

· 资源 ·

冬凌草植株再生过程中冬凌草甲素的积累机制

苏秀红, 史应强, 董诚明*, 叶海东
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:探讨冬凌草植株再生过程中培养物的生理特性与冬凌草甲素积累之间的机制。方法:采用紫外分光光度法、高效液相法测定不同时期培养物内叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白、丙酮酸、冬凌草甲素的含量。结果:培养物内叶绿素、丙酮酸、可溶性蛋白含量与冬凌草甲素含量呈正相关,相关系数分别为 0.781,0.897,0.866;而可溶性糖含量与冬凌草甲素含量呈负相关,相关系数为-0.515。结论:冬凌草培养物内叶绿素、丙酮酸的含量、可溶性蛋白与冬凌草甲素积累有相互促进的关系,而可溶性糖变化主要与培养物细胞的生长、发育关系密切。

[关键词] 冬凌草;愈伤组织;冬凌草甲素
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)07-0104-04

Study on Accumulation Mechanism of Oridonin During Plant
Regeneration in *Rabdosia rubescens*

SU Xiu-hong, SHI Ying-qiang, DONG Cheng-ming*, YE Hai-dong
(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] Objective: Changes of chlorophyll, soluble sugar, soluble protein, during the plant regeneration in *Rabdosia rubescens* were studied to explore the correlation between the accumulation of the active components and physiological characteristics of cultural materials of *R. rubescens*. Method: UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography were used to determine the content of chlorophyll, soluble sugar, soluble protein in the cultural materials of different stage. Result: The content of chlorophyll, soluble protein and acetic acid was positively correlated with the oridonin, while the soluble sugar had a negative correlation with the oridonin. Conclusion: The content of chlorophyll, soluble protein in the cultural materials had a mutual promotion relationship with the oridonin, and the levels of soluble sugar were closely related to the growth speed and developmental phase of the cultural materials.

[Key words] *Rabdosia rubescens*; callus; oridonin

冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Henmsl.) Hara 为唇形科香茶菜属多年生植物,主产于我国河南、山西、

陕西、贵州等地,具有清热解毒、消炎止痛及抗肿瘤之功效^[1]。许多学者对冬凌草的化学成分、药理作用及临床疗效进行了研究,发现其中的主要抗癌、抗菌活性成分为二萜类化合物(冬凌草甲素)。

利用植物组织培养技术生产次生代谢产物一直是国内外研究的一个热点。然而,在目前已经研究过的植物中,仅有少数植物的培养物中目的化合物的含量接近或超过原植物,而在多数情况下,培养细胞合成某些次生代谢产物的能力下降甚至消失。这与培养条件和培养方式无疑有着十分密切的关系。

[收稿日期] 20101115(002)
[基金项目] 国家“十一五”支撑项目(2006BA106A15-3);河南省教育厅自然科学研究(2010B360013)
[第一作者] 苏秀红,博士,副教授,从事药用植物资源研究, Tel:0371-65680041, E-mail:suxiuhong80@163.com
[通讯作者] *董诚明,学士,教授,从事药用植物资源研究, Tel:0371-65680041, E-mail:dcm371@sohu.com

但是,对于某些植物来说,培养细胞本身所处的分化状态也是一条不可忽视的原因^[2]。许多研究表明,培养细胞的分化程度与其次生代谢产物的合成能力之间确实存在着一定的关系。有关冬凌草组织培养的研究虽有报道,但主要集中于其愈伤组织的诱导及植株再生^[3-4]。本研究室发现冬凌草植株再生过程中,愈伤组织中未检测出冬凌草甲素,但随着细胞脱分化的开始,冬凌草甲素也随之有所积累,并随着再生植株的形成,其含量逐渐增加^[5]。冬凌草植株再生过程中随着培养物形态特征发生改变,细胞的生理生化特性也发生相应的变化,从而可能使培养细胞合成冬凌草甲素的能力下降或丧失。为了探明其积累的生理生化基础,本研究对冬凌草甲素积累过程中的叶绿素含量、可溶性糖、可溶性蛋白、丙酮酸含量的变化做了进一步研究,旨在揭示植物细胞的形态分化与冬凌草甲素合成和积累之间的机制。

1 材料与方法

冬凌草种子采自于河南省济源市冬凌草规范化种植基地,采集时间为2009年10月,经河南中医学院药学院董诚明教授鉴定为唇形科植物碎米桠*R. rubescens*的种子。

无菌苗获取:选取种皮上具花纹的冬凌草种子,自来水漂洗干净后放入75%乙醇中消毒30 s,之后用0.1%氯化汞溶液振荡消毒8 min,无菌水冲洗5次后,于超净工作台上将接种于1/2 MS培养基上,无菌条件下培养,培养约30 d,将无菌苗叶片,切成0.5 cm×0.5 cm大小,接种于MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA1.0 mg·L⁻¹培养基中,光照12 h·d⁻¹, (25±1)℃。

取样时期的确定:冬凌草植株再生过程中,根据培养物形态的变化,确定以下几个时期(表1)。

2 方法

2.1 叶绿素的提取及含量测定 采用丙酮法提取^[6]。取1 g愈伤组织,在10 mL 80%丙酮溶液中(暗箱)浸泡24 h,以80%丙酮溶液作为对照,用UV型分光光度计在663,645 nm波长下测量吸光度(A)。根据Arnon公式计算叶绿素含量。

叶绿素a = (12.7A_{663 nm} - 2.69A_{645 nm}) V/(1 000 × W)

叶绿素b = (22.9A_{645 nm} - 6.48A_{663 nm}) V/(1 000 × W)

总叶绿素 = (20.2A_{645 nm} + 8.02A_{663 nm}) V/(1 000 × W)

式中V为浸提液的最终体积(mL);W为愈伤鲜重(g)。

2.2 可溶性蛋白、可溶性糖的提取及测定^[7] 可溶

表1 不同取样时期培养物形态特征

No.	形态特征
1	叶片外植体
2	外植体周围布满愈伤,颜色为黄绿色
3	外植体全部愈伤化,颜色为淡绿色
4	愈伤增殖第10 d,颜色淡绿色,质地松软
5	愈伤增殖第20 d,颜色深绿色,质地较硬
6	分化7 d的愈伤组织,愈伤颜色中间逐渐变浅,周围黄绿色
7	愈伤分化14 d,愈伤周围有绿色芽点出现,愈伤周围颜色变深,中间愈伤褐化
8	愈伤分化21 d,愈伤周围芽点突起增多,芽点变大,但没有叶状的分化
9	不定芽有叶、茎的分化
10	组培苗高2~3 cm
11	组培苗高5~8 cm

性蛋白的提取及含量测定方法:称取鲜品0.25 g,用4 mL缓冲液研磨成匀浆后,1万r·min⁻¹离心10 min,得上清液备用,采用考马斯亮蓝G-250染色法进行含量测定。

可溶性糖的提取及含量测定方法:将材料在105℃的烘箱内鼓风干燥15 min,然后调温至60℃烘10 h,干后磨碎称取25 mg样品倒入10 mL刻度离心管内加入4 mL 80%乙醇,置于80℃水浴不断搅拌40 min,离心,收集上清液。其残渣加80%乙醇重复提2次,合并上清液。在上清液中加入10 mg活性炭,80℃脱色30 min,定容至10 mL,过滤后取滤液备用,采用硫酸-苯酚法进行含量测定。

2.3 丙酮酸的提取及含量测定 参照基础生物化学指导^[8]。称取0.5 g鲜品于研钵内加3 mL 8%三氯乙酸,仔细研成匀浆,再用8%三氯乙酸定容于10 mL量瓶。塞紧瓶塞,振摇提取,静置30 min。取约5 mL匀浆液离心(4 000 r·min⁻¹)10 min,上清液备用。取1 mL上清液于一刻度试管中,2 mL 8%三氯乙酸,加1 mL 0.1%2,4-二硝基苯胍液,摇匀,再加5 mL 1.5 mol·L⁻¹NaOH溶液摇匀显色,在520 nm波长下比色测吸光度。

2.4 冬凌草甲素的含量测定 冬凌草甲素的提取方法参照《中国药典》^[9]色谱条件如下:日本岛津LC-20A,ODS柱C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 mm),流动相甲醇-水(49:51),检测波长239 nm,流速0.8 mL·min⁻¹,柱温25℃。

2.5 试验处理及数据测定 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数

据统计采用 SPSS 软件分析, $P < 0.05$ 具有显著性差异。

3 结果与分析

3.1 冬凌草植株再生过程中冬凌草甲素含量变化及与有关成分的关系(表 2)。

表 2 冬凌草培养物内几种成分含量的动态变化 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

培养物 时期	冬凌草甲素	叶绿素	可溶性蛋白	可溶性糖	丙酮酸
1	8.88	1.47	6.57	20.2	0.168 0
2	4.50	0.483	4.97	25.1	0.127 0
3	0.272	0.026 5	2.94	26.2	0.086 8
4	0	0.027 1	1.81	33.5	0.050 9
5	0	0.039 8	2.57	58.8	0.051 3
6	0	0.035 2	3.38	33.3	0.074 4
7	0.593	0.032 3	1.80	28.7	0.077 0
8	0.648	0.031 8	1.73	27.3	0.082 3
9	1.10	0.169	3.50	38.4	0.085 4
10	3.56	0.224	5.13	27.7	0.106 0
11	7.03	0.322	5.45	29.8	0.014 1

表 2 可知,冬凌草植株再生过程中冬凌草甲素含量呈现出从有-无-有的现象,即随着叶片外植体细胞脱分化进行,冬凌草甲素含量逐渐下降,至愈伤组织增殖阶段,冬凌草甲素在培养物内已经不再积累合成。但随着细胞的分化,芽点的出现,培养物内再次合成冬凌草甲素,含量为 $0.593 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。之后,随再生植株的生长,冬凌草甲素含量逐渐上升,当组培苗高为 $5 \sim 8 \text{ cm}$ 时,其内冬凌草甲素的含量为 $7.03 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,这说明离体培养的条件下,只有当培养细胞达到一定的分化程度时次生代谢产物才能被活化,并且这种目的化合物的合成与芽和叶的分化和光照有关。

总叶绿素含量变化与甲素含量变化趋势相同。冬凌草叶片培养初期,随着细胞脱分化进行,培养物内总叶绿素含量迅速下降至 $0.026 5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,之后在芽的分化过程中直至再生植株形成过程中叶绿素含量趋于平稳,培养物有不定芽、茎、叶分化时叶绿素含量又逐渐上升。

冬凌草叶片脱分化初期,培养物内可溶性蛋白质含量与甲素变化趋势雷同,均呈下降趋势,愈伤增殖 10 d 左右蛋白含量降低为 $1.81 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,继续增殖培养蛋白含量又逐渐增加,转入分化培养基培养 7 d 左右时,此时愈伤颜色逐渐变浅,但其周围为黄

绿色时蛋白含量达到另外一个峰值为 $3.38 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,愈伤周围出现芽点突起时,但愈伤开始褐化后,蛋白含量又逐渐下降,分化 21 d 左右,愈伤周围芽点突起逐渐增多时,但此时愈伤褐化较为严重时,蛋白含量降至最低为 $1.73 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。之后,随着组培苗的生长蛋白含量又逐渐上升。

冬凌草叶片脱分化过程中可溶性糖的含量变化趋势与冬凌草甲素积累相反,呈逐渐增加趋势,至愈伤增殖培养 20 d 时,其含量最高为 $58.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,当将增殖后的愈伤转入分化培养基时可溶性糖含量迅速下降为 $33.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,之后在分化过程中缓慢下降,但当培养物现茎叶分化时,可溶性糖含量又有所升高。

在冬凌草植株的整个再生过程中丙酮酸含量呈现先降后升的趋势,与冬凌草甲素变化趋势较为类似。培养初期随着冬凌草叶片脱分化的进行,丙酮酸的含量逐渐降低,至冬凌草愈伤组织增殖培养 10 d 左右,丙酮酸含量降低最低值为 $50.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,之后在整个脱分化过程中其含量又逐渐上升。

3.2 冬凌草培养物内冬凌草甲素与其他指标的相关分析 对叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白、丙酮酸、冬凌草甲素 5 种指标进行了相关性分析,见表 3。

表 3 冬凌草培养物内各成分之间相关系数

成分	冬凌草 甲素	丙酮酸	可溶性糖	可溶性 蛋白	叶绿素
冬凌草甲素	1.000	0.897	-0.515	0.866	0.781
丙酮酸	0.897 ¹⁾	1.000	-0.606	0.870	0.824
可溶性糖	-0.515 ¹⁾	-0.606	1.000	-0.417	-0.449
可溶性蛋白	0.866 ¹⁾	0.870	-0.417	1.000	0.763
叶绿素	0.781 ¹⁾	0.824	-0.449	0.763	1.000

注: ¹⁾ $P < 0.01$ 。

由表 3 可知冬凌草培养物内冬凌草甲素与丙酮酸、可溶性蛋白、叶绿素呈显著正相关,与可溶性糖之间呈显著负相关。

4 讨论

冬凌草内主要次生代谢产物冬凌草甲素为二萜类化合物,该代谢产物的形成是以光合产物为基础,从光合初级产物到次生产物的形成过程是相当复杂的,在整个合成的过程中受到植物碳代谢、酶活性等多种生理生化因素的影响。本研究结果表明在离题培养物内叶绿素的含量变化趋势与冬凌草甲素含量基本一致,相关分析表明二者之间呈显著正相关,从

二萜类合成途径来看,丙酮酸为其生物合成的原料之一,而丙酮酸主要来源途径之一为光合产物-葡萄糖的代谢,所以培养物内叶绿素含量的高低,影响了培养物光合速率的大小,进而影响了培养物内光合产物-葡萄糖的含量,从而导致次生代谢产物-冬凌草甲素含量的降低,通过对培养物内丙酮酸含量的测定及相关分析表明,丙酮酸的含量与冬凌草甲素的含量也存在显著的正相关,这更加说明丙酮酸作为二萜类合成的原料之一,其含量的高低与冬凌草甲素积累密切相关。

蛋白质是原生质体的主要成分,也是组成细胞结构、贮存能量和维持正常生理代谢的功能性物质。本研究发现,外植体在脱分化形成愈伤组织后,可溶性蛋白含量迅速下降,可能是细胞在脱分化过程中消耗掉大量的蛋白质,在愈伤增殖后期及分化初期升高,这个时期为后期芽点的形成积累物质,为其后期器官的再生储备能量。随着芽点出现,蛋白质含量又有所降低,主要是芽点形成过程中消耗掉部分蛋白质,但当再生植株器官建成后,蛋白质含量又逐渐上升。可能是器官建成后,光和作用能力增强,影响到培养物内氮代谢所致。进一步相关分析表明可溶性蛋白含量的这种变化与冬凌草甲素积累呈正相关,可能是蛋白质的含量的变化可能影响到冬凌草甲素积累合成的相关酶类,从而两者之间表现出正相关。

相关分析表明冬凌草甲素积累与可溶性糖呈显著负相关,但 $r=0.515$,这说明培养物内可溶性糖含量的多少与冬凌草甲素积累有一定关系。该研究中可溶性糖的含量可能主要是与培养物发育有关,如从外植体形成愈伤组织,愈伤组织增殖初期阶段到

愈伤组织分化的阶段可溶性糖含量升高,这可能是由于可溶性糖作为新增细胞的碳骨架原料,含量提高可以保证愈伤组织增殖时快速增生细胞的原料供应。为新的发育阶段积累了物质和能量,并预示着新的发育状态即将开始,而到了分化期,愈伤组织进行脱分化时,由于器官原基形成、生长要以可溶性糖提供碳源,故在器官分化过程中可溶性糖含量又表现出下降趋势。

[参考文献]

- [1] 郑晓轲,董三丽,冯卫生. 冬凌草的质量控制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(2):10.
- [2] 张泓. 植物培养细胞的形态分化与次生代谢产物的生产[J]. 植物学通报,1994,11(1):12.
- [3] 李冬杰,魏景芳,许宁,等. 植物生长物质对冬凌草愈伤组织生长及褐化的影响[J]. 安徽农业科学,2006,34(6):1118.
- [4] 李景原,王太霞,杨相甫,等. 冬凌草愈伤组织诱导及细胞培养的研究[J]. 中草药,2000,31(12):938.
- [5] 苏秀红,董诚明,王伟丽. 冬凌草离体培养物中次生代谢产物积累规律的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(9):1080.
- [6] 彭运生,刘恩. 关于提取叶绿素方法的比较研究[J]. 北京农业大学学报,1992,18(3):247.
- [7] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [8] 文树基. 基础生物化学指导[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1994.
- [9] 中国药典. 一部[S]. 2010:107.

[责任编辑 邹晓翠]