

影响杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙因素的研究

叶青华, 王亚琴*, 朱媛

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 广州 510640)

摘要: 研究了外源激素 2,4-D、NAA、6-BA、KT 的不同组合以及营养添加物水解酪蛋白、酵母提取物对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响。结果表明,在 2.0 mg/L 2,4-D 的培养基中分别添加 1.0 mg/L NAA、0.5 mg/L 6-BA、0.5 mg/L KT 可提高桃叶珊瑚甙含量;在培养基中添加水解酪蛋白和酵母提取物均能促进桃叶珊瑚甙的合成,以添加 100 mg/L 水解酪蛋白和 15 mg/L 酵母提取物时其含量最大。初步得出桃叶珊瑚甙合成的最适培养条件为添加 2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT+100mg/L 水解酪蛋白+15mg/L 酵母提取物的 MS 培养基。

关键词: 杜仲;桃叶珊瑚甙;外源激素组合;营养添加物

中图分类号: Q943.1, Q946.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)03-0400-04

Studies on factors affecting aucubin production from the suspension cell of *Eucommia ulmoides*

YE Qing-Hua, WANG Ya-Qin*, ZHU Yuan

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Factors affecting aucubin production from the suspended cell of *Eucommia ulmoides*, such as the different exohormone combination of 2,4-D, NAA, 6-BA, KT and nutrients including casein hydrolysate and yeast extract, were investigated. The results showed that the production of aucubin could be improved in media with 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L NAA, 0.5 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L KT. Nutrients including casein hydrolysate and yeast extract could improve the production of aucubin, the optimal concentration was 100 mg/L casein hydrolysis and 15 mg/L yeast extract. Therefore, the optimal conditions for the production of aucubin were MS media with 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L NAA, 0.5 mg/L 6-BA, 0.5 mg/L KT, 100 mg/L casein hydrolysate and 15 mg/L yeast extract.

Key words: *Eucommia ulmoides*; aucubin; the exohormone combination; nutrients

杜仲(*Eucommia ulmoides*)是杜仲科杜仲属植物,是中国特有的贵重中药材,其药用成分包括桃叶珊瑚甙、绿原酸、总黄酮、京尼平甙、京尼平甙酸等。其中,次生代谢物桃叶珊瑚甙(Aucubin,简称 Au)是一种重要的生物活性物质,具有清湿热、利小便、镇痛、降压、保肝护肝、抗肿瘤等作用,广泛应用于医药、日用化工和饲料等行业。它能促进干细胞再生,明显抑制乙型肝炎病毒 DNA 的复制,其甙元及有

效多聚体是一种抗菌素(李长恭等,2002;管淑玉等,2003)。植物细胞具有全能性及多条代谢途径,在培养基中添加外源激素及营养物改变培养条件会使代谢朝所需终产物方向发展,从而达到提高次级产物含量的目的(甘烦远等,1991)。本文在研究碳源、培养基类型及其 pH 等影响因子的基础上(王亚琴等,2007),对外源激素 2,4-D、NAA、6-BA、KT 的不同组合以及营养添加物水解酪蛋白、酵母提取物对杜

收稿日期: 2008-01-24 修回日期: 2008-12-30

基金项目: 广州市科技计划项目(2004J1-C0231);广东省国际合作项目(2004B50201021)[Supported by Science and Technology Project of Guangzhou (2004J1-C0231); International Cooperation Project of Guangdong Province (2004B50201021)]

作者简介: 叶青华(1983-),女,硕士,主要从事植物基因工程研究,(E-mail)yeqinghua2002@yahoo.com.cn.

*通讯作者(Author for correspondence): 博士,从事植物基因工程与生物制药等研究,(E-mail)yqwang@scut.edu.cn

仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响进行了详细的研究,旨在筛选杜仲次生代谢物桃叶珊瑚甙合成的最适培养条件,这对提高杜仲细胞培养物中次生代谢物产率,实现大规模生产具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为采自广东乐昌县杜仲基地的种子。

1.2 愈伤组织的诱导

杜仲愈伤组织系由杜仲种子萌发的无菌苗真叶诱导。在继代培养 2 次后获得了生长均一、质地疏松、分散度高的愈伤组织。

1.3 培养基

MS 基本培养基附加不同的外源激素组合和营养添加物, pH 5.8, 在 0.105 MPa, 121 °C 下灭菌 20 min。

1.4 培养条件和悬浮细胞系的建立

取生长旺盛、结构疏松、易于分散的愈伤组织 1.5 g 接种到装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 的三角瓶中,在转速为 110 r/min,温度为(25±2) °C,全天光照,光照强度 72 μmol·m⁻²·s⁻¹的条件下悬浮培养。培养 2~3 周后,培养液中即有悬浮单细胞或小细胞团出现。继代培养时,加入等量的新鲜培养液,摇匀,静置,待大细胞团沉降后分瓶,不需过滤,即可得到不含大细胞团块的培养物。按上述步骤通过 3~4 次继代培养,即可得到只含单细胞或小细胞团的培养物。

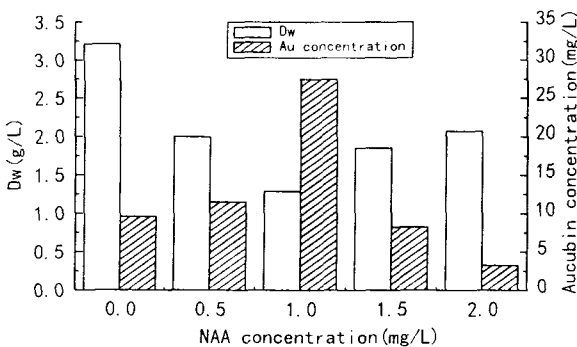


图 1 2,4-D 与 NAA 组合对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响

Fig. 1 Effect of 2,4-D and NAA on aucubin production from the suspension cell of *Eucommia ulmoides*

1.5 悬浮细胞培养物中桃叶珊瑚甙含量的 HPLC 法测定

将收集的杜仲干细胞(50 °C 烘干 2 h)置于 50

mL 容量瓶中,加 30% 甲醇溶液 40 mL,振摇 5 min,置冰箱中过夜。取出,放至室温,再振摇 10 min,加 30% 甲醇溶液至刻度,摇匀,过滤,弃去初滤液,取续滤液用滤膜滤过后进样检测。仪器为 Agilent 1100LC 高效液相色谱仪,色谱柱为 XDB-C18 (5 μm, 4.6×250 mm),流动相为乙腈:水=3:97,进样量 20 μL 流速 1.0 mL/min,柱温 25 °C,检测波长 206 nm(杨小梅等,2003)。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 与 NAA 组合对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响

以 2,4-D 最佳浓度 2.0 mg/L 为基础(王亚琴等,2007),分别加入不同浓度的 NAA,结果如图 1 所示。当培养基中未添加 NAA 时,细胞的生长量是最大的;添加 NAA 后,细胞生长量变少。说明当培养基中存在 2,4-D 时,NAA 的添加不利于细胞生长。而桃叶珊瑚甙的含量则随着 NAA 浓度的增加逐渐增大,当 NAA 浓度增至 1.0 mg/L 时,桃叶珊瑚甙含量达到最大值;超过这个浓度时,桃叶珊瑚甙的含量会下降。

2.2 2,4-D 与 6-BA 组合对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响

一般来说,在组织培养过程中,细胞分裂素和生长素同时使用有增效作用,按不同的比例配合可以产生不同的效果。但是由于不同植物细胞的生理状态和次生代谢产物不同,它们的协同作用没有规律可循。本实验以 2,4-D 最佳浓度 2.0 mg/L 为基础,分别加入不同浓度的 6-BA 观察悬浮细胞生长和桃叶珊瑚甙的含量情况(图 2)。

从图 2 可以看出,细胞生长和桃叶珊瑚甙的合成并不同步,当 6-BA 浓度为 0.1 mg/L 时,细胞生长量最大,但此时桃叶珊瑚甙的含量还没达到最大。随着 6-BA 浓度的增加,桃叶珊瑚甙的含量会逐渐增大,当 6-BA 浓度增至 0.5 mg/L 时,桃叶珊瑚甙含量达到最大值。超过这个浓度时,桃叶珊瑚甙的含量会下降。

2.3 2,4-D 与 KT 组合对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响

以 2,4-D 最佳浓度 2.0 mg/L 为基础,分别加入不同浓度的 KT。当添加 KT 的浓度达到 0.3 mg/L 时,细胞生长量比没添加 KT 时大,但此时桃

叶珊瑚甙的含量比未添加KT时低,当KT浓度增加到0.5 mg/L时,桃叶珊瑚甙的含量迅速增大并超过未添加KT前的含量(图3),初步说明添加一定浓度的KT对桃叶珊瑚甙的合成有促进作用。

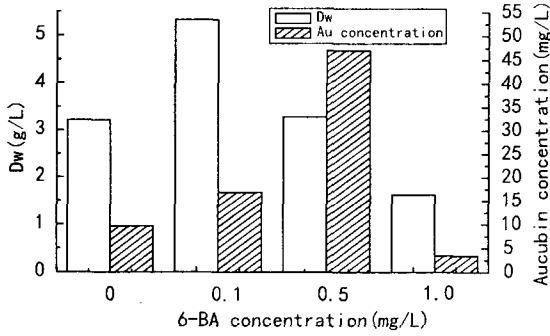


图2 2,4-D与6-BA组合对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响

Fig. 2 Effect of 2,4-D and 6-BA on aucubin production from the suspension cell of *Eucommia ulmoides*

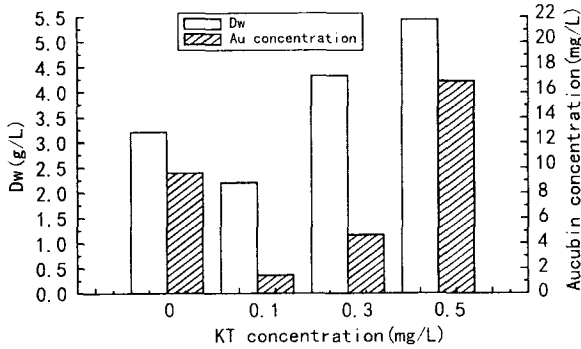


图3 2,4-D与KT组合对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响

Fig. 3 Effect of 2,4-D and KT on aucubin production from the suspension cell of *Eucommia ulmoides*

2.4 添加物对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响

在研究植物细胞生长培养基成分分配比时,经常在培养基中添加水解酪蛋白、酵母提取物或椰乳等。由于这些物质是一些成分复杂的有机添加剂,可以增加培养基内部的碳源及氮源的含量,改变不同氮源的比例,增加调节剂的浓度。因此,一定程度上这些添加物对细胞生长及次级代谢物的积累有明显的改善作用(杨世海等,2006)。

2.4.1 水解酪蛋白对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响 水解酪蛋白(Casein hydrolysis,简称CH)是植物细胞培养中常用的培养基添加物,本实验在附加2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA

+0.5 mg/LKT的MS培养基中添加不同浓度的水解酪蛋白,结果如图4所示。添加水解酪蛋白后,细胞生长量逐渐增大,当水解酪蛋白浓度为300 mg/L时,细胞生长量最大。而水解酪蛋白浓度为100 mg/L时,桃叶珊瑚甙含量最高,是添加水解酪蛋白前的2倍,当超过这个浓度时,桃叶珊瑚甙的含量缓慢下降,但均高于添加前的含量。

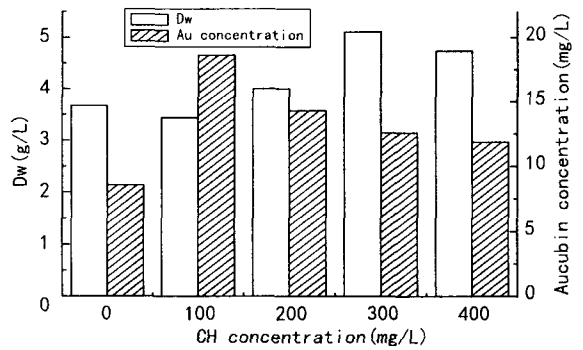


图4 水解酪蛋白对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响

Fig. 4 Effect of casein hydrolysis on aucubin production from the suspension cell of *Eucommia ulmoides*

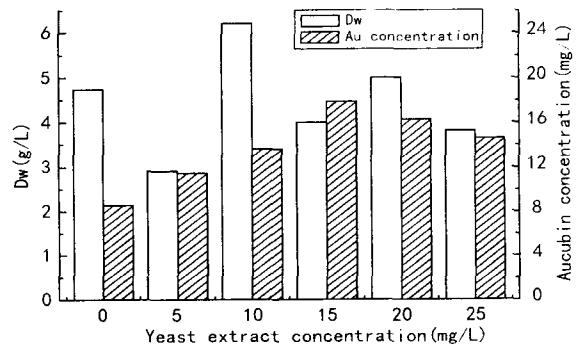


图5 酵母提取物对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响

Fig. 5 Effect of yeast extract on aucubin production from the suspension cell of *Eucommia ulmoides*

2.4.2 酵母提取物对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响 本实验在附加2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/LKT的MS培养基中添加不同浓度的酵母提取物,结果如图5所示,酵母提取物对细胞生长影响较大,当浓度为10 mg/L时,细胞生长量最大。桃叶珊瑚甙的含量随酵母提取物浓度的增加而增大,当酵母提取物浓度为15 mg/L时,桃叶珊瑚甙含量最高,是添加酵母提取物前的2倍,当超过这个浓度时,桃叶珊瑚甙的含量缓慢下降,但均高于添加前的含量。

3 讨论

武利勤等(2005)在培养新疆雪莲悬浮细胞和次生代谢物黄酮的合成中认为不同的植物生长物质组合可以调节细胞的次生代谢而影响目的成分的合成。本实验在 2.0 mg/L 2,4-D 的培养基中分别添加 1.0 mg/L NAA、0.5 mg/L 6-BA、0.5 mg/L KT 可以提高桃叶珊瑚甙含量;由此可见不同外源激素配比对次生代谢物合成的影响的确很大。这与作者在研究单一外源激素对桃叶珊瑚甙含量的影响时所得结果不太一致(王亚琴等,2007)。在单因素的研究中,NAA 浓度在 2.0 mg/L 时,桃叶珊瑚甙含量最高;而在激素组合的研究中,由于其它激素的互作影响,所需 NAA 的含量降低了 50%。

在植物细胞培养合成次生代谢产物的研究中,营养物的添加常作为提高目的产物产量的一种手段。通过外源营养物的添加,研究杜仲愈伤组织细胞次生代谢产物的积累和调控,有利于杜仲愈伤组织细胞培养系统走向工业化。水解酪蛋白是一种由多种氨基酸组成的复合营养物,有研究证明它可以显著提高裂叶茄培养物中澳洲茄胺的含量(Indrzyanto & Erawatt,1995);酵母也是一种成分复杂的营养物,可以通过活化苯丙烷类途径中的关键酶促使一些次生代谢物积累(Endress,1994)。本实验研究了水解酪蛋白、酵母提取物对杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙的影响。结果表明,在附加 2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/LKT 的 MS 培养基中添加 100 mg/L 水解酪蛋白和 15 mg/L 酵母提取物对桃叶珊瑚甙的合成有明显的促进作用。

参考文献:

- Endress R. 1994. *Plant Cell Biotechnology*[M]. Berlin: Springer-Verlag, 216—223
- Gan FY(甘烦远), Zheng GZ(郑光植). 1991. The influence of different factors on cell growth and α -tocopherol content of cultures from *Carthamus tinctorius*(各种因素对红花培养物中细胞生长及 α -生育酚含量的影响)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 33(7): 516—522
- Guan SY(管淑玉), Su WW(苏薇薇). 2003. Chemistry components and pharmacology research of *Eucommia ulmoides* Oliv(杜仲化学成分与药理研究进展)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材), 26(2): 124—129
- Indrzyanto G, Erawatt T. 1995. Effect of L-arginine, casein hydrolysate, banana powder and sucrose on growth and solasodine production in shoot cultures of *Solanum laciniatum*[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 43(3): 237—240
- Li CG(李长恭), Qu GR(渠桂荣). 2002. The progress in the development of anti-hepatitis virus drugs(抗乙型肝炎病毒药物的进展)[J]. *Nat Product Res Develop*(天然产物研究与开发), 14(6): 81—87
- Wang YQ(王亚琴), Zhu Y(朱媛). 2007. Studies on the cell suspension culture of *Eucommia ulmoides* and its metabolite-aucubin(杜仲细胞悬浮培养生产桃叶珊瑚甙的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 27(2): 236—239
- Wu LQ(武利勤), Guo SX(郭顺星), Xiao PG(肖培根). 2005. Cell suspension culture and flavonoids production in *Saussurea involucrate*(新疆雪莲细胞悬浮系的建立和黄酮类活性成分的产生)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 30(13): 965—968
- Yang SH(杨世海), Liu XF(刘晓峰), Guo DA(果德安), et al. 2006. Effects of different additives on accumulation of flavonoids in *Glycyrrhiza uralensis* callus(不同附加物对甘草愈伤组织培养中黄酮类化合物形成的影响)[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 41(2): 96—99
- Yang XM(杨小梅), Shang PP(尚平平), Liu JB(刘建斌), et al. 2003. Determination of aucubin in *Eucommia ulmoides* kernel by HPLC(HPLC 法测定杜仲仁中桃叶珊瑚甙的含量)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), 34(10): 7—9