

不同附加物对甘草愈伤组织培养中黄酮类化合物形成的影响

杨世海¹, 刘晓峰², 果德安³, 郑俊华³ (1. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2. 吉林亚泰(集团)股份有限公司, 长春 130031; 3. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘要:目的 研究了酵母提取物、水解酪蛋白、真菌诱导子、茉莉酸及稀土元素等对甘草愈伤组织中甘草黄酮类化合物合成的影响。方法 在培养基中添加各种附加物, 研究其对甘草黄酮类化合物合成的影响。结果 0.1%的酵母提取物可使培养物中黄酮类化合物的含量提高 76.8%, 甘草查尔酮含量比对照提高 7.5 倍。水解酪蛋白在 0.05% 时, 培养物中黄酮类化合物含量达最大值, 为对照的 1.7 倍, 其中甘草查尔酮的含量在 0.1% 时最高, 为对照的 3.2 倍。50 mL 培养基中加入真菌诱导子 2 mL, 甘草培养物中黄酮类化合物的含量为 149.58 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 比对照(85.26 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)增加 75%。10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 茉莉酸使黄酮类化合物的含量比对照提高了 41%。低浓度的稀土元素 Eu^{3+} 对黄酮类化合物的生物合成具有明显的促进作用, 培养基中添加 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的稀土元素 Eu^{3+} 最有利于黄酮类化合物的积累。此时, 黄酮类化合物的含量为对照的 2.7 倍, 其中甘草素的含量是对照的 4 倍。结论 在甘草愈伤组织培养过程中, 添加酵母提取物、水解酪蛋白、真菌诱导子、茉莉酸及稀土元素等是提高黄酮类化合物的有效手段之一。

关键词:甘草; 愈伤组织; 酵母提取物; 水解酪蛋白; 真菌诱导子; 茉莉酸; 稀土元素; 黄酮类化合物

中图分类号: R931.5 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494(2006)02-0096-04

Effects of Different Additives on Accumulation of Flavonoids in *Glycyrrhiza uralensis* Callus

YANG Shi-hai¹, LIU Xiao-feng², GUO De-an³, ZHENG Jun-hua³ (1. College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin Yatai (Group) Co. Ltd., Changchun 130031, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of yeast extract, casein hydrolysate, fungal elicitor, JA and rare-earth element Eu^{3+} on flavonoids production in *Glycyrrhiza uralensis* callus. **METHODS** The flavonoids content in *Glycyrrhiza uralensis* callus was analyzed by HPLC after different additives were administrated into culture medium. **RESULTS** 0.1% yeast extract resulted in 76.8% increase in the flavonoids accumulation, the licochalcone content was 7.5 times higher than that of control. The flavonoids content was 1.7 times as that of control when the concentration of casein hydrolysate was 0.05%, and the licochalcone content was 3.2 times as that of control when the concentration of casein hydrolysate was 0.1%. The highest flavonoids content of 149.58 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ was obtained with the addition of 2 mL fungal elicitor to the medium, which was 75% increased compared with the control. The JA concentration of 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was found to be the most suitable for the flavonoids accumulation with 41% higher than control. Flavonoids content was as 2.7 times as that of the control, and liquiritigenin was as 4 times as that of the control when the concentration of rare-earth element Eu^{3+} was 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. **CONCLUSION** The addition

化合物 9: 白色粉末。Molish 反应和 Liebermann-Burcard 反应阳性。与 β -胡萝卜素对照品对照, TLC 中 Rf 值及显色行为一致, 将其与 β -胡萝卜素对照品混合后熔点不下降。因此鉴定该化合物为 β -胡萝卜素 (β -daucosterol)。

REFERENCES

- [1] CHEN Z Y, XU P J and YAO T R. Chemical investigation of Chinese medicinal herb, Baogongteng III, Baogongteng B, C (study) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1986, 17(9): 2-3.
- [2] SONG W, JIN Y L and LIU J H. Studies on the chemical constituents of stems of *Erycibe schmidii* Craib [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22(6): 359-360.
- [3] CHENG Y X, ZHOU J and DING Z T. Phenolic constituents from *Manglietia crassipes* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2000, 22(3): 365-367.
- [4] KONG L Y, MIN Z D. Studies on chemical constituents of roots of *Euphorbia pelcinensis* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1996, 31(7): 524-529.
- [5] WANG Z J, ZHAO Y Y, TU G Z, et al. Studies on the chemical constituents from *Prunella vulgaris* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34(9): 679-681.
- [6] OKUYAMA T, SHIBATA S, HOSON M, et al. Effect of oriental plant drugs on platelet aggregation; III. Effect of Chinese Drug "xie bai" on human platelet aggregation [J]. *Planta Med*, 1986, 3: 171-174.
- [7] WANG M A, WANG M K, PENG S L. Chemical constituents from the barks of *Pteroceltis tatarinowii* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 13(6): 5-8.

(收稿日期: 2005-01-20)

作者简介: 杨世海, 男, 教授 Tel: (0431)4533308 Fax: (0431)4533304 E-mail: jlyangs@yahoo.com.cn

of yeast extract, casein hydrolysate, fungal elicitor, JA and rare-earth element Eu^{3+} to the medium are effective approaches to enhance flavonoids accumulation in *G. uralensis* calli.

KEY WORDS: *Glycyrrhiza uralensis*; callus; yeast extract; casein hydrolysate; fungal elicitor; jasmonic acid; rare-earth element; flavonoids

甘草为豆科植物甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.), 胀果甘草 (*G. inflata* Bat.) 或光果甘草 (*G. glabra* L.) 的干燥根及根茎, 为常用中药, 别称“国老”。甘草主要有效成分为三萜和黄酮类化合物。中医认为具有补脾益气, 清热解毒, 祛痰止咳, 缓急止痛, 调和诸药之功效。甘草中的黄酮类物质具有较强的生物活性。现代药理学研究发现甘草黄酮类对肿瘤、胃溃疡和肝损伤等具有多方面的疗效^[1]。甘草组织培养仅限于愈伤组织诱导与分化的研究报告^[2-3]。有关利用甘草组织培养生产黄酮类成分及影响因素的研究, 笔者未见国内外报道。植物次生产物的合成具有全能性和多条代谢途径^[4], 因而通过培养条件的调控, 可以定向诱导目的产物的合成。本研究旨在探讨甘草细胞培养生产黄酮类化合物的调控因子, 为进一步开展甘草细胞悬浮培养和大量培养提供可靠的参数指标。

1 材料与方法

1.1 无菌材料的准备

甘草种子由北京时珍中草药研究所提供, 经北京医科大学郑俊华教授鉴定为 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 种子, 置 4 °C 冰箱中保存备用。

挑选充实饱满的甘草种子, 用砂磨破种皮, 自来水冲洗 30 min, 0.1% HgCl_2 溶液浸 12 ~ 15 min, 用无菌水冲洗 4 ~ 5 次, 再用灭菌滤纸吸干种子表面水分, 接种在 MS0 (不添加激素) 琼脂培养基上, 置于 25 °C, 光照 12 h·d⁻¹ 的条件下培养, 3 d 后种子伸出胚根, 待生长 2 周后, 苗高 3 ~ 4 cm 时, 即可作为外植体材料。

1.2 愈伤组织诱导

将无菌苗下胚轴切成 0.5 cm 的小段, 在无菌条件下接种于诱导培养基上 (MS + BA 0.2 mg·L⁻¹ + NAA 2 mg·L⁻¹ + 3% 蔗糖 + 0.75% 琼脂), pH 5.8, 25 °C, 光照 12 h·d⁻¹ 条件下培养。每 25 d 继代培养一次。

1.3 愈伤组织培养

根据不同实验要求, 按各项处理方法进行, 取继代培养 6 代以上的愈伤组织进行各项实验, 此时愈伤组织较为均匀一致。将愈伤组织于灭菌培养皿内均匀切成若干小堆, 分别接种到盛有 25 mL 琼脂培养基的 50 mL 三角瓶中, 每瓶接种愈伤组织 1.5 g

(鲜重)。愈伤组织培养 30 d 后收获, 置于 60 °C 烘箱中烘干至恒重, 称其干重。实验均重复 3 次。

1.4 实验设计

1.4.1 酵母提取物实验 培养开始时, 在培养基中加入不同量的酵母提取物, 使溶液终浓度分别为 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%, 以不加酵母提取物的培养基为对照。

1.4.2 水解酪蛋白实验 培养开始时, 在培养基中加入不同量的水解酪蛋白, 使溶液终浓度分别为 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%, 以不加水解酪蛋白的培养基为对照。

1.4.3 真菌诱导子实验 真菌诱导子制备: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 接种于马铃薯葡萄糖液体培养基中 (每升培养基中含葡萄糖 2 g, 20% 马铃薯浸汁 100 mL), 于普通摇床上 110 r·min⁻¹, 25 °C, 暗培养 6 d 收获。悬浮培养的菌球抽滤, 加入 10 倍体积的蒸馏水, 匀浆, 匀浆液于高压灭菌锅 (121 °C) 中处理 20 min, 抽滤, 滤液即为真菌诱导子。采用苯酚-硫酸法测定其总糖含量, 以葡萄糖为标准样品。培养开始时, 真菌诱导子以每 50 mL 中含 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL 培养基的浓度分别加入到培养基中, 以不加真菌诱导子的培养基为对照。

1.4.4 茉莉酸实验 培养开始时, 茉莉酸以 0.1, 1.0, 10, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度分别加入到培养基中, 以不加茉莉酸的培养基为对照。

1.4.5 稀土元素实验 培养开始时, 稀土元素以 0.000 1, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 mg·L⁻¹ 的浓度分别加入到培养基中, 以不加稀土元素的培养基为对照。

1.5 黄酮化合物的 HPLC

1.5.1 黄酮类化合物的提取 准确称取干燥样品粉末 1.0 g, 置 10 mL 具塞试管中, 每次加 10 mL 氯仿, 置超声波提取 3 次, 时间分别为 90, 60, 30 min, 过滤, 合并 3 次滤液, 回收溶剂, 用甲醇溶解残渣, 在 10 mL 量瓶中定容, 用脂溶性微孔滤膜过滤, 备用。

1.5.2 标准溶液配制 精密称取甘草素 (A)、异甘草素 (B)、甘草苷 (C)、异甘草苷 (D)、甘草查尔酮 (E) 对照品各 10 mg, 分别溶于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 作为测试标准溶液, 甘草黄酮类化合物标准品由北京大学药学院张如意教授提供。

1.5.3 HPLC 色谱条件 Waters Millennium 2010HPLC

系统, Shim-Pack CLC-ODS(6 mm × 150 mm) 色谱柱, 流动相为 A: 3% 醋酸水溶液; B: 100% 乙腈, 梯度洗脱, 检测波长: A, C 组分 277.0 nm, B, D, E 组分 371.6 nm。

1.5.4 测定与分析 在“1.5.3”色谱条件下, 用 HPLC 测定各样品的峰面积, 根据回归方程计算甘草素、异甘草素、甘草苷、异甘草苷、甘草查尔酮的含量。

2 结果

2.1 酵母提取物对甘草愈伤黄酮类化合物合成的影响

酵母提取物对甘草愈伤黄酮类化合物合成的影响见图 1, 在培养基中添加酵母提取物对甘草愈伤组织细胞生长有轻微的抑制作用。但对黄酮类化合物的积累却有明显的促进作用, 其中 0.1% 的酵母提取物可使培养物中黄酮类化合物的含量提高 76.8%, 甘草查尔酮含量比对照提高 8 倍。

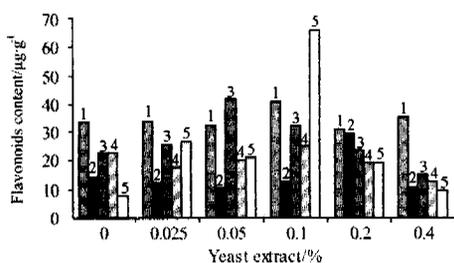


图 1 酵母提取物对甘草愈伤组织中黄酮类化合物合成的影响

1-甘草素; 2-异甘草素; 3-甘草苷; 4-异甘草苷; 5-甘草查尔酮

Fig 1 Effect of yeast extract on flavonoids production in *G. uralensis* callus

1 - liquiritigenin; 2 - isoliquiritigenin; 3 - liquiritin; 4 - isoliquiritin; 5 - licochalcone

2.2 水解酪蛋白对甘草愈伤黄酮类化合物合成的影响

水解酪蛋白对甘草愈伤黄酮类化合物合成的影响见图 2, 在所实验的浓度范围内, 水解酪蛋白均能促进甘草愈伤组织生长及黄酮类化合物的形成, 并在 0.05% 时达最大值, 培养物中黄酮类化合物含量是对照的 1.7 倍, 其中甘草查尔酮的含量在 0.1% 时最高, 为对照的 3.2 倍。

2.3 真菌诱导子对甘草愈伤组织黄酮类化合物合成的影响

真菌诱导子对甘草愈伤组织黄酮类化合物合成的影响见图 3, 诱导子用量不同, 诱导效果不同。甘草细胞对黑曲霉诱导处理的反应要求一最适的浓度范围。在 50 mL 培养基中加入真菌诱导子的最适浓度为 2 mL, 相当于每 1 mL 培养基含有 15 µg 碳水化

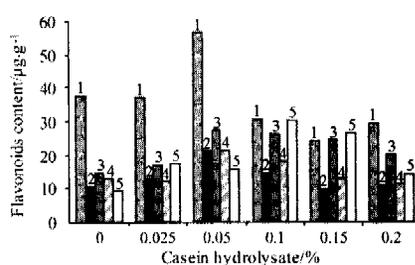


图 2 水解酪蛋白对甘草愈伤组织中黄酮类化合物合成的影响

1-甘草素; 2-异甘草素; 3-甘草苷; 4-异甘草苷; 5-甘草查尔酮

Fig 2 Effect of casein hydrolysate on flavonoids production in *G. uralensis* callus

1 - liquiritigenin; 2 - isoliquiritigenin; 3 - liquiritin; 4 - isoliquiritin; 5 - licochalcone

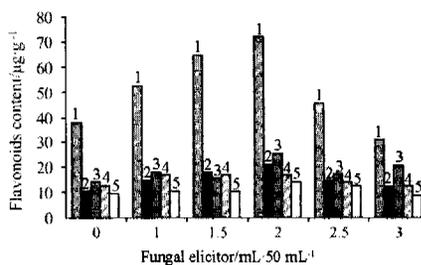


图 3 真菌诱导子对甘草愈伤组织中黄酮类化合物合成的影响

1-甘草素; 2-异甘草素; 3-甘草苷; 4-异甘草苷; 5-甘草查尔酮

Fig 3 Effect of fungal elicitor on flavonoids production in *G. uralensis* callus

1 - liquiritigenin; 2 - isoliquiritigenin; 3 - liquiritin; 4 - isoliquiritin; 5 - licochalcone

合物, 此时诱导子促进黄酮类化合物形成的作用最大, 甘草培养物中黄酮类化合物的含量为 149.58 µg·g⁻¹, 比对照(85.26 µg·g⁻¹)增加 75%, 低于或高于此浓度均不能最大程度地促进黄酮类化合物的生物合成。真菌诱导子对甘草愈伤组织生长有抑制作用, 生物量积累略有下降。

2.4 茉莉酸对甘草愈伤组织黄酮类化合物合成的影响

茉莉酸对甘草愈伤组织黄酮类化合物合成的影响见图 4, 茉莉酸对甘草培养细胞中黄酮类化合物的形成具有促进作用, 其中以 10.0 µmol·L⁻¹茉莉酸的作用最强。与对照相比, 5 种黄酮类化合物的含量提高了 41%。茉莉酸对甘草愈伤组织生物量积累有轻微的抑制作用。

2.5 稀土元素对甘草愈伤组织黄酮类化合物合成的影响

稀土元素对甘草愈伤组织黄酮类化合物合成的影响见图 5, 低浓度的稀土元素对甘草愈伤组织的生物量积累和黄酮类化合物的合成具有明显的促进作用。培养基中添加 0.1 mg·L⁻¹的稀土元素 Eu²⁺最有利于生物量的增长和黄酮类化合物的积累。此

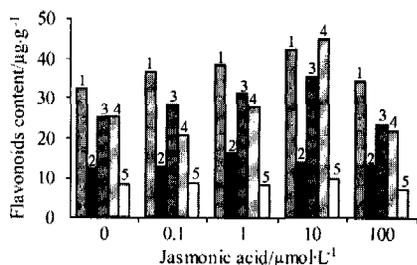


图4 茉莉酸对甘草愈伤组织中黄酮类化合物合成的影响
1-甘草素;2-异甘草素;3-甘草苷;4-异甘草苷;5-甘草查尔酮

Fig 4 Effect of JA on flavonoids production in *G. uralensis* callus
1 - liquiritigenin; 2 - isoliquiritigenin; 3 - liquiritin; 4 - isoliquiritin; 5 - licochalcone

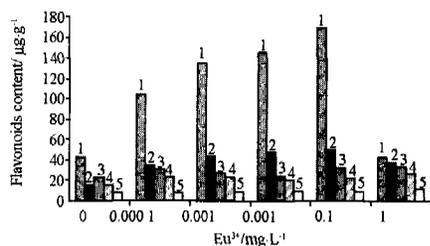


图5 稀土元素对甘草愈伤组织中黄酮类化合物合成的影响
1-甘草素;2-异甘草素;3-甘草苷;4-异甘草苷;5-甘草查尔酮

Fig 5 Effect of Eu^{3+} on flavonoids production in *G. uralensis* callus

1 - liquiritigenin; 2 - isoliquiritigenin; 3 - liquiritin; 4 - isoliquiritin; 5 - licochalcone

时,5种黄酮类化合物的含量为对照的2.7倍。其中甘草素的含量是对照的4倍。

3 讨论

在植物组织细胞培养合成次生代谢产物的研究中,附加物的添加常作为提高目的产物产量的一种手段。通过对外源附加物的筛选,研究甘草愈伤组织细胞次生代谢产物的积累和调控,有利于甘草愈伤组织细胞培养系统走向工业化。本实验研究了酵母提取物、水解酪蛋白、真菌诱导子、茉莉酸及稀土元素等附加物对甘草愈伤组织中甘草黄酮类化合物合成的影响。实验结果表明,在培养基中添加适宜浓度的上述各类附加物对甘草愈伤组织细胞中黄酮类化合物的合成均有明显的促进作用。

酵母提取物是一种化学成分不明的复杂的营养混合物,作为一种生物性诱导剂,通过活化苯丙烷类途径中的关键酶如苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸4-羟化酶(CA4H)和对-香豆酸-CoA 联结酶(4CL)等,而促使 *Cicer arietinum* L. 悬浮细胞中异黄酮的积累^[5]。由多种氨基酸组成的酪蛋白对植物组织和细胞培养是较好的复合营养物,有报道水解酪蛋白可显著提高裂叶茄(*Solanum laciniatum*)培养物中澳洲茄胺的含量^[6]。真菌诱导子是来源于真菌的一种确定的化学信号。在植物与真菌的相互作用中,能快

速、高度专一和选择性地诱导植物特定基因的表达,进而活化特定次生代谢途径,积累特定的目的次生产物^[7]。真菌诱导子使苯丙烷类途径中 PAL 等酶被活化,从而开启了苯丙烷类途径,加速了次生代谢物生物合成^[8]。茉莉酸和茉莉酸甲酯作为一类信号转导物,它们诱导 PAL 等一些酶的重新转录,最终导致次生代谢物的积累^[9]。低浓度的稀土元素 Eu^{3+} 对黄酮类化合物的合成具有明显的促进作用。这种促进作用可能与 CaM 有关,因低浓度稀土能激活依赖于 CaM 的各种酶的活性^[10-11]。

本实验研究中酵母提取物、真菌诱导子、茉莉酸等生物诱导子对黄酮类化合物的合成促进作用,其机制也可能是这些生物诱导子的添加与激活甘草细胞中苯丙烷类途径有关。生物诱导子活化该途径中的 PAL 的活性,并伴随 CA4H 和 4CL 被活化,从而开启了苯丙烷类途径,促进黄酮类化合物的生物合成。为了阐述生物诱导子的作用机制,对生物诱导子与苯丙烷类代谢途径的关键酶(PAL 等)及黄酮类化合物含量的关系,正在进一步研究中。

REFERENCES

- [1] JIA G S, JIA S S. Pharmacological activities of flavonoids from licorice [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 1998, 33(9): 513-516.
- [2] RUI H K, XIN X J, GU H F, et al. Tissue culture of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1986, (4): 54.
- [3] AN L J, LI F X, ZHANG J M, et al. Study on tissue cultures of legume plants [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1992, 34(10): 743-752.
- [4] LIANG Z, ZHENG G Z. The multiple pathways of respiratory metabolism and metabolic engineering in plant [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1994, 30(4): 290-292.
- [5] ENDRESS R. *Plant cell biotechnology* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1994: 216-223.
- [6] INDRZYANTO G, ERAWATI T. Effect of *L*-arginine, casein hydrolysate, banana powder and sucrose on growth and solasodine production in shoot cultures of *Solanum laciniatum* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1995, 43(3): 237-240.
- [7] NING W, CAO R Q. Regulation of fungal elicitors in plant secondary metabolism [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1993, 29: 321-329.
- [8] OUYANG G C, XUE Y L. Physiological role and regulation of phenylpropanoid metabolism in plant [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1988, (3): 9-16.
- [9] GUNDLACH H, MULLER M J, KUTCHAN T M, et al. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(6): 2389-2393.
- [10] CHANG Z Z. Studies on *in vitro* culture and active constituents of *Rhizomatous* transformed roots of *Rheum wittrochii* Lundser, *Rheum palmatum* L., *Cassia obtusifolia* L. [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Beijing Medical University* (北京医科大学博士论文) [D]. Beijing: Beijing Medical University, 1997.
- [11] YANG S H, LIU X F, GUO D A. Effect of rare-earth elements La^{3+} on growth of hairy roots and normal roots of *Rheum palmatum* and their yield of anthraquinone [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(10): 1171-1174.

(收稿日期:2005-01-06)