

稀土元素对甘草细胞生长及甘草酸合成的影响

刘 颖, 魏景芳*, 李冬杰, 李俊英

(河北科技大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018)

摘 要: 以胀果甘草根愈伤组织为材料,研究了在 150 mL 摇瓶中,不同浓度的两种稀土离子镧、亚铈对甘草细胞生长及甘草酸分泌和释放的影响。结果表明,在悬浮培养初期、指数期加入稀土元素,改变了细胞生长状况,均使细胞在整体上生物量减少;不同种类的稀土离子、不同的稀土浓度对细胞生长影响强弱不同,但趋势相似。其中,培养指数期,加入 500 μ L 镧溶液的培养液中,所得甘草细胞生物量较多,利用薄层—紫外分光光度计法检测到甘草酸含量为 67.68 mg/g。

关键词: 稀土元素; 甘草细胞; 悬浮培养; 甘草酸

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)01-0101-04

Effects of rare earth elements on *Glycyrrhiza* cell growth and glycyrrhizic acid synthesis

LIU Ying, WEI Jing-fang*, LI Dong-jie, LI Jun-ying

(Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: The effects of rare earth elements including $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$, $\text{Ce}_2(\text{CO}_3)_3$ on growth of *Glycyrrhiza inflata* root cell and glycyrrhizic acid synthesis were investigated in this paper. The results showed that the growth pattern of suspension cell was altered by adding the rare earth elements in the medium in the lag phase and the linear phase, the cell-wet weight was also decreased. The cell-wet weight was relatively higher and the secretion rate of glycyrrhizic acid reached 67.68 mg/g when 500 μ L La was added into the medium in the linear phase of cell culture.

Key words: rare earth element; *Glycyrrhiza inflata* cell; suspension culture; glycyrrhizic acid

甘草酸是甘草中最重要的活性成分,现代研究表明,它具有抗肝损害和毒性、抗肝纤维化,保护心血管、抑制病毒等作用,主要从植物甘草中提取。近年来,甘草面临着严重的资源问题,致使其药用成分的获得受到阻碍。于是,利用植物细胞培养技术直接生产甘草酸就有了特殊意义,而如何提高细胞合成与释放甘草酸成为关注的热点。利用某些分子生物及重金属盐作为促进细胞合成与释放次级代谢物质的诱导子已普遍采用(元英进等,1998),其中,稀

土元素对体外培养动物细胞的研究较为广泛,取得了令人满意的效果,但对于植物组织和细胞培养的影响仅有少量报道(元英进等,1993)。鉴于稀土元素对植物细胞生长及次生代谢产物的积累均有一定的促进作用。本文研究了镧、铈的化合物对甘草细胞生长及甘草酸合成的影响,为进一步探讨稀土元素对生物体的作用提供更多的证据,也为甘草细胞培养寻求一类有效的诱导子,以提高甘草酸的释放,进而为甘草细胞的工业化生产奠定基础。

收稿日期: 2004-12-01 修回日期: 2005-09-10

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划项目(02245512D)[Supported by Science and Technology Research and Development Program of Hebei Province(02245512D)]。

作者简介: 刘颖(1980-),女,河北新河人,硕士,助教,主要研究方向为生物制药。

* 通讯作者(Author for correspondence)

1 材料与方法

1.1 材料

本实验细胞株系由产自新疆的胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)的根诱导而来,在改良的 MS 培养基(MS 培养基附加 2,4-D 1.0 mg/L;NAA 1.0 mg/L;6-BA 1.0 mg/L;KT 0.3 mg/L;蔗糖 30 g/L;pH5.8)中保持和继代。

培养基所用试剂为国产分析纯。碳酸镧、碳酸铈为国产分析纯。

1.2 细胞培养

挑选在改良的 MS 固体培养基上多次继代的甘草愈伤组织细胞转接入 MS 液体培养基中,培养温度 25 ℃,摇床 120 r/min,于黑暗处培养(张立莹等,1997;梁玉玲等,2000)。

1.3 稀土溶液的配制

碳酸镧(相对分子质量 457.8)、碳酸铈(相对分子质量 460.2)各取 0.2289 g 和 0.2301 g,分别用浓盐酸定容至 100 mL,然后各取 10 mL 用去离子水定容至 1 L,即配成终浓度为 0.1 mmol/L 的镧溶液、0.1 mmol/L 的铈溶液。再用 1 N 的 NaOH 和 1 N 的 HCl 将两溶液 pH 值调至 5.8,通过细菌过滤器(0.22 μm 滤膜)过滤到无菌试剂瓶中保存、备用(苏湘鄂等,2001)。

1.4 细胞生长量的测定

取不同时期的培养液,置于离心机上,3 600 rpm 离心 10 min,倒回上清液,取沉淀物,用已灭菌的滤纸吸干沉淀表面的水分,测愈伤组织鲜重。

1.5 甘草酸含量的测定

选取加入稀土元素进行悬浮培养的愈伤组织,称取 3 g,加入 20 mL 50% 的乙醇,40 ℃ 超声波振荡破碎细胞 1 h,浸泡 24 h,将其置于离心机上,3 600 rpm 离心 10 min,取上清液,重复上述操作一次,合并所得的上清液,过滤、活性炭脱色作为样品。吸取样品液 1 mL,加入 200 μL 氨水,振荡均匀,做为待测样品液。称取甘草酸单铵盐标准品 6.6 mg,用无菌水定容至 1 mL,制得甘草酸单铵盐标准品浓度为 6.6 mg/mL。量取甘草酸单铵盐的标准溶液 2 μL、待测样品液 10 μL,点于 GF₂₅₄ 硅胶板上。选择正丁醇:冰醋酸:水=4:2:4 作为展开剂,于 265 nm 的紫外光下观察薄层层析结果,做样品的定性检验。

定性检验后,将含有甘草酸单铵盐的样品用紫

外分光光度计 UV-2102PUS 做定量测定(孙志忠等,2000)。

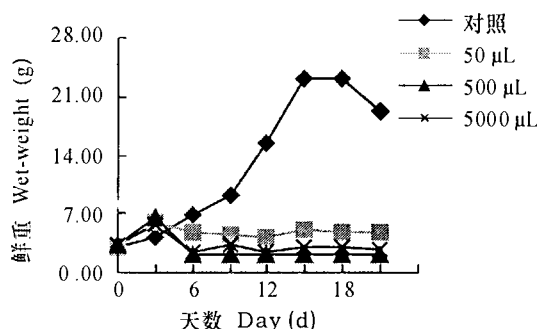


图 1 培养初期添加镧对悬浮细胞的影响
Fig. 1 Effect of La on suspension cell in lag phase

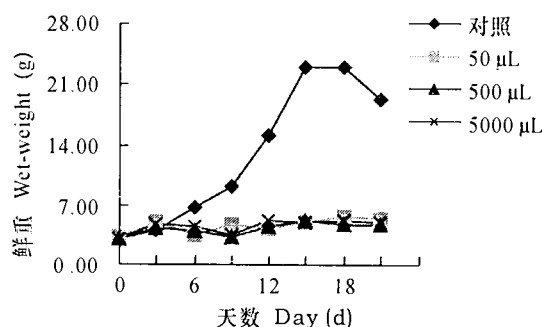


图 2 培养初期添加铈对悬浮细胞的影响
Fig. 2 Effect of Ce on suspension cell in lag phase

2 结果

2.1 悬浮培养初期加入稀土元素对甘草细胞生长的影响

在培养条件相同的情况下,同时做 7 组实验。在这 7 组实验中,其中 6 组实验在培养的第 1 天加入稀土元素,3 组添加镧溶液,加入量分别为 50、500、5 000 μL;3 组添加铈溶液,加入量分别为 50、500、5 000 μL;1 组采用未加入稀土元素的悬浮培养基。按 60 g/L 的接种量接入甘草愈伤组织。从培养日起,每隔 2 d 定时取样,同时测七组样品的细胞鲜重。观察稀土元素在培养初期对悬浮细胞生长的影响。细胞鲜重随时间变化关系如图 1、2 所示。

由图 1、2 中的曲线可以看出,在悬浮培养初期添加稀土元素对甘草细胞生长有明显影响。缩短了

细胞生长的延迟期和指数期, 衰亡期细胞生物量略显波动, 在整体上, 使细胞生物量减少。分别比较图 1、2 中的四条曲线, 在图 1 中, 采用镧溶液浓度为 $0.1 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$ 的培养基培养所获得的细胞生物量相对较多, 其他两种浓度影响较为相似, 图 2 中的三条曲线变化趋势较为相似。尽管不同的离子浓度对甘草细胞生长影响强弱有别, 但其影响的整体趋势极为相似。比较图 1、2, 可以发现, 加入镧的培养液中, 细胞在第 3 天生物量达最大值, 之后生物量略减; 铈对细胞生长影响较大, 无明显的指数期, 生长曲线近乎直线, 整体生物量相对较低。

2.2 悬浮培养指数期加入稀土元素对甘草细胞生长的影响

在培养条件相同的情况下, 同时做 7 组实验。在这 7 组实验中, 其中 6 组实验在培养的第 3 天加入稀土元素, 3 组添加镧溶液, 加入量分别为 50、500、5 000 μL ; 3 组添加铈溶液, 加入量分别为 50、500、5 000 μL ; 1 组采用未加入稀土元素的悬浮培养基。按 60 g/L 的接种量接入甘草愈伤组织。从培养日起, 每隔 2 d 定时取样, 同时测七组样品的细胞鲜重。观察稀土元素在培养指数期对悬浮细胞生长的影响, 结果见图 3、4。

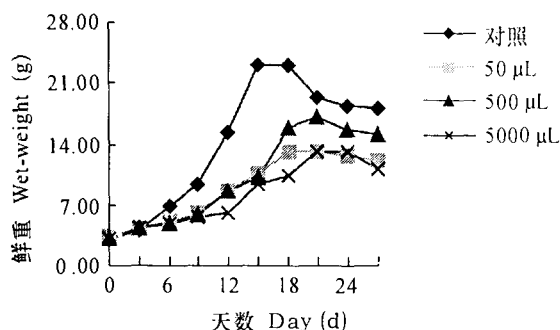


图 3 培养指数期添加镧对悬浮细胞的影响

Fig. 3 Effect of La on suspension cell in linear phase

由图 3、4 可以看出, 悬浮培养细胞在培养前 3 d, 7 组实验瓶的生长情况大致相同。3 d 后加入不同种类、不同浓度的稀土元素, 悬浮细胞生长曲线发生变化, 在培养指数期添加稀土元素对悬浮培养细胞的生长产生较大的影响。由图 3 可以看出, 加入镧后, 细胞生物量整体上减少。刚加入镧时, 对悬浮细胞都出现不同程度的抑制; 9 d 后, 镧浓度为 $0.1 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$ 、 $1 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$ 的培养液中的悬浮

细胞出现指数增长, 镧浓度为 $10 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$ 的培养液中的悬浮细胞在第 12 天后才出现指数增长; 22 d 后细胞量开始下降。比较这三种不同浓度的镧溶液对细胞生长的影响时, 发现镧浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$ 的培养液中的悬浮细胞的生物量相对较多。由图 4 可以看出, 加入铈后, 细胞生物量在整体上也减少。铈浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$ 、 $10 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$ 的培养液中的悬浮细胞刚加入铈后生长较快, 直到 18 d 后, 细胞生长呈下降趋势; 而在铈浓度为 $0.1 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$ 的培养液中的悬浮细胞, 培养 9 d 后, 出现指数增长, 22 d 细胞生物量下降, 整体上 $1 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$ 、 $10 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$ 这两种铈浓度的培养液中生物量相对较多。比较图 3、4, 发现添加铈对悬浮细胞生长的影响较大, 整体生物量较少, 细胞生长曲线波动较大。

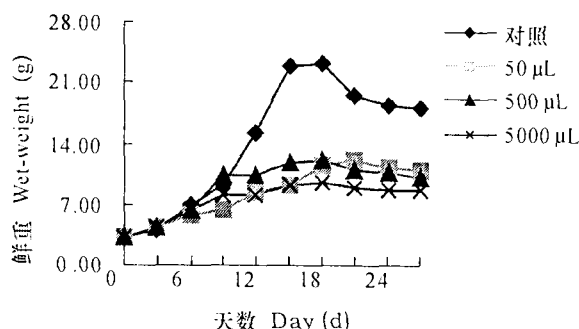


图 4 培养指数期添加铈对悬浮细胞的影响

Fig. 4 Effect of Ce on suspension cell in linear phase

2.3 加入稀土元素对甘草酸合成的影响

将不同的甘草细胞悬浮系(不加稀土元素、培养初期添加稀土元素、培养指数期添加稀土元素)按 1.5 的方法处理、取沉淀、上清点于 GF₂₅₄ 硅胶板上, 结果仅在培养指数期添加 500、5 000 μL 镧的悬浮培养细胞中发现甘草酸, 上清液中未检测到甘草酸。薄层层析结果如图 5 所示。

图 5 中, 共有 8 个点样点, 其中 1 为甘草酸单铵盐标准品, 2、3、4 分别为添加 50、500、5 000 μL 镧的悬浮培养细胞, 5、6、7 分别为添加 50、500、5 000 μL 铈的悬浮培养细胞, 8 为不加稀土元素的悬浮培养细胞。薄层层析结果显示, 只有第 3、4 样品点跑出与标准品位置接近的黑点, 但第 4 点位置偏下, 因此, 按 1.5 的检测方法, 仅有在培养指数期添加 500 μL 镧溶液的培养基中培养的甘草细胞可检测到甘

草酸。

利用紫外分光光度计,以无菌水做对照,测定3号样点的吸光度为0.115,根据甘草酸单铵盐标准品的标准曲线方程(吸光度=0.074 759×浓度),计算出甘草酸含量为67.68 mg/g。

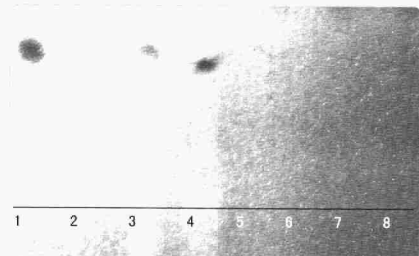


图5 培养指数期添加稀土元素薄层析图
Fig. 5 Result of thin layer chromatography in linear phase

3 讨论

甘草酸是甘草细胞在培养过程中,产生的次级代谢产物。有关甘草愈伤组织和细胞悬浮培养的报道不多,且有一些不相一致的结果,如 Sato 等报道获得了甘草酸等有效物质,而 Henry 和 Hayashi 则没能分离出来或得率很低,分析可能是试验方法及条件不同所致。本实验主要研究了稀土元素对甘草细胞生长及甘草酸含量的影响。一些研究表明,稀土元素作为一种非生物诱导子,本身不能进入细胞,而是聚集在植物细胞壁和膜外的外侧之间,因此可能作为外界信号作用胞质膜而引起膜上微结构发生变化,从而改变细胞膜的通透性(Nicalaou 等,1994),使原来贮存在细胞内的次级代谢物质释放出来(周世恭,1993;张若桦等,1987)。实验结果表明,在指数期添加 500 μ L 镧溶液的培养细胞中检测到甘草酸,其含量为 67.68 mg/g,说明镧可以作为提高甘草酸含量的一种有效诱导子,钆的加入使细胞自身生长受到较大的抑制,甘草酸释放量过低,而未加入稀土元素的细胞也由于甘草酸释放量过低,故

此未检测到甘草酸。

由实验结果可以看出,当细胞处于延滞期时,加入稀土元素,由于细胞生物量过低,直接影响甘草酸的含量;在指数期加入稀土元素,不影响细胞的旺盛分裂,虽然细胞的生物量略减,但其次代谢作用增强,将培养基中的营养成分转化为次级代谢产物,促进了甘草酸的合成。同时,镧元素的积累,改变了细胞膜表面的微结构,造成了细胞膜损伤。尽管实验中,在悬浮培养上清液里未检测到甘草酸,但悬浮培养物经过处理后,发现有甘草酸存在。可能由于镧元素的加入使得破碎的细胞易于将内含物释放出来。

参考文献:

- 元英进,胡宗定. 1993. 稀土元素对长春花植物细胞培养的影响[J]. 稀土,14(3):38-40.
- 张若桦,申泮文. 1987. 稀土元素化学[M]. 天津科学技术出版社.
- Liang YL(梁玉玲),Guan YY(管延英),Yang L(阳丽),et al. 2000. Cultivation of callus tissue of *Glycyrrhiza inflata* and the glycyrrhizic acid content analysis(腺果甘草愈伤组织培养及甘草酸含量分析)[J]. J Hebei Univ(河北大学学报),20(4):365-368.
- Nicalaou KC, Yang Z, Liu J, et al. 1994. Total synthesis of Taxol[J]. Nature, (367):630.
- Su XE(苏湘鄂), Mei XG(梅兴国), Yu YT(余倚亭). 2001. Effects of rare earth elements on *Taxus cell suspension culture and taxol synthesis*(稀土元素对红豆杉悬浮培养及紫杉醇合成的影响)[J]. Biotechnology(生物技术), 11(4):28-31.
- Sun ZZ(孙志忠), Hao WH(郝文辉), Yue XL(岳秀丽), et al. 2000. A comparative study on contents of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch from four areas by thin-layer colorimetry(薄层比色法测定四个产地甘草中甘草酸含量的比较研究)[J]. J Nat Sci Heilongjiang Univ(黑龙江大学自然科学学报), 17(3):69-70.
- Yuan YJ(元英进), Hu GW(胡国武), Wang CG(王传贵), et al. 1998. Effect of earth compounds on growths, taxol biosynthesis and release of *taxus cuspidate* cell culture(镧、钕对红豆杉细胞生长及紫杉醇合成与释放的影响)[J]. Journal of The Chinese Rare Earth Society(中国稀土学报), 16(1):56-60.
- Zhang LY(张立莹), Liu LP(刘丽萍), Jia JM(贾景明), et al. 1997. Study on cell suspension culture of *Taxus cuspidata* (东北红豆杉细胞悬浮培养研究)[J]. J Shenyang Agri Univ(沈阳农业大学学报), 28(3):180-185.
- Zhou SG(周世恭). 1993. Energy dispersive X-ray microanalysis and ultrastructural location of lanthanum in intact plant (镧在植物体中能谱分析和超微结构定位)[J]. J Chinese Electron Microscopy Society(电子显微学报), 5:406-403.