

Vitex glabrata R.Br. 悬浮培养细胞的生长条件优化及 20-羟基蜕皮激素的生产

Optimization of Cell Growth and 20-Hydroxyecdysone Production in Cell Suspension Culture of *Vitex glabrata* R.Br.

Duangjai Sinlaparaya, Preeyada Duanghaklang and Sanha Panichajakul *

张玉霞 译

Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand

摘 要 研究了培养基、植物生长调节素以及接种量对 *Vitex glabrata* R.Br. 悬浮培养细胞的生长情况以及对 20-羟基蜕皮激素形成的作用。当细胞在添加有 2.0mg/L BAP(6-苯甲酸嘌呤)和 1.0mg/L 2*A*-D 的 Gamborg's B5 培养基中培养时细胞生长和 20-羟基蜕皮激素的形成达到了最高水平。当接种量为 20% PCV(积压细胞体积)时观察到了 20-羟基蜕皮激素的最高产量,大约是 1.1mg/(L·d)。实验数据也表明当接种量增加到 20% PCV 时,产量提高了 7 倍。

关键词 20-羟基蜕皮激素, 悬浮培养, *Vitex glabrata*

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1033-04

Abstract The effects of the cultivation media, plant growth regulators and inoculum size on the cell growth and 20-hydroxyecdysone production in suspension cultures of *Vitex glabrata* R.Br. were investigated. The cell growth and 20-hydroxyecdysone formation reach the highest when cells are cultured in the Gamborg's B5 medium supplemented with 2.0mg/L BAP(6-benzylaminopurine) and 1.0mg/L 2*A*-D. The maximum 20-hydroxyecdysone productivity, of about 1.1mg/L/day, was observed in the culture with 20% PCV(packed cell volume) of inoculum size. These data also show that the increment of the inoculum size to 20% PCV could increase the productivity in 7-folds.

Key words 20-hydroxyecdysone, suspension cultures, *Vitex glabrata*

蜕皮素、20-羟基蜕皮激素或 beta-蜕皮素属于蜕皮激素,它们在控制昆虫或者甲壳动物的生长、发育和复制方面具有重要的作用^[1]。蜕皮素或者它们的类似物可以用作杀虫剂^[2]。另外, beta-蜕皮素有潜力替代添加剂胆固醇,可以做为天然生长刺激素用在虾养殖业方面^[3]。近来关于 20-羟基蜕皮激素的药物学研究特征表明它具有抗菌活性、抗糖尿病效果以及抗氧化和抗自由基特征^[4],市场上也有很多用于健身以及运动员用的含 20-羟基蜕皮激素的产品。*V. glabrata* 树皮的 20-羟基蜕皮激素的含量高

达 2%~2.5% DW,因此这种植物有潜力作为蜕皮激素的来源^[5]。由于 *V. glabrata* 树木稀缺并且生长缓慢,所以 20-羟基蜕皮激素的来源有限。植物细胞培养作为一种非常有吸引力的替代方法可以克服从天然资源中提取有用代谢物的限制^[6]。影响 *V. glabrata* 培养细胞产生 20-羟基蜕皮激素的很多因素都已有研究,包括培养基优化^[5,7],添加前体物质^[7]。本研究的目的是通过调节培养基的配方以及激素类型建立 *V. glabrata* 细胞悬浮培养的方法从而用于生产 20-羟基蜕皮激素。另外,本文还考察了

Received: January 5, 2007; Accepted: March 26, 2007.

* Corresponding author. Tel: +66-81-9653966; E-mail: spanichajakul@yahoo.com

英文原文请浏览本刊英文版(<http://www.sciencedirect.com/science/journal/1872-2075>) 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

接种量对细胞生长以及 20-羟基蜕皮激素产生的影响。

1 材料和方法

1.1 植物材料和细胞培养

V. glabrata 细胞系来源于幼茎^[5], 已经传代培养超过 10 年。愈伤组织培养 维持在半数剂量的 MS (Murashige and Skoog 培养基中^[8] 添加 2.0mg/L 6-苯甲酸嘌呤 (BAP), 1.0mg/L 的 2,4-二氯苯氧代乙酸 (2,4-D) 和 30g/L 蔗糖。培养基调节 pH 5.8 并 121℃ 20min 灭菌。悬浮培养在液体培养基中进行, 与愈伤组织培养类似, 只是不添加琼脂。培养瓶放置在滚动摇床上, 转速 120r/min, 2000lx 25℃ 持续光照。

1.2 细胞生长测定

用测定培养物中细胞干重的方法来确定细胞生长量。检测细胞干重时, 细胞悬液在抽真空的情况下透过布氏漏斗上的滤纸。将细胞放置在培养皿中在 60℃ 烘箱中烘干到恒重。

1.3 蜕皮素提取和 HPLC 检测

0.3g 干重的细胞在 Soxhlet 仪器中用 180mL 的 95% (V/V) 的乙醇提取 6h。乙醇提取液通过旋转蒸发器在 60℃ 蒸发。残余物溶解在 3mL 的甲醇中, 并用 5mL 的己烷涡旋 2 次。甲烷提取物在 60℃ 热风烘箱中蒸发。残余物溶解在 2mL 的蒸馏水中。上清通过 Sep-pak C₁₈ 柱过滤, 用 10mL 的蒸馏水洗脱高极性物质, 使之与保留的蜕皮素分离。用 20% (V/V) 甲醇-水 (10mL) 和 80% (V/V) 甲醇-水分别洗脱蜕皮素。收集洗脱物并在室温晾干, 然后溶解在甲醇中进行 HPLC 分析。提取物用 ODS-3 C₁₈ 柱 (250mm × 4.6mm) 分析。流动相的组成为水/乙腈/乙酸 (84:14:2, V/V/V), 流速 1.0mL/min。用 254nm 波长测定吸收值。标准品 (20-羟基蜕皮激素) 溶解在甲醇中, 浓度为 2.0mg/mL。20-羟基蜕皮激素的含量通过以下公式计算:

$$Y = 9E + 0.6X - 7925.2 (R^2 = 0.998),$$

Y 代表 20-羟基蜕皮激素的面积, X 代表 20-羟基蜕皮激素的含量。

2 结果和讨论

2.1 培养基的影响

图 1 显示的是 *V. glabrata* 悬浮培养物在 B5 培养基和 1/2 MS 培养基中的生长过程曲线以及 20-羟基蜕皮激素的产生情况, 两种培养基都添加了

2.0mg/L BAP 和 1.0mg/L 2,4-D。12.1g/L 的最高细胞干重是用 B5 培养基培养 3 周获得的。在 1/2 MS 培养基中获得的最高细胞干重比 B5 培养基低 20%。HPLC 分析产生的 20-羟基蜕皮激素表明, 当细胞在 B5 培养基中培养三周时产生最高水平的 20-羟基蜕皮激素 (0.038% DW)。这个数值比在 1/2 MS 培养基中培养时获得的水平高 24%。根据 Nahalka 及其同事的报道, B5 培养基中的白花丹醌含量比 1/2MS 培养基中的含量高约 1.8 倍^[9]。B5 培养基比 MS 培养基对细胞生长以及 20-羟基蜕皮激素的形成更加有利可能是因为它含有更高的无机营养素和维生素^[10]。另外, 在其它植物中, B5 培养基对细胞生长和刺激代谢产物的形成也更加有利, 这些植物包括 *Crocus sativa*^[11] 和 *Cistanche deserticola*^[12]。在本文中, B5 培养基可以有效促进细胞生长和形成 20-羟基蜕皮激素。因此, 本文选择 B5 培养基进行后续研究。

2.2 植物生长调节素的影响

本文还研究了植物生长调节素对 *V. glabrata* 细胞生长以及对 20-羟基蜕皮激素形成的影响 (图 2)。 *V. glabrata* 细胞用 B5 培养基培养, 添加 2.0mg/L BAP 和 1.0mg/L 的两种不同的植物生长素 (2,4-D 和 IAA)。当用添加 2.0mg/L BAP 和 1.0mg/L IAA 的 B5 培养基时, 在第四周获得了最高产量 7.4g/L。然而, 当用添加 2.0mg/L BAP 和 1.0mg/L 2,4-D 的 B5 培养基, 在第三周获得最高细胞产量, 其产量比用含有 IAA 的培养基高出 40%。用添加 2.0mg/L BAP 和 1.0mg/L 2,4-D 的 B5 培养基培养三周时, 20-羟基蜕皮激素的最高含量为 0.039% DW。这一含量比用添加 IAA 的培养基高出 30%。因此, 后续试验用添加 2.0mg/L BAP 和 1.0mg/L 2,4-D 的 B5 培养基进行。

2.3 接种量的影响

接种量对细胞生长和 20-羟基蜕皮激素产生的影响列在表 1 中。接种量为 20% 压积细胞体积 (PCV) 时, 在第 4 天达到最高细胞生长速度, 而用 10% 的 PCV 时最高细胞生长速度 21d 时才能获得。提高接种量可以显著的缩短培养时间。用 20% PCV 培养 4d 时, 可获得 20-羟基蜕皮激素的最高产率, 约 0.040% DW。20% PCV 时, 20-羟基蜕皮激素的最高产量为 1.10mg (L·d)。这一数值比用 10% PCV 高 7 倍。这些数据表明提高接种量对提高 20-羟基蜕皮激素的形成非常重要。通过提高接种量而刺激人参皂甙形成的原因可能是细胞之间的交流以及通过接

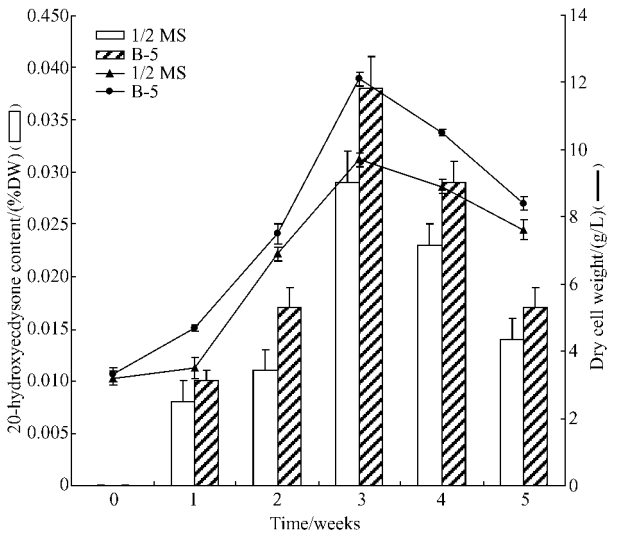


图 1 *V. glabrata* 悬浮细胞在不同培养基配方中培养时细胞干重和 20-羟基蜕皮激素产生的时间曲线
Fig. 1 Time course of dry weight and 20-hydroxyecdysone production in cell suspension cultures of *V. glabrata* in different media formulation
Values are means of triplicate results and error bars represent standard deviations.

种量所释放的未知的影响因子^[13]。另外,接种量对细胞生长以及次级代谢产物形成的影响可能与参与代谢途径的酶活性的提高有关^[14]。同样的,通过提高接种量来提高次级代谢产物的含量的方法也在以下方面有应用:*Taxus chinensis*^[15]产生紫杉酚,*Cucurbita andreana*产生葫芦素^[16],*Panax notoginseng*^[17]产生人参皂甙以及*Saussurea medusa*^[18]产生 jaceosidin。但是,接种量对次级代谢物生物合

成的影响的具体机制还不明确。

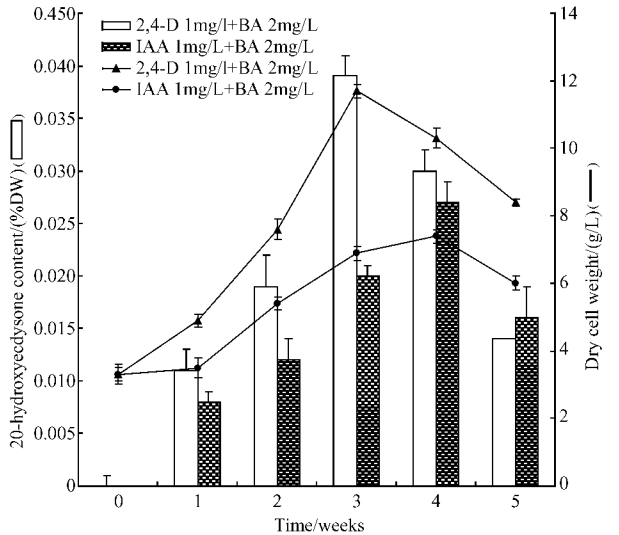


图 2 *V. glabrata* 悬浮细胞在添加 2.0mg/L BAP 和 1.0mg/L 两种不同的植物生长素(2,4-D 和 IAA)的 B5 培养基中培养时细胞干重和 20-羟基蜕皮激素产生的时间曲线
Fig. 2 Time course of dry weight and 20-hydroxyecdysone production of *V. glabrata* cell suspension cultures in B5 medium supplemented with 2.0mg/L BAP and 1.0mg/L of 2 different auxin(2,4-D and IAA)
Values are means of triplicate results and error bars represent standard deviations.

3 结论

V. glabrata 悬浮细胞培养对细胞生长和 20-羟基蜕皮激素形成的最佳条件为 Gamborg's B5 培养基添加 1.0mg/L 2,4-D, 2.0 mg/L BAP 20 %PCV 接种量。

表 1 *V. glabrata* 悬浮细胞在添加 2.0mg/L BAP 和 1.0mg/L 2,4-D 的 B5 培养基中培养时接种量对生物量和 20-羟基蜕皮激素产生的影响
Table 1 Effect of inoculum size on the biomass and 20-hydroxyecdysone productivity in suspension culture of *V. glabrata* in B5 medium supplemented with 2.0mg/L BAP and 1.0mg/L 2,4-D

Inoculum size(%PCV)	Maximum production(%DW)	Maximum cell growth(g/L)	Time of maximum production/d	Maximum productivity[mg/L·d]
10	0.033	11.2	21	0.176
20	0.040	11.0	4	1.1

致 谢 本研究由 Royal Golden Jubilee(RGJ)Ph.D. 项目(Grant no. PHD/0317/2543 资助,部分由泰国研究基金 Thailand Research Fund(TRF)BGJ/35/2544 资助。

REFERENCES(参考文献)

[1] Koolman J. Ecdysone : From Chemistry to Mode of Action. New York :Thieme Medical Publishers , 1989.
[2] Dhadialla TS, Tzertzinis G. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology*, 1998 , 43 : 545 – 569.

[3] Cho G, Itami T. Plant extract as cholesterol substitute in shrimp. *Aqua Feeds : Formulation & Beyond*, 2004 , 1(2) : 17 – 18.
[4] Lafont R, Dinan L. Practical uses ecdysteroids in mammals including humans : and update. *Journal of Insect Science*, 2003 , 3 (7) : 1 – 30.
[5] Thavornmithi P. Production and extraction of hormone from callus of *Vitex glabrata* R. Br. MS Thesis , Chulalongkorn University , Thailand , 1990.
[6] Rao SR, Ravishankar GA. Plant cell culture : chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 2002 , 20 : 101 – 153.

- [7] Prasertsom U , Suspension culture of *Vitex glabrata* R.Br. cell for moulting hormone production. MS Thesis , Chulalongkorn University , Thailand ,1990.
- [8] Murashige T , Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* , 1962 , **15** :473 – 497.
- [9] Nahalka J , Blanakrik P , Gemeiner P , *et al.* Production of plumbagin by cell suspension cultures of *Drosophyllum lusitanicum* Link. *Journal of Biotechnology* , 1996 , **49** :153 – 161.
- [10] Gui YL , Ma C. Plant Tissue Culture. Beijing : Science Press , 1985.
- [11] Chen S , Wang X , Zhao B , *et al.* Production of crocin using *Crocus sativa* callus by two-stage culture system. *Biotechnology Letters* , 2003 , **25** :1235 – 1238.
- [12] Ouyang J , Wang X , Zhao B , *et al.* Formation of phenylethanoid glycoside by *Cistanche deserticola* callus grown on solid media. *Biotechnology Letters* , 2003 , **25** :223 – 225.
- [13] Akalezi CO , Liu S , Li QS , *et al.* Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. *Process Biochemistry* , 1999 , **34** :639 – 642.
- [14] Contin A , van der Heijden R , ten Hoopen HJG , *et al.* The inoculum size trigger tryptamine or secologanin biosynthesis in a *Catharanthus roseus* cell culture. *Plant Science* , 1998 , **139** :205 – 211.
- [15] Wang HQ , Zhong JJ , Yu JT. Enhanced production of taxol in suspension cultures of *Taxus chinensis* by controlling inoculum size. *Biotechnology Letters* , 1997 , **19** :353 – 355.
- [16] Halaweish FT , Tallamy DW. Production of cucurbitacins by cucurbit cell cultures. *Plant Science* , 1998 , **131** :209 – 218.
- [17] Zhang YH , Zhong JJ. Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation of *Panax notoginseng* cells. *Enzyme Microbial Technology* , 1997 , **21** :59 – 63.
- [18] Zhao D , Xing J , Li M , *et al.* Optimization of growth and jaceosidin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea medusa*. *Plant Cell , Tissue and Organ Culture* , 2001 , **67** :227 – 234.