

丹参愈伤组织细胞固定化及其转化产物的特征

陶璐璐 袁静明

(山西大学分子科学研究所, 太原)

徐锦堂

(中国医学科学院药用植物资源开发研究所, 北京)

本文用海藻胶包埋丹参愈伤组织细胞, 在LS+KT0.1+NAA1培养液中常温振荡培养一个月左右, 培养液抽提物经TLC和HPLC检测, 表明该系统可连续分泌丹参的主要成分——丹参酮IIA和隐丹参酮。此外对丹参愈伤组织细胞悬浮培养、海藻胶包埋条件, 固定化细胞的稳定性以及分泌产物的特征等方面进行了比较。

关键词 丹参; 愈伤组织; 海藻酸; 固定化

中草药药用成分通常可用植株提取或经愈伤组织细胞悬浮培养方式获得^[1,2], 然而, 前者受自然资源的限制; 后者有快速生长, 难于形成一定量次生代谢产物的缺点。固定化植物细胞的发展, 为中药资源开辟了一条新的途径^[3,4]。经用海藻胶固定化丹参愈伤组织细胞^[5], 在LS+KT0.1+NAA1的培养液中, 常温培养近一个月, 可连续产生丹参的主要成分——丹参酮IIA和隐丹参酮。在一定培养条件下, 固定化细胞的稳定性, 产物的含量以及下游工艺的可行性等明显优于悬浮细胞培养。

材料与 方法

(一) 丹参细胞株

丹参细胞株由中国医科院药用植物资源开发研究所真菌室组培组提供。

(二) 细胞培养及固定化条件

所有操作均在无菌条件下, 制备细胞悬液及固定化细胞的程序如下。

1. 愈伤组织细胞继代培养: 愈伤组

织块培养在MS+0.2mg/L细胞激动素+1mg/L萘乙酸(简称MS+KT0.2+NAA1)的琼脂培养基上^[6], 蔗糖浓度为3%, 用0.1mol/L NaOH调pH5.8, 于25℃黑暗恒温培养一个月。

2. 悬浮细胞培养: 选取生长状态基本一致的愈伤组织细胞, 取鲜重1.0g接种于40ml LS+KT0.2+NAA1的液体培养基中^[6], 蔗糖浓度为3%, 调pH至5.8, 在25℃, 120rpm振荡培养3周。

3. 细胞悬液制备: 培养好的丹参细胞, 在无菌条件下经40—50目尼龙网过滤, 滤液经500rpm离心5min, 将细胞沉降, 倾去大部分上清液, 余下制成细胞悬液, 含细胞鲜重约1.0g/10ml。

4. 固定化丹参细胞的制备: 将上述(3)的细胞悬液10ml(约含1.0g细胞)与3%海藻胶等体积混合, 用注射器将混合液滴入50mmol/L CaCl₂液中, 使形成直径约3—5mm的胶珠, 放置1—2h, 使其硬化, 然后用生理盐水洗涤。取约1/10胶珠

本文于1989年7月29日收到。

移入 40ml LS+KT0.1+NAA1 的液体培养基中, 于 25°C, 120rpm 振荡培养, 观察次级代谢产物的形成。

5. 游离细胞培养: 从上述(2, 3)所得的细胞悬液, 取1.0ml(相当于固定化细胞的量)于上述(4)条件下同时进行比较培养。

(三) 产物的提取及分析

1. 产物提取: 培养液用乙醚抽提 3 次, 然后蒸去乙醚, 挥发至干, 得固型物作分析用。

2. 薄层层析^[7]: 硅胶板为 5×15cm (浙江黄岩化工厂出品), 点样 10μl, 展层系统为苯:甲醇=9:1, 室温展层约 1h, 用 254nm 紫外分析灯检测层析点的 R_f 值。

3. 高效液相层析: 法国 Gilson 高效液相色谱仪, C₁₈(4×15cm) 钢柱, 溶剂系统为 80% 甲醇水溶液, 记录出峰时间。标准品丹参酮 II A 和隐丹参酮由中国医科学院药植所张荫麟先生赠送。

结果与讨论

(一) 丹参细胞培养条件的选择

愈伤组织细胞生长与分化对于植物激素浓度的改变十分敏感。为了使丹参细胞既能维持生长, 又能形成次级代谢产物, 曾选择 8 种激素配比, 用相同量的细胞块, 经 3 周培养后, 观察细胞形态学。主要结果如表 1, 说明 MS+KT0.1+NAA1 的培养基, 细胞既能正常分化与生长, 又能分泌丹参酮——红色产物。而 MS+KT0.2+NAA1 的培养基, 细胞虽能很好生长, 但并不形成红色产物。表明很少或没有次级代谢产物的生成。若将形成红色产物的细胞再转移到 MS+KT0.2+NAA1 的培养基中, 则形成乳白色细胞, 而无红色产物生成。表明 MS(或 LS)+KT0.2+NAA1 培养基只适合于丹参细胞的生长与分化, 而 MS(或 LS)+KT0.1+NAA1 培养基适合于丹参细胞合成次级代谢产物。

表 1 在 MS 培养基中不同激素比对丹参愈伤组织细胞生长和分化的影响

Table 1 The effect of the various ratio of plant hormone in MS medium on cell growth and differentiation of *S. miltiorrhiza* callus tissues

2,4-D (mg/L)	细胞激动素 KT (mg/L)	萘乙酸 NAA (mg/L)	吲哚丁酸 IBA (mg/L)	愈伤组织细胞状态* The states of callus tissue cells
0.05	0.10	2.00		生长快, 易发根 Fast growth, easy to form roots
0.20	0.20	1.00		生长快, 但细胞变干而硬 Fast growth, but dry and hard
0.20	0.10		0.10	生长过快, 易衰老 Very fast growth, but aging
	0.10	1.00		生长速度适当, 细胞变红 Normal growth and becoming red
	0.20	1.00		生长快, 细胞呈乳白色 Fast growth and becoming milky cells

* 所有试样均系相同量细胞, 培养 2 周后开始用肉眼定性观察, 生长速度的快慢用第 3 周的细胞量及红色程度估算
The cell quantity of each sample in comparative test is the same. After 2 weeks incubation, examine the state with eyes. The growth speed of cells is estimated with the quantity of cells at third week and the red colour of the solution

(二) 丹参细胞悬浮培养的生长曲线
植物细胞次级代谢产物的形成一般在

生长稳定期之后, 因此选择稳定期丹参细胞制备固定化制剂, 既可使细胞缓慢生

长, 又能达到不断分泌所需代谢产物的目的。图 1 表明, 用 LS+KT0.2+NAA1 培养基培养丹参细胞时, 稳定期从第 2 周开始, 随着时间的延长, 细胞趋于衰老, 甚至致使细胞破碎死亡, 引起干重下降, 因此选择 2—3 周的细胞制成细胞悬液用于固定化最为适宜。

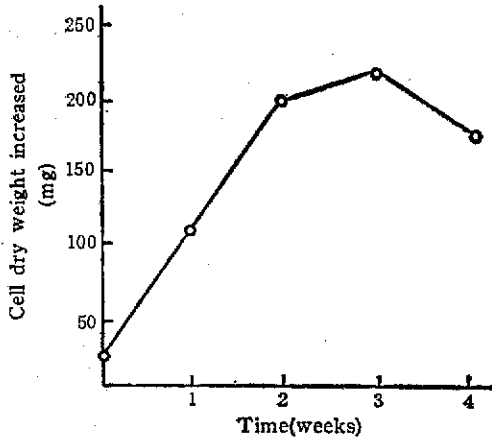


图 1 丹参愈伤组织细胞悬浮培养生长曲线
Fig.1 The growth curve of suspension culture of *S. miltiorrhiza*

培养介质为 250ml LS+KT0.2+NAA1 溶液, 原始细胞干重为 42.13mg, 本实验系 3 次平均值
The culture medium is 250ml of LS+KT0.2+NAA1.0. The dry weight of original cells is 42.13mg, This test is the average value per three times

(三) 海藻胶浓度选择与固定化细胞的状态

为使细胞固定化操作容易、稳定并具

有一定强度, 又不影响底物和产物的扩散, 选择适当浓度海藻酸显得十分重要。实验表明以 3% 海藻酸浓度最为适宜。固定化细胞经一段时间增殖后, 细胞维持在稳定缓慢生长水平, 10 天后可开始分泌产物。虽然胶珠表面可能有少量小细胞团, 但不影响胶珠的完整性和重复使用(图 2)。一般固定化丹参细胞一个培养周期为 27 天左右。实验表明即使培养 70 天, 固定化细胞仍能保持生物活性, 未引起胶珠的崩裂。

(四) 固定化丹参细胞的重复使用及稳定性

在 LS+KT0.1+NAA1 的培养基中经 27 天培养的固定化丹参细胞, 将其变红的培养液倾出, 另添加新鲜培养基, 进行重复培养, 如此反复 5 次, 都能分泌红色产物丹参酮。从显微镜观察表明细胞仍具活性, 只因培养周期太长未进一步多次重复。

将固定化丹参细胞悬浮于 LS+KT0.1+NAA1 的培养基中, 4℃ 冰箱保存 120 天后, 再进行转化反应和形态学观察, 表明该制剂中的细胞仍保持活性, 可进行转化反应。

(五) 固定化丹参细胞转化产物的检测

固定化丹参细胞在 LS+KT0.1+

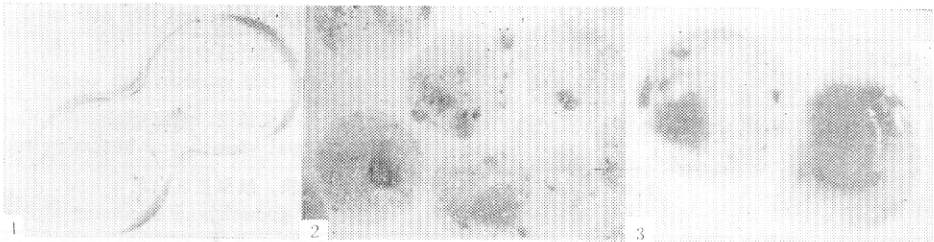


图 2 海藻胶包埋丹参愈伤组织细胞的生长与分化状态

Fig.2 The state of growth and differentiation of callus tissue cells entrapped with alginate

1. One day after immobilization
2. Three days after immobilization
3. Ten days after immobilization

NAA1 的培养基中, 可利用蔗糖为碳源, 经从头合成路线, 转化成丹参的主要成分丹参酮。培养液用乙醚抽提所得的转化产物, 经 TLC 和 HPLC 分析表明, 在上述系统中确实合成了丹参的次级代谢产物丹参酮。

1. 硅胶 G 板薄层层析: 为了比较悬

浮细胞培养和固定化细胞培养之间的差别, 在细胞量、培养液量、温度、培养时间等条件完全相同的情况下, 将乙醚抽提物定容于 3 ml 甲醇中, 每个样品均点样 10 μ l, 并同时用标准品丹参酮 II A 和隐丹参酮以及丹参根抽提液作对比, 其结果如表 2。

表 2 悬浮细胞和固定化细胞培养产物薄层层析的 R_f 值

Table 2 The R_f values on TLC of the products of suspension and immobilized cell cultures

样品类型 Type of Samples	蔗糖(%)(¹) Sucrose (%)	细胞体积(²) Volume (ml)	培养时间(天) Time (days)	R _f 值 R _f values
悬浮细胞 Suspension cells	1, 3, 5	2	27	无层析点 No spots
固定化细胞 Immobilized cells	1	2	27	0.04, 0.11
	2	2	27	0.04, 0.11, 0.30
	3	2	27	0.07, 0.11, 0.20, 0.30, 0.40
丹参根抽提物(³) Roots extract				0.05, 0.19, 0.30
丹参酮 I A(³) Tanshinone-I A				0.07
隐丹参酮(³) Cryptotanshinone				0.32

1. 培养基组成为 LS + KT 0.1 + NAA1 再加不同量蔗糖

The medium composition is LS + KT 0.1 + NAA 1.0 solution added various concentration of sucrose

2. 1.0g(鲜重)丹参愈伤组织悬浮于 40ml 培养液中, 培养后制成 4ml 细胞悬液, 其中 2ml 用于悬浮细胞试验, 2ml 用于制备固定化细胞

40ml final culture from 1.0g callus tissues (fresh weight) was prepared to 4.0ml cell suspension. Then 2ml for suspension culture and 2ml for immobilization

3. 丹参根抽提物, 丹参酮 I A 及隐丹参酮定性点样

Roots extract of *S. miltiorrhiza*, tanshinone-I A and cryptotanshinone were tested qualitatively

表 2 表明悬浮细胞培养液在不同蔗糖浓度时均未检测出任何产物, 其可能原因是悬浮细胞主要处于生长和分化状态, 未形成或极少形成丹参主要成分, 即使用 TLC 也无法检出其产物; 在完全相同情况下, 固定化细胞培养液, 因细胞处于缓慢生长的稳定期, 所以形成次级代谢产物——丹参酮。从表 2 还可看出, 随蔗糖浓度的增加, 产物的组成成分也增加。在低浓度蔗糖时, 作为碳源主要供给细胞自身

生长代谢的需要; 而在较高浓度蔗糖时, 营养液中有足够的碳源和能源供给合成次级代谢产物, 遵循从头合成的代谢途径, 生成了丹参的主要成分——丹参酮 II A 和隐丹参酮, 在层析板上具有相似的 R_f 值。

2. 高效液相色谱分析: 将上节所得的抽提物以及丹参根抽提液、标准品丹参酮 II A 和隐丹参酮同时进行定性高效液相分离分析。图 3 表明在本实验条件下, 丹参酮 II A 和隐丹参酮的分离效果很好, 在

两者混合的情况下，出峰时间分别为隐丹参酮6'42"、8'10"和丹参酮ⅡA 10'08"、12'26"。为了能使样品在柱上充分滞留，经30min洗脱，结果并无变化。

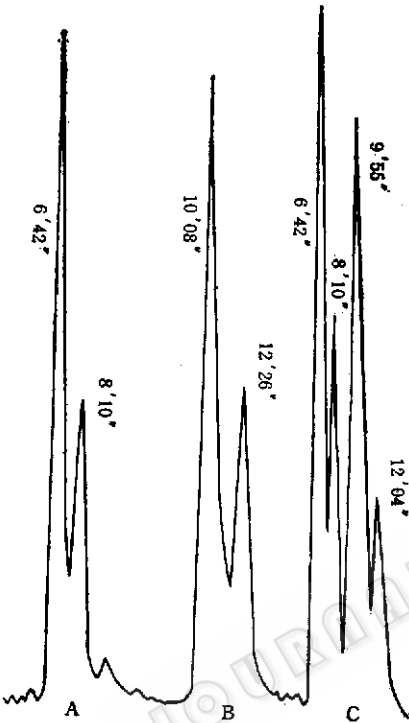


图 3 丹参酮ⅡA和隐丹参酮的高效液相分离
Fig.3 Separation of tanshinone and cryptotanshinone on HPLC

A. 隐丹参酮Cryptotanshinone
B. 丹参酮ⅡA Tanshinone-I A
C. A和B混合物 The mixture of A and B
实验条件 The experimental conditions:
柱 Column: C₁₈(4×15), 柱压 Pressure:
105Bar, 流速 Flow rate: 0.6ml/min, 纸速
Paper speed, 2mm/min, 10mV×1, 溶剂
Solvent: 80% MeOH:H₂O

图 4 为丹参根抽提液的高效液相色谱分离。除6'57"有一个主要峰值外，在8'49"和10'10"分别有两个小峰，这一结果同TLC结果相一致。

图 5 为悬浮细胞培养和固定化细胞培养30天后分泌产物的 HPLC谱，其结果也同TLC结果比较一致，悬浮细胞培养产物

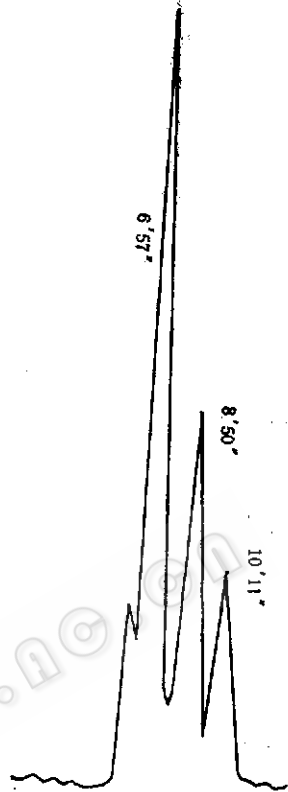


图 4 丹参根抽提物的高效液相色谱分离
Fig.4 Separation of the roots extract of *S. miltiorrhiza* on HPLC

实验条件见图 3
The experimental conditions see Fig.3

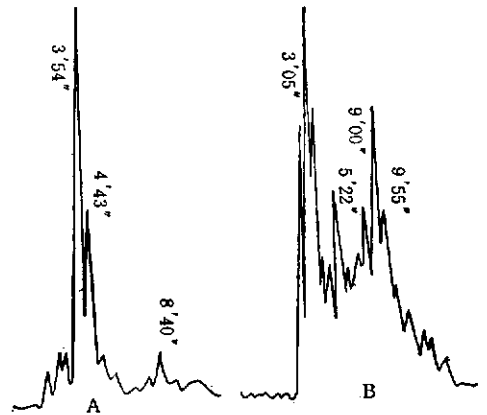


图 5 悬浮细胞与固定化细胞培养液抽提物的高效液相分离
Fig.5 Separation of extracts for suspension and immobilized cells cultures on HPLC

A. 悬浮细胞培养液抽提物
The extract of suspension cell culture

B. 固定化细胞培养液抽提物

The extract of immobilized cell culture 培养及抽提条件见“材料与方 法”, 分离条件见图 3

The culture and extract conditions see the part of “material and method”. HPLC conditions are the same as Fig. 3

虽有一些小杂峰, 但没有标准品相应的产物, 而固定化细胞培养产物出现与标准品相应的峰, 分别在 5'12", 9'00" 和 9'55" 出现明显的吸收峰, 表明合成了丹参的主要成分——隐丹参酮和丹参酮 II A (6'42" 和 10'08"), 且同丹参根抽提物的 HPLC

图谱更为接近。在出峰时间上的细微差异可能由于混合物成分复杂造成滞留时间差别以及人工记时所造成的误差。但可以定性地看出, 固定化丹参细胞确实合成了丹参的主要成分。

综上所述, 固定化丹参细胞确优于悬浮细胞培养, 我们初步研究的结果为名贵及紧缺中草药的来源开辟了一条新的途径。

参 考 文 献

- [1] 韩迎山, 生物物理与生物化学进展, (1):19, 1989.
- [2] Shuler, M. L.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 369:65, 1981.
- [3] Brodelins, P. et al.; *FEBS Lett.*, 103:93, 1979.
- [4] Brodelins, P. et al.; *Adv. Appl. Microbiol.*, 28:1—25, 1982.
- [5] Lindsey, K. et al.; *FEBS Lett.*, 155:143, 1983.
- [6] 裘文达; 园艺植物组织培养, 上海科学技术出版社, p.31, 1986.
- [7] 沙世炎, 徐礼棠; 中草药有效成份分析法, 人民卫生出版社, p.64, 1981.

IMMOBILIZATION OF CALLUS TISSUE CELLS OF *SALVIA MILTIORRHIZA* AND THE CHARACTERISTICS OF ITS PRODUCTS

Tao Lulu Yuan Jingming

(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan)

Xu Jintang

(Institute of Exploitation of Medical Plant Resources, Academy of Medical Sciences, Sinica, Beijing)

The callus tissue cells of *S. miltiorrhiza* were immobilized with 3% alginate. Then immobilized cells were cultured in LS+KT 0.1+NAA 1.0+3% sucrose at 25°C. After 27 days or so, the cultures free from cells were extracted with ether and the residues were analyzed by TLC and HPLC. The results showed that immobilized cells could secrete some main components of *S. miltiorrhiza*——tanshinone and cryptotanshinone, especially the same as the roots extract of *S. miltiorrhiza*. Meanwhile, the immobilized cells stored at 4°C more than 4 months still preserved its bioactivity to produce the secondary metabolites of *S. miltiorrhiza*.

Key words

S. miltiorrhiza; callus tissue; alginate; immobilization