

几种外源含氮化合物对草麻黄愈伤组织增殖和麻黄碱含量的影响

杨广兴¹, 李胜^{1,2,*}, 李唯¹, 张真¹, 李婷¹, 王新宇², 杨德龙¹, 王彦军¹

¹甘肃农业大学生命科学技术学院植物组织培养研究室, 兰州 730070; ²兰州大学生命科学学院细胞生物学研究所, 兰州 730000

摘要: 在 20 和 40 mg·L⁻¹ 的亚硝酸钠以及 50 mg·L⁻¹ 的苯丙氨酸处理下草麻黄茎段愈伤组织增殖量增大, 而酪氨酸和蛋氨酸处理的愈伤组织增殖量则下降, 且随着这类外源物质浓度的增大其下降幅度也增大。60 mg·L⁻¹ 蛋氨酸、20 mg·L⁻¹ 酪氨酸和 50 mg·L⁻¹ 苯丙氨酸可以有效提高草麻黄愈伤组织中麻黄碱的生成量。

关键词: 生物量; 水分散失量; 添加物; 愈伤组织

Effects of Extro-Nitrogenous Compounds on Callus Multiplication and Ephedrine Production in *Ephedra sinica* Stapf Cell Culture

YANG Guang-Xing¹, LI Sheng^{1,2,*}, LI Wei¹, ZHANG Zhen¹, LI Ting¹, WANG Xin-Yu², YANG De-Long¹, WANG Yan-Jun¹

¹Laboratory for Plant Tissue Culture, College of Life Science & Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; ²Institute for Cell Biology, School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Multiplication of the calli from *E. sinica* stem increased under supplementing with 20 and 40 mg·L⁻¹ sodium nitrite and 50 mg·L⁻¹ phenylalanine. However, adding ammonia and methionine in medium made callus multiplication decreased, and the higher the concentration of them, the lower the callus multiplication ability. It's effective to enhance the production of ephedrine in the callus under supplementing with 60 mg·L⁻¹ methionine, 20 mg·L⁻¹ ammonia and 50 mg·L⁻¹ phenylalanine.

Key words: biomass; water loss amount; superaddition; callus

草麻黄(*E. sinica*)是麻黄属的一种草本状小灌木, 从中提取的麻黄碱具有兴奋中枢神经、发汗、利尿、抗过敏等作用, 是制药业提取麻黄素的重要原料(林盛秋 1989)。目前在国际上, 麻黄碱的人工合成工艺虽已成熟, 但由于从植物中提取成本低, 副作用小等优点, 所以人工合成所占比例并不高, 麻黄碱的生产仍主要从麻黄草中提取。本文以草麻黄愈伤组织为研究对象, 用几种含氮化合物作处理后, 测定其麻黄碱含量变化, 以期对麻黄碱的生物合成进行有效控制, 为麻黄碱的植物细胞规模化生产提供前期参考。

材料与方 法

材料是我们研究室从草麻黄(*Ephedra sinica* stapf) 无菌苗茎段诱导并继代保存2年的草麻黄愈伤组织。诱导培养基为 MS+1.1 mg·L⁻¹ 2, 4-D+0.2 mg·L⁻¹ KT, 继代培养基为 MS+0.5 mg·L⁻¹ 2, 4-D+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA (高玉红等2005)。愈伤组织转移到含不同浓度亚硝酸钠(NaNO₂)、蛋氨酸(Met)、

酪氨酸(Try)和苯丙氨酸(Phe)的继代培养基(表1)中培养(光强为 17.34 μmol·m⁻²·s⁻¹, 24 h 照光, 温度为 25 °C±2 °C), 每瓶接种大小一致的 5 块愈伤

表1 添加物的种类与浓度

Table 1 Type and concentration of the substances

添加物	添加物浓度/ mg·L ⁻¹				
	对照	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4
NaNO ₂	0	20	40	60	80
Met	0	60	100	140	180
Try	0	20	40	60	80
Phe	0	25	50	75	100

收稿 2006-09-15 修定 2007-01-08

资助 兰州大学博士后基金(31455)、甘肃省自然科学基金(3ZS051-A25-063)、甘肃农业大学科技创新基金(GAU-CX0515)和甘肃农业大学大学生科学研究训练计划基金(GAU-030602)。

*通讯作者(E-mail: lish@gsau.edu.cn; Tel: 0931-7631547)。

组织。实验设1个对照和16个处理,每个处理20个重复。每2d称重(三角瓶+瓶塞+培养基+愈伤组织)1次,根据起始重(瓶重+瓶塞重+培养基重)计算出测定时愈伤组织重量(不考虑培养基的水分散失)。为了排除水分散失造成的误差,以含有培养基但不含愈伤组织的培养瓶为对照,重复20个,每2d同时测定该培养瓶的总重量(含瓶塞),30d后根据起始重与测定值的差值计算出水分散失的累积量,根据水分散失累积量及时间建立水分散失量(y)与培养时间(x)的方程式 $y=0.4854x+1.0782$, $r=0.9885$ 。然后根据公式: $M=(M_n+W_n)$ ($n\leq 30$)计算出测定当天愈伤组织实际的生物量。式中: M 为第 n 天时的愈伤组织实际重量; M_n 为第 n 天时的测定重量; W_n 为依据上述方程计算出的第 n 天时培养基的水分散失累积量。所有培养基均附加3%蔗糖,0.4%琼脂,pH为5.8,121℃灭菌20min。各种生长调节物质和氨基酸在灭菌前制备培养基时加入。

麻黄碱提取按以下流程:(1)取继代培养30d的草麻黄愈伤组织在105℃下杀青,再于80℃中烘干至恒重。(2)称取2~5g愈伤组织(干重),研成粉末,转入50mL的三角瓶中,加入0.2%的稀HCl浸泡一昼夜。(3)滤去残渣,收集滤液,用饱和 Na_2CO_3 溶液调节滤液pH至10。(4)将上述浸提液以NaCl饱和,后用30mL乙醚分3次萃取,合并乙醚萃取液,在45℃水浴中蒸干乙醚,得到麻黄碱粗提物(展雪峰等1995)。

麻黄碱含量按以下流程测定:(1)精确称取盐酸麻黄碱100.2mg置于100mL容量瓶中,加水溶解至100mL,摇匀制成 $1.002\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品的贮备液。(2)精确吸取5mL置于50mL容量瓶中,加水至刻度摇匀,制成A液。(3)精确吸取1、3、5、7、9、11、13mLA液,分别置于50mL容量瓶中,加入10mL次氯酸钠溶液,再依次加入19、17、15、13、11、9、7mL蒸馏水,至总体积为30mL,于40℃水浴中保温20min,冷却到室温,定容至50mL,摇匀。空白对照液不加样品,其他方法与上相同。(4)用S2000型紫外分光光度计测定波长在249nm处的吸光度,经回归处理得回归方程: $A=6.12\times 10^{-4}+6.618\times 10^{-2}C$, $r=0.9996$ [A:麻黄碱含量($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$);

C:249nm下的吸光度值]。

测定样品中麻黄碱含量时,在盛有麻黄碱粗提物的50mL三角瓶中加入10mL浓度为1%的次氯酸钠溶液,再加入蒸馏水20mL,放在40℃水浴中保温20min后,冷却到室温,再定溶至50mL;用紫外分光光度计测定溶液的吸光度(龙进2004)。最终所得的数据用Duncan新复极差法进行分析。

结果与讨论

1 不同外源含氮化合物对草麻黄愈伤组织增殖的影响

不含 NaNO_2 的培养基上,愈伤组织在前14d内迅速增长,12d后达到高峰,14d后,重量开始下降。浓度1下的愈伤组织生物量保持持续上升趋势,30d后的总生物量比不加 NaNO_2 的高。浓度2下的愈伤组织早期保持缓慢增长的趋势,14d后缓慢下降,22d又开始缓慢增加,30d后的最终生物量又增加。浓度3和浓度4下的愈伤组织生长速度均显著低于不加 NaNO_2 的(图1-a)。

在不同浓度Met、Try或Phe培养基上的愈伤组织虽然与对照的生长变化基本相同,即在前12~14d迅速增长,14d时达到最高,14d后开始下降,24d时最低,此后,又都缓慢回升。但在含Met、Try或Phe的培养基上的愈伤组织生长均显著比不加这些物质的差,表明添加外源的Met、Try或Phe不利于草麻黄愈伤组织生长(图1-b~d)。

第30天数据的差异显著性分析表明,在含不同浓度 NaNO_2 的培养基上,浓度1与浓度2下愈伤组织的重量均高于不加添加物的,并达极显著水平,浓度1下的效果最佳;在含不同浓度Met或Try的培养基上的草麻黄愈伤组织生长速度均显著低于不加添加物的;而在含 $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Phe的培养基上,草麻黄愈伤组织生长速度略高于不加添加物的。从愈伤组织增殖生物量来看,培养基中附加 $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaNO}_2$ 的增殖水平最佳。

2 不同外源物对草麻黄愈伤组织中麻黄碱含量的影响

由表2可知,与不加添加物的相比,培养基

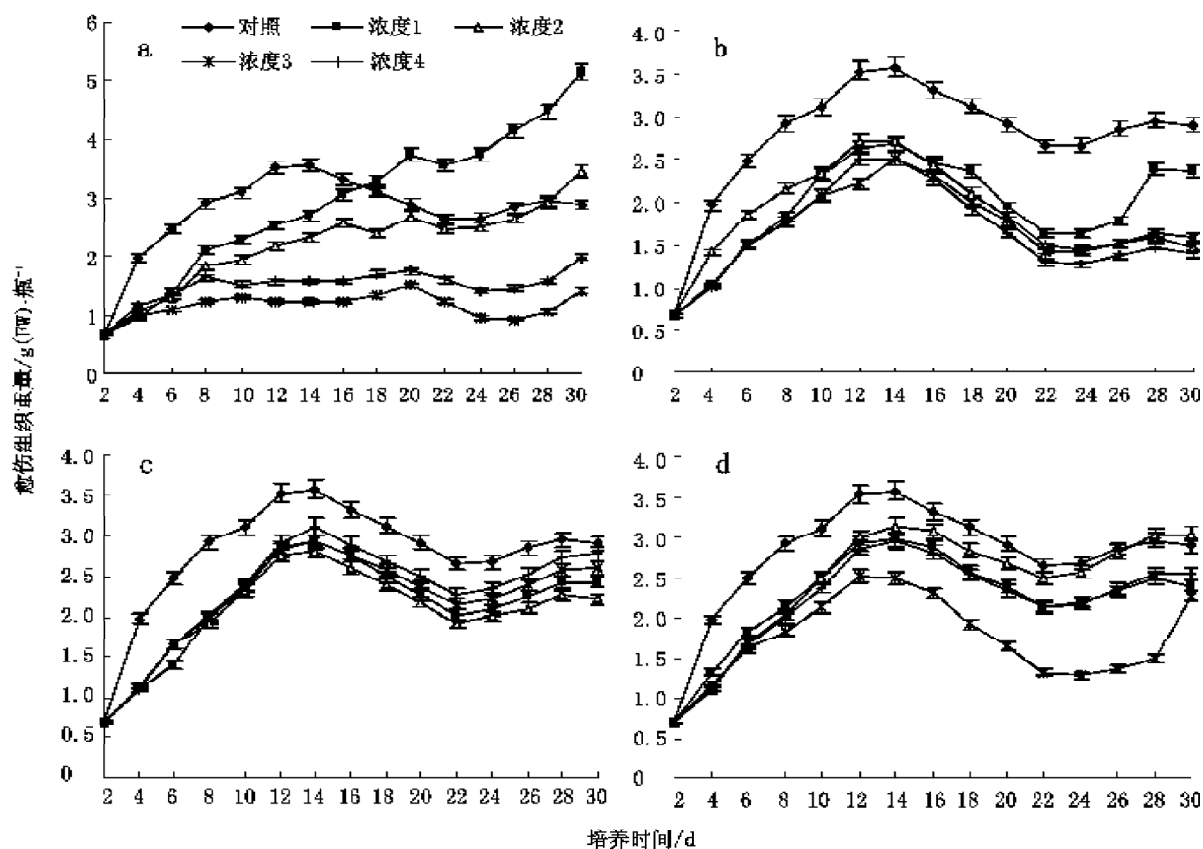


图1 亚硝酸钠和几种氨基酸对草麻黄愈伤组织增殖的影响

Fig.1 Effects of sodium nitrite and several kinds of amino acids on the multiplication of *E. sinica* callus

a: 亚硝酸钠各浓度; b: 蛋氨酸各浓度; c: 酪氨酸各浓度; d: 苯丙氨酸各浓度。

表2 不同含氮化合物对草麻黄愈伤组织中麻黄碱含量的影响

Table 2 Effects of different nitrogenous compounds on content of ephedrine in *E. sinica* callus

添加物	麻黄愈伤组织中麻黄碱的含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)				
	对照	添加物浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			
		浓度1	浓度2	浓度3	浓度4
NaNO_2	$0.1541\pm 0.0072^{\text{Aa}}$	$0.05328\pm 0.015^{\text{Bc}}$	$0.04975\pm 0.024^{\text{Bc}}$	$0.08399\pm 0.003^{\text{Bb}}$	0^{Cd}
Met	$0.1541\pm 0.0015^{\text{Bb}}$	$0.1775\pm 0.025^{\text{Aa}}$	$0.04463\pm 0.013^{\text{Dd}}$	$0.1346\pm 0.008^{\text{Cc}}$	$0.07209\pm 0.001^{\text{CDcd}}$
Try	$0.1541\pm 0.015^{\text{Bb}}$	$0.2387\pm 0.017^{\text{Aa}}$	$0.01165\pm 0.019^{\text{Cc}}$	0^{Dd}	0^{Dd}
Phe	$0.1541\pm 0.023^{\text{Aba}}$	$0.04678\pm 0.032^{\text{Dd}}$	$0.1748\pm 0.029^{\text{Aa}}$	$0.09173\pm 0.001^{\text{Cc}}$	$0.1282\pm 0.002^{\text{Bb}}$

表中数据代表 20 个重复的平均值。

中附加 $20\sim 80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaNO_2 的草麻黄愈伤组织中麻黄碱含量均显著下降, 附加 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Try、 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Met 或 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Phe 的则显著增加, 分别增加 1.5 倍、1.2 倍和 1.1 倍, 而附加其他浓度的 Try、Met 或 Phe 则显著下降。附加 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

NaNO_2 或 60 和 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Try 的草麻黄碱含量增长完全受抑制。

根据同一种营养添加物对草麻黄愈伤组织增殖和麻黄碱含量的不同影响的结果(图 1、表 3), 我们认为应从草麻黄愈伤组织的增殖和麻黄碱含量

表3 不同含氮化合物对愈伤组织中麻黄碱总量的影响

Table 3 Effects of different nitrogenous compounds on total content of ephedrine in *E. sinica* callus

添加物	麻黄愈伤组织中麻黄碱的含量/ 10^{-2} mg (FW)·瓶 ⁻¹				
	对照	添加物浓度/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)			
		浓度1	浓度2	浓度3	浓度4
NaNO ₂	0.8370±0.023 ^{Cc}	1.9010±0.123 ^{Aa}	1.4990±0.079 ^{Bb}	0.8420±0.010 ^{Cc}	0 ^{Dd}
Met	0.8370±0.032 ^{Bbc}	2.4970±0.089 ^{Aa}	0.3790±0.029 ^{Cd}	1.0910±0.021 ^{Bb}	0.6220 ^{BcCd}
Try	0.8370±0.012 ^{Bb}	3.0100±0.051 ^{Aa}	0.1860±0.081 ^{Cc}	0 ^{Dd}	0 ^{Cd}
Phe	0.8370±0.041 ^{Cc}	0.5060±0.028 ^{Cd}	2.5470±0.012 ^{Aa}	1.2730±0.065 ^{Bb}	1.2670±0.021 ^{Bb}

表中数据为每个三角瓶的愈伤组织中麻黄碱平均含量。

或者合成量来评价草麻黄碱产量的高低。按麻黄碱的平均含量和每瓶愈伤组织平均产量计算每个处理的麻黄碱平均产量(麻黄碱平均含量×愈伤组织平均重量),从差异显著性分析的结果中可以看出,NaNO₂(浓度1)、NaNO₂(浓度2)、Try(浓度1)、Met(浓度1)、Phe(浓度2)、Phe(浓度3)和Phe(浓度4)的麻黄碱总量与不加添加物之间差异极显著,其中Met(浓度1)、Try(浓度1)和Phe(浓度2)与不加添加物的差异最大,分别为不加添加物的2.9倍、3.6倍和3.0倍。

Robinson(1955)认为麻黄碱是由酪氨酸和丙氨酸为起始物合成的。原子示踪技术证明,在麻黄植物中对二甲氨基苯酚是由酪氨酸和酪胺合成的,其会进一步形成麻黄碱。Yamasaki等(1969)根据原子示踪技术研究山岭麻黄(*E. geradiana*)代谢途径,认为麻黄碱的合成是由苯丙氨酸开始经过肉桂酸和未确定的C₂-N的碎片合成的(Robinson 1955; Yamasaki等1969, 1973)。由此可知Met、Try和Phe通常用作麻黄碱合成的前体物。据此可以推测,在麻黄愈伤组织增殖培养基中附加一定浓度的Met、Try和Phe可望提高愈伤组织中麻黄碱的合成量。本文结果也间接证实了这一推断。NaNO₂在植物的代谢中起作用。本文结果表明,

从麻黄碱的生成量来看,NaNO₂的效果次于上述3种氨基酸添加物,而且其提取成分中NO₂⁻含量增加,降低了麻黄碱生产的安全性(即碱中NO₂⁻含量增加)。因而NaNO₂在麻黄愈伤组织中的增殖和麻黄碱合成中的作用应作综合分析和评价。

参考文献

- 高玉红,李胜,张真,武季玲,牛俊义,杨广兴,李婷,姜寒玉,汪建政(2005).麻黄愈伤组织诱导及倍性鉴定.甘肃农业大学学报,12(6):737~740
- 林盛秋(1989).东北药用植物.哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,55~75
- 龙进(2004).紫外分光光度法测定呖麻滴鼻液中盐酸麻黄碱的含量.中国基层医药,11(6):649~650
- 卢萍,恩和巴雅尔,耿星河,王振兴(2001).不同激素配比培养基条件下麻黄愈伤组织鲜重增长量和相对生长速率的变化.内蒙古师范大学学报,30(4):352~354
- 展雪峰,李明,张明文(1995).生药麻黄中麻黄碱含量测定新探.中草药,26(6):300~301
- Robinson R(1955).Structural Relation of Natural Productions. London: Oxford, 54
- Yamasaki K, Sankawa U, Shibata S(1969).Biosynthesis of ephedrine in *Ephedra* participation of C₆-C₁ unit. Tetrahedron Lett, 47: 4099~4102
- Yamasaki K, Tamaki T, Uzawa S, Sankawa U, Shibata S(1973).Participation of C₆-C₁ unit in the biosynthesis of ephedrine in *Ephedra*. Phytochemistry, 12: 2877~2882