

Effect of Elicitors on the Biosynthesis of Active Secondary Metabolite in Hairy Roots of Medicinal Plants

Jialei Zhou, Yuan Fang, Jianwei Chen*

School of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing Jiangsu
Email: 1041148403@qq.com, *chenjw695@126.com

Received: May 6th, 2017; accepted: May 23rd, 2017; published: May 26th, 2017

Abstract

Objective: To discuss the changes of secondary metabolites in hairy roots of medicinal plants induced by elicitors. **Methods:** According to related documents both at home and abroad in recent 20 years, the paper systematically analyzes the effects of different elicitors and co-elicitors on the accumulation of secondary metabolites in hairy roots of medicinal plants. **Results:** Elicitors and co-elicitors can obviously improve the biosynthesis of phenolic acids, quinones, alkaloids, flavonoids, terpenoids, triterpenoidsaponins in hairy roots of 16 medicinal plants. **Conclusion:** The production of secondary metabolites in hairy roots of medicinal plants can be increased by elicitors.

Keywords

Medicinal Plant, Hairy Root, Elicitor, Secondary Metabolite

诱导子对药用植物毛状根活性次生代谢物生成的影响

周佳蕾, 方圆, 陈建伟*

南京中医药大学药学院, 江苏 南京
Email: 1041148403@qq.com, *chenjw695@126.com

收稿日期: 2017年5月6日; 录用日期: 2017年5月23日; 发布日期: 2017年5月26日

*通讯作者。

摘要

目的: 探讨诱导子对药用植物毛状根次生代谢产物生成的影响。方法: 查阅了国内外近20年来相关文献, 归纳分析了不同类型诱导子及其组合诱导子对药用植物毛状根次生代谢产物合成量的变化值。结果: 诱导子及其组合诱导子可明显提高16种药用植物毛状根中酚酸类、醌类、黄酮类、萜类、三萜皂苷类、生物碱类等次生代谢产物的合成量。结论: 诱导子对药用植物毛状根产生次生代谢产物的合成具有促进作用。

关键词

药用植物, 毛状根, 诱导子, 次生代谢物

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

1982年 Chilton 首次报道发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)在侵染植物的过程中, 发现在感染部位上或附近能产生大量副产物——发状根(hairy root) [1]。此后, 毛状根培养(hairy root culture)发展成植物基因工程和细胞工程相结合的一项技术, 并在药用植物次生代谢产物的生产、转基因研究、种质保存和良种繁育等方面得到广泛应用。进一步研究表明, 毛状根具有生长迅速、激素自养、生长条件简单、次生代谢产物含量高且稳定、分化程度高、不易变异等特点, 而且可把次生代谢物分泌至培养基中[2]。增加毛状根中次生代谢产物产量的方法可通过改变培养基成分及其浓度、生长调节剂的选择或基因克隆等手段来实现。为了获取更多具有天然生物活性的次生代谢物, 药学工作者利用毛状根培养技术尝试各种途径和方法来提高药用植物活性次生代谢产物的产量, 近年来, 通过诱导子(elicitor)对药用植物毛状根定向诱导研究, 表明其可促进多种生物活性次生代谢产物的合成量。本文以中国知网为主要数据库, 以诱导子、毛状根、次生代谢产物为关键词, 筛选出国内外近20年来的相关文献, 综述了诱导子对人参、丹参、黄花蒿等16种药用植物毛状根及6种不同类型生物活性次生代谢产物定向诱导的影响, 为同类药用植物毛状根培养生产次生代谢产物的研究提供一定的参考价值。

2. 诱导子与次生代谢产物

诱导子, 从植物病理学的角度来讲, 是指在抗病生理过程中诱发植物产生植保素(phytoalexin)和引起植物过敏反应(hypersensitive reaction, HR)的因子。从细胞培养的角度来讲, 是指能促进植物细胞产生目的产物的因子。根据其来源可分为生物诱导子(biotic elicitor)和非生物诱导子(abiotic elicitor), 生物诱导子主要包括真菌孢子、菌丝体、匀浆、真菌细胞壁成分、真菌培养物滤液等, 而非生物诱导子是指不是细胞中天然成分, 但又能触发形成植保素的信号因子, 如紫外线、高温、低温、pH值、乙烯、重金属盐和高浓度盐等[3]。诱导子被认为是提高植物细胞培养中次生代谢产物最有效的途径之一[4]。

次生代谢产物(secondary metabolite)是以初生代谢产物为“原料”, 在一系列酶的催化下, 生成一些特殊的化学物质, 包括脂肪酸及其酯类、酚酸类、苯丙素类、香豆素类、醌类、黄酮类、萜类、皂苷类、

生物碱类、甾体类等类型化学成分，其中大多数具有药理活性。

3. 诱导子对药用植物毛状根次生代谢产物的影响

在药用植物毛状根培养实验中，利用诱导子来提高其次生代谢产物合成量已成为常用方法，以下按中药活性成分结构类别分述诱导子在对提高药用植物毛状根中次生代谢产物的影响，先游离成分，如酚酸类、生物碱类，后含苷类，如三萜皂苷类(见表 1)。

3.1. 酚酸类成分

酚酸类成分广泛存在于药用植物中，如忍冬科的金银花，菊科的蒲公英，唇形科的鼠尾草，蔷薇科的仙鹤草，橄榄科的方榄，伞形科的当归等。这些植物中的酚酸类成分(如绿原酸、原儿茶酸、咖啡酸、没食子酸、阿魏酸等)具有重要的药理活性，如清除自由基、抗炎、抗病毒、免疫调节、抗凝血及抗肿瘤作用等，因此受到越来越多的人关注[5]。

酚酸类成分的生成与植物所受外界胁迫有很大关联，酚类物质本身具有抗病性，且其氧化醌类杀菌力更强，可氧化胞外连丝而导致病原菌扩展受阻，从而引起植株过敏性反应；同时酚类物质也可以形成木质素的前体，使寄主细胞木质化而产生抗病作用。因此当植物受到外界胁迫后，植物为了适应这一环境，体内就会积累酚类物质，酚类物质积累越多，抗胁迫能力越强[6]。

实验研究证明，利用诱导子可以提高酚酸类成分在药用植物毛状根中的合成量。张顺仓[7]等使用真菌诱导子和茉莉酸甲酯使丹参毛状根中迷迭香酸的含量分别提高了 50% 和 20%，而两种诱导子的协同使用却只提高了 30%；Bais HP [8]等使用疫霉的真菌细胞壁诱导紫花罗勒毛状根，发现其中迷迭香酸含量是对照的 1.9 倍。

3.2. 醌类成分

醌类成分是天然药物中一类重要的化学成分，它是一类分子内具有不饱和环二酮结构(醌式结构)或容易转变成这样结构的天然有机化合物。按化学结构主要分为苯醌、萘醌、菲醌和蒽醌四种，其中蒽醌及其衍生物种类最多。其生源合成主要通过乙酰-丙二酸、莽草酸-琥珀酰苯甲酸、芳香氨基酸等多种途径实现。

醌类成分在高等植物中广泛分布，如蓼科的大黄、何首乌、虎杖，唇形科的丹参、茜草科的茜草、豆科的决明子、番泻叶、百合科的芦荟、紫草科的紫草等。醌类在一些低等植物，如地衣类、菌类和藻类的代谢产物中也有存在。这些成分具有泻下、抗菌、抗肿瘤、利尿和止血等多个方面的生物活性[9] [10]。

实验研究证明，利用诱导子可以提高醌类成分在药用植物毛状根中的合成量。张璞[11]等使用黑曲霉和米曲霉诱导新疆紫草毛状根，其萘醌含量分别是对照的 2.4 倍和 2.3 倍，同时发现在生物反应器中添加黑曲霉和米曲霉的混合诱导子及大孔吸附树脂 NKA-9，其总萘醌含量是对照的 4.17 倍；阎岩[12]等使用 4% 密旋链霉菌 Act12 诱导丹参毛状根，促进丹参酮积累增加，最高达到对照的 10.2 倍，同时发现 4% 密旋链霉菌 Act12 处理可以提高丹参毛状根中活性氧含量，同时上调 HMGR 和 DXR 基因表达，从而提高毛状根中的丹参酮含量。

3.3. 生物碱类成分

生物碱类是指来源于生物界的一类含氮有机化合物。目前已知的生物碱主要生源途径有两个：一是氨基酸途径，二是甲戊二羟酸(异戊烯)途径。采用生源结合化学分类法，生物碱分为源于鸟氨酸途径的生物碱类、源于赖氨酸途径的生物碱类、源于苯丙氨酸和酪氨酸途径的生物碱类、源于色氨酸途径的生物碱类、源于邻氨基苯甲酸途径的生物碱类、源于组氨酸途径的生物碱类、萜类生物碱和甾体类生物碱。

Table 1. The effects of biosynthetic amount of secondary metabolites in hairy roots of medicinal plants induced by elicitors
表 1. 诱导子对药用植物毛状根次生代谢产物合成量的影响

次生代谢产物名称	药用植物名称	诱导子	次生代谢产物量 + 增重 (mg/g)	诱导子促进增量 (%)	参考文献
酚酸类					
迷迭香酸 Rosmarinic acid	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bung	内生菌	3.98 + 1.99 mg/g (DW)	50.00	[7]
		茉莉酸甲酯	3.41 + 0.68 mg/g (DW)	19.94	[7]
		内生菌 + 茉莉酸甲酯	3.85 + 1.15 mg/g (DW)	29.99	[7]
总酚酸 Total phenolic acid	紫花罗勒 <i>Ocimumbasilicum</i> L	疫霉	79.2 + 71.9 g/L	90.78	[8]
		丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bung	茉莉酸甲酯	74.36 + 14.87 mg/g (DW)	20.00
醌类					
萘醌 Shikonin	新疆紫草 <i>Arnebiaeuchroma</i> (Royle) Johnst	黑曲霉	0.35% + 0.50%	142.86	[11]
		米曲霉	0.35% + 0.46%	131.43	[11]
丹参酮 Tanshinone	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bung	山梨醇	0.25 + 0.5 mg/g (DW)	200.00	[23]
		PGPR 蜡样杆菌	0.19 + 1.4 mg/g	736.84	[24]
		密螺旋霉菌 Act12	0.5 + 4.6 mg/g (DW)	920.00	[12]
		酵母提取物	0.46 + 0.91 mg/g (DW)	197.83	[25]
		细菌多糖	0.19 + 1.4 mg/g	736.84	[26]
		蜡样芽孢杆菌	1.4 + 9.0 mg/L	642.86	[27]
丹参酮 II _A Tanshinone II _A	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bung	茉莉酸甲酯	0.252 + 1.311 mg/g	520.24	[28]
二氢丹参酮 I Dihydrotanshinone I	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bung	半知菌	0.067 + 0.93 mg/g (DW)	1388.06	[7]
		茉莉酸甲酯	0.033 + 0.957 mg/g (DW)	2900.00	[7]
		真菌诱导子 + 茉莉酸甲酯	0.07 + 1.3 mg/g (DW)	1857.14	[7]
		半知菌	0.11 + 2.94 mg/g (DW)	2672.73	[7]
隐丹参酮 Cryptotanshinone	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bung	酵母提取物	(胞内) 0.001 + 0.059% (DW)	5900.00	[22]
			(胞外) 0.002 + 0.076 mg/L	3800.00	
		茉莉酸甲酯	0.115 + 1.775 mg/g (DW)	1543.48	[7]
		茉莉酸甲酯	0.024 + 0.548 mg/g	2283.33	[28]
		真菌诱导子 + 茉莉酸甲酯	0.114 + 3.326 mg/g (DW)	2917.54	[7]
生物碱类					
莨菪烷类生物碱 Tropane alkaloids	木本曼陀罗 <i>Brugmansia candida</i> Pers.	Ag ⁺	(胞内) 1400 + 4800 μg/g (胞外) 60 + 20 μg/g	342.86 33.33	[29]
		NaCl	3.90 + 8.07 mg/g	206.92	[30]
莨菪碱 Hyoscyamine	曼陀罗 <i>Datura stramonium</i> L.	茉莉酸甲酯	0.655 + 0.838 mg/g	127.94	[14]

Continued

东莨菪碱 Scopolamine	木本曼陀罗 <i>Brugmansia candida</i> Pers.	CdCl ₂	(胞外) 10 + 230 μg/g (FW)	2300.00	[29]
		水杨酸	(胞外) 10 + 38 μg/g (DW)	380.00	[29]
	木本曼陀罗 <i>Brugmansia candida</i> Pers.	酵母提取物	(胞外) 40 + 240 μg/g (FW)	600.00	[29]
	曼陀罗 <i>Datura stramonium</i> L.	茉莉酸甲酯	0.309 + 0.130 mg/g	42.07	[14]
靛蓝 Indigo	蓼蓝 <i>Polygonum tinctorium</i> Lour.	壳聚糖	151.7 + 34.5 μg/g (DW)	22.74	[31]
阿玛碱 Ajmalicine	长春花 <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	KCl	(胞内) 1.25 + 2.84 mg/g	227.20	[32]
		PVP	(胞内) 0.90 + 1.63 mg/g	181.11	[32]
			(胞外) 1.32 + 0.872 mg/L	66.06	[32]
		甘露醇	(胞外) 1.32 + 4.08 mg/L	309.09	[32]
		NaCl	(胞外) 1.32 + 0.70 mg/L	53.03	[32]
		CdCl ₂	(胞外) 1.32 + 0.42 mg/L	31.82	[32]
黄酮类					
染料木黄酮 Genistein	补骨脂 <i>Psoralea corylifolia</i> L.	酵母提取物	0.19% + 0.04% (DW)	21.05	[16]
		壳聚糖	0.19% + 0.089% (DW)	46.84	[16]
		水杨酸	0.19% + 0.038% (DW)	20.00	[16]
水飞蓟素 Silymarin	奶蓟草 <i>Silybum marianum</i> L.	酵母提取物	0.15% + 0.32 mg/g (DW)	213.33	[33]
		酵母提取物	0.081% + 0.049 mg/g (DW)	60.49	[17]
黄酮 Flavonoids	甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	聚乙二醇	0.081% + 0.014 mg/g (DW)	17.28	[17]
		聚乙二醇 + 酵母提取物	0.081% + 0.105 mg/g (DW)	129.63	[17]
萜类					
青蒿素 Artemisinin	黄花蒿 <i>Artemisia annua</i> L.	胶孢炭疽菌	8.91% + 4.6 mg/L	51.63	[18]
		寡糖	7.28% + 4.02 mg/L	55.22	[19]
		黄青霉	249.6% + 299.5 mg/L	119.99	[34]
		酵母提取物	0.3% + 0.6 μg/mg (DW)	200.00	[35]
		壳聚糖	0.26% + 1.58 μg/mg (DW)	607.69	[35]
		茉莉酸甲酯	0.25% + 1.27 μg/mg (DW)	508.00	[35]
含硫苷类					
旱金莲苷 Glucotropaeolin	旱金莲 <i>Tropaeolum majus</i> L.	酵母提取物	60% + 20 mg/g (DW)	33.33	[36]
		茉莉酸甲酯	60% + 40 mg/g (DW)	66.66	[36]
		乙酰水杨酸	60% + 90 mg/g (DW)	150.00	[36]
		乙酰水杨酸 + 酵母提取物	60% + 140 mg/g (DW)	233.33	[36]
		乙酰水杨酸 + 茉莉酸甲酯	60% + 140 mg/g (DW)	233.33	[36]

Continued

		黄酮苷类			
黄芩苷 Baicalin	黄芩 <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Co ²⁺	0.98% + 0.13 g/L	13.27	[37]
		黑曲霉	0.98% + 0.09 g/L	9.18	[37]
		米曲霉	0.98% + 0.1 g/L	10.20	[37]
		茉莉酸甲酯	12.15% + 39.14 mg/g	322.14	[38]
		水杨酸	12.15% + 10.38 mg/g	85.43	[38]
		酵母提取物	1.55% + 0.38% (DW)	24.52	[16]
黄豆苷元 Daidzein	补骨脂 <i>Psoralea corylifolia</i> L.	壳聚糖	1.55% + 1.23% (DW)	79.35	[16]
		水杨酸	1.55% + 0.65% (DW)	41.94	[16]
		乙酰水杨酸	0.62% + 0.82% (DW)	132.26	[39]
		茉莉酸	0.47% + 2.96% (DW)	629.79	[39]
		酵母提取物	(胞内) 0.6% + 0.5% (胞外) 0.1% + 0.3%	83.33 300.00	[40]
王不留行黄酮苷 Vaccarin	王不留行 <i>Vaccaria segetalis</i> (Neck.) Garcke	茉莉酸甲酯	(胞内) 0.621% + 3.003% (胞外) 0.092% + 0.16%	483.57 173.91	[40]
		水杨酸	(胞内) 0.621% + 1.765% (胞外) 0.092% + 0.113%	284.22 122.83	[40]
		三萜皂苷类			
人参皂苷 Ginsenoside	人参 <i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	寡糖	1.6% + 1.9%	118.75	[21]
		茉莉酸甲酯	1.93% + 0.63%	32.64	[22]
	珠子参 <i>Panax japonicus</i> var. <i>major</i>	寡糖	1.33% + 2.47%	185.71	[41]

DW: 干重, FW: 鲜重。

生物碱类成分主要分布在植物界, 绝大多数存在于高等植物的双子叶植物中, 其中最重要的 18 个科为: 石竹科、番荔枝科、夹竹桃科、菊科、小檗科、紫草科、黄杨科、卫矛科、蝶形花科、樟科、豆科、防己科、罂粟科、胡椒科、毛茛科、茜草科、芸香科和茄科等。单子叶植物代表性类群有石蒜科、百合科、兰科等。裸子植物有麻黄科、红豆杉科、三尖杉科等类群。

生物碱类成分结构式样丰富, 生物活性多样, 常为许多药用植物的有效成分。如鸦片中的吗啡具有强烈的镇痛作用, 可待因具有止咳作用; 麻黄中的麻黄碱具有平喘作用; 黄连、黄柏中的小檗碱具抗菌消炎作用; 长春花中的长春花碱、三尖杉中的高三尖杉酯碱、喜树中的喜树碱等均具有很好的抗肿瘤作用等[13]。

实验研究证明, 利用诱导子可以提高生物碱类成分在药用植物毛状根中的合成量。孙际薇[14]等采用 HPLC 测定茉莉酸甲酯处理后不同浓度梯度及不同时间段(0, 3, 6, 9, 12 d)曼陀罗毛状根中东莨菪碱和莨菪碱的含量以及其在培养基中的含量, 曼陀罗毛状根经茉莉酸甲酯处理后 3, 6, 9, 12 d 的东莨菪碱的质量分数分别达 0.419, 0.439, 0.43, 0.374 mg/g, 分别是对照组的 1.36, 1.42, 1.17, 1.12 倍; 莨菪碱的质量分数达 1.493, 0.817, 0.723, 0.698 mg/g, 分别是对照组的 2.28, 1.11, 0.63, 0.70 倍, 从而证明茉莉酸甲酯能显著促进曼陀罗毛状根中东莨菪碱成分的积累并向培养基中释放; 能显著促进处理 3 d 和 6 d 后

曼陀罗毛状根中莨菪碱成分的积累并向培养基中释放。

3.4. 黄酮类成分及其苷类衍生物

黄酮类成分及其苷类衍生物是指由 C₆-C₃-C₆ 单位组成的化合物, C-2 或 C-3 位上苯环, 以游离态与糖结合为苷的形式存在。根据结构特点可将主要的天然黄酮类化合物分为黄酮类、黄酮醇类、查尔酮、橙酮、异黄酮类、花青素类, 以及各类二氢衍生物。

黄酮类成分多存在于高等植物及蕨类植物中, 苔藓类中含有的黄酮类成分为数不多, 而藻类、微生物(如细菌)及其他海洋生物中没有发现黄酮类成分的存在[13]。据报道, 黄酮类化合物集中分布于被子植物中, 尤以唇形科、玄参科、爵麻科、苦苣苔科、菊科等植物中存在较多; 黄酮醇类较广泛分布于双子叶植物中, 特别是一些木本植物的花和叶中; 二氢黄酮类特别在蔷薇科、芸香科、豆科、杜鹃花科、菊科、姜科中分布较多; 二氢黄酮醇类较普遍地存在于豆科植物中; 异黄酮类以豆科蝶形花亚科和鸢尾科植物中存在较多。在裸子植物中也有存在, 如双黄酮类多局限分布于裸子植物, 尤其是松柏纲、银杏纲和凤尾纲等植物中[15]。

黄酮类成分的生物活性丰富多样。芦丁、橙皮苷、*d*-儿茶素等具有降低毛细血管脆性和异常通透性作用; 川陈皮素、槲皮素具止咳祛痰作用; 染料木素、金雀花异黄酮、大豆素等异黄酮类具雌性激素样作用和抗氧化、抗肿瘤作用; 木犀草素、黄芩苷、黄芩素以及槲皮素、桑色素等具有抗菌、抗病毒作用; 牡荆素、桑色素、*d*-儿茶素等具有抗肿瘤作用。

实验研究证明, 利用诱导子可以提高黄酮类成分在药用植物毛状根中的合成量。Shinde AN [16]等使用不同诱导子诱导补骨脂毛状根, 发现 2 mg/L 的壳聚糖促使染料木黄酮的干重增加 46.84%, 1 mM 的水杨酸促使染料木黄酮的干重增加 20%, 200 mg/L 的酵母提取物促使染料木黄酮的干重增加 21.05%; Zhang HC [17]等使用 0.1% 酵母提取物和 2% 聚乙二醇诱导甘草毛状根中黄酮的合成, 发现黄酮的干重分别增加 60.49% 和 17.28%, 同时发现 0.1% 酵母提取物和 2% 聚乙二醇的混合诱导子可以促使黄酮的合成量干重达到对照的 2.29 倍。

3.5. 萜类成分

萜类成分是由甲戊二羧酸衍生、且分子式符合(C₅H₈)_n 通式的化合物及其衍生物。萜类成分根据分子骨架中异戊二烯单元的数目进行分类, 如单萜、倍半萜、二萜等, 再根据分子中碳环的数目, 进一步分为链萜、单环萜、双环萜、三环萜和四环萜等。

萜类成分是天然产物中数量最多的一类成分, 其在植物界中的分布极为广泛, 藻类、菌类、地衣类、苔藓类、蕨类、裸子植物及被子植物中均有萜类的存在。单萜在唇形科、伞形科、樟科及松科等植物腺体、油室及树脂道内大量存在; 倍半萜集中分布于木兰目、芸香目、山茱萸目及菊目等植物中; 二萜主要分布于五加科、马兜铃科、菊科、橄榄科、杜鹃花科、大戟科、豆科、唇形科和茜草科等植物中, 是形成树脂的主要物质; 二倍半萜数量较少, 主要分布于羊齿植物、菌类、地衣类、海洋生物及昆虫的分泌物等中; 三萜是构成植物皂苷、树脂等的重要物质; 四萜主要是一些脂溶性色素, 广泛分布于植物中, 一般为红色、橙色或黄色结晶[13]。

实验研究证明, 利用诱导子可以提高萜类成分在药用植物毛状根中的合成量。王剑文[18]等将从胶孢炭疽菌菌丝体中提取纯化的寡糖提取物用于诱导黄花蒿毛状根合成青蒿素, 发现培养 23 d 的毛状根经诱导子(0.4 mg/mL)处理 4 d 后, 青蒿素产量可达 13.51 mg/L, 比同期对照产量提高 51.63%; Zhang B [19]等也使用寡糖诱导黄花蒿毛状根合成青蒿素, 发现培养 16 d 的毛状根加入诱导子(60 μg/mL)处理 4 d 后, 青蒿素最高产量达 11.3 mg/L, 比对照增加 55.2%。

3.6. 三萜皂苷类成分

三萜皂苷类成分是三萜皂苷元与糖结合而成的化合物，常见的苷元为四环三萜与五环三萜，常见的糖主要是葡萄糖、半乳糖、木糖、鼠李糖、阿拉伯糖等。根据糖链的多少，可将三萜皂苷分为单糖链苷、双糖链苷、三糖链苷。

三萜皂苷广泛存在于植物中，是一类重要的植物次生代谢产物，尤其在双子叶植物中分布最多，目前发现的已达 2 万多种[20]。三萜皂苷具有多种生物活性，如抗炎、抗肿瘤、抗凝血、抗病毒、降低胆固醇、保肝和增强植物抗病、抗虫害的能力。

实验研究证明，利用诱导子可以提高三萜皂苷类成分在药用植物毛状根中的合成量。Zhou LG [21] 等使用寡糖诱导人参毛状根合成人参皂苷，结果实验组的含量最高可达对照组的 1.18 倍；徐立新[22]使用茉莉酸甲酯来诱导人参毛状根合成人参皂苷，发现茉莉酸甲酯在较低浓度的时候对总皂苷的积累和人参毛状根的生长有促进作用，当其浓度为 0.001 mmol/L 时，总皂苷含量为 2.56%，比对照增加了 32.64%。

由表 1 可见，在适宜的条件下，在药用植物毛状根中加入诱导子均表现出次生代谢产物含量的增加，最高的可增加 59 倍，如隐丹参酮(cryptotanshinone)，表明诱导子可以促进药用植物毛状根次生代谢产物的合成；不同诱导子对同一次生代谢产物的增量有显著差异，如对莨菪碱(Hyoscyamine)诱导，NaCl 与茉莉酸甲酯相差 197 倍，提示选择适宜的诱导子可定向、高效、大量的获取具有药理活性的次生代谢产物。

另外，研究显示茉莉酸类物质作为诱导子，可以引发植物的防御反应，其通过影响植物相关防御基因的表达从而促进次生代谢产物的合成。于丽莉[42]实验发现给人参毛状根外源添加茉莉酸甲酯作为诱导子后，过氧化物酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶的酶活变化趋势与人参皂苷生物合成关键酶基因的表达量变化的趋势一致，这说明植物抗性酶类的酶活变化可以作为植物防御反应的重要生理生态指标。酶活性的增强，意味着植物次生代谢活动的提高，次生代谢产物的积累增加。

4. 诱导子在毛状根培养生产次生代谢物中可能的调控机制

根据上述研究及国内外有关植物细胞培养中次生代谢产物调控的报道，可将诱导子对毛状根培养生产次生代谢产物的调控机制归纳为以下 12 个方面：1) 诱导子与质膜受体的结合；2) 促使植物细胞膜两侧离子流量的变化；3) 促使植物细胞内蛋白磷酸化模式的迅速改变和蛋白激酶被激活；4) 促使第二信使三磷酸肌醇(inositol 1, 4, 5-trisphosphate, IP3)和二酯酰甘油(diacylglycerol, DAG)的合成；5) 导致植物细胞外 pH 上升；6) 导致植物细胞骨架重排；7) 使植物细胞产生活性氧类物质；8) 促使植物细胞积累与防御相关的蛋白；9) 使植物细胞发生超敏反应，导致植物细胞的局部死亡；10) 使细胞壁结构发生变化；11) 激活植物细胞有关防卫基因的转录使植物细胞产生防御分子；12) 促使植物细胞合成信号分子水杨酸和茉莉酸。这些机制尚不能解释植物细胞培养中次生代谢物产生过程中所有的现象，目前有关生物活性成分代谢相关酶或关键酶的分子克隆和基因表达调控水平的研究已受到关注[43] [44] [45] [46]。

5. 展望

利用诱导子进行有目的的药用植物毛状根次生代谢产物调控及生物合成已受到越来越多国内外药理学工作者的关注，并成为大幅度提高药用植物毛状根中生物活性代谢产物含量的重要方法之一。虽然距规模化生产应用还有较大差距，但其定向、高效的促进毛状根生物活性次生代谢产物(药物成分生产的原料或先导化合物)的生成量已显现出其具有潜在应用前景。加强诱导子的筛选与应用，不仅可大大提高药用植物毛状根次生代谢产物的产量，减少天然药物资源的消耗，还可降低生产、人力成本，获得客观的经济和社会效益。

基金项目

2014 年江苏省大学生实践创新训练计划项目(201410315069Y)。

参考文献 (References)

- [1] Chilton, M.D., Tepfer, D.A., Petit, A., *et al.* (1982) *Agrobacterium rhizogenes* Inserts T-DNA into the Genomes of the Host Plant Root Cells. *Nature*, **295**, 432-434. <https://doi.org/10.1038/295432a0>
- [2] 杜旻, 吴晓俊, 王峥涛, 等. 发根农杆菌 Ri 质粒及其在植物基因工程中的应用[J]. 药物生物技术, 2005, 12(3): 193-196.
- [3] 宁文, 曹日强. 真菌诱导物在植物次生代谢中的调节作用[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(5): 321-324.
- [4] 齐凤慧, 詹亚光, 景天忠. 诱导子对植物细胞培养中次生代谢物的调控机制[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(3): 568-573.
- [5] 张囡, 杜丽丽, 王冬, 等. 中药酚酸类成分的研究进展[J]. 中国现代中药, 2006, 8(2): 25-28.
- [6] 肖莹. 丹参酚酸类成分生源合成的调控研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 第二军医大学, 2009.
- [7] 张顺仓, 刘岩, 沈双, 等. 诱导子对丹参毛状根酚酸类和丹参酮类成分积累的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1269-1273.
- [8] Bais, H.P., Walker, T.S., Schweizer, H.P., *et al.* (2002) Root Specific Elicitation and Antimicrobial Activity of Rosmarinic Acid in Hairy Root Cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**, 983-995.
- [9] 吴立军. 天然药物化学(第 6 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 156.
- [10] Monks, T.J., Hanzlik, R.P., Cohen, G.M., *et al.* (1992) Quinone Chemistry and Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **112**, 2-16.
- [11] 张璞, 王芳, 朱查山. 真菌诱导子与吸附树脂对新疆紫草毛状根中萘醌积累的影响[J]. 生物工程学报, 2013, 29(2): 214-223.
- [12] 阎岩, 赵欣, 张顺仓, 等. 活性氧在密旋链霉菌 Act12 诱导丹参毛状根中丹参酮积累中的作用[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 1985-1991.
- [13] 裴月湖, 娄红祥. 天然药物化学(第 7 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- [14] 孙际薇, 张鸿, 王凤英, 等. 茉莉酸甲酯对曼陀罗毛状根中主要萜萜烷类生物碱成分积累和释放的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1712-1718.
- [15] 段金彪, 陈士林. 中药资源化学(第 9 版)[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 130.
- [16] Shinde, A.N., Malpathak, N. and Fulzele, D.P. (2009) Enhanced Production of Phytoestrogenic Isoflavones from Hairy Root Cultures of *Psoralea corylifolia* L. Using Elicitation and Precursor Feeding. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **14**, 288-294.
- [17] Zhang, H.C., Liu, J.M., Lu, H.Y., *et al.* (2009) Enhanced Flavonoid Production in Hairy Root Cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by Combining the Over-Expression of Chalcone Isomerase Gene with the Elicitation Treatment. *Plant Cell Reports*, **28**, 1205-1213. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0721-3>
- [18] 王剑文, 郑丽屏, 谭仁祥. 促进黄花蒿发根青蒿素合成的内生真菌诱导子的制备[J]. 生物工程学报, 2006, 22(5): 829-834.
- [19] Zhang, B., Zou, T., Yan, H., *et al.* (2010) Stimulation of Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* Hairy Roots by Oligogalacturonides. *African Journal of Biotechnology*, **9**, 3437-3442.
- [20] Liby, K.T., Yore, M.M. and Sporn, M.B. (2007) Triterpenoids and Rexinoids as Multifunctional Agents for the Prevention and Treatment of Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **7**, 357-369. <https://doi.org/10.1038/nrc2129>
- [21] Zhou, L.G., Cao, X.D., Zhang, R.F., *et al.* (2007) Stimulation of Saponin Production in *Panax ginseng* Hairy Roots by Two Oligosaccharides from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Biotechnology Letters*, **29**, 631-634. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9273-6>
- [22] 徐立新. 植物激素和诱导子对人参发根皂苷含量的影响研究[D]: [硕士学位论文]. 吉林: 吉林大学, 2007.
- [23] Wu, J.Y. and Shi, M. (2008) Ultrahigh Diterpenoid Tanshinone Production through Repeated Osmotic Stress and Elicitor Stimulation in Fed-Batch Culture of *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **78**, 441-448. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1332-y>
- [24] Jiang, L.Z., Li, G.Z. and Jian, Y.W. (2010) Promotion of *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Growth and Tanshinone Pro-

- duction by Polysaccharide-Protein Fractions of Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus*. *Process Biochemistry*, **45**, 1517.
- [25] Yan, Q., Hu, Z.D., Tan, R.X., *et al.* (2005) Efficient Production and Recovery of Diterpenoid Tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Cultures with *in Situ* Adsorption, Elicitation and Semi-Continuous Operation. *Journal of Biotechnology*, **119**, 416-424.
- [26] Zhao, J.L., Zhou, L.G. and Wu, J.Y. (2010) Promotion of *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Growth and Tanshinone Production by Polysaccharide-Protein Fractions of Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus*. *Process Biochemistry*, **45**, 1517-1522.
- [27] Wu, J.Y., Ng, J., Shi, M., *et al.* (2007) Enhanced Secondary Metabolite (Tanshinone) Production of *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots in a Novel Root-Bacteria Co-Culture Process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **77**, 543-550. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1192-5>
- [28] 王学勇, 崔光红, 黄璐琦, 等. 茉莉酸甲酯对丹参毛状根中丹参酮类成分积累和释放的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 300-302.
- [29] Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C. and Giulietti, A.M. (2000) The Influence of Different Biotic and Abiotic Elicitors on the Production and Profile of Tropane Alkaloids in Hairy Root Cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 252-258.
- [30] Khelifi, L., Zarouri, B., Amdoun, R., *et al.* (2011) Effects of Elicitation and Permeabilization on Hyoscyamine Content in *Datura stramonium* Hairy Roots. *Advances in Environmental Biology*, **5**, 329-334.
- [31] Chae, Y.A., Yu, H.S., Song, J.S., *et al.* (2000) Indigo Production in Hairy Root Cultures of *Persicaria tinctoria* Lour. *Biotechnology Letters*, **22**, 1527-1530. <https://doi.org/10.1023/A:1005668625822>
- [32] Thakore, D., Srivastava, A.K. and Sinha, A. (2012) Enhanced Production of Antihypertensive Drug Ajmalicine in Transformed Hairy Root Culture of *Catharanthus roseus* by Application of Stress Factors in Statistically Optimized Medium. Health, Energy and Environmental Perspectives. In: Srivastava, M.M., Khemani, L.D. and Srivastava, S., Eds., *Chemistry of Phytopotentials*, Springer, Berlin, 39-42.
- [33] Hasanloo, T., Sepehrifar, R., Rahnama, H., *et al.* (2009) Evaluation of the Yeast-Extract Signaling Pathway Leading to Silymarin Biosynthesis in Milk Thistle Hairy Root Culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**, 1901-1909. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0088-1>
- [34] Liu, C., Wang, Y., Xu, X., *et al.* (1999) Improvement of Artemisinin Accumulation in Hairy Root Cultures of *Artemisia annua* L by Fungal Elicitor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **20**, 161-164. <https://doi.org/10.1007/pl00009041>
- [35] Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., *et al.* (2007) Improvement of Artemisinin Production by Chitosan in Hairy Root Cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology Letters*, **29**, 1143-1146. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9368-8>
- [36] Wielanek, M. and Urbanek, H. (2006) Enhanced Glucotropaeolin Production in Hairy Root Cultures of *Tropaeolum majus* L. by Combining Elicitation and Precursor Feeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **86**, 177-186. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9106-2>
- [37] 齐香君, 郭乐康, 陈微娜. 诱导子对黄芩毛状根生长及黄芩苷合成的影响[J]. 中草药, 2009, 40(5): 801-803.
- [38] 朱葵荣, 马琳, 冯杉. 不同诱导子对黄芩不定根生长及黄芩苷累积的影响[J]. 中南药学, 2014, 12(11): 1076-1079.
- [39] Zaheer, M., Reddy, V.D. and Giri, C.C. (2016) Enhanced Daidzin Production from Jasmonic and Acetyl Salicylic Acid Elicited Hairy Root Cultures of *Psoralea corylifolia* L. (Fabaceae). *Natural Product Research*, **30**, 1542-1547. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1054823>
- [40] 王瑜, 杨世海. 不同诱导子对王不留行毛状根生长和王不留行黄酮苷含量的影响[J]. 人参研究, 2014, 2: 51-53.
- [41] Zhou, L., Yang, C., Li, J., *et al.* (2003) Heptasaccharide and Octasaccharide Isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and Their Plant Growth Regulatory Activity. *Plant Science*, **165**, 571-575.
- [42] 于丽莉. 诱导子调控下人参发状根皂苷合成相关基因表达的研究[D]: [硕士学位论文]. 吉林: 吉林农业大学, 2014.
- [43] 赵鸿莲, 于荣敏. 诱导子在植物细胞培养中的应用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(2): 152-156.
- [44] Radman, R., Saez, T., Bucke, C., *et al.* (2003) Elicitation of Plants and Microbial Cell Systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **37**, 91-102. <https://doi.org/10.1042/ba20020118>
- [45] Newton, J.A. and Fray, R.G. (2004) Integration of Environmental and Host Derived Signals with Quorum Sensing during Plant-Microbe Interactions. *Cellular Microbiology*, **6**, 213-224. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00362.x>
- [46] Jian, Z., Davis, L.C. and Verpoorte, R. (2005) Elicitor Signal Transduction Leading to Production of Plant Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, **23**, 283-333.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：br@hanspub.org