

外源水杨酸对悬浮培养甘草细胞中甘草黄酮积累的影响

杨英, 何峰, 季家兴, 郑辉, 余龙江*

华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074

摘要: 甘草细胞悬浮培养体系中添加 10 mg·L⁻¹ 水杨酸可促进和提高甘草细胞的生长和甘草总黄酮产量。添加水杨酸可导致细胞中过氧化氢含量升高, 引起细胞中苯丙氨酸裂解酶、过氧化氢酶和过氧化物酶活性的增强以及丙二醛含量的升高。

关键词: 水杨酸; 悬浮培养甘草细胞; 甘草黄酮积累; 防御反应

Effects of Exogenous Salicylic Acid on the Flavonoid Accumulation in Cell Suspension Culture of *Glycyrrhiza inflata* Bat.

YANG Ying, HE Feng, JI Jia-Xing, ZHENG Hui, YU Long-Jiang*

College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: Effects of salicylic acid on the cell biomass and flavonoid accumulation in cell suspension cultures of *Glycyrrhiza inflata* were studied. The results showed that 10 mg·L⁻¹ salicylic acid increased the cell biomass and flavonoid accumulation by 28% and 33%, respectively. In addition, salicylic acid increased the content of H₂O₂, the activities of phenylalanine ammonialyase, catalase, peroxidase and malondialdehyde content.

Key words: salicylic acid; cell suspension cultures of *Glycyrrhiza inflata*; flavonoid accumulation; defense response

采用细胞培养大规模生产甘草的有效成分已多有报道, 如梁玉玲等(2000)用胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata*)愈伤组织培养生产甘草酸; 杨世海等(2005)的乌拉尔甘草(*G. uralensis*)愈伤组织培养条件的探索以及杜旻等(2001)乌拉尔甘草毛状根培养体系的建立等。但有关采用甘草细胞培养生产总黄酮的研究几乎还是空白。此外, 水杨酸(salicylic acid, SA)是植物体内可自身合成的一种类似植物激素的酚类化合物, 它参与许多生理过程, 并与植物抗病反应密切相关。近年来的研究表明, 施加 SA 可影响植物体内一系列生理反应, 其对植物培养物的次级代谢的诱导也引起人们越来越多的注意, 报道也越来越多(于放等 2005; 徐亮胜等 2005; 罗建平等 2006; 张东向等 2007)。但对胀果甘草悬浮细胞合成甘草黄酮的研究尚未见报道。因此, 本文在研究 SA 影响甘草细胞生长和黄酮合成的同时, 对其与防御反应相关的几个生化指标如过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化氢(H₂O₂)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量变化作了检测, 以探讨 SA 影响甘草黄酮合成的机制。

材料与方法

实验材料为我们实验室保存的高产甘草黄酮的胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)细胞系。其高产甘草黄酮细胞系悬浮培养的培养基为 MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+3% 蔗糖, 高压灭菌前 pH 调至 5.8。在 30 μmol·m⁻²·s⁻¹ 光照条件下振荡培养, 光暗周期为 12 h/12 h。摇床转速为 120 r·min⁻¹, 培养温度为(25±1) °C, 每 20 d 继代一次细胞, 接种量为 5%, 用 250 mL 三角瓶, 每瓶装 80 mL 培养基。所有实验至少重复 3 次。

不同浓度 SA 经过滤灭菌后, 在细胞培养的对数生长期(第 11 天), 添加到悬浮培养体系中。培养一个周期(共 20 d)后, 培养物以沙芯漏斗过滤, 用蒸馏水将残留的培养液冲洗干净, 再次抽滤, 称重, 得到细胞鲜重(FW), 然后将所得细胞置于 50 °C 烘箱中烘干至恒重, 冷却后称得细胞

收稿 2008-01-16 修定 2008-04-29

致谢 新疆建设兵团新疆昆仑神农股份有限公司提供经费支持。

* 通讯作者(E-mail: Yulj@hust.edu.cn; Tel: 027-87792264; Fax: 027-87792265)。

干重(DW)。

测定甘草黄酮的含量时,准确称取1 g干燥至恒重的甘草细胞粉末,过100目筛,加入30倍量80%乙醇溶液超声提取1 h,提取液减压浓缩,用等量乙酸乙酯萃取3次,合并萃取液,然后用95%乙醇提取,离心后上清液为甘草黄酮液。甘草黄酮含量测定用比色法(张雪辉等2001),即用甲醇稀释后,再加0.5 mL 10% KOH溶液,充分摇匀显色5 min后,用甲醇定容至10 mL,摇匀,用Unico紫外可见分光光度计[Unico wfz UV-2100, 尤尼柯(上海)仪器有限公司]测定其波长410 nm处的吸收值,以芦丁为标准样品。

苯丙氨酸裂解酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)和POD活性及MDA含量的测定均参照李合生(2000)书中的方法。 H_2O_2 含量测定用顾月华等(1998)文中的方法。CAT活性的测定参照文献(李合生2000;彭志英和蒋黎1995)进行。

结果与讨论

1 SA对甘草细胞生长和黄酮积累的影响

如图1所示,在一定的浓度范围内,随着SA浓度的增加,甘草细胞的生物量和总黄酮产量也在增加,SA浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘草细胞的生物量和总黄酮产量最大。SA的浓度继续增大的甘草细胞的生物量和总黄酮产量都开始下降,SA浓度达到 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘草细胞的生物量和总黄酮产量与不加SA的差异不显著,而且SA浓度继续提高的细胞生物量和总黄酮产量明显低于不加SA的。这说明低浓度SA促进甘草黄酮的合成,而高浓度的SA则抑制。

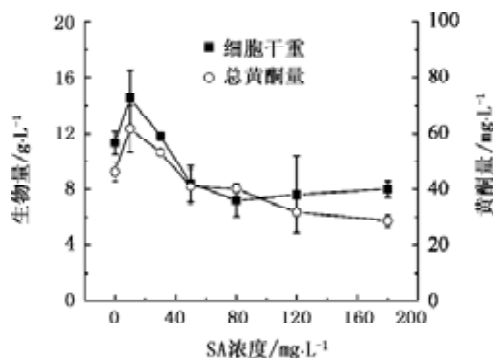


图1 SA对甘草细胞生长和黄酮积累的影响

Fig.1 Effects of SA on the cell biomass and flavonoid accumulation

2 SA对PAL、POD和CAT活性的影响

PAL在黄酮合成中非常重要,能够催化苯丙氨酸生成肉桂酸,肉桂酸又经多步催化,其产物与乙酸的衍生物结合生成查耳酮,在此基础上又合成其他黄酮(李雄彪和张金忠1992)。由图2可以看出:添加SA的细胞中PAL活性逐渐增强,第4天时,达到最高,此后,酶活开始急剧下降,但第5天时的酶活仍高于不加SA的。不加SA的细胞的PAL活性在处理后的第1天即下降,

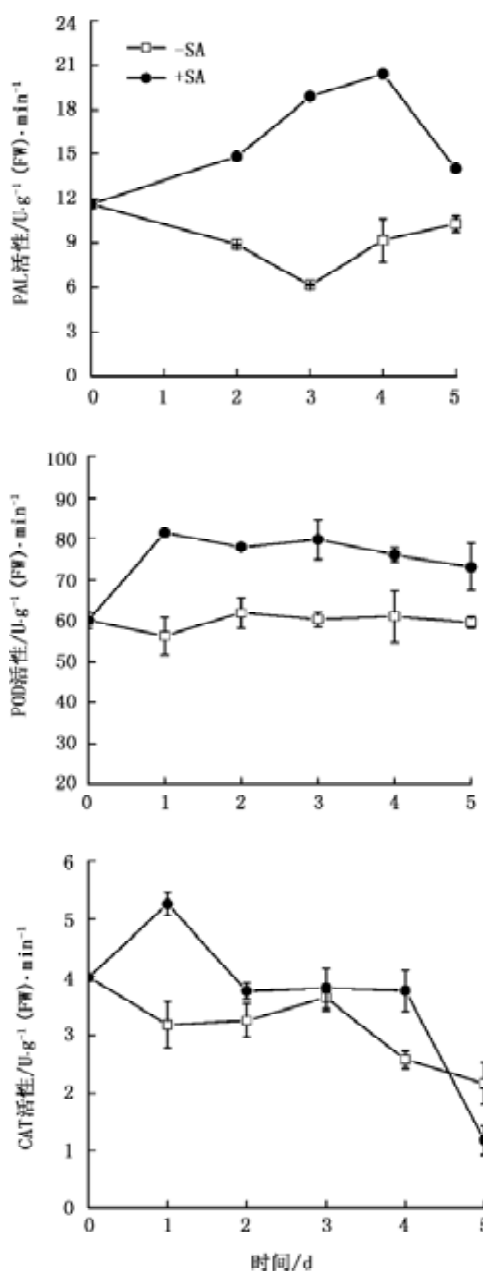


图2 SA对PAL、POD和CAT活性的影响

Fig.2 Effects of SA on the PAL, POD and CAT activities

第3天降至最低, 随后又开始上升, 最终保持在 $9 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$, 但仍然比加 SA 的酶活低。加 SA 的细胞的 PAL 活性增强, 与加 SA 的总黄酮产量升高的变化规律一致。从图 2 还可以看出: 不加 SA 的细胞的 POD 活性变化不明显。而添加 SA 的细胞的 POD 活性则急剧上升, 第 1 天最高, 随后开始下降, 但下降速度非常缓慢, 在第 5 天, 仍比不加 SA 的高 21.9%。这说明 SA 促进 POD 活性升高, 这对于及时清除过量的 H_2O_2 是重要的。前 3 d, 不加 SA 的细胞 CAT 活性没有明显变化, 培养后期, 细胞 CAT 活性有所下降。添加 SA 后的第 1 天, 细胞中 CAT 的活性快速升高, 并达到最大; 此后, 开始下降, 第 2~4 天, 加 SA 的 CAT 活性变化不显著, 第 4 天的 CAT 酶活仍显著高于不加 SA 的; 随后急剧下降, 第 5 天时的仅为不加 SA 的 29.5%。

3 SA 对 H_2O_2 含量的影响

由图 3 可以看出, 不加 SA 的细胞产生的 H_2O_2 含量一直比较稳定; 而以 SA 处理的细胞 H_2O_2 含量立即下降, 处理后的 1 h 便开始上升, 2 h 内产生的 H_2O_2 含量和不加 SA 的变化均不显著, 其含量继续升高, 并在第 3 小时达到最高, 而后, 急剧下降, 第 5 小时起与不加 SA 的差异不显著。这说明添加 SA 可促进短时间内的细胞中 H_2O_2 的产生。

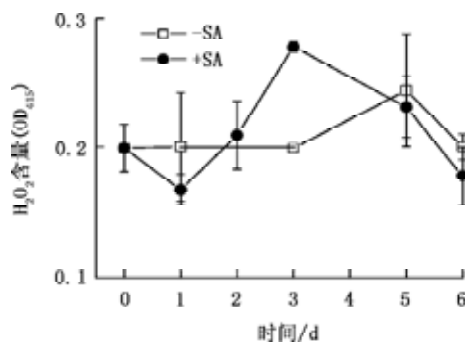


图 3 SA 对 H_2O_2 含量的影响

Fig.3 Effect of SA on the H_2O_2 content

4 SA 对 MDA 含量的影响

从图 4 可以看出, 在培养过程中, 不加 SA 的细胞中 MDA 含量在 $3.06 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW})$ 上下浮动 10%; 而在添加 SA 后, 细胞中 MDA 含量迅速升

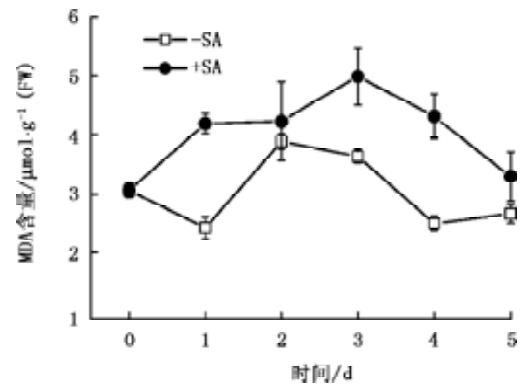


图 4 SA 对 MDA 含量的影响

Fig.4 Effect of SA on the MDA content

高, 第 3 天达到最高, 此后开始下降, 但在处理后的第 5 天, 加 SA 的细胞中 MDA 含量仍然显著高于不加 SA 的。

参考文献

- 杜曼, 向德军, 丁家宜, 刘涤(2001). 甘草毛状根培养系统的建立及化学成分分析. 植物资源与环境学报, 10 (1): 7~10
- 顾月华, 罗江虹, 严晓红(1998). N^+ 离子束注入烟草愈伤组织对膜脂过氧化及相关酶活性的影响. 激光生物学报, 7 (3): 180~183
- 李合生主编(2000). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 213~214
- 李雄彪, 张金忠编(1992). 简明植物生物化学. 天津: 南开大学出版社, 341~344
- 梁玉玲, 管延英, 阳丽, 王淑敏(2000). 胀果甘草愈伤组织培养及甘草酸含量分析. 河北大学学报(自然科学版), 20 (4): 365~368
- 罗建平, 夏宁, 沈国栋(2006). 茉莉酸甲酯、水杨酸和一氧化氮诱导怀槐悬浮细胞合成异黄酮及细胞结构变化. 分子细胞生物学报, 39 (5): 438~444
- 彭志英, 蒋黎(1995). 紫外速率直接法测定过氧化氢酶活性. 华西医学, 10 (1): 4~7
- 徐亮胜, 薛晓峰, 付春祥, 金治平, 陈毓莹, 赵德修(2005). 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. 生物工程学报, 21: 402~406
- 杨世海, 刘晓峰, 果德安, 郑俊华(2005). 培养基及培养条件对甘草愈伤组织生长和黄酮类化合物合成的影响. 吉林农业大学学报, 27 (3): 289~295
- 于放, 张冬艳, 白凤武, 安利佳(2005). 水杨酸对喜树细胞次级代谢的诱导作用. 高技术通讯, 15 (1): 70~73
- 张东向, 李康, 姚娜, 张磊(2007). 诱导子对黄芩悬浮细胞系的影响. 北方园艺, (4): 194~196
- 张雪辉, 赵元芬, 陈建民(2001). 甘草中总黄酮的含量测定. 中国中药杂志, 26 (11): 746~747