

两种金属离子对黄芩愈伤组织培养 及其次生代谢物积累的影响

孟庆华 张 拴 赵莉平

(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

摘 要 目的 研究 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 离子对黄芩组织培养过程中组织生长量和次生代谢物积累的影响。方法 进行黄芩愈伤组织的诱导、分化, 然后改变 MS 培养基中 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 的含量进行继代培养; 提取所得黄芩愈伤组织中的黄酮类化合物, 分别用紫外可见分光光度法和高效液相色谱法测定了总黄酮和黄芩苷的含量。结果 有利于黄芩愈伤组织生长的金属离子浓度为: Fe^{2+} 0.15 mmol/L、 Mn^{2+} 0.2 mmol/L; 增大 Mn^{2+} 浓度到 1.5 mmol/L 有利于黄酮类次生代谢物生物合成; 而高浓度的 Fe^{2+} 有利于黄芩苷的生物合成。结论 通过调节金属离子含量可以有效的提高黄芩愈伤组织生长率并显著提高其有效成分的含量。

关键词 黄芩; 总黄酮; 黄芩苷; 愈伤组织培养

中图分类号: R969.1 **文献标识码**: B **文章编号**: 1002-168X(2007)05-0086-02

黄芩为唇形科植物 *Scutellaria Baicalensis* Georgi 的干燥根, 其味苦性寒, 具有清热、燥湿、解毒、止血之功效^[1]; 用于治疗发热烦渴、肺热咳嗽等症, 临床疗效确切, 为常用中药之一。含数种黄酮类物质, 黄芩苷 (Baicalin) 是其主要有效成分。目前国内外对黄芩苷的研究主要集中在抗氧化^[2], 抗 HIV^[3-4] 和消除自由基^[5] 等方面, 从而带动了生物技术在活性成分的组织培养等方面的开发和应用, 因此受到普遍关注^[6-8]。近年来, 由于临床用药需求的增大和中药野生资源的破坏, 组织培养成为解决黄芩资源短缺有效途径之一。国内外对黄芩组织培养的研究主要集中在快繁技术和利用毛状根培养系统提高次生代谢物的产量上^[9-10]。对于培养基组成, 大多研究是从碳源、氮源、有机添加物等方面来探讨的^[9-11]。植物体内有效成分合成主要与酶活性有关, 而酶的活性又受培养条件下金属离子种类和浓度影响。本文采用植物组织培养方法, 通过改变培养基中 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 离子的浓度, 对黄芩愈伤组织生长及总黄酮和黄芩苷含量变化进行了研究。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪 (岛津 LC-4A), 7551 型紫外可见分光光度计 (上海分析仪器厂), 超净工作台 (苏州安泰), 超声波提取仪 (中航七院)。

1.2 试剂与药品 95% 乙醇, 水 (重蒸馏水), MS 培养基, 萘乙酸, 6-苄基嘌呤 (AR 级), 黄芩苷对照品 (自制, 经光谱鉴定)。

1.3 黄芩愈伤组织的诱导培养

1.3.1 培养基的组成 MS + 2.0 mg/L6-BA + 0.50 mg/LNAA + 2% 蔗糖 + 0.6% 琼脂

1.3.2 诱导条件 诱导温度: $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照时间: 16 h/d, 光强: 1200 L lux。

1.3.3 黄芩愈伤组织的来源 黄芩种子由天津天士力制药集团商洛药源基地提供并经鉴定。取黄芩种子用水漂洗干净后用 75% 乙醇消毒 1 min, 转入 2% 次氯酸钠溶液中消毒 10 min, 无菌水冲洗 5 次, 接种在 MS 培养基上萌发, 约 2 周后获得无菌

苗。取黄芩子叶, 在上述诱导条件下 40 d 生成黄芩愈伤组织。

1.4 金属离子浓度的调节

在 MS 培养基中, Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度均为 0.1 mmol/L。分别配制浓度为原 MS 培养基中各离子 0.05、1.0、1.5 和 2.0 倍¹⁻² 的培养基, 调节 PH 值为 6.00 进行高温灭菌处理。对 1.3.3 项下诱导出的黄芩愈伤组织于 25℃ 光照下继代培养 21 d。每种培养基接种 10 瓶, 每瓶接种组织 4~5 块, 并分别称取实验前后的愈伤组织鲜重, 计算其生长率, 计算公式为: 生长率 = (生长量 - 接种量) / 接种量。

1.5 黄芩愈伤组织中总黄酮含量的测定

1.5.1 标准工作曲线制作 精密称 25 mg 黄芩苷标准品, 用 70% 的乙醇配制浓度为 0.02 mg/mL 的标准溶液。分别取该溶液 1、2、3、4、5 和 6 mL 定容到 10 mL 容量瓶中, 得浓度分别为 0.002、0.004、0.006、0.008、0.01 和 0.012 mg/mL 的黄芩苷溶液。在紫外可见分光光度计上于 279 nm 处, 测定其吸光度, 得线性回归线方程: $Y = 61.6X - 0.0262$, $R = 0.998$

1.5.2 总黄酮的提取^[1-3] 将各种培养条件下所得愈伤组织于 60℃ 下干燥至恒重, 研细后准确称取 0.1 g, 分别加入试管内, 再加入 10 mL 70% 的乙醇, 超声提取 30 min, 过滤。重复 2 次, 将三次滤液合并, 定容至 50 mL, 再取该溶液 1 mL 定容至 10 mL 容量瓶中, 待测。

1.5.3 总黄酮含量的测定 在 279 nm 处, 用 70% 的乙醇做空白试剂测定其吸光度, 代入 1.5.1 项下的回归方程计算各样品中总黄酮含量。

1.6 黄芩苷含量测定^[14-15]

1.6.1 HPLC 法的色谱条件 色谱柱: 4 mm × 250 mm C_{18} 柱, 流动相: 甲醇 - 水 - 磷酸 (60:40:0.2), 进样量 10 μL , 流速 1 mL/min, 感量 0.16 AUFS, 柱温 30℃。

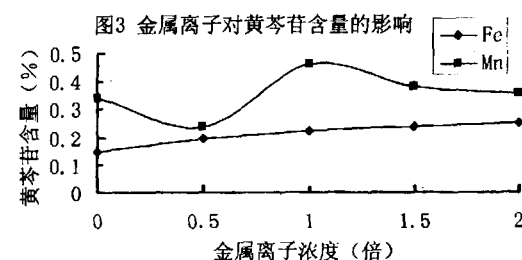
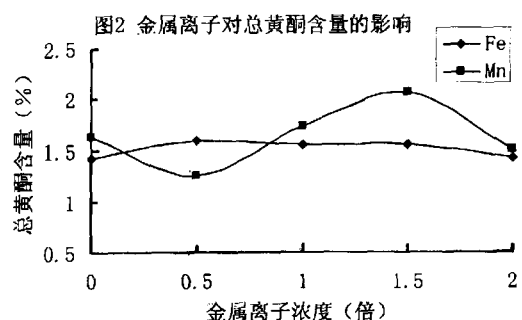
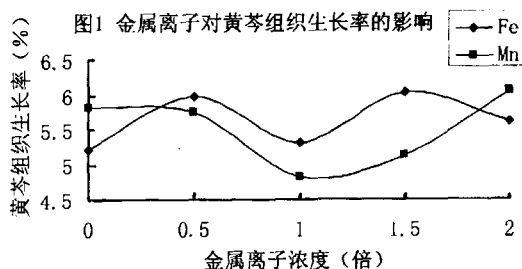
1.6.2 工作曲线 取黄芩苷标准溶液 (浓度为 0.05 mg/mL) 1、2、3、4、5 和 6 μL , 依次进样分析。根据黄芩苷的含量 (X) 和峰积分面积 (Y) 计算得

回归方程: $Y = 3.32740X - 12.76147$, $R = 0.9998$ 。

1.6.3 黄芩苷的提取 各培养条件下所得的黄芩愈伤组织于 60°C 下干燥至恒重, 研细, 准确称取 250 mg , 装入试管内, 各加 10 mL 甲醇, 超声提取 30 min , 过滤, 重复 2 次, 合并三次滤液, 定容至 50 mL , 待测。

1.6.4 样品中黄芩苷含量的测定 取 1.6.3 项下样品提取液各 $10\text{ }\mu\text{L}$ 进样分析, 将测定数据代入 1.6.2 中的回归方程计算各样品中黄芩苷含量。

2 结果与讨论



2.1 Fe^{2+} 对黄芩愈伤组织生长及黄酮类化合物含量的影响

Fe^{2+} 对愈伤组织生长的影响如图 1 所示。增加或减少 MS 培养基中的 Fe^{2+} 都能促进黄芩组织的增殖, 0.15 mmol/L 为最佳浓度。培养基中无 Fe^{2+} 会抑制黄芩组织的增殖。 Fe^{2+} 主要参与细胞呼吸作用中的电子传递, 此外也是过氧化氢酶和过氧化物酶的组成成分。不添加 Fe^{2+} 会直接影响细胞色素的形成而影响呼吸作用, 因而抑制了细胞的分裂。

图 2 可以看到 Fe^{2+} 对黄芩愈伤组织中黄酮类物质的影响, 增加或减少 MS 培养基中的 Fe^{2+} 都对黄芩愈伤组织中黄酮类物质的生物合成影响不大, 这说明 MS 培养基中的 Fe^{2+} 浓度可以满足黄酮类物质的生物合成需要。

图 3 表明增大培养基中 Fe^{2+} 的浓度可促进黄

芩愈伤组织中黄芩苷的合成。

2.2 Mn^{2+} 对黄芩愈伤组织生长及黄酮类化合物含量的影响

如图 1 中所示, 无论增加还是减少其浓度, 都明显促进了愈伤组织生长, 当 Mn^{2+} 浓度为 0.2 mmol/L 时, 作用最显著。从图 2 可以看出, Mn^{2+} 在 1.5 倍浓度 (0.15 mmol/L) 时, 总黄酮的含量有所增长。图 3 表明原 MS 培养基中的 Mn^{2+} 浓度能满足黄芩苷生物合成需要。

MS 培养基中的 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度的改变均能影响黄芩组织的生长, 最佳浓度依次为: $\text{Fe}^{2+} 0.15\text{ mmol/L}$ 和 $\text{Mn}^{2+} 0.2\text{ mmol/L}$; 增大 Mn^{2+} 浓度到原浓度的 1.5 倍浓度有利于黄芩愈伤组织中黄酮类次生代谢物生物合成; 高浓度的 Fe^{2+} 有利于黄芩愈伤组织中黄芩苷的生物合成。

参考文献

- [1] ChP (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Yoshino M, Murakami K. Interaction of Iron with polyphenolic compounds application to antioxidant characterization [J]. Anal Biochem, 1998, 257: 40.
- [3] Li B Q, Fu T, Yao D Y, et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 276(2): 534.
- [4] Kitamura K, Honda M, Yoshizki H, et al. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production in vitro [J]. Antiviral Res, 1998, 37: 131.
- [5] Gao Z H, Huang K X, Yang X L, et al. Free radical scavenging and antioxidant activity of flavonoids extracted from the radix of Scutellaria baicalensis Georgi [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1472: 643.
- [6] Teresa K, Bao Q L, Howard A Y. The flavonoid baicalin inhibit superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines [J]. FEBS Lett, 2001, 500: 52.
- [7] Ishimaru K, Nishikawa K, Omoto T, et al. Two flavone-2-glucosides from Scutellaria baicalensis [J]. Phytochemistry, 1995, 40(1): 279.
- [8] Li H B, Yue J, Chen F. Separation methods used for Scutellaria baicalensis active components [J]. Chromatogr Abstr, 2004, 812: 277.
- [9] Gao S L, Chen B J. Optimization on cloning rapid-propagation technology by tissue culture in Scutellaria baicalensis [J]. Chin Tradit herb drugs (中草药), 2004, 35(3): 312.
- [10] Nishikawa K, Furukawa H, Fuji H, et al. Flavone production in transformed root cultures of Scutellaria baicalensis Georgi [J]. Phytochemistry, 1999, 52: 885.
- [11] 王梦亮, 任振兴, 黄登宇, 等. 黄芩愈伤组织培养及黄芩苷合成调控的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(6): 924-928.
- [12] 郭志刚, 冯莹, 刘瑞芝. 无机元素对紫杉醇和紫杉烷类化合物生物合成的调控作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(5): 23-27.
- [13] 郭孝武, 张福成, 林书玉. 超声提取对黄芩苷成分提出率的影 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19(6): 348.
- [14] 杜海燕, 马静. HPLC 法测定黄芩提取物中黄芩苷的含量 [J]. 中草药, 2001, 32(8): 706.
- [15] 李守拙, 李沈明. 黄芩茎叶中野黄芩苷含量测定 [J]. 中草药, 2000, 31(12): 910.

(收稿日期: 2007-04-06; 修回日期: 2007-05-19)