信息与资料 Imformation and Data

不同树龄白桦的不同器官及其组培苗诱导的愈伤组织中白桦酯醇和齐墩果酸的分布和含量变化

尹静, 詹亚光*, 李新宇, 任春林, 邱伟, 陈秀福, 由香玲
东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

Changes of Distribution and Contents of Betulin and Oleanolic Acid in Different Organs and Induced Callus of Culture Seedling from Birch (*Betula platyphylla* Suk.) of Different Ages

YIN Jing, ZHAN Ya-Guang*, LI Xin-Yu, REN Chun-Lin, QIU Wei, CHEN Xiu-Fu, YOU Xiang-Ling
College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

提要: 检测一年生、四年生、六年生、八年生及四十年生白桦树各器官以及白桦组培苗诱导的愈伤组织和悬浮培养细胞中齐墩果酸和白桦酯醇的分布和含量。结果表明, 不同树龄白桦的叶、茎外皮和根皮中都能检测出齐墩果酸和白桦酯醇, 但主要集中在茎外皮, 叶片和根皮中含量极低, 齐墩果酸和白桦酯醇含量分别以四年生和八年生白桦茎外皮中最高。由白桦组培苗茎段诱导的愈伤组织及其悬浮培养细胞和组培苗根诱导的愈伤组织中都能测出白桦酯醇, 其含量以茎段诱导的悬浮培养细胞中为最高。组培苗、茎段诱导的愈伤组织及其悬浮培养细胞、叶片和根诱导愈伤组织中均可以检测出齐墩果酸, 其含量以悬浮培养细胞中的为最高。

关键词: 白桦; 细胞培养; 白桦酯醇; 齐墩果酸

白桦树含有三萜类次生代谢产物白桦酯醇和齐墩果酸, 他们均是来源于同一前体—2,3-氧化角鲨烯(2,3-oxidosqualene, 2,3-OSC)的五环三萜(Zhang等2003), 具有多种药理活性(李庆丽等1992; Fujioka等1994; Pisha等1995; Vasilenko等1993; Sun等2002)。萜类代谢产物的一个主要特征之一是具有组织特异性, 而这些化合物在某一植物体内仅存在于某一类器官、组织、细胞或细胞器中, 并受到独立的调控(Zhang等2003; Hiroaki 2004)。虽然很多植物都含有这两种三萜物质, 然而, 含量超过10%的却很少(王奇和芦柏震2008; 杜丰玉等2008), 而白桦树外皮中仅白桦酯醇含量就可达到10%~40% (崔艳霞和郑志方1994; 范桂枝等2007), 是三萜物质最丰富的来源之一; 另外, 如能通过组织培养方法获得白桦酯醇和齐墩果酸类药物, 用于大规模生产和临床应用, 具有积极的生态效益和社会效益。本文以不同树龄白桦的不同器官及其组培苗诱导的愈伤组织为试材, 研究白桦酯醇和齐墩果酸的分布和含量, 以期能为白桦三萜类物质的代谢调控及其开发、利用提供参考。

材料与方法

不同树龄白桦(*Betula platyphylla* Suk.)植株来自东北林业大学白桦强化种子园, 于6月中旬取不同树龄叶片、根皮和茎皮部分, 60 ℃烘干至恒重, 粉碎后用于检测。

白桦母树取自本校白桦强化种子园五至七年生嫁接优树(接穗30年生), 取其种子, 经灭菌后在WPM+1.0 mg·L^{-1} 6-BA培养基诱导组培苗, 相同培养基上继代, 继代周期为30 d。

选择生长状态良好的组培苗, 在超净工作台上取其茎段(去掉茎段上的叶片及侧芽)、叶柄、叶片和根, 切成1 cm左右, 接种于培养基IS+0.8 mg·L^{-1} 6-BA+0.6 mg·L^{-1} NAA (詹亚光2001)诱导愈伤组织, 每瓶3个外植体, 并在相同培养基上继代, 每25 d

收稿 2008-12-22 修定 2009-05-19
资助 黑龙江省自然基金重点项目(GA09158)和中国博士后基金(20080430873)。
* 通讯作者(E-mail: yaguangzhan@126.com; Tel: 0451-82191752)。

为一个继代周期, 继代2次后, 收获愈伤组织, 烘干, 粉碎。

花药诱导的愈伤组织来源于春季取白桦花序, 经表面消毒灭菌后, 接种于培养基IS+0.8 mg·L^{-1} 6-BA+0.6 mg·L^{-1} NAA诱导愈伤组织, 并在相同培养基上继代, 25 d为一个继代周期, 继代2次后, 收获愈伤组织, 烘干, 粉碎。白桦无菌苗和愈伤组织诱导与继代培养基均加入为20 g·L^{-1} 蔗糖、5.3 g·L^{-1} 琼脂粉, pH值为6.0~6.5。培养基均以121 ℃高压蒸汽灭菌20 min, 培养温度为24~26 ℃, 光照强度为40 μmol·m^{-2}·s^{-1},光照时间16 h·d^{-1}, 湿度为40%~50%。

由无菌苗茎段诱导和花药诱导的愈伤组织在上述培养条件下, 连续继代5次, 愈伤组织黄绿松散。在超净工作台上, 以镊子破碎, 接种于装有培养基100 mL B_5+0.2 mg·L^{-1} 6-BA+0.6 mg·L^{-1} TDZ中, 接种量为3 g·100 mL^{-1}, 悬浮培养继代周期为15 d, 继代2次后, 收获细胞, 烘干, 粉碎。

齐墩果酸和白桦酯醇提取采用改进的超声波醇法(张泽和孙宏2004)。分别称取3份0.2 g干燥的白桦样品, 加入95%分析乙醇并定容5 mL容量瓶中, 于室温过夜浸提, 然后用强度为10 kHz下的超声波超声40 min, 取上清液, 并将其用0.45 μm滤膜过滤, 为样品检测液。

白桦酯醇和齐墩果酸标准品的纯度>98%, 购自中国药品生物制品检定所。准确称取干燥的标准样品0.050 g, 溶解于95%分析乙醇中, 并定容至50 mL, 配制成浓度为1 mg·mL^{-1} 标准储备液。

高效液相色谱(HPLC)检测条件, 用Water公司600-717-2487色谱系统, 色谱柱HiQ sil C18V 4.6 mm×250 mm; 流动相为乙腈:水=4:1; 柱温25 ℃; 灵敏度16 AUFS; 流速1.0 mL·min^{-1}; 检测波长210 nm, 进样10 μL。

结果与讨论

1 不同树龄白桦植株中白桦酯醇和齐墩果酸含量与分布

(1)表1显示, 白桦叶、茎外皮和根皮可检测出齐墩果酸(图1和2), 齐墩果酸含量茎外皮中最多, 显著高于叶和根皮。四年生和六年生植株的茎外皮中齐墩果酸含量较高, 其次为八年生和四十年生的植株, 一年生植株茎外皮齐墩果酸含量最低。而叶中齐墩果酸含量以六年生最高, 显著高于其他树龄, 其次为四年生和四十年生的。一年生的叶中齐墩果酸含量最低。根皮中齐墩果酸含量以四十年树龄的为最高, 其次为六年生和八年生的, 最低为一年生的。

(2)白桦植株各部位均可检测出白桦酯醇(图2和3), 但主要集中在茎外皮中, 叶和根皮中相对含量均较低。八年生的白桦植株茎外皮中白桦酯醇含量最高, 其次为四十年生的, 再次为四年和六年生的, 最低为一年生的。树叶中白桦酯醇以八年生的为最高, 其次为四年生和六年生, 四十年生和一年生叶片白桦酯醇含量最低。根皮中白桦酯醇含量依次为四十年生>八年生>六年生>四年生>一年生(表2)。

由此可见, 树年龄与齐墩果酸和白桦酯醇含量具有一定的相关性, 但并不是完全随着树龄增加而提高(表1和表2)。一年生白桦植株各部位的这两种物质的含量均较低, 这可能是由于幼树正处于快速生长期, 物质代谢主要集中在初生物质合成, 以致各种次生代谢产物积累较少之故。另外, 可能只有达到一定树龄、经过气候变化及四季的更替等外界环境的刺激, 才更有利于大量次生代谢产物的

表1 不同树龄白桦的齐墩果酸在各部位的分布与含量

树龄	齐墩果酸含量/mg·g^{-1} (DW)			齐墩果酸总量/mg·g^{-1} (DW)
	叶	茎外皮	根皮	
一年生	0.035^{D}	0.144^{C}	0.006^{C}	0.185^{C}
四年生	0.205^{B}	22.340^{A}	0.040^{C}	22.585^{A}
六年生	0.395^{A}	19.886^{A}	0.190^{B}	21.171^{A}
八年生	0.158^{C}	14.236^{B}	0.154^{B}	14.548^{B}
四十年生	0.188^{B}	14.570^{B}	0.376^{A}	15.134^{B}

表中不同字母表示在0.01水平上差异显著。下表同此。

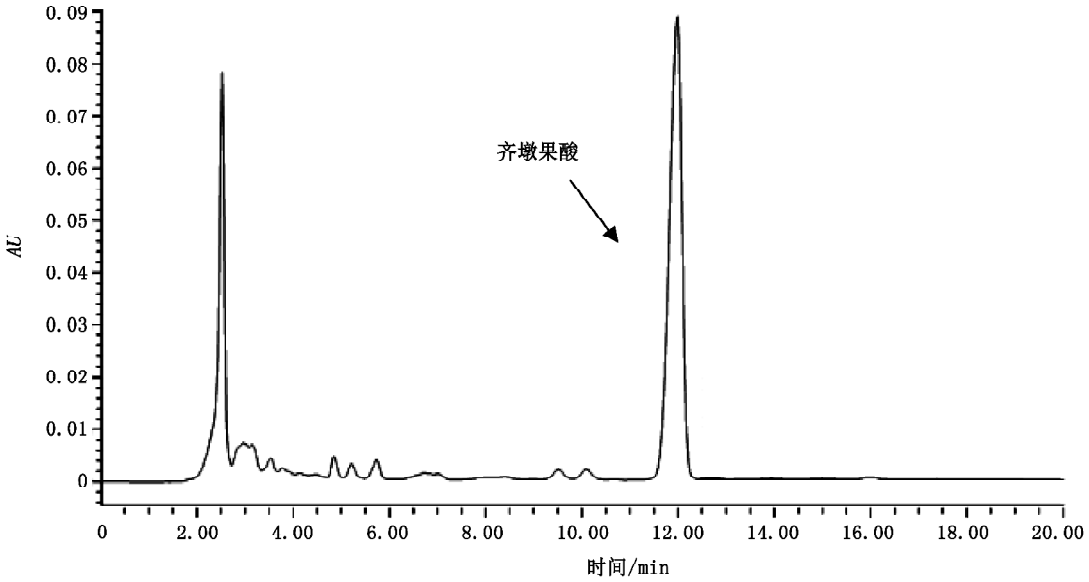

图1 齐墩果酸标准品液相色谱检测图

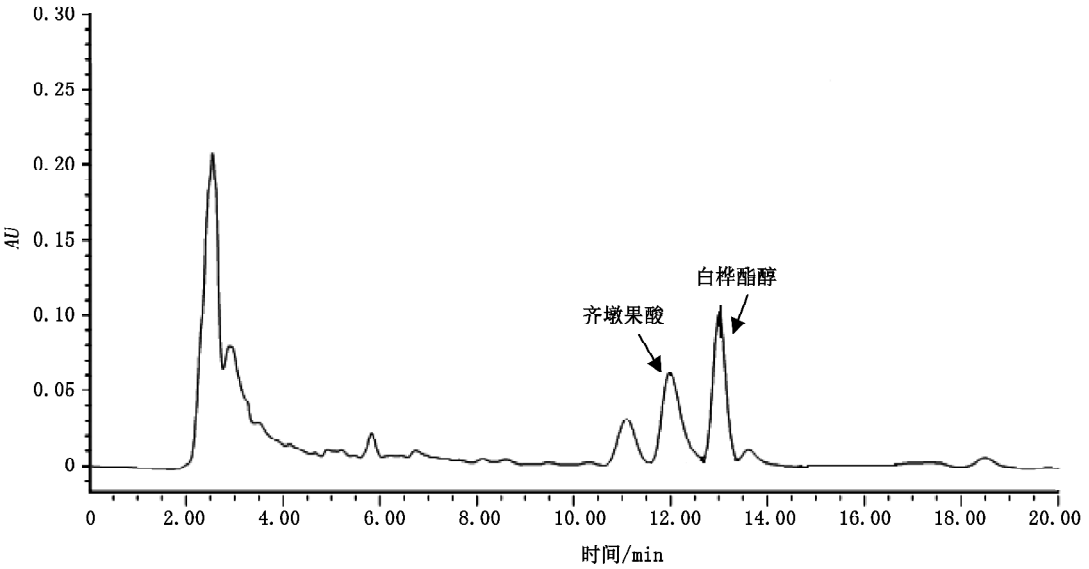

图2 白桦树外皮样品液相色谱检测图谱

表2 不同树龄白桦植株中白桦酯醇分布与含量

树龄	白桦酯醇含量/mg·g^{-1} (DW)			白桦酯醇总量/mg·g^{-1} (DW)
	叶	茎外皮	根皮	
一年生	0.182^{D}	3.872^{D}	0.841^{D}	4.895^{D}
四年生	1.927^{B}	64.275^{C}	2.200^{C}	68.402^{C}
六年生	1.794^{B}	53.035^{C}	3.100^{C}	57.929^{C}
八年生	2.397^{A}	207.704^{A}	6.546^{B}	216.647^{A}
四十年生	0.506^{C}	100.277^{B}	8.279^{A}	109.061^{B}

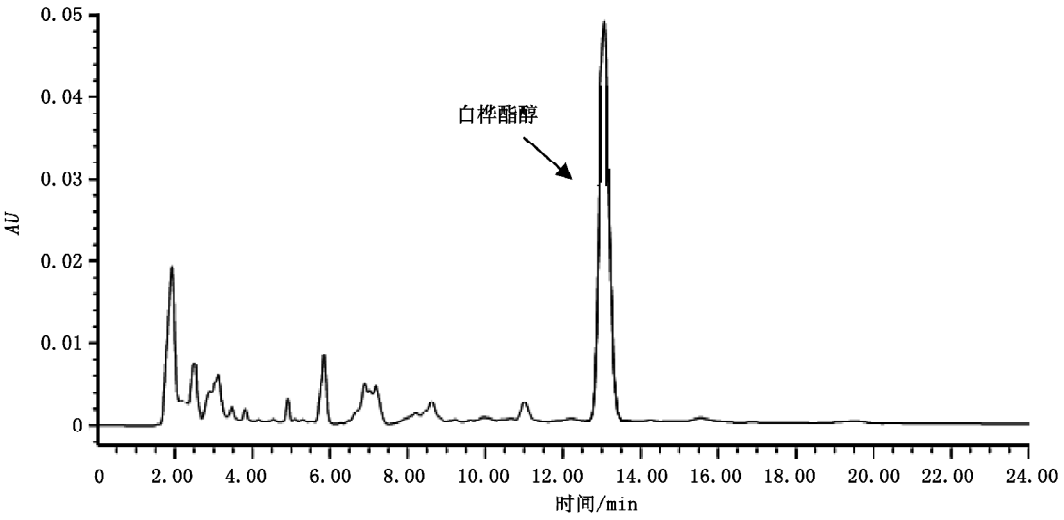

图3 白桦酯醇标准品液相色谱检测图谱

合成与积累。

2 白桦无菌苗和细胞中白桦酯醇和齐墩果酸含量与分布

表3显示, 由白桦组培苗茎段诱导的愈伤组织及其悬浮培养细胞和组培苗根诱导的愈伤组织中可检测到白桦酯醇, 含量以茎段诱导的悬浮培养细胞中为最高, 其次为根诱导的愈伤组织。而组培苗、花药诱导的愈伤组织及其悬浮培养细胞、叶柄和叶片诱导的愈伤组织均检测不到白桦酯醇。但在组培苗、组培苗茎段诱导的愈伤组织及其悬浮培养细胞、叶片和根诱导的愈伤组织中均可以检测出齐墩果酸, 其含量以茎段诱导的悬浮培养细胞中为最高, 其次为叶和茎段诱导的愈伤组织。而由花药诱导的愈伤组织及其悬浮培养细胞, 以及叶柄诱导的愈伤组织中均检测不到齐墩果酸。另外值得注意的是我们在进行由无菌苗的根、叶柄及叶诱导愈伤组织时发现愈伤组织生长量和细胞活力均不及茎段诱导的愈伤组织高, 且结构较致密, 用镊子不能较易破散。尤其是根诱导的愈伤组织在进行悬浮培养时, 需用刀切割, 且切割后造成机械损伤, 使细胞发生褐化, 并扩散到悬浮培养基中, 抑制细胞生长, 不利于悬浮培养; 所以本文未对由根诱导的愈伤组织在悬浮培养过程中进行白桦酯醇和齐墩果酸含量的检测。综合比较, 由茎段诱导的愈伤组织结构松散, 生长速度快, 颜色黄绿, 细胞活力高, 易于悬浮培养和三萜的合成。

表 3 白桦无菌苗和细胞中白桦酯醇和齐墩果酸含量与分布

材料	外植体来源	齐墩果酸含量 /mg·g^{-1} (DW)	白桦酯醇含量 /mg·g^{-1} (DW)
愈伤组织	根	0.015	0.647
	茎段	0.040	0.100
	叶柄	0	0
	叶片	0.059	0
	花药	0	0
悬浮培养细胞	茎段	0.119	0.913
	花药	0	0
组培苗	全株	0.024	0

可见利用白桦愈伤组织及细胞悬浮培养的方法可以获得白桦酯醇和齐墩果酸物质, 但次生代谢产物合成的组织特异性, 也使得通过此种方法获得目的产物的一个重要前提条件是培养材料的选择上。本研究中, 利用白桦组培苗的茎段诱导的愈伤组织及其悬浮培养细胞中均可获得白桦酯醇和齐墩

果酸。相对来讲, 悬浮培养过程中, 营养物质与细胞的全面接触及振荡过程中细胞间物质的有效传递,使得悬浮培养细胞更有利于积累次生代谢产物。

参考文献

崔艳霞,郑志方(1994). 白桦皮化学组成的研究. 东北林业大学学报, 22: 53~58

杜丰玉, 陈钧, 许月明, 张保华, 张淑颖, 张相飞(2008). 高效液相色谱法测定枇杷叶中熊果酸和齐墩果酸含量. 中国医院药学杂志, 28 (1): 22~23

范桂枝, 詹亚光, 王博, 邱磊, 刘桂丰, 王会仁(2007). 白桦不同部位及种源间白桦酯醇含量的差异分析. 林产化学与工业, 27: 103~106

李丽庆, 李淑芬, 张爱莲, 王燕(1992). 齐墩果酸免疫治疗恶性肿瘤病人的临床II期研究. 中国肿瘤临床, 19 (6): 412~414

王奇, 芦柏震(2008). 齐墩果酸的研究进展. 中国药房, 19 (9): 710~715

詹亚光(2001). 白桦组织培养与遗传转化[博士论文]. 哈尔滨: 东北林业大学林学院

张泽, 孙宏(2004). 高效液相色谱法测定白桦树皮中白桦酯醇的含量. 林产化学与工业, 24 (1): 61~63

Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, Cosentino LM, Ballas LM, Jiang JB, Janzen WP, Chen IS, Lee KH (1994). Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. J Nat Prod, 57: 243~247

Hayashi H, Huang P, Takada S, Obinata M, Inoue K, Shibuya M, Ebizuka Y (2004). Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra*. Biol Pharm Bull, 27: 1086~1092

Pisha EH, Chai IL, Lee I-S, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CW, Fong HH, Kinghorn AD, Brown DM, et al (1995). Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. Nat Med, 1: 1046~1051

Sun IC, Chen CH, Kashiwada Y, Wu JH, Wang HK, Lee KH (2002). Anti-AIDS agents 49. synthesis, anti-HIV, and anti-fusion activities of IC9564 analogues based on betulinic acid. J Med Chem, 45: 4271~4275

Vasilenko I, Semenchenko VF, Frolova LM, Parfenteva EP, Skul'te IV, Vasilenko AV, Koaharski VV (1993). Pharmacological properties of birth bark triterpenoids vasilenko. Eksp Klin Farmakol, 56: 53~55

Zhang H, Shibuya M, Yokota S, Ebizuka Y (2003). Oxidosqualene cyclases from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*: molecular evolution of oxidosqualene cyclases in higher plants. Biol Pharm Bull, 26: 642~650