

白花曼陀罗悬浮培养细胞生长和生物碱活性成分合成

龚加顺, 杨兆祥*

(昆明制药集团股份有限公司药物研究所, 云南 昆明 650100)

摘要:目的 研究白花曼陀罗细胞悬浮培养合成生物碱。方法 在 MS 液体培养基上悬浮培养细胞生产生物碱, 以碳源、pH 值、接种量等为影响因子进行研究。结果 蔗糖为最佳碳源, 细胞接种量以鲜重 1.5~2.0 g/L、培养液初始 pH 值 5.5~6.0 对曼陀罗悬浮培养细胞生长和生物碱合成最有利, 加入苯丙氨酸能促进生物碱的合成。

结论

白花曼陀罗细胞悬浮培养能有效地合成生物碱。

关键词: 白花曼陀罗; 悬浮培养; 细胞生长; 生物碱合成

中图分类号: R282.13

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)08-0936-04

Cell growth and alkaloid synthesis in suspension cultures of *Datura metel*

GONG Jia-shun, YANG Zhao-xiang

(Institute of Materia Medica, Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming 650100, China)

Abstract : Object To investigate the synthesis of alkaloids by cell suspension cultures of *Datura metel* L.

Methods Cultured cells derived from leaves of *D. metel* were maintained in Murashige and Skoog (MS) liquid medium. The effects of different carbohydrates, different inoculum sizes, and different pH values of medium as affecting factors on cell growth and alkaloid formation were studied. **Results** The optimum carbohydrate was sucrose, inoculum size (1.5 - 2.0 g/L) for fresh weight and initial pH values (5.5 - 6.0) of the medium were benefit for cell growth and alkaloid synthesis in the suspension cultures. The synthesis of alkaloids was improved when exogenous phenylalanine added to the culture. **Conclusion** Suspension-cultured cells of *D. metel* can be used to synthesize alkaloids.

Key words : *Datura metel* L. ; suspension culture ; cell growth ; alkaloid synthesis

目前,仿天然生物碱成为了研究热点。所谓仿天然生物碱就是指利用植物组织培养方法所获得的生物碱,把从含生物碱植物的根、茎、叶或花、种子等器官上取下的组织——细胞群乃至单个细胞,接种在特殊控制的培养基中,在人工条件下进行离体培养,以此代替原植物体在短时间内生产优质高含量的生物碱。许多发达国家正在进行这项工作,如芬兰对钝叶天仙子转化根培养,可于 14 d 内提高莨菪碱质量分数为干重的 0.79%^[1];英国 NOVALA 植物制药公司利用细胞悬浮培养连续发酵生产医药中间体,其中绝大多数为生物碱,如咖斯它诺精胺;美国的麦角碱、德国萝芙木生物碱、日本小檗碱和喜树碱均已投放市场。

白花曼陀罗 *Datura metel* L. 又名洋金花(风茄花),系茄科植物。含黄酮、生物碱、多糖等多种有效成分,具有刺激中枢神经系统,改善微循环的作用,可在眼科疾病、皮肤病、气管炎、慢性支气管炎、

哮喘、中毒性休克、风湿痹痛等中应用^[2]。洋金花生物总碱具有抗衰老功能,能提高机体内源性 SOD 活力和抑制脂质过氧化;临床用于麻醉、银屑病、血栓闭塞性脉管炎眩晕等的治疗^[3]。本实验主要对白花曼陀罗细胞组织悬浮培养合成生物碱进行了初步探讨,研究了接种量、pH、糖质量浓度等对悬浮培养细胞生长和生物碱合成的影响,为进一步规模化培养合成生物碱奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料:采用由白花曼陀罗叶诱导的愈伤组织白色细胞系。

1.2 培养方法:采用 MS 液体培养基(Murashige 和 Skoog, 1962)^[4],并添加 2,4-D 2.5 mg/L,蔗糖 30 g/L, pH 5.8, 25 °C,摇床转速为 90~110 r/min, 250 mL 摇瓶中培养基装量为 50 mL。

* 收稿日期:2003-12-08

基金项目:昆明制药集团博士后基金项目

作者简介:龚加顺(1971-),云南富源人,副教授,博士,研究方向为生物技术(细胞工程和食品生物技术)。

1.3 细胞生长测定:液体培养物经滤纸滤过,放置烘箱中置于 60°C 烘干至恒重得干重,取3次重复的平均值。

1.4 培养液中糖质量浓度的测定:用蒽酮比色法测定总糖的质量浓度^[5],用 Roe 比色法测定蔗糖的质量浓度^[6]。

1.5 培养液中生物总碱的分析:参照 Roberts 等人测定颠茄总碱的方法^[7],并加以改进。取培养液 20 mL,加入 0.5 mol/L 硫酸 5 mL,再加入 30 mL 乙醚,搅拌后放置 5 min 倾出乙醚层,另加入 30 mL 乙醚重复 4 次,以除去脂溶性物质。培养液中剩余乙醚可放置于通风处除去。之后,向培养液中加入 10% 氨水 30 mL,搅拌后放置 30 min,再加入苯 10 mL 在沸水浴中加热 10 min。将样品全部转移到分液漏斗,加入苯 50 mL,萃取 60~90 min。反复用 50 mL 的苯萃取 4 次,并不断分离苯层将之在沸水浴中蒸干除去。将蒸出的生物碱残渣溶解在 5 mL 乙醇中,精确加入 1 mL 0.02 mol/L 硫酸和 5 mL 蒸馏水中,加入 5 滴甲基红指示剂,再用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液回滴剩余的酸,同时做空白试验。每毫升 0.01 mol/L 碱相当于 2.894 mg 生物碱。

2 结果与讨论

2.1 白花曼陀罗悬浮培养细胞生长、生物碱合成、pH 及糖利用曲线:由图 1 可知,在液体培养过程中,细胞生长开始比较缓慢,有明显的延迟期,当初始糖质量浓度为 30 g/L 时,从 10~15 d,细胞出现快速生长,为指数生长期,其细胞干重增长量最大,为 2.33 g/L;15 d 以后,细胞生长逐渐缓慢,细胞干重增长量为 0.4 g/L。在培养初期,总糖消耗缓慢,培养 10 d 后总糖含量急剧下降。这与细胞的快速生长密切相关。在 20 d 以后,由于糖分大量消耗,逐渐限制了细胞的生长,细胞生物量的增长趋于平缓。因此,要提高悬浮培养细胞生长量,须增加碳源的供给。另从图 2 可看出,生物碱的合成与细胞生长的变化是一致的,即随着培养时间的延长,细胞生物量不断增长,生物碱的合成也是增加的。培养初期,培养液中的生物碱增长缓慢,到了培养末期(15 d 后),出现了大量增长,25 d 时生物碱总量为 0.289 4 g/L。

另从图 3 中可以看出,在培养过程中,培养液的 pH 值处于下降趋势,但下降幅度不大,培养 25 d 时为 4.98。即使在细胞生长速度最快的时候,pH 值的变化也不大,说明细胞组织在液体培养基中具有一定的自动调节能力。

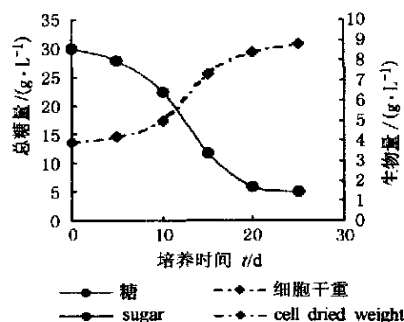


图1 白花曼陀罗细胞悬浮培养过程中总糖与细胞生物量的变化

Fig. 1 Time-courses of total sugar utilization and cell biomass in suspension culture of *D. metel*

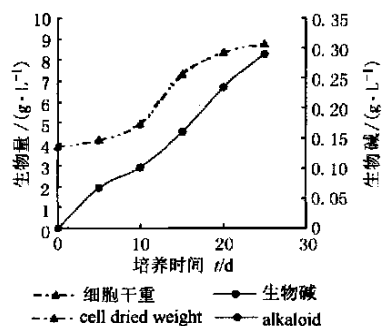


图2 白花曼陀罗细胞生长与生物碱的合成曲线

Fig. 2 Time-courses of cell growth and alkaloid synthesis in suspension culture of *D. metel*

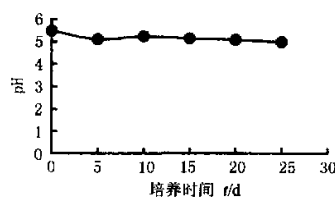


图3 pH值随培养时间的变化

Fig. 3 Time-courses of pH value

2.2 培养液 pH 值对白花曼陀罗悬浮培养细胞生长和生物碱合成的影响:pH 值作为悬浮培养细胞的重要因素对细胞生长起重要作用。图 4 显示了培养液 pH 值对白花曼陀罗悬浮培养细胞生长和生物碱合成的影响。当 pH 值为 5.5~6 时,细胞生长量和生物碱合成量最大。而 pH 值高于或低于这个值时,细胞生长速度均下降,生物碱合成也表现出类似的变化。

2.3 接种量对白花曼陀罗悬浮培养细胞生长和生物碱合成的影响:由图 5,6 可知,白花曼陀罗悬浮培养的适接种质量浓度为干重 1.5~2 g/L。低于 1.5 g/L 时,细胞生长缓慢,生物碱合成量也较少;高于 2 g/L 时,虽然细胞生长量较大,但生物碱合成量却减少。

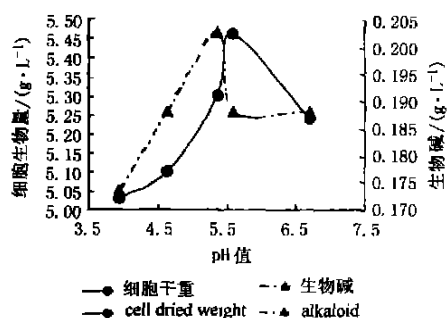


图 4 pH 值对细胞生长与生物碱合成的影响

Fig. 4 Effects of pH value on cell growth and alkaloid synthesis

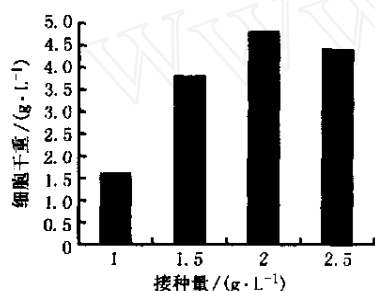


图 5 接种量对细胞生长的影响

Fig. 5 Effect of inoculums on cell growth

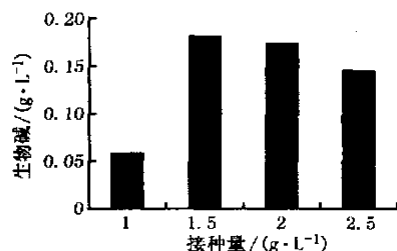


图 6 接种量对生物碱合成的影响

Fig. 6 Effect of inoculums on alkaloid synthesis

2.4 不同蔗糖质量浓度对白花曼陀罗悬浮培养细胞生长和生物碱合成的影响:碳源是细胞生长的能量来源和构成细胞骨架的重要成分,植物细胞培养一般采用蔗糖、果糖、葡萄糖为碳源。图 7、8 显示了蔗糖不同质量浓度对白花曼陀罗悬浮培养细胞生长和生物碱合成的影响。在蔗糖不同质量浓度下,细胞生物量变化不大,但生物碱合成差异较大。当蔗糖质量浓度为 40 g/L 时,生物碱合成量最大为 274.93 mg/L。较高的初始蔗糖质量浓度对细胞生长和生物碱合成没有明显的抑制作用,说明白花曼陀罗细胞能够耐受较高质量浓度的糖。

2.5 不同碳源对白花曼陀罗悬浮培养细胞生长和生物碱合成的影响:图 9、10 为不同碳源对白花曼陀罗悬浮培养细胞生长和生物碱合成的影响。由图可

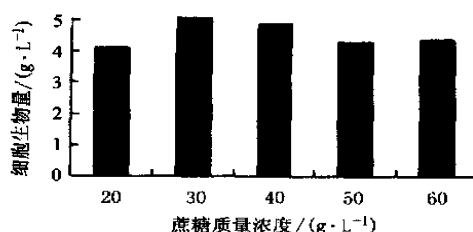


图 7 蔗糖不同质量浓度对细胞生长的影响

Fig. 7 Effect of different concentrations of sucrose on cell growth

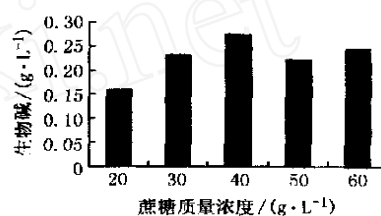


图 8 蔗糖不同质量浓度对生物碱合成的影响

Fig. 8 Effect of different concentrations of sucrose on alkaloid synthesis

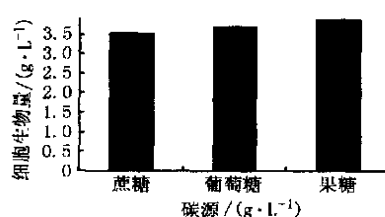


图 9 不同碳源对细胞生长的影响

Fig. 9 Effect of different carbohydrates on cell growth

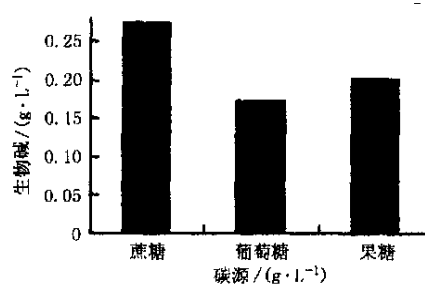


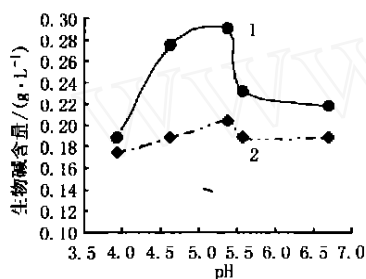
图 10 不同碳源对生物碱合成的影响

Fig. 10 Effect of different carbohydrates on alkaloid synthesis

见,3 种碳源对细胞生长的影响不大,但对于生物碱的合成却有显著的影响。以蔗糖 (30 g/L) 作为碳源,生物碱的合成量最大为 274.93 mg/L。因此,选用蔗糖作为白花曼陀罗悬浮培养的碳源对生物碱的合成最为有利。

2.6 苯丙氨酸对白花曼陀罗细胞生长及生物碱合成的影响:在培养基中加入合成生物碱的前体物质,会增加生物碱的生成量。如烟草愈伤组织培养中,

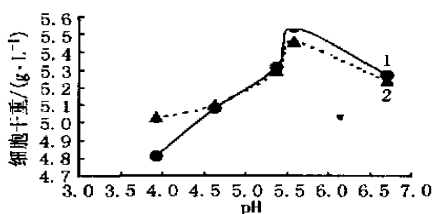
将前体物质烟碱酸加入,会增加烟碱的生成量^[8]。因此,在曼陀罗细胞悬浮培养过程的第 10 天添加了少量的苯丙氨酸,添加量为培养液的 0.015 %。实验发现,添加少量苯丙氨酸后,对细胞生长影响不大。与对照相比,两者的 pH 值和细胞干重基本相同。但生物碱的合成却有较大提高,与对照相比最大增幅为 46.2 %,最小也有 8.35 % (图 11、12)。若苯丙氨酸添加量达到培养液的 0.2 % 时,对细胞生长有明显的抑制作用,而生物碱则出现了大幅度的提高,与对照相比普遍提高了 95 % 以上 (图 13、14)。



1-添加苯丙氨酸 2-未添加苯丙氨酸
1-with phenylalanine 2-without phenylalanine

图 11 不同 pH 值条件下添加苯丙氨酸对生物碱合成的影响

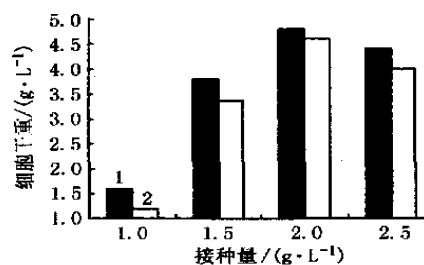
Fig. 11 Effect of phenylalanine on alkaloid synthesis with different pH values



1-添加苯丙氨酸 2-未添加苯丙氨酸
1-with phenylalanine 2-without phenylalanine

图 12 不同 pH 值条件下添加苯丙氨酸对细胞生长的影响

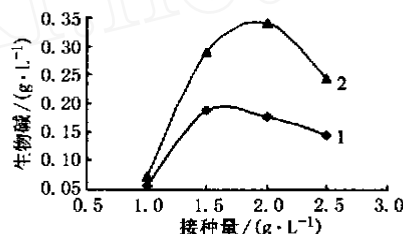
Fig. 12 Effect of phenylalanine on cell growth with different pH values



1-添加苯丙氨酸 2-未添加苯丙氨酸
1-with phenylalanine 2-without phenylalanine

图 13 添加苯丙氨酸对细胞生长的影响

Fig. 13 Effect of phenylalanine on cell growth



1-添加苯丙氨酸 2-未添加苯丙氨酸
1-with phenylalanine 2-without phenylalanine

图 14 添加苯丙氨酸对生物碱合成的影响

Fig. 14 Effect of phenylalanine on alkaloid synthesis

References:

- [1] Wu S J, Zhao T, Qin Y Q. *Components Chemistry of Modern Chinese Herbal Medicine* (现代中草药成分化学) [M]. Beijing: China Medicor-Pharmaceutical Sciences and Technology Publishing House, 2002.
- [2] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2000.
- [3] Ji Y B, Zhang C. *Pharmacology and Application of Anti-senescence Components in Chinese Traditional Medicine* (中药抗衰老有效成分药理与应用) [M]. Harbin: Heilongjiang Scientific and Technical Publishers, 2001.
- [4] Xue Y L. *Experimental Manual of Plant Physiology* (植物生理学试验手册) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1985.
- [5] Zhou W Y. *Principle and Technology of Plant Cell Engineering* (植物细胞工程原理与技术) [M]. Beijing: Chinese Agricultural University Publishers, 2001.
- [6] Li R L. *Experiment of Biochemistry* (生物化学试验) [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 1998.
- [7] Xu G Y, Xie Y Y. A study on the alkaloids of *Hyoscyamus pusillus* [J]. *Arid Aone Research*, 1994, 11(3): 44-46.
- [8] Chen Z G. *Horticultural Plant in vitro Culture* (园艺植物离体培养学) [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2001.

青藏高原红景天提取物

兰州汇元生物技术研究所

联系人:李义富 电话:(0931) 7357097 手机:13109366988