

丛枝菌根真菌对云木香根产量及其木香烯内酯和去氢木香烯内酯含量的影响^Δ

张杰^{1,2*}, 潘兴娇², 罗静³, 周浓^{1,2}, 谢娥¹, 杨敏^{2#}(1.重庆三峡学院生命科学与工程学院, 重庆 404000; 2.大理大学药学与化学学院, 云南大理 671000; 3.重庆市食品药品检验检测研究院/重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆 401121)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2179-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.05

摘要 目的:研究丛枝菌根(AM)真菌在人工栽培条件下对云木香根产量及其有效成分含量的影响。方法:采用室温盆栽方法,设不接种AM真菌组为CK组,设接种阿密菟菌根组为AM组,每组5个重复,每个重复1盆,共5盆,每盆栽种云木香3株。采用文献方法计算菌根感染率和感染强度,采用称重法测定云木香根产量,采用高效液相色谱法测定木香烯内酯、去氢木香烯内酯的含量。结果:AM组与CK组的感染率分别为(86.22±3.28)%、0($P<0.05$),感染强度分别为(52.12±2.14)%、0($P<0.05$);两组间根增质量率和木香烯内酯、去氢木香烯内酯及总内酯的含量比较差异有统计学意义($P<0.05$)。与CK组比较,AM组云木香根产量提高了(50.96±2.12)%,云木香根中木香烯内酯、去氢木香烯内酯及总内酯的含量分别增加了65.55%、97.42%、85.42%,内酯类成分间的结构比有所改变。结论:外源性AM真菌的加入能明显提高云木香根的品质。

关键词 云木香;丛枝菌根真菌;产量;木香烯内酯;去氢木香烯内酯

路磷酸化方面探讨了其抗神经胶质瘤细胞侵袭的可能机制。

STAT3通常以无活性的单体形式存在于细胞质中,当STAT被上游的JAK信号激活后,主要以活化的p-STAT形式进入细胞核内,刺激并导致某些与细胞侵袭密切相关的致癌基因异常表达,调节与癌细胞迁移和侵袭等相关的靶基因(MMP-2、MMP-9)转录活性^[5]。MMP-2、MMP-9作为STAT3活化后引起迁移和侵袭的相关靶基因,是胶质瘤侵袭性预测的指标之一^[8-9]。本研究结果显示,血府逐瘀汤含药血清干预U251细胞后,细胞侵袭能力显著降低,细胞中p-STAT3、p-JAK2蛋白以及MMP-2、MMP-9蛋白和mRNA表达均显著减弱,而桃红四物汤含药血清和抵挡汤含药血清作用不明显。可见,血府逐瘀汤抑制U251细胞侵袭可能是通过抑制JAK2/STAT3信号通路的激活及下游侵袭相关靶基因MMP-2、MMP-9的表达而起作用。

综上,血府逐瘀汤可以作为一种JAK2/STAT3磷酸化的有效抑制剂进一步用于抗胶质瘤的研究,同时本研究也为开发一种新的抗肿瘤药物或药物前体提供了一定的参考依据。

参考文献

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81260622)

* 硕士研究生。研究方向:药用植物栽培与生态环境调控。电话:023-58102522。E-mail:806202815@qq.com

通信作者:硕士,讲师。研究方向:中药材质量标准化研究。电话:0872-2219936。E-mail:yang_min_0302@163.com

- [1] Morgan LL. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review[J]. *Neuro Oncol*, 2015, 17(4): 623-624.
- [2] Blacher E, Ben Baruch B, Levy A, et al. Inhibition of glioma progression by a newly discovered CD38 inhibitor[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(6):1422-1433.
- [3] 李全国,胡永强.替莫唑胺联合放疗用于恶性脑胶质瘤患者的临床观察[J]. *中国药房*, 2015, 26(26):3690-3692.
- [4] 黄良文,刘建民,袁淮涛.活血化痰中药抗肿瘤转移作用的研究进展[J]. *中国医药科学*, 2014, 4(6):37-39、67.
- [5] Chen F, Xu Y, Luo Y, et al. Down-regulation of STAT3 decreases invasion activity and induces apoptosis of human glioma cells[J]. *J Mol Neurosci*, 2010, 40(3): 353-359.
- [6] 陈赐慧,花宝金.关于中药血清药理学实验的几个问题和探讨[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(1):46-48.
- [7] 陈健媚,郭姣.中药血清药理学研究进展[J]. *广东药学院学报*, 2016, 32(3):390-393.
- [8] Hagemann C, Anacker J, Ernestus RI, et al. A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas[J]. *World J Clin Oncol*, 2012, 13(5):67-79.
- [9] Shim KN, Jung SA, Joo YH, et al. Clinical significance of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer[J]. *J Gastroenterol*, 2000, 42(2):120-128.

(收稿日期:2016-10-03 修回日期:2017-04-25)

(编辑:林静)

Effects of *Arbuscular mycorrhizal* Fungi on the Yield and Contents of Costunolide and Dehydrocostuslactone in Root of *Saussurea costus*

ZHANG Jie^{1,2}, PAN Xingjiao², LUO Jing³, ZHOU Nong^{1,2}, XIE E¹, YANG Min²(1.College of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China; 2.College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Yunnan Dali 671000, China; 3.Chongqing Institute for Food and Drug Control / Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 401121, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of *Arbuscular mycorrhizal* (AM) fungi on yield and its active ingredients contents of *Saussurea costus* in artificial cultivation. METHODS: Through the pot method at room temperature, not inoculated AM fungi group was regarded as CK group, inoculated AM fungi group as AM group, 5 repeated in each group, one pot in each repeated, there were 5 pots in all, 3 strains of *S. costus* in each pot. Literature establishment method was used to calculate the mycorrhizal colonization rate and colonization intensity. Weighing method was adopted to determine the yield and HPLC was conducted to determine the content of costunolide and dehydrocostuslactone. RESULTS: Colonization rates of AM group and CK group were (86.22 ± 3.28)%, 0 ($P < 0.05$); colonization intensities were (52.12 ± 2.14)%, 0 ($P < 0.05$). There were statistical significances in weighing rate of root, contents of costunolide, dehydrocostuslactone and total lactones in 2 groups ($P < 0.05$). Compared with CK group, the yield increase in AM group (50.96 ± 2.12)%, contents of costunolide, dehydrocostus lactone and total lactones increased 65.55%, 97.42%, 85.42%, respectively. And there was a certain change on the structure ratio of lactones. CONCLUSIONS: Inoculating exogenous AM fungi can significantly improve the root quality of *S. costus*.

KEYWORDS *Saussurea costus*; *Arbuscular mycorrhizal* fungi; Yield; Costunolide; Dehydrocostuslactone

云木香是我国传统常用中药品种及国际应用广泛的天然药物之一,为菊科植物木香(*Aucklandia lappa* Decne.),具有行气止痛、健脾消食的功效^[1],其主要有效成分为内酯类,具有较强的抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、保肝、利胆等生物活性^[2]。

云木香在我国有多年的栽培历史,其中大理市花甸坝地方国营药材场种植云木香面积已达数千亩^[3]。伴随着道地产区云木香的同一块地连续多年大规模栽培,病虫害严重、入药品质不稳定等^[4-6]生产实际问题迫切需要解决,否则将严重影响到云木香的可持续性发展。丛枝菌根(AM)真菌侵染药用植物根系形成的植物根系与真菌的互惠共生体,能参与药用植物的许多生理代谢过程,研究表明,AM真菌在增强药用植物抗病能力、提高产量和改善品质等方面发挥着重要作用^[7-9]。本课题组对AM真菌参与云木香的人工栽培方法进行了多年研究,已证明AM真菌对云木香的光合生理指标的影响有显著促进作用^[10]。而人工栽培条件下AM真菌对云木香根产量及有效成分的影响未见报道。为此,本试验以接种AM真菌后收获的人工栽培云木香为材料,研究AM真菌对云木香根产量及其木香炔内酯、去氢木香炔内酯含量的影响,为云木香人工栽培工作提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);DM-BA300-B型生物显微镜、SMZ-168型体视显微镜、Motic VM V1型显微图像采集与分析系统均为厦门麦克奥迪实业集团有限公司提供;KQ-250B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);W2018型恒温水浴锅(上海申生科技有限公司);AE240型电子分析天平[梅特勒-托利

多仪器(上海)有限公司];LDZX-50KBS型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

1.2 药材与试剂

阿密蕈菌根(以*Funneliformis mosseae*为主的菌根化商品)由上海弘升科技发展有限公司惠赠;云木香的新鲜种子采集于云南省大理市花甸坝药材种植基地苗圃的同一批健康植株,经重庆三峡学院生命科学与工程学院周浓教授鉴定为菊科植物木香(*Aucklandia lappa* Decne.)的成熟新鲜种子;木香炔内酯对照品(批号:110795-200806,纯度:≥98%)、去氢木香炔内酯对照品(批号:110757-200206,纯度:≥98%)均购自中国食品药品检定研究院;蔗糖、氢氧化钾、盐酸、过氧化氢、无水乙醇、冰醋酸、甲醛、乳酸、甘油、曲利苯蓝、苯酚、甲醇均为分析纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 接种方法及栽培管理

供试土壤购买于大理市花鸟市场的林下腐殖土,与当地砂壤土按照3:1体积比混合(过2 mm筛,121 °C高压灭菌锅内灭菌2 h,每盆装土壤2.0 kg)。采用室温盆栽方法,设不接种AM真菌组为CK组、接种阿密蕈菌根组为AM组,每组5个重复,每个重复1盆,共5盆,每盆栽种云木香3株。2010年2月14日,选择大小一致的云木香幼苗,AM组每盆层施AM菌剂15 g。生长期间按常规管理,定期浇水、护理。2010年12月12日收获云木香植株的根,须根用蒸馏水洗净后剪成约1 cm长的根段置于福尔马林-醋酸-70%乙醇(FAA)固定液中固定;根于室内35 °C烘干,粉碎过筛,备用。

2.2 指标测定

2.2.1 AM真菌的生态特征检测 随机选取浸泡于FAA

中的云木香根系 30 条,采用文献[11-12]方法计算菌根侵染率和侵染强度。

2.2.2 云木香根产量测定 采用称重法测定云木香根产量。2010 年 12 月收获云木香后,测定不同处理方法下单株云木香根鲜质量,烘干至恒质量后分别测定其质量作为根干质量,并用以上相关数据计算个体平均根鲜质量、根干质量、根含水量[(根鲜质量-根干质量)/根鲜质量×100%]、折干率(根干质量/根鲜质量×100%)和根增质量率[(AM 组根鲜质量-CK 组根鲜质量)/CK 组根鲜质量×100%]。

2.2.3 云木香根的品质分析 采用高效液相色谱法^[1]对云木香根的木香烯内酯和去氢木香烯内酯进行测定。

2.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析,采用 LSD 法进行多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 AM 真菌对云木香根系 AM 真菌生态特征的影响

两组云木香根系 AM 真菌生态特征比较结果见表 1。

表 1 两组云木香根系 AM 真菌生态特征比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab 1 Comparison of ecological characteristics of root AM fungi between 2 groups($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	侵染率, %	侵染强度, %
AM 组	86.22 ± 3.28*	52.12 ± 2.14*
CK 组	0	0

注:与 CK 组比较, * $P < 0.05$

Note: vs. CK group, * $P < 0.05$

从表 1 可见,侵染率和侵染强度两组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明人工栽培条件下是否施用 AM 真菌对云木香的侵染具有显著的影响。

3.2 AM 真菌对云木香根产量的影响

两组云木香根产量比较结果见表 2。

表 2 两组云木香根产量比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab 2 Comparison of root yield of *S. costus* between 2 groups($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	根鲜质量, g	根干质量, g	根含水量, %	折干率, %	根增质量率, %
AM 组	9.415 0 ± 0.169 6	2.194 9 ± 0.125 6	76.37 ± 0.02	23.33 ± 0.04	50.96 ± 2.12*
CK 组	6.195 7 ± 0.117 5	1.555 4 ± 0.237 1	75.53 ± 0.04	25.12 ± 0.03	

注:与 CK 组比较, * $P < 0.05$

Note: vs. CK group, * $P < 0.05$

从表 2 可见,AM 组根含水量略高于 CK 组,但二者差异无统计学意义($P > 0.05$)。因 AM 真菌可促进云木香根对水分的吸收,故略降低了云木香根的折干率。两组根增质量率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),AM 组根增质量率比 CK 组提高了(50.96 ± 2.12)%,说明接种 AM 真菌能明显促进云木香根产量的积累。

3.3 AM 真菌对云木香根内酯类含量和成分比的影响

两组云木香根内酯类含量和成分比比较结果见表 3。

表 3 两组云木香根内酯类含量和成分比比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab 3 Comparison of root costuslactone contents and ratio of constituents between 2 groups($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	木香烯内酯, mg/g	去氢木香烯内酯, mg/g	总内酯, mg/g	木香烯内酯与去氢木香烯内酯含量之比
AM 组	0.932 4 ± 0.032 1*	1.839 2 ± 0.015 9*	2.771 6 ± 0.021 4*	1:1.97
CK 组	0.563 2 ± 0.061 0	0.931 6 ± 0.155 2	1.494 8 ± 0.088 6	1:1.65

注:与 CK 组比较, * $P < 0.05$

Note: vs. CK group, * $P < 0.05$

从表 3 可见,接种 AM 真菌不同程度地影响了云木香根中木香烯内酯和去氢木香烯内酯的代谢过程。接种 AM 真菌处理与非接种处理其木香内酯类成分量及成分比均存在较大的差异,AM 组云木香根中木香烯内酯、去氢木香烯内酯及总内酯量平均值与 CK 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),AM 组木香烯内酯、去氢木香烯内酯及总内酯量平均值分别比 CK 组提高 65.55%、97.42%、85.42%,同时成分比有所改变。以上结果表明,AM 真菌诱导处理刺激了云木香根的次生代谢,改变了根中化学成分的含量,从而提高了根的内在品质。

4 讨论

本试验结果表明,在室温人工栽培条件下,云木香能与 AM 真菌形成良好的互惠共生关系,接种 AM 真菌能明显提高菌根侵染率和侵染强度,促进了云木香根的生长发育,与潘兴娇等^[10]研究结果一致。AM 组根增质量率比 CK 组提高了(50.96 ± 2.12)%,AM 组木香烯内酯、去氢木香烯内酯及总内酯量平均值分别比 CK 组提高 65.55%、97.42%、85.42%,说明外源性 AM 真菌的加入可使人工栽培的云木香品质更佳,优化了其产量及入药品质。

因不同植株同一采收期的化学成分有所差异^[13],为减少试验误差,本试验采用单株云木香采样与分析。值得注意的是,云木香为多年生药用植物,其产量和活性成分的积累是一个漫长的动态过程。虽然在短期试验中,供试 AM 真菌表现出良好的促进云木香植株生长发育的作用,但未能体现不同处理方法下云木香的内酯类成分积累的差异。而在长期且不再接种 AM 真菌的情况下,云木香植株是否能继续保持较好的生长状态,还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015 年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:62-63.
- [2] 魏华,彭勇,马国需,等. 木香有效成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(3):613-620.
- [3] 杨颖,杨晓莉,周平,等. 大理花甸坝药材场 5 种药材中重金属含量的测定[J]. 大理学院学报, 2010, 9(6):10-12.
- [4] 杨丽英,杨斌,李林玉,等. 6 种云南道地中药材病害发生

川芎中抗血栓活性成分的计算机虚拟筛选研究[△]

刘福和*,陈少军,倪文娟(浙江医药高等专科学校药学院,浙江宁波 315100)

中图分类号 R9-39 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2182-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.06

摘要 目的:运用计算机辅助药物设计寻找川芎抗血栓活性成分。方法:以“血栓症”为关键词,从治疗靶蛋白数据库中搜索筛选川芎抗血栓靶蛋白;再从蛋白质数据库中查询目标靶蛋白并下载其三维结构,采用蛋白质预处理工具确定活性区域中心坐标,应用PyRx和Discovery Studio Visualizer软件对从台湾中医药资料库下载的247个川芎小分子与靶蛋白进行分子对接,通过结合能筛选出活性成分并分析结合作用力。结果:筛选出4个活性成分即新绿原酸、1-*H*-苯并咪唑-2-胺、3,8-二羟基酰内酯、川芎三萜,其分别与凝血酶、抗凝血酶Ⅲ、凝血因子Xa、血栓调节蛋白具有较高结合活性,结合能分别为-6.1、-4.5、-7.7、-8.6 kJ/mol;分析结果显示范德华力、静电作用力在对接中发挥着重要作用。结论:新绿原酸、1-*H*-苯并咪唑-2-胺、3,8-二羟基酰内酯、川芎三萜可能是中药川芎抗血栓的活性成分。

关键词 血栓症;川芎;计算机辅助药物设计;虚拟筛选;靶蛋白;分子对接;活性成分

Study on the Computer Virtual Screening of Antithrombotic Active Ingredients in Chuanxiong Rhizoma

LIU Fuhe, CHEN Shaojun, NI Wenjuan (School of Pharmacy, Zhejiang Pharmaceutical College, Zhejiang Ningbo 315100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To find the active ingredient of on antithrombotic chuanxiong rhizoma using computer aided drug design. METHODS: Using “thrombosis” as keyword, thrombosis related proteins were searched and screened in therapeutic target database; target proteins’ three-dimensional structure were downloaded in protein database, then the protein preparing tool were used to determine the coordinates of the active area center. PyRx software and Discovery Studio Visualizer were used to match the 247 small molecules of chuanxiong rhizoma with target protein that downloaded from Taiwan traditional Chinese medicine database. The active molecules were screened and binding force was analyzed. RESULTS: Active molecules of neochlorogenic acid, 1-*H*-benzimidazole-2-amine, 3, 8-dihydrodiligustilide, chuanxiongterpene were selected by blinding energy, and there were high binding activity among these active molecules, thrombin, antithrombin III, coagulation factor Xa and thrombomodulin, and the binding energy were -6.1, -4.5, -7.7, -8.6 kJ/mol. Analysis results showed van Edward force and electrostatic interactions played an important role in their respective docking. CONCLUSIONS: Neochlorogenic acid, 1-*H*-benzimidazole-2-amine, 3, 8-dihydrodiligusti-

- 及抗病育种研究进展[J]. 中药材, 2010, 33(7): 1186-1188.
- [5] 刘正清. 不同产地和采收时间木香药材中木香烃内酯和去氢木香内酯的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 116-118.
- [6] 陈飞龙, 谭晓梅, 汤庆发, 等. 不同产地木香挥发油成分的GC-MS分析比较[J]. 中国药房, 2011, 22(23): 2187-2189.
- [7] 周浓, 丁博, 冯源, 等. 接种不同AM真菌对滇重楼菌根侵染率和入药品质的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(16): 3158-3167.
- [8] 肖文娟, 杨光, 陈美兰, 等. 丛枝菌根真菌在中药栽培病害防治研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 252-257.
- [9] 潘兴娇, 张杰, 路风中, 等. 重楼属植物根茎有效成分与菌根侵染率、土壤营养成分之间的相关性[J]. 中国药房, 2016, 27(22): 3037-3040.
- [10] 潘兴娇, 张杰, 黄兴容, 等. 接种AM真菌对木香幼苗生长及光合特性的影响[J]. 中药材, 2016, 39(10): 2178-2184.
- [11] Phillips JM, Hayman DS. Improved procedures for clearing and attaining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. *Trans Br Mycol Soc*, 1970, 55(1): 158-161.
- [12] Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*[M]. Paris: INRA Publications, 1986: 217-224.
- [13] 周浓, 张德全, 孙琴, 等. 真菌诱导子对滇重楼中次生代谢产物甾体皂苷的影响[J]. 药学学报, 2012, 47(9): 1237-1242.

△ 基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No.LY15H280009)

* 讲师, 硕士。研究方向: 中药药理。电话: 0574-88223170。E-mail: 89994226@qq.com

(收稿日期: 2016-12-12 修回日期: 2017-02-04)

(编辑: 余庆华)