

诱导子和前体物质对明党参悬浮细胞中3种呋喃香豆素合成的影响

周萍¹，谢晨琼¹，陈建伟^{1,2*}，李祥^{1,3}

(1. 南京中医药大学药学院，江苏南京210046；2. 江苏省方剂研究重点实验室，江苏南京210046；
3. 江苏省中药炮制重点实验室，江苏南京210029)

摘要：目的 考察诱导子（水杨酸、茉莉酸甲酯、酵母浸出物）和前体物质（L-苯丙氨酸）对明党参 *Changium smyrnioides* Wolff. 悬浮细胞中呋喃香豆素（佛手酚、佛手柑内酯和花椒毒素）合成的影响。方法 在悬浮细胞稳定期前加入诱导子及前体物质，以悬浮细胞增长量和呋喃香豆素含有量为指标，选择最佳质量浓度及诱导时间。结果 水杨酸和茉莉酸甲酯可明显促进佛手酚、佛手柑内酯和花椒毒素的合成。其中，200 μmol/L 水杨酸可使其含有量达到最高，分别为0.654%、0.293% 和0.060%。最佳诱导时间为8 d。结论 水杨酸和茉莉酸甲酯增加了明党参悬浮细胞中呋喃香豆素的含有量。

关键词：明党参；悬浮细胞；诱导子；前体物质；呋喃香豆素；合成

中图分类号：R284.1 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2016)08-1760-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.021

Effects of elicitors and precursor on the syntheses of three furocoumarins in *Changium smyrnioides* suspension cells

ZHOU Ping¹，XIE Chen-qiong¹，CHEN Jian-wei^{1,2*}，LI Xiang^{1,3}

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Jiangsu Provincial Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulæ Research, Nanjing 210046, China; 3. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of elicitors (salicylic acid, methyl jasmonate and yeast extract) and precursor (*L*-phenylalanine) on syntheses of furocoumarins (bergaptol, bergapten and xanthotoxin) in *Changium smyrnioides* Wolff. suspension cells. **METHODS** The elicitors and precursor were added into suspension cells before stable-phase. With growth of suspension cells and contents of furocoumarins with indices, the best concentrations and induction time were selected. **RESULTS** Salicylic acid and methyl jasmonate could promote the syntheses of bergaptol, bergapten and xanthotoxin. Among them, 200 μmol/L salicylic acid made their contents reach the highest (0.654%, 0.293% and 0.060%, respectively). The best induction time was 8 d. **CONCLUSION** Salicylic acid and methyl jasmonate increase the contents of furocoumarins in *C. smyrnioides* suspension cells.

KEY WORDS: *Changium smyrnioides* Wolff. ; suspension cells; elicitors; precursor; furocoumarins; syntheses

明党参 *Changium smyrnioides* Wolff. 是我国特有的伞形科单种属植物，具有润肺化痰、养阴和胃、解毒等功效，它既是药性缓和的补益药，又是疗效较好的祛痰止咳平喘药^[1]。该植物分布于江苏、安徽、浙江等省，为华东地区著名药材之一，

是我国外贸出口的重要药材品种，畅销东南亚，在当地作药膳及滋补强壮剂使用，这与其中含有量丰富的呋喃香豆素具有抗疲劳及增强自身免疫能力的功效相一致，而且该成分具有抗凝血、抗肿瘤、抗艾滋病、抗癫痫和治疗皮肤病等功效，如花椒毒素

收稿日期：2015-11-10

基金项目：江苏高校优势学科建设工程资助项目（ysxk-2010）；国家教育部博士点基金（200803150009）；江苏省自然科学基金资助项目（BK2003107）

作者简介：周萍（1991—），女，硕士生，从事药用植物组织培养研究。E-mail: zhoupingley@163.com

*通信作者：陈建伟（1955—），男，教授，博士生导师，从事中药品质评价与中药生物技术研究。Tel: (025) 85811280, E-mail: chenjw695@126.com

能保护动物抵抗最大电击诱发癫痫发作^[2]，而佛手柑内酯光敏活性强，可应用于牛皮癣、白癜风等皮肤病的治疗^[3]。

由于人类的过度利用及自身生物学特性，明党参分布区和个体数目正日益减少，1984年被列为国家三级濒危保护植物。而植物细胞培养技术是名贵药用植物资源可持续发展的一条重要途径，不受季节和气候影响，并可通过多种方式有效调节植物细胞次生代谢产物的含有量，其中诱导子就已成为大幅度提高植物细胞和组织培养中次生代谢产物的最有效方法之一^[4]。目前，已有关于明党参组织培养及悬浮培养条件建立的研究报道，主要研究其中多糖的含有量^[5]，但尚未见关于利用添加不同诱导子、前体物质来提高呋喃香豆素含有量的相关研究。因此，本实验主要考察非生物诱导子茉莉酸甲酯(MeJA)、水杨酸(SA)，生物诱导子酵母浸出物(YEF)及前体物质L-苯丙氨酸(PHE)对明党参悬浮细胞生长和呋喃香豆素合成的影响，筛选能有效提高该成分含有量的诱导子。另一方面，诱导子的添加能使明党参悬浮细胞中呋喃香豆素种类有所增加，对其生物合成途径的推测有一定意义。

1 材料

药材采自南京中医药大学药苑，经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为伞形科植物明党参 *Changium smyrnioides* Wolff. 的新鲜植株。所用对照品均为本实验室从明党参根皮中分离得到，鉴定为珊瑚菜内酯、佛手酚、佛手柑内酯、花椒毒素，含有量均大于98%。

1.1 愈伤组织的诱导 选取生长良好的明党参幼嫩叶片，洗净后流动自来水冲洗1 h，在超净台依次用75%乙醇消毒30 s，0.1%升汞消毒10 min，无菌水冲洗5次，切成5 mm²的小块，接种于植物激素为1.5 mg/L萘乙酸+0.5 mg/L2,4-二氯苯氧乙酸+0.2 mg/L6-糠氨基嘌呤+0.5 mg/L6-苄氨基嘌呤的MS培养基中^[6]，24 ℃下暗处培养，30 d后开始继代，每隔20 d再继代1~2次。

1.2 细胞悬浮培养的建立 选取疏松、易碎、生长良好的愈伤组织10 g，接种于装有200 mL MS液体培养基的三角瓶中，24 ℃、120 r/min悬浮震荡暗处培养。7 d后，将细胞悬浮培养物过80目镍网过滤，滤液分装继续培养，每15 d继代一次，选取生长良好的悬浮细胞继代多次，得到明党参悬浮培养细胞液。

2 方法

2.1 诱导试验方案

2.1.1 最适浓度考察 将悬浮培养液分装于含250 mL培养液的三角瓶内，培养15 d后(指数生长之前)加入无菌的不同浓度水杨酸、茉莉酸甲酯、L-苯丙氨酸、酵母浸出物，以未添加诱导子的组为对照，培养8 d后收集细胞。

2.1.2 最佳诱导时间考察 选择最佳浓度的诱导子，与明党参悬浮细胞共同培养，于第2、4、6、8天测定细胞数目及呋喃香豆素含有量，结果见表1。

表1 诱导子及前体物质的浓度

Tab. 1 Concentrations of elicitors and precursor substance

成分	浓度		
	1	2	3
水杨酸	50 μmol/L	100 μmol/L	200 μmol/L
茉莉酸甲酯	100 μmol/L	200 μmol/L	300 μmol/L
L-苯丙氨酸	2 mg/L	4 mg/L	8 mg/L
酵母浸出物	0.1 g/L	0.4 g/L	0.8 g/L

2.2 明党参悬浮细胞生物量的测定 将悬浮细胞液置于超净台上，移取摇匀的细胞液于细胞计数板上，显微镜下计算细胞数目，计算公式为生物增长量=(收获时细胞数目-接种时细胞数目)/接种时细胞数目。

2.3 明党参悬浮细胞中呋喃香豆素含有量测定

2.3.1 呋喃香豆素含有量 在超净台中取5.0 mL明党参悬浮细胞液，冷冻干燥后甲醇超声提取4次，每次15 min，过滤，甲醇定容至50 mL量瓶中，以甲醇为空白试剂，于268 nm^[7]波长处测定。

2.3.2 佛手酚、佛手柑内酯和花椒毒酚含有量 将明党参悬浮培养物过滤，滤液旋干，甲醇溶解，过滤后定容于100 mL量瓶中，即为细胞外液。将过滤得到的明党参细胞冷冻干燥至恒重，粉碎，精密称取0.50 mg，用滤纸包好，置于索氏提取器中，加入80 mL甲醇提取1 h，定容于100 mL量瓶中，即为细胞粗提物。将明党参细胞外液和细胞粗提物过0.22 μm微孔滤膜，按表2洗脱程序进行测定，线性关系见表3。

表2 梯度洗脱程序

Tab. 2 Gradient elution programs

时间/min	A 甲醇/%	水 B/%
0~5	20~30	80~70
5~25	30~40	70~60
25~35	40~60	60~40
35~50	60~70	40~30
50~60	70~100	30~0
60~70	100~20	0~80

表3 呋喃香豆素的线性关系

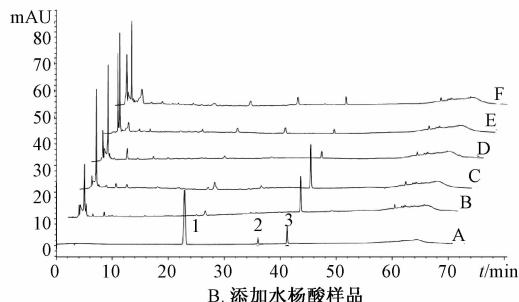
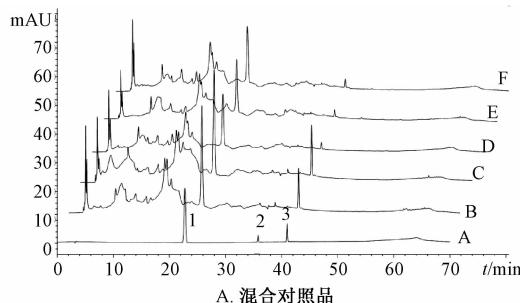
Tab. 3 Linear relationships of furocoumarins

成分	回归方程	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R
佛手酚	$Y = 9668.7X + 14.034$	3.125 ~ 10.00	0.9986
佛手柑内酯	$Y = 26161X + 4.984$	6.094 ~ 19.50	0.9987
花椒毒素	$Y = 20033X - 0.3096$	0.006 ~ 20.00	0.9985

2.4 统计分析 所有数据均使用 SPSS 11.3 软件进行方差分析, 再通过 GraphPad Prism 5 软件绘图, 每批试验重复 3 次。

3 结果

3.1 诱导子对呋喃香豆素含有量及种类的影响 由图 1 可知, 在水杨酸和茉莉酸甲酯诱导的明党参细胞提取物中, 佛手酚和佛手柑内酯含有量比空白对照组有明显提高, 其中以前者最高, 而且增加了花椒毒素。



A. 混合对照品 B. 添加水杨酸样品 1 C. 添加茉莉酸甲酯样品 1
D. 添加 L-苯丙氨酸样品 1 E. 添加酵母浸出物样品 1 F. 空白对照 1. 佛手酚 2. 花椒毒素 3. 佛手柑内酯

A. mixed reference substances B. sample 1 added with salicylic acid
C. sample 1 added with methyl jasmonate D. sample 1 added with L-phenylalanine E. sample 1 added with yeast extract F. blank control

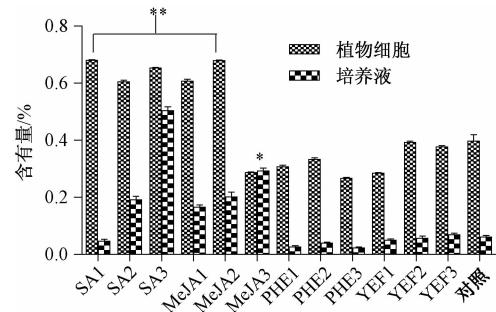
1. bergaptol 2. xanthotoxin 3. bergapten

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

3.1.1 诱导子及前体物质对明党参悬浮细胞生长的影响 在实验浓度范围内, 除酵母浸出物外, 水杨酸、茉莉酸甲酯、L-苯丙氨酸对明党参悬浮细胞的生长均具有一定促进作用。其中, 低浓度水杨酸和中、高浓度 L-苯丙氨酸的诱导效果与对照组差

异最显著 ($P < 0.01$), 其生物增长量分别提高了 73%、74% 和 79%, 表明前体物质 L-苯丙氨酸和诱导子水杨酸、茉莉酸甲酯都适合添加到明党参悬浮细胞中, 具体见图 2。



注: 横坐标上 1、2、3 分别代表低、中、高浓度。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2 诱导子及前体物质对明党参悬浮细胞生长的影响

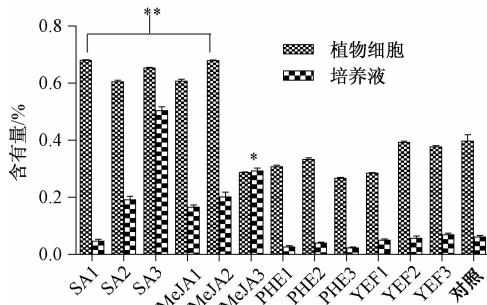
Fig. 2 Effects of elicitors and precursor substance on the growth of *Changium smyrnioides* suspension cells

3.1.2 诱导子及前体物质对佛手酚含有量的影响

由图 3 可知, 水杨酸和茉莉酸甲酯诱导明党参悬浮细胞合成佛手酚的效果与对照组差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中, 3 种浓度水杨酸诱导子对佛手酚诱导效果相当, 平均含有量达到 0.65%, 而培养液中其浓度随着水杨酸诱导子浓度的增加而增加, 说明 200 $\mu\text{mol/L}$ 该诱导子在促进佛手酚合成的同时, 还能促进其从细胞中进入培养液。随着茉莉酸甲酯浓度的增加, 对细胞内佛手酚含有量的影响先增加后降低, 而培养液中佛手酚含有量随着茉莉酸甲酯浓度的增加而增加, 说明 200 $\mu\text{mol/L}$ 茉莉酸甲酯适合诱导细胞内佛手酚的合成, 而 300 $\mu\text{mol/L}$ 适合诱导培养液中积累佛手酚。

3.1.3 诱导子及前体物质对佛手柑内酯含有量的影响 由图 4 可知, 随着水杨酸浓度的增加, 细胞内和培养液中佛手柑内酯的含有量也随之增加, 在 200 $\mu\text{mol/L}$ 时最高, 分别达到 0.29% 和 0.37%。在茉莉酸甲酯诱导子的作用下, 植物细胞中佛手柑内酯含有量与对照组差异非常显著 ($P < 0.01$), 但不同浓度的诱导效果相当。

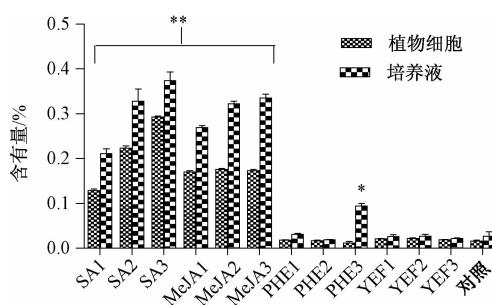
3.1.4 诱导子及前体物质对花椒毒素含有量的影响 由图 5 可知, 只有水杨酸和茉莉酸甲酯诱导子诱导的明党参悬浮细胞中检测到了花椒毒素, 并随着诱导子浓度的增加而增加。200 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸和 300 $\mu\text{mol/L}$ 茉莉酸甲酯合成花椒毒素的含有量分别为 0.060% 和 0.055%。



注: 横坐标上 1、2、3 分别代表低、中、高浓度。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 3 诱导子及前体物质对佛手酚含有量的影响

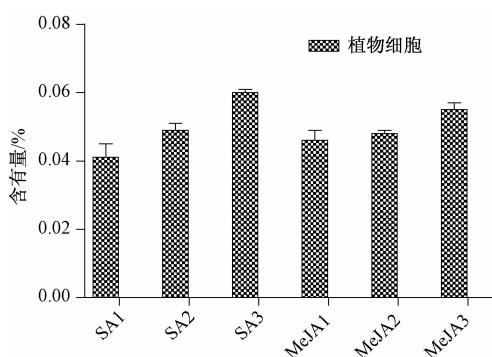
Fig. 3 Effects of elicitors and precursor substance on beraptol content



注: 横坐标上 1、2、3 分别代表低、中、高浓度。与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 4 诱导子及前体物质对佛手柑内酯含有量的影响

Fig. 4 Effects of elicitors and precursor substance on beraptol content



注: 横坐标上 1、2、3 分别代表低、中、高浓度

图 5 诱导子及前体物质对花椒毒素含有量的影响

Fig. 5 Effects of elicitors and precursor substance on xanthotoxin content

3.2 诱导子诱导时间的影响 由明党参悬浮细胞的生长规律可知, 细胞在培养 15 d 后进入对数生长期; 18~20 d 处于生长稳定期, 生物量达到最大值; 20~24 d 处于衰退期, 细胞数目开始锐减,

故选择 24 d 作为明党参悬浮细胞的总培养周期。因此, 对水杨酸和茉莉酸甲酯诱导子进行诱导时间长短的试验时, 选择了已培养 15 d 的悬浮细胞, 添加诱导子后再培养 8 d, 检测呋喃香豆素的含有量。由图 6A 可知, 悬浮细胞中加入水杨酸诱导子后, 其含有量不断增长, 在第 8 天时达到最佳效果, 而且高浓度 (200 $\mu\text{mol/L}$ 效果) 最好; 图 6B 显示, 随着茉莉酸甲酯诱导时间的增加, 其含有量先增加后降低, 在第 6 天、诱导子浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时最高。

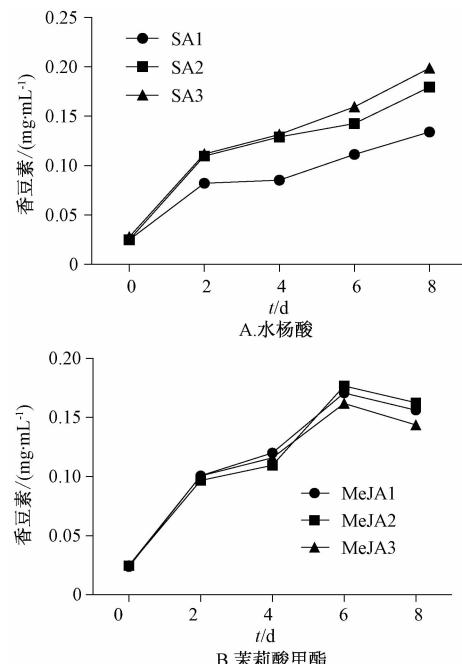


图 6 诱导时间对呋喃香豆素含有量的影响

Fig. 6 Effects of induction time on the contents of furocoumarins

4 讨论

3 种浓度水杨酸诱导子对明党参悬浮细胞中佛手酚合成促进作用明显, 但不同浓度诱导效果差别不大, 而随着其浓度增加, 悬浮培养液中佛手酚含有量增加, 说明高浓度水杨酸不仅能促进明党参细胞合成佛手酚, 还能促进其释放到培养液中。现代研究表明, 培养液中存在一定量次生代谢产物^[8], 通过收集水杨酸诱导的明党参悬浮细胞培养液来获得次生代谢产物呋喃香豆素, 既免去了繁琐的操作步骤, 又充分利用了废弃的培养液。

香豆素生物合成途径表明, 佛手酚和花椒毒素是由补骨脂素转化而来的同分异构体, 而佛手柑内酯是由佛手酚-O-甲基转移酶作用于反应底物佛手酚转化而来^[9], 故推测检测出来的少量花椒毒素

可能为甲氧基转移酶作用于花椒毒酚而来。明党参悬浮细胞液中添加3种水杨酸诱导子后,悬浮液中佛手柑内酯含有量随添加诱导子浓度的增加而增加,其原因可能为一方面,水杨酸诱导子促进了反应底物佛手酚的大量合成;另一方面,其增强了佛手酚-O-甲基转移酶的活性。

酵母浸出物作为一种植物悬浮细胞较常见的诱导子,其诱导机制可能为酵母诱导子引起植物细胞发生氧化爆裂反应,使植物细胞壁蛋白质和L-抗坏血酸过氧化酶发生变化^[10]。诱导子为外界信号被细胞识别时作用于细胞膜,引起胞内基因启动和酶活性变化,这是一个级联过程,需要有物质充当胞内信使,即第二信使^[11]。有研究表明,水杨酸和茉莉酸甲酯为胞内信使,易直接引起明党参细胞内发生变化,从而调控次生代谢产物的合成,而酵母浸出物为植物细胞第一信使,可能未被明党参悬浮细胞膜上的受体所识别,故未引起酶活性变化。

5 结论

200 μmol/L 水杨酸、300 μmol/L 茉莉酸甲酯诱导子对明党参悬浮细胞中佛手酚、佛手柑内酯和花椒毒素合成的诱导效果最好,其中前者诱导的明党参悬浮细胞中佛手酚、佛手柑内酯含有量分别达到0.654%和0.504%,而培养液中分别达到0.293%和0.374%;细胞中花椒毒素含有量达0.060%,生物量比对照组提高了42.14%;水杨酸培养时间宜为8 d,而茉莉酸甲酯宜为6 d。这两种诱导子促进明党参悬浮细胞生长的同时,提高了细胞中呋喃香豆素的含有量与种类,为解决明党参细胞培养中次生代谢产物的低产问题提供了思路,也为后续细胞扩大化培养奠定了基础。但本实验仅考察了诱导子浓度和诱导时间对植物细胞生长及次生代谢产物含有量的影响,而未对诱导子添加时

间、协同效应及的作用机制进行深入研究,故有待作进一步探索。

参考文献:

- [1] 李祥,陈建伟,方泰惠.中国特有植物明党参化学成分和药理研究进展[J].中国野生植物资源,1998,17(2):13-16.
- [2] Łuszczki J J, Andres-Mach M, Gleńsk M, et al. Anticonvulsant effects of four linear furanocoumarins, bergapten, imperatorin, oxypeucedanin, and xanthotoxin, in the mouse maximal electroshock-induced seizure model: a comparative study[J]. *Pharmacol Rep*, 2010, 62(6): 1231-1236.
- [3] 熊友健,杨玉明,姜松,等.呋喃香豆素类成分及其药理作用研究进展[J].中成药,2010,32(10):1764-1768.
- [4] 李文渊,高伟,邵爱娟,等.诱导子对丹参有效成分次生代谢的诱导与调控[J].中国中药杂志,2011,36(3):258-262.
- [5] 江曙,段金廒,陈建伟,等.明党参愈伤组织诱导及其细胞悬浮培养的研究[J].中国中药杂志,2009,34(9):1078-1081.
- [6] 步达,姚晓,刘晓艺,等.不同激素配比对明党参叶片愈伤组织诱导的影响及其总香豆素的含量测定[J].中国药房,2013,24(19):1806-1809.
- [7] 顾源远,陈建伟.紫外分光光度法测明党参中总香豆素类成分的含量[J].中国现代中药研究与实践,2010,24(2):58-60.
- [8] 谷荣辉,洪利亚,龙春林.植物细胞培养生产次生代谢产物的途径[J].植物生理学报,2013,49(9):869-881.
- [9] 孔令义.香豆素化学[M].北京:化学工业出版社,2008.
- [10] Gokulakannan G G, Niehaus K. Characterization of the *Medicago truncatula* cell wall proteome in cell suspension culture upon elicitation and suppression of plant defense[J]. *J Plant Physiol*, 2010, 167(18): 1533-1541.
- [11] 肖春桥,高洪,池汝安.诱导子促进植物次生代谢产物生产的研究进展[J].天然产物研究与开发,2004,16(5):473-476.