

此培养基上原球茎继代培养5代以上,能保持较高的增殖率,且原球茎不易分化。本研究结果与文献报道^[5]的结果有所不同,文献报道添加土豆提取物时原球茎增殖量最大,但原球茎易分化成小苗。

铁皮石斛原球茎固体培养的线性生长期为第9~13周,随后进入减速生长期。研究结果表明在原球茎生长的初期加入真菌诱导子,对原球茎的生长有一定抑制作用。在原球茎线性生长的后期加入真菌诱导子,能提高原球茎的鲜质量和干质量,说明诱导子对原球茎的生长有促进作用,并能影响原球茎的物质代谢过程,促进其干物质的积累。这些结果与已有的研究报道^[7]结果相符合。

上述研究结果显示,2种真菌对原球茎的作用有一定差别:原球茎与MF23诱导子作用时间延长,鲜质量和干质量有降低的趋势;原球茎与MF24诱导子作用时间延后,鲜质量和干质量有增加的趋势。

但它们的这种不同作用之间没有显著性差异。推测MF24对原球茎的作用较温和。对于菌根真菌对铁皮石斛原球茎的作用,还有待于从生理、生化及次生代谢产物等方面进行深入研究。

参考文献:

- [1] 李铭宗. 铁皮石斛的生物学特性和人工栽培[J]. 福建热作科技, 1999, 24(1): 29-31.
- [2] 邵华, 张玲琪, 李俊梅, 等. 铁皮石斛研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(1): 109-112.
- [3] 张铭, 朱峰, 魏小勇, 等. 铁皮石斛种胚萌发和原球茎质量控制[J]. 浙江大学学报(理学版), 2000, 27(1): 92-94.
- [4] 高建平, 金若敏, 吴耀平, 等. 铁皮石斛原球茎与原药材免疫调节作用的比较研究[J]. 中药材, 2002, 25(7): 487-489.
- [5] 张治国, 刘骅, 王黎, 等. 铁皮石斛原球茎增殖培养条件研究[J]. 中草药, 1992, 23(8): 431-433.
- [6] 张勤, 张启能. 生物统计学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [7] 刘长军, 侯嵩生. 真菌诱导子对新疆紫草悬浮培养细胞的生长和紫草素合成的影响[J]. 植物生理学报, 1998, 24(1): 6-10.

肉苁蓉细胞悬浮培养体系的建立

欧阳杰¹, 武彦文², 王晓东³, 赵兵³, 王玉春^{3*}

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院 食品科学与工程系, 北京 100083; 2. 清华大学 化学系 生命有机磷化学教育部重点实验室, 北京 100084; 3. 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 目的 研究由肉苁蓉愈伤组织建立细胞悬浮培养体系的培养条件。方法 在固体培养基上添加不同比例的生长激素, 考察生长激素、细胞种龄和接种量对细胞生长和次生代谢产物苯乙醇糖苷(PeG)量的影响。结果 在添加1 mg/L 2, 4-D的B5固体培养基上形成的愈伤组织松散易碎, 适于进行悬浮培养。细胞种龄为25 d和接种量为3%~4%时细胞悬浮培养的结果最好, PeG产量达到最大, 为0.82 g/L。细胞在悬浮培养时聚集体由大变, 直径小于0.5 mm的细胞聚集体由接种时的5%逐渐增加至第20天时的81%, 其PeG量为10.1%。结论 通过摇瓶培养建立了较好的细胞悬浮培养体系。

关键词: 肉苁蓉; 悬浮培养; 苯乙醇糖苷(PeG)

中图分类号: R 282.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)03-0426-04

Establishment of *Cistanche deserticola* cell lines in suspension culture

OU YANG Jie¹, WU Yan-wen², WANG Xiao-dong³, ZHAO Bing³, WANG Yu-chun³

(1. Department of Food Science and Engineering, College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Key Laboratory of Bioorganic Phosphorous Chemistry & Chemical Biology (Ministry of Education), Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: **Objective** To investigate the culture conditions for the establishment of suspension cell lines from *Cistanche deserticola* callus. **Methods** Adding different kinds and ratios of plant growth regulator to solid B5 medium, the effects of cell age, inoculation size, and plant growth regulator on the cell growth and the second metabolite accumulation, phenylethanoid glycosides (PeG) were studied. **Results**

* 收稿日期: 2007-05-10

作者简介: 欧阳杰(1971—), 男, 湖南省安仁县人, 博士, 副教授, 主要从事生化工程方面的研究, 已在国内外发表论文30余篇。
Tel: (010) 62336700 Fax: (010) 62338221 E-mail: ouyangjy@sohu.com

Callus formed on solidified B5 medium supplemented with 1 mg/L 2, 4-D was spongy and suitable for suspension culture. The production of PeG reached the highest of 0.82 g/L when cell suspended culture with the cell age of 25 d and inoculation size of 3% - 4%. In suspension culture, the ratio of cell aggregation smaller than 0.5 mm changed from 5% at the start to 81% at the day 20. Its PeG content reached 10.1%. **Conclusion** Optimal cell suspension lines are established after flask culture.

Key words: *Cistanche deserticola* Y. C. Ma; suspension culture; phenylethanoid glycosides (PeG)

肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 是一种生长于盐碱地和戈壁滩的名贵中药材, 具有滋肾壮阳、清除自由基以及增强免疫力等功效, 其主要的药用成分是苯乙醇糖苷 (phenylethanoid glycosides, PeG), 包括松果菊苷 (echinacoside)、洋丁香苷 (acteoside)、2'-乙酰洋丁香苷 (2'-acetylacteoside) 和肉苁蓉苷A (cistanoside A) 等^[1]。肉苁蓉寄生在梭梭等植物的根上, 由于乱采滥挖, 造成资源短缺, 植被破坏严重, 加速了土地沙化。通过植物细胞培养来生产次级代谢产物, 可以很好地解决资源短缺的问题, 并且可以进行工业化大生产。

笔者已对从肉苁蓉种子诱导出愈伤组织的条件和愈伤组织培养条件的优化进行了研究^[2, 3]。本实验对肉苁蓉愈伤组织转入液体培养基建立细胞的悬浮培养体系进行研究, 为进一步的生物反应器培养奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料: 将从外植体诱导得到的肉苁蓉愈伤组织, 在液体培养基中进行悬浮培养, 得到分散的肉苁蓉细胞及聚集体。

1.2 肉苁蓉细胞培养方法: 肉苁蓉细胞悬浮培养采用B5培养基, 添加20 g/L的蔗糖。将细胞按1%的接种量接种在装有40 mL B5液体培养基的100 mL三角瓶中进行培养(添加1 mg/L 2, 4-D)。培养温度为(25±1)℃, 光照强度1 600 lx, 光照时间16 h/d, 继代时间为20 d。

1.3 细胞种龄和接种量对细胞生长及PeG累积的影响: 将固体培养基上种龄分别为5、10、15、20、25、30 d的愈伤组织转入液体培养基, 培养20 d, 测生物量和PeG产量; 将固体培养基上的愈伤组织分别按0.5%、1%、2%、3%、4%、5%转入液体培养基, 测生长曲线和PeG产量。

1.4 测定方法

1.4.1 干质量测定方法: 取培养20 d的肉苁蓉细胞培养液, 用滤纸滤过, 将细胞置于烘箱中, 60℃烘约24 h至恒重, 称得其干质量即为生物量。

1.4.2 苯乙醇糖苷类化合物的量测定: PeG在332

nm处有强吸收峰, 由此可绘制标准曲线, 标准曲线方程为: $A_{332\text{ nm}} = 0.0085 + 0.01228C$ (C为PeG的质量浓度, $\mu\text{g/mL}$)。将肉苁蓉提取液浓缩至膏状, 加适量水混悬, 经醋酸乙酯脱脂后, 用正丁醇萃取。浓缩萃取液, 稠膏再用水混悬, 通过大孔吸附树脂。先后用水和甲醇洗脱, 收集甲醇部分, 然后稀释适当倍数, 测定其在332 nm下的A值, 即可计算出肉苁蓉中PeG的量^[4]。

$\text{PeG产量}(\text{g/L}) = \text{PeG量}(\%) \times \text{生物量}(\text{g/L})$

1.4.3 不同大小的细胞聚集体的收集方法: 准备网眼分别为0.5、1、1.5 mm大小的筛网各1个。先将细胞悬浮液用1.5 mm的筛网滤过, 用无菌水冲洗一遍, 收集筛网上的细胞聚集体, 即为> 1.5 mm的细胞聚集体。同样操作可以分别得到1.0~1.5 mm、0.5~1.0 mm和< 0.5 mm的细胞聚集体。

2 结果和讨论

2.1 肉苁蓉悬浮培养细胞系的建立: 要建立肉苁蓉细胞的悬浮培养体系, 需将固体培养基上的愈伤组织转移到液体培养基, 使聚集成块的愈伤组织分散为单个细胞或细胞聚集体。在添加0.5 mg/L 6-BA和10 mg/L GA₃的B5固体培养基上形成的愈伤组织和在添加1 mg/L 2, 4-D的B5固体培养基上形成的愈伤组织的形态和物理性质不同^[3]。前者形成的愈伤组织为灰黄色, 紧密结实, 硬度较大; 而后者形成的愈伤组织为浅黄色, 半透明, 松软易碎。松散的愈伤组织是进行悬浮培养最适合的材料, 稍经机械振荡, 即可使组织分散成单细胞或由几个细胞组成的小细胞团, 在培养中细胞迅速增殖; 而坚实愈伤组织中的细胞间被果胶质紧紧地粘着, 因而往往不能形成良好的悬浮系统。因此在添加1 mg/L 2, 4-D的B5固体培养基上生长的愈伤组织适合进行进一步的悬浮培养, 其生物量、PeG的量和PeG产量分别为9.4 g/L、14.1%、1.4 g/L。

2.2 细胞种龄对细胞生长和PeG累积的影响: 处于不同生长时期的细胞, 其生理状况不同, 细胞内的代谢活动情况有较大的差别。因此将固体培养基上的愈伤组织转入液体培养基时, 细胞种龄对悬浮培

养的结果有较大的影响。由图1可知,接种的细胞种龄在15 d以下时,悬浮培养后细胞的干质量和PeG的量较低;而种龄在15 d以上时,种龄对细胞生长和PeG的合成影响差别不大。种龄为25 d时悬浮培养的结果最好,当接种量为1%时,培养20 d后细胞生物量达到6.2 g/L, PeG 的量为10.2%, PeG 产量为0.63 g/L。种龄10 d以上的愈伤组织正处于生长曲线的对数生长期,在此阶段,细胞生长迅速,代谢活跃。将此阶段的愈伤组织转接到液体培养基时,可以缩短悬浮细胞生长的延滞期,细胞很快进入对数生长期。固体培养基上生长的愈伤组织如果种龄过短,则种子量少,实验效率低下,而且操作性不强,不利于培养时的转接。而种龄为25 d时,愈伤组织的生物量大,PeG 的量也较高,因此选用种龄为25 d的愈伤组织进行实验较为适宜。

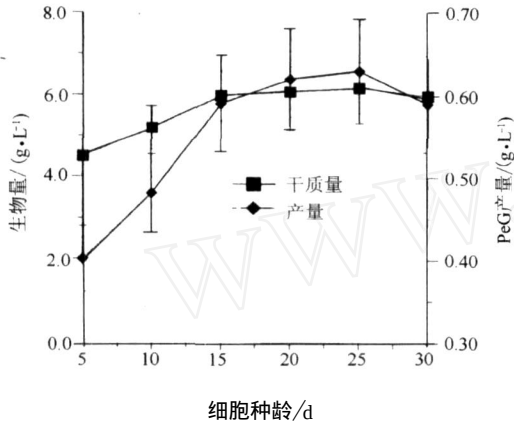


图1 肉苁蓉细胞种龄对细胞生长和PeG累积的影响
Fig. 1 Effect of inoculation age on cell growth of *C. deserticola* and PeG accumulation in suspension culture

2.3 接种量对肉苁蓉细胞生长和PeG累积的影响:不同接种量时肉苁蓉细胞的生长曲线见图2。随着接种量的加大,细胞的生长周期缩短。接种量为0.5%时,对数生长末期是第28天;接种量为1%时,对数生长末期是第20天;接种量为2%~3%时,对数生长末期是第16天;而接种量为4%~5%时,对数生长末期是第12天。随着接种量的增加,对数生长末期时细胞的生物量也随之增加。接种量为5%,培养到第12天时细胞的生物量最大,生物量达12.5 g/L,但此时细胞的生长倍数只有3.2倍。接种量为1%时,细胞培养20 d后的增长倍数最大,达到8.1倍,细胞的生物量为6.2 g/L。

接种量对肉苁蓉细胞悬浮培养时PeG合成的影响见表1。摇瓶培养时靠空气和培养液表面的接触传氧,其传氧效率较低。随着接种量的增加,单位

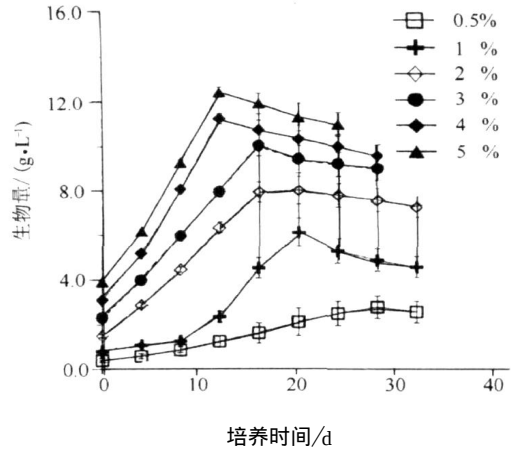


图2 不同接种量时肉苁蓉细胞的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of *C. deserticola* cells in suspension cultures under different inoculation sizes

表1 悬浮培养时接种量对肉苁蓉细胞生长和PeG合成的影响

Table 1 Effect of inoculation size on cell growth of *C. deserticola* and PeG biosynthesis in suspension culture

接种量 /%	培养时间 /d	生物量 /(g·L ⁻¹)	生长 倍数	PeG/%	PeG 产量 /(g·L ⁻¹)
0.5	28	3.8±0.4	7.6	11.3±1.0	0.43±0.09
1	20	6.2±0.6	8.1	10.2±0.9	0.63±0.11
2	20	8.1±0.7	5.3	9.8±1.0	0.80±0.15
3	16	10.1±1.0	4.4	8.0±0.8	0.82±0.16
4	16	11.3±1.0	3.7	7.2±0.7	0.82±0.15
5	12	12.5±1.2	3.2	6.1±0.6	0.77±0.15

质量细胞的传氧减少,营养物质的传递效率也逐渐减弱,因此肉苁蓉细胞的生长速率和PeG 的量逐渐下降。接种量低于4%时,随着接种量的增加,生物量也增加,PeG 产量明显提高。当接种量为3%~4%时,PeG 产量达到最大,为0.82 g/L。接种量继续增加到5%时,PeG 产量又有所下降。

2.4 悬浮培养时细胞聚集体大小随时间变化的分布:将在添加1 mg/L 2,4-D 的B5 固体培养基上生长的愈伤组织转接到相同的液体培养基中,放于摇床上进行培养(转速110 r/min)。随着培养时间的延长,愈伤组织越来越分散,细胞聚集体由大变小。由图3 可见,直径小于0.5 mm 的细胞聚集体从接种时的5% 逐渐增加到第20 天时的81%,而1.5 mm 以上的细胞聚集体则由接种时的80% 逐渐降至第20 天时的10%。培养第20 天时,介于0.5~1.0 mm 的细胞聚集体的比例为7.3%,1.0~1.5 mm 的细胞聚集体占1.6%。由图4 可见,肉苁蓉细胞之间的细胞间质较少,细胞极易脱离分散,细胞聚集体较

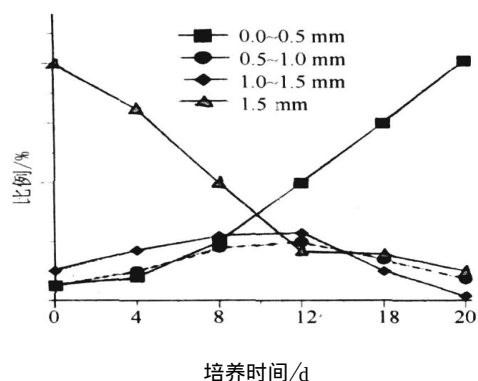


图3 液体悬浮培养时肉苁蓉细胞聚集体大小随时间变化的分布

Fig. 3 Distribution of cell aggregation size with changes of culture time in cell suspension culture of *C. deserticola*

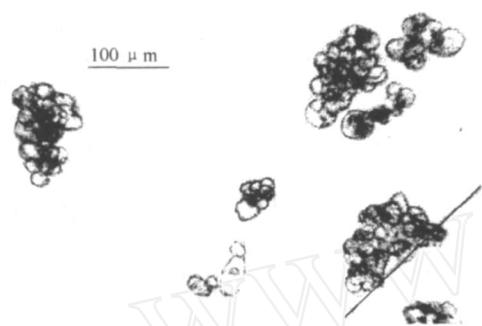


图4 肉苁蓉细胞聚集体的显微照相图

Fig. 4 Microscope photos of *C. deserticola* cell aggregation

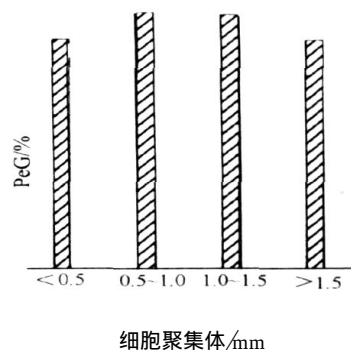


图5 肉苁蓉细胞聚集体大小和PeG量的关系 (细胞培养时间为20 d)

Fig. 5 Relationship between cell aggregation size of *C. deserticola* and PeG content

物细胞的生长有一定的限制作用。愈伤组织由固体培养基转至液体培养时,愈伤组织逐渐分散成单个细胞或多个细胞的聚集体。在悬浮培养过程中,随着细胞的生长和增殖,细胞的聚集度又慢慢提高,细胞聚集体不断增大^[6],聚集体的大小与液体悬浮过程中产生的剪切力有关,并与次级代谢产物的量之间也存在着一定关系。

在肉苁蓉细胞悬浮培养的过程中,当细胞种龄为25 d和接种量为3%~4%时结果最好,PeG的产量达到最大,为0.82 g/L。细胞在悬浮培养时聚集体由大变小,直径小于0.5 mm的细胞聚集体由接种时的5%逐渐增加至第20天的81%,介于0.5~1.0 mm的细胞聚集体由5%变为7.3%。大小介于0.5~1.0 mm的细胞聚集体PeG的量最高,达到11.3%。通过摇瓶培养建立了较好的肉苁蓉细胞培养体系,培养条件为温度25℃,光照强度1600 lx,光照时间16 h/d,为下一步的放大培养打下了基础。

参考文献:

- [1] Kobayashi H, Karasawa H, Miyase T. Studies on the constituents of *Cistachis herba* III. Isolation and structure of new phenylpropanoid glycosides, cistanosides A and B [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32: 3009-3014.
- [2] 欧阳杰, 王晓东, 陈书安, 等. 肉苁蓉种子愈伤组织诱导条件的研究 [J]. *中国药学杂志*, 2002, 37(7): 491-493.
- [3] Ouyang J, Wang X D, Zhao B, et al. Formation of phenylethanoid glycosides by *Cistanche deserticola* callus grown on solid media [J]. *Biochemical Engineering Letters*, 2003, 25(3): 223-225.
- [4] 堵年生, 刘峻岭. 大孔吸附树脂-紫外分光光度法测定肉苁蓉苯乙醇糖甙类的含量 [J]. *天然产物研究与开发*, 1993, 5(3): 30-22.
- [5] 邢建民. 水母雪莲细胞悬浮培养生产黄酮类化合物动力学与过程调控 [C]. 北京: 中国科学院过程工程研究所, 1998.
- [6] Webb C, Mavituna F. *Process Possibilities for Plant and Animal Cell Cultures* [M]. Chichester: Ellis Horwood, 1987.

小,不容易形成大的细胞聚集体。

2.5 细胞聚集体大小和PeG量的关系:愈伤组织转入液体培养基后,随着培养时间的延长,逐渐形成大小不同的细胞聚集体。从图5可见,不同大小的肉苁蓉细胞聚集体之间PeG的量差别较小。介于0.5~1.0 mm的细胞聚集体PeG的量最高,为11.3%,是介于0~0.5 mm的细胞聚集体PeG的量(10.1%)的112%。大于1.5 mm的细胞聚集体PeG的量又稍有下降,为10.1%。不同的植物种类,其细胞聚集体大小和次级代谢产物量之间的关系差别很大。在水母雪莲*Saussurea medusa* Maxim.红色系悬浮培养物中,细胞聚集体大小在1.0~5.0 mm时,黄酮的量最高;而细胞聚集体小于1.0 mm或大于5.0 mm时,黄酮的量下降^[5]。

3 结论

和固体培养相比,液体悬浮培养有良好的混合、流动性能及更高的传质效率,但溶氧有限,可能对植