

# 硬紫草细胞悬浮培养和紫草宁 及其衍生物的形成

宁文曹日强

(南京大学生物系,南京 210008)

**摘要** 硬紫草细胞悬浮培养形成紫草宁及其衍生物时,细胞生长曲线呈扁平的S形。细胞停止生长后,紫草宁及其衍生物大量形成,二者的动态变化呈负相关。测定了此过程中培养液的无机元素和可溶性糖含量、溶氧、pH值以及细胞形态的变化情况,可作为硬紫草细胞大规模培养的参考。

**关键词** 硬紫草,紫草宁及其衍生物,悬浮培养,植物细胞大规模培养

硬紫草(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc)为我国传统中药,其有效成分紫草宁及其衍生物是具有药用价值的天然色素<sup>[1]</sup>。借助细胞培养技术生产紫草宁及其衍生物,是开发硬紫草资源的新途径。1983年日本首先利用植物细胞大规模培养技术生产紫草宁及其衍生物,并用于化妆品<sup>[2]</sup>。本实验室从1986年始进行硬紫草细胞大规模生产紫草宁及其衍生物的研究。本文测定摇瓶状态下,硬紫草细胞悬浮培养形成目的产物时,细胞生长、紫草宁及其衍生物形成的动态变化及此过程中细胞形态和培养液中无机元素和可溶性糖含量、溶氧、pH值的动态变化,为细胞由摇瓶培养转为发酵罐培养后有关工艺学参数的设定提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

供试材料为山东产硬紫草茎愈伤组织,经本实验室筛选得到的高产细胞系。

### 1.2 培养方法

采用二阶段培养法(two-stage culture)<sup>[3]</sup>。第一阶段为愈伤组织继代培养,B<sub>5</sub>基本培养基<sup>[4]</sup>中添加吲哚乙酸(IAA)0.025mg/L,6-苄基腺嘌呤(6-BA)1.0mg/L,光培养;光照时间6—8小时/天。第二阶段为细胞悬浮培养形成紫草宁及其衍生物,M<sub>9</sub>基本培养基<sup>[4]</sup>改加吲哚乙酸(IAA)0.1mg/L,6-苄基腺嘌呤(6-BA)1.0mg/L,Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 347mg/L,CuCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 6.0mg/L。培养18天的愈伤组织接种到内装50ml M<sub>9</sub>培养液的250ml三角瓶中,置于旋转式摇床上培养,转速120r/min,振幅2.5cm。悬浮细胞暗中培养20天收获。

### 1.3 测定方法

本文于1992年5月7日收到。

- 1.3.1 细胞生长的测定: 细胞悬浮培养一段时间后,抽滤,60℃烘至恒重。以细胞干重作为其生长的指标。
- 1.3.2 紫草宁及其衍生物含量的测定: 将悬浮培养的细胞抽滤,用石油醚分别冷浸细胞和滤液,反复提取至无色,合并提取液并定容,于波长 520nm 处比色<sup>[5]</sup>,测得紫草宁及其衍生物量(mg/L),除以细胞干重(mg,dwt/L)即得紫草宁及其衍生物百分含量(%)。
- 1.3.3 培养液中无机元素含量的测定:采用电感耦合等离子直读光谱法(ICP)分析培养液中  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  含量。
- 1.3.4 培养液中可溶性糖含量的测定:按常规的蒽酮法测定<sup>[6]</sup>。设最初培养液中糖浓度为 100%。
- 1.3.5 培养液中溶氧浓度(DO)的测定:采用日本 TOKOYO B·E·MARUISHI 溶氧自动控制仪和溶氧电极直接测定。
- 1.3.6 培养液 pH 值的测定:采用国产 PHS-10A 型数字酸度/离子计和玻璃电极测定。
- 1.3.7 细胞形态的观察:采用日本 OLYMPUS BH-2 型光学显微镜明视野及暗视野观察细胞形态。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞生长和紫草宁及其衍生物的形成

实验结果见图 1。由图 1 表明在摇床培养 20 天里,细胞的生长曲线大致呈扁平的 S 形,明显地分为三阶段——延迟期(0—4 天),指数生长期(4—11 天),静止期(10—20 天)。此期间细胞生长缓慢,细胞干重仅比接种时增加了 0.2—0.5 倍。20 天后,细胞干重略有下降。接种后第三天,细胞团边缘变红,表明紫草宁及其衍生物开始形成;细胞指数生长期,紫草宁及其衍生物的量稳步上升,形成速度约为 21.8mg/L 培养基/天;在静止期,紫草宁及其衍生物形成速度加快,约为 167mg/L 培养基/天,是指数生长期紫草宁及其衍生物形成速度的 6.78 倍,培养 20 天后紫草宁及其衍生物百分含量达到最高水平(18%)。

上述实验结果表明,硬紫草细胞悬浮培养紫草宁及其衍生物的形成与细胞生长呈负相关,细胞生长缓慢则有利于目的产物的形成。其细胞生长与产物形成的动态变化类型,是非生长偶联型<sup>[7]</sup>,因此硬紫草细胞大规模培养应采用成批培养或者固定化培养形式<sup>[7]</sup>。

20 天后继续培养,紫草宁及其衍生物量缓慢下降。我们认为硬紫草细胞悬浮培养 20 天为最佳收获时间,紫草宁及其衍生物量为最高值(1580mg/L),紫草宁及其衍生物百分含量为 18%。

### 2.2 培养液中无机元素和可溶性糖含量、DO、pH 值的变化

2.2.1 无机元素:在培养过程中,重要的无机元素的变化见图 2。在整个培养中培养液的钙含量不断下降,20 天后钙含量才上升,推测细胞生长和紫草宁及其衍生物形成需大量钙。细胞指数生长期,培养液中钾镁含量下降,静止期镁含量回升,特别是钾元素,其含量回升达到的最终值大于原培养液中钾含量,表明细胞在不同生长时期对钾镁需要量不同。培养液中铜元素含量的变化与众不同,在延迟期,培养液中铜含量迅速下降,第 4 天培养液中铜含量下降了 90%,指数生长期培养液中铜含量回升,静止期培养液中铜含量逐步

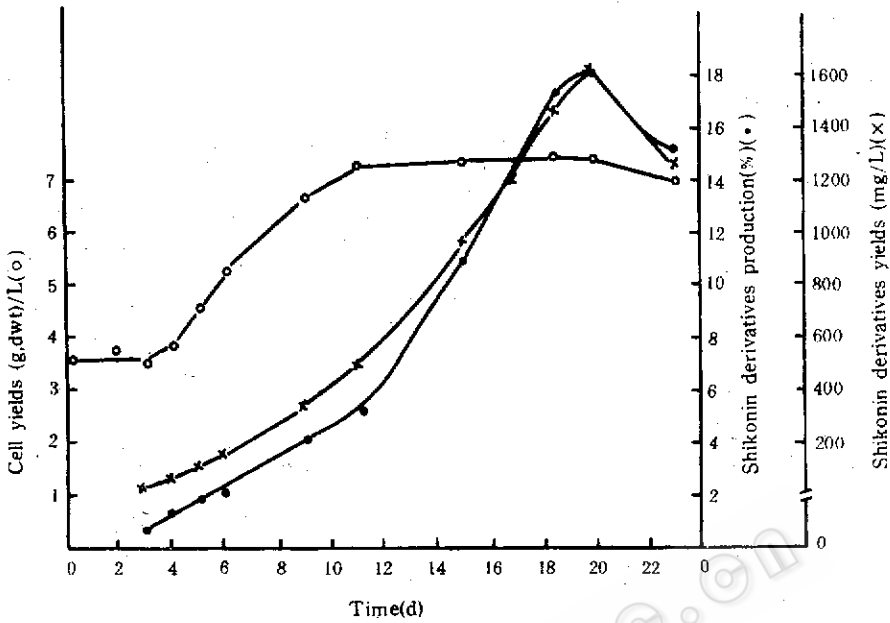


图1 细胞生长和紫草宁及其衍生物形成的变化

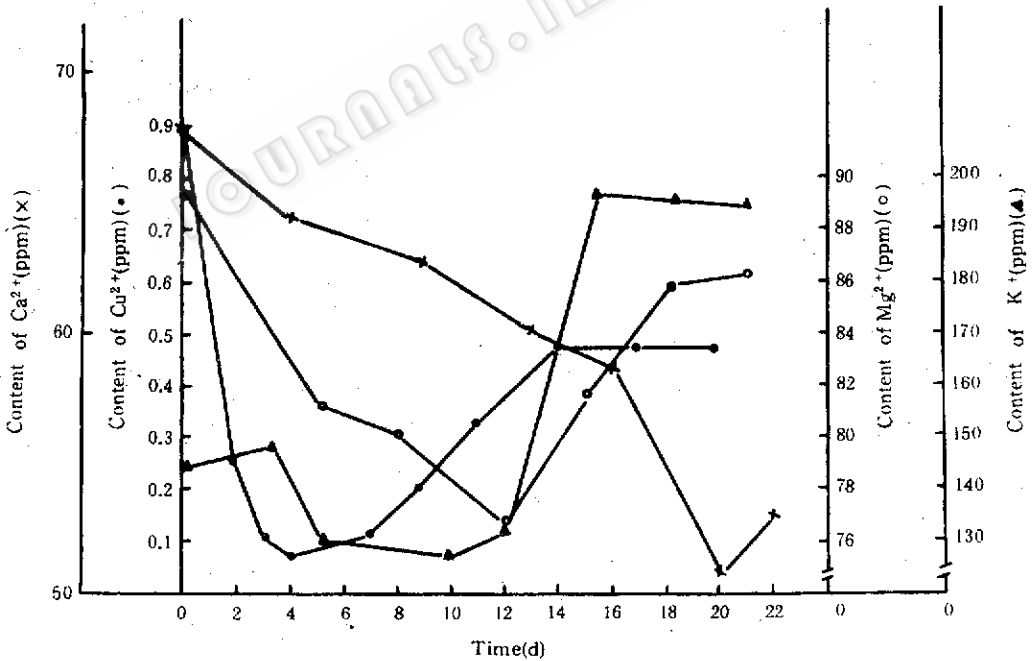
Fig. 1 Cell growth and shikoin derivatives formation of *L. erythrorhizon* cells

图2 培养基中无机离子含量的变化

Fig. 2 Inorganic nutrients contents of medium

稳定,为原培养液中铜含量的50—60%。已知铜对紫草宁及其衍生物形成十分重要<sup>[8]</sup>,在一定浓度范围内,培养液中铜浓度增加了,紫草宁及其衍生物产量上升<sup>[8]</sup>。已有文献报道

铜在芸苔属植物<sup>[9]</sup>、豌豆<sup>[10,11]</sup>中可作为非生物诱导物被细胞快速吸收,诱导促进次生产物合成。因此我们推测铜做为诱导物,在延迟期被细胞快速吸收,过饱和和积累于胞内,参与细胞由初生代谢向次生代谢的转化,促进硬紫草细胞形成紫草宁及其衍生物,其促进作用与铜离子浓度呈正相关。有关研究有待继续。

2.2.2 可溶性糖:在 20 天的培养时间中,培养液中可溶性糖含量在细胞指数生长期不断下降,反映细胞生长仍需要吸收培养液中的碳源;在静止期培养液中可溶性糖含量上升(图 3),糖含量回升的原因可能是细胞向胞外分泌了一些多糖类物质<sup>[12]</sup>。

2.2.3 溶氧(DO):在振荡培养中溶氧(DO)变化,可间接反映细胞对氧气的需求。由图 3 可见延迟期培养液 DO 不变, $\Delta DO=0$ ;指数生长期 DO 下降, $\Delta DO=-1.4\text{mg/L}$ ;静止期培养液中 DO 有所回升, $\Delta DO=-0.4\text{mg/L}$ 。这是因为指数生长期细胞仍缓慢生长并开始形成紫草宁及其衍生物,代谢耗氧量大;静止期细胞大量合成紫草宁及其衍生物,但其大部分能量可能来源于初级代谢积累的 ATP,代谢耗氧量相对少;静止期末期(18—20 天)细胞紫草宁及其衍生物产量达到最高值,紫草宁及其衍生物合成趋于停止,细胞对氧气的需求下降,培养液 DO 又恢复到原值( $DO=6.7\text{mg/L}$ )。

2.2.4 pH:根据已有的实验结果,培养基 pH 在 5.0—7.0 范围内,对硬紫草细胞悬浮培养没有明显的影响,一般将培养液 pH 值调至 6.5。培养液 pH 的动态变化,具体实验有所差异,但总趋势相同。用  $1\text{mol/L NaOH}$  调培养液 pH 至 6.5,高压灭菌后,培养液 pH 下降至 5.75 左右,在培养过程中,延迟期培养液 pH 上升,达到最高值( $\text{pH}6.52$ ),对数生长期培养液 pH 下降至 6.05,静止期 pH 维持不变,紫草宁及其衍生物大量形成。20 天后,培养液 pH 略有下降(图 3)。

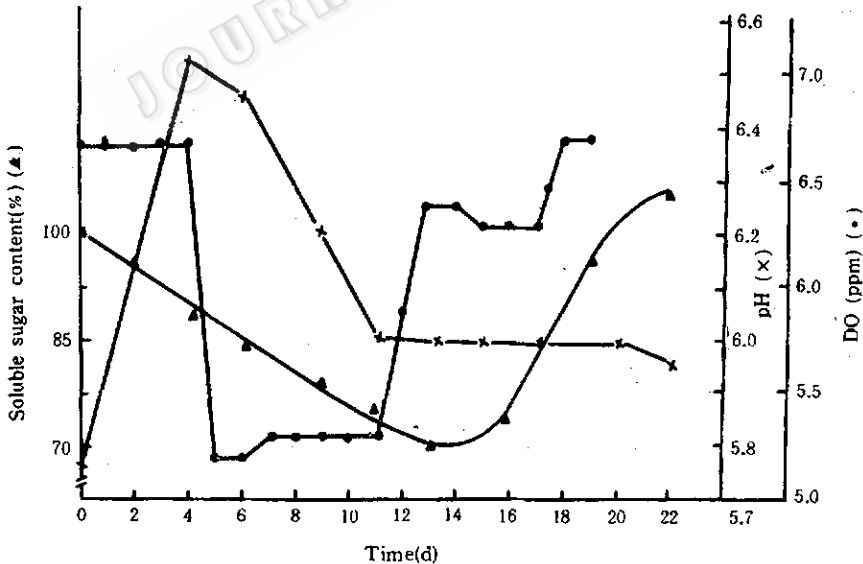


图 3 培养液中糖含量、溶氧和 pH 值的变化

Fig. 3 Soluble sugar contents, DO and pH values of medium

上述实验结果表明,在 20 天的培养时间内,无机元素、糖和氧气供应均能满足硬紫草细胞悬浮培养时紫草宁及其衍生物形成的需要,不存在由于生长及某种营养缺乏而抑制

紫草宁及其衍生物形成的情况。因此,根据他们的动态变化,在细胞对其需求低的阶段,可以考虑减少某些营养成分的供给,在不影响紫草宁及其衍生物产量的前提下降低成本。

### 2.3 细胞形态的变化

多个细胞紧密结合成细胞小团,若干个细胞小团聚集为相对疏松的大细胞团,这种悬浮体系有利于次生代谢产物——紫草宁及其衍生物的形成。细胞团中的细胞大小形态变化呈一定规律,细胞延迟期为  $3 \times 3 - 4 \times 4 \mu\text{m}$  的球形薄壁细胞,对数生长期仍为  $4 \times 4 - 6 \times 6 \mu\text{m}$  的球形薄壁细胞,静止期后期细胞主要为  $(6-8) \times (10-13) \mu\text{m}$  的各种形状的衰老细胞。

于光学显微镜下观察,对数生长期时细胞团边缘细胞已开始形成紫草宁及其衍生物,细胞内可见大量红色小泡,均匀分布于细胞质中;静止期时细胞团全部为红色,后期可见细胞内大量红色小泡分布于细胞边缘这一特殊现象。反映了细胞将紫草宁及其衍生物向外运输、分泌及沉积于细胞壁上这一趋势<sup>[12]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] 高菊红. 中草药, 1986, 17(6): 268.
- [2] 藤田泰宏. 森木悌次郎. 细胞工学, 1985, 14: 405.
- [3] Tabata M and Fujita Y. In "Biotechnology in Plant Science", New York, Academic Press, Inc., 1985, p. 207.
- [4] Fujita Y *et al.* In "Plant Tissue and Cell Culture" Alan R L. New York: Proc 5th Int Congr., 1982, p. 339.
- [5] 郑明新. 李佳政. 中草药丛书. 紫草, 乌鲁木齐: 新疆人民出版社: 1984, p. 1.
- [6] Tsignos C P and Muir H. Analytical Biochemistry, 1966, 17(3): 495.
- [7] 朝迎山. 植物生理学通讯, 1989, 5: 72.
- [8] Fujita Y *et al.* Plant Cell Rell Rep, 1981, 1: 61.
- [9] Rouxel T *et al.* Planta, 1991, 184: 271.
- [10] Cruickshank I A M *et al.* Aust J Plant Physiol, 1987, 14: 549.
- [11] Smith M M and Cruickshank I A M. Physiol Mol Plant Pathol, 1987, 31: 315.
- [12] 施中华, 程井辰. 植物生理学通讯, 1991, 27(2): 97.

## *Lithospermum erythrorhizon* Cell Suspension Culture and Shikonin Derivatives Formation

Ning Wen      Cao Riqiang

(Department of Biology, Nanjing University, Nanjing 210008)

**Abstract** In *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension culture, the cell growth curve was a type of flat "S". After the growth of cells almost stopped, shikonin derivatives formed rapidly. The change of shikonin formation had negative relevance to that of cell growth. During the culture, the changes of the contents of soluble sugar and inorganic nutrients, DO and pH values of medium, and the morphology of cells were studied. The results could give an important reference for the large-scale cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells in future.

**Key words** *Lithospermum erythrorhizon*, shikonin derivatives, cell suspension cultures, large-scale plant cell cultures.