

## 丙二酰基人参皂苷对南洋参和线叶南洋参细胞生长及皂苷积累的影响

吕思琴<sup>1</sup>, Nosov Aleander Mihaylovich<sup>2,3</sup>, Eugene A. Rogozhin<sup>4</sup>, Andrey A. Gontcharov<sup>5</sup>, 杨玲<sup>1,6\*</sup>

1. 东北林业大学林学院, 林木遗传育种全国重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 莫斯科国立罗门诺索夫大学 生物系, 莫斯科 119991

3. 俄罗斯科学院植物生理研究所 细胞生物学实验室, 莫斯科 127276

4. 俄罗斯科学院生物有机化学研究所 植物防御肽实验室, 莫斯科 117997

5. 俄罗斯科学院远东分院联邦陆地生物多样性中心, 海参崴 690020

6. 深圳北理莫斯科大学 生物系, 植物生物学实验室, 广东 深圳 518172

**摘要:** 目的 以南洋参 *Polyscias fruticosa* 和线叶南洋参 *P. filicifolia* 的悬浮培养细胞为研究对象, 研究在细胞培养过程中, 丙二酰基人参皂苷 (malonyl ginsenoside, M-GS) 对细胞生长及皂苷合成的影响, 以促进南洋参悬浮培养细胞的皂苷合成和积累。方法 以南洋参和线叶南洋参的细胞系 (编号 6a 和 VDK) 为试验材料, 在悬浮培养的第 7 天添加 M-GS, 分析添加 M-GS 对细胞生长以及细胞中多糖苷 E、人参皂苷 R0、多糖苷 A 和齐墩果酸皂苷 A 含量的影响。结果 M-GS 对南洋参和线叶南洋参的生长均具有抑制作用, 使其不能长期生存。M-GS 可使南洋参 6a 细胞系的细胞密度以及干质量峰值提前出现, 使细胞活力提前开始下降, 缩短了细胞的培养周期。而线叶南洋参 VDK 细胞系的细胞密度、鲜质量以及干质量的峰值延迟出现, 延长了细胞的培养周期。M-GS 对南洋参 6a 细胞系的抑制作用比线叶南洋参 VDK 更强。在培养末期南洋参 6a 细胞系的细胞密度、活力、鲜质量以及干质量分别降低了 25.43%、22.23%、46.56% 以及 45.56%。M-GS 对南洋参和线叶南洋参细胞中皂苷积累的影响不同。对于南洋参 6a 细胞系, M-GS 促进细胞中多糖苷 E、多糖苷 A、齐墩果酸皂苷 A 的合成, 且对多糖苷 E 的促进能力最强 (提高了 79.67%), 其次为齐墩果酸皂苷 A (提高了 70.67%), 最后为多糖苷 A (提高了 19.67%), 同时抑制了人参皂苷 R0 的含量 (降低了 74.00%)。对于线叶南洋参 VDK 细胞系, M-GS 只促进了细胞中多糖苷 A 的合成, 使其含量增加了 63.29%, 却抑制了细胞中多糖苷 E、多糖苷 A、齐墩果酸皂苷 A 的合成, 且对多糖苷 A 抑制能力最强 (降低了 63.29%), 其次为多糖苷 E (减低了 27.59%), 最后为齐墩果酸皂苷 A (减低了 8.33%)。结论 添加 M-GS 可以促进南洋参和线叶南洋参悬浮培养细胞的部分种类皂苷积累, 但不宜于细胞长期培养; 且 M-GS 对不同物种细胞系细胞中不同皂苷的影响不同, 对南洋参 6a 细胞系的促进能力高于线叶南洋参 VDK 细胞系。因此在南洋参和线叶南洋参细胞悬浮培养中可根据培养细胞系和目的产物不同选择使用 M-GS 以提高目的皂苷产量。

**关键词:** 南洋参; 线叶南洋参; 细胞培养; 丙二酰基人参皂苷; 多糖苷 E; 人参皂苷 R0; 多糖苷 A; 齐墩果酸皂苷 A

**中图分类号:** R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)23-8171-14

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.023

## Effects of malonyl-ginsenosides on cell growth and saponin accumulation of *Polyscias fruticosa* and *Polyscias filicifolia*

LYU Siqin<sup>1</sup>, Nosov Alexander Mihaylovich<sup>2,3</sup>, Eugene A. Rogozhin<sup>4</sup>, Andrey A. Gontcharov<sup>5</sup>, YANG Ling<sup>1,6</sup>

1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2. Department of Plant Physiology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia

3. Department of Cell Biology, Institute of Plant Physiology K.A. Timiryazev, Russian Academy of Sciences, Moscow 127276, Russia

4. Plant Defense Peptide Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow 117997, Russia

5. Federal Centre for Land Biodiversity, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690020, Russia

6. Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen 518172, China

收稿日期: 2024-05-06

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFD2200103)

作者简介: 吕思琴 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物细胞培养的研究。

\*通信作者: 杨玲 (1977—), 女, 教授, 博士, 博士生导师, 主要研究方向为树木繁育生物学与技术、森林定向培育理论与技术。

Tel: 13351988824 E-mail: yangl-cf@nefu.edu.cn

**Abstract: Objective** With suspension cultured cells of *Polyscias fruticosa* and *P. filicifolia* as research objects, we explored the effects of malonyl ginsenosides (M-GS) on the cell growth and saponin synthesis during the cell culture to promote the synthesis and accumulation of saponin in suspension cultured cells of *P. fruticosa*. **Methods** Cell lines (6a and VDK) of *P. fruticosa* and *P. filicifolia* were used as experimental materials. M-GS was added on 7th day of the suspension culture to analyze the effects of M-GS addition on the cell growth and contents of polyscioside E, ginsenoside R0, polyscioside A and ladyginoside A saponins in cells. **Results** M-GS could inhibit the growth of *P. fruticosa* and *P. filicifolia*, preventing their long-term survival. M-GS brought forward the peak of cell density and dry weight of 6a cell line of *P. fruticosa*, causing the cell viability to start declining earlier, and shortening the cell culture cycle. While the peak values of cell density, fresh weight and dry weight of VDK cell line were delayed, which prolonged the cell culture cycle. The inhibitory effect of M-GS on 6a cell line was stronger than that of VDK. The cell density, vitality, fresh weight and dry weight of 6a cell line decreased by 25.43%, 22.23%, 46.56% and 45.56%, respectively. The effects of M-GS on the accumulation of saponins in the cells of *P. fruticosa* and *P. filicifolia* were different. For the cell line 6a of *P. fruticosa*, M-GS promoted the synthesis of Polyscioside E, Polyscioside A and Ladyginoside A saponins, and the promotion was the strongest for Polyscioside E saponins (increased by 79.67%), followed by ladyginoside A saponins (increased by 70.67%) and polyscioside A saponins (increased by 19.67%). However, the content of ginsenoside R0 saponins was inhibited (reduced by 74.00%). For the VDK cell line of *Panax lineolata*, M-GS only promoted the synthesis of Polyscioside A saponins, increasing its content by 63.29%, but inhibited the synthesis of polyscioside A, Polyscioside A and Ladyginoside A saponins, and had the strongest inhibition on polyscioside A saponins (decreased by 63.29%), followed by Polyscioside A saponins (decreased by 27.59%) and Ladyginoside A saponins (decreased by 8.33%). **Conclusion** The addition of malonyl ginsenosides can promote the accumulation of some kinds of saponins in suspension cultured cells of *P. fruticosa* and *P. filicifolia*, but it is not suitable for the long-term cell culture. Moreover, the effects of malonyl-ginsenosides on different saponins in different cell lines were different, with a higher promotional ability on 6a cell line than on the VDK cell line. Therefore, malonyl ginsenosides can be selected to increase the yield of target saponins in cell suspension culture of *P. fruticosa* and *P. filicifolia* according to different cell lines and target products.

**Key words:** *Polyscias fruticosa* (L.) Harms; *Polyscias filicifolia* (Ridley) Bailey; plant cell culture; malonyl ginsenoside; polyscioside E; ginsenoside R0; polyscioside A; ladyginoside A

南洋参 *Polyscias fruticosa* (L.) Harms 为五加科南洋参属常绿灌木或小乔木，因其叶片、茎干长相优美，被广泛种植于东南亚及太平洋地区的热带岛屿，成为较为常见的观赏植物<sup>[1]</sup>。南洋参的次生代谢物中含有皂苷、多酚、类黄酮和维生素等物质<sup>[2]</sup>，使其具有多种功效；被作为重要的药用植物，其叶片<sup>[3-5]</sup>可抗氧化、抗炎、抗菌和助消化等；其根部<sup>[6]</sup>可抗痢疾、缓解神经痛和风湿性疼痛、利尿等。且从其叶片中提取的齐墩果酸皂苷及其根部提取的多聚乙炔均具有抗菌和抗真菌作用<sup>[5]</sup>，此外提取出的丙二酰基人参皂苷具有抗糖尿病、调血脂和保护神经系统等作用<sup>[7]</sup>。南洋参作为传统医学和制药工业的重要原材料，有极大的市场需求，但由于近年气候恶化的影响，天然南洋参的栖息地正面临不受控制的退化和丧失问题。此外，提取南洋参中的次生代谢物较为困难且效率较低，无法达到市场需求，如何提高南洋参的繁殖率及次生代谢物的提取率成为近年来研究的重难点。

在植物离体培养细胞中加入目的化合物的前体物质是提高次生代谢物产量的有效途径（即前体饲

喂技术）。目前已有许多药用植物通过利用前体饲喂技术提高了次生代谢产物的产量<sup>[8-10]</sup>。研究发现丙酮酸钠前体可提高人参皂苷的含量<sup>[11]</sup>和西洋参 *Panax quinquefolium* L. 细胞培养物生长量<sup>[12]</sup>以及人参 *P. ginseng* C. A. Mey 中人参皂苷 Rb<sub>2</sub><sup>[14]</sup>的产量。乙酸钠前体可以促进西洋参细胞的生长<sup>[13]</sup>以及促使产人参皂苷的菌株 GE-15 产生原人参三醇 (PPT)<sup>[14]</sup>。Fett-neto 等<sup>[15]</sup>也发现苯丙氨酸、苯甲酸、*N*-苯甲酰甘氨酸、丝氨酸或甘氨酸对红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd 愈伤组织培养以及悬浮培养的细胞中紫杉醇的合成有明显的促进作用。

目前已有大量关于南洋参属植物的组织培养和细胞悬浮培养及次生代谢产物的研究<sup>[16]</sup>，并发现许多提高皂苷提取率的方法，比如超声波辅助法<sup>[17]</sup>。但通过前体饲喂来增加皂苷产量的研究还处于起步阶段。本实验以南洋参和线叶南洋参 *P. filicifolia* (Ridley) Bailey 的悬浮培养细胞系（6a 和 VDK）的细胞为试验材料，研究在细胞生长过程中，丙二酰基皂苷 (malonyl ginsenoside, M-GS) 对细胞生长及皂苷合成产生的影响。旨在保持南洋参和线叶南洋

参细胞分裂和生长旺盛的同时提高皂苷的产量,从而使细胞培养物作为完整植物的补充或替代品,解决原料短缺的问题,为实现生产的工业化和标准化并控制目标产品的形成过程,以及开发生产可再生植物原料的方法和创造富含次生代谢物的细胞生产的新生物技术奠定基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 试剂与材料

采用南洋参细胞系 6a 和线叶南洋参细胞系 VDK (由莫斯科国立罗门诺索夫大学生物系、俄罗斯科学院植物生理研究所细胞生物学实验室教授 Nosov Alexander Mihaylovich 鉴定) 作为试验材料。南洋参细胞系 6a 来源于 2006 年从其叶片获取的悬浮培养细胞<sup>[18]</sup>。线叶南洋参细胞系 VDK 来源于 1992 年从其叶片获得的细胞系 BFT-01-95 (“收集”细胞系),其在全俄罗斯高等植物细胞培养物保藏中心 (VKKKVR) 中注册,编号为 58<sup>[18]</sup>。MS 培养基 (批号 HHE0519393A)、6-苄氨基嘌呤 (6-BA, 批号 HCX0130033A) 以及 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D, 批号 HCW0295034A) 均购买于美国 PhytoTech 有限公司。肌醇 (批号 A600536-0100)、酪蛋白水解物 (批号 01182005)、蔗糖 (批号 S48029)、M-GS (批号 B75766) 均购买哈尔滨泰思格生物科技有限公司。

### 1.2 仪器

分析型高效液相色谱仪 (Agilent Technologies 1200 series); Centrifuge 5425 F 型离心机 (Eppendorf 公司); ZQPL-200 型摇床 (Wlabotery 公司)

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

2 个物种的细胞系均在 MS 培养基上进行培养,添加酪蛋白水解物 (0.5 g/L)、肌醇 (0.1 g/L)、3% 蔗糖、6-BA (1 mg/L) 和 2,4-D (2 mg/L)。在 250 mL 的三角瓶中添加 30~40 mL 悬浮培养液,在黑暗中 26 °C、摇床上 (100 r/min) 进行培养,为对照组 (CK)。在培养的第 7 天,在培养液中添加 100 mg/L M-GS,观察记录添加 M-GS 后 10 d 内细胞的生长变化以及皂苷的含量变化。

### 2.2 细胞密度与活力的测定

采用细胞计数板的方法来测定细胞的活力和密度,方法参考陈甲美等<sup>[19]</sup>方法。待测细胞悬液和台盼蓝染色液以 1:1 混合均匀后滴加在细胞计数板上,计数细胞总数。台盼蓝可将死细胞染成蓝色,而活细胞不被染色,以此来区分活细胞与死细胞。

从而计算细胞的活力。

$$\text{细胞个数} = 4 \text{ 个大方格内细胞总数} / 2 \times 10\,000$$

$$\text{生活力} = \text{活细胞数量} / \text{总细胞数量} \times 100$$

### 2.3 细胞生物量的测定

在培养过程中每隔 3 d 随机取出 3 瓶培养物样品,用布氏漏斗进行抽滤,用蒸馏水洗涤 2 次并抽干,在万分之一的光电分析天平上称定质量,此为鲜质量<sup>[20]</sup>,之后将培养物置于 45 °C 的烘箱中烘干 3 d 至恒定质量,称其质量,即为干质量。

### 2.4 皂苷提取与测定

培养细胞系的皂苷提取和测定以烘干后的干细胞为材料,在黑龙江出入境检验检疫局检验检疫技术中心完成皂苷提取和测定。

**2.4.1 样品溶液的制备** 精确称取样品 0.1 g,加入 1 mL 纯甲醇后,放置在超声波震荡仪中避光超声 30 min 后,10 000 r/min,离心 6 min,提取上清液。残渣中再加入 1 mL 纯甲醇,并避光超声 30 min 后,离心 6 min,提取上清液,合并 2 次提取液。取 1 mL 提取液置于氮吹管中,氮吹至干后,用甲醇-磷酸二氢钾 (5:95) 定容至 1 mL 后,采用 0.22 μm 有机膜进行滤过,获得混合皂苷提取液。

**2.4.2 对照品溶液的制备** 所采用的对照品为南洋参细胞系 6a 培养 0 d 时的细胞 (其多糖苷 E、人参皂苷 R0、多糖苷 A、齐墩果酸皂苷 A 的初始质量分数分别为 1.65、0.05、0.45、0.25 mg/g)<sup>[18]</sup>,精确称取对照品 0.1 g,按“2.4.1”项制备对照品溶液。

**2.4.3 色谱条件** 色谱柱体积流量 1.0 mL/min;柱温 35 °C;检测波长 207 nm;进样量 20 μL;流动相为 20 mmol/L 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水 (A)-乙腈 (B) 溶液,0~3 min,20% A;3~3.5 min,20%~22% A;3.5~14 min,22%~26% A;14.5~15 min,26%~29% A;15~26 min,29%~36% A;26~27 min,36%~90% A;27~29 min,100% B。

**2.4.4 方法学考察** 根据参考文献方法<sup>[18]</sup>进行方法学考察,结果表明,精密度、重复性、稳定性、加样回收率试验均符合试验要求。

### 2.5 次生代谢产物含量的计算

以南洋参 6a 细胞系细胞培养 0 d 时为参照物,根据公式 (2) 计算样品的 C<sub>2</sub> 值后代入公式 (1) 计算,最终计算出次生代谢产物的含量。

$$\text{代谢产物量} = C_2 \times V_1 \times V_2 \times m \quad (1)$$

C<sub>2</sub> 为根据标准品的浓度计算得到的样品的浓度;V<sub>1</sub> 为

上样体积； $V_2$  为浸提液的体积； $m$  为称取样品的质量。

$$C_2 = C/A \times A_2 \quad (2)$$

$C$  为样品的浓度值， $A$  为样品的峰面积； $A_2$  为标准物质的峰面积。

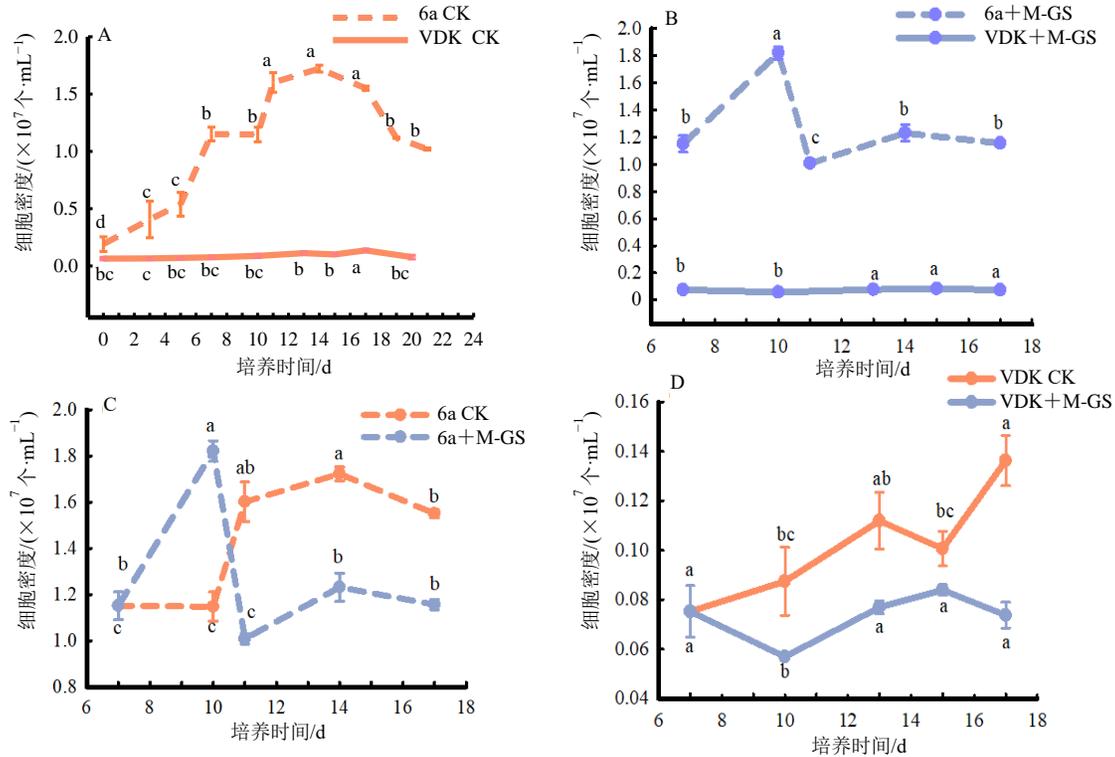
### 3 结果与分析

#### 3.1 M-GS 对细胞生长的影响

**3.1.1 M-GS 对细胞密度的影响** 未添加 M-GS 时 (图 1-A)，随着培养时间的延长，南洋参细胞系 6a 和线叶南洋参细胞系 VDK 的细胞密度整体上均呈现先上升后下降的趋势，并分别于培养的第 14、17 天，细胞密度出现峰值 (南洋参细胞系 6a 为  $1.60 \times 10^7$  个/mL、线叶南洋参细胞系 VDK 为  $1.1 \times 10^6$  个/mL)。在培养的末期，南洋参细胞系 6a 的密度与线叶南洋参 VDK 细胞系的密度之间存在着显著的差异 ( $P < 0.05$ )，且南洋参细胞系 6a

的细胞密度高于南洋参细胞系 VDK 1 222.02%。在培养的第 7 天添加 M-GS 之后 (图 1-B)，南洋参 6a 细胞系和线叶南洋参 VDK 细胞系的细胞密度变化与 CK 组响应一致。在培养末期，南洋参 6a 细胞系的密度与线叶南洋参 VDK 细胞系的密度之间存在着显著的差异 ( $P < 0.05$ )，且南洋参 6a 细胞系的细胞密度高于线叶南洋参 VDK 细胞系 1 468.52%。

M-GS 对 2 个物种悬浮培养细胞系细胞密度的影响不同。在培养的第 7 天添加 M-GS 之后，南洋参 6a 细胞系 (图 1-C) 的细胞密度峰值提前 4 d (即在培养的第 10 天) 出现，为  $1.8213 \times 10^7$  个/mL，比 CK 高 58.72%。线叶南洋参 VDK 细胞系 (图 1-D) 的细胞密度峰值提前 2 d (即在培养的第 15 天) 出现，为  $8.39 \times 10^5$  个/mL，比 CK 低 31.11%。



A-未添加 M-GS 时 2 个细胞系细胞密度的变化情况；B-培养第 7 天添加 M-GS 后 2 个细胞系细胞密度的变化情况；C-南洋参 6a 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞密度的变化情况；D-线叶南洋参 VDK 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞密度的变化情况；不同小写字母表示不同培养天数之间细胞密度差异显著 ( $P < 0.05$ )。

A-changes in cell density of two cell lines without adding malonyl saponins; B-changes in cell density of the two cell lines after the addition of M-GS on day 7 of culture; C-changes in cell density without addition of 6a cell line and with addition of M-GS; D-changes in cell density of VDK cell lines without and after M-GS addition. Different lowercase letters indicate significant difference in cell density between different culture days ( $P < 0.05$ ).

图 1 南洋参 6a 和线叶南洋参 VDK 细胞悬浮培养过程中添加 M-GS 前后细胞密度变化

Fig. 1 Changes in cell density of *P. fruticososa* 6a and *P. filicifolia* VDK before and after adding M-GS during cell suspension culture

在培养的末期，添加 M-GS 之后的 2 个物种悬浮培养细胞系的细胞密度与 CK 之间均存在显著的差异性 ( $P < 0.05$ )，且 2 个细胞系的细胞密度均低于 CK (南洋参 6a 细胞系低了 25.43%、线叶南洋参 VDK 细胞系低了 45.95%)。由此可知 M-GS 对南洋参和线叶南洋参悬浮培养细胞的细胞密度具有抑制作用，且对线叶南洋参 VDK 细胞系的抑制作用更强一些。

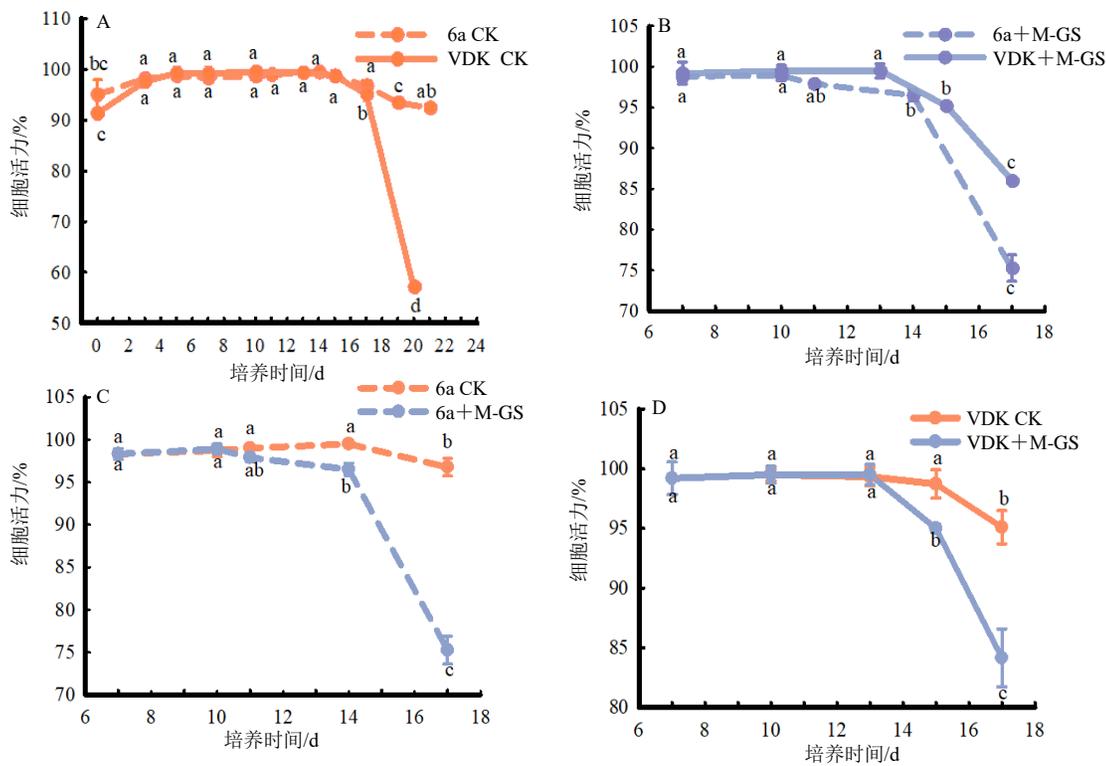
**3.1.2 M-GS 对细胞活力的影响** 未添加 M-GS 时 (图 2-A)，随着培养时间的延长，南洋参 6a 细胞系和线叶南洋参 VDK 细胞系的细胞活力在培养初期均保持不变，后分别在培养的第 13 天和第 14 天 (即细胞密度峰值) 时开始下降，在培养的末期，2 个细胞系的活力之间的差异显著 ( $P < 0.05$ )，且南洋参 6a 细胞系的活力高于线叶南洋参 VDK 细胞系 61.76%。在培养的第 7 天添加 M-GS 后 (图 2-B)，

2 个细胞系的细胞活力与 CK 变化趋势一致。在培养末期，2 个细胞系的细胞活力的差异显著 ( $P < 0.05$ )，但南洋参 6a 细胞系的密度却低于线叶南洋参 VDK 细胞系 14.24%。

M-GS 对 2 个细胞系的活力影响不同。在培养的第 7 天添加 M-GS 后，南洋参 6a 细胞系 (图 2-C) 的活力提前 4 d (即培养的第 10 天) 开始下降，而线叶南洋参 VDK 细胞系 (图 2-D) 无明显变化。

在培养末期时，2 个细胞系的 CK 和添加 M-GS 后的细胞密度之间均存在显著的差异性 ( $P < 0.05$ )，且 2 个细胞系的活力比 CK 均有所下降 (南洋参 6a 细胞系降低了 22.23%，线叶南洋参 VDK 降低了 11.52%)。由此可知，M-GS 对南洋参细胞系 6a 的活力抑制作用较线叶南洋参 VDK 细胞系更大。

**3.1.3 M-GS 对细胞鲜质量的影响** 未添加 M-GS 时 (图 3-A)，随着培养时间的延长南洋参 6a 细胞

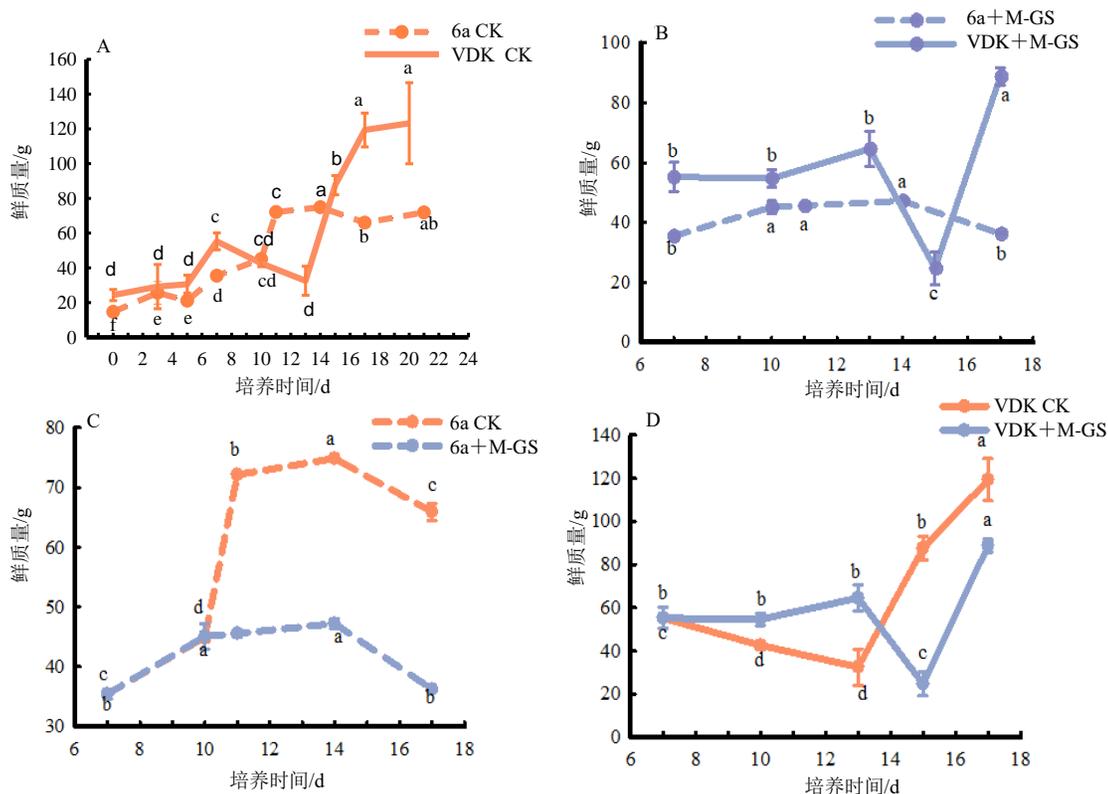


A-未添加 M-GS 时 2 个细胞系细胞活力的变化情况；B-在培养的第 7 天添加 M-GS 后 2 个细胞系细胞活力的变化情况；C-南洋参 6a 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞活力的变化情况；D-线叶南洋参 VDK 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞活力的变化情况；不同小写字母表示不同培养天数之间细胞活力差异显著 ( $P < 0.05$ )。

A-changes in cell viability of the two cell lines when M-GS was not added; B-changes in cell viability of the two cell lines after the addition of M-GS on the 7th day of culture; C-changes in cell viability of 6a cell line without and with M-GS addition; D-changes in cell viability of VDK cell lines without and after addition of M-GS. Different lowercase letters indicate significant difference in cell viability between different culture days ( $P < 0.05$ ).

图 2 南洋参 6a 和线叶南洋参 VDK 细胞悬浮培养过程中添加 M-GS 前后细胞活力变化

Fig. 2 Changes in cell viability of *P. fruticososa* 6a and *P. filicifolia* VDK before and after adding M-GS during cell suspension culture



A-未添加 M-GS 时 2 个细胞系细胞鲜质量的变化情况；B-在培养的第 7 天添加 M-GS 后 2 个细胞系细胞鲜质量的变化情况；C-南洋参 6a 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞鲜质量的变化情况；D-线叶南洋参 VDK 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞鲜质量的变化情况。不同小写字母表示不同培养天数之间细胞鲜质量差异显著 ( $P < 0.05$ )。

A-changes in fresh cell weight of the two cell lines when M-GS was not added; B-changes in fresh weight of the two cell lines after adding M-GS on the 7th day of culture; C-changes in cell fresh weight without adding 6a cell line and after adding M-GS; D-changes of fresh cell weight in VDK cell lines without and after adding M-GS. Different lowercase letters indicate significant difference in cell fresh weight between different culture days ( $P < 0.05$ ).

图 3 南洋参 6a 和线叶南洋参 VDK 细胞悬浮培养过程中添加 M-GS 前后细胞鲜质量变化

Fig. 3 Changes in fresh weight of *P. fruticosa* 6a and *P. filicifolia* VDK before and after adding M-GS during cell suspension culture

系和线叶南洋参 VDK 细胞系的鲜质量整体上呈现不断增加的趋势，但是线叶南洋参 VDK 细胞系却在培养的第 7~13 天时存在细胞鲜质量降低的过程，此时细胞密度正处于快速上升期，13 d 之后细胞密度开始降低，鲜质量也随之开始增加。在培养末期，南洋参 6a 细胞系和线叶南洋参 VDK 细胞系的鲜质量之间存在明显的差异性 ( $P < 0.05$ )，且线叶南洋参 6a 细胞系的鲜质量低于线叶南洋参 VDK 细胞系 73.74%。在培养的第 7 天添加 M-GS 后 (图 3-B)，2 个细胞系的鲜质量与 CK 响应相同，在添加 M-GS 的第 10 天 (培养的第 17 天) 时，南洋参 6a 细胞系和线叶南洋参 VDK 细胞系的鲜质量之间存在明显的差异 ( $P < 0.05$ )，且线叶南洋参 VDK 细胞系的鲜质量高于南洋参 6a 细胞系 71.51%。

M-GS 对 2 个物种不同细胞系的鲜质量影响

不同。在培养的第 7 天添加 M-GS 后，南洋参 6a 细胞系的鲜质量 (图 3-C) 开始与 CK 无明显的区别，在添加后的第 3 天 (即培养的第 10 天) 开始，低于 CK 但变化趋势与 CK 一致，并与 CK 同时出现峰值。线叶南洋参 VDK 细胞系的鲜质量 (图 3-D) 与 CK 的变化趋势相一致。在添加 M-GS 的第 10 天 (即培养的第 17 天) 时，2 个细胞系添加 M-GS 后的鲜质量与对照之间均存在显著差异 ( $P < 0.05$ )，且 2 个细胞系的鲜质量均低于 CK (南洋参 6a 细胞系低了 46.56%，VDK 细胞系低了 34.37%)。由此可知，M-GS 对南洋参细胞系 6a 的细胞鲜质量的抑制作用比线叶南洋参 VDK 细胞系的更强一些。

3.1.4 M-GS 对细胞干质量的影响 未添加 M-GS 时 (图 4-A)，随着培养时间的延长，南洋参 6a 细

胞系的干质量)与线叶南洋参 VDK 细胞系的干质量变化趋势均与鲜质量一致。在培养末期, 2 个细胞系的干质量之间存在明显的差异 ( $P < 0.05$ ), 且线叶南洋参 VDK 细胞系的干质量高出南洋参 6a 细胞系 90.00%。在培养的第 7 天添加 M-GS 后(图 4-B), 随着培养时间的延长, 南洋参 6a 细胞系和线叶南洋参 VDK 细胞系的干质量变化趋势一致, 在培养的末期, 2 个细胞系的干质量之间存在明显的差异 ( $P < 0.05$ ), 且线叶南洋参 VDK 细胞系的干质量高出南洋参 6a 细胞系 16.43%。

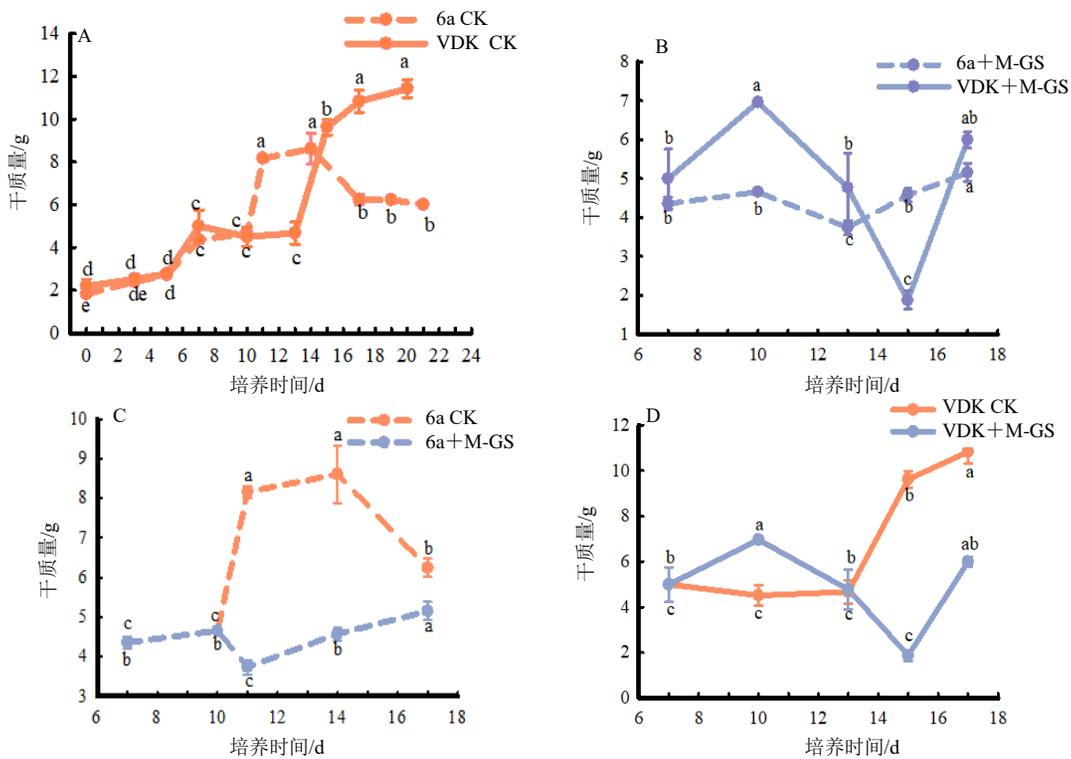
M-GS 对 2 个细胞系的干质量影响不同。在培养的第 7 天添加 M-GS 后, 南洋参 6a 细胞系(图 4-C)和线叶南洋参 VDK 细胞系(图 4-D)的干质量变化与鲜质量趋势相同, 南洋参 6a 细胞系的干质量在培养的第 7~10 天与 CK 无明显差别, 培养 10 d

之后低于 CK 水平上, 干质量峰值提前 4 d 出现。而线叶南洋参 VDK 细胞系的干质量与鲜质量趋势一致, 峰值推迟了 5 d 出现。在培养的末期, 添加 M-GS 后的 2 个细胞系的干质量与 CK 之间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 且 2 个细胞系的干质量均低于 CK (南洋参 6a 细胞系低了 46.56%, 线叶南洋参 VDK 细胞系低了 17.52%)。由此可知, M-GS 对南洋参细胞系 6a 细胞干质量的抑制作用比线叶南洋参细胞系 VDK 的更强一些。

### 3.2 M-GS 对细胞中皂苷含量的影响

#### 3.2.1 M-GS 对细胞中多糖苷 E 含量的影响

未添加 M-GS 时(图 5-A), 随着培养时间的延长, 南洋参 6a 细胞系的细胞中多糖苷 E 含量呈现先增加后减少再增加的趋势, 在第 10 天出现峰值(5.01 mg/L)。而线叶南洋参 VDK 细胞系的多糖

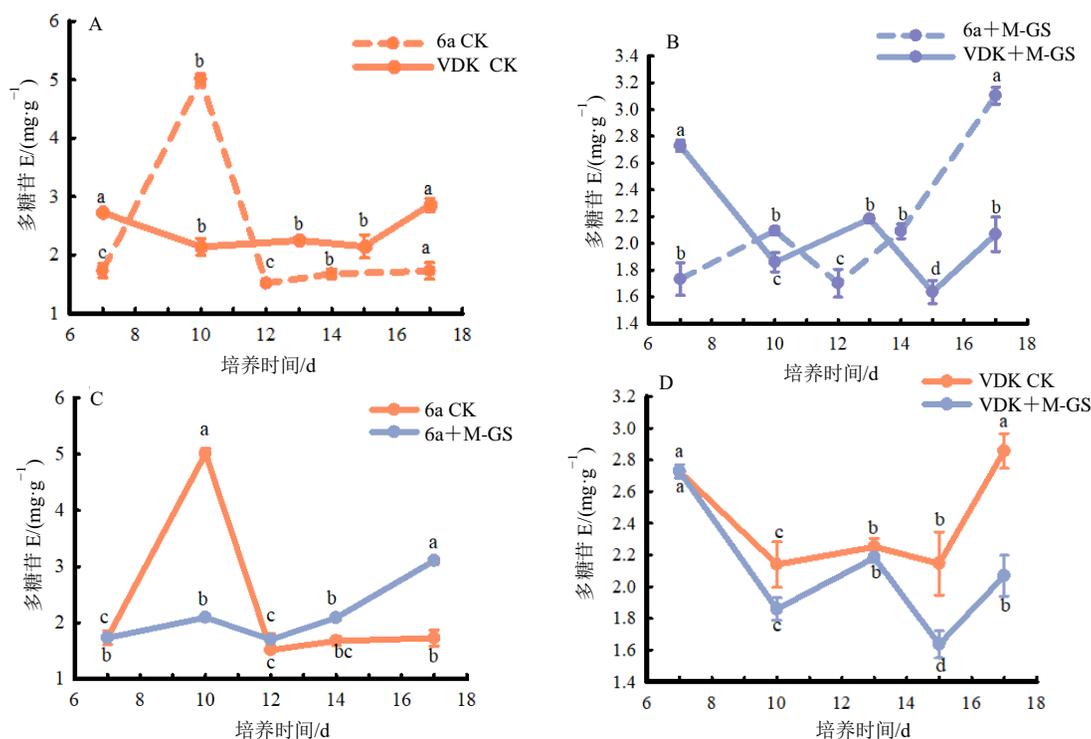


A-未添加 M-GS 时 2 个细胞系细胞干质量的变化情况; B-在培养的第 7 天添加 M-GS 后 2 个细胞系细胞干质量的变化情况; C-南洋参 6a 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞干质量的变化情况; D-线叶南洋参 VDK 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞干质量的变化情况; 不同小写字母表示不同培养天数之间细胞干质量差异显著 ( $P < 0.05$ )。

A-changes in dry weight of two cell lines without M-GS addition; B-changes in the dry weight of the two cell lines after the addition of M-GS on day 7 of culture; C-changes of cell dry weight without adding 6a cell line and after adding M-GS; D-changes in dry weight of VDK cell lines without and after the addition of M-GS. Different lowercase letters indicate significant difference in cell Dry Weight between different culture days ( $P < 0.05$ ).

图 4 南洋参 6a 和线叶南洋参 VDK 细胞悬浮培养过程中添加 M-GS 前后细胞干质量变化

Fig. 4 Changes in dry weight of *P. fruticosa* 6a and *P. filicifolia* VDK before and after adding M-GS during cell suspension culture



A-未添加 M-GS 时 2 个细胞系细胞中多糖苷 E 含量的变化情况；B-在培养的第 7 天添加 M-GS 后 2 个细胞系细胞中多糖苷 E 含量的变化情况；C-南洋参 6a 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞中多糖苷 E 含量的变化情况；D-线叶南洋参 VDK 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞中多糖苷 E 含量的变化情况。不同小写字母表示不同培养天数之间细胞中多糖苷 E 含量差异显著 ( $P < 0.05$ )。

A-change of polysaccharide E content in two cell lines without M-GS addition; B-changes of polysaccharide E content in the two cell lines after the addition of M-GS on the 7th day of culture; C-changes of polysaccharide E in 6a cell line without addition and after addition of M-GS; D-changes of polysaccharide E content in VDK cells without and after the addition of M-GS. Different lowercase letters indicate significant difference in polysaccharide E content between different culture days ( $P < 0.05$ ).

图 5 南洋参 6a 和线叶南洋参 VDK 细胞悬浮培养过程中添加 M-GS 前后细胞中多糖苷 E 含量变化

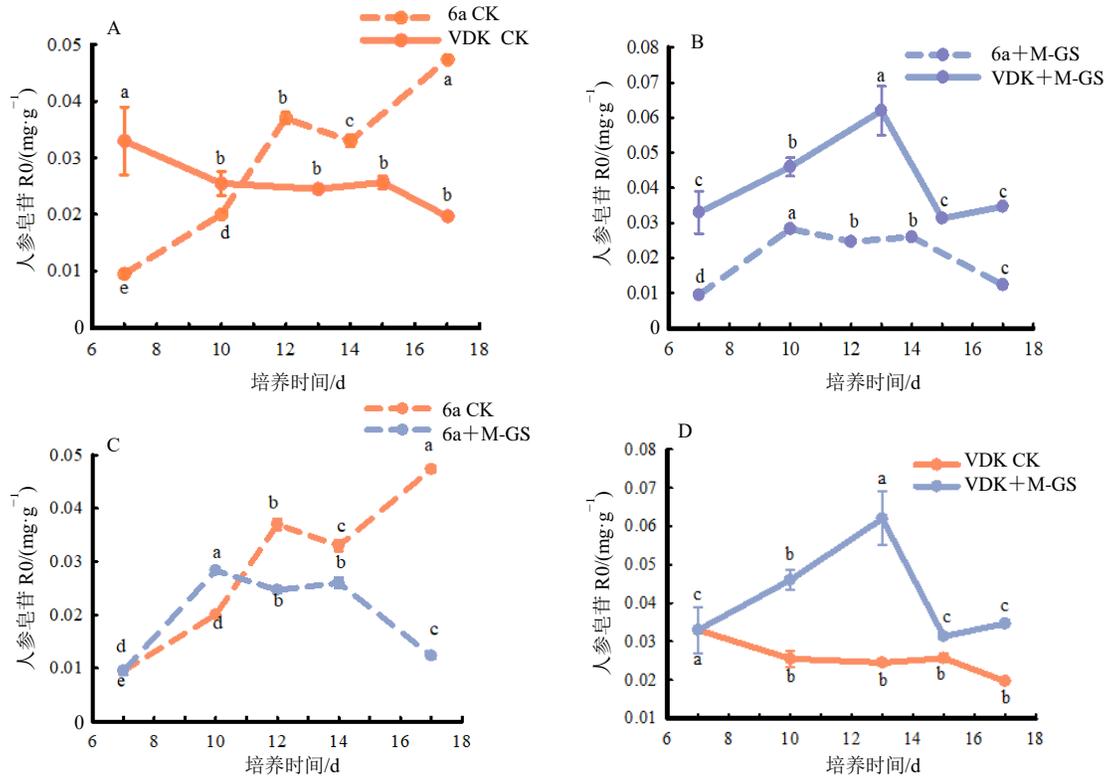
Fig. 5 Changes of ladyginoside A content of *P. fruticosus* 6a and *P. filicifolia* VDK cells before and after adding M-GS during cell suspension culture

苷 E 含量变化不明显。在培养末期时，二者之间存在明显的差异性 ( $P < 0.05$ )，此时线叶南洋参 VDK 细胞系中多糖苷 E 的含量低于南洋参 6a 细胞系 39.50%。在培养的第 7 天加入 M-GS 后 (图 5-B)，随着培养时间的延长，南洋参 6a 细胞系和线叶南洋参 VDK 细胞系的细胞中多糖苷 E 含量变化均与 CK 一致，且变化程度增大。在培养末期时，二者之间存在明显的差异 ( $P < 0.05$ )，此时线叶南洋参 VDK 细胞系中多糖苷 E 的含量低于南洋参 6a 细胞系 33.35%。

M-GS 对 2 个细胞系的细胞中多糖苷 E 含量的影响不同，在培养的第 7 天加入 M-GS 后，变化趋势与 CK 大致相同，但变化程度降低，且在培养的第 12 天之后，多糖苷 E 含量比 CK 的含量增加迅速。而线叶南洋参 VDK 细胞系 (图 5-D) 的多糖苷

E 含量低于 CK 且与 CK 变化一致。在培养的末期，南洋参 6a 细胞系细胞中的多糖苷 E 含量高于 CK 79.67%，而线叶南洋参 VDK 细胞系则相反，低于 CK 27.59%。由此可知，M-GS 对南洋参 6a 细胞系的细胞培养物中多糖苷 E 含量短期内有抑制作用，而对线叶南洋参 VDK 细胞系具有持续性抑制作用。但随着培养时间的延长，在培养末期，M-GS 对南洋参 6a 细胞系细胞中多糖苷 E 含量起促进作用。

**3.2.2 M-GS 对细胞中人参皂苷 R0 含量的影响** 未添加 M-GS 时 (图 6-A)，随着培养时间的延长，南洋参 6a 细胞系的细胞中人参皂苷 R0 含量呈现先增加后减少再增加的趋势，而线叶南洋参 VDK 细胞系的人参皂苷 R0 含量整体上不断减少。在培养末期时，二者之间存在明显的差异性 ( $P < 0.05$ )，此时线叶南洋参 VDK 细胞系中人参皂苷 R0 的含



A-未添加 M-GS 时 2 个细胞系细胞中人参皂苷 R0 含量的变化情况；B-在培养的第 7 天添加 M-GS 后 2 个细胞系细胞中人参皂苷 R0 含量的变化情况；C-南洋参 6a 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞中人参皂苷 R0 含量的变化情况；D-线叶南洋参 VDK 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞中人参皂苷 R0 含量的变化情况。不同小写字母表示不同培养天数之间细胞中人参皂苷 R0 含量差异显著 ( $P < 0.05$ )。

A-changes of ginsenoside Ro content in two cell lines without M-GS addition; B-changes of ginsenoside Ro content in the two cell lines after the addition of M-GS on the 7th day of culture; C-changes of ginsenoside Ro content in 6a cell line without addition and after addition of M-GS; D-changes of ginsenoside Ro in VDK cells without and after the addition of M-GS. Different lowercase letters indicate significant difference in ginsenoside Ro content between different culture days ( $P < 0.05$ ).

图 6 南洋参 6a 和线叶南洋参 VDK 细胞悬浮培养过程中添加 M-GS 前后细胞人参皂苷 R0 含量变化

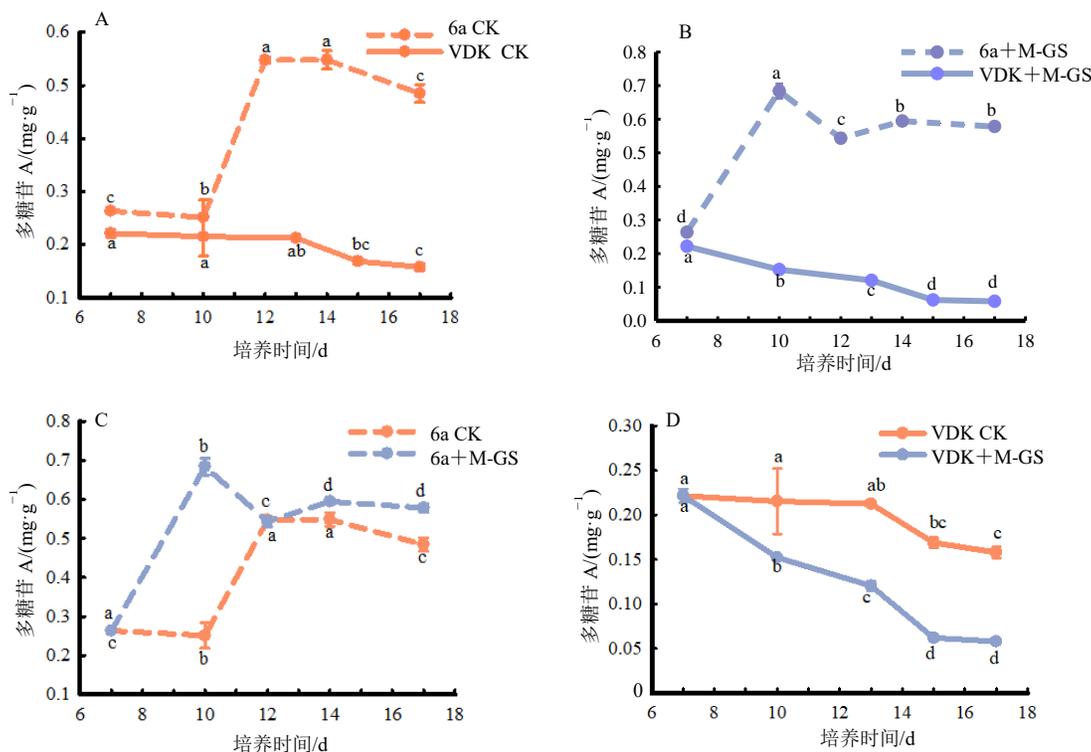
Fig. 6 Changes of ginsenoside Ro content of *P. fruticososa* (6a) and *P. filicifolia* (VDK) cells before and after adding M-GS during cell suspension culture

量低于 6a 细胞系 140.10%。在培养的第 7 天添加 M-GS 后 (图 6-B)，随着培养时间的延长，南洋参 6a 细胞系细胞中人参皂苷 R0 含量的变化与 CK 一致，而线叶南洋参 VDK 细胞系则不一致。在培养末期，两个细胞系的细胞中人参皂苷 R0 含量之间存在明显的差异 ( $P < 0.05$ )，且线叶南洋参 VDK 细胞系高出南洋参 6a 细胞系 182.11%。

M-GS 对 2 个细胞系的细胞中人参皂苷 R0 含量的影响不同，在培养的第 7 天加入 M-GS 后，南洋参 6a 细胞系 (图 6-C) 细胞中人参皂苷 R0 含量在第 11 天前高于 CK，之后便低于 CK 变化，且峰值提前出现，而线叶南洋参 VDK 细胞系 (图 6-D) 的人参皂苷 R0 含量一直高于 CK 水平，但峰值却延迟 2 d 出现。在培养的末期，南洋参 6a 细胞系细胞中的多糖苷 E 含量低于 CK 74.00%，线叶南洋参 VDK 细胞系则相反，高出 CK 76.14%。

由此可知，M-GS 对南洋参 6a 细胞系的人参皂苷 R0 含量仅在短期内起促进作用，而对线叶南洋参 VDK 细胞系的则具有持续性促进作用。

**3.2.3 M-GS 对细胞中多糖苷 A 含量的影响** 未添加 M-GS 时 (图 7-A)，随着培养时间的延长，南洋参 6a 细胞系的细胞培养物中多糖苷 A 含量呈现先减少后增加再减少的趋势，且在第 14 天出现峰值 (0.548 0 mg/L)。而线叶南洋参 VDK 细胞系呈现逐渐降低的趋势。在培养末期，2 个细胞系之间存在明显的差异性 ( $P < 0.05$ )，且南洋参 6a 细胞系高出线叶南洋参 VDK 细胞系 206.77%。在培养的第 7 天添加 M-GS 后 (图 7-B)，随着培养时间的延长，2 个细胞系的细胞中多糖苷 A 含量与 CK 响应一致，在培养末期，2 个细胞系之间存在明显的差异 ( $P < 0.05$ )，且南洋参 6a 细胞系高出线叶南洋参 VDK 细胞系 897.07%。



A-未添加 M-GS 时 2 个细胞系细胞中多糖苷 A 含量的变化情况；B-在培养的第 7 天添加 M-GS 后 2 个细胞系中多糖苷 A 含量的变化情况；C-南洋参 6a 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞中多糖苷 A 含量的变化情况；D-线叶南洋参 VDK 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞中多糖苷 A 含量的变化情况。不同小写字母表示不同培养天数之间细胞中多糖苷 A 含量差异显著 ( $P < 0.05$ )。

A-changes of Polyscioside A content in two cell lines without M-GS addition; B-changes of Polyscioside A content in the two cell lines after the addition of M-GS on day 7 of culture; C-The changes of polyscioside A content in cells without and after the addition of M-GS in 6a cell line; D-changes of polyscioside A content in VDK cells without and after the addition of M-GS. Different lowercase letters indicate significant difference in polyscioside A content between different culture days ( $P < 0.05$ ).

图 7 南洋参 6a 和线叶南洋参 VDK 细胞悬浮培养过程中添加 M-GS 前后细胞中多糖苷 A 含量变化

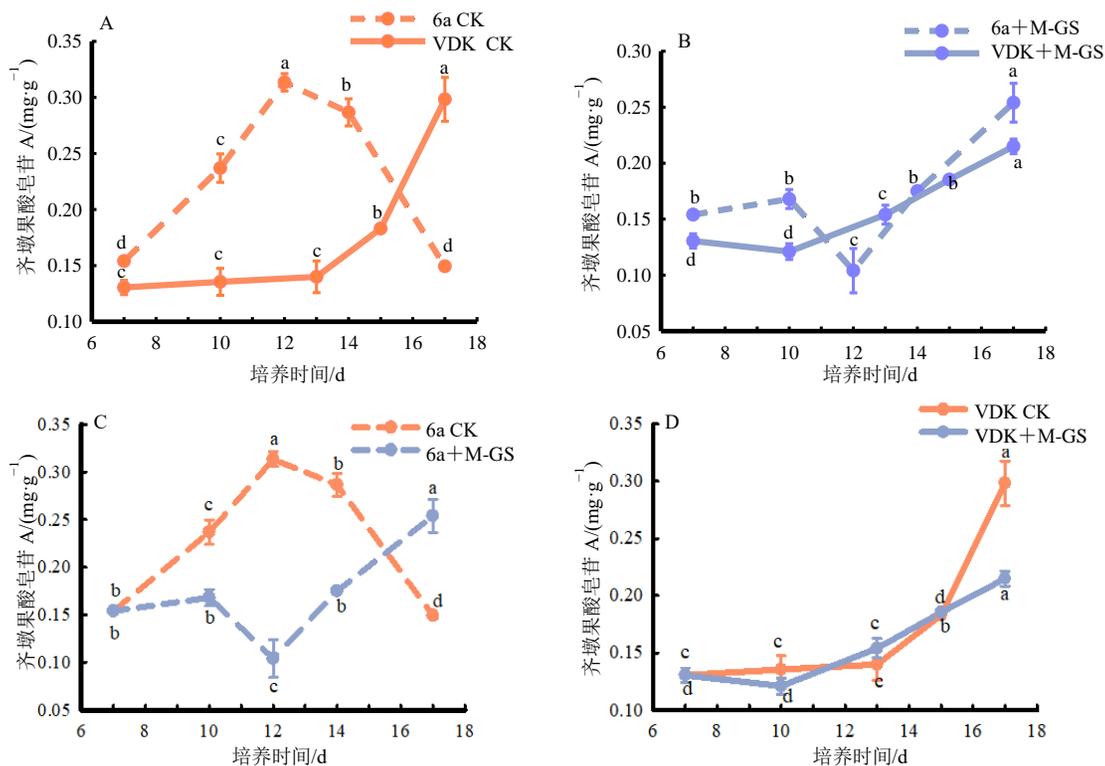
Fig. 7 Changes of polyscioside A content of *P. fruticososa* 6a and *P. filicifolia* VDK cells before and after adding M-GS during cell suspension culture

M-GS 对 2 个细胞系的细胞中多糖苷 A 含量的影响不同，在培养的第 7 天加入 M-GS 后，南洋参 6a 细胞系（图 7-C）细胞中多糖苷 A 含量在高于 CK 的水平上变化，峰值提前 4 d 出现，而南洋参 VDK 细胞系（图 7-D）一直在低于 CK 的水平上不断减少。在培养的末期，南洋参 6a 细胞系细胞中的多糖苷 A 的含量高出 CK 19.31%。而线叶南洋参 VDK 细胞系则相反，低于 CK 63.29%。由此可知，M-GS 对南洋参 6a 细胞系细胞中多糖苷 A 含量具有持续促进作用，而对线叶南洋参 VDK 细胞系的多糖苷 A 含量则有持续抑制作用。

**3.2.4 M-GS 对细胞中齐墩果酸皂苷 A 含量的影响**  
未添加 M-GS 时（图 8-A），随着培养时间的延长，南洋参 6a 细胞系的细胞中的齐墩果酸皂苷 A 含量

呈现先增加再减少的趋势，且在培养的第 12 天出现峰值 ( $0.3135 \text{ mg/g}$ )。而线叶南洋参 VDK 细胞系呈现逐渐增加的趋势，且在培养的第 7~12 天时缓慢增加，12~17 d 时快速增加。在培养末期，2 个细胞系之间存在明显的差异 ( $P < 0.05$ ) 且南洋参 6a 细胞系的齐墩果酸皂苷 A 含量低于线叶南洋参 VDK 细胞系 49.95%。在培养的第 7 天添加 M-GS 后（图 8-B），随着时间的延长，2 个细胞系的细胞中齐墩果酸皂苷 A 含量与 CK 响应不一致，在培养末期，2 个细胞系之间存在明显的差异 ( $P < 0.05$ )，且南洋参 6a 细胞系低于线叶南洋参 VDK 细胞系 18.14%。

M-GS 对 2 细胞系的细胞中齐墩果酸皂苷 A 含量的影响不同，在培养的第 7 天加入 M-GS 后，南洋参 6a 细胞系（图 8-C）细胞中齐墩果酸皂苷 A 含



A-未添加 M-GS 时 2 个细胞系细胞中齐墩果酸皂苷 A 含量的变化情况；B-在培养的第 7 天添加 M-GS 后 2 个细胞系中齐墩果酸皂苷 A 含量的变化情况；C-南洋参 6a 细胞系未添加和添加 M-GS 后细胞中齐墩果酸皂苷 A 含量的变化情况；D-线叶南洋参 VDK 细胞系未添加和添加 M-GS 细胞中齐墩果酸皂苷 A 含量的变化情况。不同小写字母表示不同培养天数之间细胞中齐墩果酸皂苷 A 含量差异显著 ( $P < 0.05$ )。

A-changes of ladyginoside A content in two cell lines without M-GS addition; B-changes of ladyginoside A content in the two cell lines after the addition of M-GS on day 7 of culture; C-changes of ladyginoside A content in cells without and with M-GS addition in 6a cell line; D-changes in ladyginoside A content in VDK cells without addition and in M-GS cells with addition. Different lowercase letters indicate significant difference in ladyginoside A content between different culture days ( $P < 0.05$ ).

图 8 南洋参 6a 和线叶南洋参 VDK 细胞悬浮培养过程中添加 M-GS 前后细胞中齐墩果酸皂苷 A 含量变化

Fig. 8 Changes of ladyginoside A content of *P. fruticososa* 6a and *P. filicifolia* VDK cells before and after adding M-GS during cell suspension culture

量变化趋势与 CK 不同，而线叶南洋参 VDK 细胞系（图 8-d）以与 CK 一致的变化趋势变化，齐墩果酸皂苷 A 含量提前 3 d 开始增加。在培养的末期，2 个细胞系在添加 M-GS 之后细胞中齐墩果酸皂苷 A 的含量与 CK 之间存在明显的差异 ( $P < 0.05$ )，且南洋参 6a 细胞系细胞中的齐墩果酸皂苷 A 含量高于 CK 70.13%，线叶南洋参 VDK 细胞系则相反，低于 CK 8.33%。由此可知，M-GS 对南洋参 6a 细胞系细胞中齐墩果酸皂苷 A 含量具有促进作用，而对线叶南洋参 VDK 细胞系则有抑制作用。

#### 4 讨论

植物细胞的培养是一种特别的生物系统，因此它的细胞代谢方式与完整植株体内细胞代谢的方式是不同的。在细胞培养过程中与各种脂肪酸发生的酯化反应（包括乙酰化、丙二酰化和巴豆酰化）对

人参皂苷的结构多样化起着至关重要的作用<sup>[21]</sup>。Kochkin 等<sup>[22]</sup>在细胞培养物中发现 M-GS 的存在而且研究还发现了 M-GS 对确定细胞悬浮液中真正的人参皂苷含量具有十分重要的作用。M-GS 不仅有助于细胞培养质量的控制，还有助于更好的理解人参皂苷的积累机制<sup>[22]</sup>。

#### 4.1 M-GS 对细胞生长的影响

通过本研究结果可知，在南洋参和线叶南洋参的 2 个细胞系（6a 和 VDK）进行悬浮培养时，在一个培养周期内，南洋参 6a 细胞系的细胞密度远大于线叶南洋参 VDK 细胞系，且随着培养时间的延长，它们呈现出了不同的变化趋势。在培养的末期，南洋参 6a 细胞系的细胞活力也比线叶南洋参 VDK 细胞系更高一些，且下降的速度更慢。但是线叶南洋参 VDK 细胞系却获得了更多的生物量（鲜质量和

干质量)。由获得的曲线可得知, 南洋参 6a 细胞系随着生命力的下降, 生物量也随之减少, 而线叶南洋参 VDK 细胞系在生命力下降的时候却获得了更多的生物量。由此可知, 线叶南洋参 VDK 细胞系适合快速获取生物量时进行培养, 但不适合长期培养, 南洋参 6a 细胞系适合长期继代培养, 从而慢慢累积生物量。

根据本课题组前期的研究<sup>[23]</sup>, 悬浮培养的第 7 天是南洋参细胞进入指数生长期的第 1 天, 伴随着细胞生长指数加速, 皂苷含量积累加速, 因此选择在培养的第 7 天添加 M-GS, 探究 M-GS 对南洋参 6a 细胞系和线叶南洋参 VDK 细胞系细胞生长以及皂苷积累的影响。在加入 M-GS 后, 在前期培养过程中, 南洋参 6a 细胞系的生活力以及生物量均与 CK 无太大的差别, 而细胞密度却下降了。线叶南洋参 VDK 细胞系除了生活力与 CK 基本一致以外, 细胞密度和生物量均有所提高。且南洋参 6a 细胞系的细胞密度以及干质量峰值提前 4 d 出现, 且细胞活力也提前 4 d 开始下降, 从而缩短了细胞的培养周期。而线叶南洋参 VDK 细胞系的细胞活力、鲜质量以及干质量的峰值均延迟出现, 从而延长了细胞的培养周期。在培养的末期, M-GS 对 2 个细胞系的细胞密度、活力、鲜质量以及干质量均有抑制作用, 且抑制作用的强度不同。对南洋参 6a 细胞系的细胞活力、鲜质量以及干质量均比线叶南洋参 VDK 细胞系的抑制作用明显, 而对细胞密度的影响则相反。由此认为 M-GS 对南洋参 6a 细胞系和线叶南洋参 VDK 细胞系细胞生长的前期具有一定的促进作用, 但在后期则起抑制作用。因此南洋参细胞系 6a 和线叶南洋参细胞系 VDK 的细胞均不适合在含有 M-GS 的培养液中长期培养。研究结果与薛璐莎<sup>[24]</sup>研究前体对雷公藤悬浮细胞的影响结果相一致。但是本研究发现了在 M-GS 在培养的前期有一定的促进作用, 所以可通过短期添加以促进南洋参和线叶南洋参的生长。

#### 4.2 M-GS 对细胞内皂苷含量的影响

在植物细胞悬浮培养的过程中, 由于细胞形态分化受到抑制或者染色体发生变异等, 细胞中的次生代谢物产量均会降低<sup>[25]</sup>。有研究表明通过筛选高产的细胞系可以提高植物次生代谢物的产量。研究表明, 南洋参的细胞培养物中至少含有 7 种三萜皂苷, 但主要分为 4 种, 分别为多糖苷 E、人参皂苷 R0、多糖苷 A 和齐墩果酸皂苷 A<sup>[26]</sup>。这 4 种主

要皂苷在细胞培养物中的含量存在着明显的差异, 随着时间的延长, 含量的变化趋势也各不相同。在不同的南洋参细胞中的含量也存在明显的差异。这与 Ramesha 等<sup>[26]</sup>发现不同的喜树 *Camptotheca acuminata* 诱导出的愈伤组织中碱的含量差异较大相一致。因此为了提高次生代谢物的产量, 筛选高产细胞系是必不可少的。

在植物的悬浮培养过程中, 前体物质可被当做底物或者催化代谢途径中的关键酶发挥作用, 从而提高次生代谢物的产量<sup>[27-28]</sup>。目前前体饲喂技术目前已成为提高皂苷产量, 探索皂苷合成途径的重要手段之一。在细胞的代谢过程中添加一些前体物质后, 往往能促进产物的生成。但许多外源前体的加入又会抑制植物细胞的生长, 从而也最终影响了终产物的产量<sup>[29]</sup>。

同时由于体外培养的细胞不同于整体植物, 在培养中由于驯化培养使得细胞间的异质性比较显著, 在相同的处理和相同培养条件下, 可以刺激不同细胞系积累不同的单体, 同一类代谢物质中不同的单体在不同或同一培养时期的积累也有可能不同。本课题组研究了在细胞培养 1 周 (7 d) 时添加 M-GS, 记录添加后 10 d, 随着培养时间的延长细胞中皂苷含量的变化, 以此来分析 M-GS 对皂苷合成和积累的影响, 发现 4 种皂苷 (多糖苷 E、人参皂苷 R0、多糖苷 A 和齐墩果酸皂苷 A) 之间存在不同的变化, 类似的结果在人参细胞<sup>[30]</sup>和紫杉醇<sup>[31]</sup>细胞中也存在。

在研究中发现 2 个细胞系 (南洋参 6a 细胞系和线叶南洋参 VDK 细胞系) 对 M-GS 的响应互为拮抗作用, 对于南洋参 6a 细胞系, M-GS 对多糖苷 E、多糖苷 A 和齐墩果酸皂苷 A 均有促进作用, 而对人参皂苷 R0 前期有促进作用, 后期为抑制作用, 这与陈月华等<sup>[28]</sup>研究发现细胞培养物长期培养可导致齐墩果苷含量降低的结果相一致。所以前体饲喂的时间成为了一个值得注意的问题。对于线叶南洋参 VDK 细胞系, M-GS 对细胞中皂苷的影响与南洋参 6a 细胞系相反, 对细胞中多糖苷 E、多糖苷 A 和齐墩果酸皂苷 A 均有抑制作用, 而对人参皂苷 R0 有促进作用。前体饲喂除了存在最佳的饲喂时间还存在最佳的饲喂浓度<sup>[32]</sup>。Суханова 等<sup>[33]</sup>证实了 MEC 低质量浓度 (最高 100 mg/L) 对作物生长具有刺激作用, 而较高浓度则具有抑制作用。所以 M-GS 对 VDK 细胞系中皂苷的抑制作用是否与 M-GS 的

浓度有关本实验尚未研究, 还值得继续探究。

综上所述, 饲喂 M-GS 对南洋参和线叶南洋参悬浮培养细胞系的不同皂苷含量的影响不同。因此为了更好的提高培养细胞内有用皂苷的产量, 后续还需要继续研究 M-GS 添加对皂苷合成和积累的调控机制以及最佳的饲喂浓度。

本实验通过对 M-GS 对南洋参和线叶南洋参细胞生长以及皂苷积累的影响, 发现南洋参和线叶南洋参细胞均不适合在含有 M-GS 的培养液中长期生长。外源添加 M-GS 对这 2 种物种的悬浮培养细胞的生长均具有抑制作用。同时也发现 M-GS 对不同物种细胞系在不同培养时期皂苷的积累影响并不相同。M-GS 可以提高南洋参 6a 细胞系细胞中多糖苷 E、多糖苷 A 齐墩果酸皂苷 A 以及线叶南洋参 VDK 细胞系中多糖苷 A 的含量。因此在应用中可根据不同的培养目的和培养对象(细胞系种类)选择性添加 M-GS 进行定向诱导, 以获取目标皂苷的高产量。本研究为解决南洋参资源短缺、促进有用皂苷积累开辟了新途径, 同时为开发生产可再生植物原料的方法和创造富含次生代谢物的细胞生产的新生物技术奠定了基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 李小萍. 优良观叶植物南洋参的栽培与管理 [J]. 现代农业, 2010(12): 19-20.
- [2] Do V M, Tran C L, Duong T H, *et al.* Chemical constituents of the leaves of *Polyscias fruticosa* [J]. *Chem Nat Compd*, 2021, 57(6): 1125-1127.
- [3] Nguyen T T D, Nguyen Q D, Nguyen T V L. Kinetic study on chlorophyll and antioxidant activity from *Polyscias fruticosa* (L.) harms leaves via microwave-assisted extraction [J]. *Molecules*, 2021, 26(12): 3761.
- [4] Nguyen T T, Nguyen Q D, Nguyen T V. Kinetic study on chlorophyll and antioxidant activity from *Polyscias fruticosa* (L.) harms leaves via microwave-assisted extraction [J]. *Molecules*, 2021, 26(12): 3761.
- [5] Rarison R H G, Truong V L, Yoon B H, *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of lipophilic fractions from *Polyscias fruticosa* leaves based on network pharmacology, *in silico*, and *in vitro* approaches [J]. *Foods*, 2023, 12(19): 3643.
- [6] Selvaraj B, Le T T, Kim D W, *et al.* Neuroprotective effects of ethanol extract of *Polyscias fruticosa* (EPPF) against glutamate-mediated neuronal toxicity in HT22 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3969.
- [7] Liu Z, Qu C Y, Li J X, *et al.* Hypoglycemic and hypolipidemic effects of malonyl ginsenosides from American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on type 2 diabetic mice [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(49): 33652-33664.
- [8] 罗杰, 梅兴国. 前体和诱导子对紫杉醇合成影响的优化研究 [J]. 华中科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(5): 88-90.
- [9] 成浩, 李素芳, 沈星荣, 等. 利用外源前体饲喂生物合成 <sup>14</sup>C-儿茶素的研究 [J]. 茶叶科学, 2003, 23(S1): 82-87.
- [10] 庄晓蕾, 张秀清, 于树宏, 等. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇的研究进展 [J]. 中草药, 2000, 31(10): 794-798.
- [11] 王影, 张美萍, 王义. 丙酮酸钠调控西洋参培养物生长及代谢产物的研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(6): 664-667.
- [12] 赵寿经, 侯艳, 贾冬梅, 等. 西洋参发根的诱导及不同外源物质对发根生长和皂苷含量的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(1): 98-103.
- [13] 方绮民, 郑光植, 周立刚. 西洋参细胞悬浮培养中皂甙生物合成的代谢调节 [J]. 生物工程学报, 1992, 8(3): 261-265.
- [14] 金护定. 人参内生菌生产稀有皂苷的研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2017.
- [15] Fett-Neto A G, Melanson S J, Nicholson S A, *et al.* Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44(8): 967-971.
- [16] Do V M, Tran C L, Nguyen T P. Polysciosides J and K, two new oleanane-type triterpenoid saponins from the leaves of *Polyscias fruticosa* (L.) harms. cultivating in An Giang Province, Viet Nam [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(9): 1250-1255.
- [17] Khoang L T, Huyen H T T, Van Chung H, *et al.* Optimization of total saponin extraction from *Polyscias fruticosa* roots using the ultrasonic-assisted method and response surface methodology [J]. *Processes*, 2022, 10(10): 2034.
- [18] Sukhanova, E.S.; Chernyak, N.D.; Nosov, A.M. Obtaining and description of *Polyscias filicifolia* and *polyscias fruticosa* cell and suspension cell cultures [J]. *Biotechnologia*, 2010(4): 44-50.
- [19] 陈甲美, 代婉婉, 吴艳梅, 等. 体外培养细胞的一种简便计数方法 [J]. 北京农学院学报, 2023, 38(2): 116-120.
- [20] 侯学文, 郭勇. 一个快速测定悬浮培养植物细胞生物量的方法的建立 [J]. 云南植物研究, 2001, 23(4): 504-508.
- [21] Qi L W, Wang C Z, Yuan C S. Ginsenosides from American

- ginseng: Chemical and pharmacological diversity [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(8): 689-699.
- [22] Kochkin D V, Kachala V V, Shashkov A S, *et al.* Malonyl-ginsenoside content of a cell-suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* [J]. *Phytochemistry*, 2013, 93: 18-26.
- [23] Titova M V, Kochkin D V, Sukhanova E S, *et al.* Suspension cell culture of *Polyscias fruticosa* (L.) harms in bubble-type bioreactors—Growth characteristics, triterpene glycosides accumulation and biological activity [J]. *Plants*, 2023, 12(20): 3641.
- [24] 薛璐莎. 前体和真菌诱导子对雷公藤悬浮细胞次生代谢产物合成的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [25] 李燕, 王春兰, 郭顺星, 等. 植物组织和细胞培养物中黄酮类物质积累影响因素的研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(9): 651-655.
- [26] Ramesha B T, Amna T, Ravikanth G, *et al.* Prospecting for Camptothecines from *Nothapodytes nimmoniana* in the Western Ghats, South India: Identification of high-yielding sources of camptothecin and new families of camptothecines [J]. *J Chromatogr Sci*, 2008, 46(4): 362-368.
- [27] Verpoorte R, Contin A, Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites [J]. *Phytochem Rev*, 2002, 1(1): 13-25.
- [28] 陈月华, 朱艳, 张翔, 等. 植物细胞悬浮培养中次生代谢产物积累的研究进展 [J]. *中国野生植物资源*, 2016, 35(3): 41-47.
- [29] Robins R J, Bent E G, Rhodes M J C. Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids by *Datura stramonium* L. transformed root cultures [J]. *Planta*, 1991, 185(3): 385-390.
- [30] Chirikova N K, Olennikov D N, Grigor'ev R O, *et al.* Acylquinic acids, flavonoids, and maltol O-glucoside from *Panax vietnamensis* [J]. *Chem Nat Compd*, 2019, 55(6): 1161-1163.
- [31] Demidova E, Globa E, Klushin A, *et al.* Effect of methyl jasmonate on the growth and biosynthesis of C13- and C14-hydroxylated taxoids in the cell culture of yew (*Taxus wallichiana* zucc.) of different ages [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(6): 969.
- [32] 谷荣辉, 洪利亚, 龙春林. 植物细胞培养生产次生代谢物的途径 [J]. *植物生理学报*, 2013, 49(9): 869-881.
- [33] Суханова Е С, Кочкин Д В, Гафиятова Э И, *et al.* Влияние предшественника синтеза изопреноидов на ростовые и биосинтетические характеристики культуры клеток *Polyscias fruticosa* (L.) Harms [J]. *Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова*, 2011, 8(4): 40-44.

[责任编辑 时圣明]