

文章编号:1000-8551(2020)07-1432-08

乙酰水杨酸对三角褐指藻岩藻黄质含量的影响及其分子机理研究

章丽 龚一富* 朱帅旗 刘浩 李申睿 谢志浩 王何瑜

(宁波大学海洋学院,浙江宁波 315800)

摘要:为了研究不同浓度乙酰水杨酸(ASA)对三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)细胞生长、岩藻黄质积累及岩藻黄质生物合成相关基因的表达水平的影响,通过分光光度计、高效液相色谱(HPLC)以及荧光定量PCR测定不同浓度ASA处理后的三角褐指藻的各项指标。结果表明,三角褐指藻的生长和岩藻黄质积累与ASA浓度密切相关。一定浓度的ASA抑制了三角褐指藻的细胞数量;岩藻黄质含量也随着ASA浓度的升高呈现先上升后下降的趋势,当ASA浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,岩藻黄质含量最高,达 $1.78\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ DW}$,为对照组的1.9倍。在不同浓度ASA诱导下,与岩藻黄质生物合成途径有关的*PSY*、*PDS*、*ZDS*、*CRTISO*、*LCYB*和*ZEP*基因表达均上调,当ASA浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,相关基因的表达量极显著高于对照组($P<0.01$)。主成分分析(PCA)结果表明,*PSY*、*PDS*、*ZDS*、*CRTISO*、*LCYB*和*ZEP*基因与岩藻黄质积累具有相关性,其中,*ZEP*基因对岩藻黄质生物合成贡献率最高。综上,适当浓度的ASA不仅提高了岩藻黄质合成途径中相关基因的表达水平,而且促进了岩藻黄质的积累。本研究结果为进一步深入研究三角褐指藻中岩藻黄质合成的分子机制奠定了理论基础。

关键词:乙酰水杨酸;三角褐指藻;岩藻黄质;基因表达;主成分分析

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.07.1432

岩藻黄质(fucoxanthin)是一类主要存在于褐藻、硅藻中的脂溶性天然类胡萝卜素,占类胡萝卜素总量的10%以上^[1]。该色素与几种蛋白质以及叶绿素a结合,在类囊体中形成岩藻黄质-叶绿素a/c-蛋白复合物(fucoxanthin chlorophyll a/c protein,FCP),可通过叶绿素a将激发能传递到光合电子传递链,具有光捕获和光保护能力^[2]。岩藻黄质具有一个丙二烯键、一个共轭羰基以及一个5,6-环氧化物特殊结构^[3],这些结构赋予岩藻黄质多种生物活性,包括抗肥胖、抗糖尿病^[4]和抗肿瘤活性^[5-9]。其中岩藻黄质的多烯发色团的类胡萝卜素端是抗肥胖作用的关键结构,它含有一个烯键和两个羟基,能够调节腹腔白色脂肪组织(white adipose tissue,WAT)线粒体产生解偶联蛋白1(uncoupling protein 1,UCP1),促进脂肪酸的氧化以及WAT的产热;岩藻黄质还能通过调节WAT分泌的细胞因子来改善胰岛素抵抗以及降低血糖水平^[10]。在抗肿瘤方面,岩藻黄质在胶质瘤^[5]、乳腺癌^[6]、肺癌^[7]、

结肠癌^[8]和大肠癌^[9]等多种癌症中具有抗增殖作用。Yu等^[11]发现岩藻黄质能够调控胃癌细胞(MGC-803细胞)周期停滞在G₂/M期,同时通过降低酪氨酸激酶/转录激活因子(JAK/STAT)通路中*CyclinB1*基因的表达,抑制MGC-803细胞的增殖。此外,研究表明岩藻黄质可诱导Hela细胞凋亡,并能通过提高人宫颈SIHA细胞对肿瘤坏死因子(TNF)相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand,TRAIL)敏感性,选择性诱导肿瘤细胞凋亡^[12-13],因此岩藻黄质与TRAIL联合预防或治疗宫颈癌具有很大潜力。

岩藻黄质具有潜在保健、抗癌功能,且可进行微藻培养,因此对微藻的岩藻黄质合成调控研究具有重要意义。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)作为主要产岩藻黄质的微藻之一,已报道可通过培养条件、营养成分的改变或诱导子来提高岩藻黄质含量。如Kosakowska等^[14]发现三角褐指藻在缺铁的培养条件下,岩藻黄质含量降低,而在氮源充足的条件下,三

收稿日期:2019-03-04 接受日期:2019-05-04

基金项目:宁波市社发重大项目(2017C510002),国家科技部/星火计划(2015GA701001)

作者简介:章丽,女,实验员,主要从事藻类生物化学与分子生物学。E-mail: 540227452@qq.com

*通讯作者:龚一富,男,副教授,主要从事藻类次生代谢调控研究。E-mail: gongyifu@163.com

角褐指藻的岩藻黄质含量提高^[15];张南南等^[16]利用高光处理三角褐指藻 6 h 后,岩藻黄质含量较对照组提高近 1 倍;朱帅旗等^[17]发现低浓度硫酸铈(0.2~0.4 mg·L⁻¹)能提高三角褐指藻岩藻黄质含量。水杨酸(salicylic acid, SA)是植物发育以及胁迫耐受性相关信号传递的酚类物质,作为植物内源性诱导子参与并调节植物重要的生理生化活动;而 SA 对三角褐指藻岩藻黄质合成影响的相关研究尚鲜见报道。本研究通过对对数期三角褐指藻中添加一定浓度乙酰水杨酸(acetylsalicylic acid, ASA),并对诱导过程中的三角褐指藻的生长、岩藻黄质含量及相关合成基因表达水平进行检测,以期三角褐指藻岩藻黄质的研究和利用提供一定的理论依据和技术指导。

1 材料与方法

1.1 三角褐指藻的培养

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)由宁波大学海洋生物工程重点实验室藻种室提供。经过 f/2 固体培养基培养,挑斑纯化扩大培养,以 1×10^5 cells·mL⁻¹ 初始浓度接种到 f/2 液体培养基中,置于 20℃、62.5 μmol photons·m⁻²·s⁻¹、12 h/12 h (黑光暗)条件下培养。

1.2 ASA 处理

待三角褐指藻生长至对数期(1×10^6 cells·mL⁻¹),采用 0(CK)、10、25、50、100 mg·L⁻¹ 的 ASA 对其进行处理,每个处理设 3 组平行。

1.3 三角褐指藻生长曲线测定

取 1 mL 对数期藻液,通过 6800 型双光束紫外可见分光光度计(英国 bibby 科技有限公司)进行全波段扫描,确定藻液最大吸收峰波长。将藻液稀释成浓度梯度,测定最大吸收峰的 OD 值,同时用 XB-K-25 型血球计数板(玉环县求精医用仪器厂)计算相应浓度

的藻细胞密度。通过 OD 值和藻细胞密度建立光密度回归方程。以加入 ASA 为初始时间,处理持续到第 8 天,期间每隔 24 h 取 1 mL 三角褐指藻溶液并测定 OD₆₈₀ 值,每组均设 3 个平行。根据光密度回归方程,绘制三角褐指藻的生长曲线。

1.4 岩藻黄质的提取

培养第 6 天收集三角褐指藻细胞,参考 Kim 等^[3]的方法提取三角褐指藻的岩藻黄质,4℃、52 000×g 离心 10 min 收集藻体,冷冻干燥并研磨后加入无水乙醇重悬,然后静置 1 h,4℃、52 000×g 离心 10 min 后取上清液过一次头式滤器(0.22 μm, Millipore),得高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测液,备用。

1.5 岩藻黄质含量的测定

精确称取 0.1 mg 岩藻黄质标准品溶于 1 mL 无水乙醇,依次稀释成不同浓度的标准品。色谱系统为 Alliance e2695 separations module HPLC 系统(Waters, 美国),Waters 2998 二极管阵列检测器。洗脱程序:先用甲醇/水(9:1, v/v)洗脱 30 min,再用 100%甲醇洗脱 10 min,最后用甲醇/水(9:1, v/v)洗脱 15 min。进样量 10 μL,检测波长 445 nm。通过岩藻黄质标准品积分峰面积与浓度作回归曲线,根据色谱图中的色谱峰保留时间以及相应强度,计算样品中岩藻黄质含量。

1.6 岩藻黄质生物合成相关基因的表达分析

收集不同浓度 ASA 处理 24 h 后的藻液,采用试剂盒(Plant RNA Kit, 美国 OMEGA-Bio-Tek 公司)提取 RNA, PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) 试剂盒(TaKaRa, 大连)进行反转录。采用 SYBR Premix Ex TaqTM II (Perfect Real Time) (TaKaRa, 大连)进行荧光定量 PCR 检测,目的基因^[17-19]和参照基因^[20](表 1)采用同一扩增程序,应用 2^{-ΔΔCT}法计算目的基因的相对表达量。

表 1 定量 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences of quantity PCR

基因 Genes	引物序列 Primer sequences
<i>β-actin</i>	F-primer: 5'CCTGACTTGACGGACTACCTG3', R-Primer: 5'TAGTTTTTGTCCAGAGCCGAG3'
<i>PSY</i>	F-primer: 5'ATCCCACCTTGACATTACG3', R-Primer: 5'GTTCCTAGCATCTTCGCCTA3'
<i>PDS</i>	F-primer: 5'TTGCTCCGAATACGAATGTG3', R-primer: 5'CACCACCCACGACGATAACT3'
<i>ZDS</i>	F-primer: 5'GATTCCTACGCTTTGGG3', R-primer: 5'GCATGGGCTGCTAAGATTGA3'
<i>CRTISO</i>	F-primer: 5'AGATGATGTGACAGCCGAGC3', R-primer: 5'TTTTCGCTCTTATGTTCTGTAG3'
<i>LYCB</i>	F-primer: 5'CCCAATAACGACAAACACG3', R-primer: 5'CAAAGAACGGCGTCACAGAT3'
<i>ZEP</i>	F-primer: 5'GCAATGGTTCGCACTGATAC3', R-primer: 5'GTAGCAAAGTCATCCACA3'

1.7 岩藻黄质含量的主成分分析

以不同浓度 ASA 处理下 *PSY*、*PDS*、*ZDS*、*CRTISO*、*LYCB* 和 *ZEP* 基因表达量和岩藻黄质含量作为数据集,利用 SAS 9.0 统计软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。

1.8 数据分析

采用 Microsoft Office Excel 2012 进行数据处理,SPSS 19.0 进行单因素方差分析,LSD 法进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 ASA 对三角褐指藻细胞生长的影响

对数期的三角褐指藻最大吸收峰的波长为 680 nm,对数期的三角褐指藻密度与 OD₆₈₀ 呈良好的线性关系,回归方程为 $y = 0.0095x - 0.0005$ (y 为 OD₆₈₀ 值, x 为 1 mL 藻液的细胞密度, $R^2 = 0.9962$)。由图 1 可知,各试验组三角褐指藻生长曲线趋势相似,培养第 1~第 6 天维持高速生长,且在培养第 6 天时出现一个生长高峰,培养第 7 天时藻细胞数量急剧下降。与 CK 不同的是,不同浓度 ASA 处理的三角褐指藻在培养第 2 天时生长速度下降,培养第 3 天又出现较大幅度的增长。总体上,ASA 各处理组的三角褐指藻藻细胞数量始终低于 CK,表明 ASA 抑制了三角褐指藻的生长。

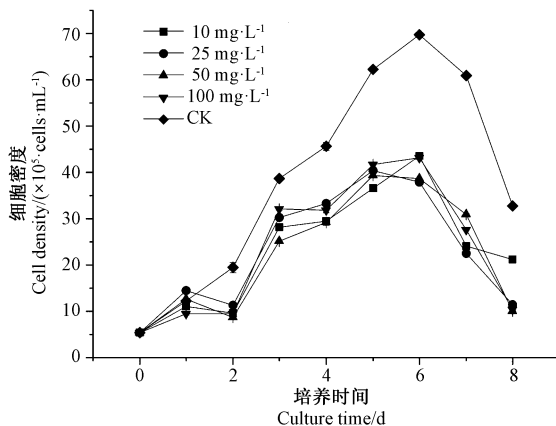
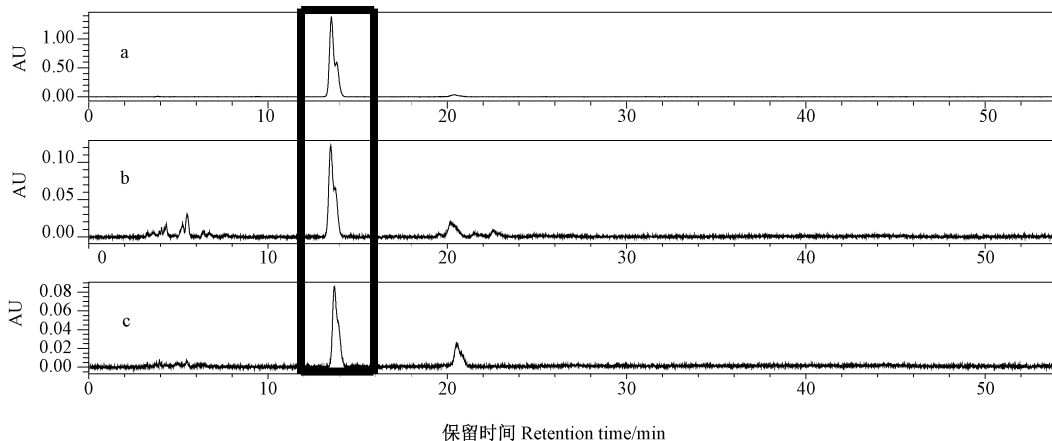


图 1 ASA 对三角褐指藻细胞生长的影响
Fig.1 Effect of ASA on the growth of *Phaeodactylum tricornutum* cell

2.2 ASA 对三角褐指藻岩藻黄质含量的影响

根据 HPLC 检测发现,标准品和样品的出峰时间均为 13.5 min(图 2)。以岩藻黄质浓度与 HPLC 峰面积作回归方程为 $y = 0.1074x + 0.0138$ (y 为峰面积, x 为岩藻黄质标准品不同浓度, $R^2 = 0.9999$)。根据回归方程得出的岩藻黄质含量(图 3),结果显示,三角褐指藻岩藻黄质含量对 ASA 均有一定程度的响应。与 CK 相比,10、25、50 mg·L⁻¹ ASA 处理组中三角褐指藻岩藻黄质含量分别极显著提高了 91%、77%、30% ($P < 0.01$),但 100 mg·L⁻¹ ASA 处理组中岩藻黄质含量略低于 CK。



注:a:岩藻黄质标准品;b:对照组;c:10 mg·L⁻¹ ASA 处理组。

Note: a: Analytical standard of fucoxanthin. b: Control group. c: 10 mg·L⁻¹ ASA treatment group.

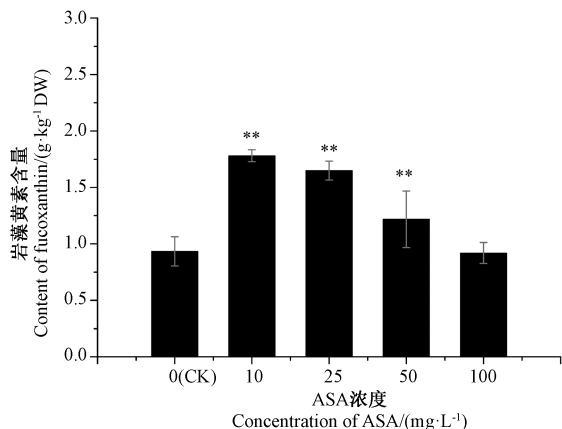
图 2 445 nm 光谱下岩藻黄素的 HPLC 图

Fig.2 HPLC diagram of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornutum* under spectrum of 445 nm

2.3 ASA 对三角褐指藻岩藻黄质生物合成相关基因表达的影响

比较不同浓度 ASA 对三角褐指藻岩藻黄质合成

相关基因表达的影响,结果如图 4 所示。随着 ASA 浓度的增加,*PSY*、*PDS*、*ZDS*、*CRTISO*、*LYCB* 和 *ZEP* 基因的相对表达量均呈现先增加后减少的趋势,其中



注: *, ** 分别表示与 CK 相比差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

Note: *, ** indicates significant differences compared with the and control group at 0.05 and 0.01 level, respectively.

The same as following.

图3 不同浓度 ASA 处理下三角褐指藻中岩藻黄质含量的变化

Fig.3 Variation of the content of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornutum* treated with different concentrations of ASA

表2 6个主成分的贡献率和累积贡献率

Table 2 The Proportion and cumulative proportion of six principal components

项目 Item	主成分 Principal components				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
标准差 Standard deviation	2.510 7	0.701 37	0.385 3	0.237 07	2.275×10^{-16}
方差贡献率 Proportion of variance/%	90.05	7.03	2.12	0.80	0
累计贡献率 Cumulative proportion/%	90.05	97.08	99.20	100	100

3 讨论

岩藻黄质在抗氧化、抗肥胖^[4]和抗癌^[5-9]的治疗中有重要的作用,三角褐指藻作为具有丰富岩藻黄质的单细胞藻,其生长速率以及岩藻黄质含量均优于大型藻,如海带 (*Laminaria japonica*)、裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 等,目前已经对其进行商业化养殖^[21]。SA 是植物抗逆的关键激素,其结构类似物 ASA 的诱导作用也得到了证实。目前国内外已有学者报道了 SA 对微藻生长的影响,Czerpak 等^[22] 研究表明, 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} mol·L⁻¹ SA 可促进小球藻的生长。而在微拟球藻和水华鱼腥藻中,SA 对其生长影响呈现低促高抑的现象^[23-24]。SA 在 2.5~40 mg·L⁻¹ 以

10 mg·L⁻¹ ASA 处理组的 6 个基因表达量均最高,且极显著高于 CK ($P < 0.01$); 25 mg·L⁻¹ ASA 处理组, 6 个基因的表达也得到显著或极显著上调。当 ASA 浓度上升到 100 mg·L⁻¹ 时,大部分目的基因的表达仍然上调,但上调趋势渐缓。这可能是因为,低浓度 ASA 诱导藻细胞产生信号分子,调控岩藻黄质途径基因的表达,但随着 ASA 浓度的增加,造成了藻细胞膜系统和功能受损,导致基因调控作用减弱。

2.4 三角褐指藻岩藻黄质生物合成相关基因的主成分分析

利用荧光定量所检测到的与岩藻黄质相关的 5 个基因表达数据,结合 5 种不同浓度 ASA 处理下岩藻黄质的含量,构成原始数据集,进行主成分分析,得到了主元向量中 5 个主成分特征值的贡献率(表 2),其中,第一主成分(PC1)贡献率(90.05%)和第二主成分(PC2)累计贡献率(97.07%)超过 85%,以第一主成分和第二主成分作图(图 5)。结果表明,变量 (*PSY*、*PDS*、*ZDS*、*CRTISO*、*LCYB* 和 *ZEP*) 与岩藻黄质含量存在正相关关系,其中,*ZEP* 基因对三角褐指藻中岩藻黄质含量的贡献最高。

及 40~120 mg·L⁻¹ 浓度范围内分别对三角褐指藻和铜绿微囊藻有抑制作用,且抑制作用与浓度呈正相关^[23,25]。由于藻类之间的差异,SA 对微藻生长的影响没有统一的规律,但外源 SA 作为酚酸类化感物质之一,可通过不同途径来影响植物和藻类的生长,除了造成质膜过氧化,最常见的是阻碍叶绿素合成,从而影响植物光合作用^[26-27]。在高等植物中,叶面施用 SA 后,大麦和黑吉豆叶片的叶绿素含量均降低^[28-29]。Moharekar 等^[30] 用不同浓度 SA 处理小麦后,其叶绿素 a/b 值随着 SA 浓度的升高而下降,由此推测 SA 改变了捕光天线的尺寸。在微藻中,张诚鹏等^[23] 发现外源 ASA 抑制了三角褐指藻光合效率。胡利静等^[25] 发现 SA 抑制了铜绿微囊藻叶绿素 a 的合成,且高浓度的水杨酸(0.12 g·L⁻¹) 对叶绿素 a 的降解作用更明显。本

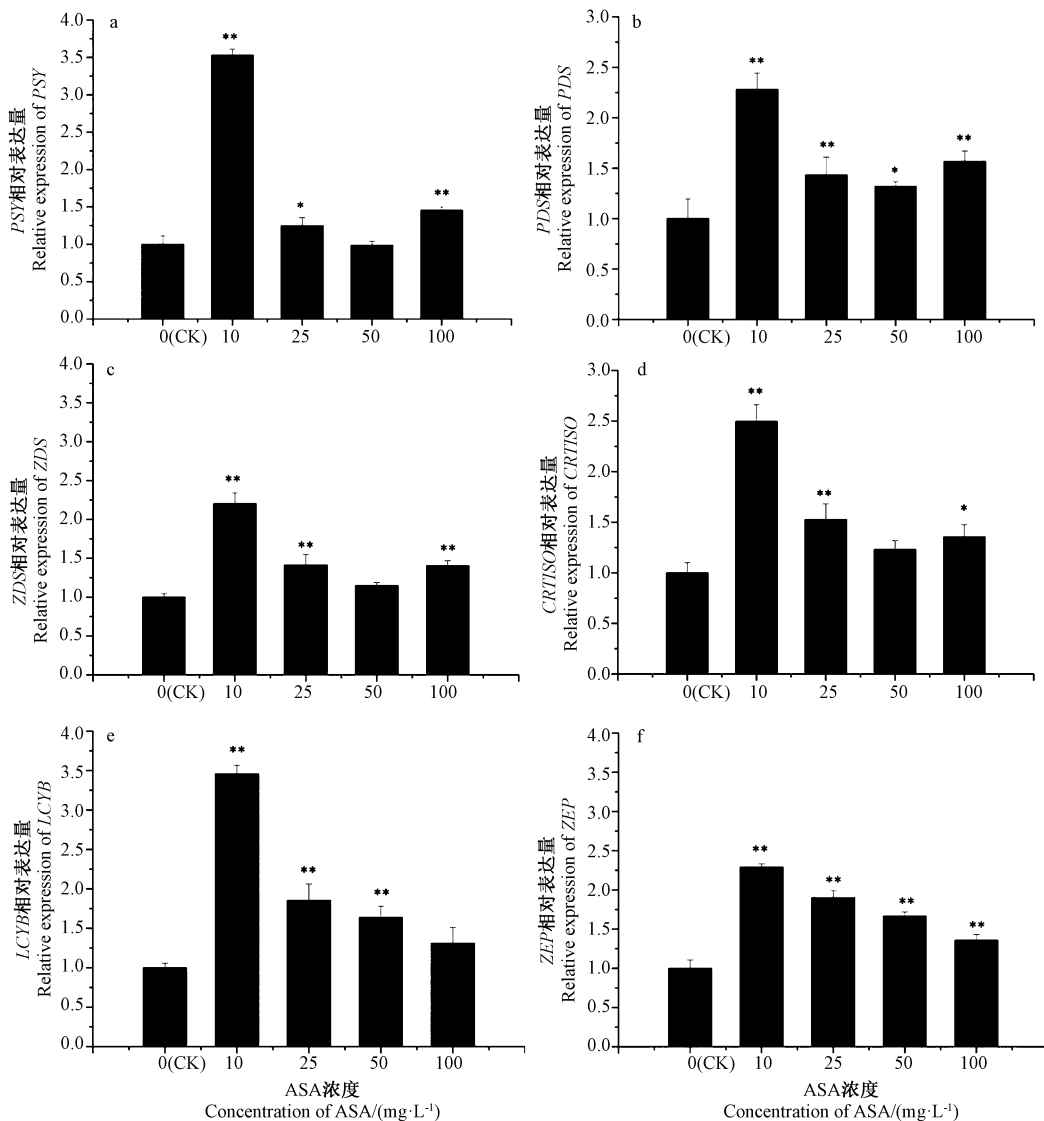


图4 不同浓度ASA处理下三角褐指藻种各基因转录差异

Fig.4 Transcriptional levels induced by different concentrations of ASA in *Phaeodactylum tricornutum*

试验结果也表明,ASA处理的三角褐指藻细胞数量低于对照组,10~40 mg·L⁻¹ASA抑制了三角褐指藻的生长。因此推测,ASA能抑制三角褐指藻叶绿素a的合成,影响光合作用,抑制藻细胞的生长。

大量研究表明,外源SA能够诱导高等植物和微藻中类胡萝卜素等次级代谢产物的积累。Moharekar等^[30]用不同浓度的SA处理小麦和苜蓿种子后,发现两种植物中类胡萝卜素的含量、叶黄素库大小以及脱环氧化速率均显著增加。Vidhyavathi等^[31]用SA处理雨生红球藻,在低光条件下,10、50和100 μmol·L⁻¹的SA能促进虾青素和β-胡萝卜素的合成。SA处理不仅能促进天然类胡萝卜素的积累,还能增强抗氧化酶的活性,进而提高植物的抗逆性。Hu等^[32]发现,ASA能显著增加番茄叶片的多酚氧化酶和过氧化物酶的活

性;经过SA和ASA处理后的甜樱桃,其抗氧化物浓度和抗氧化酶活性提高^[33]。张颖等^[34]用外源SA处理苹果,发现过氧化氢酶(catalase, CAT)、多酚氧化酶(polyphenol, PPO)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)活性显著提高。以上抗氧化酶都是植物防止膜脂过氧化、维持细胞膜正常代谢的重要酶。本研究中,岩藻黄质的含量随着ASA浓度的增加呈先上升后下降的趋势,在10 mg·L⁻¹ASA下岩藻黄质含量最高($P < 0.01$),100 mg·L⁻¹ASA对三角褐指藻岩藻黄质含量的影响不显著($P > 0.05$)。推测10 mg·L⁻¹ASA作为诱导子,通过影响藻岩藻黄质合成途径中相应基因表达,对岩藻黄质的合成进行调控,进一步减轻膜脂过氧化。100 mg·L⁻¹ASA可能对藻细胞产生氧化胁迫,加剧膜质过

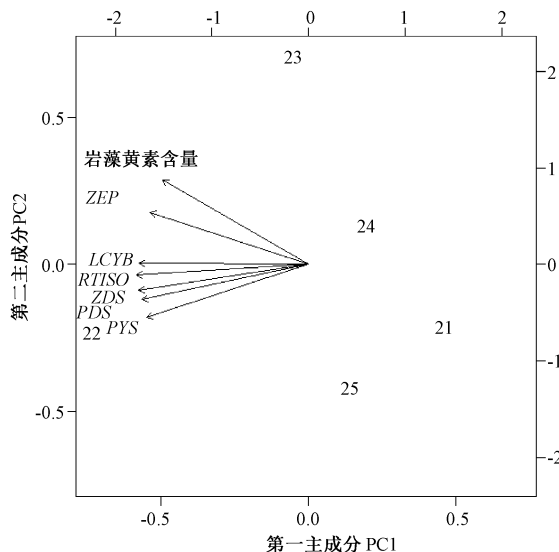


图5 岩藻黄质生物合成通路中的基因与其含量的主成分分析

Fig.5 The principal component analysis between the contents of fucoxanthin and gene involved in pathway of fucoxanthin biosynthesis

氧化,导致藻细胞数量减少甚至岩藻黄质含量降低。

本研究中6个岩藻黄质含量合成相关酶表达水平与岩藻黄质含量存在相关性,其中 *ZEP* 对岩藻黄质合成贡献度最大。张南南等^[35]采用高光处理三角褐指藻6 h后,*ZEP1*和*PSY*表达量相对于对照组提高近2倍,岩藻黄素含量提高了2.16倍,*ZEP1*可能是编码岩藻黄素合成途径中的限速酶。本研究中,主成分分析也得出 *ZEP* 基因对岩藻黄质合成贡献度最高。ASA对三角褐指藻岩藻黄质合成的促进作用,表现在合成途径关键酶基因表达水平和岩藻黄质含量上,其作用机理还需进一步研究。

目前,在岩藻黄质的生物合成途径中,紫黄素到岩藻黄质的合成,仍然存在假说和分歧的观点,一种是由 Wilhelm 和 Christian 提出紫黄质通过硅甲藻黄素转化成岩藻黄质^[36],而另外一种推断是新叶黄质先后经过酮醇化和乙酰化两步修饰,最终转化为岩藻黄质^[37]。本研究通过 ASA 处理三角褐指藻,从生长、含量以及分子方面对其进行了探究,为岩藻黄质的生产实践提供了基础。

4 结论

本研究探究了不同浓度 ASA 诱导对三角褐指藻生长和岩藻黄质合成的影响,结果显示,ASA 处理抑制了对数期三角褐指藻的生长,但 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ASA 对三

角褐指藻岩藻黄质合成途径相关酶基因的表达具有促进作用,且 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组三角褐指藻中岩藻黄质含量显著高于对照组,表明 ASA 可能通过影响三角褐指藻岩藻黄素合成的基因的表达从而调控岩藻黄质的合成。本试验为进一步研究外源诱导子对三角褐指藻的岩藻黄质积累及分子机理奠定了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] Fung A, Hamid N, Lu J. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida* [J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 1055-1062
- [2] Wang W D, Yu L J, Xu C Z, Takashi T, Zhao S H, Yasufumi U, Chen X B, Qin X C, Xin Y Y, Michihiro S, Han G Y, Kuang T Y, Shen J R. Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms[J]. Sciences, 2019, 363(6427): aav0365
- [3] Kim S M, Jung Y J, Kwon O N, Cha K H, Um B H, Chung D, Pan C H. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Applied Biochemistry Biotechnology, 2012, 166(7): 1843-1855
- [4] Peng J, Yuan J P, Wu C F, Wang J H. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health[J]. Marine Drugs, 2011, 9(10): 1806-1828
- [5] Liu Y G, Zheng J, Zhang Y, Wang Z T, Yang Y, Bai M C, Dai Y W. Fucoxanthin activates apoptosis via inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and suppresses invasion and migration by restriction of p38-MMP-2/9 pathway in human glioblastoma cells [J]. Neurochemical Research, 2016, 4(10): 2728-2751
- [6] Rwigemera A, Mamelona J, Martin L J. Comparative effects between fucoxanthinol and its precursor fucoxanthin on viability and apoptosis of breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 [J]. Anticancer Research, 2015, 35(1): 207-219
- [7] Wang L B, Zeng Y, Liu Y, Hu X S, Li S H, Wang Y P, Li L, Lei Z F, Zhang Z Y. Fucoxanthin induces growth arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells by up-regulation of p21 and down-regulation of mortalin [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2014, 46(10): 877-884
- [8] Kawee A A, Kim S M. Application of microalgal fucoxanthin for the reduction of colon cancer risk: Inhibitory activity of fucoxanthin against beta-glucuronidase and DLD-1 cancer cells [J]. Natural Product Communications, 2014, 9(7): 921-924
- [9] Takahashi K, Hosokawa M, Kasajima H, Hatanaka K, Kudo K, Shimoyama N, Miyashita K. Anticancer effects of fucoxanthin and fucoxanthinol on colorectal cancer cell lines and colorectal cancer tissues[J]. Oncology Letters, 2015, 10(3): 1463-1467
- [10] Gammon M A, D'Orazio N. Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin [J]. Marine Drugs, 2015, 13: 2196-2214
- [11] Yu R X, Hu X M, Xu S Q, Jiang Z J, Yang W. Effects of fucoxanthin on proliferation and apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via JAK/STAT signal pathway [J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 657(1/2/3): 10-19

- [12] Ye G, Lu Q, Zhao W D, Du D L, Jin L J, Liu Y S. Fucoxanthin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa via PI3K/Akt pathway[J]. *Tumour Biology*, 2014, 35(11): 11261-11267
- [13] Jin Y, Qiu S, Shao N, Zheng J H. Fucoxanthin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically promotes apoptosis of human cervical cancer cells by targeting PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. *Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2018, 24: 11-18
- [14] Kosakowska A, Lewandowska J, Stoń J, Burkiewicz K. Qualitative and quantitative composition of pigments in *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae) stressed by iron[J]. *BioMetals*, 2004, 17(1): 45-52
- [15] Järup L. Hazards of heavy metal contamination[J]. *British Medical Bulletin*, 2003, 68(1): 167-182
- [16] 张南南, 罗玲, 陈卓, 杨之帆, 黄凤洪, 万霞, 龚阳敏. 三角褐指藻岩藻黄素合成途径及其关键基因对高光照的响应[J]. *中国油料作物学报*, 2017, 39(1): 128-136
- [17] 朱帅旗, 龚一富, 刘浩, 张兵兵, 王何瑜. 硫酸铈铵对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响及转录差异研究[J]. *中国稀土学报*, 2014, 32(6): 750-757
- [18] 陈俊粤, 龚一富, 朱帅旗, 俞凯, 章丽, 王何瑜, 严小军. 三角褐指藻 *pds* 基因生物信息学分析与诱导表达分析[J]. *核农学报*, 2017, 31(12): 2306-2313
- [19] 管悦琳, 龚一富, 朱帅旗, 俞凯, 王何瑜, 严小军. 三角褐指藻 *crts* 基因克隆与表达调控研究[J]. *核农学报*, 2018, 32(11): 2098-2106
- [20] 周丽亚, 龚一富, 俞凯, 陈俊粤, 王何瑜, 章丽, 严小军. 花生四烯酸对三角褐指藻生长、脂质含量及相关基因表达的影响[J]. *核农学报*, 2018, 32(7): 1291-1297
- [21] 宋培钦, 刘鹭, 魏东. 三角褐指藻跑道池规模化培养基岩藻黄素积累条件的优化[J]. *现代食品科技*, 2018, 224(4): 156-164, 247
- [22] Czerpak R, Bajguz A, Gromek M, Kozłowska G, Nowak I. Activity of salicylic acid on the growth and biochemistry of *Chlorella vulgaris* Beijerinck[J]. *Acta Physiol Plant*, 2002, 24(1): 45-52
- [23] 张诚鹏, 朱尧, 张仁璇, 姜思, 佟少明. 水杨酸对两种海洋微藻生长及油脂积累的影响[J]. *生物加工过程*, 2018, 16(6): 42-46
- [24] 吴安平, 张庭廷, 何梅, 聂刘旺. 水杨酸对水华鱼腥藻的化感抑制作用及相关毒理学的初步研究[J]. *生物学杂志*, 2008, 25(5): 44-47
- [25] 胡利静, 童桂香, 黄光华, 肖艳翼, 刘腾飞, 胡鲲, 杨先乐, 韦信贤. 水杨酸对铜绿微囊藻的化感抑制作用[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(1): 169-173
- [26] 李菊, 李玉梅, 苟亚妮, 张同霞, 朱建龙, 肖雪梅. 酚酸类物质代谢及其化感效应研究进展[J]. *黑龙江农业科学*, 2019(8): 175-182
- [27] 高李李, 郭沛涌. 酚酸类化感物质抑菌作用的研究进展[J]. *水处理技术*, 2012, 38(9): 1-4
- [28] Pancheva T V, Popova L P, Uzunova A N. Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants[J]. *Plant Physiology*, 1996, 149(1/2): 57-63
- [29] Anandhi S, Ramanujam M P. Effect of salicylic acid on black gram (*Vigna mungo*) cultivars[J]. *Indian Journal of Plant Physiology*, 1997, 2(2): 138-141
- [30] Moharekar S T, Lokhande (Moharekar) S, Hara T, Tanaka R, Tanaka A, Chavan P D. Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings [J]. *Photosynthetica*, 2003, 41(2): 315-317
- [31] Vidhyavathi R, Sarada R. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2011, 33: 1043-1049
- [32] Hu Y J, Zhang R Q, Wang R R, Bai S H. Induction of polyphenol oxidase and peroxidase activity in tomato seedling leaves by salicylic acid and acetylsalicylic acid[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, 27(2): 262-266
- [33] Giménez M J, Serrano M, Valverde J M, Romero D M, Castillo S, Valero D, Guillén F. Preharvest salicylic acid and acetylsalicylic acid treatments preserve quality and enhance antioxidant systems during postharvest storage of sweet cherry cultivars[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(4): 1220-1228
- [34] 张颖, 李保华, 董向丽, 梁文星, 李桂舫, 王彩霞. 不同品种苹果叶片对外源水杨酸的生理响应[J]. *核农学报*, 2016, 30(5): 1005-1012
- [35] 张南南, 罗玲, 陈卓, 杨之帆, 黄凤洪, 万霞, 龚阳敏. 三角褐指藻岩藻黄素合成途径及其关键基因对高光照的相应[J]. *中国油料作物学报*, 2017, 39(1): 128-136
- [36] Wilhelm L, Christian W. Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model[J]. *Planta*, 2001, 212(3): 382-391
- [37] Dambek M, Eilers U, Steiger S, Breitenbach J, Sandmann G. Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricoratum* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(15): 5607-5612

Effects of Acetosalicyclic Acid on Fucoxanthin Content in *Phaeodactylum tricornutum* and Its' Molecular Mechanism

ZHANG Li GONG Yifu* ZHU Shuaiqi LIU Hao LI Shenrui XIE Zhihao WANG Heyu
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315800)

Abstract: The objective of this research is to investigate the effects of acetosalicylic acid (ASA) on cell growth, fucoxanthin accumulation and expression levels of genes related to the biosynthesis of fucoxanthin in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Growth rate, fucoxanthin content and gene expression were detected by spectrophotometer, high performance liquid chromatography (HPLC) and real-time PCR respectively. The results indicated that fucoxanthin content were closely associated with the concentrations of ASA. ASA at a certain concentration suppressed proliferation of algae cells. With the concentration of ASA increased, the content of fucoxanthin was first increased and then declined. Notably, the content of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornutum* treated with $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ASA was the highest ($1.78 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DW}$), which was 1.9 times as much as that in control groups. The expression of genes (including *PSY*, *PSD*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCYB* and *ZEP*) that encoding pivotal enzymes associated with the fucoxanthin biosynthesis were increased following ASA treatment. In particular, the transcripts of detected genes were significantly up-regulated under $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ASA treatment when compared with the control ($P < 0.01$). Principal component analysis (PCA) indicated these six genes were positively correlated with fucoxanthin accumulation, therein *ZEP* exhibited the highest contribution. In general, proper concentrations of ASA induced the expression of genes responsible for fucoxanthin biosynthesis and increased the production of fucoxanthin. The present study provides a theoretic basis for molecular mechanism of fucoxanthin biosynthesis in *Phaeodactylum tricornutum*.

Keywords: acetosalicylic acid, *Phaeodactylum tricornutum*, fucoxanthin, gene expression, principal component analysis