

外源激素对何首乌毛状根生长及蒽醌类成分生物合成的影响

Effects of Exogenous Phytohormones on Hairy Root Growth and Biosynthesis of Anthraquinones in the Hairy Root Culture of *Polygonum multiflorum*

于荣敏^{1*}, 马娜¹, 严春艳¹, 赵昱²

YU Rong-Min^{1*}, MA Na¹, YAN Chun-Yan¹ and ZHAO Yu²

1 暨南大学药学院, 广州 510632

2 浙江大学药学院, 杭州 310031

1 College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China

摘 要 研究了外源激素对液体培养何首乌毛状根生长及其蒽醌类化合物生物合成的影响。结果表明:外源激素 2,4-D、NAA 和 6-BA 对何首乌毛状根的生长及蒽醌生物合成有较大的影响。在 MS 培养基中添加 2,4-D 对何首乌毛状根的生长和蒽醌类化合物的生物合成有很强的抑制作用,而添加适量浓度 NAA 和 6-BA 则可促进何首乌毛状根的生长以及蒽醌类物质的生物合成。

关键词 何首乌, 毛状根, 悬浮培养, 蒽醌类化合物, HPLC

中图分类号 R915 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)04-0619-05

Abstract The effects of exogenous phytohormones on hairy root growth and biosynthesis of anthraquinones in the hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb. were studied. The results showed that the 2,4-D, NAA and 6-BA all have obvious effects on the growth of hairy root cultures and the biosynthesis of anthraquinones. The growth of hairy root and biosynthesis of anthraquinones were strongly restrained by 2,4-D. However, NAA and 6-BA of appropriate concentration were favourable to hairy root growth and anthraquinones production.

Key words *Polygonum multiflorum*, hairy roots, suspension culture, anthraquinones, HPLC

中药何首乌,又名首乌、赤首乌,为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)的干燥块根。其性微温、气微、味微苦而甘涩,有解毒、消疮痍、润肠通便等功能,可用于肝肾精血亏虚、头昏目眩、须发早白等症的治疗^[1]。何首乌的化学成分主要为蒽醌类化合物、卵磷脂以及微量元素等^[2]。其中蒽醌类成分具有上皮生长因子受体酪氨酸蛋白激酶抑制

剂活性^[3]。

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)中含有致使植物产生毛状根的 Ri 质粒,在 vir 区基因产物协助下,Ri 质粒中的 T-DNA 片段转移进植物细胞核基因组并在其中表达,从而导致了毛状根的大量出现^[4]。毛状根具有生长迅速、遗传性状稳定、激素自养等特点,它能够合成与原植物含量相当甚至高于

Received: December 6, 2005; Accepted: April 11, 2006.

This work was supported by the grant from the Natural Sciences Foundation of Guangdong(No. 04010461).

* Corresponding author. Tel: 86-20-85223784; E-mail: tyrm@jnu.edu.cn

广东省自然科学基金资助项目(No. 04010461)

原植物含量的次生代谢产物^[5]。影响毛状根生长及其次生代谢物形成的因素很多,包括培养基、外源激素、光照以及温度等各种理化因子。其中,外源激素对毛状根的生长及其次生代谢产物累积的影响愈来愈受到科学家们的高度关注。本文在前期工作^[1,5,6]的基础上,利用 HPLC 含量测定方法研究了三种重要的外源激素[2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 2,4-二氯苯氧乙酸)、NAA (naphthalene acetic acid, 萘乙酸)和 6-BA (6-benzylaminopurine, 6-苄基嘌呤)]对何首乌毛状根生长和蒽醌类化合物生物合成的影响。

1 材料与方法

1.1 何首乌毛状根的培养

何首乌毛状根系由本实验室用发根农杆菌 LBA9402 感染何首乌无菌苗叶片诱导获得^[5]。何首乌毛状根培养采用含 30g/L 蔗糖的 MS 液体培养基为基本培养基。高压灭菌前用 1mol/L NaOH 调 pH 至 5.70。将 20 条生长旺盛长约 5cm 的毛状根根尖接入装有 100mL MS 液体培养基的 250mL 三角瓶中,暗培养,培养温度为 25℃ ± 1℃,摇床转速 110 r/min,每 15 天继代 1 次。经过 20 代液体悬浮培养得到稳定的毛状根培养体系。在进行外源激素研究时,除特别已说明的条件外,其它条件与基本培养条件一致。

1.2 仪器与试剂

含量测定在 Agilent 1100 高效液相色谱仪上完成。大黄酸(rhein)、大黄素(emodin)、大黄素甲醚(phycion)对照品购自中国药品生物制品检定所,氯仿、磷酸、盐酸均为分析纯,甲醇为色谱纯,水为双蒸水。

1.3 试验方法

1.3.1 色谱条件:色谱柱 ZORBAX SB-C18 柱(5 μ m, 4.6mm × 250mm);柱温:30℃;流动相:甲醇-水(含 0.5% 磷酸)(80:20);流速:0.8mL/min;检测波长:439nm。

1.3.2 对照品溶液的制备:精密称取大黄酸和大黄素甲醚各 5.0mg,分别用甲醇溶解,定容至 50mL;另精密称取大黄素 5.0mg 用甲醇定容至 25mL,配成 3 种对照品储备液。取大黄酸、大黄素甲醚储备液各 2mL,大黄素储备液 1mL 于 5mL 具塞试管中,混匀得到对照品混合液。

1.3.3 回归方程和线性范围的计算:分别吸取混合标准溶液及其 10 倍稀释液 1~10 μ L 按上述色谱条件进样分析,以峰面积积分为纵坐标,对照品进样

量(ng)为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程的回归系数及截距。

1.3.4 精密度试验:上述色谱条件以混合对照品 5 μ L 重复进样 10 次,根据峰面积计算相对标准偏差(RSD)。

1.3.5 供试品溶液的制备:在基本培养基中分别添加 2,4-D、NAA 和 6-BA,使其终浓度分别为 0mg/L、0.1mg/L、0.2mg/L、0.3mg/L、0.4mg/L、0.5mg/L。21d 收获。收获后,测定毛状根干重(DW)。

将收获后自然晾干的何首乌毛状根研磨,取约 3g 精密称定。加 30mL 甲醇和 2.5mL 盐酸,于 70℃ 水浴中回流 1.5h。冷却,过滤,用适量甲醇分次洗涤容器和残渣,洗液与滤液合并,蒸干,用 30mL 水洗出。再用等量氯仿分别萃取 3 次,取氯仿层,合并,蒸干,用甲醇溶解,置容量瓶中,定容。按上述色谱条件测定大黄酸、大黄素以及大黄素甲醚含量,每次取 3 个平行样进行分析,重复 3 次。

1.3.6 回收率试验:取对照品混合溶液 1mL 加入 1.5g 的样品中。按样品的测定方法提取测定,取 3 次测定的平均值计算回收率。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 方法的可行性

图 1、图 2 为蒽醌标准品和毛状根提取物的 HPLC 谱图。

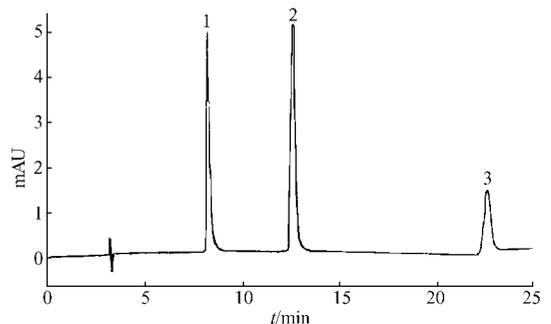


图 1 蒽醌标准品的 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC of standard anthraquinones

1: rhein; 2: emodin; 3: phycion.

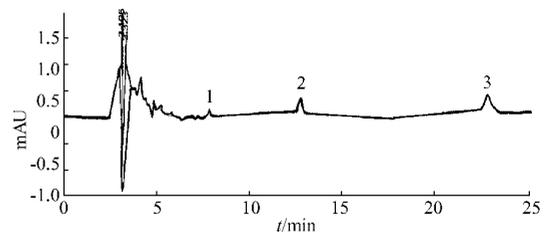


图 2 毛状根提取液 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC of anthraquinones of hairy root cultures

结果表明,此色谱条件下,在4~400ng范围内,大黄酸、大黄素、大黄素甲醚含量与峰面积呈良好的线性关系。线性方程如下所示:

$$\text{大黄酸: } y = 5.2064x - 2.9226 \quad r = 0.9999$$

$$\text{大黄素: } y = 6.0165x - 4.5608 \quad r = 0.9999$$

$$\text{大黄素甲醚: } y = 3.7792x - 1.9694 \quad r = 0.9992$$

大黄酸、大黄素和大黄素甲醚对照品峰面积积分值的RSD分别为0.72%、0.47%和2.15%,精密度良好。回收率计算,大黄酸为98.62%,大黄素为99.97%、大黄素甲醚为98.70%。说明方法准确可靠。

2.2 外源激素对何首乌毛状根生长及蒽醌生物合成的影响

2.2.1 基本培养基中毛状根的生物量及其蒽醌类化合物的含量

基本培养基中培养的毛状根,在21d收获时其干重为11.701g/L,大黄酸、大黄素和大黄素甲醚的含量分别为10.66 μ g/g、31.16 μ g/g和5.99 μ g/g(DW),即124.7 μ g/L、364.6 μ g/L和70.09 μ g/L。

2.2.2 2,4-D对何首乌毛状根生长及蒽醌类化合物生物合成的影响

实验结果显示,2,4-D对何首乌毛状根侧根的产生以及蒽醌的生物合成有很强的抑制作用。2,4-D浓度为0.1mg/L时,毛状根收获时为2.085g/L(DW),是基本培养条件下的17.8%;大黄酸、大黄素和大黄素甲醚的含量分别为2.13 μ g/L、3.56 μ g/L和7.19 μ g/L。分别为基本培养条件下的1.71%、6.46%和1.03%。2,4-D浓度为0.1mg/L至0.5mg/L时,何首乌毛状根的生长以及蒽醌的含量没有显著变化(图3和图4)。

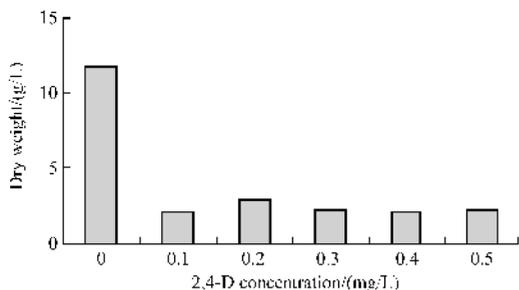


图3 2,4-D对何首乌毛状根生长的影响

Fig. 3 Effect of 2,4-D on the growth of hairy roots of *Polygonum multiflorum*

2.2.3 NAA对何首乌毛状根生长及蒽醌生物合成的影响

实验结果显示,NAA对何首乌毛状根侧根的产生有促进作用。NAA浓度为0.1mg/L时,毛状

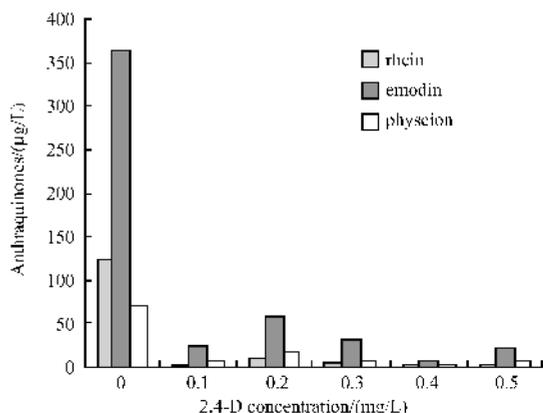


图4 2,4-D对何首乌毛状根中蒽醌类化合物生物合成的影响

Fig. 4 Effect of 2,4-D on the accumulation of anthraquinones in hairy roots of *Polygonum multiflorum*

根生长量为14.08g/L(DW),是基本培养基条件下毛状根生长量的1.20倍。当浓度为0.4mg/L时毛状根生长量为17.54g/L(DW),是基本培养基的条件下的1.5倍。到达一定浓度之后,随着NAA浓度的增加,其毛状根的增长幅度减小(图5)。

实验结果还表明,NAA对何首乌毛状根单位质量中的蒽醌的生物合成有抑制作用。NAA浓度为0.1mg/L时单位质量毛状根中的大黄酸、大黄素和大黄素甲醚的含量略有降低,分别为在基本培养基条件下的93.6%、82.1%和89.6%。但是,NAA对何首乌毛状根培养体系单位体积蒽醌的生物合成有促进作用。在NAA为0.4mg/L时,单位培养体积中何首乌毛状根的蒽醌的生物合成量得到提高。其中,大黄酸的含量为162.13 μ g/L,是在基本培养基的条件下的1.3倍,说明添加适量浓度NAA,有利于大黄酸的积累(图6)。

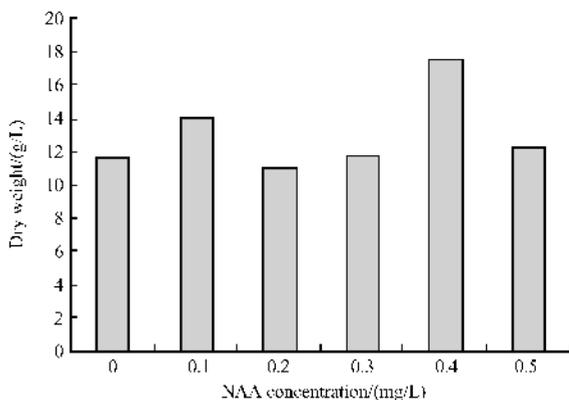


图5 NAA对何首乌毛状根生长的影响

Fig. 5 Effect of NAA on the growth of hairy roots of *Polygonum multiflorum*

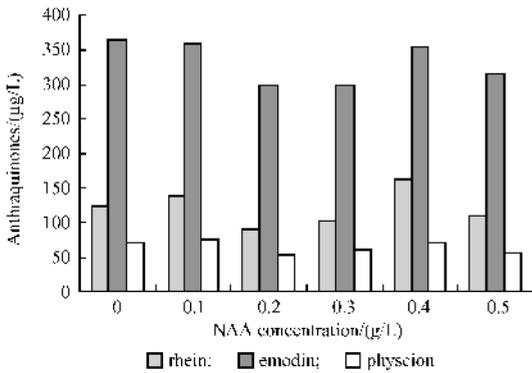


图6 NAA对何首乌毛状根中蒽醌类化合物生物合成的影响

Fig. 6 Effect of NAA on the accumulation of anthraquinones in the hairy roots of *Polygonum multiflorum*

2.2.4 6-BA对何首乌毛状根生长及蒽醌生物合成的影响:实验结果显示,6-BA对何首乌毛状根侧根的产生有促进作用。6-BA浓度为0.1mg/L时,毛状根生长量为13.7g/L(DW),是基本培养基条件下毛状根生长量的1.17倍。当浓度为0.3mg/L时毛状根生长量为27.558g/L(DW),是在基本培养基条件下,毛状根生长量的2.36倍。到达一定浓度之后,随着6-BA浓度的增加,其毛状根的增长幅度减小(图7)。

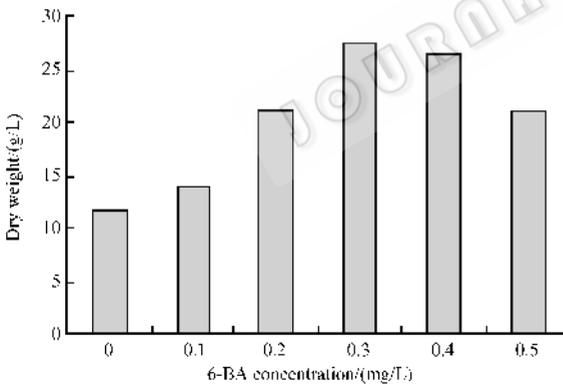


图7 6-BA对何首乌毛状根生长的影响

Fig. 7 Effect of 6-BA on the growth of hairy roots of *Polygonum multiflorum*

此外,实验结果还表明,6-BA对何首乌毛状根单位质量中的蒽醌的生物合成有抑制作用。6-BA浓度为0.1mg/L时单位质量毛状根中的大黄酸和大黄素的含量显著降低,分别为在基本培养基条件下的81.4%和61.3%。大黄素甲醚的含量基本不变。但是,6-BA对何首乌毛状根培养体系单位体积蒽醌的生物合成有促进作用。在6-BA为0.3mg/L时,单位培养体积中何首乌毛状根的蒽醌的生物合成量显著提高。其中,大黄酸的含量为224.46µg/L,大黄素

甲醚的含量为104.445µg/L,分别是基本培养基条件下的1.8倍和1.5倍。说明添加适量浓度6-BA,有利于大黄酸和大黄素甲醚的积累(图8)。

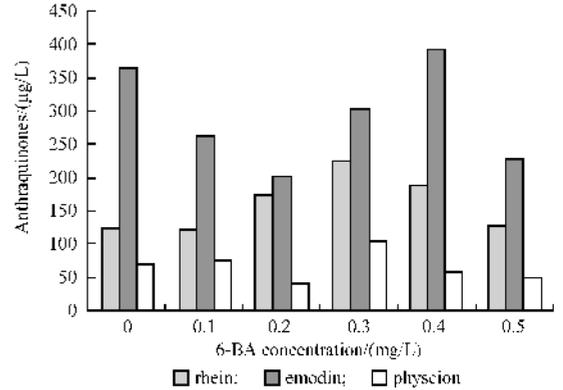


图8 6-BA对何首乌毛状根中蒽醌类化合物生物合成的影响

Fig. 8 Effect of 6-BA on the accumulation of anthraquinones in the hairy roots of *Polygonum multiflorum*

2.2.5 6-BA添加时间对何首乌毛状根生长及代谢产物形成影响:分别在培养第1天、第6天、第11天和第16天向培养基中添加0.3mg/L的6-BA。试验结果表明,随着添加时间的推迟,6-BA对何首乌毛状根生长量以及蒽醌的生物合成的影响逐渐减小,如在第16天添加0.3mg/L的6-BA时,毛状根生长量为11.900g/L(DW),大黄酸、大黄素和大黄素甲醚含量分别为125.1µg/L,370µg/L和69.5µg/L。毛状根生长量及蒽醌的生物合成量与基本培养基培养时类似(图9和图10)。

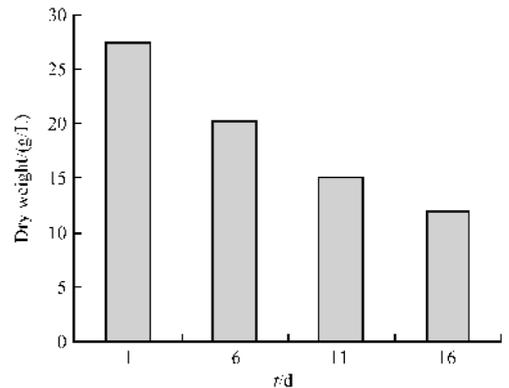


图9 6-BA添加时间对何首乌毛状根生长的影响

Fig. 9 Effect of the different time of adding 6-BA on the growth of hairy roots of *Polygonum multiflorum*

毛状根具有生长迅速、生长和遗传稳定、以及激素自养等特点,影响毛状根生长及其次生代谢物形成的因素很多,其中外源激素是重要因素之一。植物激素是植物组织培养中的关键因子,不仅影响细

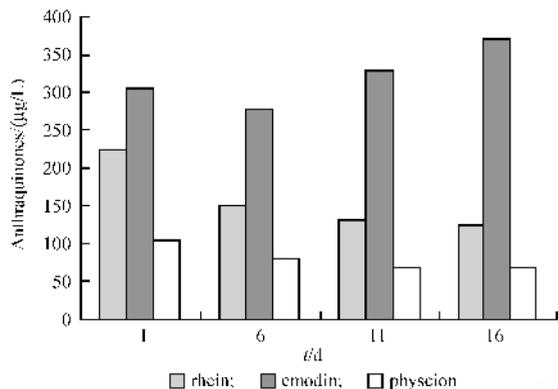


图 10 6-BA 添加时间对何首乌毛状根中蒽醌类成分累积的影响

Fig. 10 Effect of the different time of adding 6-BA on the accumulation of anthraquinones of hairy roots of *Polygonum multiflorum*

胞生长,还影响细胞次生代谢产物的合成^[7]。在本文考察的三种外源激素中,NAA和6-BA对何首乌毛状根的生长及其蒽醌类成分的累积起到了一定的促进作用。由此可以推测,通过调节培养基中的激素,或者激素比例,可提高其主要次生代谢产物的含量,为何首乌毛状根中活性成分的大量累计及其未来的产业化提供了科学依据。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Yu RM (于荣敏), Zhang H (张辉), Chen JQ (陈家琪) et al. Callus culture of *Polygonum multiflorum* and the production of anthraquinones. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry* (中国药物化学杂志), 1995, 5(2): 131
- [2] Wang ZH (王振华), Du Q (杜勤), Liu H (刘浩) et al. Culturing of hairy root of *Polygonum multiflorum* and determination of its chrysophanol content. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2001, 32(8): 695-696
- [3] Su W (苏玮), Guo Q (郭群). Progress on pharmacological development of *Polygonum multiflorum* Thunb. *Chinese Traditional Patent Medicine* (中成药), 1997, 20(2): 119-121
- [4] Chilton MD, Tepfer DA, Petit A et al. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 1982, 295: 432-434
- [5] Wang I (王莉), Yu RM (于荣敏), Zhang H (张辉) et al. Hairy-root culture of *Polygonum multiflorum* Thunb and the production of its active constituents-anthraquinones. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2002, 18(1): 69-78
- [6] Wang I (王莉), Yu RM (于荣敏), Zhang H (张辉) et al. Hairy-root induction and culture of *Polygonum multiflorum* Thunb. *Pharmaceutical Biotechnology* (药物生物技术) 2002, 9(2): 110-114
- [7] Meyer HJ, Van Standen J. The *in vitro* production of an anthocyanin from cell cultures of *Oxalis linearis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1995, 40: 155-158