

元宝草悬浮细胞培养及其生长特性研究

张楠, 王保军, 张秀清, 张京声, 孙君社

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 研究了元宝草悬浮细胞生长及其金丝桃素类物质(金丝桃素和假金丝桃素)的代谢规律。悬浮培养细胞的生长周期为 18 d, 其中 4~10 d 是对数期。金丝桃素类物质在 10 d 达到 $46.06 \mu\text{g/g(DW)}$, 其含量增加与细胞鲜质量增长相偶联。可溶性糖的消耗与细胞的生长以及金丝桃素类物质的代谢有着密切的关系, 是影响细胞鲜质量和金丝桃素类物质增长的重要因素。

关键词: 元宝草; 金丝桃素; 假金丝桃素; 悬浮细胞培养

中图分类号: S682.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)05-0120-03

Cell Suspension Culture and Growth Characteristics of *Hypericum sampsonii* Hance

ZHANG Nan, WANG Bao-jun, ZHANG Xiu-qing, ZHANG Jing-sheng, SUN Jun-she

(College of Food Science and Nutritional Engineering, Chese

Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: This research studied the cell growth characteristics and hypericins (hypericin and pseudohypericin) metabolite production in *Hypericum sampsonii* Hance cell suspension culture. The result as followed: growth period of suspension cell was as long as 18 d; the exponential phase was 4~10 d. Hypericins arrived $46.06 \mu\text{g/g(DW)}$ at 10 day's culture, and its production was related to cell growth rate. Consume of soluble carbohydrate that played a key role in cell growth and hypericins metabolism, effected accumulation of fresh weight of cell and hypericins.

Key words: *Hypericum sampsonii* Hance; Hypericin; Pseudohypericin; Cell suspension culture

元宝草(*Hypericum sampsonii* Hance)属于多年生草本植物,在我国西南地区有广泛分布^[1]。全草可入药,具有清热解毒、通经活络、凉血止血等功能^[2,3]。研究表明元宝草中含有金丝桃素类物质^[4],该成分被证明具有抗抑郁等功能^[5]。目前,对于元宝草的相关研究主要集中在化学成分的分析^[6],而在组织培养方面少见报道^[7],元宝草细胞悬浮培养未见报道。本试验研究了元宝草悬浮培养细胞的生长特性及次生代谢物的积累情况,对推动其药用活性成分的应用技术研究具有积极意义。

1 材料和方法

1.1 元宝草细胞悬浮体系的建立

以元宝草无菌苗为试验材料,无菌苗培养基为 MS 培养基添加激素 BA 0.1 mg/L + IBA 0.05 mg/L 。取培养 25 d 的组培苗叶片为外植体,进行愈伤组织

诱导,培养基为 $1/2 \text{ N MS}$ 培养基附加激素 NAA 0.6 mg/L + KT 0.1 mg/L ,培养条件:光照 16 h/d ,光照强度 $40 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,培养温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ ^[8]。

取 1.0 g 生长旺盛的疏松愈伤组织,转入装有 20 mL MS 液体培养基的 100 mL 三角瓶中培养。培养基附加 NAA 0.6 mg/L + KT 0.1 mg/L 以及 3% 蔗糖。培养温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,连续暗培养,摇床转速 100 r/min 。

悬浮细胞每隔 12 d 继代一次,每次继代时将培养物摇匀,用无菌移液管吸取培养基中的培养物加入新鲜培养液中,新鲜培养液与原细胞培养基比例为 3:1。继代 5 次以上的培养细胞可达到稳定状态。

1.2 细胞生长曲线的建立

用继代培养 6 次后的悬浮细胞建立生长曲线。0~18 d 每 2 d 取样一次,测定相关指标,并通过测定细胞生长速率以及比生长速率来统计细胞生长。

收稿日期: 2007-07-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20506029)

作者简介: 张楠(1982-),女,北京人,在读硕士,主要从事植物组织培养方面研究

通讯作者: 孙君社(1961-),男,河北栾城人,教授,博士生导师,主要从事食品生物技术研究。

相关计算公式如下:

$$R_x = \frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{式 } 1)$$

R_x : 细胞生长速率; X : 细胞干质量(g/L); t : 培养时间(d); μ : 比生长速率。

1.3 金丝桃素类物质高效液相测定方法

将悬浮细胞冷冻干燥 12 h, 研磨成粉状。称取样品 0.5 g (干质量, DW), 加入 9.8 mL 甲醇和 0.2 mL 吡啶, 超声波冰浴提取 15 min, 之后离心 15 min (离心力 $12\,000 \times g$), 取上清液进行检测^[9]。

色谱条件: 色谱柱 Diamonsil(TM) 钻石 C₁₈, 颗粒 5 μm , 150 mm \times 4.6 mm。流动相为 0.05 mol/L 三乙氨乙酸缓冲液: 乙腈=20:80, 三乙氨乙酸缓冲液 pH 6.5。流速 1 mL/min, 检测波长 588 nm^[10]。标准方程如下: 假金丝桃素: $Y = 2.466 \times 10^{-5} X + 0.489$, 金丝桃素: $Y = 6.979 \times 10^{-6} X + 0.421$ ($R^2 > 0.99$)。Y: 提取液中金丝桃素类物质含量($\mu\text{g/mL}$), X: 峰面积。金丝桃素类物质含量=假金丝桃素含量+金丝桃素含量。高效液相测定仪器 LC-10A (日本岛津), 泵 LC-10AT, 检测器 SPD-M10A。

1.4 培养液中可溶性糖的测定(蒽酮比色法)^[10]

将培养的悬浮细胞取出, 置于离心管中, 离心 15 min (离心力 $12\,000 \times g$), 收集上清液待测。取 200 μL 样品, 用去离子水定容到 10 mL 容量瓶, 摇匀, 为待测样品溶液。

吸取样品溶液 1 mL 于 20 mL 大试管中, 加入 4 mL 2% 蒽酮试剂, 混合均匀后浸于沸水浴中, 管口加盖玻璃塞, 以防蒸发。沸水煮沸 10 min, 取出后用流水冷却, 室温放置 10 min, 在 620 nm 波长下测定 OD 值。

$$\text{可溶性糖含量 (mg/mL)} = \frac{\text{查表所得的糖量} \times \text{提取液总体积}}{\text{测定所取提取液体积}} \quad (\text{式 } 2)$$

1.5 培养液 pH 的测定

0~18 d 每 2 d 取培养液置于离心管中, 离心 15 min (离心力 $12\,000 \times g$), 收集上清液待测。采用 Sartorius 普及型 pH 计 (PB-8) 进行测定。

2 结果与分析

2.1 细胞生长曲线的建立

元宝草细胞在一个生长周期 18 d 中的生长情况见图 1。18 d 的培养周期中, 元宝草悬浮细胞的生长曲线基本上呈现“S”型。0~4 d 为延滞期细胞鲜质量增长缓慢, 之后进入对数生长期, 在 12 d 时细胞生物量达到最大, 13~18 d 为静止期, 细胞鲜质量趋于稳定。细胞鲜质量在 14 左右增长了约 5 倍,

最小倍增时间为 55 h。在对数生长期中, 8 d 时生长速率达到最大, 此时细胞处于迅速增殖阶段。

2.2 悬浮细胞中金丝桃素类物质含量的变化

悬浮细胞中金丝桃素类物质的变化趋势与细胞的生长趋势相似(图 1, 2), 在细胞生长期有效成分开始增加, 对数生长末期 (10 d) 细胞中金丝桃素类物质达到最大值。这说明悬浮细胞中次生代谢物的积累与生长是偶联的。此时细胞中金丝桃素类物质达到 46.06 $\mu\text{g/g}$, 比接种时增长约 4 倍。

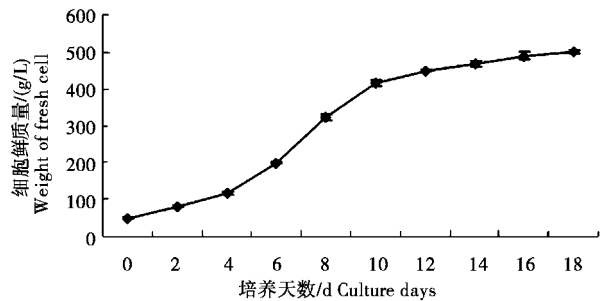


图 1 元宝草细胞悬浮培养的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Hypericum sampsonii* Hance suspension culture

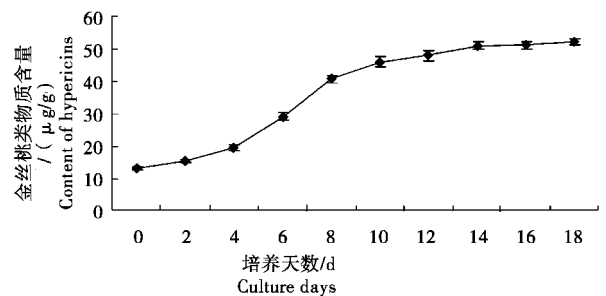


图 2 元宝草悬浮细胞金丝桃素类物质的含量

Fig. 2 Hypericins content in suspension cell from *Hypericum sampsonii* Hance

2.3 可溶性糖消耗过程与生长和代谢的相关性分析

可溶性糖消耗速率的曲线显示(图 3), 蔗糖作为细胞生长的碳源, 在延滞期消耗缓慢, 到对数生长期时有明显增加; 随着时间延长, 可溶性糖消耗速率又趋于缓慢, 此时细胞已经达到平稳期, 呈现衰老状态。在整个培养过程中, 蔗糖的利用率和细胞的生长与金丝桃素类物质代谢有着密切的关系。

2.4 培养液中 pH 的变化

在生长周期内 pH 维持在 4.9~5.7。由图 4 可以看出, 在 0~8 d pH 不断下降, 原因可能是在此时期细胞处于旺盛的分裂状态, 消耗大量盐类使 pH 降低。而随培养时间延长, 细胞不断生长和次级代谢物积累, pH 发生变化, 逐渐升高。在进一步的试验中, 可以利用这一点通过测量 pH 来监测细胞的生长状态。

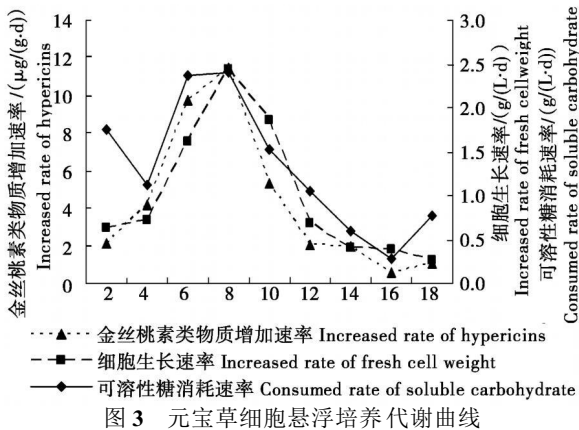


图3 元宝草细胞悬浮培养代谢曲线

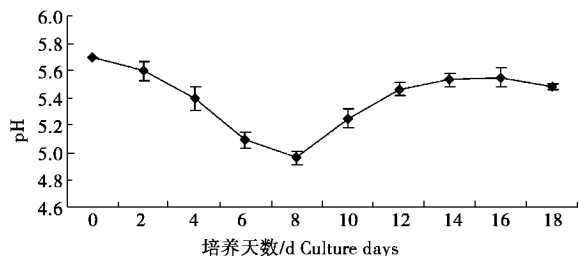


图4 培养基中 pH 变化

3 讨论

利用植物细胞培养技术生产药用次生代谢产物,是目前生物技术重要的研究领域。与在固体培养基上培养相比,细胞悬浮培养能使细胞繁殖速度加快,提供大量均一的植物细胞。

元宝草悬浮细胞在振荡培养过程中大致分为三个阶段:培养初期细胞系主要由游离的单个细胞组成;随着培养时间的延长,细胞生物量急剧增加,形成小细胞团;在生长末期,细胞开始衰败,逐渐死亡。悬浮培养细胞的生长曲线为“S”型,分为延滞期(0~4 d),指数生长期(4~10 d)和静止期(10~18 d)。在一个培养周期内细胞鲜质量可增加5倍左右,最小倍增时间为55 h。在对数生长期,8 d时生长速率达到最大2.3 g/d。14 d后,由于培养基中的营养物质减少,细胞代谢也积累了大量有害物质,造成生长环境的变化,导致细胞生长速度减慢。因此,需要在对数生长末期或静止初期进行继代培养。

试验结果表明,金丝桃素类物质的代谢和细胞生长是相偶联的,元宝草细胞在悬浮培养的过程中,其生长曲线与金丝桃素类物质含量变化基本同步。随着细胞的生长,总金丝桃素含量不断增加,在对数生长末期逐渐趋于稳定。通过本研究可以确定元宝草悬浮细胞的收获时间在对数期结束后为最佳。此时细胞鲜质量和金丝桃素物质代谢处于最适合的状

态。

本研究结果发现,培养液中可溶性糖浓度在元宝草悬浮细胞生长期间不断下降,反映出细胞的生长对蔗糖的利用。在延滞期可溶性糖消耗较慢,进入对数生长期后可溶性糖消耗量迅速增加,最终可溶性糖的利用率达到79%。应根据细胞培养的需要调整蔗糖的添加量。

pH是影响细胞生理的重要因素,培养基的pH能够改变培养基中营养物质的离子化程度,从而影响细胞对营养物质的吸收以及代谢反应中各种酶的活性和代谢途径。本试验中,pH值的变化呈现先下降,再升高最终趋于稳定的变化。在细胞继代培养周期内pH的变化可能是由于处于不同生长期的细胞代谢物不同所致,同时也有可能是悬浮细胞对培养基成分的吸收利用不同而造成的。

通过以上研究为元宝草细胞生产金丝桃素类物质的工业化提供了有效的参考数据和理论支持,促使其向商品化过渡。

参考文献:

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 60.
- [2] 吕洪飞, 刘文哲. 元宝草的分泌结构与其次生产物的研究[J]. 西北植物学报, 1999, 19(6): 111—115.
- [3] 潘映红, 郭宝林. 国产金丝桃属药用植物资源现状及利用前景[J]. 中药材, 1993, 16(3): 14—18.
- [4] 曾虹燕, 周朴华, 侯团章. 元宝草金丝桃素含量的测定[J]. 中药材, 2002, 25(7): 479.
- [5] 万德光, 裴瑾, 周明眉, 等. 三种贯叶连翘组药用植物醇提取物对小鼠的抗抑郁作用[J]. 中药材, 2003, 26(3): 187—189.
- [6] 郭澄, 郑清明, 郑汉臣. 元宝草的化学成分研究[J]. 药学服务与研究, 2005, 5(4): 341—344.
- [7] 曾虹燕, 周朴华. 元宝草愈伤组织诱导和器官分化[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 231—234.
- [8] 张楠, 张秀清, 张京生, 等. 元宝草愈伤组织培养及金丝桃素代谢研究[J]. 农业生物技术学报, 2007(增刊).
- [9] Ang C Y W, Cui Y Y, Chang H, et al. Determination of St. John's Wort Components in Dietary Supplements and Functional Foods by Liquid Chromatography[J]. Journal of AOAC international, 2002, 85(6): 1360—1369.
- [10] Ang C Y W, Cui Y Y, Chang H, et al. Determination of St. John's Wort Components in Dietary Supplements and Functional Foods by Liquid Chromatography[J]. Journal of AOAC international, 2002, 85(6): 1360—1369.
- [11] 陈毓荪. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 171—173.