

茉莉酸甲酯(MeJA)对贯叶连翘悬浮细胞生长和贯叶金丝桃素产量的影响

王保军¹, 张秀清¹, 孙立伟¹, 刘晓娜², 张京声¹, 孙君社^{1,*}中国农业大学¹ 食品科学与营养工程学院, ²水利与土木工程学院, 北京 100083

提要: 培养基中添加 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA后, 贯叶连翘悬浮细胞生物量增加量和贯叶金丝桃素(HF)的产量分别是未经 MeJA 处理的 1.3 倍和 1.73 倍; 培养 3 d 时, 培养基中添加 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 能提高 HF 产量, 是未经 MeJA 处理的 2.4 倍。

关键词: 贯叶连翘; 贯叶金丝桃素; 悬浮细胞; 茉莉酸甲酯

Effect of Methyl Jasmonate on Suspension Cells Growth and Hyperforin Production of *Hypericum perforatum* L.WANG Bao-Jun¹, ZHANG Xiu-Qing¹, SUN Li-Wei¹, LIU Xiao-Na², ZHANG Jing-Sheng¹, SUN Jun-She^{1,*}

¹College of Food Science and Nutritional Engineering, ²College of Water Conservancy and Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: The results showed that the application of 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ methyl jasmonate (MeJA) could promote the accumulation of biomass and hyperforin (HF) contents in suspension cells, which were 1.3 times and 1.73 times higher than those in untreated suspension cells, respectively. Furthermore the production of HF were significantly improved, which were 2.4 times higher than those in untreated suspension cells, when suspension cells were treated with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA after incubated for 3 days.

Key words: *Hypericum perforatum* L.; hyperforin; suspension cells; methyl jasmonate (MeJA)

贯叶金丝桃素(hyperforin, HF)是贯叶连翘中的主要成分之一, 它具有抗抑郁(Chatterjee 等 1998)、抗肿瘤(Schempp 等 2002)、抗菌(Beerhues 2006)、抗炎症和抗血管形成的作用, 能通过加强神经系统中神经递体的释放来调节神经系统(Medina 等 2006), 因此越来越受到人们的关注。大田种植的贯叶连翘容易受到病虫害、微生物和季节的影响, 产量和其中有用成分的含量不稳定(Murch等2000; Southwell 和 Bourke 2001)。植物组织培养技术可以大量培养贯叶连翘细胞, 保证细胞生物量的增加, 还可以改变培养条件(Kirakosyan等2000)以调控和提高细胞内目的产物的含量。

茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)作为一种能够促进植物进行细胞防御应答和次级代谢产物合成的化学诱导子, 对植物次级代谢物的生成有明显促进作用(Ketchum 等 1999; 曲均革等 2006; 罗建平 等 2006)。Sirvent 和 Gibson (2002)的研究表明, 在贯叶连翘小植株生长过程中添加 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA可显著提高植株内金丝桃素类物质的含量, 同时植株内 HF 的含量也提高; Conceicao 等(2006)的研究表明, 经 MeJA 诱导的贯叶连翘悬浮细胞中一

系列类黄酮如倒捻子素、芒果苷、异槲皮素和毛地黄黄酮的含量增高。

本文探讨MeJA对贯叶连翘悬浮细胞的生物量和 HF 积累的影响。

材料与方法

实验材料为从贯叶连翘(*Hypericum perforatum* L.) 种子获得的贯叶连翘组培苗。培养基为 MS+3% 蔗糖+0.6% 琼脂。取生长 25 d 的组培苗上部幼嫩叶片诱导生成愈伤组织, 培养基为: 1/2 N (硝酸钾+硝酸铵) MS 培养基+0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D; 培养温度为(25 \pm 1) ; 光照时间为 16 h \cdot d⁻¹; 光照强度为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。培养 25 d 将愈伤组织继代在新鲜的继代培养基[1/2 N (硝酸钾+硝酸铵) MS+0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT]上, 连续继代 3 次。取 0.2 g 结构疏松、性状均一和生长快的愈伤组织,

收稿 2008-04-03 修订 2008-05-28

资助 国家自然科学基金(20506029)。

* 通讯作者(E-mail: sunjsh61@163.com; Tel: 010-62737501)。

放入装有 30 mL 液体培养基[1/2 N (硝酸钾 + 硝酸铵) MS+0.4 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.1 mg·L⁻¹ KT]的 100 mL 三角瓶中, 摇床振荡暗培养。培养条件: (25±1) °C, 转速 120 r·min⁻¹, 旋转半径 12 mm。悬浮细胞每隔 10 d 继代一次, 接种量按新鲜培养基与原培养基的比例为 3:1。实验所用贯叶连翘悬浮细胞已经过 33 代的继代培养, 具有稳定的形态特征和生长速率。

MeJA 用 DMF (二甲基甲酰胺) 溶解, 配制成 100 μmol·mL⁻¹ 母液, 以 0.45 μm 的滤膜过滤除菌。分别将母液加到培养液中, 配制为 50、75、100 和 125 μmol·L⁻¹ 的培养液。

测定 HF 时, 取稳定期悬浮细胞, 离心(9 600×g, 10 min), 沉淀经真空冷冻干燥 24 h 后碾碎成粉末状, 称取 0.5 g 粉末, 加入 9.8 mL 色谱甲醇和 0.2 mL 吡啶。冰浴中超声波(JY-II 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝科器研究所)破碎提取, 超声条件为: 超声时间 10 s、间隙时间 10 s、功率 300 W、超声次数 30 次。然后 9 600×g 冷冻离心 15 min, 取上清液经过 0.45 μm 有机系滤膜过滤后进行高效液相检测(刘晓娜等 2007)。整个过程尽量在避光和低温下进行, 以避免提取物的光和热分解。用 Agilent 1200 系列高效液相色谱仪分析检测, 色谱柱为 Agilent XDB-C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 检测器为 G1314B 可变波长检测器; 进样量为 20 μL。流动相 75% 乙腈(色谱纯, Fisher)和 25% 水相(乙酸-三乙胺缓冲液, pH 6.5), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 290 nm。

以甲醇(色谱纯)溶解贯叶金丝桃素标品(HF, 97.0%, 德国 Alexis 公司), 配制 HF (2.5、5、10、15、20、25、50、75 和 100 μg·mL⁻¹) 标准溶液。峰面积与标准溶液的标准方程为: $Y=13.833X-16.118$, 相关性 $R^2=0.999$ [Y 为峰面积, X 为 HF 的浓度(μg·mL⁻¹)]。

经处理的贯叶连翘悬浮细胞冷冻离心(9 600×g, 10 min)去除上清液, 收集细胞沉淀, 真空冷冻干燥 24 h, 至恒重后, 称干量。

按公式: HF 产量 = 细胞干重(g·L⁻¹)×HF 含量(mg·g⁻¹), 计算 HF 产量。

实验数据均采用 SAS 8.0 (Anova) 进行差异显著性分析(α=0.05)。

结果与讨论

1 贯叶连翘细胞的生长和 HF 合成

(1) 图 1 显示, 贯叶连翘悬浮细胞的生长周期为 14 d, 2~5 d 内细胞分裂生长快; 培养第 8 天细胞生物量达到最大; 之后细胞进入稳定期, 随着培养基中糖类和一些营养成分的消耗, 细胞分裂生长减慢, 生物量基本上保持稳定; 后期细胞出现凋亡现象, 再加上培养液随摇床的振动, 细胞裂解增加, 生物量略有下降。细胞培养 10 d 时转接入新鲜培养基中, 其细胞生长延滞期较短。

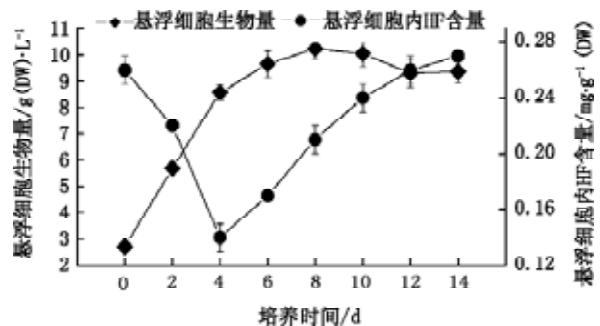


图 1 贯叶连翘悬浮细胞的生长和 HF 的积累

Fig.1 Growth of *H. perforatum* suspension cells and accumulation of HF

(2) 细胞生长过程中, HF 合成呈现一个动态的变化过程。由于用稳定期的细胞接种, 其细胞内的 HF 含量较高, 随着细胞生长的加快, HF 的含量迅速下降。第 4 天的 HF 达到最低, 与悬浮细胞生长曲线相对应, 第 4 天时悬浮细胞生长最快, 生物量急速增加。随着培养时间的增加, 细胞生物量增加变慢, HF 的含量开始增加。细胞生长到 12~14 d 时的 HF 含量达到最大(图 1)。

2 MeJA 对贯叶连翘悬浮细胞的生长和 HF 产量的影响

MeJA 能促进贯叶连翘细胞内 HF 含量的积累 (Sirvent 和 Gibson 2002)。

(1) 不同浓度的 MeJA 对悬浮细胞生物量和 HF 产量的影响不同。较低浓度 MeJA 对贯叶连翘悬浮细胞生物量的影响不显著, 100 μmol·L⁻¹ MeJA 显著促进悬浮细胞生物量积累, 细胞干重是不经 MeJA 处理的 1.3 倍。高浓度 MeJA 对细胞生物量积累的促进不明显(图 2-a)。

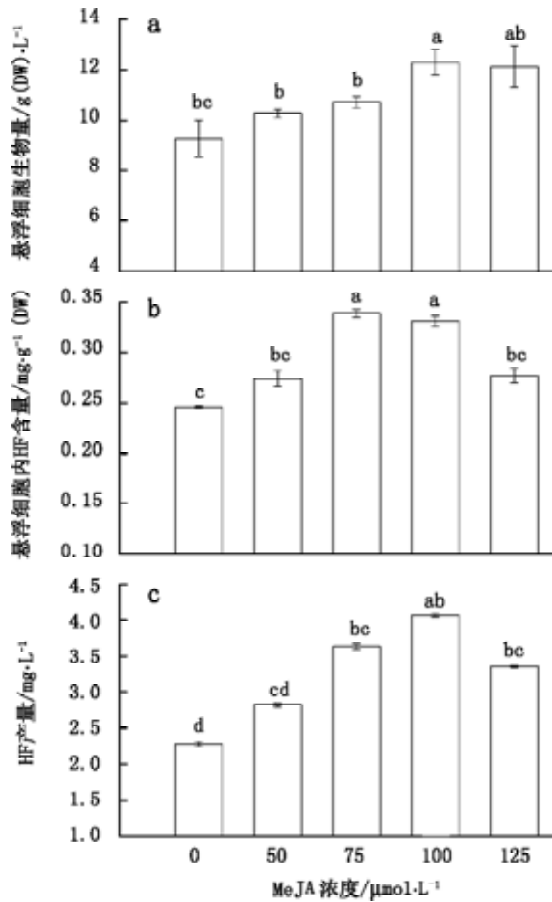


图2 不同浓度 MeJA 对悬浮细胞生物量、HF 含量和产量的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of MeJA on contents of biomass, HF and the production of HF in suspension cells

(2)不同浓度MeJA都能促进细胞内HF积累,浓度为 $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MeJA 显著促进 HF 的积累(图 2-b、c), 后者的积累量最大。

3 MeJA 诱导的贯叶连翘悬浮细胞内 HF 含量变化

随着培养天数的增加,添加 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 的悬浮细胞内 HF 的含量,呈现先降后升的变化趋势(图 3), 培养 4 d 的含量降到最低。培养 8 d 进入稳定期,经 MeJA 诱导的悬浮细胞内 HF 含量达到最大,比不经 MeJA 处理的提高 1.73 倍。培养 14 d 不经 MeJA 处理的悬浮细胞中 HF 含量达到最大值。

4 不同时间添加 MeJA 对贯叶连翘悬浮细胞生长和 HF 产量的影响

在细胞生长的对数期,添加 MeJA 对细胞内次

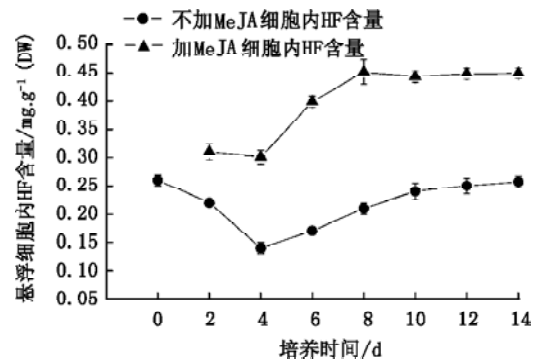


图3 贯叶连翘悬浮细胞中 HF 的积累

Fig.3 Accumulation of HF in *H. perforatum* suspension cells

级代谢产物的促进作用最明显(Qian 等 2004; 曲均革等 2006)。本实验在悬浮细胞生长的第 3 天添加 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA, 培养 14 d 测定悬浮细胞生物量的结果表明, MeJA 显著地提高了细胞生物量, 是不经 MeJA 处理的 1.1 倍(图 4-a)。细胞培养的第 1、

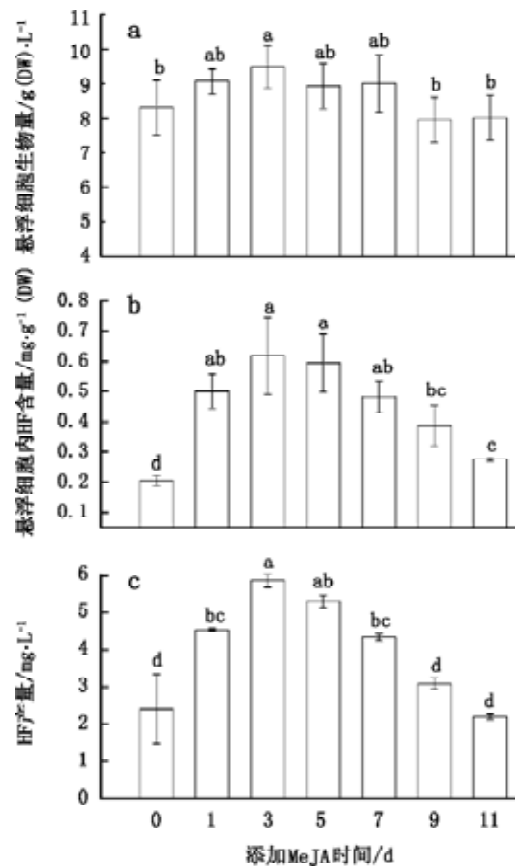


图4 培养后不同时间添加 MeJA 对悬浮细胞生物量、HF 含量和产量的影响

Fig.4 Effect of adding MeJA at different time on contents of biomass, HF and the production of HF in suspension cells

5和7天分别添加 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA与第3天的细胞生物量增加差异不明显,而第9和11天添加,则加速细胞的凋亡和裂解,以致细胞生物量比不经MeJA处理的略有降低,但在统计学上没差异。细胞培养3 d时添加MeJA的HF含量和HF产量显著提高,是未经MeJA处理的2.4倍。其他时间添加MeJA的HF含量有不同程度的提高,培养1、7和9 d添加MeJA的产量也高于不经MeJA处理的HF产量(图4-b、c)。

参考文献

- 刘晓娜, 张秀清, 孙君社(2007). 贯叶连翘的水培及其代谢产物检测. 植物生理学通讯, 43 (1): 101~103
- 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
- 曲均革, 虞星炬, 张卫, 金美芳(2006). 前体饲喂、诱导子和光照联合使用对葡萄细胞培养合成花青素的影响. 生物工程学报, 22 (2): 299~305
- Beerhues L (2006). Hyperforin. *Phytochemistry*, 67: 2201~2207
- Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Müller WE (1998). Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sci*, 63 (6): 499~510
- Conceicao LFR, Ferreres F, Tavares RM, Dias ACP (2006). Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cell by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry*, 67: 149~155
- Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB, Shuler ML (1999). The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension culture of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnol Bioeng*, 62 (1): 97~105
- Kirakosyan A, Hayashi H, Inocue K, Charchoglyan A, Vardapetyan H (2000). Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry*, 53: 345~348
- Medina MA, Martínez-Poveda B, Amores-Sánchez MI, Quesada AR (2006). Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci*, 79: 105~111
- Murch SJ, Choffe KL, Victor JMR, Slimmon TY, KrishnaRaj S, Saxena PK (2000). Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*. cv 'Anthos'). *Plant Cell Rep*, 19: 576~581
- Qian ZG, Zhao ZJ, Xu Y, Qian X, Zhong JJ (2004). Novel chemically synthesized hydroxyl-containing jasmonates as powerful inducing signal for plant secondary metabolism. *Biotechnol Bioeng*, 86 (7): 809~816
- Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, Gilb B, Kaufmann T, Borner C, Sleeman JP, Simon JC (2002). Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene*, 21: 1242~1250
- Sirvent T, Gibson D (2002). Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiol Mol Plant Pathol*, 60: 311~320
- Southwell IA, Bourke CA (2001). Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). *Phytochemistry*, 56: 437~441