

## 巫山淫羊藿悬浮培养细胞的生长特性研究

韩素菊<sup>1</sup>, 黎云祥<sup>2\*</sup>

1. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621000

2. 西华师范大学 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川 南充 637002

**摘要:** **目的** 考察巫山淫羊藿悬浮培养细胞的生长特性, 为巫山淫羊藿资源利用提供参考。**方法** 选用悬浮培养所获得的均匀悬浮培养细胞为研究对象, 在光照条件下进行悬浮培养, 每隔3 d取样, 测定相关的生理生化指标。**结果** 巫山淫羊藿悬浮细胞的生长曲线呈“S”型, 培养基中蔗糖、磷酸盐、硝酸盐、铵盐量均呈急剧下降趋势, 最后变化趋于平缓, 细胞合成黄酮最佳光照时间为每天12 h, 黄酮合成量为27.854 82 mg/L。**结论** 巫山淫羊藿细胞生长特性的研究为其大规模悬浮培养生产天然活性成分奠定了基础。

**关键词:** 巫山淫羊藿; 悬浮培养; 生长曲线; 生长特性; 黄酮

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)08-1609-05

## Growth characteristics of *Epimedium wushanense* in cell suspension culture

HAN Su-ju<sup>1</sup>, LI Yun-xiang<sup>2</sup>

1. Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China

2. Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation, Ministry of Education, China West Normal University, Nanchong 637002, China

**Abstract: Objective** To provide biotechnology reference for the utilization of *Epimedium wushanense*. **Methods** Some subculture conditions were determined and the growth characteristics of suspension cells were observed every 3 d. **Results** The cell showed S-shaped growth curve and the content of nitrate, ammonia salt, phosphate, and sucrose all showed sharply decreasing trend during the initial cell suspension culture of *E. wushanense*. Then the respective changes slowed down. The optimum illumination duration was 12 h. The highest output of flavonoids was 27.854 82 mg/L under 12 h illumination. **Conclusion** The growth characteristics research lays the foundation of mass natural active ingredient in cell suspension culture production of *E. wushanense*.

**Key words:** *Epimedium wushanense* T. S. Ying; suspension culture; growth curve; growth characteristics; flavonoids

巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense* T. S. Ying 是小檗科淫羊藿属的多年生宿根性草本植物。《本草纲目》中称其有“益精气, 坚筋骨, 补腰膝, 强心力”之功效。现代药理学研究表明, 淫羊藿能增加心脑血管血流量, 促进造血功能、免疫功能及骨代谢, 具有抗衰老、抗肿瘤、补肾阳、强筋骨、祛风湿等功效, 临床应用十分广泛<sup>[1-2]</sup>。淫羊藿药用历史悠久, 其有效成分为黄酮类化合物和多糖等次生代谢产物<sup>[3-4]</sup>。随着现代中药产业的发展, 以淫羊藿为主要原料的中成药、民族药产品不断问世, 市场对淫羊藿需求量愈来愈大, 使其野生资源供不应求<sup>[5-6]</sup>。国内外淫羊藿细胞悬浮培养研究较少, 而植物细胞悬浮培养的次生

代谢产物具有提高产率、缩短周期、调控其生产过程、提高产品质量等优点。因此, 研究巫山淫羊藿悬浮细胞的生长特性, 为其次生代谢产物的研究提供基础。

### 1 材料与仪器

#### 1.1 材料

药材经贵州药用植物——淫羊藿分类专家何顺志、西华师范大学秦自生、马永红鉴定为巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense* T. S. Ying, 幼叶经诱导得到愈伤组织, 培养数代后得到巫山淫羊藿均匀悬浮培养细胞。将悬浮培养物用400目不锈钢筛网滤过, 收集细胞。在超净工作台上用电子天平称量2 g

收稿日期: 2010-12-18

基金项目: 四川省教育厅项目(09ZX011); 四川省科技厅应用基础研究项目(2008JY0158); 四川省重点实验室开放基金项目(XNYB09-04)

作者简介: 韩素菊(1976—), 女, 讲师, 研究方向为药用植物生理。

\*通讯作者 黎云祥 E-mail: yx\_li@263.net

细胞加入到 B<sub>5</sub> 培养基中培养。

淫羊藿苷对照品 (批号 110737-200415) 购自中国药品生物制品检定所, 质量分数 >98%。

## 1.2 仪器

雷磁 Phs—25 数显 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司; LDZX—40BI 型立式自动压力蒸气灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; HZQ—QX 全温振荡器, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; GBC—916 紫外-可见分光光度计, 澳大利亚 GBC 科学仪器有限公司。

## 2 方法

### 2.1 生长曲线的绘制

以 B<sub>5</sub> 培养基为基本培养基, 附加 1.0 mg/L 2, 4-D、0.2 mg/L BA、30 mg/L 蔗糖配制成生长培养基, 调节 pH 值在 5.8。取 30 mL 培养基装于 100 mL 三角瓶中, 每瓶接种继代培养 6 d 后的淫羊藿鲜细胞 2 g, 在 120 r/min, (24±2) °C, 每天光照 12 h 条件下培养。培养后, 每 3 天取 5 瓶细胞培养物测定其紧实细胞体积 (PCV), 再用 400 目不锈钢筛网滤过, 洗涤, 称量其鲜质量, 60 °C 烘至质量恒定, 称量。绘制细胞干、湿质量生长曲线。

### 2.2 PCV 的测定

悬浮培养过程中, 每 3 天取其培养物, 静置, 弃去上清液, 将下面沉淀物倒入刻度离心管中, 500 r/min 离心 5 min, 测定 PCV。然后将其摇匀倒入上清液中。测细胞的湿质量和干质量。

### 2.3 培养过程中生长参数的测定

取测生长曲线后的滤液, 测其滤液中各营养物的量。

**2.3.1 培养液中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的测定<sup>[7]</sup>** 分别将 1、2、3、4、5 mL 标准硝酸盐溶液放入瓷勺中, 蒸发至干, 加入 2 mL 苯酚二磺酸试剂, 以溶解残余固体, 用 10 mL 蒸馏水稀释, 转移至 50 mL 量瓶, 加入约 15 mL 浓氨水, 直至颜色最深, 用蒸馏水定容至刻度, 测定吸光度 (*A*) 值。以 *A* 值为纵坐标 (*Y*), 质量浓度为横坐标 (*X*), 得到标准曲线为  $Y=0.0194X+0.026$ ,  $r=0.9950$ 。

将培养液滤过, 稀释 10 倍后取 0.05 mL, 参照标准曲线的测定方法, 由标准曲线计算培养液中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的量。

**2.3.2 培养液中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的测定<sup>[8]</sup>** 分别取 30.0 μg/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 标准溶液 0.5、1、1.5、2、2.5、3 mL 于 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水至 30 mL 左右, 然后

加入 5 mL 酚溶液、5 mL 次氯酸钠溶液, 40 °C 显色 30 min 后加入 1 mL 掩蔽剂, 定容, 于 625 nm 下测定 *A* 值。

以 *A* 值为纵坐标 (*Y*), 质量浓度为横坐标 (*X*), 绘制标准曲线:  $Y=0.2593X-0.0298$ ;  $r=0.9959$ 。取 1 mL 培养液于 50 mL 量瓶中, 其余操作同标准曲线。根据测得的 *A* 值求得相应的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的量。

**2.3.3 培养液中 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 的测定<sup>[9]</sup>** 分别取 1、2、3、4、5 mL 标准磷酸盐溶液至 50 mL 量瓶中, 分别加入 10 mL 的钼酸铵-钒酸铵试剂, 定容至刻度, 混匀, 在室温下放置 10 min, 于 400 nm 处测定其 *A* 值。以 *A* 值为纵坐标 (*Y*), 质量浓度为横坐标 (*X*), 绘制标准曲线  $Y=0.0201X-0.0028$ ,  $r=0.9997$ 。取 1 mL 培养液于 25 mL 量瓶中, 其余操作同标准曲线。根据测得的 *A* 值求得相应的 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 的量。

**2.3.4 培养液中蔗糖质量浓度的测定<sup>[10]</sup>** 分别取标准蔗糖溶液 2 mL 放入带塞试管中, 加入 10 mL 蒽酮试剂, 立即摇匀, 放入冰水浴中。放入沸水浴 10 min, 取出迅速冷却, 静置 10 min。于 620 nm 处测定其 *A* 值。

以 *A* 值为纵坐标 (*Y*), 质量浓度为横坐标 (*X*), 绘制标准曲线为  $Y=6.3643X+0.0045$ ,  $r=0.9992$ 。取 2 mL 培养液于试管中, 加入 10 mL 蒽酮溶液, 操作同标准曲线。根据测得的 *A* 值求得相应的蔗糖的量。

### 2.4 悬浮培养细胞黄酮量的测定

总黄酮量采用分光光度法测定。收集悬浮培养细胞, 洗涤, 60 °C 烘干至恒定质量, 研细, 取 0.05 g 粉末至三角瓶中, 加入 85% 乙醇 10 mL 浸泡, 室温振荡 48 h, 滤过得到总黄酮提取液。取滤液 0.5 mL 于试管中, 再加入 10 mL 85% 乙醇摇匀得到样品液, 在 269.56 nm 处测 *A* 值。根据标准曲线计算相应的样品中总黄酮的量。

根据文献方法<sup>[11-13]</sup>确定淫羊藿苷在紫外区 270 nm 处有最大吸收峰。

淫羊藿苷对照品 105 °C 干燥 4 h 后, 精密称取 5 mg, 用 85% 乙醇溶解, 定容于 10 mL 量瓶, 质量浓度为 500 μg/L。精密吸取 500 μg/L 的对照品溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、7.0、9.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 85% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 于 269.56 nm 处测定其 *A* 值。根据 *A* 值和质量浓度得到标准曲线。

以 *A* 值为纵坐标 (*Y*), 质量浓度为横坐标 (*X*),

绘制标准曲线为  $Y=25.349 X-0.222 5$ ,  $r=0.999 0$ 。

### 3 结果与分析

#### 3.1 巫山淫羊藿悬浮培养细胞的生长曲线

由图 1 可见巫山淫羊藿悬浮培养细胞的生长曲线基本呈 S 型, 3~6 d 为延滞期, 指数增长期在 6~18 d, 之后进入稳定期。糖的利用情况和细胞的生长情况基本一致, 细胞生长最快时, 糖利用能力最强, 18 d 后, 悬浮培养液中细胞进入了稳定期, 在显微镜下观察细胞团增大, 细胞湿质量有所下降, 干质量基本保持不变, 但图 2 中显示细胞的 PCV 体积在 18~21 d 时还在增加, 这段时间镜检观察空细胞增多, 细胞的内含物减少。故细胞虽然体积增加, 但细胞的鲜质量和干质量都基本保持不变, 所以细胞的最佳收获期在 20 d 左右。

黄酮的形成积累与细胞生长也有很大关系, 图 3 显示淫羊藿悬浮培养细胞在延滞期黄酮量较低, 但在延滞期中间有一个最高值; 进入快速生长期后, 淫羊藿黄酮量也逐渐升高, 基本与细胞生长

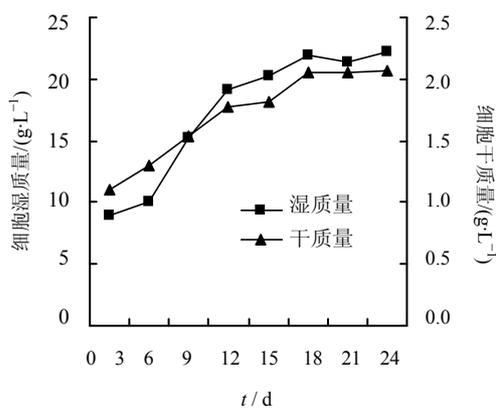


图 1 悬浮培养细胞生长曲线

Fig. 1 Growth curves of suspension cultural cell

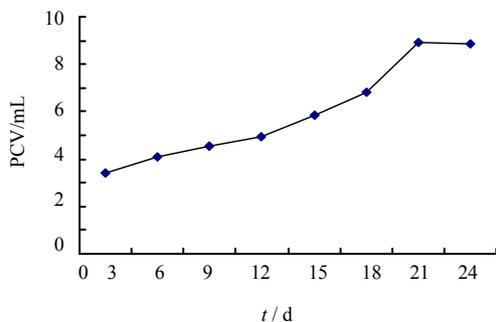


图 2 悬浮培养细胞 PCV 变化曲线

Fig. 2 PCV change curve of suspension cultural cell

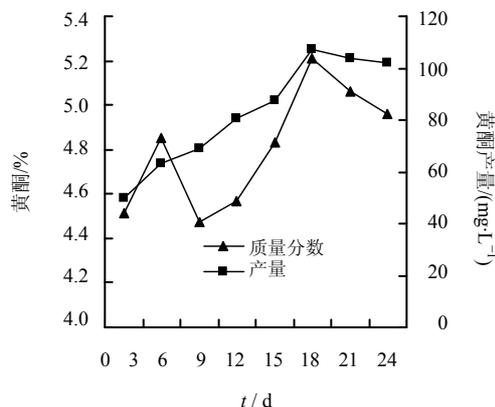


图 3 悬浮培养细胞黄酮量变化曲线

Fig. 3 Flavonoids change curves of suspension cultural cell

呈正相关; 细胞生长进入静止期后淫羊藿黄酮量开始下降; 到达衰亡期时淫羊藿黄酮量下降到最低值。巫山淫羊藿悬浮培养周期约为 21 d, 经过 21 d 达到最大值, 为 107.3 mg/L, 继续培养细胞黄酮量下降。考虑到淫羊藿细胞增长倍数和黄酮量两个因素, 在实验中选择生长到第 20 天时收获细胞为宜。

#### 3.2 光照时间对悬浮细胞合成黄酮的影响

光照对许多植物中黄酮类化合物, 如黄酮、黄酮醇和花色苷的合成, 具有诱导作用<sup>[11]</sup>。大量研究已证实苯丙氨酸氨基裂解酶 (PAL) 是植物细胞中黄酮生物合成途径中的第一关键酶。本研究中探索了在相同光照强度下不同光照时间对巫山淫羊藿细胞产黄酮的影响。淫羊藿悬浮细胞在光照和黑暗条件都产黄酮, 但光照时间与黄酮合成量有关 (表 1), 结果表明, 光照对悬浮培养细胞及黄酮量均有影响, 光照时间越长黄酮量越高, 产量也越高。光照 12 h 即能明显促进黄酮的合成, 再延长光照时间却没有明显影响。但全天光照反而抑制巫山淫羊藿细胞黄酮合成, 黄酮量降低, 但均高于黑暗条件的黄酮量。这与光照时间对水母雪莲愈伤组织生长和黄酮生物合成的影响是一致的<sup>[13]</sup>。光照时间对巫山淫羊藿产黄酮有很大影响, 黑暗条件下, 细胞合成黄酮量 17.209 9 mg/L。细胞合成黄酮最佳光照时间为 12 h/d, 黄酮合成量为 27.854 8 mg/L。

#### 3.3 培养液中糖的利用动态

培养过程中营养组分的量并不恒定, 而是随着培养过程的进行而下降。糖作为细胞代谢过程中碳水化合物的主要来源, 对细胞的生长有较大的影响。

由图 4 可知, 蔗糖的消耗利用是较快的。最初蔗糖质量浓度为 40 g/L, 培养 24 d 后, 只剩 7.39 g/L,

表 1 光照对淫羊藿黄酮合成的影响

Table 1 Effects of different illumination duration on flavonoids synthesis

光照时间/h	细胞干质量/g	黄酮/%	黄酮量/(mg·L <sup>-1</sup> )
0	0.368 8	4.666 8	17.209 9
6	0.513 9	4.989 3	25.640 0
12	0.530 8	5.247 5	27.854 8
16	0.522 3	5.102 4	24.321 1
24	0.556 1	4.828 4	26.852 1

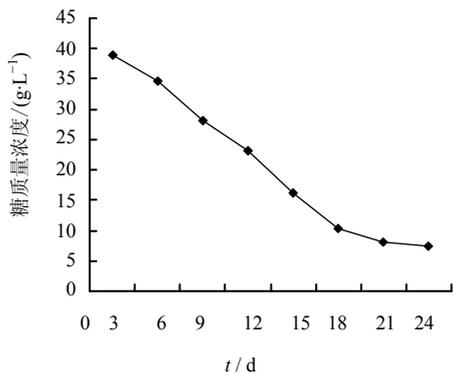


图 4 悬浮培养细胞培养液中残糖量变化曲线

Fig. 4 Change curve of sugar content in media of suspension cultural cell

蔗糖每天的平均消耗速度是 1.36 g/L。对数生长期的 6~18 d 蔗糖消耗更快, 从 34.75 g/L 降至 10.30 g/L, 每天平均消耗 2.04g/L。蔗糖的这种消耗速度与细胞的生长速度密切相关。培养初期糖的消耗量小, 相应细胞处于延滞期, 细胞生长速度慢, 生长量也缓慢, 在对数生长期, 蔗糖被大量消耗, 细胞生长量也最大。表明碳源是细胞生物量积累的主要能源。

### 3.4 培养基中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的消耗

氮元素是植物细胞的重要组成元素之一, 也是生物碱等次级代谢产物的组成元素。氮源是植物细胞生长、繁殖和生产生物碱等次级代谢产物所必不可少的营养物质。植物细胞培养通常采用一定量的硝酸盐和铵盐作为混合无机氮源, 单独以铵盐或者硝酸盐为氮源, 都对细胞的生长和次级代谢产物的生成不利<sup>[12]</sup>。细胞生长一个重要指标是 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的代谢变化。在细胞生长初期 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的消耗比较快, 在生长高峰期, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的消耗并不随细胞生长的加快而增加。在 B<sub>5</sub> 培养基中, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 与 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的摩尔比为 2 : 25, N 素的总浓度为 27 mmol/L。图 5 显示, 在培养前期, 铵盐比硝酸盐的利用速度快, 铵盐的摄入对淫羊藿细胞生长所需的蛋白质的合成

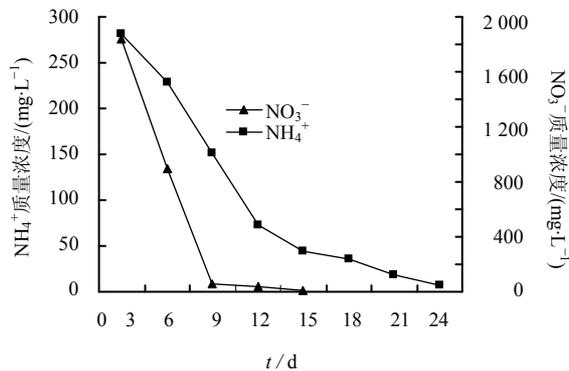


图 5 悬浮培养细胞培养液中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 量变化曲线

Fig. 5 Change curves of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contents in media of suspension cultural cell

十分重要, 而硝酸盐的消耗则与黄酮和其他的一些次级代谢产物合成有关。

### 3.5 培养液中 PO<sub>4</sub><sup>3+</sup> 的变化

植物细胞培养需要多种无机元素, 其中磷酸盐的浓度对细胞生长和次级代谢产物生长有很大影响。磷是细胞生命活动中起重要作用的 DNA、RNA、ATP 等许多生物活性物质的组成元素, 对细胞分裂、繁殖、生长和新陈代谢有重要意义。图 6 显示淫羊藿悬浮培养细胞在第 9 天时, 约有 60% 的磷被消耗, 在第 18 天时基本消耗完。

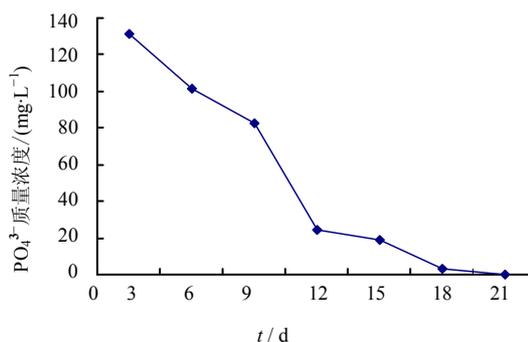


图 6 悬浮培养细胞培养液中 PO<sub>4</sub><sup>3+</sup> 量变化曲线

Fig. 6 Change curve of PO<sub>4</sub><sup>3+</sup> content in media of suspension cultural cell

## 4 讨论

### 4.1 悬浮培养过程中营养消耗与细胞生长的关系

掌叶半夏<sup>[14]</sup>在培养过程中生长曲线呈 S 型, 分为延迟期、对数期、对数生长期和静止期, 培养 20 d 左右细胞数量和鲜质量达到最大值。银杏悬浮培养细胞生长曲线基本为 S 型, 其中 0~3 d 为延迟期, 3~18 d 为指数生长期<sup>[14]</sup>, 18~21 d 为静止期, 21~24 d 为衰亡期。人参悬浮<sup>[15]</sup>细胞培养生长曲线 0~

6 d 为延滞期, 6~15 d 为对数生长期, 21~24 d 为减慢期, 29 d 后进入静止期。本实验中, 淫羊藿细胞生长曲线也呈 S 型, 0~5 d 为延滞期, 5~18 d 为指数生长期, 18~24 d 为静止期, 最佳换液时间为 20 d 左右, 此时培养基的养分所剩无几, 细胞生长量下降, 甚至细胞出现退化现象, 褐化死亡。不同悬浮培养材料对营养利用时间不同, 细胞生长规律也不同。

在植物细胞培养中, 细胞的生长受培养基中的糖源的制约, 蔗糖作为生物代谢过程中的碳源, 在培养基中降解成葡萄糖和果糖。高量的蔗糖常刺激组织培养细胞的生长。 $\text{NH}_4^+$ 作为生物合成过程中的氮源, 被用于蛋白质的合成, 而  $\text{NO}_3^-$ 与次生代谢过程中的关键酶和一些代谢物的合成有关。在本实验中淫羊藿悬浮细胞选择了  $\text{B}_5$  作为培养基, 能获得高产次生代谢物黄酮。淫羊藿细胞在生长初期铵盐被迅速消耗, 硝酸盐消耗比较缓慢。两者之间的代谢关系有待进一步研究。

#### 4.2 光照与细胞合成黄酮的关系

光照条件对黄酮类化合物的合成影响很大。研究发现植物合成黄酮类化合物是对紫外线照射的一种反应, 可以保护植物免受紫外线的伤害。紫外线可以引发植物合成黄酮类化合物的基因的转录活性, 紫外线照射后, 黄酮类化合物迅速合成, 并积累于表皮细胞<sup>[16]</sup>。光照可以促进植物细胞黄酮类化合物的合成, 巫山淫羊藿黄酮的合成也与光照关系密切, 黑暗条件下细胞培养物产黄酮量只是光照的 3/5, 细胞黄酮的量是光照条件下的 4/5。而细胞产黄酮量与光照时间也有一定关系, 研究发现 12 h 有利于巫山淫羊藿悬浮细胞黄酮的形成和积累, 此时细胞黄酮量最高 5.2%, 产量也达到最高。

#### 参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2000.
- [2] 李晶晶, 于世凤, 李铁军, 等. 淫羊藿对口腔各矿化组织破骨细胞性骨吸收的体外实验研究 [J]. 中国口腔医

学杂志, 2002, 37(5): 391-394.

- [3] 郭宝林, 肖培根. 淫羊藿属植物中的黄酮类成分及其分类学意义 [J]. 植物分类学报, 1999, 37(3): 228-243.
- [4] 周颖欣, 贾敏鸽, 涂光忠, 等. 巫山淫羊藿根的化学成分研究 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 817-818.
- [5] 张华峰, 杨晓华. 淫羊藿的生物活性成分及其开发策略研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 329-332.
- [6] 徐艳琴, 陈建军, 葛菲, 等. 淫羊藿药材质量评价研究现状与思考 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 661-666.
- [7] 王立军, 张正. 分析化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1998.
- [8] Weatherburn M W. Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia [J]. *Anal Chem*, 1967, 39(8): 971-974.
- [9] Chen P S, Oribara T Y, Huber W. Micro-determination of phosphorus [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(11): 1756-1759.
- [10] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K. Colorimetric methods for the determination of sugar and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350-357.
- [11] Fuglevand G, Jackson J A, Jenkins G I. UV-B, UV-A and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(15): 2347-2357.
- [12] 郭勇, 崔堂兵, 谢秀祯. 植物细胞培养技术与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [13] 赵德修, 李茂寅, 刑建民, 等. 光质、光强和光期队水母雪莲愈伤组织生长和黄酮生物合成的影响 [J]. 植物生理学报, 1999, 25(2): 127-132.
- [14] 朱宝成, 吴爱民, 成亚利, 等. 掌叶半夏细胞悬浮培养及单细胞培养再生植株 [J]. 作物学报, 1996, 22(2): 197-201.
- [15] 唐魏, 吴绛云. 人参悬浮细胞系的建立及其生长特性的研究 [J]. 生物技术, 1994, 4(1): 26-29.
- [16] Schmelzer E, Jahnen W, Hahlbrock K. *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase mRNA, chalcone synthase and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1988, 85(9): 2989-2993.