

精胺对霍山石斛类原球茎悬浮培养细胞生长和多糖合成的影响

Effect of Spermine on Cell Growth and Polysaccharide Production in Suspension Cultures of Protocorm-like Bodies from *Dendrobium huoshanense*

魏 明, 姜绍通, 罗建平*

WEI Ming, JIANG Shao-Tong and LUO Jian-Ping*

合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009

School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

摘 要 研究了在添加外源精胺时, 霍山石斛类原球茎细胞生长、多糖积累、主要营养物质消耗以及细胞内多胺含量的变化。结果表明, 0.6mmol/L 的精胺明显促进霍山石斛类原球茎细胞的生长和多糖的合成。细胞的比生长速率从 0.046d^{-1} 提高到 0.054d^{-1} 。培养 30d 时, 类原球茎干重达 32.4g DW/L, 多糖总产量为 2.46g/L, 分别是对照的 1.32 和 1.31 倍。添加外源精胺能够提高内源多胺的含量, 同时, 蔗糖酶和硝酸还原酶等相关代谢酶的活性增强, 促进了碳、氮的吸收和利用。

关键词 霍山石斛, 类原球茎, 悬浮培养, 精胺, 多糖

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)02-0327-05

Abstract The effect of outer spermine on cell growth, accumulation of polysaccharides and utilization of nutrient together with the intracellular polyamine contents were investigated in suspension cultures of protocorm-like bodies from *Dendrobium huoshanense*. The results indicated that spermine at 0.6mmol/L was the most effective in increasing cell growth and polysaccharide synthesis. The specific growth rate of cell increased from 0.046d^{-1} to 0.054d^{-1} , and the maximum dry weight and polysaccharide production reached 32.4g DW/L and 2.46g/L respectively, which were 1.32-fold and 1.31-fold that of the control on day 30. The titres of intracellular free polyamines were higher in the cultures treated with spermine than that of the control. Invertase and nitrate reductase activities were found to increase significantly in the cultured cells treated with spermine, which was beneficial to the utilization of carbon and nitrogen source.

Key words *Dendrobium huoshanense*, protocorm-like bodies, suspension culture, spermine, polysaccharides

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)属于兰科石斛属, 产于安徽霍山及邻近地区, 是名贵中草药, 其含有活性多糖、生物碱等多种化合物^[1, 2], 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳等功效。现代药理研究证明, 石斛多糖具有增强机体免疫功能, 显著提高机体杀伤肿瘤细胞的能力^[3]。查学强等^[4]观察到霍山石斛类原球茎总多糖能够显

著促进小鼠脾细胞产生干扰素 $\text{IFN-}\gamma$ 和腹腔巨噬细胞产生肿瘤坏死因子 $\text{TNF-}\alpha$ 。由于霍山石斛对生长条件要求十分苛刻, 自然繁殖能力低, 生长周期长, 加上人工大量采集, 野生资源已濒临灭绝。类原球茎是霍山石斛体细胞胚, 可由植株的不同部位诱导产生, 具有和植株同样的物质代谢和形态发育潜能^[5]。探索霍山石斛类原球茎悬浮培养技术, 以组

Received: August 30, 2006; Accepted: September 21, 2006.

This work was supported by the Key Project for Science and Technology Research from Ministry of Education of China(No.03098).

* Corresponding author. E-mail: jianpingluo@sohu.com

教育部科学技术研究重点项目(No.03098)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

组织培养物代替原药材或生产有关活性成分为解决霍山石斛资源短缺的方法之一。

多胺广泛存在于各种植物中,主要有腐胺(putrescine)、精胺(spermine)和亚精胺(spermidine)等。它们能够促进细胞生长、分化和增殖,延缓衰老,参与胚胎发育等生命活动与植物的生长发育密切相关,对细胞的生长具有重要调控作用^[6]。多胺对霍山石斛类原球茎生长和多糖合成的影响尚未见报道。本工作研究了添加适量的外源精胺对霍山石斛类原球茎细胞生长和多糖合成的影响以及不同生长阶段内源多胺含量的变化,为进一步调控霍山石斛类原球茎细胞的生长和多糖合成提供方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

霍山石斛类原球茎由本实验室诱导保存,在固体MS培养基中继代,继代周期为30d,液体培养基为改良的MS培养基,其中微量元素、有机元素减半,大量元素:KNO₃ 30mmol/L, MgSO₄·7H₂O 1.5mmol/L和CaCl₂·2H₂O 4.5mmol/L, KH₂PO₄ 2.5mmol/L,蔗糖浓度为30g/L。

1.2 类原球茎悬浮培养条件

取生长30d的类原球茎接种于装有60mL液体培养基(pH为5.8)的250mL三角瓶中(分别添加0.2、0.6和1.0mmol/L的精胺,对照培养基不添加精胺),接种量为100g/L(鲜重),置于摇床上(110r/min)(25±2)℃下悬浮培养。光照周期为14h/d,日光灯,光强为80μmol/m²·s,每隔6天随机取样1次,培养周期为30d。

1.3 分析方法

培养结束后,收获类原球茎,用蒸馏水洗2次,然后用滤纸吸干类原球茎表面的水分后,记为鲜重,把收获类原球茎置于60℃烘箱中烘至恒重,记为干重。提取多糖时,把类原球茎用研钵研碎,然后加入一定量的蒸馏水在50~60℃水浴上提取3次,收集水提液,加95%乙醇至80%浓度过夜沉淀,最后收集沉淀。培养基中的多糖也用醇沉方法提取,沉淀溶于蒸馏水中用Savage法脱蛋白,并用苯酚-硫酸法测定多糖^[7]。

多胺的测定参照刘华英等方法^[8],取5g(鲜重)左右的类原球茎加入10mL预冷的5%高氯酸(W/V),然后在冰浴中研磨,浸提1h,4℃12000g离心20min。取1mL上清液加入15μL苯甲酰氯,1mL NaOH(2mol/L),充分混匀后37℃水浴反应30min,然后加入2mL饱和NaCl,2mL乙醚,充分混匀后3000g离心5min。收集乙醚相,然后干燥,用3mL

甲醇溶解后过0.45μm滤膜。采用Waters高效液相色谱仪,色谱柱为C₁₈(5μm, 4.5×250mm),进样体积为20μL,洗脱液为甲醇:水(64:36)流速为0.7mL/min,色谱柱温度为25℃,检测波长为230nm。

粗酶液的提取:准确称取类原球茎5g(鲜重),加入10mL预冷的酶提取缓冲液(20mmol/L Hepes-NaOH缓冲液,pH7.5,含0.5mmol/L巯基乙醇、2mmol/L MgCl₂、2.5mmol/L DTT、2%(V/V)PVP),在冰浴中研磨匀浆,匀浆液于12000g离心15min,取上清液作为待测酶液,所有操作均在4℃下进行。蛋白质含量用Bradford法测定^[9]。

蔗糖酶(EC 3.2.1.26)活性按V_u等方法测定^[10],取待测酶液1.5mL,加入20mmol/L蔗糖溶液(蔗糖溶于0.1mol/L的磷酸盐缓冲液,pH4.7)0.2mL,30℃下保温10min后,立即转入沸水浴3min终止反应,然后加入1.5mL 3,5-二硝基水杨酸试剂,沸水浴5min,流水冷却,在540nm处测定吸光值的变化,空白对照不加蔗糖。酶活力单位定义:

1μg还原糖/mg蛋白质·min为1个酶活力单位(u)。

硝酸还原酶(EC 1.6.6.1)活性按Chen等方法测定^[11],取粗酶液0.1mL,加入0.1mol/L磷酸钾缓冲液(pH7.5,含0.01mol/L的KNO₃)1.8mL混合并于28℃下保温10min,加入0.05mg/L NADH 0.1mL,在28℃反应15min后,加入1mL 1%(W/V)氨基苯磺酰胺和1mL 0.02%(W/V)萘基乙烯二胺水溶液终止反应。反应混合液在5000g离心5min,除去悬浮物,在540nm处测定吸光值。空白对照不加NADH,而加0.1mL重蒸水。此反应为测定生成的亚硝酸盐的量,酶活力单位定义:

1μmol NO₂⁻/mg蛋白质·min为一个酶活力单位(u)。

类原球茎生物量为每升培养基收获类原球茎的总干重,以g DW/L表示,多糖总产量为每升培养基收获类原球茎中多糖和培养基中多糖的总提取量,以g/L表示,类原球茎的多糖含量=类原球茎中的多糖/生物量(干重)(%),类原球茎的比生长速率 $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$ (d⁻¹)(X为生物量)。所有实验至少重复2次,实验数据以平均值附标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 外源精胺对霍山石斛类原球茎细胞生长和多糖合成的影响

在培养基中分别添加0.2、0.6、1.0mmol/L的精胺,结果如表1所示。由表1可知,不同浓度的精胺均能促进霍山石斛类原球茎的生长,其中0.6mmol/L的精胺的效果最好,与对照相比,添加0.6mmol/L的

精胺时,细胞生长较快,生物量也较大,比生长速率从 0.046d^{-1} 提高到 0.054d^{-1} ,培养30d时,类原球茎干重为 32.4g DW/L ,是对照的1.32倍。添加适量的精胺能够促进多糖的合成,与对照相比,添加

0.6mmol/L 时,多糖的合成速度较快,细胞内和培养液中的多糖含量以及多糖总产量都较高,培养30d时,多糖总产量为 2.46g/L 是对照的1.31倍。

表1 外源精胺对霍山石斛类原球茎悬浮培养细胞生长和多糖合成的影响
Table 1 Effect of out spermine on the cell growth and polysaccharide synthesis in suspension cultures of protocorm-like bodies from *D. huoshanense*

Spermine(mmol/L)	Biomass(g/L)	μ (d^{-1})	Polysaccharide Content/ %	Polysaccharides in medium (g/L)	Total polysaccharides (g/L)
0	24.6 ± 1.3	0.046 ± 0.001	6.4 ± 0.41	0.061 ± 0.005	1.87 ± 0.14
0.2	29.2 ± 0.5	0.052 ± 0.003	7.8 ± 0.61	0.075 ± 0.002	2.26 ± 0.04
0.6	32.4 ± 1.2	0.054 ± 0.002	8.2 ± 0.82	0.092 ± 0.008	2.46 ± 0.12
1.0	31.4 ± 0.6	0.054 ± 0.001	7.9 ± 0.12	0.083 ± 0.005	2.21 ± 0.13

2.2 外源精胺对内源多胺含量的影响

图1表示了添加精胺时,霍山石斛类原球茎细胞内多胺含量的变化(腐胺、精胺和亚精胺)。从图1可以看出,添加适量的精胺能够明显提高内源多胺的含量,特别是内源精胺的含量增加显著,在18d左右达最大,随着培养时间的延长,细胞内源多胺的含量开始下降。多胺在细胞内可以通过离子键和氢

键形式与生物大分子结合,并通过调节它们的生物活性来调节细胞生长。细胞内多胺水平的高低对植物细胞生长和培养周期有重要调节作用。Sudha and Ravishankar^[12]在辣椒细胞培养中添加适量的腐胺提高了细胞内源多胺的含量,并且促进了辣椒细胞的生长和辣椒素的形成。

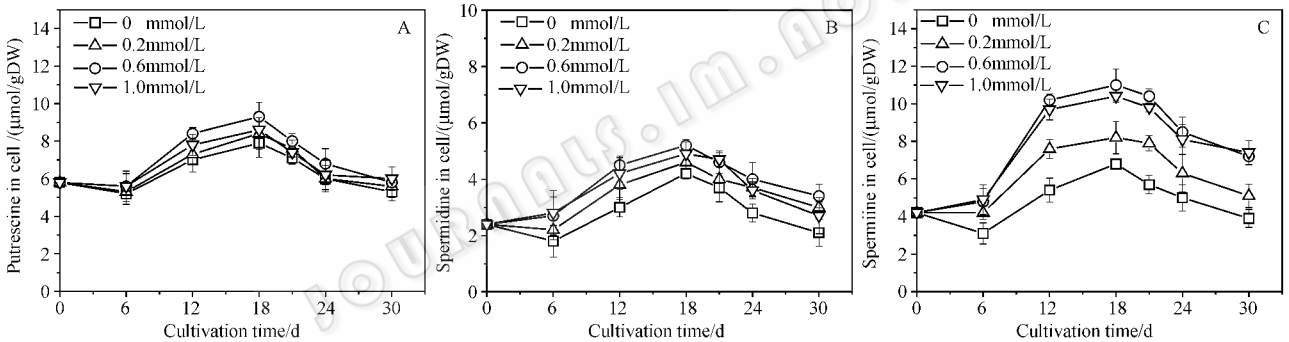


图1 外源精胺对类原球茎内源多胺含量(腐胺 A) 亚精胺 B) 和精胺 C) 的影响

Fig.1 Effect of spermine on the intracellular polyamine contents (putrescine(A) ,spermidine(B) and spermine(C))

2.3 精胺对碳和氮的利用影响

图2表示了添加精胺时,碳和氮的利用情况。霍山石斛类原球茎在培养过程中,以蔗糖为碳源,以硝酸钾为氮源。碳和氮是细胞生长的主要营养元素,它们的利用程度直接影响细胞生长和产物合成。

蔗糖首先要水解为单糖才能被利用^[13],而硝酸钾被还原为氨态氮才能够被利用^[14]。由图2可知,精胺能够影响碳、氮的利用,添加 0.6mmol/L 的精胺时,类原球茎生长快,碳和氮的吸收速率加快,且利用率提高,培养30d后,培养基中的碳和氮被耗尽,而不

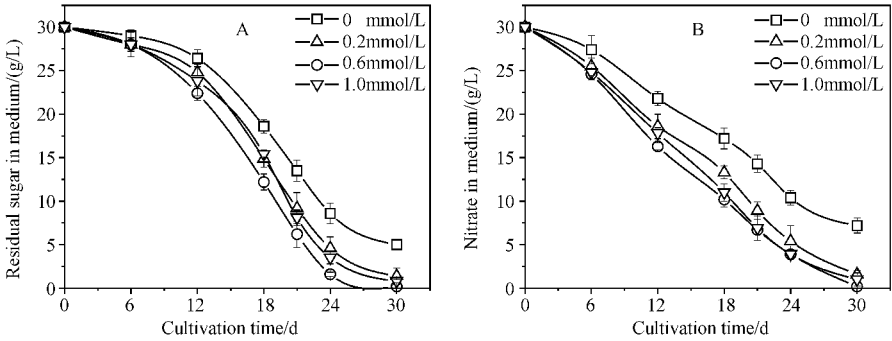


图2 外源精胺对碳源 A) 和氮源 B) 利用的影响

Fig.2 Effect of spermine on utilization of carbon(A) and nitrogen(B) source

加精胺时,类原球茎生长较慢,培养 30d 后,培养基中仍有一部分碳和氮未被利用。

2.4 精胺对蔗糖酶和硝酸还原酶活性的影响

图 3 表示了蔗糖酶和硝酸还原酶的活性变化。由图 3 可知,添加适量的精胺能够显著提高蔗糖酶和硝酸还原酶的活性。蔗糖酶的主要作用是分解培养基中的蔗糖,蔗糖在被细胞利用之前首先要被降

解为葡萄糖和果糖等还原糖。高的蔗糖酶活性是细胞生长的特征之一,提高蔗糖酶的活性可以促进细胞对碳的吸收和利用^[10],从而促进细胞生长。硝酸钾作为培养基中的唯一氮源,首先在硝酸还原酶的作用下被还原为氨态氮,才能被细胞利用,硝酸还原酶的活性影响 NO₃⁻ 的同化吸收^[15]。

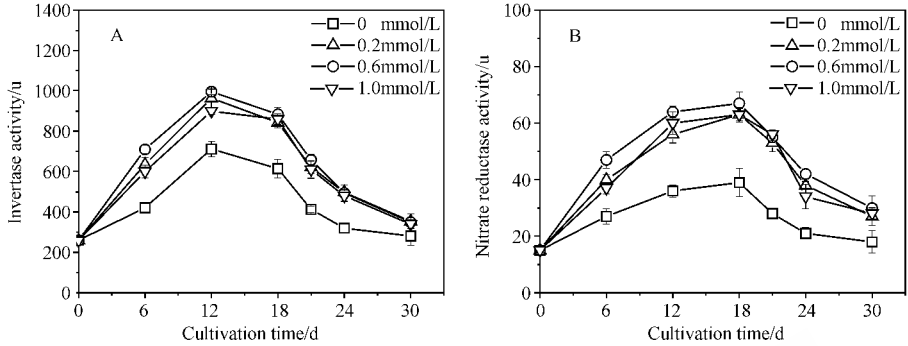


图 3 精胺对蔗糖酶(A)和硝酸还原酶(B)活性的影响
Fig.3 Effect of spermine on invertase(A) and nitrate reductase(B) activities in suspension cultures of protocorm-like bodies from *D. huoshanense*

3 讨论

在生物的代谢过程中,多胺能够促进细胞生长和分化。通过调节多胺水平可以调控细胞生长,添加外源多胺可以促进内源多胺的合成,有效提高细胞内源多胺的含量,而内源多胺含量的增加可以促进细胞生长和代谢产物的合成^[16]。Suresh 等在甜菜发状根培养中添加适量的腐胺和精胺促进了发状根的生长和甜菜碱的合成^[17]。添加适量的外源精胺,霍山石斛类原球茎生长速度提高,生物量和多糖产量显著增加,说明外源精胺改善了霍山石斛类原球茎的生长状况,这种改善与内源多胺水平的升高密切相关。多胺水平的降低可影响细胞的分裂,从而影响细胞生长。多胺在细胞内可直接或间接参与酶活性的调节,Sudha and Ravishankar 在辣椒细胞培养中添加适量的腐胺提高了内源多胺的含量和辣椒素合成酶的活性,从而提高了辣椒素的产量^[12]。在本工作中,添加适量的精胺可以显著提高蔗糖酶和硝酸还原酶等与碳、氮代谢相关的酶的活性,促进了碳和氮的同化吸收。碳和氮是植物细胞生长的主要营养成分,它们的吸收和利用直接影响细胞的生长和产物合成。在霍山石斛类原球茎的悬浮培养过程中,多糖的合成不仅与类原球茎的生长有关,而且还与细胞内的还原糖浓度有关^[18]。培养基中的碳被吸收到细胞内,一方面供应细胞生长,另一方面用来合成多糖,蔗糖酶活性的提高加速了蔗糖的分解,使培养基中的还原糖浓度提高,类原球茎对碳的吸收

速度和利用程度都提高,从而促进了类原球茎的生长和多糖的积累,所以,在霍山石斛类原球茎的悬浮培养过程中,可以通过添加适量的多胺来调控类原球茎的生长和多糖合成。

REFERENCES(参考文献)

[1] Chen XM(陈晓梅), Guo SX(郭顺星). Study progress of the *Dendrobium* plants in chemicals constituents and pharmaceutical activity. *Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), 2001, **13**(1): 70-74.

[2] Bi ZM, Wang ZT, Xu LS. Chemical constituents of *Dendrobium monili forme*. *Acta Botanica Sinica*, 2004 **46**(1): 124-126.

[3] Luo H(罗慧玲), Cai TY(蔡体育), Chen Q(陈巧伦), et al. Enhancement of *Dendrobium candidum* polysaccharide on killing effect of LAK cells of umbilical cord blood and peripheral blood of cancer patients *in vitro*. *Journal of Chinese Cancer*(癌症), 2000, **19**(12): 1124-1126.

[4] Zha XQ, Luo JP, Jiang ST. Induction of immunomodulating cytokines by polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*. *Pharmaceutical Biology*, 2007, **45**(1): 1-6.

[5] Huang M(黄民权), Lu YJ(卢应京). Prospect on cultures of *Dendrobium candidum* used as drugs. *J Chin Med Mater*(中药材), 1998, **21**(11): 543-545.

[6] Tiburcio AF, Campose JL, Figueras X, Besford RT. Recent advance in understanding polyamine function during plant development. *Plant Growth Regulator*, 1993, **12**: 331-340.

[7] Zhong JJ, Wang DJ. Improvement of cell growth and production of ginseng sapoin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng*: Cu⁺ effect. *J Biotechnology*, 1996, **46**: 69-72.

[8] Liu HY(刘华英), Xiao L(萧浪涛), Lu XD(鲁旭东), et al. Determination of polysaccharide content in *Dendrobium huoshanense* callus by reversed phase high

- performance liquid chromatography. *Journal of Hunan Agricultural University* (湖南农业大学学报), 2005, **31**(1): 39 – 41.
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein dye-binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 – 254.
- [10] Vu JCV, Randall PN, Yelenosky G. Activities of sucrose metabolism enzymes in glycerol-grown suspension cultures of sweet orange (*Citrus Sinensis* L. osbeck). *Environmental and Experimental Botany*, 1995, **35**: 455 – 463.
- [11] Chen BM, Wang ZH, Li SX, Wang GX, Song HX, Wang XN. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetable. *Plant Science*, 2004, **167**: 635 – 643.
- [12] Sudh G, Ravishankar GA. Putrescine facilitated enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens*. *J Plant Physiology*, 2003, **160**: 339 – 346.
- [13] Konradora H, Lipavska H, Albrechtora J, Vreugdenhil D. Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogenesis in Norway spruce: content of soluble saccharide and localization of key enzyme activities. *J Plant Physiology*, 2002, **159**: 387 – 396.
- [14] Navarro FJ, Perdomo G, Jejera D, Medina B, Machin F, Guillen RM, Lancha A, Siverio JM. The role of nitrate reductase in the regulation of the nitrate assimilation pathway in the yeast *Hansenula Polymorpha*. *FEMS Yeast Research*, 2003, **4**: 149 – 155.
- [15] Campbell WH. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiol Plant*, 1988, **74**: 214 – 219.
- [16] Bais HP, Madhusudhan R, Bhagyalakshmi N, Rajasekaran T, Ramesh BS, Ravishankar GA. Influence of polyamines on growth and formation of secondary metabolites in hairy root cultures of *Beta vulgaris* and *Tagetes patula*. *Acta Physiol Plant*, 2000, **22**: 151 – 158.
- [17] Suresh B, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Ravishankar GA. 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. *Process Biochemistry*, 2004, **39**: 2091 – 2096.
- [18] Jiang ST(姜绍通), Wei M(魏明), Luo JR(罗建平). Effect of phosphate on cell growth and polysaccharide production by suspension cultures of protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2006, **22**(4): 613 – 618.