

不同理化因子对雪莲培养细胞中黄酮类形成的影响

赵德修 汪 沂 赵敬芳

(中国科学院植物研究所 北京 100093)

摘 要 研究了不同理化因子对水母雪莲(*Saussurea medusa* Maxim)愈伤组织生长及黄酮类化合物生物合成的影响。结果表明,有利于细胞生长及黄酮形成的合适温度为 25℃。白光对愈伤组织生长无促进作用,但有利于黄酮的形成。培养基中添加 1mg/L NAA 和 0.2mg/L 的 KT 组合对细胞的生长较有促进作用。5%蔗糖和 1%葡萄糖的组合有利于细胞的生长和黄酮的形成。用⁶⁰Co-γ射线辐照愈伤组织,在剂量为 4000Gy 的条件下,获得一个合成黄酮能力高于原愈伤组织 70%的细胞系。用高效液相和紫外分光光度法,测定离体培养光照条件下干细胞总黄酮的含量为 3.2%,是暗培养的 4.4 倍。培养温度 25℃时干细胞黄酮的含量为 2.02%,分别为 20℃,35℃时的 5 倍和 3.2 倍。

关键词 水母雪莲,愈伤组织培养,理化因子,黄酮,生物合成
学科分类号 Q947.9

水母雪莲(*Saussurea medusa* Maxim)属于菊科凤毛菊属植物,为我国传统中草药。民间用于治疗风湿性关节炎、妇科病、高山不适应症等。雪莲含多种有效成分,如黄酮具有抗炎、镇痛,扩张血管等作用^[1]。其中 4',5,7-三羟基-3',6-二甲氧基(Jaceosidin)和 4',5,7-三羟基-6-甲氧基(Hispidulin)黄酮对治疗腹水形肝癌具有良好的作用^[2,3]。雪莲生长环境特异,人工栽培困难,自然资源有限,难以满足临床上日益增长的需要。应用植物细胞大量培养技术获得人们所需要的活性产物已有许多成功的先例^[4]。本文研究不同理化因子对雪莲培养细胞生长及黄酮类化合物生物合成的影响。以探讨适合于雪莲细胞培养的优良条件。为进一步开展水母雪莲细胞大量培养提供可靠的参数指标。

1 材料和方法

1.1 材料和愈伤组织培养

供试材料水母雪莲愈伤组织,为本实验室筛选获得的优良无性系 A,用于⁶⁰Co-γ射线辐射的愈伤组织为 B1 系。剂量分别为 250, 500, 1000, 2000, 4000Gy, 剂量率为 90Gy/min。培养条件:在 MS 附加 0.2mg/L BA + 2mg/L NAA,蔗糖 30g/L, pH5.8 的培养基上加琼脂 6g/L,进行固体继代培养。50ml 三角瓶内含 20ml 固体培养基,每瓶接种量为鲜重 0.5g 左右,分别于日光 60μmol/m²·s 下培养,温度为 25℃左右,每隔 16d 继代 1 次。

1.2 细胞生长测定

取继代固体培养细胞,测定细胞生长曲线及光因子,植物激素,培养温度,碳源和 ^{60}Co - γ 照射愈伤组织等实证。以每升细胞的鲜重(FW)或干重(DW)表示培养过程中的生长变化。计算:细胞增长量=收获量/L-接种量/L,细胞生长指数(Growth index)=(细胞收获量/L)/(接种量/L)。所有数据为2次重复,每次5瓶,共计10瓶的平均值。

1.3 培养物中活性产物的测定

1.3.1 样品提取:细胞培养物 60℃干燥,研碎。用 80% 的乙醇提取总黄酮^[5]。

1.3.2 紫外分光光度法:仪器型号, BECKMAN DU-600。对照品的溶液采用梯度稀释法配制,标准曲线用线性响应回归方程: $Y = a + bX$ (X 为进样量, Y 为响应峰值)^[5]。 $r = 0.9994$; $a = 0.00533$; $b = 10.54257$ 。

1.3.3 高压液相色谱法:仪器 Water 244 型。色谱条件: BCC_{18} (0.4cm×30cm) 柱; 流动相: 90% 甲醇, 10% 水; pH 3; 流速 0.7ml/min; 检测器: $\text{UV}_{365\text{nm}} \times 0.1\text{AUFS}$ ^[6]。

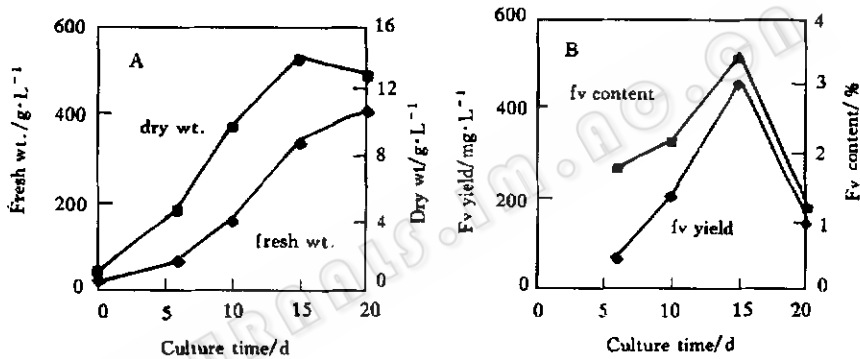


图1 雪莲愈伤组织生长和黄酮形成的时间进程

Fig.1 Time-course of callus growth and flavonoids formation in *S. Medusa Maxim*

A. Growth curves of cell, B. Time-course of flavonoids formation

1.3.4 薄层层析对培养物中 4', 5, 7-三羟基-3', 6-二甲氧基和 4', 5-7 三羟基-6-甲氧基, 即粗毛茛草素的分析:聚酰胺片 3cm×7cm, 展开剂: 氯仿: 甲醇: 丁酮 = 12:2:1, 用紫外灯 254nm 波长或碘蒸汽显色。

2 结果与讨论

2.1 细胞生长及黄酮形成的时间进程

取继代 12 次的培养细胞,接种于 MS 培养基上进行光照培养,每隔 4~5d 随机取样,测定细胞鲜重,干重及干细胞黄酮的含量。结果见图 1,图 1 显示雪莲细胞生长曲线基本符合“S”型。在经过短时间的延迟期后,大约第 6d 开始进入对数生长期,第 15d 后细胞的鲜重继续增加,但干细胞重量基本保持不变。从图 1 中也可以看出,随着细胞生长量的增加,黄酮形成的产率也随着提高。当细胞的干重达到最大值时,黄酮的含量也为最大值。生长率保持静止期时,黄酮的产量突然下降。因此,本试验证明雪莲愈伤组织中黄酮生物合成与细胞生长不是平行关系的次生代谢模型。

2.2 温度对愈伤组织生长及黄酮生物合成的影响

试验结果见表 1。雪莲愈伤组织生长及黄酮生物合成的适宜温度在 25℃ 左右。培养温度为 20℃ 或 35℃ 时对愈伤组织的生长及黄酮的合成均不利。在这 2 种培养温度下,愈伤组织的鲜重、干重的增加分别只有 25℃ 时的 80%, 63%, 而总黄酮的含量分别又有 25℃ 时的 20%, 31% 这一结果与叶和春等^[8]报道的基本上是一致的。在 25℃ 或 35℃ 条件下,愈伤组织培养 10d 后,分别由 25℃ 转换到 35℃ 或 35℃ 转换 25℃ 再继续培养 6d,试验结果表明,以上 2 种不同的培养温度与 25℃ 相比,愈伤组织生长无明显差别。但黄酮的含量均只有 25℃ 时的 53%。这一结果与 Seo^[9]报道是不一致的。

表 1 温度对固体培养细胞生长及黄酮形成的影响

Table 1 Effects of temperature on cell growth and flavonoids formation in solid culture

Temperature /℃	Increase of weight/g. L ⁻¹		Growth index/g. L ⁻¹		Flavonoids content/ %	Flavonoids yield/ml. L ⁻¹
	FW	DW	FW	DW		
20	325	11.50	13.0	13.9	0.40	46
25	415	14.25	16.6	16.0	2.02	288
35	260	9.00	10.4	10.1	0.62	56
25~35	429	15.40	17.2	17.3	1.08	166
35~25	422	14.50	16.9	16.3	1.08	156

2.3 光照对愈伤组织生长及黄酮生物合成的影响

采用了白色光照(荧光灯连续光照,光强 60 μmol/m²·s,)及黑暗,光-暗,暗-光 4 种处理雪莲愈伤组织培养中。试验结果表明:在白光的条件下,干细胞总黄酮的含量是黑暗条件下的 4.4 倍,对黄酮的形成具有明显的促进作用。黑暗对愈伤组织的生长是有利的,但对愈伤组织中黄酮的形成无促进作用。在光照或黑暗条件下培养愈伤组织 10d 后,分别由光照转入到黑暗,由黑暗转入光照,再继续培养 6d。结果表明:由黑暗转入光照条件下的愈伤组织生长及黄酮产量均低于光照条件下,但均高于光照转入黑暗条件下。

表 2 光照对固体培养细胞生长及黄酮形成的影响

Table 2 Effects of light on cell growth and flavonoids formation in solid culture

Condition of light	Increase of weight/g. L ⁻¹		Growth index/g. L ⁻¹		Flavonoids content	Flavonoids yield
	FW	DW	FW	DW	/ %	/mg. L ⁻¹
Light	415	14.25	16.60	16.57	2.02	288
Dark	450	16.35	18.00	18.37	0.46	75
Light-dark	373	12.75	14.82	14.32	0.84	107
Dark-light	401	12.80	16.04	14.34	1.84	234

2.4 激素对愈伤组织生长的影响

由表 3 可以看出,对雪莲愈伤组织的生长以 1mg/L NAA+0.2mg/L KT 组合的效果较为理想,因为这一组合是以较低的激素浓度,达到较高的细胞生长量。尽管 NAA 浓度扩大 10 倍,愈伤组织的生长量若有提高,但可以认为是在误差的范围之内。0.1mg/L 2,4-D+0.2mg/L KT 组合比以上激素的组合对细胞生长效果较差,而且随 2,4-D 浓度的加大,对愈伤组织的生长更为不利。

表 3 不同激素组合对固体培养细胞生长的影响(16d)

Table 3 Effects of different combination of hormone on cell growth in solid culture (16d)

Hormone/mg. L ⁻¹			Increase of weight/g. L ⁻¹		Growth index/g. L ⁻¹	
2,4-D	NAA	KT	FW	DW	FW	DW
0.1	0.0	0.2	274	12.65	10.96	14.21
1.0	0.0	0.2	174	9.25	6.98	10.39
10.0	0.0	0.2	39	2.65	1.56	2.92
0.0	0.1	0.2	255	13.20	10.18	14.83
0.0	1.0	0.2	375	16.65	15.00	18.70
0.0	10.0	0.2	350	15.60	14.00	17.52

2.5 碳源对愈伤组织生长及黄酮形成的影响

糖对次生代谢的作用,首先表现在不同的碳源对次生产物的积累及细胞的生长不一样^[10]。如李树敏^[11]研究发现,蔗糖对人参色素细胞生长及花苷的积累效最好,葡萄糖次之。在我们的试验中选用不同浓度的蔗糖、葡萄糖及蔗糖和葡萄糖的组合作为糖源。如表4所示,培养基中加入5%葡萄糖,其细胞生长量是5%蔗糖的细胞鲜重1.6倍,是细胞干重的1.22倍。但培养物中黄酮的含量仅是5%蔗糖的33%。在所有调查的碳源中,30%的蔗糖浓度条件下的愈伤组织鲜重最高,但细胞干重只是5%葡萄糖的75%,5%蔗糖+1%葡萄糖组合的66%。5%蔗糖+1%葡萄糖的组合对雪莲愈伤组织生长不仅有利,而且干细胞中总黄酮的含量为最高。

表 4 碳源对固体培养细胞生长的影响

Table 4 Effects of different carbon resources on cell growth in solid cultures

Carbon/g. L ⁻¹		Increase of weight/g. L ⁻¹		Growth index/g. L ⁻¹		Flavonoids	Flavonoids yields
Sucrose	Glucose	FW	DW	FW	DW	content/%	/mg. L ⁻¹
10	0	169	6.65	7.36	7.47	0.94	63
30	0	470	16.57	18.78	18.82	1.90	318
50	0	204	18.25	8.16	20.50	1.96	355
0	10	151	5.50	6.04	6.18	1.40	77
0	30	331	13.50	13.24	15.17	1.81	244
0	50	328	10.75	13.12	25.00	0.64	142
10	10	279	10.75	11.16	12.08	1.07	116
30	10	360	19.00	14.40	21.35	1.69	321
50	10	260	25.50	10.40	2.86	2.15	548

2.6 ⁶⁰Co-γ 射线照射愈伤组织对细胞生长及黄酮生物合成的影响

目前,应用各种化学的和物理的诱变处理,已在不少培养细胞中获得所需要性状的突变体,有些突变体表现出了良好的生长能力。郑光植^[12]利用4000Gy的⁶⁰Co-γ射线照射三分三愈伤组织,诱导出的一个愈伤组织突变体其东莨菪碱含量为0.177mg/g干重,比亲本高30%且很稳定。我们用⁶⁰Co-γ射线照射雪莲愈伤组织,剂量范围为250-4000Gy。照射速率为91Gy min⁻¹。从表5中可以发现,在4000Gy剂量范围内照射愈伤组织,干细胞总黄酮含量是原愈伤组织中总黄酮含量的2.99倍。虽然愈伤组织生长受到抑制,但从

表 6 中可以看到,照射后的愈伤组织经过 5 代继代培养后。细胞生长明显提高,比原愈伤组织干细胞提高 13%,且很稳定。黄酮的含量比原愈伤组织总黄酮含量提高 70%。

表 5 不同⁶⁰Co-γ-ray 照射剂量对愈伤组织生长及黄酮形成的影响
Table 5 Effects of different dosages of ⁶⁰Co-γ-ray on the growth rates and flavonoids contents of *T. medusa* calluses

Radiation dosages /Gy	Increase of weight/g.L ⁻¹		Growth index/g.L ⁻¹		Flavonoids content /%	Flavonoids yield mg.L ⁻¹
	FW	DW	FW	DW		
0	357	14.5	14.28	16.29	1.51	219
250	135	13.5	5.40	15.16	1.03	139
500	125	12.0	5.00	13.48	1.50	180
1000	130	10.5	5.20	11.79	1.08	114
2000	39	6.0	1.54	6.74	1.66	99
4000	19	4.5	0.74	5.05	2.79	126

表 6 ⁶⁰Co-γ-ray 照射后愈伤组织生长及黄酮形成的动态
Table 6 Time courses of the cell growth and flavonoids formation after irradiation with ⁶⁰Co-γ-ray

Subculture /No.	Radiation dosages/Gy											
	0		250		500		1000		2000		4000	
	In. wt /g.L ⁻¹	F. conc. /%	In. wt /g.L ⁻¹	F. conc. /%	In. wt /g.L ⁻¹	F. conc. /%	In. wt /g.L ⁻¹	F. conc. /%	In. wt /g.L ⁻¹	F. conc. /%	In. wt /g.L ⁻¹	F. conc. /%
2	14.5	1.51	13.5	1.03	12.0	1.80	10.5	1.08	6.0	1.20	4.5	2.79
3	14.0	1.48	16.0	0.90	13.0	1.70	16.0	0.898	13.5	1.08	12.0	2.50
4	15.0	1.44	11.5	0.80	12.5	1.72	12.5	1.10	13.0	1.60	12.5	2.54
5	13.0	1.50	9.5	0.88	6.0	1.67	8.5	0.90	10.5	1.21	17.0	2.55

In. wt = Inceas of dry weight, F. conc = Flavonoid content

2.7 培养物中活性产物分析

2.7.1 HPLC 对培养物中 Jaceosidin 和 Hispidulin(粗毛豚草素)黄酮的分析和含量测定:图 2 显示雪莲愈伤组织中含 Jaceosidin 0.42%, Hispidulin 0.088%。

2.7.2 紫外分光光度法:用紫外分光光度法对培养物中总黄酮的含量测定,试验结果分别从表 1 - 6 中可以看出不同培养中总黄酮的差异。

2.7.3 薄层层析对培养物中 Jaceosidin 和 Hispidiun 分析: Jaceosidin Rf 值为 0.83, Hispidun Rf 值 0.67^[7]。

通过以上试验,初步确定了影响雪莲愈伤组织生长及黄酮类生物合成的某些理化因子的值。在这些调控因子中,光和培养温度为培养因子。至于不同光质、不同光强对次生代谢产物的影响和光因子的作用机理以及培养温度对有关合成黄酮的主要关键酶活性的相关性,有待进一步研究。

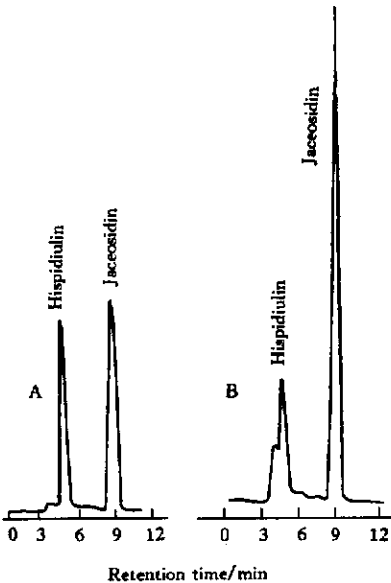


图 2 培养物中黄酮的高效液相色谱分析
Fig.2 HPLC determination
A. Standard (Jaceosidin, Hispidulin), B. Extract of flavonoids in cells

致 谢 标准品由兰州大学化学系贾忠建教授提供,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 李观海,刘 发,张 新. 药学通报,1979,14(2):86
- 2 韩书亮. 癌变·畸变·突变. 1995,7(2):80~83
- 3 刘力生. 兰州大学学报(自然科学版),1985,21(4):80~83
- 4 Mamoru T, Hajime M, Noboru H *et al.* Phytochemistry, 1974, 13:927~932
- 5 关家彦,王玮文,马暮提等. 沈阳医科大学学报,1995,12(3):209~211
- 6 郑玉梁,姚新生. 中草药,1994,25(10):542~545
- 7 贾忠建,李 瑜,杜 牧等. 高等学校化学学报,1983,4(5):581
- 8 叶和春,尹作鸿,李国风等. 植物学报,1991,33(12):927~931
- 9 Weon Taek Seo *et al.* Plant Cell Reports, 1993, 12:414~417
- 10 Zhao Dexiu, Beran M, Kozova J *et al.* Folia Microbiol, 1991, 36:549
- 11 李树敏,朱慰华. 植物学报,1990,32:103~111
- 12 Zheng Guangzhi, He Jingbo, Wang Shiling. In: Fujiwara A eds, Plant Tissue Culture, Tokyo:1982, pp. 339~340

Effect of Physical and Chemical Factors on Callus Growth and Flavonoids Biosynthesis in the Callus Cultures of *Saussurea medusa*

Zhao Dexiu Wang Yi Zhao Jingfang

(Institute of Botany of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract The effects of some physical and chemical factors on callus growth and flavonoids formation in the callus cultures of *Saussurea medusa* were discussed. According to experiments, the optimum temperature for callus growth and flavonoids formation was 25℃. Authors also found that flavonoids formation were strongly inhibited by dark light, and white light is famous for flavonoids production. Callus growth was promoted when 1mg/L NAA and 0.2mg/L KT were added to the media. The combination of 5% sucrose and 1% glucose is useful for callus growth and flavonoids formation. A fine callus strain of *S. medusa* have been selected through irradiation with 4000 rad of r-ray. The growth rate and flavonoids content of the callus strain were high and stable. A sensitive and rapid high-performance liquid chromatographic as well as UV spectrophotometer methods have been developed for detecting the flavonoids in cultured cells. The results revealed that the content of total flavonoids in dry cells was 2.02%, 4.4 times as that in dark light; 5 and 3.2 times were that in temperature 20℃, 35℃ respectively.

Key words *Saussurea medusa* Maxim, callus culture, physical and chemical factors, flavonoids biosynthesis