

# 杜仲细胞悬浮培养生产桃叶珊瑚甙的研究

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:** 对杜仲细胞悬浮培养及其次生代谢产物桃叶珊瑚甙的产生进行了研究, 考察了各种理化因子对细胞生长及桃叶珊瑚甙产生的影响。结果表明, 在悬浮培养生产桃叶珊瑚甙中, 第 18 天桃叶珊瑚甙的含量达到最大值, 培养基为 MS、pH 为 5.8 时有利于桃叶珊瑚甙的合成, 此时含量高达 40.56 mg/L。2.0 mg/L 的 2,4-D、NAA 及浓度低于 1.0 mg/L 的 6-BA 均能促使桃叶珊瑚甙的合成, 但 KT 却抑制桃叶珊瑚甙的合成。

**关键词:** 杜仲; 桃叶珊瑚甙; 细胞培养

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)02-0236-04

## Studies on the cell suspension culture of *Eucommia ulmoides* Oliv. and its metabolite-aucubin

WANG Ya-Qin, ZHU Yuan

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

**Abstract:** The production of aucubin in cell suspension culture of *Eucommia ulmoides* Oliv. was reported. Some physical and chemical factors affected the cell growth and the production of aucubin were investigated. The results showed that the concentration of aucubin was the highest on 18th day. The optimal conditions such as MS medium and the proper pH was 5.8 could produce 40.56 mg/L aucubin. 2.0 mg/L 2,4-D, NAA and 6-BA below 1.0 mg/L could promote the production of aucubin, but KT restrained the production of aucubin.

**Key words:** *Eucommia ulmoides* Oliv.; aucubin; cell culture

利用植物细胞培养生产药用成分是近年来发展起来的新领域, 已经成为开发药用植物资源的重要途径(梁文裕等, 2003)。杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.) 是重要的药用资源, 其药用成分包括桃叶珊瑚甙、绿原酸、总黄酮等。其中, 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)。桃叶珊瑚甙主要存在于杜仲的树皮、叶中, 含量较低, 提取量有限, 而且通过剥皮、采叶来提取桃叶珊瑚甙对杜仲的生长有一定影

响。因此, 为了更有效地保护杜仲种质资源, 目前多采用组织培养技术, 在组织和细胞水平上促成杜仲次生代谢物的生物合成, 达到在不受田间条件制约的情况下大规模生产杜仲次生代谢物的目的。本文通过对影响杜仲细胞悬浮培养及其次生代谢物桃叶珊瑚甙产生的各项因子进行了研究, 得出了生产桃叶珊瑚甙的优化条件, 为通过细胞培养大规模生产次生代谢物奠定了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

供试材料为采自广州乐昌县杜仲基地的种子。

收稿日期: 2006-05-08 修回日期: 2006-10-30

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 Municipal Funds of Science and Technology Project of Guangzhou(2004J1-C0231); Funds of International Cooperation Project of Guangdong Province(2004B50201021)]

作者简介: 王亚琴(1972-), 女, 山西忻州人, 讲师, 博士, 从事植物基因工程与生物制药方面的研究, (E-mail) yqwang@scut.edu.cn.

## 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。诱导的愈伤组织接种于含有 20 mL B5(附加 0.5 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L 6-BA 及 20 g/L 蔗糖) 固体培养基的 50 mL 三角瓶中。置于 GXZ 型智能光照培养箱中( $25 \pm 2$  °C) 培养, 10 h/d 光照、14 h/d 黑暗, 光照强度  $4\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。愈伤组织 15~20 d 继代一次, 经过半年的驯化培养得到无性细胞系。

## 1.3 细胞悬浮培养体系的建立

将生长旺盛、结构疏松、易于分散的愈伤组织转移到液体培养基中, 置于摇床中进行悬浮培养, 摇床转速为 110 r/min, 培养温度  $25 \pm 2$  °C, 全天光照, 光照强度  $4\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。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, 稍静置, 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。这样通过 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。

## 1.4 细胞生长的测定

悬浮培养细胞经尼龙网过滤, 蒸馏水洗涤 3 次, 抽滤去表面水分, 称量鲜样质量 FW(g/L),  $50$  °C 烘干后称量干样质量 DW(g/L)。细胞增长率 = (收获细胞量 - 接种细胞量) / 接种细胞量  $\times 100\%$ 。

## 1.5 悬浮细胞培养物中桃叶珊瑚甙含量的 HPLC 法测定 (杨小梅等, 2003)

将收集的杜仲干细胞置于 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 1100 LC 高效液相色谱仪, 色谱柱为 XDB-C18( $5\ \mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 250\ \text{mm}$ ), 流动相为乙腈: 水 = 3: 97, 进样量  $20\ \mu\text{L}$  流速  $1.0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 柱温  $25$  °C, 检测波长 206 nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 接种量对悬浮细胞生长的影响

在以生产次生代谢物为目的的植物细胞悬浮培养中, 要求细胞均有较高的生长速率, 获得了高生长速率的细胞系后, 再通过各种影响因子的调控来提高细胞系中次生代谢产物含量。本试验考察了 30、40、50、60、70 g/L 接种密度, 结果显示: 当接种量为

50 g/L 时, 细胞倍增量最大。

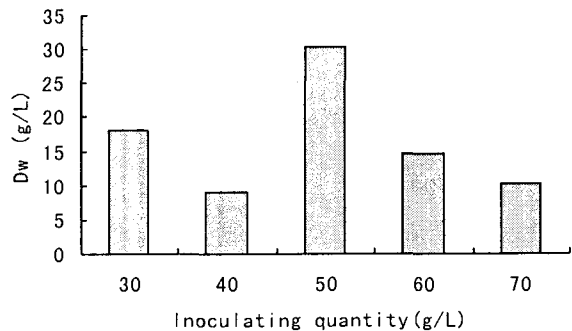


图 1 接种量对悬浮细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of different inoculating quantity on the growth of suspension cell

### 2.2 细胞生长曲线与桃叶珊瑚甙含量的变化

在培养条件相同的情况下, 分别于培养后的第 3~21 天每 3 天随机抽取 6 瓶培养物, 测定培养细胞的干重和其中桃叶珊瑚甙的含量, 结果见图 2。杜仲悬浮培养细胞生长曲线基本为 S 型, 经历了 4 个阶段: 迟滞期、对数生长期、生长平衡期和衰亡期。在培养前期, 桃叶珊瑚甙的含量随细胞增长而逐渐增加, 第 18 天时达到最大含量, 因此, 以选取生长到第 18 天时收获细胞为宜。

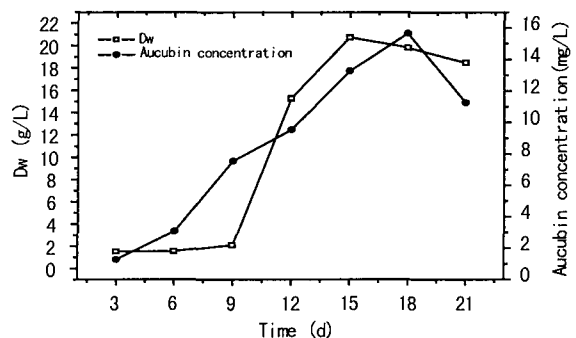


图 2 杜仲悬浮培养细胞生长曲线和桃叶珊瑚甙含量变化曲线

Fig. 2 Growth curve of suspension cell of *Eucommia ulmoides* Oliv. and aucubin content curve

### 2.3 碳源对悬浮细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响

2.3.1 不同碳源对悬浮细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响 本试验观察了蔗糖、葡萄糖、麦芽糖等不同碳源对悬浮培养细胞生长和桃叶珊瑚甙含量的影响, 选用不同的碳源浓度均为 20 g/L。由表 1 可见, 以蔗糖为碳源时, 最适于细胞的生长, 且桃叶珊瑚甙含量最大, 其它两种碳源的效果都不如蔗糖。

2.3.2 不同蔗糖浓度对悬浮细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响 本试验考察了浓度分别为 20、30、40、50、60 g/L 的蔗糖对细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响。由图 3 可知,当蔗糖浓度为 50 g/L 时,细胞生长量最大,但此时对应的桃叶珊瑚甙含量却不是最大;相反,当蔗糖浓度为 20 g/L 时,细胞生长量最小,但此时对应的桃叶珊瑚甙含量最大,由此可见,蔗糖对桃叶珊瑚甙的生成有一定的抑制作用。

表 1 碳源对悬浮细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响  
Table 1 Effect of different carbon sources on the growth of suspension cell and the content of aucubin

碳源 Carbon resource	碳源浓度 (g/L) Carbon concentration	细胞干重 (g/L) Dry weight of cell	Au 浓度 (mg/L) Au concentration
蔗糖 Sucrose	20	5.6	60.9
葡萄糖 Glucose	20	4.6	49.8
麦芽糖 Maltose	20	4.3	49.5

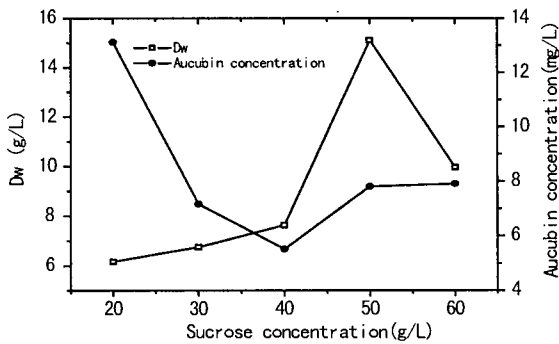


图 3 蔗糖浓度对悬浮细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响  
Fig. 3 Effect of concentration of sucrose on the growth of suspension cell and content of aucubin

2.4 培养基对悬浮细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响

本试验考察了 MS、B5、N6 等培养基对细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响。由图 4 可知,N6 培养基最适于细胞生长,MS 培养基最利于桃叶珊瑚甙的合成,而 B5 培养基的效果明显不如 N6 和 MS。由此可见,以获得高产量次生代谢物为目的的悬浮培养,应选用 MS 培养基作为基本培养基。

2.5 培养基初始 pH 对悬浮细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响

在其它条件相同情况下,考察了培养基初始 pH 的影响效应。试验结果表明,pH 对细胞生长的影响不是很大,但对产物含量影响较大,当 pH 为 5.8 时,桃叶珊瑚甙的产量最大。

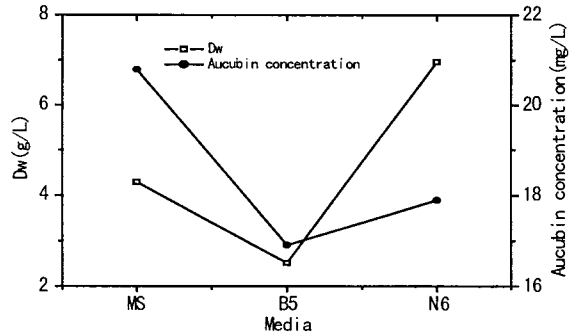


图 4 不同培养基对悬浮细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响  
Fig. 4 Effect of different medium on the growth of suspension cell and the content of aucubin

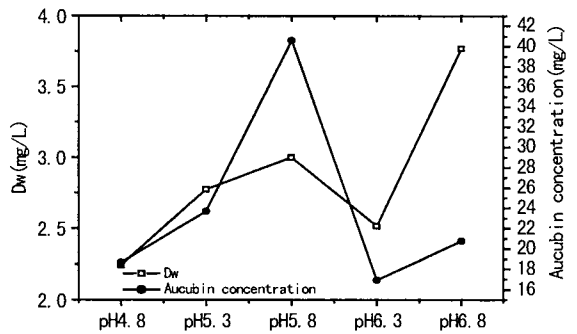


图 5 pH 对悬浮细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响  
Fig. 5 Effect of pH on the growth of suspension cell and the content of aucubin

2.6 激素对悬浮细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响

本试验考察了生长素和分裂素对细胞生长及次生代谢产物含量的影响。由表 2 可知,添加了 2,4-D、NAA 等生长素后,均能检测出桃叶珊瑚甙,随着生长素浓度升高,桃叶珊瑚甙的含量也增加,且在 2.0 mg/L 时产量最大,在此基础上继续加大生长素浓度时,桃叶珊瑚甙的含量反而减少。低浓度的细胞分裂素如 6-BA 也能促使桃叶珊瑚甙的合成,但浓度不能超过 1.0 mg/L,而 KT 无论什么浓度均不能促使桃叶珊瑚甙的合成,且抑制细胞的生长。

3 讨论

影响悬浮细胞培养物中次生代谢物含量的因素很多,如外植体种性、生育状态、培养方法、培养条件等内、外因素等。内在因素主要指物种的特性,不同材料培养的成愈效果差异很大;外界因素主要是培

养条件如培养基类型、碳源、pH、激素等, 这些均能显著影响次生代谢过程的因素均可考虑作为调控手段(于荣敏, 1999; 李春斌, 2003)。本实验以广州乐昌基地种植的杜仲为研究对象, 主要考察了培养条件对其细胞悬浮培养生产桃叶珊瑚甙的影响。实验表明, MS 培养基更有利于桃叶珊瑚甙的合成, 而 N6 培养基更利于细胞生长, 由此可见, 适合细胞生长的培养基不一定利于次生代谢物的合成。

表 2 激素对悬浮细胞生长及桃叶珊瑚甙含量的影响

Table 2 Effect of different phytohormone on the growth of suspension cell and the content of aucubin

激素 Phytohormone	激素浓度(mg/L) Phytohormone concentration	细胞干重(g/L) Dry weight of cell	Au 浓度 (mg/L) Au concentration
2,4-D	0.5	6.3	10.8
2,4-D	1.0	5.8	16.7
2,4-D	2.0	5.2	57.6
2,4-D	4.0	10.5	34.8
NAA	0.5	3.2	12.2
NAA	1.0	2.9	13.2
NAA	2.0	5.5	20.8
NAA	4.0	3.0	15.1
KT	1.5	2.0	—
KT	1.0	2.1	—
KT	2.0	2.8	—
KT	4.0	2.7	—
6-BA	0.5	2.4	28.4
6-BA	1.0	2.3	5.5
6-BA	2.0	4.3	—
6-BA	4.0	2.4	—

培养基的 pH 值作为细胞悬浮培养的重要因素对细胞生长及次生代谢物的合成起着重要作用, 是因为培养基的酸碱度对培养基中各种营养成分(如 Fe 盐中的铁离子等)的活性有直接影响, 从而影响细胞对其吸收利用。张娟芳等(2003)在研究印楝细胞悬浮培养时发现, pH 值的高低对细胞生长有一定的影响。本实验结果表明, pH 值不仅影响杜仲悬浮细胞的生长, 而且对桃叶珊瑚甙的合成影响较大, 当 pH 值为 5.8 时, 桃叶珊瑚甙的含量最大。

激素常作为诱导和调节细胞生长的重要因素而

用于次生代谢产物的研究, 但其中生长素和细胞分裂素的作用大不相同。一定浓度的激素可以明显促进细胞生长, 但也会抑制次生代谢物的产生。如 NAA 促进桔叶鸡眼藤悬浮培养物中蒽醌的产生, 而 2,4-D 则完全抑制蒽醌的合成。在本实验中, 较低浓度的 2,4-D、NAA 及低浓度的 6-BA 均能促使桃叶珊瑚甙的产生, 但浓度过高时就会产生抑制, 而 KT 则完全抑制桃叶珊瑚甙的产生。

## 参考文献:

- 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
- Li CB(李春斌), Wang GL(王关林), Yue YL(岳玉莲), et al. 2003. Research on effect of culture condition factors on synthesis of flavone glycosides in cell suspension of *Ginkgo biloba* L. (培养条件对银杏悬浮培养细胞黄酮合成影响研究)[J]. *J Dalian Univ Tech*(大连理工大学学报), 43(3):287-291
- Li CG(李长恭), Qu GR(渠桂荣). 2002. The progress in the development of anti-hepatitis virus drugs(抗乙肝病毒药物研究的进展)[J]. *Nat Product Res Develop*(天然产物研究与开发), 14(6):81-87
- Liang WY(梁文裕), Cao W(曹雯), Wang J(王俊), et al. 2003. Application of biotechnology in the research on Chinese medicinal plants(生物技术在我国药用植物研究中的应用)[J]. *J Ningxia Agric Coll*(宁夏农学院学报), 24(4):94-95
- Yang XM(杨小梅), Shang PP(尚平平), Liu JB(刘建斌), et al. 2003. Determination of aucubin in *Eucommia ulmoides* Oliv 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
- Yu RM(于荣敏), Zhao HL(赵鸿莲), Zhang H(张辉), et al. 1999. Studies on the cell suspension culture of *Ginkgo biloba* and its metabolites-ginkgolides(银杏细胞悬浮培养及其银杏内酯产生的研究)[J]. *Chin J Biotech*(生物工程学报), 15(2):207-210
- Zhang JF(张娟芳), Qi SY(戚树源), He ML(何梦玲), et al. 2003. Effects of several physiological factors on the growth of cell suspension culture of *Azadirachta indica*(几种生理因子对印楝细胞悬浮培养生长的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), 23(6):549-552