



· 资源与鉴定 ·

PEG胁迫对黄芩黄酮类有效成分积累及相关基因表达的影响

杨兆春, 袁媛, 陈敏*, 帅凌飞, 肖倩, 林淑芳

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:研究不同程度PEG胁迫对黄芩悬浮细胞中黄芩苷、黄芩素的积累及相关基因表达的影响。方法:采用HPLC法检测黄芩悬浮细胞中黄芩苷、黄芩素的含量,用酶标仪检测细胞内游离脯氨酸含量,并用半定量RT-PCR的方法对相关基因的表达进行分析。结果与结论:黄芩悬浮细胞内游离脯氨酸含量随PEG胁迫浓度升高而升高,10%PEG胁迫黄芩悬浮细胞可以模拟干旱条件,提高悬浮细胞PAL基因表达量且会促进黄芩素的积累。20%PEG胁迫提高了UBGAT基因的表达量,但同时APX酶活性的提高抑制了黄芩素参与清除活性氧,导致了黄芩素向黄芩苷的转化。

[关键词] 黄芩;悬浮细胞;PEG;半定量RT-PCR;基因表达;黄芩苷;黄芩素

黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,是我国常用大宗药材,具有清热解毒、燥湿泻火、止血安胎的作用^[1]。现代研究表明,黄芩中主要活性成分黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等黄酮化合物,具有解热、抑菌、镇静、降压、降转氨酶等作用。近年来以黄芩苷为主要原料的双黄连针剂、片剂、口服液及银黄口服液等相继投产,致使黄芩提取物用量逐年增加。

黄芩素及其生物合成途径关键酶基因的表达受到外界环境的影响。其中,苯丙氨酸解氨酶(PAL)、查尔酮合酶(CHS)、黄芩素7-O-葡萄糖醛酸基转移酶(UBGAT)和 β -葡糖醛酸酶(GUS)是和黄酮化合物一起作用的起始关键酶^[2-3],在过氧化氢解毒代谢中发挥着重要作用。陈顺钦等^[4]研究表明光照对黄芩悬浮细胞中有效成分的积累有显著的促进作用,同时光诱导刺激了PAL、UBGAT的表达。

同时,土壤含水量也是影响黄芩有效成分的积累的重要因素之一,秦双双等^[5]发现轻度土壤缺水会促进黄芩幼苗中总黄酮和黄芩素含量的积累。本

实验以黄芩悬浮细胞为对象,通过用不同浓度PEG胁迫模拟水分胁迫,对黄芩悬浮细胞中黄芩苷、黄芩素的积累变化及其相关生物合成关键酶基因PAL、UBGAT、GUS、CHS表达进行分析。旨在为研究水分胁迫影响黄芩有效成分积累的分子机制提供理论基础,并建立研究平台。

1 材料和方法

1.1 植物材料及培养条件 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附加了 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D和 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ的MS液体培养基(3%蔗糖,pH 5.8)中进行悬浮培养,接种量(鲜重)约为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。处理组加入PEG,使其终浓度分别为10%,20%,30%,以未加PEG的悬浮细胞为对照。在光照16 h、黑暗8 h条件下进行培养,摇床转速为 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,培养温度为 $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 。分别在处理后4,8,16 d取样。每个处理做3次重复。悬浮细胞样品经液氮速冻后保存在 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中,备用。

1.2 仪器和试剂 多功能酶标仪(Varioskan flash)、酶标仪专用测量板(有机系)、水浴锅、Waters 2695 高效液相色谱仪、Waters 2996 二极管阵列检测器、Millennium 32 工作站、Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。对照品黄芩苷(批号0867-200205,纯度 $\geq 98\%$)、黄芩素(批号110766-200416,纯度 $\geq 98\%$)均购自中国药品生物制品检定所,色谱纯甲醇、乙腈,分析纯甲酸,高纯水(实验室

[稿件编号] 20110326003

[基金项目] 国家科技重大专项(2009ZX09301-005-03);北京市科技新星计划项目(2008B2);中国博士后科学基金特别资助项目(201003228)

[通信作者] * 陈敏, Tel: (010) 64014411-2955, E-mail: cmk315eke@163.com



自制)。Trizol 购自 Invitrogen 公司, cDNA 合成试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.3 脯氨酸含量测定^[6] 取 1 mL 悬浮细胞样品, 加入 300 μ L 3% 磺基水杨酸提取缓冲液, 沸水浴 10 min, 冷却后吸取 100 μ L 上清液, 加入 100 μ L 冰醋酸, 100 μ L 酸性茚三酮, 沸水浴 30 min, 冷却后加入 1 mL 甲苯, 振摇 30 s, 静置后取上清于离心管中, 在

3 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min。吸取上层脯氨酸甲苯溶液 200 μ L 在酶标仪上检测 520 nm 的吸光值, 并用提取液代替细胞液作为空白对照, 按公式 $M_{\text{脯氨酸}} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = (5 \times A_{520} / 2) / \text{细胞体积}$, 计算脯氨酸含量。

1.4 引物设计 根据 GenBank 数据库中的基因序列设计引物, 引物合成由上海生物工程技术有限公司完成, 序列见表 1。

表 1 基因序列引物

基因片段	引物序列(5'-3')	目标片段长度/bp	Genbank 登录号
PAL	Forward: AAGCCCTTACCAAGTTCC	139	EF501766
	Reverse: GCCCACAGCCTTAGAGTT		
UBGAT	Forward: AGCCAAGGAAGCCATAGTCAAC	174	EF512580
	Reverse: CCGAAACAAAGGAAGACGACA		
CHS	Forward: TCCGACTGAACTCCCTCT	130	AB008748
	Reverse: TCCCGTATTCGTAAGCAC		
GUS	Forward: AGAGCAGTGTGAAGATAAGC	239	AB040072
	Reverse: CATAGTAGGTCCAGGCAAG		
18S	Forward: CGTTGACTACGTCCTGCCCTT	179	FJ527609
	Reverse: GTTCACCTACGGAACCTTGTTACGAC		

1.5 总 RNA 提取与 cDNA 合成 选择培养 4, 16 d 的悬浮细胞处理组和对照组, 用 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取悬浮细胞样品总 RNA, 利用紫外分光光度仪测定总 RNA 的 $A_{260 \text{ nm}}$, $A_{280 \text{ nm}}$ 。选择 $A_{260 \text{ nm}/280 \text{ nm}}$ 为 1.8 ~ 2.0 的总 RNA 进行反转录, 反转录反应按 cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书进行。

1.6 半定量 RT-PCR^[4] 取上述反转录产物 1 μ L, 分别加入表 1 中各基因正向引物 0.5 μ L (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 反向引物 0.5 μ L (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), dNTP 1 μ L, 10 \times buffer 2.5 μ L, ExTaq 酶 0.5 μ L, 灭菌 H_2O 19 μ L。反应条件为 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 退火 40 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 充分延伸 10 min。通过扩增 18S rRNA 基因片段, 调整 cDNA 加入量使各样本的模板浓度一致。采用上述体系扩增相关功能基因的表达情况, 以 18S rRNA 基因片段为内标, 在目标 PCR 产物长度位置出现条带为相关酶基因有表达。以凝胶成像仪上扫描的各目标基因与 18S rRNA 的光吸收比值差异来表示目标基因在不同 PEG 浓度处理和取样时间的表达量。

1.7 黄芩苷、黄芩素含量的测定^[4] 取黄芩悬浮细胞液 1 mL, 4 $^\circ\text{C}$ 12 000 $\times g$ 离心去上清, 加入分析纯甲醇 1 mL, 称重, 超声提取 120 min, 取出后称重并补足失重。用 0.45 μm 滤膜过滤得检测溶液。

采用 HPLC 法测定样品中黄芩苷、黄芩素含量。流动相 (A) 乙腈-水-甲酸 (23: 77: 1.0); (B) 乙腈-水-甲酸 (80: 20: 1.0); 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 $^\circ\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 脯氨酸含量动态变化 未加 PEG 的对照组黄芩悬浮细胞内游离脯氨酸含量随培养时间延长无显著变化。不同 PEG 浓度处理 4 d 后, 各组黄芩悬浮细胞内游离脯氨酸含量均高于对照, 且 PEG 胁迫浓度越大, 游离脯氨酸含量越高。30% PEG 处理 8, 16 d 后, 黄芩悬浮细胞内游离脯氨酸含量也均高于对照, 见图 1。

2.2 黄芩苷、黄芩素积累动态变化 随着处理时间的延长, 对照组黄芩悬浮细胞内黄芩苷、黄芩素的含量均显著增加。10%, 20%, 30% PEG 胁迫 16 d 后, 黄芩悬浮细胞内黄芩苷含量均显著低于对照组; 而 10% PEG 处理组中黄芩素含量显著高于对照组, 20%, 30% 浓度的 PEG 处理 16 d 后细胞中的黄芩素含量低于对照组, 见图 1。

2.3 黄芩素、黄芩苷生物合成酶基因表达变化 以 18S rRNA 为内标, 通过半定量 RT-PCR 检测 PAL, GUS, UBGAT, CHS 基因在黄芩悬浮细胞 4, 16 d 及不

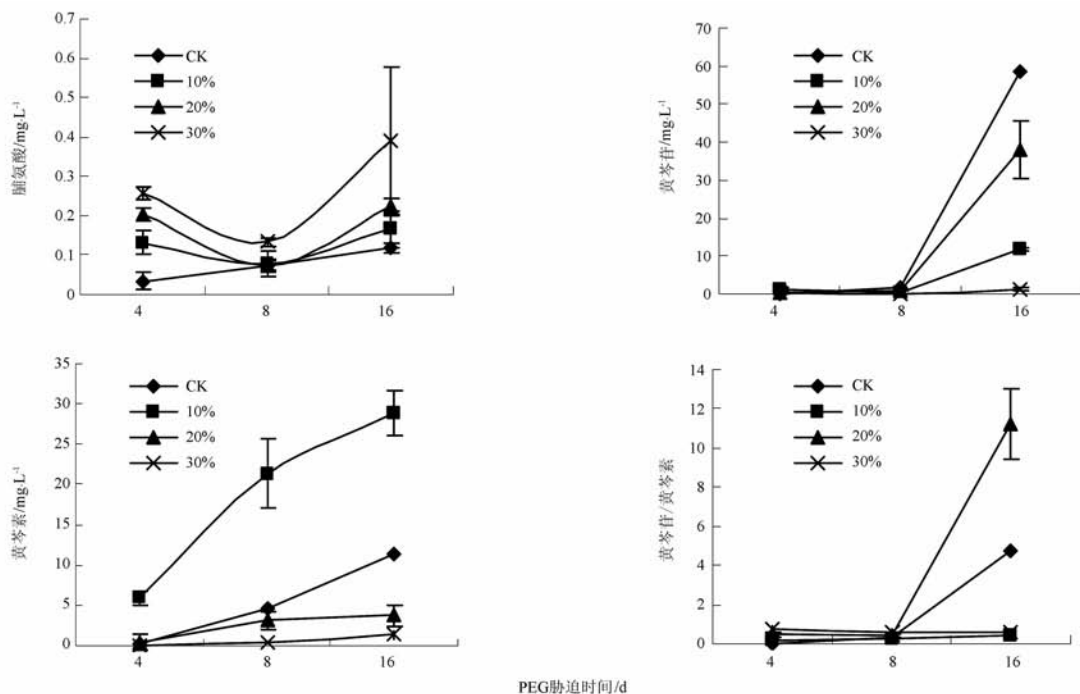


图 1 黄芩悬浮细胞中脯氨酸、黄芩苷、黄芩素含量、黄芩苷与黄芩素比的动态变化

同浓度 PEG 胁迫的表达情况,见图 2。与对照相比,悬浮细胞培养 4 d 时,*PAL* 基因表达量在 10% PEG 浓度胁迫下显著提高;培养 16 d 的悬浮细胞在 20% PEG 浓

度胁迫下表达量显著提高。*UBGAT* 基因在 20% PEG 浓度下培养 16 d 表达量最高。PEG 胁迫条件下,黄芩悬浮细胞中 *CHS*, *GUS* 基因表达基因没有显著变化。

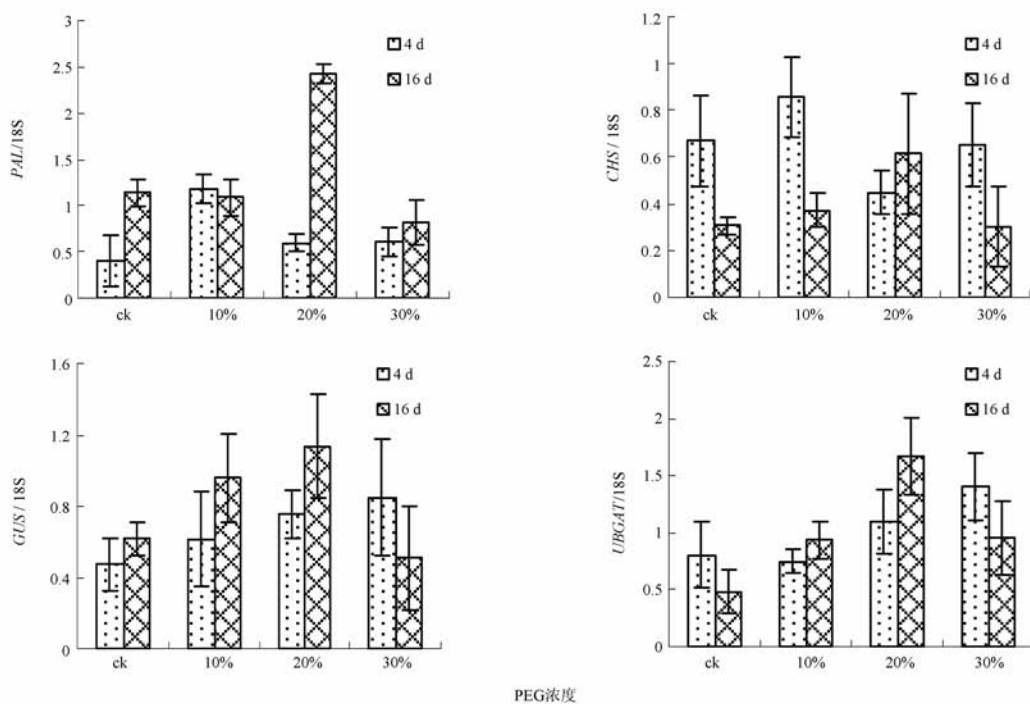


图 2 黄芩苷生物合成相关基因表达分析



2.4 黄芩苷与黄芩素含量比 黄芩苷与黄芩素的比值随着 PEG 胁迫浓度的不同呈现不同情况,见图 1。培养 4,8 d 的悬浮细胞对照组和处理组的苷与苷元比没有显著差异。培养 16 d 20% PEG 的悬浮液中苷素比高于对照组;10%,30% PEG 浓度的悬浮细胞中苷与苷元比大于处理组。

3 讨论

3.1 黄芩有效成分积累培养条件研究 本文结果表明,10% PEG 胁迫 4 d 后,黄芩悬浮细胞中黄芩素含量显著上升,并且随着胁迫时间的延长持续升高。因此,PEG 可以作为促进黄芩悬浮细胞中黄芩素积累的诱导剂。

3.2 PEG 模拟水分胁迫对黄芩素生物合成的影响

PAL 是黄酮生物合成途径中的关键酶^[7],在悬浮细胞中,10% PEG 胁迫 4 d 后,PAL 表达量显著上升,表明 10% PEG 胁迫刺激了黄芩素的生物合成,从而促进了黄芩素在细胞中的积累。

3.3 PEG 模拟水分胁迫对黄芩悬浮细胞过氧化氢清除系统的影响

黄芩素作为抗氧化剂,可能参与了逆境条件下黄芩体内过氧化氢的清除。在 PEG 模拟水分胁迫条件下,细胞之中重要的渗透剂和防脱水机脯氨酸的含量会大量积累,其积累量与逆境水平及植物对逆境的抗性有关^[8],在植物适应逆境过程中能降低细胞渗透势以提高植物组织的持水力。在本实验中,黄芩悬浮细胞内游离脯氨酸的积累量与 PEG 浓度呈正比。

黄芩苷是黄芩素的储存形式^[9],当植物受到逆境胁迫时,黄芩苷水解为其苷元发挥抗氧化功能。在 10% PEG 胁迫 16 d 后,黄芩苷含量显著下降,同时苷/苷元显著低于对照。此种结果显示随着胁迫时间的延长,细胞内的黄芩苷大量水解为苷元参与抗氧化作用中来,不利于黄芩苷的积累。

20% PEG 胁迫 4 d 时,黄酮类成分含量和基因表达量没有显著性差异;16 d 后,悬浮细胞中黄芩

素含量显著下降,但 PAL 基因表达量显著上升,同时苷/苷元显著上升,控制苷向苷元转化的关键酶 UBGAT 基因表达量也显著上升。此现象表明在 20% PEG 胁迫下 16 d 时,黄芩素生物合成被激活,但却不能促进黄芩素在细胞中的积累。Yamasaki, H 等^[10]报道 APX 可以将氧化型黄酮还原为还原型黄酮,因此推测由于 20% PEG 刺激了 APX 等抗氧化酶的活性,从而抑制了黄芩素参与清除活性氧,导致黄芩素向黄芩苷转化。

[参考文献]

- [1] 徐国钧,何宏贤,徐璐珊. 中国药材学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:398.
- [2] Doke N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissue to infection with incompatible race of phytophthora infestans and the hyphal cell wall components[J]. *Physiol Plant Pathol*,1983, 23:345.
- [3] 周琳,王雁,彭镇华,等. 牡丹查耳酮合酶基因 *Ps-CHS1* 的克隆及其组织特异性表达[J]. *园艺学报*,2010,37(8):1295.
- [4] 陈顺钦,袁媛,罗毓健,等. 光照对黄芩黄酮类活性成分积累及其相关基因表达的影响[J]. *中国中药杂志*,2010,35(5):49.
- [5] 秦双双,陈顺钦,黄璐琦,等. 水分胁迫对黄芩内源激素与有效成分相关性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*,2010,16(7):99.
- [6] 赵瑞雪,程钰宏,董宽虎. 植物脯氨酸及其合成酶系研究进展[J]. *草业科学*,2008,25(2):90.
- [7] 刘天国,石延霞,文景芝. 水杨酸诱导烟草对 TMV 的抗性和 PAL 活性变化研究[J]. *植物病理学报*,2003,33(2):190.
- [8] 周洁,郭兰萍,张霁. 药用植物对干旱胁迫的响应及实验策略与方法[J]. *中国中药杂志*,2010,35(15):1919.
- [9] Masao Hirotsani, Ryo Kuroda, Hideyuki Suzuki, et al. Cloning and expression of UDP-glucose: flavonoid 7-O-glucosyltransferase from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* [J]. *Planta*, 2000, 210(6):1006.
- [10] Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂ [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 1405.

Effects of PEG stress on flavonoids accumulation and related gene expression in suspension of *Scutellaria baicalensis*

YANG Zhaochun, YUAN Yuan, CHEN Min*, SHUAI Lingfei, XIAO Qian, LIN Shufang
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of PEG stress on baicalin, baicalein accumulation induced by an increased concentration of PEG solution and the related genes' expression in suspension of *Scutellaria baicalensis*. **Method:** The content of baicalin, baicalein in suspension of *S. baicalensis* was determined by HPLC. The related genes' expression was analyzed by semi-quantitative PCR. **Result:** The content of proline in suspension of *S. baicalensis* was promoted by PEG treatment. Ten percent PEG treatment promoted the expression of PAL and the content of baicalein in experimental material via a drought stress. 20% PEG solution treatment promoted the expression of UBGAT. At the same time, the increased activity of APX inhibited the progress of eliminating reactive oxygen by baicalein, which induced the transformation from baicalein to baicalin. **Conclusion:** Active ingredient in suspension of *S. baicalensis* was promoted significantly via a stress of light concentration of PEG solution.

[Key words] *Scutellaria baicalensis*; suspension cells; PEG; semi-quantitative PCR; gene expression; baicalin; baicalein

doi:10.4268/cjcm20111601

[责任编辑 吕冬梅]

书 讯

由高文远教授编写的《现代中药质量控制及技术》已在科学出版社出版发行,该书从中药质量控制的重要性和必要性出发,叙述了中药质量控制的发展历史、发展趋势;详细介绍了中药的来源鉴别、性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别和新技术在中药鉴别中的应用;高效液相色谱、超高压液相色谱、高效毛细管电泳、色谱-质谱联用技术等色谱技术在中药质量控制中的应用;还包括中药指纹图谱质量控制技术及生物效价、代谢组学、分子生物学等现代质量控制技术。此外,还专辟章节介绍了含不同类型活性成分中药及不同剂型中药,中药材、中药饮片和中成药,以及中药保健食品的质量控制。既可以供中药和药学相关领域的科研、教学人员使用,也可以作为中药和药学相关领域的研究生、本科生参考。

当当网、卓越网、新华书店及医学专业书店有销售。定价120元。免邮寄挂号费用,联系人:温晓萍;电话:010-64034601 64015165;地址:北京市东黄城根北街16号科学出版社(100717);联系人:温晓萍;请在汇款附言注明购书的书名、册数、联系电话、发票等。