

黄芩愈伤组织培养条件的研究

王梦亮*, 任振兴, 刘滇生

山西大学现代化学研究所, 太原 030006

摘要:在暗培养条件下, 黄芩愈伤组织生长和次级代谢物合成的最佳培养条件: 在基本培养基 MS 中氮源浓度为 60 mmol/L ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 为 1:1), KH_2PO_4 1.5 mmol/L, 附加 80 g/L 蔗糖, 0.3 mg/L IAA, 2 mg/L 6-BA 和 200 mg/L 蛋白胨, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。培养 40 d 后收获愈伤组织生物量达 28.7 g/L, 总黄酮的含量为 354.6 mg/g, 黄芩苷的含量为 167.4 mg/g。并发现蔗糖作为一种最佳碳源, 在黄芩次级代谢物合成过程中起着至关重要的作用。

关键词:黄芩; 总黄酮; 黄芩苷; 愈伤组织培养

中图分类号: Q813.1+2

文献标识码: A

Studies on the Culture Condition of *Scutellaria baicalensis* Georgi Callus

WANG Meng-liang*, REN Zhen-xing, LIU Dian-sheng

Institute of Advanced Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: The optimal culture condition on the callus growth and the synthesis of the flavonoids and baicalin in the dark are as follows: MS culture medium, 60 mmol/L ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^- = 1:1$), 1.5 mmol/L KH_2PO_4 , 80 g/L sucrose, 0.3 mg/L IAA, 2 mg/L 6-BA and 200 mg/L peptone. When the callus was cultured in the dark for 40 days, the total biomass reached 28.7 g/L and the content of baicalin and total flavonoids reached up to 167.4 mg/g and 354.6 mg/g, respectively. Sucrose was found to be the optimal carbon source and played an important role in the synthesis of secondary metabolites.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; total flavonoids; baicalin; callus culture

黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 为唇形科多年生草本植物, 其根性寒味苦, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效^[1], 含数种黄酮苷, 黄芩苷 (baicalin) 是其主要有效成分。国内外研究结果已表明, 黄芩苷具有抑菌抗炎^[2]、抗 HIV-1 活性^[3,4]、抗氧化^[5]、抗变态反应^[6]和清除自由基^[7]等药理作用, 临床上可用来治疗支气管炎、肝炎、肝硬化、腹泻、恶性肿瘤、白血病等疾病^[8]。但由于临床上对黄芩药材的需求量大增, 黄芩野生资源破坏严重, 产量日趋下降, 有的产区种群已濒临灭绝^[9], 而黄芩人工栽培存在生活周期长、存活率低、农药残留超标和有效成分较低等弊端, 因此利用植物组织培养技术进行黄芩次级代谢产品的生产是解决目前供需矛盾的有效途径之一。

当前国内外对黄芩组织培养的研究主要集中在快繁技术和利用毛状根培养系统提高次级代谢产物

的产量, 如高山林等利用黄芩组织培养克隆化快速繁殖技术, 为保护黄芩的野生资源, 发展人工资源和探讨育种新途径奠定了基础^[10]。丁如贤等用组织培养的方法直接从黄芩茎段诱导丛生芽, 并通过诱导生根形成了完整植株^[11]。Kazutaka NK 等将发根农杆菌 ATCC 15834 含有的 Ri-质粒中的 T-DNA 片段整合到黄芩细胞上, 诱导出毛状根, 进行黄芩的毛状根培养, 从而提高黄芩的次级代谢产物的产量^[12]。但对黄芩次级代谢生物合成的研究尚少见报道。

本文系统研究了碳源、生长调节物质、氮源, 磷酸盐和有机添加剂对黄芩愈伤组织的生长量、总黄酮及其黄芩苷合成的影响, 旨在为工业化生产黄芩的黄酮类化合物提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 材料

黄芩愈伤组织 (实验室所筛选第八代的愈伤组织)。诱导与继代培养基均为: MS 培养基 [附加 0.2

收稿日期: 2006-04-19 接受日期: 2006-08-28

基金项目: 山西省攻关项目 (051039-4)

* 通讯作者 Tel: 86-351-7016101; E-mail: mLwang@sxu.edu.cn

mg/L 的吲哚乙酸 (IAA) 和 2 mg/L 的 6-乙酰基嘌呤 (6-BA)], 蔗糖 3%, 琼脂 0.8%, pH 5.8, 暗培养, (25 ± 1) °C, 培养周期为 40 d。

1.1.2 试剂

黄芩苷对照品 (中国药品生物制品检定所); 甲醇 [色谱纯, 中国医药 (集团) 上海化学试剂公司], 水 (重蒸馏水), 其余试剂均为 A. R. 级。

1.2 仪器

日本岛津 UV-120-02 型紫外分光光度计, 高效液相色谱仪 (waters, 2487 紫外检测器, Breeze 色谱工作站), SPX-250-GB 光照培养箱 (上海医疗器械厂), JY98-3 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝科器研究所)。

1.3 黄芩愈伤组织测试指标

鲜重增量 = 最终收获鲜重 - 接种量

干重增量 = 最终收获鲜重 - 接种量

1.4 黄芩愈伤组织中黄酮含量的测定

参考文献^[13,14], 精确称取在 60 °C 烘干至恒重的黄芩愈伤组织 0.3 g, 碾碎, 加 50% 乙醇 80 mL 超声 20 min, 然后定溶于 100 mL 容量瓶中, 再精密吸收上清液 2.0 mL 用 50% 乙醇定容至 10 mL 容量瓶中, 在 280 nm 处测吸光度值, 从标准曲线方程得出含量。

1.5 黄芩愈伤组织中黄芩苷含量的测定

1.5.1 HPLC 法^[1]

色谱柱, ODS 色谱柱 (4.6 × 150 mm, 大连依利特科学仪器有限公司), 流动相: φ (水: 甲醇: 磷酸) = 47:53:0.2, 检测波长: 280 nm, 柱温: 室温, 进样量 20 μL, 流速: 1 mL/min, 按外标法以峰面积计算供试品溶液中黄芩苷的含量。

1.5.2 黄芩愈伤组织提取液的制备

称取 0.3 g 黄芩愈伤组织干粉, 加 50% 乙醇 80 mL 超声破碎 20 min, 定容至 100 mL, 精密移取上清液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 微孔滤膜过滤后进样。

1.5.3 对照品溶液的制备

精密称取黄芩苷对照品适量, 用甲醇配成 0.12 mg/mL 溶液, 作为对照品溶液。

1.5.4 标准曲线制备

取 0.12 mg/mL 的对照品溶液, 按一定的比例用甲醇稀释成 120、60、48、38.4、30.7、18.4、11.0、2.6 μg/mL 的溶液, 各取 20 μL, 注入色谱仪, 记录色谱结果。以对照品溶液的浓度 C 为横坐标, 相应的峰面积 S 为纵坐标得回归方程: $S = 78776C -$

47513, $R = 0.9994$, 线性范围: 2.6 ~ 120 μg/mL。

2 结果与讨论

2.1 不同碳源对黄芩愈伤组织生长与次级代谢物合成的影响

表 1 不同碳源对黄芩愈伤组织生长和次级代谢物含量的影响

Table 1 Effects of carbon source on callus growth and the content of secondary metabolites

不同碳源 Carbon source	干重增量 Increment of dry weight (g/L)	总黄酮含量 Content of total flavonoids (mg/g)	黄芩苷含量 Content of baicalin (mg/g)
甘露醇	0	0	0
麦芽糖	3.13	24.2	未检出
葡萄糖	3.95	28.4	16.1
蔗糖	8.73	38.5	30.2

从表 1 可以看出, 无论对于黄芩愈伤组织的生长还是次级代谢物的含量而言, 蔗糖都是一种最佳碳源。

2.2 不同浓度的蔗糖对黄芩愈伤组织生长与次级代谢物合成的影响

图 1 显示, 随着培养基中蔗糖浓度的增加, 黄芩愈伤组织的生物量、黄芩苷的含量和总黄酮的含量都明显增加, 但高到 10% 时, 三者又都受到了抑制, 这可能与培养基中高的渗透压有关。就黄酮类化合物的合成情况而言, 在 2% 的蔗糖培养基中并不合成黄芩苷, 总黄酮的含量也很低, 而在 8% 的蔗糖培养基中, 总黄酮的含量达到最高, 其中黄芩苷的含量几乎是 3% 蔗糖中的 5 倍。因此, 增加蔗糖的浓度有利于黄酮化合物的合成, 且在一定范围内不影响黄芩愈伤组织的生长。

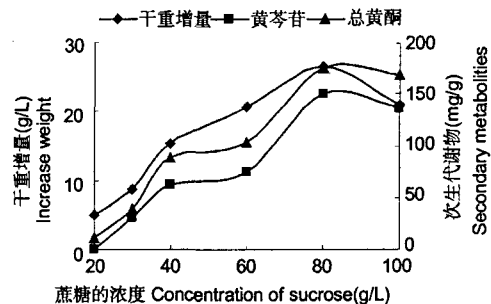


图 1 不同蔗糖浓度对黄芩愈伤组织生长和次级代谢物含量的影响

Fig. 1 Effects of sucrose concentrations on callus growth and the content of secondary metabolites

2.3 生长调节物质对黄芩愈伤组织生长与次级代谢物合成的影响

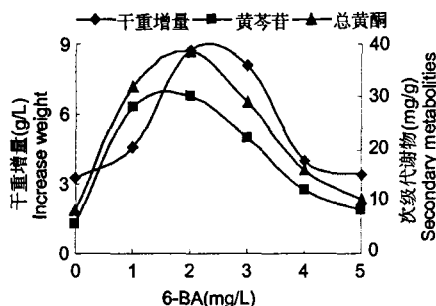


图2 不同浓度的6-BA对黄芩愈伤组织的生长和次级代谢物含量的影响

Fig. 2 Effects of concentrations of 6-BA on callus growth and the content of secondary metabolites

图2显示,当固定IAA的浓度为0.2 mg/L时,生物量随6-BA浓度的增大而明显增加,当6-BA高于2 mg/L时,其生长趋势又明显减弱。总黄酮及其黄芩苷的含量在6-BA为2 mg/L最高,其中黄芩苷的含量比6-BA浓度为3 mg/L时大将近40%,达到最大值(30.2 mg/g)。

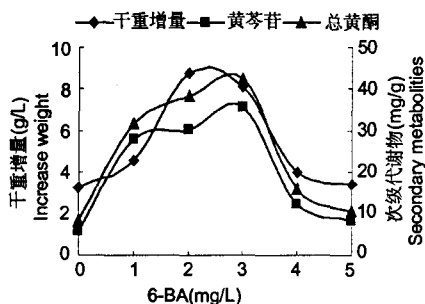


图3 不同浓度的IAA对黄芩愈伤组织生长和次级代谢物含量的影响

Fig. 3 Effects of concentrations of IAA on callus growth and the content of secondary metabolites

图3显示,当固定6-BA的浓度为2 mg/L时,生物量在不加IAA时很低,随IAA的浓度的增大而明显增加,IAA的浓度在0.2 mg/L时达到最大值,当浓度大于0.2 mg/L时,愈伤组织生长又受到明显抑制。总黄酮及其黄芩苷的含量则在浓度为0.3 mg/L时达到最大值,但随着IAA浓度的进一步增加出现减小的趋势。

2.4 氮源对黄芩愈伤组织生长与黄酮类化合物合成的影响

植物愈伤组织培养通常采用一定量的硝酸盐和

铵盐作为混合无机氮源,单独以铵盐或者硝酸盐为氮源,都对愈伤组织的生长和次级代谢物的生成不利,黄芩愈伤组织生长对 NH_4^+ 和 NO_3^- 的需求是有差别的,氮源对黄芩愈伤组织生长和黄酮类化合物合成的影响结果见表2。

从表2可以得出, $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 为1:1时,黄芩愈伤组织的生物量、总黄酮及其黄芩苷的含量均达到了最高。当固定 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 为1:1时,培养基中总氮浓度变化的影响结果见图4。

表2 NH_4^+ 和 NO_3^- 浓度比例对黄芩愈伤组织生长和次级代谢物含量的影响

Table 2 Effects of ratios of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ on callus growth and the content of secondary metabolites

$\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	干重增量 Increment dry weight (g/L)	黄酮含量 Content of flavonoids (mg/g)	黄芩苷含量 Content of baicalin (mg/g)
1:0	0	0	0
0:1	4.73	10.32	5.91
1:1	10.47	42.5	34.88
1:2	9.34	22.4	11.87
2:1	8.65	9.46	4.82

注:总氮浓度为50 mmol/L。
Note: Total nitrogen concentration 50 mmol/L.

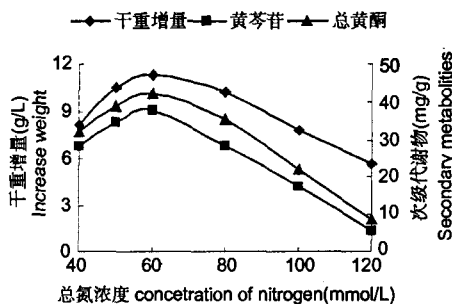


图4 总氮浓度对黄芩愈伤组织生长和次级代谢物含量的影响

Fig. 4 Effects of nitrogen concentrations on callus growth and the content of secondary metabolites

从图4可以看出,总氮浓度为60 mmol/L时,愈伤组织生长较好,总黄酮及其黄芩苷的含量均为最高;随着总氮浓度的增加二者又都出现明显的抑制,当总氮浓度达120 mmol/L时,黄芩愈伤组织的生长和次级代谢物的合成都明显受到抑制。据此认为,适宜的氮源浓度为60 mmol/L(其中 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 为1:1)。

2.5 磷酸盐对黄芩愈伤组织生长与黄酮类化合物合成的影响

从图5可以看出,当 KH_2PO_4 在小于0.5 mmol/

L时,愈伤组织生长量随着 KH_2PO_4 浓度的增加而迅速增大,在 0.5~2.5 mmol/L 之间时,增加幅度不大。总黄酮及其黄芩苷的含量在 1.5 mmol/L 时达到最大值,但随着 KH_2PO_4 浓度的增加出现了明显的抑制,因此, KH_2PO_4 的最佳浓度为 1.5 mmol/L。

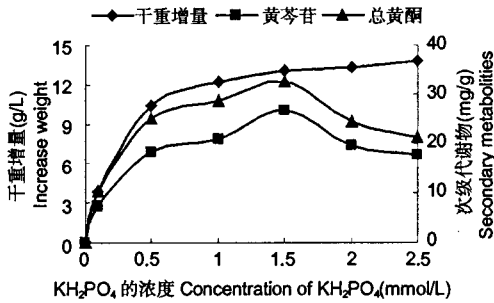


图5 不同浓度的 KH_2PO_4 对黄芩愈伤组织生长和次级代谢物含量的影响

Fig. 5 Effects of concentrations of KH_2PO_4 on callus growth and the content of secondary metabolites

2.6 有机添加物对黄芩愈伤组织生长与黄酮类化合物合成的影响

一般认为,加入一些有机添加物对愈伤组织的早期生长有利。为了考察有机添加物对黄芩愈伤组织生长和次级代谢物含量的影响,我们添加了牛肉膏、蛋白胨和酵母粉三种有机物,添加量为 200 mg/L,其结果见表 3。

表3 有机添加物对黄芩愈伤组织生长和次级代谢物含量的影响

Table 3 Effects of organic additives on callus growth and the content of secondary metabolites

有机添加物 Organic additive	干重增量 Increment of dry weight (g/L)	总黄酮含量 Content of flavonoids (mg/g)	黄芩苷含量 Content of baicalin (mg/g)
对照	8.73	38.5	30.2
牛肉膏	11.3	51.2	24.9
蛋白胨	12.1	48.9	27.4
酵母粉	6.33	18.4	9.04

表3表明,牛肉膏和蛋白胨对黄芩愈伤组织的生长比对照分别提高了 29.4% 和 38.6%,其总黄酮的含量比对照分别提高了 33.0% 和 27.0%,但酵母粉对黄芩愈伤组织生长和总黄酮的含量都有明显抑制作用,比对照分别减低了 27.5% 和 53.1%,这可能是因为其中含有某些抑制成分所致。但就黄芩苷的合成情况而言,三者都比对照有所降低,说明黄芩

苷和总黄酮积累的规律并不完全一样。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia (中国药典). Vol II. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2005. 211-212.
- 2 Hou YN (侯艳宁), Zhu XY (朱秀媛), Cheng GF (程桂芳). Study on the anti-inflammatory mechanism of baicalin. *Acta Pharm Sin*, 2000, 35: 161-164.
- 3 Kitamura K, Honda M, Yoshizaki H, et al. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production *in vitro*. *Antiviral Res*, 1998, 37: 131-140.
- 4 Li BQ, Fu T, Yao DY, et al. Flavonoid Baicalin Inhibits HIV-1 Infection at the level of viral entry. *Biochem Biophys Res Communications*, 2000, 276: 534-538.
- 5 Masataka Y, Keiko M. Interaction of iron with polyphenolic compounds application to antioxidant characterization. *Analyt Biochem*, 1998, 257: 40-44.
- 6 Shen YC, Chiou WF, Chou YC, et al. Mechanisms in mediating anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. *Europ J Pharm*, 2003, 465: 171-181.
- 7 Gao ZH, Huang KX, Yang XL, et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Bioch et Bioph Acta*, 1999, 1472: 643-650.
- 8 Zobayed S, Murch SJ, Rupasinghe H, et al. Optimized system for biomass production, chemical characterization and evaluation of chemo-preventive properties of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Plant Sci*, 2004, 167: 439-446.
- 9 Li X (李欣), Huang LQ (黄璐琦), Shao AJ (邵爱娟), et al. Study on *Scutellaria baicalensis* Georgi source. *World Sci Techn/Mod Tradit Chin Mat*, 2003, 5(6): 54-58.
- 10 Gao SL (高山林), Chen BJ (陈柏君). Optimization on cloning rapid-propagation technology by tissue culture in *Scutellaria baicalensis*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2004, (3): 312-315.
- 11 Ding RX (丁如贤), Zhang HM (张汉明), Fu X (付翔). Rosette bud induction from stem segments of baical skull (*Scutellaria baicalensis*). *Chin Tradit Herb Drugs*, 1998, 29: 194-195.
- 12 Kazutaka N, Hiroko F, Hiroko F, et al. Flavone production in transformed root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Phytochem*, 1999, 52: 885-889.
- 13 Zhou DQ (周德庆), Zeng L (曾骆). Study on extraction process for the total flavonoid in *Scutellaria baicalensis* Georgi. *West China J Pharm Sci*, 2003, 18: 78-79.
- 14 Guan CX (关崇新), Hui RH (回瑞华), Hou DY (侯冬岩). Study of extracting method in total flavonoid from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *J Anshan Teachers Coll*, 2000, 2(4): 87-90.