

差异值得深入研究,连翘叶和花的药用价值也需要进一步验证。

本实验采用 PDA 检测器对最佳检测波长进行选择,经 HPLC-PDA 在 200~400 nm 下进行全波长扫描,在 235 nm 处出峰最多且整体信号明显,故选择 235 nm 为检测波长。

本实验比较了不同提取溶剂(甲醇、75%甲醇、50%甲醇、30%甲醇)的水浴回流和超声提取的提取效果,同时还考察了不同提取时间的提取效果。结果表明,以 75%甲醇为提取溶剂,当超声提取 45 min 时,各色谱峰响应值不再增加,且方法稳定,重现性好。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 张海燕.连翘化学成分及药理活性的研究进展[J].中药材,2000,23(10):657-658.
- [3] 肖培根.新编中药志[M].第2卷.北京:化学工业出版社,2002.
- [4] 兰泽伦,李敏,李校堃,等.温莪术 HPLC 指纹图谱研究[J].中草药,2008,39(6):920-922.
- [5] 马致法,董江江,李振宁,等.不同款冬花药材中槲皮素和山柰素的定量分析及 HPLC 指纹图谱研究[J].中草药,2009,40(8):1305-1308.
- [6] 黎阳,刘素香,张铁军,等.枳实的高效液相色谱指纹图谱研究[J].中草药,2009,40(9):1469-1474.
- [7] 李英霞,孟庆梅.连翘的本草考证[J].中药材,2002,25(6):435-437.
- [8] 李书渊,施玉旋,罗婷.青翘与青翘种子及老翘中连翘苷的含量测定[J].时珍国医国药,2006,17(9):1720.

高产绿原酸杜仲细胞悬浮培养体系优化研究

颜日明^{1,2},张志斌¹,邱晓芳¹,曾庆桂¹,游海¹,朱笃^{1,2*}

(1. 江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室,江西 南昌 330022;

2. 江西省天然药物活性成分研究重点实验室,江西 宜春 336000)

摘要:目的 优化杜仲细胞悬浮培养及其产绿原酸的条件。方法 研究基本培养基种类、激素质量浓度、碳源种类及质量浓度、pH 值、接种量和摇床转速等因素对杜仲细胞生长和绿原酸产量的影响,建立了高产绿原酸的悬浮细胞培养体系。结果 B5 培养基+0.5 mg/L NAA+0.6 mg/L 6-BA、蔗糖 30 g/L、初始 pH 5.0~5.5、接种量 20 g·FW/L 以及摇床转速 110 r/min 为杜仲细胞悬浮培养的适合条件。结论 优化后的培养条件为杜仲细胞大规模悬浮培养生产天然活性成分奠定了基础。

关键词:杜仲;细胞悬浮培养;绿原酸

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)02-0301-04

杜仲 *Eucommia ulmoides* Olive 为杜仲科杜仲属多年生落叶乔木,其干燥树皮为我国特有名贵中药,具有补肾健腰、强筋壮骨、提高机体缺氧耐力、改善提高机体免疫功能、降低血脂、平衡调节血压等功效。其药用成分包括木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类和黄酮类等。其中属于苯丙素类物质的绿原酸具有广泛的抗菌、抗病毒、抗诱变、抗肿瘤作用^[1]。绿原酸具有较强药理活性,对消化系统、血液循环系统和生殖系统均有作用^[2],还可能作为抗 HIV 的先导化合物,具有抗逆转录酶的活性^[3]。但是杜仲作为第三纪孑遗的古老树种,其野生资源正在日益稀竭,同时杜仲栽培周期长,商品药材的有效药用成分量极低,产量质量都不稳定。运用细胞工程生产有用次生代谢物质是目前全世界生物技术研究三大潮流

之一,因此采用生物技术提高其活性成分的量势在必行。目前,有关杜仲的组织培养、快繁及培养条件对愈伤组织次生代谢产物合成影响的研究国内外已有较多研究,但有关杜仲细胞悬浮培养研究仅有少量报道^[4,5]。本实验通过对杜仲细胞悬浮培养及其产绿原酸条件优化,为通过杜仲细胞大规模生产次级代谢产物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料:杜仲种子 2005 年 11 月采于庐山,由南昌大学生命科学学院黄兆祥教授鉴定。

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,诱导的培养基为含 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L NAA (萘乙酸) + 1.0 mg/L 6-BA (6-苄氨基嘌呤)的 MS 培养基^[6]。置于

* 收稿日期:2009-04-08

基金项目:教育部重点科技项目资助(地方 204078)

作者简介:颜日明(1979—),男,在读博士研究生,研究方向为发酵工程。E-mail:yanriming@yahoo.com.cn

*通讯作者 朱笃 Tel:(0795)3200616 E-mail:zhudu12@163.com

PQX 多段人工气候箱中进行继代培养,温度为 25℃,光照和黑暗均为 12 h/d,光照 1 000 lx,愈伤组织 8~10 d 继代一次,经过半年的驯化培养得到无性细胞系^[5,6]。

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 110 r/min,培养温度 25℃,全天光照,光照强度为 1 000 lx,培养 1 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,不需滤过,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 细胞生长测定:悬浮培养细胞经 400 目不锈钢筛网滤过,蒸馏水洗涤 3 次,称得细胞鲜质量,50℃烘干至恒重即得干质量,计算细胞生长率[细胞增长率=(收获细胞量-接种细胞量)/接种细胞量×100%]。

1.5 绿原酸的提取及测定:见文献报道^[7]。

2 结果与分析

2.1 培养条件优化

2.1.1 基本培养基及激素浓度筛选:由于液体环境下,植物细胞的生长状态与固体培养中并不相同,因此在悬浮细胞系建立后,对液体基本培养基和激素进行 L₉(3⁴) 正交设计优化。正交试验数据和结果分析分别见表 1、2。

表 1 正交试验结果

Table 1 Result of orthogonal test

试验号	因 素			生物量/ (g·L ⁻¹ 干质量)	绿原酸/ (mg·L ⁻¹)
	基本培养基类型	萘乙酸/(mg·L ⁻¹)	6-苄氨基嘌呤/(mg·L ⁻¹)		
1	MS	0.5	0.3	3.31±0.14	14.44±0.52
2	MS	1.0	0.6	2.95±0.16	12.81±0.46
3	MS	1.5	1.0	3.19±0.24	13.58±0.42
4	B5	0.5	0.6	5.95±0.12	25.90±0.74
5	B5	1.0	1.0	5.90±0.07	26.04±0.82
6	B5	1.5	0.3	4.63±0.10	19.67±0.40
7	N6	0.5	1.0	3.18±0.18	14.28±0.44
8	N6	1.0	0.3	2.27±0.10	9.69±0.52
9	N6	1.5	0.6	3.20±0.18	14.30±0.62
K ₁	3.15 (13.61)*	4.15 (18.21)*	3.40 (14.60)*		
K ₂	5.49 (23.87)*	3.71 (16.18)*	4.03 (17.67)*		
K ₃	2.88 (12.76)*	3.67 (15.85)*	4.09 (17.97)*		
R	2.61 (11.11)*	0.48 (2.36)*	0.69 (3.37)*		

*生物量(g/L)和绿原酸产量(mg/L)(括号内)

*biomass (g/L) and chlorogenic acid (mg/L) (in parenthesis)

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

因 素	离差平方和	平均方差	F 值	显著性
培养基类型	12.37 (229.50)*	6.19 (114.75)*	26.89 (20.33)*	显著(显著)**
萘乙酸	0.42 (9.77)*	0.21 (4.89)*	0.91 (0.87)*	不显著(不显著)**
6-苄氨基嘌呤显著性	0.88 (2.85)*	0.44 (10.42)*	1.90 (1.85)*	不显著(不显著)**

*生物量(g/L)和绿原酸产量(mg/L)(括号内); **因子对生物量和绿原酸产量(括号内)的显著性(α=0.05)

*biomass (g/L) and chlorogenic acid (mg/L) (in parenthesis)

**significant degree of biomass and chlorogenic acid (in parenthesis) at α=0.05

结果表明,培养基的种类对细胞生物量的增长和绿原酸的合成起很大的作用。B5 培养基更有利于杜仲细胞的生长和绿原酸的合成,同时通过对细胞活力和褐化情况的观察和测定,发现虽然杜仲细胞在 B5 培养基中有一定程度的褐化现象,但是收获时细胞的活力仍然较高,说明细胞仍然有很大的增长潜力;在 MS、N6 培养基中的悬浮细胞虽然褐化程度很轻,但细胞增长缓慢,绿原酸合成量也相对

偏低,同时收获时细胞活力也较低。说明 B5 是杜仲悬浮培养的一种比较优良的培养基。结果还表明激素对细胞生物量的增长和绿原酸的合成影响均不太明显,且 0.6%、1.0% 的 6-BA 对于杜仲的生长和绿原酸合成几乎没有区别。通过综合分析,确定最终的杜仲悬浮培养基为 B5+0.5 mg/L NAA+0.6 mg/L 6-BA。

2.1.2 碳源种类筛选及浓度优化:碳源是细胞生长

的能量来源和构成细胞骨架的重要成分,不同的碳源物质对于植物细胞的生长和此代谢产物的合成都有影响^[8]。本试验观察了葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖等不同碳源对悬浮培养细胞生长和绿原酸合成的影响,选用不同碳源质量浓度均为 30 g/L。由图 1 可见,以果糖为碳源时,最适于细胞的生长,但以蔗糖为碳源时,不仅有利于细胞的生长,同时绿原酸产量最高,且蔗糖的来源相比果糖要丰富,因此选择蔗糖作为碳源。

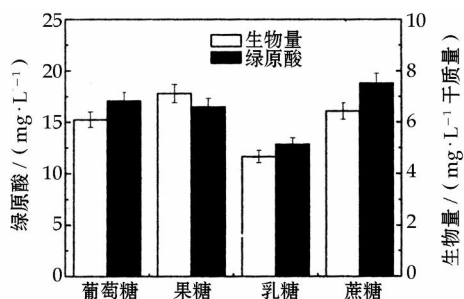


图 1 不同碳源对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸合成的影响

Fig 1 Effects of different carbon sources on growth of suspension cell and chlorogenic acid synthesis in suspension cultures of *E. ulmoides*

进一步研究发现,用蔗糖作碳源时,杜仲悬浮细胞的生长和绿原酸的合成都受到蔗糖质量浓度的调节。图 2 显示了不同蔗糖质量浓度对杜仲悬浮培养细胞生长和绿原酸合成的影响。当蔗糖质量浓度较低时,由于碳源供应不足,使得杜仲细胞的生长和绿原酸的合成均受到限制。蔗糖 30 g/L 时,细胞生长量和绿原酸产量均比较高。同时可以看到,高质量浓度的蔗糖由于高渗透压而对杜仲细胞的生长和产绿原酸都有抑制作用。因此也表明蔗糖作为碳源也能通过调节培养体系的渗透压而对植物细胞的生长和产物合成起到一定的作用。

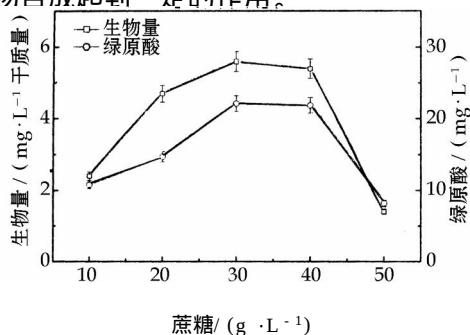


图 2 蔗糖质量浓度对杜仲悬浮生长和绿原酸合成的影响

Fig 2 Effects of sucrose concentration on cell growth and chlorogenic acid synthesis in suspension cultures of *E. ulmoides*

2. 1. 3 培养 pH 值对杜仲细胞生长和绿原酸合成的影响:环境 pH 值对植物细胞 pH 值会产生诸多影响,包括引起质膜通透性变化,影响植物细胞对激素的吸收以及植物细胞的代谢情况等等^[9]。本实验通过测定高温灭菌后不同 pH 值条件下杜仲悬浮细胞干质量的增长量影响的研究发现,杜仲细胞 pH 值在 5.0~5.5 时生长和绿原酸合成最好,其干质量最高达到 6.68 g/L,绿原酸产量也达到 26.4 mg/L (图 3),当 pH 值超过 6 时,杜仲细胞的生长明显受到抑制。由此可见培养基的 pH 值对杜仲悬浮细胞的生长影响很大,酸性环境更有利于其生长。

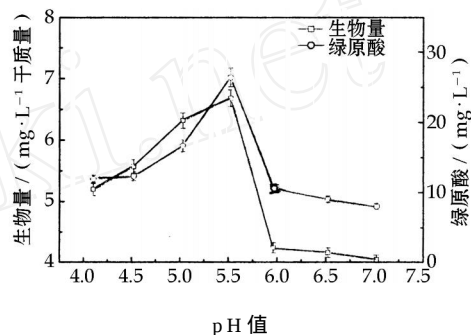


图 3 pH 值对杜仲悬浮生长和绿原酸合成的影响

Fig 3 Effects of pH on cell growth and chlorogenic acid synthesis in suspension cultures of *E. ulmoides*

2. 1. 4 接种量对杜仲细胞生长和绿原酸合成的影响:在对接种量的考察中,发现接种量较小的时候,悬浮细胞活力低,生长缓慢。而接种量过大时,虽然生长迅速但很快出现褐化现象,使悬浮细胞生长后期有大量细胞死亡,不利于进行继代培养。从图 4 可以看出在接种量为鲜质量 20 g/L (干质量 1.6 g/L) 时,悬浮细胞的生物量和绿原酸合成量最大,且细胞活力更好,更有利于进一步继代培养,因此选定鲜质量 20 g/L 接种量为悬浮细胞培养体系建立的最适接种量。

2. 1. 5 摇床转速对杜仲悬浮培养细胞生长和绿原酸合成的影响:摇床转速对杜仲悬浮培养细胞生长和绿原酸合成影响很大,从图 5 可知,摇床转速为 70 r/min 时,杜仲细胞生长速度较慢,生长量为 3.37 g/L,绿原酸合成量也只有 12.17 mg/L;当摇床转速为 110 r/min 时,两者分别达到 5.43 g/L 和 19.98 mg/L;当摇床转速提到 130 r/min 时,细胞生长和产物合成较差。这可能是由于摇床转速高时,剪切力较高,引起细胞破碎死亡,从而抑制了细胞的生长和产物的合成。

2. 1. 6 优化条件下杜仲悬浮培养细胞生长和绿原酸积累过程:将杜仲悬浮细胞在上述各种优化条件下

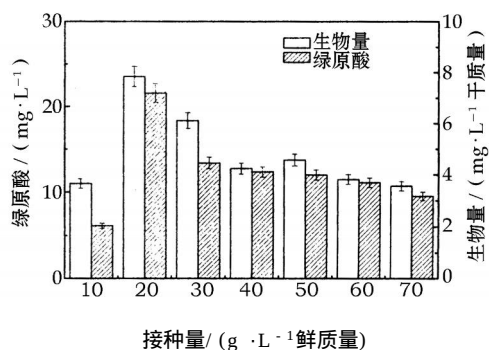


图 4 接种量对杜仲悬浮生长和绿原酸合成的影响

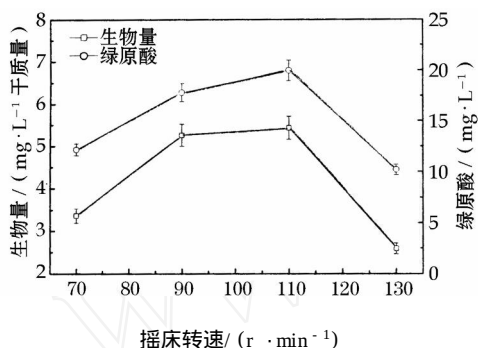
Fig 4 Effects of inoculums sizes on cell growth and chlorogenic acid synthesis in suspension cultures of *E. ulmoides*

图 5 摇床转速对杜仲悬浮培养细胞生长和绿原酸合成的影响

Fig 5 Effects of rotation speed on cell growth and chlorogenic acid synthesis in suspension cultures of *E. ulmoides*

进行培养,并考察它的生长和绿原酸积累情况。结果发现杜仲细胞接入新鲜培养液后,细胞在经过一个短暂的延滞后开始快速生长,总体呈现“S”型曲线。同时还可以看到,培养物中绿原酸质量浓度随着细胞的生长而不断积累,第 8 天达最大值 27.16 mg/L,量也达到最高的 0.404 2%。随后细胞生长进入稳定期,但此时绿原酸的质量浓度也迅速降低。在细胞生长前 8 d 内,绿原酸(Y)与细胞量(X)呈正相关性, $Y = 0.0048X - 0.0046$, $R^2 = 0.98$ 。

3 结论

培养条件对植物细胞培养物的生长量增长和次级代谢物积累的影响是错综复杂的,往往一个因素的调整会影响其他因素的变化。同时,植物体是各

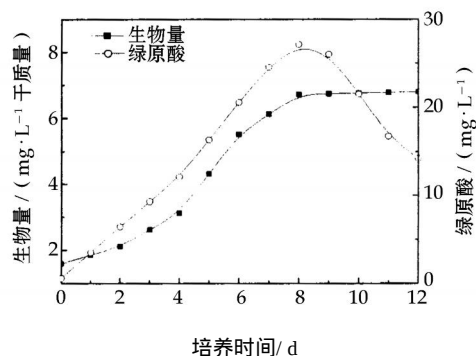


图 6 杜仲悬浮培养细胞生长和绿原酸积累

Fig 6 Cell growth and chlorogenic acid accumulation in suspension cultures of *E. ulmoides*

不相同而具有其本身特殊性的。因此,对一种植物细胞或一种次级代谢物合适的条件,不一定对其他细胞或次级代谢作用也适合。本实验在悬浮系初步建立后,通过正交设计对培养基组成和激素配比进行了优化,并在此基础上考察了碳源种类与浓度、培养基 pH 值、接种量和培养转速等因素对杜仲悬浮细胞生长和绿原酸产量的影响,建立了适宜杜仲细胞生长和产物合成的培养条件。这为利用杜仲悬浮细胞培养大规模生产天然活性物质提供重要的物质基础。

参考文献:

- [1] 叶文峰. 杜仲叶中化学成分、药理活性及应用研究进展[J]. 林产化工通讯, 2004, 38(5): 40-44.
- [2] 吴卫华, 康 桢, 欧阳冬生, 等. 绿原酸的药理学研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 691-694.
- [3] 孙燕荣, 董俊兴, 吴曙光. 中药杜仲抗 HIV 作用的实验研究[J]. 解放军预防医学杂志, 2004, 22(2): 101-103.
- [4] Wang J L, Liao X, Zhang H M, et al. Accumulation of chlorogenic acid in cell suspension cultures of *Eucommia ulmoides* [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2003, 74(2): 193-195.
- [5] 邱晓芳, 朱 芑, 张志斌, 等. 杜仲疏松愈伤组织诱导条件的优化筛选[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 375-378.
- [6] 邱晓芳, 朱 芑, 张志斌, 等. 杜仲愈伤组织继代培养及抑制褐化的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 307-309.
- [7] 张志斌, 邱晓芳, 颜日明, 等. 高效液相色谱法测定杜仲愈伤组织和悬浮细胞中绿原酸[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2082-2083.
- [8] 丁世萍, 严菊强, 季道藩. 糖类在植物组织培养中的效应[J]. 植物学通报, 1998, 15(6): 42-46.
- [9] 杨玉敏, 元英进, 胡宗定. 植物细胞胞内产物释放行为研究[J]. 生物工程进展, 1998, 18(1): 17-21.