

杜仲细胞悬浮培养生产绿原酸的初步研究

王亚琴, 叶青华, 朱媛

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 广州 510640)

摘要: 对影响杜仲细胞悬浮培养及其次生代谢物绿原酸产生的几种主要因子进行了研究。结果表明, 在杜仲细胞悬浮培养生产绿原酸的过程中, 第15天绿原酸的含量达到最大值。35 g/L的蔗糖为最适碳源, MS培养基为最适悬浮培养基, pH为5.3时利于绿原酸的合成, 2,4-D、NAA对绿原酸合成的促进效果不大, 添加1.0 mg/L的6-BA绿原酸的合成效果较好。

关键词: 杜仲; 细胞悬浮培养; 绿原酸; 影响因子

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)05-0671-04

Preliminary study on the cell suspension culture of *Eucommia ulmoides* and secondary metabolite-chlorogenic acid

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

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

Abstract: Some major factors affected the cell suspension culture of *Eucommia ulmoides* and the production of chlorogenic acid were investigated. The results showed that the concentration of chlorogenic acid was the highest on 15th day, sucrose was better than glucose and maltose for cell growth and chlorogenic acid synthesis and the optimum concentration was 35 g/L. The optimal media was MS media and the proper pH value was 5.3. Some exogenous hormones such as 2,4-D and NAA had little effect on chlorogenic acid synthesis, but 1.0 mg/L 6-BA could promote the production of chlorogenic acid.

Key words: *Eucommia ulmoides*; cell suspension culture; chlorogenic acid; factors

随着生物技术的发展,应用植物细胞培养发酵生产药用物质正发展成为一门新型的产业体系。在植物细胞培养中,影响细胞生长和次生代谢物形成的因子如植物激素、气体成分、光照和培养基成分等在水母雪莲、三七、人参和红豆杉中多有研究(孔祥海, 2005;唐建军等,1998),但在药用植物杜仲中很少报道。杜仲(*Eucommia ulmoides*)是重要的中药材,其药用成分包括绿原酸、桃叶珊瑚甙、总黄酮等。其中,绿原酸(Chlorogenic acid,以下简称Cha)是一种重要的生物活性物质,具抗菌、抗病毒、增高白血球、保肝

利胆、抗肿瘤、降血压、降血脂、清除自由基和兴奋中枢神经系统等作用,它是许多中药材的有效成分之一,又是某些成药的质量指标。其应用非常广泛,主要为医药、日用化工和食品行业。绿原酸主要存在于杜仲叶、皮中,含量较低,提取量有限,并存在农药残留和重金属残留等问题,因此,目前多采用组织培养技术,在组织和细胞水平上促进绿原酸的生物合成。本文对影响杜仲细胞悬浮培养及其次生代谢物绿原酸形成的几种主要因子如碳源、培养基、pH、激素等进行研究,初步得出生产绿原酸的优化条件,为通过

收稿日期: 2006-12-24 修回日期: 2007-06-26

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

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

细胞培养大规模生产次生代谢物绿原酸奠定了基础。

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 和 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 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) 培养, 光照 10 h/d、黑暗 14 h/d, 光照强度 $72 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。愈伤组织每 15~20 d 继代 1 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 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 全天光照, 光照强度 $72 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。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 悬浮细胞生长的测定

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 悬浮细胞培养物中绿原酸含量的 HPLC 法测定

参考杨小梅等(2003)的方法。样品准备: 将收集的杜仲干细胞置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 40 mL, 密封后称量, 超声处理 60 min, 放至室温, 用 50% 甲醇补充至 40 mL, 摇匀, 过滤, 取滤液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 滤液供 HPLC 分析用。HPLC 条件: 流动相 乙腈 : 0.1% 磷酸 = 15 : 85, 流速 1.0 mL/min, 柱温 25°C , 进样体积 20 μL , 检测波长 327 nm, 色谱柱 XDB-C18 Analytical 4.6 \times 250 mm 5-Micron。

2 结果与分析

2.1 杜仲悬浮细胞生长曲线与绿原酸含量的变化

在相同的培养条件下, 分别于第 3~21 天每 3 d

随机抽取 6 瓶培养物, 测定培养细胞的干重和其中绿原酸的含量, 结果见图 1。由图 1 可知, 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、快速生长期、生长平衡期和衰亡期。在培养前期, 绿原酸的含量随细胞增长而逐渐增加, 第 15 天时达到最大含量。基于本研究目的是为了获得高产量的次生代谢物绿原酸, 因此, 宜选取生长到第 15 天时的细胞作为种子液。

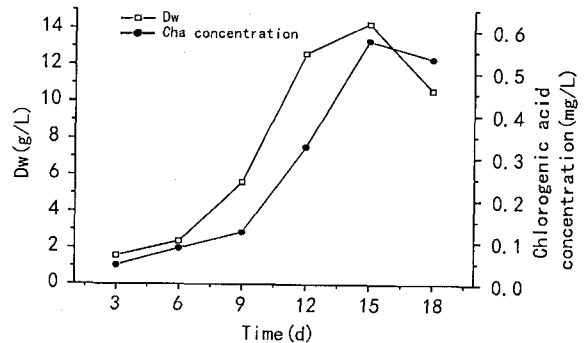


图 1 杜仲悬浮细胞生长曲线和绿原酸含量变化曲线
Fig. 1 Growth curve of suspension cell and chlorogenic acid content curve of *Eucommia ulmoides*

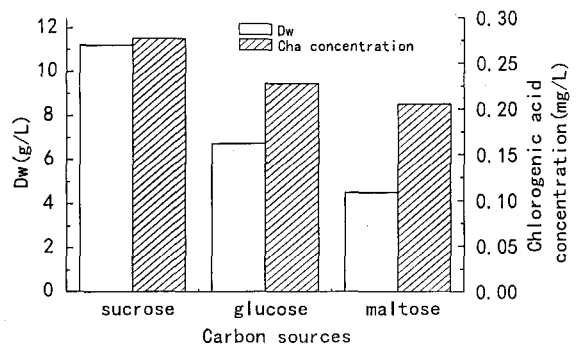


图 2 碳源对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响
Fig. 2 Effect of different carbon sources on the growth of suspension cell and content of chlorogenic acid of *Eucommia ulmoides*

2.2 碳源对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响

2.2.1 不同碳源对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响 糖类是影响植物组织培养成功与否的关键之一, 糖的种类和用量不仅影响培养物生长速度和生长量, 而且影响其代谢水平和次生代谢物的合成(韩建萍等, 2003)。本实验比较了蔗糖、葡萄糖、麦芽糖等不同碳源对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响, 其中不同碳源的浓度为 20 g/L。由图 2 可知, 无论是细胞生长还是绿原酸的积累, 蔗糖作为碳源最为合适。

2.2.2 不同蔗糖浓度对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响 一般来说,在所有的碳水化合物中,蔗糖是植物细胞培养特别是次生代谢物生产最佳的碳源和能源,植物细胞对其他糖类的利用率远低于对蔗糖的利用率。蔗糖不仅是植物细胞合成次级代谢产物碳骨架的前体化合物,而且还能影响到培养基的渗透压。当蔗糖浓度提高时,由于渗透压的作用,次生代谢产物的产率会提高。因此蔗糖浓度的选择对植物细胞次生代谢物的产生及大规模培养是非常重要的。本实验比较了 5 种蔗糖浓度下杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的情况。由图 3 可知,随着蔗糖浓度的增加,细胞生长量和绿原酸含量逐渐增加。当蔗糖浓度为 35 g/L 时,绿原酸含量最大,超过这个浓度时,绿原酸含量开始降低,但细胞生长量还在增加。这说明高浓度(>35 g/L)的蔗糖不利于绿原酸的合成,但对细胞的生长具有促进作用。

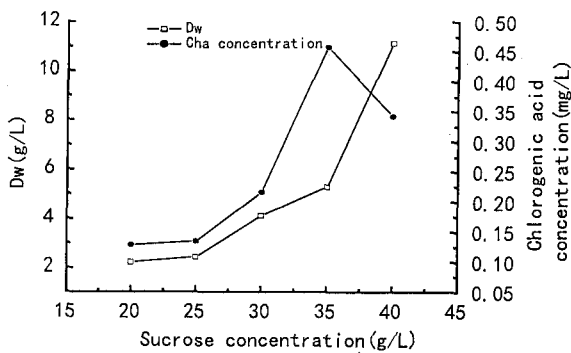


图 3 蔗糖浓度对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响

Fig. 3 Effect of sucrose concentration on the growth of suspension cell and content of chlorogenic acid of *Eucommia ulmoides*

2.3 悬浮培养基对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响

本实验比较三种悬浮培养基 MS、B5、N6 对杜仲细胞生长和绿原酸含量的影响(图 4)。由结果可知,N6 培养基适于细胞生长,MS 培养基利于绿原酸的合成,而 B5 培养基的效果明显不如 N6 和 MS。基于本研究是以获得高产量次生代谢物绿原酸为目的进行悬浮培养,所以选用 MS 培养基作为基本悬浮培养基。

2.4 培养基初始 pH 对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响

培养基的酸碱度对次生代谢物的分泌很重要。研究表明,一些次生代谢物与 H^+ 通过对运方式跨膜传递密切相关。由于细胞膜两侧的 pH 差控制对运

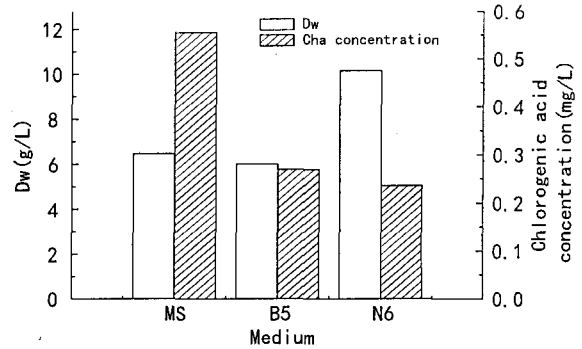


图 4 悬浮培养基对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响

Fig. 4 Effect of suspension media on the growth of suspension cell and content of chlorogenic acid of *Eucommia ulmoides*

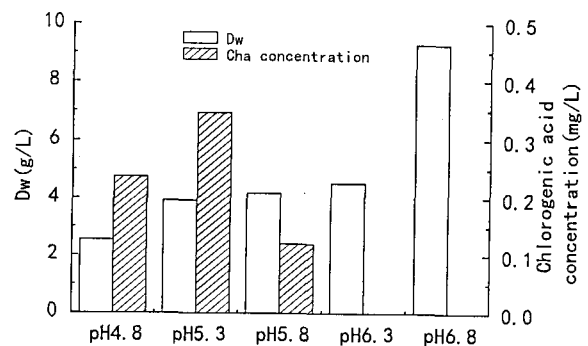


图 5 pH 对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响

Fig. 5 Effect of pH on the growth of suspension cell and content of chlorogenic acid of *Eucommia ulmoides*

的方向,因此,当培养基中 pH 值降低时,即培养基中 H^+ 浓度升高时,就会促进次生代谢物向细胞外运输,而 H^+ 向细胞内运输(韩建萍等,2003)。在上述优化条件下,本实验考察了培养基初始 pH 的影响效应(图 5)。结果表明,随着 pH 的升高,细胞生长量逐渐升高,pH6.8 时生长量最大。而当 pH 为 5.3 时,绿原酸含量最高,当 pH 超过 5.8 时,绿原酸的合成受抑制。

2.5 外源激素对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响

本实验同时比较了不同浓度的 2,4-D、NAA、6-BA 对杜仲细胞生长和绿原酸含量的影响。由表 1 可知,添加了 2,4-D、NAA、6-BA 等外源激素后均能检测出绿原酸,但随着浓度升高,绿原酸的合成受到抑制。在这三种激素中,2,4-D、NAA 浓度超过 0.5 mg/L 时,绿原酸的合成被抑制,而 6-BA 只有在浓度高于 2.0 mg/L 时才抑制绿原酸的合成,且绿原酸含量偏高。说明 2,4-D、NAA 对绿原酸合成的促进效果不大,添

加 1.0 mg/L 的 6-BA 绿原酸的合成效果较好。

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。内在因素主要指物种的特性,外界因素主要是培养条件如培养基类型、碳源、pH、激素等,这些均能显著影响细胞培养过程中次生代谢物的累积。本实验结果表明杜仲细胞生长量最大的培养基配方其绿原酸的积累量不一定最大,N6 培养基更利于细胞生长,而 MS 培养基更有利于绿原酸的合成。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累积,这与吴晓玲等(2005)、曹孟德等(2002)对黄芩、香荚兰细胞培养的研究结果一致。就杜仲细胞培养而言,应采用两步培养法,前期细胞增殖用 N6 培养基,绿原酸积累应采用 MS 培养基。

表 1 外源激素对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸含量的影响
Table 1 Effect of exogenous hormone on the growth of suspension cell and content of chlorogenic acid of *Eucommia ulmoides*

外源激素 Exogenous hormone	激素浓度 CH (mg/L)	细胞干重 DWC (g/L)	绿原酸浓度 CCA (mg/L)
2,4-D	0.5	5.8	0.24
2,4-D	1.0	10.3	0.11
2,4-D	2.0	5.8	0
2,4-D	4.0	4.9	0
NAA	0.5	5.3	0.38
NAA	1.0	9.4	0.31
NAA	2.0	5.8	0
NAA	4.0	3.7	0
6-BA	0.5	12.6	0.41
6-BA	1.0	7.0	0.57
6-BA	2.0	10.1	0.13
6-BA	4.0	2.5	0

CH-concentration of hormone; DWC-dry weight of the cell; CCA-concentration of chlorogenic acid.

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重要作用,这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,进而影响细胞对其的吸收利用。实验表明,pH 值对绿原酸的合成影响较大,当 pH 值为 5.3 时,绿原酸的含量最大。

细胞悬浮培养过程中,细胞生长曲线大多为 S 形(阮茜等,1999),各时期乃至整个生长周期的长短受到植物种类、起始细胞密度、营养成分种类与配比等多

种因素影响。吴晓玲等(2005)报道黄芩的细胞培养周期为 9 d,而红豆杉细胞培养周期从 12~18 d 不等(Fett-Neto 等,1994; Wickremesinhe & Arteca, 1994; Gibson 等,1993)。本实验结果表明,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、快速生长期、生长平衡期和衰亡期。在培养前期,绿原酸含量基本随细胞增长而逐渐增加,第 15 天时达最大含量,即培养周期为 15 d。与同是乔木的药用植物红豆杉结果相近,适合大规模培养生产次生代谢物绿原酸。

外源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,其中生长素和细胞分裂素的作用大不相同。一定浓度的外源激素可明显促进细胞生长,同时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(杨世海等,2005)。本实验比较了三种不同浓度的外源激素 2,4-D、NAA 和 6-BA 对杜仲悬浮细胞生产绿原酸的影响,结果显示 1.0 mg/L 的 6-BA 促使绿原酸合成的效果最好。

参考文献:

- Cao MD(曹孟德), Li JR(李家儒), Qin DC(秦东春), et al. 2002. Effects of absorbents and components of medium on vanillin biosynthesis in cell cultures of *Vanilla planifolia* (吸附剂及培养基组成对香荚兰细胞悬浮培养产生香兰素的影响)[J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 22(1): 65-67
- Fett-Neto A G, Zhang W Y, Dicosmo F. 1994. Kinetics of taxol production, growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus pidata* [J]. *Biotech Bioeng*, 44: 205-210
- Gibson D M, Ketchum R E B, Vance N C, et al. 1993. Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific yew) [J]. *Plant Cell Rep*, 12: 479-482
- Han JP(韩建萍), Liang ZS(梁宗锁), Wang JM(王敬民). 2003. The relationship between mineral element and the root growth and accumulation of effective ingredient in root of traditional herbs(矿物质元素与根类中草药根系生长发育及有效成分累积的关系)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 39(1): 78-81
- Kong XH(孔祥海). 2005. Research progress of cell culture for plant secondary metabolites(植物次生代谢物的细胞培养技术研究进展)[J]. *J Longyan Univ* (龙岩学院学报), 23(6): 60-63
- Ruan Q(阮茜), Guo Y(郭勇). 1999. Kinetics on growth of Roselle cells and anthocyanin formation in phosphorus-limiting cultures(磷限制培养中玫瑰茄细胞生长及花青素形成动力学)[J]. *J South China Univ Tech; Nat Sci* (华南理工大学学报·自然科学版), 27(1): 86-90
- Tang JJ(唐建军), Xiang TF(项田夫), Zhang LY(张禄源). 1998. Advances in researches of secondary metabolism, accumulation of (下转第 680 页 Continue on page 680)

- mulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves[J]. *J Exp Bot*, **53**:2 401—2 410
- Kumari GJ, Reddy AM, Naik ST, et al. 2006. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings[J]. *Bio Plant*, **50**: 219—226
- Lu CQ, Huang BL. 2004. Effects of low temperature stress on membrane lipid peroxidation and cell defense enzyme activity in leaves of *E. grandis* × *E. urophylla* seedlings[J]. *Guihaia*, **24** (1):64—68
- Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J. 1996. NaCl- induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa*) cultivars differing in salinity resistance[J]. *Ann Bot*, **78**:389—398
- Miyamoto K, Oka M, Ueda J. 1997. Update on the possible mode of action of the jasmonates, Focus on the metabolism of cell wall polysaccharides in relation to growth and development[J]. *Physiol Plant*, **100**:631—638
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiol*, **22**:867—880
- Paull RE. 1981. Temperature- induced leakage from chilling-sensitive and chilling-resistant plants[J]. *Plant Physiol*, **68**:149—153
- Sasse JM. 1997. Recent progress in brassinosteroid research[J]. *Physiol Plant*, **100**:696—701
- Simon EW. 1974. Phospholipids and plant membrane permeability [J]. *New Phytol*, **173**:377—420
- Takstuto S, Kamuro Y, Watanabe T. 1996. Synthesis and plant growth promoting effects of brassinosteroid compound TS303 [J]. *Proc Plant Growth Regul Soc Am*, **23**:15—20
- Uemura M, Steponkus PL. 1998. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze- induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves [J]. *Plant Cell Environ*, **26**:1 083—1 096
- Xu Y, Chang PFL, Liu D, et al. 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate [J]. *Plant Cell*, **6**:1 077—1 085
- Yang CW, Kao CH. 1999. Importance of ornithine-δ-aminotransferase to proline accumulation caused by water stress in detached rice leaves[J]. *Plant Growth Regul*, **27**:189—192
- Yemm EW, Willis AJ. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by the anthrone[J]. *Biochem J*, **57**:508—514
- Zhao SJ, Xu CC, Zhou Q, et al. 1994. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissue [J]. *Plant Physiol Commun*, **30**:207—210
- Zhou YP, Zheng YL, Tian CE, et al. 2002. Effects of ABA, PP333 and BR on the POD activity and REC of leaves in banana plantlets[J]. *Guihaia*, **22**(5):444—448

长效油菜素内酯 TS303 和二氢茉莉酸丙酯增强花生抗寒能力

董登峰^{1,2}, 李杨瑞^{1*}, 江立庚², 梁和², 黄京华²

(1. 广西作物遗传改良和生物技术重点实验室, 南宁 530007; 2. 广西大学农学院, 南宁 530004)

摘要: 长效油菜素内酯 TS303 和二氢茉莉酸丙酯(PDJ)浸种能增强花生对低温的忍耐能力, 二者显著降低低温诱导的丙二醛含量和电解质渗漏率。低温降低超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性以及相对含水量, 但增加过氧化物酶(POD)活性以及可溶性糖和脯氨酸含量。TS303 和 PDJ 以及它们的混合物 TNZ 都能延缓低温伤害引起的 SOD 和 CAT 活性下降, 并能通过增加可溶性糖和脯氨酸含量来提高相对含水量。TS303 在延缓 SOD 和 CAT 活性降低方面效果比 PDJ 好, 但 PDJ 在增加可溶性糖和脯氨酸含量方面效果比 TS303 强, 由于 TS303 和 PDJ 作用机理不同, 二者混合使用表现出加成或协同效应。

关键词: 油菜素内酯; 二氢茉莉酸丙酯; 花生; 低温

(上接第 674 页 Continue from page 674)

- secondary metabolites and its regulation *in vitro* (植物次生代谢、离体培养条件下次生代谢物积累及其调控研究进展)[J]. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), **17**(4):1—6
- Wickremesinhe E R M, Arteca R N. 1994. Taxus cell suspension cultures: optimizing growth and production of taxol[J]. *Plant Physiol*, **144**:183—188
- Wu XL(吴晓玲), Deng GC(邓光存), Jiang XH(姜晓慧). 2005. Growth characteristics and productivity of secondary metabolites in *Scutellaria baicalensis* cell(黄芩细胞生长特性及次生代谢产物生产性能的研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **25**(3):557—561
- Yang SH(杨世海), Liu XF(刘晓峰), Guo DA(果德安), et al. 2005. Effects of different carbon sources on biomass accumulation and anthraquinone yield of hairy root cultures of *Rheum palmatum* (不同碳源对掌叶大黄毛状根生物量和蒽醌产量的影响)[J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), **36**(7):1 075—1 078
- 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苷的含量)[J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), **34**(10):7—9