

三叶青松散型和致密型愈伤组织悬浮培养及黄酮积累的比较研究

彭昕¹, 张剑², 何军邀¹, 范三微¹, 凌庆枝^{1*}

1. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100

2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 比较三叶青松散型和致密型愈伤组织悬浮培养细胞生长及其次生代谢产物黄酮的积累情况。**方法** 将三叶青叶诱导的愈伤组织在不同外源植物激素种类和配比的培养基上多次继代培养, 筛选获得松散型和致密型愈伤组织, 分别建立相应悬浮细胞体系, 研究了两种悬浮培养细胞生长和总黄酮积累的动态。**结果** 三叶青松散型愈伤组织悬浮培养的继代周期为 8 d, 增加质量倍数最高达到 3.68 倍, 黄酮积累的最大值 11.7 mg/g, 较最初接种时的浓度增加 34.5%, 该悬浮系继代 4~5 次后生命力衰退且褐化加重; 而致密型愈伤组织悬浮培养的继代周期为 20 d, 增加质量倍数最高达到 2.65 倍, 黄酮积累的最大值 40.9 mg/g, 较最初接种时的浓度增加 212.2%, 该悬浮系继代多次细胞无明显变化。**结论** 与松散型愈伤组织悬浮培养相比, 致密型愈伤组织悬浮培养更有利于继代培养和次生代谢产物的积累。

关键词: 三叶青; 松散型; 致密型; 愈伤组织; 悬浮培养; 黄酮

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0577-04

Comparison on accumulation of flavonoids in loose and compact callus suspension cell culture of *Tetrastigma hemsleyanum*

PENG Xin¹, ZHANG Jian², HE Jun-yao¹, FAN San-wei¹, LING Qing-zhi¹

1. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China

2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: **Objective** To analyze and compare the cell growth and accumulation of its secondary metabolites, flavonoids, in loose and compact calluses suspension cell culture of *Tetrastigma hemsleyanum*. **Methods** The calluses induced from the leaves of *T. hemsleyanum* were subcultured in different culture media, to screen loose and compact calluses, then established two suspension cell systems. The time courses of cell growth and yields of flavonoids were studied. **Results** Suitable culture period of loose callus suspension cell was 8 d, however, the suitable culture period of compact callus suspension cell was 20 d. The highest multiple proliferation was 3.68, however, the highest multiple proliferation of compact callus suspension cell was 2.65. The highest content of flavonoids was 11.7 mg/g, increased by 34.5%, compact callus suspension cell was 40.9 mg/g, increased by 212.2%, loose callus suspension cell had a high level of browning and varietal vitality decline after 4—5 subcultures. There was no significant changes in the subculture of the multicell suspension cultures. **Conclusion** Comparing with loose callus, the compact callus suspension cell shows a remarkable high content of flavonoids, and is preferable for subculture.

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg; loose; compact; callus; suspension culture; flavonoid

三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg 是我国独有的珍稀药用植物, 可用于治疗高热、肝炎、风湿性关节炎及病毒性脑膜炎等多种疾病, 也是抗肿瘤常用药物。其主要活性成分黄酮对肝癌、肠癌、胃癌和白血病细胞株具有“促凋亡作用”^[1-2]。目前该植物资源濒临灭绝, 为了更有效地保护三叶青资源, 研究利用细胞培养方法进行三叶青次生代谢产物的工

业化生产势在必行。三叶青成分、组织快繁、栽培技术的研究已有文献报道^[3-5]。但有关三叶青悬浮培养生产次生代谢产物的研究尚未见报道。

植物细胞悬浮培养技术是通过筛选生长旺盛且质地疏松的愈伤组织进行植物单细胞或小细胞团悬浮培养, 近年来又发展了植物细胞自生固定化培养技术, 即通过调整合适的植物激素及配比, 使悬浮

收稿日期: 2011-10-18

基金项目: 浙江省新苗人才计划项目 (ZJPKJJCX201006); 浙江医药高等专科学校校级科研项目 (ZPCSR2010003)

作者简介: 彭昕, 讲师, 硕士, 主要研究方向为生物制药技术。Tel: (0574)88223161 E-mail: pengx@mail.zjpc.net.cn

*通讯作者 凌庆枝 Tel: (0574)88227845 E-mail: lingqingzhi@sina.com

的植物细胞聚焦成具有一定分化程度的质地致密的愈伤细胞大颗粒,培养液中几乎无单细胞存在,目前已有高山红景天、银杏、川贝母等植物建立了这种质地致密的愈伤细胞颗粒培养系统^[6-8],本实验通过调整继代培养基中外源植物激素多次筛选获得两种典型的松散型和致密型愈伤组织,比较了它们在悬浮培养过程中生长和黄酮积累的动态特征,以期为大规模细胞培养生产三叶青黄酮提供理论和方法依据。

1 材料与方法

1.1 材料

样品采自浙江省丽水市,经安徽师范大学生命科学学院周守标教授鉴定为三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg。

1.2 松散型愈伤组织悬浮培养体系的建立

按文献方法^[9]诱导的愈伤组织接种于MS培养基(含1.5%蔗糖、0.8 mg/L 6-BA、3.0 mg/L 2,4-D、pH 5.8)上,每15天继代1次,并不断筛选,剔除色暗的衰老组织,挑选呈淡黄绿色、半透明、质地松散、含水量高、生长旺盛的愈伤组织转入液体培养,培养基同上,不加琼脂,置于摇床中进行悬浮培养,接种量为2 g鲜质量,摇床转速120 r/min,培养温度为 (24 ± 2) °C,每天光照12 h,光照强度2 000 lx,100 mL摇瓶中培养基装量为50 mL,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,不需过滤,即可得到不含大细胞团块的培养物。初期1~2 d继代1次,继代2次后即可得到只含单细胞或小细胞团的培养物。以后转为8 d继代1次。

1.3 致密型颗粒状愈伤组织悬浮培养体系的建立

按文献方法^[9]诱导的愈伤组织接种于MS培养基(含3%蔗糖、3.0 mg/L 6-BA、1.0 mg/L IBA、pH 5.8)上,每20天继代1次,并不断筛选,将呈浅绿色、小颗粒堆积生长、颗粒表面有瘤状小突起的愈伤组织转入液体培养,培养基同上,不加琼脂,其余培养条件同“1.2”项,置于摇床中进行悬浮培养,从原愈伤组织块上重新长出新愈伤组织,并不断分散成小颗粒,将大块褐化愈伤组织去掉,初期3~4 d继代1次。继代2次后转为20 d继代1次,3~4次继代后逐渐形成均匀稳定的致密颗粒状愈伤组织悬浮培养体系。

1.4 悬浮细胞生长的测定

每隔2天随机抽取3瓶悬浮培养物过滤,蒸馏水洗涤3次,用滤纸吸净其表面水分,称质量即得

其鲜质量,鲜质量增长倍数=(最终收获鲜质量-接种鲜质量)/接种鲜质量;测定干质量时,将悬浮培养物置于60 °C下干燥至恒定质量,重复3次。

1.5 总黄酮的测定

1.5.1 标准曲线的绘制 以芦丁为对照品,参照文献方法^[10]绘制标准曲线,得线性回归方程为 $Y=0.090X+0.001$, $R^2=0.9996$ 。

1.5.2 样品总黄酮测定 精密称取烘干至恒质量的样品0.2 g,加10 mL 50%乙醇超声浸提2 h,滤过后量取提取液1 mL,置于25 mL的量瓶中,按标准曲线的绘制中所用的方法对样品溶液进行显色,依据标准曲线,计算样品中的总黄酮量。

2 结果与分析

2.1 松散型愈伤组织悬浮细胞的生长和黄酮的积累

三叶青愈伤组织经多次筛选继代后,得到稳定的松散型愈伤组织(图1),这种愈伤组织接种到液体培养基中即自动散开。培养初期,部分细胞褐化、形态不规则,单细胞比例相对较小(图2、3)。经过1~2次的继代筛选,培养物大量繁殖,单细胞和小细胞团比例明显增加,且细胞多呈圆球形,内涵

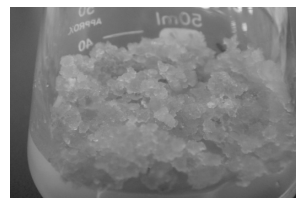


图1 三叶青松散型愈伤组织

Fig. 1 Loose callus of *T. hemsleyanum*

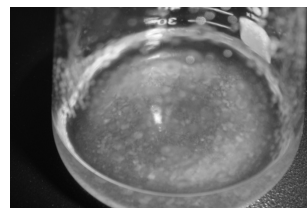


图2 初代培养的三叶青松散型愈伤组织悬浮细胞

Fig. 2 Primarily cultured loose callus suspension cell of *T. hemsleyanum*

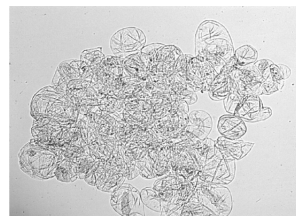


图3 初代培养的三叶青松散型愈伤组织悬浮细胞显微图

Fig. 3 Micrograph of primarily cultured loose callus suspension cell of *T. hemsleyanum*

物丰富(图4)。为维持悬浮细胞系良好的分散性,需周期性去除大细胞团块。

从图5中可看出其细胞生长曲线基本为“S”型,0~2 d是滞后期,是细胞生长的适应期,增长缓慢,之后2~8 d是对数生长期,此时细胞旺盛分裂,生长迅速,每2~3天即可增加1倍质量,到第8天最高,增加质量的倍数可达3.68倍,随后即进入细胞衰亡期,培养液开始变混浊,瓶壁上出现衰败细胞,此时若不及时继代,细胞明显变褐死亡。该悬浮细胞系在继代4~5次后,生长能力明显衰退,且褐化增加。黄酮量变化的趋势是在接种后2~6 d明显增长,达到积累的最大值11.7 mg/g,较最初接种时的浓度增加34.5%,6~10 d基本稳定,之后逐渐降低。

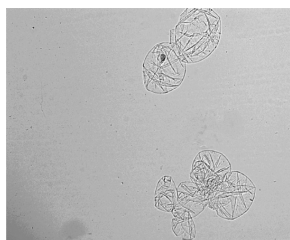


图4 继代两次后的三叶青松散型愈伤组织悬浮细胞显微图

Fig. 4 Micrograph of twice subcultured loose callus suspension cell of *T. hemsleyanum*

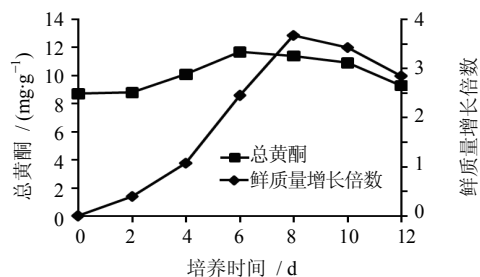


图5 三叶青松散型愈伤组织悬浮培养细胞生长及黄酮合成曲线

Fig. 5 Curves of loose callus suspension cell growth and flavonoids synthesis of *T. hemsleyanum*

2.2 致密型颗粒状愈伤组织悬浮细胞的生长和黄酮的积累

三叶青致密型愈伤组织见图6,这种愈伤组织结构紧实,继代过程中需不断夹碎以增加其分散度,转入液体培养经多次筛选继代后,逐渐形成了绿色球状、直径多数在2~5 mm、表面有瘤状小突起、均匀稳定的颗粒状愈伤组织悬浮培养体系,培养液为澄清透明,几乎无单细胞(图7)。

三叶青致密型颗粒状愈伤组织悬浮细胞的生长

特性及黄酮的积累曲线见图8,培养的前4天为适应期,生长较缓慢,4~24 d进入指数生长期,增长速度呈线性增长,24~32 d为饱和期,增重倍数最高为2.65倍。在此期间,黄酮量变化的趋势是在接种后即迅速增长,第16天达到积累的最大值40.9 mg/g,较最初接种时的浓度增加212.2%,之后逐渐降低。

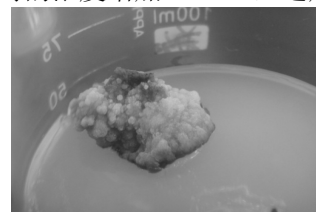


图6 三叶青致密型颗粒状愈伤组织

Fig. 6 Compact granular callus of *T. hemsleyanum*

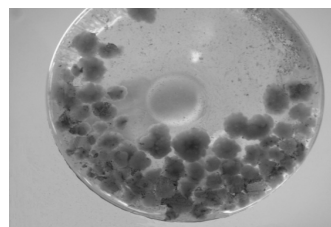


图7 三叶青致密型颗粒状愈伤组织悬浮细胞

Fig. 7 Compact granular callus suspension cell of *T. hemsleyanum*

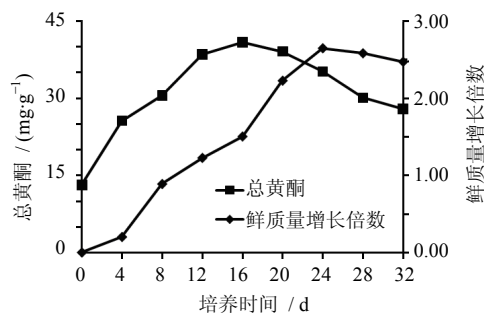


图8 三叶青致密型颗粒状愈伤组织悬浮培养细胞生长及黄酮合成曲线

Fig. 8 Curves of compact granular callus suspension cell growth and flavonoids synthesis of *T. hemsleyanum*

3 讨论

植物愈伤组织状态是一个动态变化过程,可以通过调控植物外植体来源、培养条件和培养基条件来实现对愈伤组织状态的调控。理论上所有愈伤组织都可以通过调控上述条件的一个或几个而最终得到想要的愈伤组织状态。本研究主要通过调整继代培养基成分来实现对三叶青的愈伤组织状态调控。从三叶青叶直接诱导出的愈伤组织一般质地较紧实,将其在含有不同外源植物激素种类和配比的

MS 培养基上继代培养, 继代 3 次后逐渐形成了稳定的不同愈伤组织状态, 6-BA 质量浓度在 1 mg/L 时, 愈伤组织相对较松散, 在 1~5 mg/L 时, 愈伤质地开始变得紧实, 表面呈现颗粒状, 当质量浓度大于 5 mg/L 时, 愈伤切口处明显褐化, 生长缓慢缺乏生命力, 表明高浓度的 6-BA 对愈伤的生长有抑制作用。当 BA/IBA 值大时, 容易形成较紧实的愈伤组织, 这一点与吴双秀^[6]在诱导高山红景天愈伤组织时发现的规律相同。在 MS 培养基(含 3%蔗糖、3.0 mg/L 6-BA、1.0 mg/L IBA、pH 5.8)上得到的愈伤组织形态较为典型, 为致密型颗粒状愈伤组织, 呈绿色, 表面有 1~3 mm 小颗粒堆积, 生长速度较快, 褐化率低。6-BA 与 IBA 各比例组合均难以得到理想的适于悬浮的松散型愈伤组织。在培养基中加入 2, 4-D, 愈伤组织质地明显由坚实逐渐变得疏松, 颜色由绿色逐渐变为淡黄色, 愈伤组织生长速度也逐渐加快。其中 3.0 mg/L 2, 4-D 与 0.8 mg/L 6-BA 组合的培养基上仅 3 d 就有淡黄绿色半透明状的愈伤组织从切口出现, 生长旺盛, 质地疏松。本研究中还发现培养基中蔗糖浓度高时有利于紧实的愈伤生成, 而浓度较低时有利于疏松易碎愈伤组织的生成, 这可能是由于改变了培养基中渗透压, 增强了细胞被动吸收营养的能力, 加快了细胞生长的原因。因为蔗糖浓度有所降低而同时细胞生长也较快, 所以疏松愈伤组织的继代时间要适当缩短。另外, 本研究中还发现增加继代次数也有利于松散型愈伤组织的形成。

两种类型的愈伤组织悬浮培养细胞生长曲线均为 S 型, 但松散型愈伤组织悬浮培养的生长周期短, 滞后期较短, 生物量增殖高。可能是因为松散型愈伤组织分散程度高, 与培养基中的氧气及营养物质接触充分, 新陈代谢旺盛; 抑制细胞生长的代谢产物可较快释放等原因。另外, 该悬浮系细胞生长周期的后阶段没有明显的稳定期, 生物量达到最高值后即明显下降, 可能是因为该悬浮系细胞的同步化程度较致密型愈伤悬浮细胞更高。但松散型愈伤悬浮系继代后生长能力易衰退, 易褐化, 可能有以下原因: 细胞生长速度越快, 在一定时间内, 分裂的代数就越多, 也就越易发生突变; 培养基中 2, 4-D 对愈伤组织及悬浮细胞的伤害作用较大; 且该培养系统的生长调节物质比例始终处于高比例的生长素类似物状态, 有研究表明^[11], 培养基中高浓度的生长素会诱导细胞内多酚氧化酶活性升高, 从而导致

褐化, 不利于细胞继代培养。

松散型愈伤组织悬浮培养细胞中黄酮的合成能力远远低于致密型, 这主要是因为前者的脱分化程度更高, 而细胞的成团和分化往往是次生代谢物生产的必要条件^[12], 采用初步分化的植物愈伤组织颗粒进行悬浮培养可使团块颗粒中心至表面形成一个传质梯度, 类似于分化了的组织内环境, 这在一定程度上有利于次生代谢产物的形成, 进而能够明显提高植物次生代谢物的量^[13]。在川贝母和银杏等的悬浮细胞培养中均发现, 成团生长的细胞中次级代谢产物的量明显高于松散生长的细胞^[7-8]。

因此, 建立致密型愈伤组织悬浮系对于提高次生代谢产物的得率和维持细胞继代后生长能力具有重要意义。

参考文献

- [1] 魏克民, 丁刚强, 浦锦宝. 中草药三叶青抗肿瘤作用机制实验研究和临床应用 [J]. 医学研究杂志, 2007, 36(11): 41-43.
- [2] 伍昭龙, 吕江明. 中药三叶青的研究现状 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2006, 78: 15-18.
- [3] 李瑛琦, 陆文超, 于治国. 三叶青的化学成分研究[J]. 中草药, 2003, 34(11): 982-983.
- [4] 钱丽华. 三叶青的离体快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(1): 121-122.
- [5] Dai Y J, Shen Z G, Liu Y, et al. Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanu* Diels et Gilg [J]. *Environ Exp Bot*, 2009, 23(65): 177-182.
- [6] 吴双秀. 高山红景天颗粒状愈伤组织悬浮培养和红景天苷的诱导 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2001.
- [7] 王跃华, 何宗晟, 孙雁霞, 等. 川贝母细胞团块悬浮培养生产生物碱的研究 [J]. 中药材, 2011, 34(2): 183-186.
- [8] 刘佳佳, 江文辉, 赵国玲, 等. 银杏致密细胞团块颗粒悬浮培养生产银杏内酯研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(4): 16-19.
- [9] 吴浩, 彭昕, 林言娜, 等. 三叶青愈伤组织的诱导及分化培养基的筛选 [J]. 现代农业科技, 2011(21): 121-122.
- [10] 卢爱芳, 祁明君, 李宗亮, 等. 三叶青愈伤组织培养及其总黄酮含量的研究 [J]. 中药材, 2010, 33(7): 1042-1045.
- [11] Erica D G. Establishment of a callus culture and measurement of seasonal changes in secondary compound production in *Eucommia ulmoides* Oliver [D]. Baton Rouge: Louisiana State University, 2003.
- [12] Dornenburg H, Knorr D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1995, 17: 674-684.
- [13] 王素芳, 王志林, 蒋琳兰, 等. 植物细胞悬浮培养 [J]. 中国生物制品学杂志, 2002, 15(6): 381-383.