

• 药材与资源 •

多胺对白桦悬浮细胞生长和三萜积累的影响

李晓灿, 詹亚光, 王晓东, 刘英甜, 李 丹, 荣令珍, 范桂枝*

东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 分析外源多胺对白桦悬浮细胞生长和三萜积累的影响。**方法** 在白桦悬浮细胞的生长末期添加 0.1 mmol/L 和 1.0 mmol/L 的腐胺 (Put)、精胺 (Spm) 和亚精胺 (Spd), 采用比色法和 RT-PCR 方法分析白桦三萜量及其合成关键酶羽扇豆醇合酶 (LUS) 基因的表达。**结果** 除 1.0 mmol/L Spm 处理使白桦悬浮细胞的活力和干质量积累降低外, 其他处理均提高了白桦悬浮细胞的活力、干质量积累和三萜产量, 且随着处理时间的延长, 干质量积累和三萜产量呈增加趋势。其中 1.0 mmol/L Put 在处理的第 2 天对细胞干质量和三萜产量的促进效应最大, 分别比对照增加了 38.89% 和 116.35%。LUS 基因的 RT-PCR 检测结果进一步证实了多胺对白桦三萜积累的促进作用。**结论** Put 可有效促进白桦悬浮细胞生长和三萜积累。

关键词: 白桦; 悬浮细胞; 三萜; 多胺; 羽扇豆醇合酶

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)04-0463-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.04.018

Effect of polyamine on growth of *Betula platyphylla* suspension cells and triterpenoid accumulation

LI Xiao-can, ZHAN Ya-guang, WANG Xiao-dong, LIU Ying-tian, LI Dan, RONG Ling-zhen, FAN Gui-zhi

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To analyze the effect of exogenous polyamine on the growth of *Betula platyphylla* suspension cells and triterpenoid accumulation. **Methods** At the end of the growth stage, 0.1 mmol/L and 1.0 mmol/L putrescine (Put), spermine (Spm), and spermidine (Spd) were added to the suspension cells of *B. platyphylla*, the triterpenoid content and gene expression of lupeol synthase (LUS) related to the synthesis of triterpenoid were analyzed by chemical colorimetry and RT-PCR, respectively. **Results** Except for the treatment with 1.0 mmol/L Spm, the cell viability, dry weight, and triterpenoid production in *B. platyphylla* suspension cells induced by Put and Spd were increased, and the dry weight and triterpenoid production of *B. platyphylla* cells were increasing with the extension of polyamine treatment time. Among them, dry weight and triterpenoid production were the highest after 2 d Put induction, which were 38.89% and 116.35% higher than those in the control, respectively. Triterpenoid production in *B. platyphylla* cells induced by polyamine was further confirmed by RT-PCR of LUS gene. **Conclusion** Put could effectively enhance the growth of *B. platyphylla* suspension cells and triterpenoid accumulation.

Key words: *Betula platyphylla* Suk.; suspension cell; triterpenoid; polyamine; lupeol synthase

近年来, 利用植物离体培养技术生产有用次生代谢物质的研究取得了很大进展, 如紫草细胞培养生产紫草素、人参细胞培养生产皂苷、洋地黄细胞培养生产生物碱等均达到了工业化生产规模, 用长春花细胞培养生产抗癌生物碱已达中试水平^[1-3]。然而次生代谢物质的低产现象是制约细胞培养生产植物天然产物技术产业化的核心问题之一, 理解和掌握植物细胞次生代谢调控规律是解决这一问题的基

础。虽然, 国内外研究者针对植物培养细胞中次生代谢物质低产问题进行了研究, 包括优质细胞系选育、培养条件优化、培养技术改进及次生物质合成关键酶基因克隆等^[4-7]。但到目前为止, 植物细胞次生代谢物质的低产问题仍未得到很好解决。

诱导子是可以迅速、专一和选择性地诱导植物多种特定基因表达的物质, 如茉莉酸诱导子使金银花细胞中齐墩果酸增加了 9.4 倍^[8], 真菌诱导子使

收稿日期: 2012-07-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31100445, 31070531); 中央高校基本科研业务专项资金项目(DL12CA05); 黑龙江省博士后科研启动金(415288)

作者简介: 李晓灿, 博士, 现从事植物细胞工程领域的研究。E-mail: gzf325@126.com

*通信作者 范桂枝 Tel: (0451)82191752 E-mail: gzf325@126.com

网络出版时间: 2013-01-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130116.1026.004.html>

亚麻细胞中足叶草毒素量增加了7倍^[9]。为此,诱导子被认为是提高植物次生代谢物质产量最有效的方法之一。但是,大部分诱导子在促进目的次生代谢物质合成的同时,却不同程度地抑制了细胞生长,最终导致次生代谢物质产量的提高程度仍不能满足生产需求。如能找到同时促进细胞生长和次生代谢物质积累的诱导子,将有助于解决植物细胞培养生产次生代谢物质低产的问题。

本课题组的前期研究表明,具有药用价值的白桦三萜类物质可以在白桦愈伤组织中积累^[10-12],但其量极低。本研究将腐胺(Put)、亚精胺(Spd)、精胺(Spm)添加到白桦悬浮细胞培养体系中,分析多胺对白桦悬浮细胞生长和三萜积累的影响,以期找到既能促进细胞生长又能促进次生代谢物质积累的诱导子。

1 材料与仪器

白桦 *Betula platyphylla* Suk. 母树取自东北林业大学白桦强化种子园 5~7 年生嫁接优树(接穗30年生),外植体取自其诱导的组培苗,由东北林业大学生命科学学院詹亚光鉴定。HY—6A 双层振荡器,UV—2800 紫外分光光度计,PE 公司 2400 型 PCR 仪。

2 方法

2.1 白桦悬浮细胞制备

用白桦组培苗茎段进行愈伤组织诱导,使用NT固体培养基,其中包括0.1 mg/L 6-BA、0.01 mg/L TDZ、20 g/L 蔗糖、5.3 g/L 琼脂,pH 6.0~6.5。每20~25 d 继代1次,多次继代后将松散愈伤组织接入不加琼脂的NT液体培养基中悬浮培养,250 mL 摇瓶中盛有90 mL 培养液,pH 5.5~6.0,每瓶接种4 g 鲜质量的愈伤组织,每隔15 d 继代1次,培养温度为25~27 ℃,光照强度为2 000 lx,每天光照16 h,摇床转速为120 r/min。

2.2 外源多胺的添加

在白桦悬浮细胞培养的第8天,分别加入0.1、1.0 mmol/L 的 Put、Spd、Spm,以加入等体积无菌水作对照。在处理第1、2、4、8天取样测定细胞活力、干质量和三萜量。

2.3 细胞活力的测定

取白桦悬浮细胞鲜样0.20 g,加入2.5 mL 现配的0.4%氯化三苯四氮唑(TTC),再加入2.5 mL PBS 缓冲液(pH 7.0),常温下暗处理14 h。去除上清溶液,用5 mL 蒸馏水清洗细胞,待细胞沉淀静止后,

吸去上清再次洗涤细胞,共重复3次。用5 mL 95%乙醇脱色处理,于60 ℃水浴30 min,每隔5 min 轻晃倒置试管摇匀。待细胞沉淀后用紫外分光光度计测定上清溶液的吸光度(A)值,即代表细胞活力,A 值大则细胞活力强^[13]。

2.4 三萜的提取与测定

三萜的提取采用超声波醇提法,利用紫外分光光度计法测定其量^[12]。将白桦悬浮细胞烘干至恒质量后,研磨成粉末状,每样品称量0.05 g 加入2 mL 95%乙醇浸提过夜,重复提取3次,将提取液混合。于70 ℃水浴1 h,超声(10 kHz)提取40 min,静置沉淀后滤过,取上清溶液蒸干,并加入2 mL 醋酸乙酯复溶,得待测样品。测定时,取样品100~200 μL,置于70 ℃水浴,待样品蒸发完全后,加入200 μL 5%香草醛-冰醋酸混合液(现用现配)和800 μL 高氯酸,继续70 ℃水浴反应15 min,反应结束后迅速冷却,醋酸乙酯定容到5 mL,混合均匀。空白对照加入同样试剂。以紫外分光光度计551 nm 处测定A 值。

用白桦酯醇对照品制作标准曲线,回归方程为 $Y=0.0871X+0.0002$, r 为0.9993。白桦脂醇在0.02~0.10 mg 具有良好的线性关系。

2.5 LUS 基因的表达分析

2.5.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 采用 Tris-CTAB 法^[14]提取白桦悬浮细胞的RNA,用AMV 反转录酶(大连 TaKaRa 公司)合成cDNA 第一链。

2.5.2 半定量 RT-PCR 分析 LUS 的引物参照文献方法^[14],其正向引物为TTGAAGACGTGCAAGAA-CCTG,反向引物为CATCAATGAGGGATAACAAGG,以白桦组成型表达的Tubulin 基因为内参(正向引物TCAACCGCCTTGTCTCTCAGG,反向引物TGGC-TCGAATGCACTGTTGG)。PCR 反应条件为94 ℃、3 min; 94 ℃、30 s, 54 ℃、45 s, 72 ℃、50 s, 35 个循环; 72 ℃、7 min; 4 ℃保存。

3 结果与分析

3.1 外源多胺对白桦悬浮细胞活力的影响

将0.1、1.0 mmol/L 的 Put、Spm 和 Spd 分别添加到培养8 d 的白桦悬浮培养体系中,TTC 法分析多胺处理对白桦细胞活力的影响。研究发现,在多胺处理的1~8 d 内,除1 mmol/L Spm 使白桦细胞活力降低11.97%~80.32%外,外源多胺处理均不同程度提高了白桦悬浮细胞活力(图1)。其中,0.1 mmol/L Spm 处理的白桦悬浮细胞,在处理第1天达最大值,比对照增加了

40.50%; 同样, 0.1、1.0 mmol/L Spd 也在处理的第 1 天达最大值, 分别比对照增加了 25.77%和 27.39%; 而 0.1、1.0 mmol/L Put 在处理的第 8 天达最大值, 分别比对照增加了 26.22%和 80.50%。

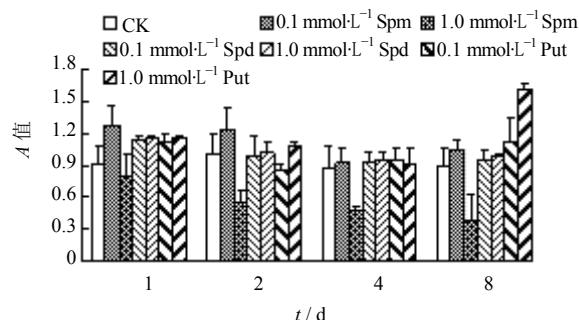


图 1 外源多胺对白桦悬浮细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of exogenous polyamine on cell viability of *B. platyphylla* suspension cells

由此可知, 多胺对白桦细胞活力的影响存在种类和浓度效应, 其中 Put 的促进效应最大。

3.2 外源多胺对白桦悬浮细胞干质量和三萜积累的影响

0.1、1.0 mmol/L Put、Spm 和 Spd 处理 1~8 d 后, 白桦悬浮细胞干质量、三萜量和产量 (三萜产量=三萜量×干质量) 的变化见表 1。外源多胺对白桦悬浮细胞干质量的积累趋势与细胞活力变化基本相同, 除 1.0 mmol/L Spm 处理使三萜量和三萜产量降低了外, 其余处理均不同程度促进了干质量的积累, 且随处理时间延长, 干质量积累呈增加趋势。其中, 0.1、1.0 mmol/L Put 在处理第 2 天增幅最大, 分别比对照增加了 17.28%和 38.89%。

3 种多胺均不同程度的促进了三萜的合成。其中, 1.0 mmol/L Spd 在处理第 1 天达最高值, 比对照增加了 61.01%; 0.1 mmol/L Spm, 0.1 mmol/L Spd,

表 1 多胺对白桦悬浮细胞干质量和三萜合成的影响

Table 1 Effect of polyamine on dry weight and triterpenoid synthesis of *B. platyphylla* suspension cells

处理	处理时间 / d	处理方法	干质量 / (g·L ⁻¹)	三萜量 / (mg·g ⁻¹)	三萜产量 / (mg·L ⁻¹)
1	1	CK	1.68±0.22	8.24±0.24	13.87±0.41
2	1	0.1 mmol·L ⁻¹ Spm	1.52±0.07	9.84±0.24	14.99±0.37
3	1	1.0 mmol·L ⁻¹ Spm	1.15±0.10	10.35±0.21	11.97±0.25
4	1	0.1 mmol·L ⁻¹ Spd	1.64±0.21	10.32±0.26	17.02±0.43
5	1	1.0 mmol·L ⁻¹ Spd	1.45±0.24	13.26±0.14	19.30±0.21
6	1	0.1 mmol·L ⁻¹ Put	1.74±0.05	11.83±0.07	20.64±0.13
7	1	1.0 mmol·L ⁻¹ Put	1.87±0.26	12.10±0.30	22.73±0.57
8	2	CK	1.62±0.18	7.62±0.23	12.35±0.38
9	2	0.1 mmol·L ⁻¹ Spm	2.10±0.26	9.18±0.19	19.35±0.39
10	2	1.0 mmol·L ⁻¹ Spm	1.21±0.13	8.68±0.16	10.50±0.20
11	2	0.1 mmol·L ⁻¹ Spd	1.62±0.03	9.82±0.08	15.93±1.31
12	2	1.0 mmol·L ⁻¹ Spd	1.94±0.03	9.28±0.21	18.03±0.40
13	2	0.1 mmol·L ⁻¹ Put	1.90±0.28	11.32±0.15	21.51±0.33
14	2	1.0 mmol·L ⁻¹ Put	2.25±0.28	11.87±0.17	26.71±0.34
15	4	CK	2.00±0.04	10.66±0.15	21.32±0.30
16	4	0.1 mmol·L ⁻¹ Spm	1.98±0.06	11.92±0.09	23.70±1.82
17	4	1.0 mmol·L ⁻¹ Spm	1.03±0.11	10.46±0.19	10.78±1.99
18	4	0.1 mmol·L ⁻¹ Spd	2.08±0.18	13.23±0.20	27.56±1.62
19	4	1.0 mmol·L ⁻¹ Spd	1.63±0.04	12.53±0.08	20.55±1.38
20	4	0.1 mmol·L ⁻¹ Put	2.13±0.19	12.71±0.12	27.17±2.54
21	4	1.0 mmol·L ⁻¹ Put	2.26±0.22	12.76±0.10	28.92±2.22
22	8	CK	3.24±0.26	9.52±0.14	30.92±0.45
23	8	0.1 mmol·L ⁻¹ Spm	3.43±0.07	8.71±0.32	29.92±1.11
24	8	1.0 mmol·L ⁻¹ Spm	1.29±0.07	13.09±0.12	16.98±1.54
25	8	0.1 mmol·L ⁻¹ Spd	3.28±0.14	11.01±0.17	36.16±0.54
26	8	1.0 mmol/L Spd	3.13±0.06	10.35±0.23	32.51±0.73
27	8	0.1 mmol/L Put	3.54±0.21	9.13±0.15	32.38±0.53
28	8	1.0 mmol/L Put	3.28±0.48	10.21±0.06	33.57±1.95

0.1、1.0 mmol/L Put 在处理第 2 天达最高值, 分别比对照增加了 20.46%、28.86%、48.56%; 同样, 在多胺处理后第 2 天达最大值。其中, 0.1、1.0 mmol/L Put 在处理第 2 天增幅最大, 分别比对照增加了 74.23%和 116.35%。

3.3 外源多胺对 LUS 基因表达的影响

结果显示, 外源多胺在处理 2 d 后三萜积累量达最大值。白桦悬浮细胞三萜的主要成分之一为白桦酯醇, 其合成关键酶羽扇醇合酶的基因 LUS 已被克隆。为进一步从转录水平验证外源多胺对白桦三萜合成的影响, 本课题组利用 RT-PCR 方法分析了外源多胺对 LUS 基因表达的影响。研究发现, LUS 基因表达对多胺的响应趋势与三萜积累相同 (图 2), 其中, 1.0 mmol/L Spd 和 1.0 mmol/L Put 促进效应最大, 分别比对照增加了 50.03%和 35.71%。

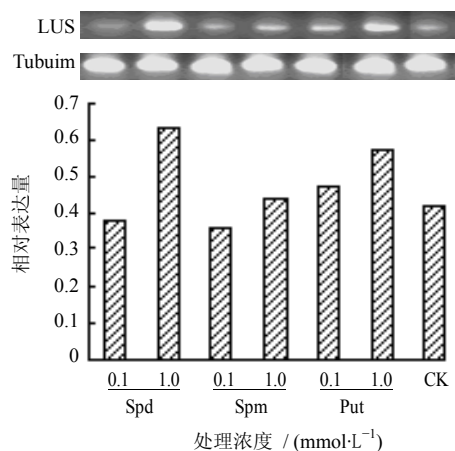


图 2 外源多胺对 LUS 基因表达的影响

Fig. 2 Effect of exogenous polyamine on LUS gene expression

4 讨论

多胺 (polyamines, PAs) 是生物代谢过程中产生的一类具有生物活性的低相对分子质量脂肪族含氮碱, 是 Put、Spd、Spm 和尸胺 (Cad) 的总称, 广泛存在于生物有机体中。PAs 作为一种生理活性物质, 与植物的生长发育、形态建成和胁迫响应关系密切^[15-16]。许多研究表明, 适当浓度的多胺能促进细胞及组织生长^[17-19]。本研究也发现, 除 1.0 mmol/L Spm 处理外, Put 和 Spd 均促进了白桦细胞干质量增加。进一步分析 PAs 对白桦悬浮细胞活力的影响发现, Put 和 Spd 处理增加了白桦悬浮细胞活力, 1.0 mmol/L Spm 处理却降低了白桦悬浮细胞活力。由此初步推断, Put 和 Spd 处理后白桦悬浮细胞干质量积累的增加可能是由于其细胞活力增加所致。

PAs 和次生代谢物质积累均是植物逆境下的表征, 二者是否有关联呢? 研究发现, 外源 Spd 和 Put 显著提高了甜菜毛状根中甜菜素产量^[17], 外源 Spm 显著增加了利马豆中挥发性萜类物质^[18]。本实验的研究结果也显示, 外源 Put、Spm 和 Spd 均能促进白桦悬浮细胞中三萜的合成, 其中 1.0 mmol/L Put 促进效果最佳, 在诱导后第 2 天三萜量比对照增加了 55.77%, 三萜产量增加了 116.35%。同时, 从转录水平进一步证实了 PAs 对白桦三萜积累的促进效应。由此可知, 外源 PAs 可促进植物次生代谢物质的积累, 且此促进存在种类和浓度效应。

综上所述, 外源 PAs 可促进白桦悬浮细胞生长和三萜积累, 是同时促进细胞生长和次生代谢物积累的多胺诱导子, 从而为有效解决植物细胞培养生产次生代谢物质的低产问题提供了思路, 下一步将深入研究 Put 促进三萜积累的机制。

参考文献

- [1] 胡立勇. 紫草细胞培养生产紫草素的研究 [J]. 栽培与育种, 2004, 27(5): 313-314.
- [2] 刘春朝, 王玉春, 欧阳藩. 植物组织培养生产有用次生代谢产物的研究进展 [J]. 生物技术通报, 1997(5): 1-3.
- [3] 尹作鸿, 朱蔚华. 植物组织与细胞培养生产有用次生代谢产物研究进展 [J]. 中药材, 1992, 15(4): 43-45.
- [4] 郭肖红, 高文远, 陈海霞, 等. 药用植物培养高产细胞系的选育 [J]. 世界科学技术, 2005, 7(1): 60-66.
- [5] 钱丹丹, 龚德顺, 焦丽, 等. 大豆异黄酮合成关键酶基因的克隆及表达分析 [J]. 大豆科学, 2011(5): 743-748.
- [6] 罗凯, 胡廷章, 罗建平. 植物细胞培养生产次生代谢产物的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2338-2340.
- [7] 徐茂军. 药用植物细胞次生代谢产物合成信号转导机制研究进展 [J]. 细胞生物学杂志, 2009, 5: 651-657.
- [8] Wiktorowska E, Długosz M, Janiszowska W. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2010, 46(1): 14-20.
- [9] Bahabadi S E, Sharifi M, Behmanesh M, et al. Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album* [J]. *J Plant Physiol*, 2012, 169(5): 487-491.
- [10] 范桂枝, 翟俏丽, 于海娣, 等. 白桦细胞悬浮培养产三萜及其营养成分消耗的动态 [J]. 林业科学, 2011, 47(1): 62-67.
- [11] Fan G Z, Li X C, Wang X D, et al. Chitosan activates

- defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. [J]. *Afr J Biotechnol*, 2010, 9(19): 2816-2820.
- [12] 王晓东, 李晓灿, 翟俏丽, 等. 真菌诱导子对白桦悬浮体系中N和P的吸收利用和三萜合成的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2119-2124.
- [13] 刘 华, 梅兴国. TTC 法测定红豆杉细胞活力 [J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 537-539.
- [14] Zhai Q L, Fan G Z, Zhan Y G. Significant enhancement of triterpenoids production by *Phomopsis* elicitors in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. [J]. *Adv Mater Res*, 2011, 335/336: 105-110.
- [15] Takahashi T, Kakehi J I. Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses [J]. *Ann Bot*, 2010, 105: 1-6.
- [16] 刘 颖, 王 莹, 龙 萃, 等. 植物多胺代谢途径研究进展 [J]. 生物工程学报, 2011, 27(2): 147-155.
- [17] Hwang S J, Kim K S, Pyo B S, *et al.* Saponin production by hairy root cultures of *Panax ginseng* CA Meyer: influence of PGR and polyamines [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 1999, 4: 309-312.
- [18] Ozawa R, Berteau C M, Foti M, *et al.* Exogenous polyamines elicit herbivore-induced volatiles in lima bean leaves: involvement of calcium, H₂O₂ and jasmonic acid [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(12): 2183-2199.
- [19] Suresh B, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, *et al.* Polyamine and methyl jasmonate influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments [J]. *Process Biochem*, 2004, 39: 2091-2096.