82 倍。早于或晚于 14d 添加,其诱导效果都比较差。鲁明波等^[14] 在红豆杉细胞培养的 0d、10d、20d 加入不同的真菌诱导子,发现在细胞指数生长初期(10d)加入真菌诱导子最好,过早(0d)加入引起细胞发生强烈的过敏反应,细胞生长受到抑制,紫杉醇合成量并不高,而在 20d 加入诱导子又显得太迟,紫杉醇合成量基本没有增加。这也说明添加时间的不同可以影响细胞次生代谢物的合成。

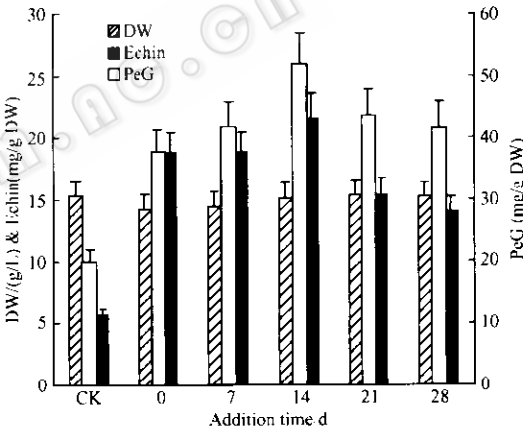


图3 不同添加时间茉莉酸甲酯对悬浮细胞的影响
Fig.3 Effect of the differen addition time of methyl jasmonate on dry cell weight, PeG content and Echinacoside content in suspension cultures of *C. deserticola*

CK, untreated cell line. The cell were harvested on day 32. Values are means of triplicate results and bars represent standard errors of the means.

2.3 水杨酸对肉苁蓉悬浮细胞中苯乙醇甙合成的影响

2.3.1 水杨酸添加浓度的影响:与对照相比,SA 在 $10\sim 100\mu\text{mol/L}$ 范围内,细胞干重随着添加浓度的增加,明显下降,而 PeG 和 Echin 含量都逐渐升高(图 4)。当浓度为 $100\mu\text{mol/L}$ 时,细胞干重仅为对照的 76.8%。PeG 含量 (41.58mg/g DW) 和 Echin 含量 (10.74mg/g DW) 同时达到最高,分别为对照的 2.01 倍和 1.92 倍。当浓度为 $200\mu\text{mol/L}$ 时,细胞在加入诱导子后细胞逐渐褐化死亡。这说明 SA 在 $10\sim$

100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,虽然诱导效果逐渐提高,但对细胞的毒害也逐渐加强,造成细胞干重明显下降。因此,要获得较好的诱导效果,必须寻求细胞生物量的下降与 PeG 含量的提高之间的平衡点。当 SA 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,虽然细胞中 PeG 含量达到最高,可是干重明显下降,结果产量不如浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时高。因而,确定 50 $\mu\text{mol/L}$ 为 SA 的最佳添加浓度。

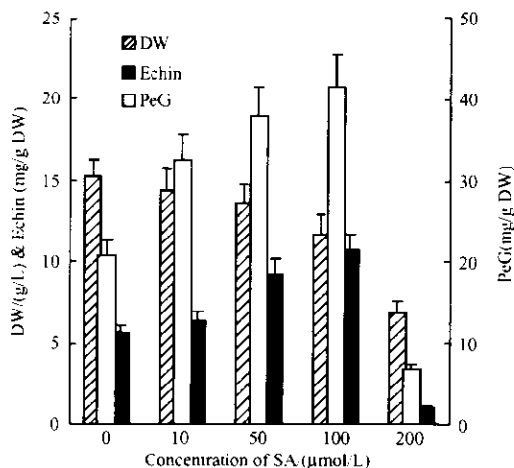


图4 不同浓度的水杨酸对悬浮细胞的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of salicylic acid on dry cell weight, PeG content and Echinacoside content in suspension cultures of *C. deserticola*

The cell were harvested on day 32. Values are means of triplicate results and bars represent standard errors of the means.

2.3.2 水杨酸添加时间的影响: 不同培养时间添加 SA, 影响细胞干重变化(图 5)。在 28d 时加入 SA, 细胞干重达到对照的 95.5%, 但比前面三个时期处理的细胞干重高。这可能由于加入 SA 前, 细胞的生长量已达到一定程度。同时由于后期细胞次生代谢活动的增强, 抵抗外源诱导子毒害能力也增强, 从而使 SA 对细胞的毒害减轻。PeG 和 Echin 含量也随着 SA 添加时间的延后, 逐渐升高。在 28d 时添加, PeG 含量(54.61 mg/g DW)达到最高, 是对照的 2.71 倍。而 Echin 含量(17.85mg/g DW)在 21d 添加时与 28d 添加时相等, 均为最高, 是对照的 3.15 倍。

3 讨论

MJ 和 SA 均可作为植物防御反应的信号分子, 诱导植物中与抗逆有关的多种次生代谢物的积累^[15,16]。在 MJ 和 SA 添加研究中, 诱导子处理刺激培养物合成次生产物的效果受诱导子种类、浓度及添加时间等因素的影响。本研究结果表明, MJ 和

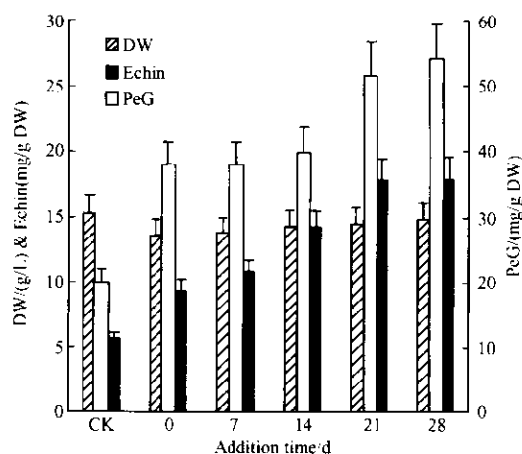


图5 不同添加时间水杨酸对悬浮细胞的影响

Fig.5 Effect of the different addition time of salicylic acid on dry cell weight, PeG content and Echinacoside content in suspension cultures of *C. deserticola*.

CK, untreated cell line. The cell were harvested on day 32. Values are means of triplicate results and bars represent standard errors of the means.

SA 对肉苁蓉细胞中 PeG 积累的诱导效果明显。但是, 两者的最佳适用浓度范围存在差异。MJ 适用的浓度范围较低(1~10 $\mu\text{mol/L}$), 对肉苁蓉悬浮细胞毒害较小, 细胞干重变化不显著(<10%)。而 SA 适用的浓度范围较高(10~50 $\mu\text{mol/L}$), 对细胞的毒害比较大, 细胞干重降低明显(>10%)。从诱导效果来看, MJ 诱导细胞合成 PeG 的效果比 SA 差, 而它诱导合成 Echin 的效果比 SA 好。因此, 进一步考察 MJ 和 SA 之间的协同作用, 有可能取得 PeG 和 Echin 含量同时提高的效果。

另外, 诱导子作用的效果还依赖于培养细胞的生理状态, 只有处于一定生长时期的细胞才能有效地接受诱导信号, 此时诱导子表现为最高活性^[17]。本实验中, MJ 在 14d(对数生长初期)添加对 PeG 合成影响效果最好, 而 SA 则在 28d(对数生长后期)添加效果最好。这说明在对数生长初期, 肉苁蓉细胞接受 MJ 信号的能力最强, 在对数生长后期接受 SA 信号的能力最强。其有关机理尚待进一步研究。

致谢: 肉苁蓉材料由曹瑞教授采集并鉴定, 松果菊甙标准品由清华大学郭志刚教授惠赠, 特此致谢!

REFERENCES(参考文献)

- [1] Jiang Su New Medical College Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大词典), Shanghai: Shanghai people's Publisher, 1977
- [2] Zhang LH(张雷红), Du NS(堵年生). A review of the studies on chemical constituents of *Cistanche deserticola*. *Chinese Traditional Patent Medicine*(中成药), 2003, 25(4): 323-327

- [3] Muteliefu G(木特列夫·古力努尔), Lei L(雷丽), Tu PF(屠鹏飞) *et al.* Study on molecular mechanism of echinacoside for against aging. *Acta Biophysica Sinica*(生物物理学报), 2004, **20** (3): 183 - 187
- [4] Li S(李森), Wu X(吴新), Dong XC(董效成) *et al.* Callus culture of *Cistanche deserticola*. *China Journal of Northwest Pharmaceutics* (中国西北药学杂志), 1998, **13**(3): 103 - 104
- [5] Ouyang J, Wang XD, Zhao B *et al.* Formation of phenylethanoid glycosides by *cistanche deserticola* callus grown on solid media. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**: 223 - 225
- [6] Li S(李森), Wu X(吴新), Dong XC(董效成) *et al.* Effect of elicitor of *cistanche deserticola* callus. *China Journal of Northwest Pharmaceutics* (中国西北药学杂志), 1998, **13**: 247 - 248
- [7] Liu CJ(刘长军), Hou CS(侯嵩生). Regulation of fungal elicitor on the cell growth and biosynthesis of sapanin of panax Ginseng cell suspension culture. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*(实验生物学报), 1999, **32**(2): 169 - 174
- [8] Wang YD, Yuan YJ, Wu JC. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, **19**: 259 - 256
- [9] Qiu Y(仇燕), Jia N(贾宁), Wang L(王丽) *et al.* Progress of studies on elicitor's application in taxal production in *Taxus* cell cultures. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 2003, **20** (2): 184 - 189
- [10] Kang SM, Jung HY, Kang YM *et al.* Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science*, 2004, **166**: 745 - 751
- [11] Du NS (堵年生), Liu JL (刘峻岭). Determination of phenylethanoid glycosides in *Cistanche deserticola* by macroreticular resin spectrophotometry. *Nature Product Research and Development* (天然产物研究与开发), 1993, **5**(3): 30 - 33
- [12] Javier P, Tosa MC, Mercedes B *et al.* Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2003, **41**: 1019 - 1025
- [13] Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y *et al.* Methyl jasmonate induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnology*, 1996, **14**: 1129 - 1132
- [14] Lu MB(鲁明波), Su X'E(苏湘鄂), Mei XG(梅兴国). Effect of fungal elicitors on the cell suspensions of *Taxus Chinensis*. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. (华中理工大学学报), 1998, **26**(7): 107 - 109
- [15] Szabo E, Thelen A, Petersen M *et al.* Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports*, 1999, **18**: 484 - 489
- [16] Jirase D, Tootle TL, Reuber TL *et al.* *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 1999, **96**: 13583 - 13588
- [17] Liu CJ(刘长军), Hou CS(侯嵩生). Effects of fungal elicitors on the cell growth and the shikonin biosynthesis in *Arnebia euchroma* cells in suspension culture. *Acta Phytophysiologica Sinica* (植物生理学报), 1998, **24**(1): 6 - 10