

秦艽细胞悬浮培养研究(II)

齐香君, 陈如意, 王 薇

(陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西 西安 710021)

摘 要:目的 研究碳源、氮源和金属离子对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响。方法 测定不同浓度蔗糖和葡萄糖、不同 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比及 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 影响因素下细胞干质量和龙胆苦苷量。结果 有利于秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的培养条件为: 3% 蔗糖, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 20/40, 3 mmol/L Ca^{2+} , 0.007 49 mmol/L Zn^{2+} 。结论 不同碳源及其浓度对细胞生长及龙胆苦苷积累都有显著影响, 高糖不利于龙胆苦苷的合成。 NO_3^- 对细胞生长来说, 是一种比 NH_4^+ 更好的氮源。 Ca^{2+} 对细胞生长和龙胆苦苷的量都有显著影响, Zn^{2+} 对细胞生长影响不明显, 对龙胆苦苷量影响显著。

关键词: 秦艽; 龙胆苦苷; 悬浮培养; 影响因素

中图分类号: R282.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)04-0636-03

Cell suspension culture of *Gentiana macrophylla* (II)

QI Xiang-jun, CHEN Ru-yi, WANG Wei

(College of Life Science, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of carbohydrate and its concentration, nitrogen source, and metal ions on suspension cell growth of *Gentiana macrophylla* and gentiopicroside accumulation. **Methods** The cell dry weight and gentiopicroside content were measured under factors of different carbohydrate, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, Ca^{2+} , and Zn^{2+} at various concentration. **Results** The optimum culture conditions are as follows: 3% sucrose, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ of 20/40, 3 mmol/L Ca^{2+} , 0.007 49 mmol/L Zn^{2+} . **Conclusion** Different carbohydrates and their concentration have significant effects on cell growth and gentiopicroside accumulation while high concentration of carbohydrates does not have such effect. NO_3^- is better than NH_4^+ for the cell growth. Ca^{2+} Remarkably influences both cell growth and gentiopicroside accumulation while Zn^{2+} contributes only to gentiopicroside content.

Key words: *Gentiana macrophylla* Pall.; gentiopicroside; suspension culture; influential factor

秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall. 主要有效成分龙胆苦苷具有良好的保肝、健胃、利胆、抗炎、抗菌等作用^[1~3]。近年对龙胆苦苷的分析已有报道^[4,5], 目前已被开发为滴丸及胶丸等新药上市。但野生秦艽由于过度采挖临近濒危状态, 栽培品种也因产量有限, 远不能满足市场所需^[6]。植物细胞工程是实现中药资源可持续发展及药用成分工业化生产的有效手段。目前秦艽细胞及组织培养研究主要集中在快繁技术^[7]、愈伤组织及毛状根诱导^[8], 关于秦艽细胞的悬浮培养研究还未有报道。本实验在悬浮培养体系建立基础上, 通过秦艽细胞悬浮培养影响因素研究, 优化培养条件, 为秦艽细胞悬浮培养工业化生产龙胆苦苷奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料: 秦艽细胞系以秦艽叶片诱导的愈伤组织为原料, 通过小细胞团法筛选而得到的细胞系。龙胆苦苷对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号: 110770-200510。

1.2 培养方法: 将愈伤组织定量转接到附加 2, 4-D 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 的 MS 液体培养基 (MS₀) 中, 于 25 ℃, 110 r/min 条件下摇床暗培养, 12 d 后筛选生长迅速、较均一的小细胞团定量 (4 g/100 mL 湿质量) 接种至装有 50 mL 新鲜液体培养基的 100 mL 三角瓶中, 110 r/min, 25 ℃ 暗培养 28 d。

1.3 悬浮细胞生长的测定: 培养液于 3 850 r/min 转速下离心 30 min, 收集沉淀的细胞, 于 100 ℃ 灭酶 30 min 后 60 ℃ 干燥至恒重, 冷却后称质量, 以每升培养液中细胞干质量为细胞生长的依据, 取 3

①收稿日期: 2009-07-20

基金项目: 西安市科技局项目 (YF07118)

作者简介: 齐香君 (1957—), 女, 河南博爱人, 陕西科技大学生命科学与工程学院院长、教授, 长期从事生物制药、发酵代谢调控方向的教学、科研工作。Tel: (029) 86168590 13991368065 Fax: (029) 86168293 E-mail: qixj@sust.edu.cn

次重复的平均值。

1.4 龙胆苦苷定量的测定:精密称取研细的干细胞 1.000 g, 70% 乙醇回流提取 60 min, 滤过, 放冷, 定容至 25 mL, 摇匀, 即得秦艽细胞粗提物, 以 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用 HPLC 法测定, 采用 SY-4000K (德国 KNAUER) 高效液相色谱仪, 色谱柱: 化学键合型十八烷基柱 (SciC₁₈); 流动相: 甲醇-水 (20: 80); 检测波长: 270 nm; 柱温: 室温; 体积流量: 1 mL/min。龙胆苦苷产量以细胞干质量与龙胆苦苷量的乘积计算, 取 3 次重复的平均值, 单位为 mg/L。龙胆苦苷对照品和秦艽悬浮细胞提取液色谱图, 见图 1。

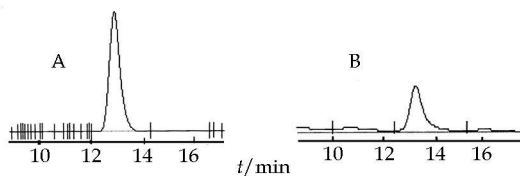


图 1 龙胆苦苷对照品 (A) 和秦艽悬浮细胞提取液 (B) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of gentiopicroside reference substance (A) and extracts of suspension cells (B) of *G. macrophylla*

2 结果

2.1 不同碳源及其质量浓度对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响: 本试验考察了 2%、3%、4%、5% 的蔗糖和葡萄糖两种碳源对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响, 结果见图 2。蔗糖为碳源时细胞生长量都明显高于葡萄糖, 且蔗糖质量浓度为 4% 时细胞生物量 (10.97 g/L) 最大。对于龙胆苦苷量, 2% 的蔗糖和葡萄糖相当, 其余质量浓度都以蔗糖为碳源时龙胆苦苷量高, 当蔗糖为 3% 时量达到最高, 为 0.492 mg/g。以龙胆苦苷产量为指标, 3% 的蔗糖是本试验体系的最佳蔗糖质量浓度。两种碳源下, 高糖都对细胞生长有利, 但抑制龙胆苦苷合成。可能一方面高的糖质量浓度能供给细胞足够的能量, 促进细胞的生长, 但另一方面高糖引起高渗透压, 影响细胞对培养液中其他营养成分的吸收, 高渗环境还能引起细胞中含水量的降低, 从而影响某些代谢功能的正常作用。蔗糖与葡萄糖对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的显著差异可能还与细胞利用糖的方式有关, 此结果提示有必要深入探索糖对龙胆苦苷代谢的影响。

2.2 不同 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比对秦艽悬浮细胞生长的影响: 植物细胞中的含氮化合物都直接或间接来源

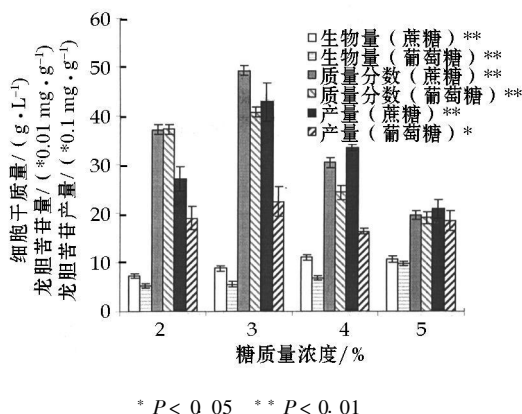


图 2 不同碳源及浓度对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响

Fig. 2 Effects of different carbohydrates and their concentration on cell growth and gentiopicroside accumulation in suspension cell of *G. macrophylla*

于培养基中的氮源, 且由于植物细胞对铵态氮和硝态氮的耐受性和吸收机制不同, 它们对植物细胞影响是不同的。本试验在保持培养基中总氮源为 60 mmol/L 不变的情况下, 调整铵态氮 (NH_4^+)、硝态氮 (NO_3^-) 比例分别为 60/0、30/30、20/40、15/45、0/60 后, 研究了其对细胞生长的影响, 结果见图 3。不同的 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 对细胞的生长影响是极显著的 ($P < 0.01$)。硝态氮 (NO_3^-) 对秦艽悬浮细胞生长来说, 是一种远比铵态氮 (NH_4^+) 要好的氮源。当 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 20/40、15/45、0/60 时, 秦艽细胞的生长量显著高于其他比例的, 其中以 20/40 时生物量最高为 10.65 g/L。秦艽悬浮细胞在高 NH_4^+ 浓度的培养基中生长缓慢, 而在高 NO_3^- 浓度下均生长较好。在侯学文^[9] 玫瑰茄的悬浮培养中也有类似现象。植物吸收的硝酸盐必须同化为氨态氮后才能被利用, 而植物吸收的氨态氮 (或由硝酸盐还原产生的氨态氮) 必须迅速同化为有机物。因高浓度的氨态氮能使光合磷酸化或氧化碳酸化解偶联, 并能抑制光合作用中水的光解, 对植物是有害的^[10, 11]。本试验中 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 60/0、20/40、0/60 比较, 可知在秦艽悬浮细胞中, 硝态氮的同化过程可能对氨态氮的同化有一定的协调作用, 能促进其转化为有机物或是一定程度地解除了其毒害作用, 而使细胞生长较好。

2.3 金属离子对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响

2.3.1 钙离子的影响: 本试验在保持 MS₀ 培养基中其他成分不变时, 分别调节钙离子浓度为 0、1.5、3、6、9 mmol/L, 研究其对细胞生长及龙胆苦苷积累

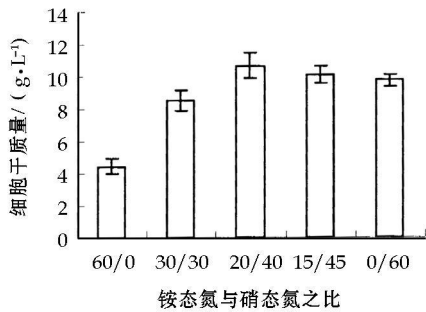


图 3 不同 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比对秦艽细胞生长的影响

Fig. 3 Effects of different ratios of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ on cell growth of *G. macrophylla*

的影响, 结果见表 1。 Ca^{2+} 浓度对秦艽细胞的生长和龙胆苦苷量都具有非常显著 ($P < 0.01$) 影响, 当 Ca^{2+} 浓度为 6 mmol/L 时, 细胞生长量最大, 但是龙胆苦苷的量却在 Ca^{2+} 浓度为 3 mmol/L (与 MS 培养基同浓度) 时最高。从龙胆苦苷的产量来看, 3 mmol/L 是最适合的 Ca^{2+} 浓度, 在其处理下龙胆苦苷产量为 4.264 mg/L , 是不加 Ca^{2+} 时的 1.6 倍, 此结果显示 Ca^{2+} 对龙胆苦苷的积累有积极的作用, 但过高的 Ca^{2+} 浓度对龙胆苦苷的生产不利。

表 1 钙离子对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响 ($n=3$)

Table 1 Effects of Ca^{2+} on cell growth and gentiopicroside accumulation in suspension cell of *G. macrophylla* ($n=3$)

Ca^{2+} 浓度/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞干质量/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	龙胆苦苷量/ ($\times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	龙胆苦苷产量/ ($\times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
0	7.26 ± 0.16	36.71 ± 1.06	26.66 ± 1.11
1.5	7.98 ± 0.25	35.41 ± 1.04	28.25 ± 0.92
3	8.67 ± 0.48	49.20 ± 0.91	42.64 ± 1.82
6	9.65 ± 0.36	40.82 ± 0.97	39.38 ± 0.53
9	5.39 ± 0.28	47.80 ± 0.96	25.76 ± 1.63

2.3.2 锌离子的影响: 分别将秦艽细胞接种到锌离子浓度为 0、7.49、15.0、22.5、30.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS0 液体培养基中, 28 d 后收获, 其结果见表 2。

由表中数据单因素方差分析可知, Zn^{2+} 浓度对细胞生长影响不明显, 对龙胆苦苷量影响较显著 ($P < 0.01$)。细胞中龙胆苦苷量在 Zn^{2+} 浓度为 $7.49 \mu\text{mol/L}$ 时达到最高, 为 0.249 mg/g , 此后随 Zn^{2+} 浓度升高, 龙胆苦苷量逐渐下降, 这可能与锌离子参与细胞某些代谢活动有关, 其对龙胆苦苷积累的调节机制还需进一步研究。从龙胆苦苷产量来看, Zn^{2+} 浓度为 $7.49 \mu\text{mol/L}$ 时最大, 为 2.905 mg/L 。

表 2 锌离子对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响 ($n=3$)

Table 2 Effects of Zn^{2+} on cell growth and gentiopicroside accumulation in suspension cell of *G. macrophylla* ($n=3$)

Zn^{2+} 浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞干质量/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	龙胆苦苷量/ ($\times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	龙胆苦苷产量/ ($\times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
0	10.88 ± 0.64	22.89 ± 1.05	24.90 ± 2.26
7.49	11.69 ± 0.38	24.86 ± 1.02	29.05 ± 2.09
15.0	11.42 ± 0.35	24.80 ± 1.00	28.33 ± 1.13
22.50	12.20 ± 0.41	22.61 ± 1.04	27.17 ± 1.14
30.00	11.68 ± 0.28	19.19 ± 0.30	22.41 ± 0.87

3 讨论

在秦艽细胞悬浮培养中, 不同碳源及其浓度对细胞生长及龙胆苦苷积累都有显著影响, 高糖不利于龙胆苦苷的合成, 3% 蔗糖是较优的碳源。硝态氮 (NO_3^-) 对细胞生长来说, 是一种比铵态氮 (NH_4^+) 更好的氮源, 最优 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比为 20/40。 Ca^{2+} 对细胞生长和龙胆苦苷量都有显著影响, Zn^{2+} 对细胞生长影响不明显, 对龙胆苦苷量影响显著, 较优浓度分别为 3 mmol/L 和 $7.49 \mu\text{mol/L}$ 。在试验过程中还发现秦艽悬浮细胞随在液体培养基中继代次数的增加, 龙胆苦苷积累逐渐降低, 连续 4 次继代后几乎检测不到龙胆苦苷的量, 提示需对秦艽悬浮细胞中龙胆苦苷稳定性及细胞遗传稳定性作深入研究。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005

[2] 陈长勋, 刘占文, 孙峥嵘, 等. 龙胆苦苷抗炎药理作用研究[J]. 中草药, 2003, 34(9): 814-816

[3] 刘占文, 陈长勋, 金若敏, 等. 龙胆苦苷的保肝作用研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 47-50

[4] 李向阳, 李福安, 李建民, 等. 青海栽培秦艽中龙胆苦苷的影响因素考察[J]. 中草药, 2005, 36(8): 1237-1239

[5] 李勇慧, 曹晓燕, 李向民, 等. 大叶秦艽不同采收期中龙胆苦苷的分析[J]. 中草药, 2007, 38(6): 933-936

[6] 吴兴海, 黄馨慧, 王喆之. 中药秦艽及其可持续利用途径研究[J]. 世界科学技术—中药现代化, 2002, 4(6): 58-61

[7] 孟玉玲, 贾敬芬. 粗茎秦艽组织培养及再生植株[J]. 中草药, 1995, 26(10): 537-539

[8] 曹建平. 秦艽的组织培养、发根体系建立及发根中次生代谢产物的变化[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2005

[9] 侯学文. 悬浮培养玫瑰茄细胞的生长及泛醌合成的代谢调控[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 1998

[10] 王宝山. 植物生理学[M]. 北京: 科学出版社, 2005

[11] 陈晓亚, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007