

## 茉莉酸甲酯与二氢茉莉酮酸甲酯对悬浮培养的甘草细胞生长和黄酮积累的影响

杨英, 郑辉, 李赞, 季家兴, 余龙江\*

华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074

**摘要:** 建立了稳定的甘草细胞悬浮培养体系, 在一个培养周期内, 细胞的生长曲线呈“S”型, 培养21 d的干重、鲜重和黄酮产量都达到最高值。甘草细胞悬浮培养体系中分别添加 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二氢茉莉酮酸甲酯和茉莉酸甲酯时, 虽然对细胞生长有一定程度的抑制, 但细胞中甘草黄酮产量仍有提高。添加二氢茉莉酮酸甲酯和茉莉酸甲酯的最适时间分别为细胞培养后的第5天和第10天。

**关键词:** 胀果甘草悬浮细胞; 甘草黄酮; 茉莉酸甲酯; 二氢茉莉酮酸甲酯

## Effects of Methyl Jasmonate and Methyl Dihydrojasmonate on the Cell Growth and Flavonoids Accumulation in Cell Suspension Culture of *Glycyrrhiza inflata* Bat.

YANG Ying, ZHENG Hui, LI Yun, JI Jia-Xing, YU Long-Jiang\*

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

**Abstract:** The effects of methyl jasmonate and methyl dihydrojasmonate on cell growth and flavonoids production in suspension cultures of *Glycyrrhiza inflata* Batal were investigated. Biomass accumulation and flavonoids production both exhibited “S” curve in one culture cycle, with the greatest values obtained on day 21. In addition, although the cell growth was restrained to some degree by the methyl dihydrojasmonate and methyl jasmonate treatment with the concentration of  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , the flavonoids accumulation was increased. Moreover, the optimum time for the addition of methyl dihydrojasmonate and methyl jasmonate was the 5th day and the 10th day during the cell culture, respectively.

**Key words:** cell suspension cultures of *Glycyrrhiza inflata*; flavonoids production; methyl jasmonate; methyl dihydrojasmonate

采用细胞培养大规模生产甘草的有效成分已有报道, 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还未见有报道。茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MJ)是一种小的信号分子, 具有广泛的生理作用(刘燕等2007), 它可以作为细胞信使, 参与到植物细胞的代谢过程中, 激活特定的防御相关基因表达, 引起细胞抗逆反应产物表达(宾金华和潘瑞焱1999)。张进杰和徐茂军(2006)研究NO和茉莉酸甲酯影响黄芩悬浮细胞生长及黄芩苷合成的结果表明, MJ能增加黄芩苷的合成。余龙江等(1999)的研究表明, 茉莉酸甲酯有诱导紫杉醇生物合成的作用。茉莉酸甲酯对植物培养物的次级代谢的诱导也引起人们

的注意(于树宏和李玲 2002; 徐亮胜等 2005; 罗建平 2006), 但其对胀果甘草悬浮细胞合成甘草黄酮的研究尚未见报道。二氢茉莉酮酸甲酯是MJ的类似物, 在工业中可以作为一种香料, 但价格比MJ便宜很多。为此, 本文研究MJ及其类似物二氢茉莉酮酸甲酯(methyl dihydrojasmonate)对甘草细胞生长和甘草黄酮积累的影响, 以期为甘草细胞规模化生产黄酮类化合物提供参考。

### 材料与方法

实验材料为我们实验室保存的高产甘草黄酮

收稿 2008-06-16 修定 2008-07-22

资助 新疆建设兵团新疆昆仑神农股份有限公司提供经费。

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

的胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)细胞系。其悬浮培养的培养基为MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D, 3% 蔗糖, 高压灭菌前将pH调至5.8。在光照强度为30 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>条件下振荡培养, 光暗周期为12 h/12 h。摇床转速为120 r·min<sup>-1</sup>, 培养温度为(25±1) °C, 每20 d继代一次, 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。

细胞培养一个周期(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, 冷却后称得细胞干重(DW)。

不同浓度二氢茉莉酮酸甲酯和茉莉酸甲酯经过滤除菌后, 于细胞培养的不同时间添加到悬浮培养体系中。细胞培养一个周期(共20 d)后, 测定细胞的干重。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, 提取液减压浓缩至5 mL后, 用5 mL乙酸乙酯萃取3次, 合并萃取液, 然后用95%乙醇提取, 以3500×g离心5 min后, 得到的上清液即为甘草黄酮液。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, 充分摇匀后显色5 min, 用甲醇定容至10 mL, 摇匀后用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。

## 结果与讨论

### 1 悬浮培养的甘草细胞的生长和黄酮的积累

从图1可以看出, (1)甘草细胞悬浮培养的生长周期为25 d左右, 细胞的鲜重和干重增长的时间进程非常相似, 基本上呈现“S”型。在培养的前6 d, 细胞生长缓慢, 有明显的延迟期, 6 d之后, 生物量迅速增长, 即为对数生长期, 第21天的干重和鲜重都达到最高值, 分别为16.4 g·L<sup>-1</sup>和232.4 g·L<sup>-1</sup>, 为培养初期的5倍左右。21 d后, 进入稳定期, 干重变化不大, 鲜重开始缓慢下降。(2)前6 d, 总黄酮积累缓慢, 之后黄酮总产量迅速增加, 第21天达到最高, 为95.7 mg·L<sup>-1</sup>。在随后的培养过程中, 黄酮的总产量略微下降。甘草细胞生长的最佳周期为

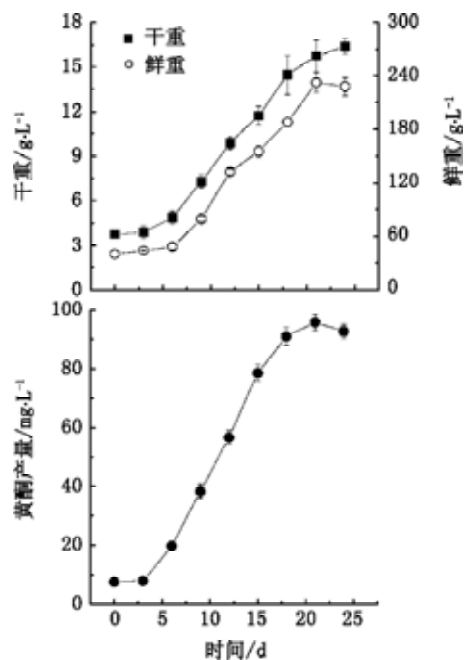


图1 悬浮培养的甘草细胞生长和黄酮的积累

Fig.1 Time curves of cell growth and flavonoids accumulation in suspension culture of *Glycyrrhiza inflata* Bat.

21 d, 在整个培养周期中, 黄酮积累和细胞生长是同步的。

### 2 不同浓度二氢茉莉酮酸甲酯和MJ对甘草细胞生长和甘草黄酮产量的影响

不同浓度的MJ和二氢茉莉酮酸甲酯在第10天加入培养基中, 培养后20 d收获细胞, 从图2可以见到, (1)在一定浓度二氢茉莉酮酸甲酯和茉莉酸甲酯的范围内, 随着两者浓度的增加, 甘草细胞的生物量下降, MJ抑制细胞生长比二氢茉莉酮酸甲酯强。二氢茉莉酮酸甲酯浓度小于20 μmol·L<sup>-1</sup>时, 其对甘草细胞生长影响不大, 而当二氢茉莉酮酸甲酯和MJ的浓度为120 μmol·L<sup>-1</sup>时, 细胞褐化严重, 可能是大多数细胞已经死亡。(2)在一定浓度二氢茉莉酮酸甲酯和茉莉酸甲酯的范围内, 随着二者浓度的增加, 甘草细胞中总黄酮产量也增加, 二者浓度均为100 μmol·L<sup>-1</sup>时, 甘草细胞中总黄酮产量最大。两者浓度继续增大时, 甘草细胞的总黄酮产量都开始下降, 浓度达到120 μmol·L<sup>-1</sup>时, 甘草细胞的总黄酮产量明显低于不加二氢茉莉酮酸甲酯和MJ的。这说明低浓度二氢茉莉酮酸甲酯和MJ均促进甘草黄酮的积累, 而高浓度的二氢茉莉酮酸甲酯和MJ则有抑制作用。

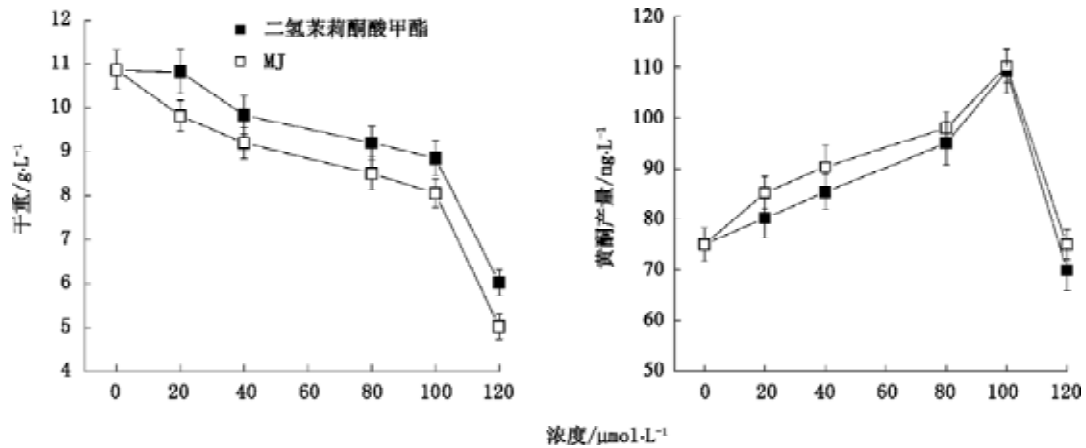


图2 不同浓度二氢茉莉酮酸甲酯和MJ对甘草细胞生长和黄酮积累的影响

Fig.2 Effects of methyl dihydrojasmonate and methyl jasmonate on the cell biomass and flavonoid accumulation

### 3 不同时间添加二氢茉莉酮酸甲酯和MJ对甘草细胞生长和甘草黄酮产量的影响

为了寻找最佳的添加时间,于细胞培养后0、5、10、15 d加入浓度为 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二氢茉莉酮酸甲酯和MJ,培养后20 d收获细胞,测定细胞的生物量和甘草黄酮产量的结果如图3所示,培养开始时0 d加入 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二氢茉莉酮酸甲酯和MJ对细胞的影响最大,细胞褐化现象严重,甘草细胞干重分别仅为不加二氢茉莉酮酸甲酯和MJ的28.3%和35.5%,总黄酮产量也显著比不加二氢茉莉

酮酸甲酯和MJ的低,但于第5天加入浓度为 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二氢茉莉酮酸酯对细胞的生长几乎没有影响,为不加的98.1%,而在第10天加入MJ对细胞的生长影响也最小,为不加二氢茉莉酮酸甲酯和MJ的89.6%。第5天添加二氢茉莉酮酸甲酯对提高黄酮产量最有效,为不加二氢茉莉酮酸甲酯和MJ的1.45倍,达到 $108.26\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;第10天加入MJ能达到最好效果,为不加二氢茉莉酮酸甲酯和MJ的1.47倍,达到 $110.26\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

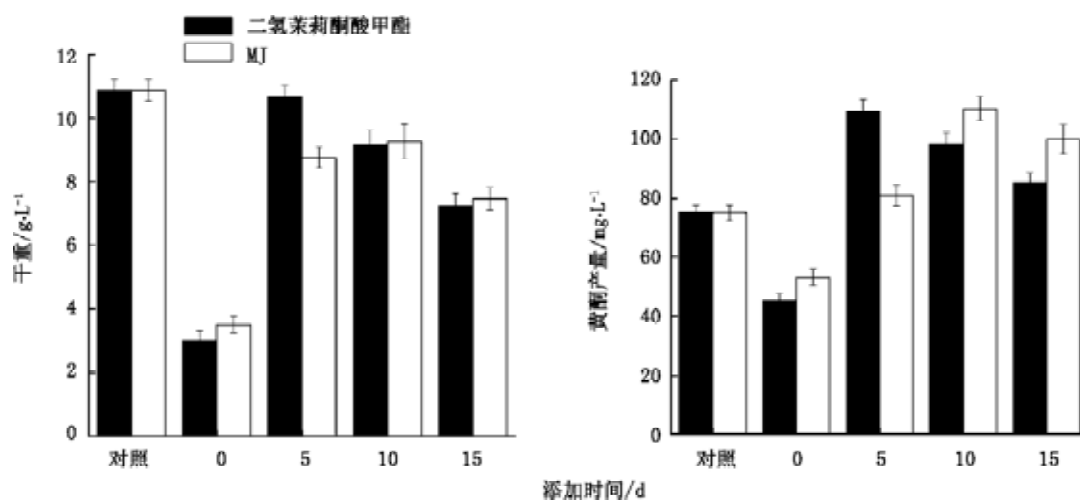


图3 不同时间添加二氢茉莉酮酸甲酯和MJ对甘草细胞生长和黄酮积累的影响

Fig.3 Effects of the addition time of methyl dihydrojasmonate and methyl jasmonate on the cell biomass and flavonoid accumulation

## 参考文献

- 宾金华, 潘瑞焱(1999). 茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗病与过氧化酶活性和木质素含量的关系. 应用与环境生物学报, 5(2): 160~164
- 杜旻, 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
- 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
- 刘燕, 宾金华, 王小菁, 王英强(2007). 茉莉酸及其衍生物与植物有性生殖某些过程的关系. 植物生理学通讯, 43 (2): 211~217
- 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
- 徐亮胜, 薛晓锋, 付春祥, 金治平, 陈毓荃, 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德影响. 吉林农业大学学报, 27 (3): 289~295
- 余龙江, 朱敏, 周莹, 柯轶, 梅兴国(1999). 茉莉酸甲酯对紫杉醇生物合成的诱导作用. 天然产物研究与开发, 11 (5):1~7
- 于树宏, 李玲(2002). 茉莉酸甲酯和 ABA 对野葛毛状根中异黄酮含量的影响. 植物生理学通讯, 38 (4): 344~346
- 张进杰, 徐茂军(2006). NO 和茉莉酸甲酯对黄芩悬浮细胞生长及黄芩苷合成的影响. 植物学通报, 23 (4): 374~379
- 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