

· 资源与鉴定 ·

光照对黄芩悬浮细胞内源激素与有效成分相关性的影响

陈顺钦^{1,2}, 黄璐琦¹, 袁媛^{1*}, 罗毓健¹, 陈平², 秦双双^{1,2}, 杨兆春¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;

2. 武汉工业学院, 武汉 430023)

[摘要] 目的: 研究光照对黄芩悬浮细胞内源激素与有效成分相关性的影响。方法: 采用 HPLC 法检测黄芩悬浮细胞中黄芩苷含量, 酶联免疫吸附法检测内源激素。结果: 研究结果表明在光照条件下, 伴随着 IAA 含量的降低, 黄芩苷含量也随之降低, 两者变化曲线显著相关($r=0.972$)。相对较高的 IAA 含量和相对较低的 GAs 含量有利于黄芩苷的积累, 而绝对的 GAs 含量在本研究中并没有表现出与黄芩苷有很强的相关性。结论: 黄芩悬浮细胞有效成分与内源激素绝对含量以及相对含量具有相关性。

[关键词] 黄芩; 黄芩苷; 悬浮细胞; 光照; 内源激素

[中图分类号] R284.1

[文献标识码] B

[文章编号] 1005-9903(2010)04-0072-03

黄芩为唇形科药用植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。黄芩苷是黄芩的主要有效成分, 其含量高低受各种环境因子的影响。植物激素对植物的生长发育有重要的调节作用, 它与植物次生代谢物质存在着相互作用, 并共同调节植物的生长发育、对环境的适应等, 而次生代谢产物往往是药材中的有效成分, 具有各种各样的药理活性, 其对药材品质的形成具有重要的影响。作为主要的环境因子, 光不仅提供光合作用所需的能量, 还作为一种环境信号, 深刻影响着植物的内源激素水平以及次生代谢产物的合成与积累^[1]。Behringer 等^[2]认为蓝紫光、紫外光能改变 IAA 氧化酶的活性, 对 IAA 起调控作用。刘小阳等^[3]研究了光强对砵山酥梨石细胞形成的影响及其与内源 IAA、ZR 和 ABA 含量的关系, 结果表明高光强促进砵山酥梨果实发育前期 IAA、ZR 和 ABA 合成。不同波长的光线, 可以通过与其相关的色素作用来影响植物体内的激素平衡, 进而引发植物的生理生态变化。

相关生态学研究表明, 野生黄芩中汉黄芩素等黄酮类化合物含量与光照时数密切相关。受控试验结果也表明, 光诱导对黄芩悬浮细胞中有效成分的积累有显著的促进作用, 且光诱导刺激了与有效成分的积累相关基因的表达。而 Sylvia 等^[4]报道认为, ETH、ABA 可以促进花青苷等类黄酮的合成。本实验拟对光照条件下黄芩悬浮细胞内源激素与有效成分含量进行研究, 以了解光照对黄芩悬浮细胞内源激素与有效成分积累相关性的影响, 为合理使用植物生长调节剂生产优质药材提供理论和技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料及培养条件 黄芩愈伤组织由本实验室诱导。将在 MS 固体培养基上稳定继代的愈伤组织, 转入到 MS 液体培养基(3%蔗糖, pH5.8)中进行悬浮培养, 光照 16 h 黑暗 8 h 进行培养, 以黑暗条件作为对照, 摇床转速 120 r/min, 培养温度(25 ± 1)℃, 接种量约为 2 g/L 鲜重, 设 3 个重复。培养液中附加 0.5 mg/L 2, 4-D 和 3 mg/L TDZ。分别于第 20, 22, 24, 26 d 取样, 备用。

1.2 内源激素测定 取黄芩悬浮细胞液 5 mL, 4 12 000 g 离心后, 除去上清, 置于液氮中冷冻 20 min, 再转入 -70℃ 下保存, 待测。样品用 80% 甲醇(含有 0.02% 2, 6-二叔丁基对甲酚)提取, 内源 IAA(indole-3-acetic acid), GAs(gibberellin), ZR(zeatin)

[收稿日期] 2009-09-28

[基金项目] 北京市科技新星项目(2008B82); 国家中医药管理局项目(06-07ZP51); 中国中医科学院自主选题(ZZ2008062)

[通讯作者] * 袁媛, Tel: (010) 64014411-2956; E-mail: yyuan0732@gmail.com

riboside) 和 ABA(abscisic acid) 的测定均采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 重复 3 次。激素测定试剂盒由中国农业大学王保民博士提供, 按照 ELISA 说明书, 用酶联免疫检测仪(华东电子管厂生产 DG-3022A 型) 测定。

1.3 黄芩苷、黄芩素的测定^[5] 取黄芩悬浮细胞液 5 mL, 4 12 000 g 离心后, 除去上清, 沉淀中精密加入甲醇 1 mL, 称定质量, 超声提取 120 min, 取出, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。色谱柱: Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相: 乙腈-水-甲酸(23 77 1.0) (A); 乙腈-水-甲酸(80 20 1.0) (B); 梯度洗脱, 梯度洗脱程序为: 0 ~15 min, 100% (A); 15 ~25 min, 100% ~87% (A); 25 ~40 min, 87% ~52% (A); 40 ~60 min, 52% ~0% (A)。检测波长 280 nm; 分析时间 60 min; 柱温 30 。

1.4 数据分析 采用 SPSS, Excel 软件对相关数据进行相关性分析和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 黄芩悬浮细胞黄芩苷含量动态变化 在光照条件下, 黄芩苷含量在第 20 天含量最高, 达到 218.31 μg/g, 随后呈逐渐降低趋势, 在第 26 天下降为 148.95 μg/g, 降幅达 31.77%; 在黑暗条件下, 黄

芩苷的变化趋势与光照条件一致, 第 20 天为 183.78 μg/g 到第 26 天降为 96.32 μg/g, 降幅达 47.59%。光照条件下黄芩苷含量显著高于黑暗条件黄芩苷含量 ($P < 0.05$) 见图 1。

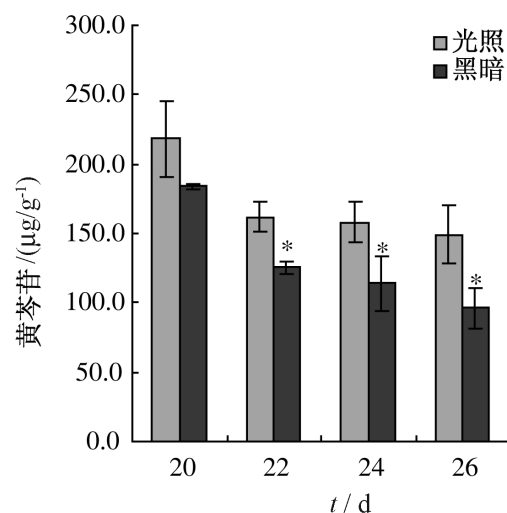


图 1 黄芩悬浮细胞中黄芩苷含量的动态变化

* 表示光照和黑暗显著差异 $P < 0.05$

2.2 光照对黄芩悬浮细胞内源激素含量的影响 在光照条件下, 黄芩悬浮细胞中的 IAA 含量持续降低, 而黑暗条件下的 IAA 含量则持续升高。在 20d 和 22d 光照条件高于黑暗条件下的 IAA 含量 ($P < 0.05$), 而在 26 天黑暗条件下的 IAA 含量高于光照条件 ($P < 0.05$)。另外, ZR, GAs, ABA 在光照条件下波动次数要比黑暗条件多见表 1。

表 1 黄芩悬浮细胞中内源激素含量的变化

处理	t/d	ZR	GAs	IAA	ABA
光照	20	16.787 ± 1.116	22.754 ± 1.094	89.865 ± 8.623	83.028 ± 4.933
	22	16.212 ± 0.301	37.431 ± 3.463	70.611 ± 2.953	92.706 ± 3.995
	24	22.872 ± 1.112	21.673 ± 0.271	61.232 ± 3.343	67.722 ± 4.079
	26	18.168 ± 0.861	34.589 ± 4.627	60.326 ± 2.644	78.160 ± 7.052
黑暗	20	17.632 ± 1.234	36.976 ± 1.948	57.606 ± 0.987	91.454 ± 11.993
	22	17.858 ± 0.773	28.542 ± 1.108	58.159 ± 2.074	81.987 ± 6.863
	24	17.303 ± 1.275	25.821 ± 1.971	64.347 ± 5.979	84.466 ± 0.313
	26	22.343 ± 0.971	36.577 ± 1.155	93.799 ± 8.965	90.746 ± 3.902

表 2 光照对黄芩悬浮细胞内源激素相关性的影响

组别	光照	黑暗
ZR-GAs	- 0.581	0.567
ZR-IAA	- 0.568	0.964 ¹⁾
ZR-ABA	- 0.927 ¹⁾	0.497
GAs-ABA	0.667	0.914 ¹⁾
GAs-IAA	- 0.329	0.423
IAA-ABA	0.450	0.452

注: 表示显著相关¹⁾ $P < 0.05$

2.3 光照对黄芩悬浮细胞内源激素相关性的影响 利用 SPSS 软件对内源激素的相关性 (Pearson Correlation) 进行了分析, 从表 2 可以看出除 GAs-ABA, IAA-ABA 外, 其他激素之间都在光照条件下的

负相关转变为黑暗条件下的正相关。其中光照条件下的 ZR-ABA 和黑暗条件下的 ZR-IAA、GAs-ABA 之间的含量变化曲线显著相关。

2.4 内源激素水平及激素平衡与黄芩苷含量的相关性分析 为进一步阐明内源激素水平以及激素平衡与黄芩苷含量之间的关系, 作者利用 SPSS 软件做了单个内源激素含量或两两内源激素平衡比值与黄芩苷含量之间的相关关系分析。在光照条件下, IAA 与黄芩苷之间的含量变化曲线显著相关, $r = 0.972$, 而高 ZR 含量则不利于黄芩苷的积累。在激素平衡方面, 光照条件下, IAA/GAs ($r = 0.897$), ABA/GAs

($r = 0.850$), IAA/ZR ($r = 0.837$), IAA/ABA ($r = 0.904$) 之间的激素平衡比值变化与黄芩苷含量显著相关; 黑暗条件下, GAs/ZR ($r = 0.893$), GAs/IAA ($r = 0.979$), ABA/IAA ($r = 0.880$), ABA/ZR ($r = 0.833$) 之间的激素平衡比值变化与黄芩苷含量显著相关。

3 讨论

3.1 IAA 对黄芩悬浮细胞中黄芩苷积累的影响 研究表明, 在光照条件下, 伴随着 IAA 含量的降低, 黄芩苷含量也随之降低, 两者变化曲线显著相关 ($r = 0.972$)。基因活化学说认为, 生长素能在转录和翻译水平上促进核酸和蛋白质的合成, 而这种核酸已经证明是 mRNA, 本研究结果提示 IAA 可能促进与黄芩苷积累有关的功能基因或者是催化黄芩苷合成的酶基因的转录, 在类黄酮合成中, 查尔酮合成酶 (CHS) 是最关键的酶, Carolyn 等^[7] 研究发现: CHS 酶受高含量 IAA 的刺激。同时本研究发现光照条件下, 较高浓度的 ZR 含量不利于黄芩悬浮细胞内黄芩苷的积累, 细胞分裂素的主要功能是促进细胞质的分裂, 而细胞质的分裂需要大量碳源化合物, 而这势必减少了合成黄芩苷的前提初级代谢产物, 导致了黄芩苷的降低。Tong 等^[8] 研究结果表明光质和 ZT 在调节花青素合成时显示相减效应, 并推测光敏色素的作用减弱了花青素合成对 ZT 的敏感性或者 ZT 减弱了光敏色素对光质的感应。

3.2 光照对黄芩悬浮细胞内源激素相关性的影响

光照对内源激素间的相互作用产生了一定的影响, 光照条件对 ZR-IAA、ZR-ABA 相关性影响较大见 (表 2), 相关报道认为 ZR 可以抑制 IAA 与氨基酸的结合, 也可通过影响 IAA 氧化酶活性, 从而影响 IAA 在体内的含量。从激素相关性结果分析可以看出, IAA 含量与黄芩苷含量密切相关, 其他激素 (如 ZR) 则通过影响 IAA 含量间接影响黄芩苷含量。

3.3 黄芩悬浮细胞中内源激素平衡对黄芩苷积累的影响

在植物体内黄酮类化合物的合成代谢受多种因子的调控, 而酶和内源激素是主要的因子^[9]。程水源等^[10] 认为内源激素与类黄酮之间的关系通过激素平衡来讨论更加合理。本研究结果显示光照条件下, IAA/GAs ($r = 0.897$), ABA/GAs ($r =$

0.850), IAA/ZR ($r = 0.837$), IAA/ABA ($r = 0.904$) 之间的激素平衡比值变化与黄芩苷含量变化显著相关, 即相对较高的 IAA 含量和相对较低的 GAs 含量有利于黄芩苷的积累, 而绝对的 GAs 含量在本研究中并没有表现出与黄芩苷有很强的相关性。

植物体可以与受到和识别的环境信号组成应激性反应, 进行环境胁迫识别后信号被传输到细胞内和植物体全部^[11], 细胞间通讯系统的主要信号分子就是植物激素。本研究以黄芩悬浮细胞为试材, 从信息传递的角度来研究黄芩悬浮细胞中黄芩苷合成的调控, 为合理使用植物生长调节剂生产优质药材提供理论和技术基础。

[参考文献]

- [1] Kendrick R C, Kronenberg G H. Photomorphogenesis in Plants [M]. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994: 200.
- [2] Behringer J F, Davies P J. Indole-3-acetic acid levels after phytochrome-mediated changes in the stem elongation rate of dark- and light-grown Pisum seedlings [J]. Planta, 1992, 188: 85.
- [3] 刘小阳, 李玲, 蔡永萍. 光强对砧山酥梨石细胞形成的影响及其与内源 IAA、ZR 和 ABA 含量的关系 [J]. 激光生物学报, 2006, 15(2): 161.
- [4] Sylvia M B, Richard C U. PAL and ethylene content during maturation of red and 'Golden delicious' apples [J]. Photochemistry, 1998, 27(4): 1001.
- [5] 李晓明, 罗毓健, 袁媛, 等. 高效液相色谱法测定黄芩愈伤组织中黄芩苷、黄芩素含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 1.
- [6] Carolyn E L, Jane E L, John R L. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivators [J]. J Sci Food Agric, 1996, 71: 313.
- [7] Tong Z, Kasemir H, Mohr H. Coaction of light and cytokinin in photo morphogenesis [J]. Pflanzl, 1983, 159: 136.
- [8] Cheng S Y, Gu M R, Shu H R. Advances in research on flavonoids in Ginkgo biloba leaf [J]. Scientia Sinicae, 2000, 6: 110.
- [9] 程水源, 王燕, 李俊凯, 等. 内源激素含量与银杏叶中类黄酮含量的关系 [J]. 林业科学, 2004, 40(6): 45.
- [10] 黄璐琦, 郭兰萍. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 277.