

碳源和氮源对水母雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮合成的影响*

邢建民^{1,2} 赵德修^{* * 1} 李茂寅¹ 叶和春¹ 李国凤¹ 李佐虎

¹(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

²(中国科学院植物研究所 北京 100093)

摘 要 在 MS 培养基上进行水母雪莲(*Saussurea medusa Maxim*)细胞悬浮培养时研究了碳源和氮源的影响。结果表明碳源以蔗糖最适合,蔗糖浓度则以 40g/L 较好,细胞生长量干重为 18.12g/L,总黄酮合成量达到 1423.25mg/L。在培养过程中,水母雪莲细胞能够快速将蔗糖水解为葡萄糖和果糖,并首先利用葡萄糖。氮源总浓度(包括 NH_4^+ 和 NO_3^-)为 60~120mmol/L, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例为 20/40 有利于雪莲细胞生长和黄酮合成。用 HPLC 检测显示 4',5,7-三羟基 3',6-二甲氧基黄酮(Jaceosidin)和 4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮(Hispidulin)2 种黄酮的含量分别达到细胞干重的 1.46% 和 0.010%。

关键词 水母雪莲,悬浮培养,碳源,氮源,细胞生长,黄酮类化合物合成

分类号 Q947.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0230-34

水母雪莲(*Saussurea medusa Maxim*)又称水母雪兔子,藏名:恰果苏巴,系菊科(Compositae)植物,分布于我国青海、甘肃、西藏等地,是我国高山地区的一种稀有名贵中药材,含黄酮、生物碱、多糖等多种有效成分^[1-3],具有散寒除湿,活血通络,抗癌等功效,可治疗风湿性关节炎,妇女月经不调,高山不适应等症^[2,4]。

雪莲生长环境特异,天然生长缓慢,人工栽培困难,长期的掠夺性采挖,已使得雪莲资源严重匮乏。应用细胞培养技术进行雪莲的细胞培养既可以满足临床上对中药雪莲的需求,又可以保护自然资源。赵德修等^[5-7]曾报道了水母雪莲愈伤组织的诱导,固体培养中各种理化因子对培养物的影响,并对水母雪莲细胞悬浮培养进行了初步探讨。本文研究了碳源和氮源等对悬浮培养细胞生长和总黄酮合成的影响,为大规模培养水母雪莲细胞打下了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

采用由水母雪莲(*Saussurea medusa Maxim*)诱导得到的黄色细胞系。

1.2 培养方法

采用 MS 培养基^[8]添加 0.5mg/L BA、2mg/L NAA、30g/L 蔗糖, pH5.8, 25℃ ± 1℃, 38.9~58.4 μmol/(m²·s)光照条件下培养,每隔 12d 继代一次。摇床转速为 100r/min,

* 国家自然科学基金资助(No. 39570862)。

** 通讯联系人。

收稿日期:1998-03-31, 修回日期:1998-10-20。

100mL 摇瓶中培养基装量为 25mL。

1.3 细胞生长测定

液体培养物质经 400 目不锈钢筛网过滤,洗涤,60℃ 烘至恒重称量得干重。

1.4 培养液中糖浓度的测定

采用葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖浓度,仪器:Biochemical analyzer 2700 select(Yellow Springs Instruments Co., Inc., Yellow Springs, Ohio 45387)。蔗糖和果糖均采用蒽酮法进行测定^[9]。

1.5 培养物中黄酮的分析

1.5.1 分光光度计法:总黄酮含量采用分光光度计法^[10]在 510nm 处测定 OD 值。仪器采用 Hitachi 557 Double Wavelength/Double Beam Spectrophotometer(Hitachi Co. Ltd. Tokyo, Japan)。

1.5.2 HPLC 法:仪器:Waters 244 型高效液相色谱仪,色谱条件:柱为 BC C₁₈(0.4 cm × 30cm)。流动相:甲醇:水为 90:10。pH 3.0。流速:0.7mL/min。检测器:UV_{365nm}(灵敏度:0.1AUFS)。

2 结果与讨论

2.1 碳源对水母雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮合成的影响

植物细胞培养一般采用蔗糖、果糖、葡萄糖为碳源。图 1 显示了不同初始糖浓度时雪莲细胞生长量和黄酮合成量。由图可见,初始糖浓度为 10g/L 蔗糖或 20g/L 蔗糖时,细胞干重和黄酮合成量都很低;在其它初始糖浓度下,细胞生长量都较大,采用 60mg/L 蔗糖时,生长量达到了 24.00 g/L。在 40g/L 蔗糖时,细胞生长量为 18.12g/L,黄酮的生物合成量达到了 1423.25mg/L。因此,初始蔗糖浓度选择 40g/L。果糖的加入对细胞生长没有显著影响,黄酮合成却明显减少了。同时,我们也注意到,较高的初始蔗糖浓度对细胞生长和黄酮合成没有明显的抑制作用,说明水母雪莲细胞能够耐受较高的糖浓度和较高的渗透压。

2.2 水母雪莲悬浮培养细胞的糖利用动态

培养液中的初始糖浓度为蔗糖 60g/L,蔗糖 40g/L,蔗糖 20g/L + 果糖 10g/L + 葡萄糖 10g/L 和果糖 10g/L + 葡萄糖 30g/L 时的糖代谢情况见图 2。在灭菌过程中,培养液中的少量蔗糖转变成了果糖和葡萄糖。在培养过程中,培养液中的蔗糖浓度迅速下降到零,而果糖和葡萄糖浓度则相应增加,说明蔗糖被降解为葡萄糖和果糖;而且降解速度非

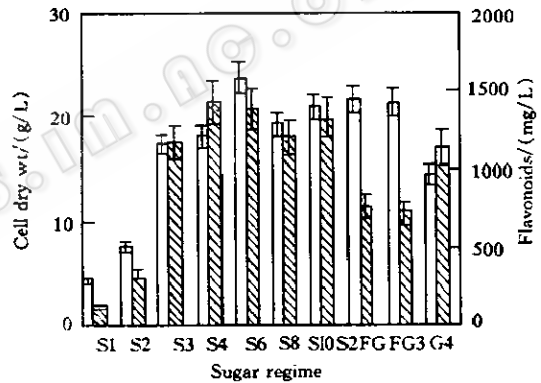


图 1 碳源对水母雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮合成的影响

Fig. 1 Effects of carbon sources on cell growth and flavonoids production in suspension cultures of *S. medusa*

S1-S10: Sucrose 10-100g/L; S2FG: Sucrose 20 g/L + fructose 10 g/L + glucose 10g/L; FG3: Fructose 10g/L + glucose 30g/L; G4: Glucose 40g/L

□ Cell dry wt.; ▨ Flavonoids

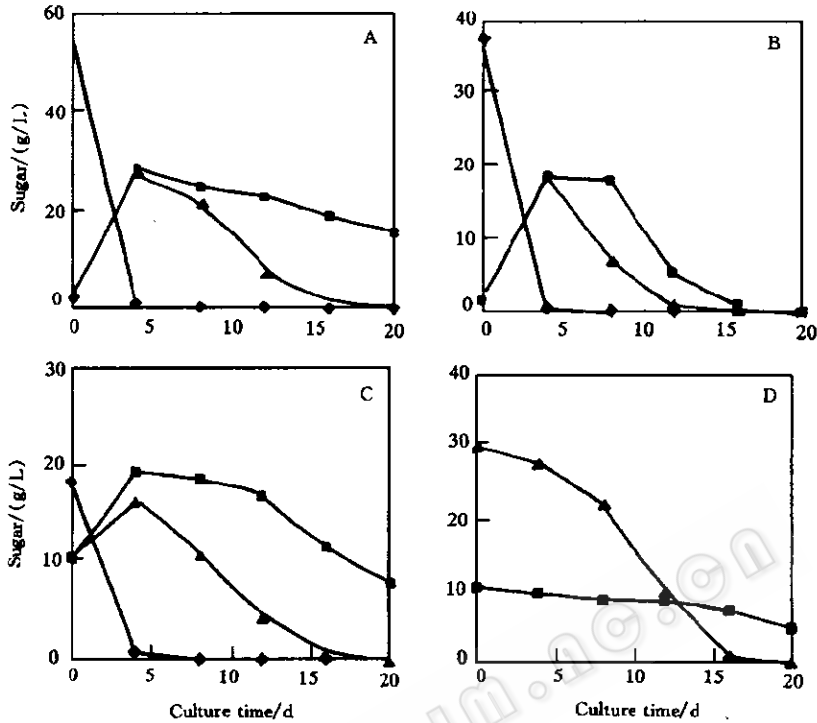


图2 水母雪莲悬浮细胞的糖利用动态曲线

Fig. 2 Time-courses of sugar utilization in suspension cultures of *S. medusa*

Conc./ (g/L); A: Sucrose 60; B: Sucrose 40;

C: Sucrose 20 + fructose 10 + glucose 10; D: Fructose 10 + glucose 30

常快,即使初始蔗糖浓度高达 60g/L 时,这一过程也基本在培养的前 4d 完成。从消耗曲线可见,葡萄糖浓度下降快于果糖。初始蔗糖浓度为 60g/L 时,在培养到第 12 天、第 16 天和第 20 天时,葡萄糖浓度分别为 7.49g/L, 0.75g/L 和 0.66g/L,而果糖浓度则高达 23.03g/L, 19.05g/L 和 15.89g/L。这说明水母雪莲细胞将蔗糖转化为葡萄糖和果糖后,优先利用葡萄糖。从图 2 我们可以发现,当初始蔗糖浓度为 60g/L 时,培养到第 16 天和第 20 天时,糖浓度仍高达 21.77g/L 和 16.55g/L,说明这部分糖没有被细胞利用,从投入产出的角度看这是不经济的。

2.3 氮源对水母雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮合成的影响

氮源总浓度(包括 NH_4^+ 和 NO_3^-)对细胞干重增长和黄酮合成的影响比较明显(见图 3A)。氮源浓度为 60 ~ 120mmol/L 时,细胞生长量和黄酮合成量分别在 20g/L 和 1000mg/L 左右。氮源浓度低于 60mmol/L 时,细胞生长量和黄酮合成量分别低于 15g/L 和 500mg/L,说明此时氮源浓度过低,影响了雪莲细胞的生长和黄酮的合成。氮源总浓度为 240mmol/L 时,细胞生长量和黄酮合成量分别只有 4.83g/L 和 128mg/L,说明较高的氮源浓度会对细胞生长和黄酮合成产生抑制作用。

不同 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例下,水母雪莲细胞生长和黄酮的合成量有一定差别(见图 3B)。

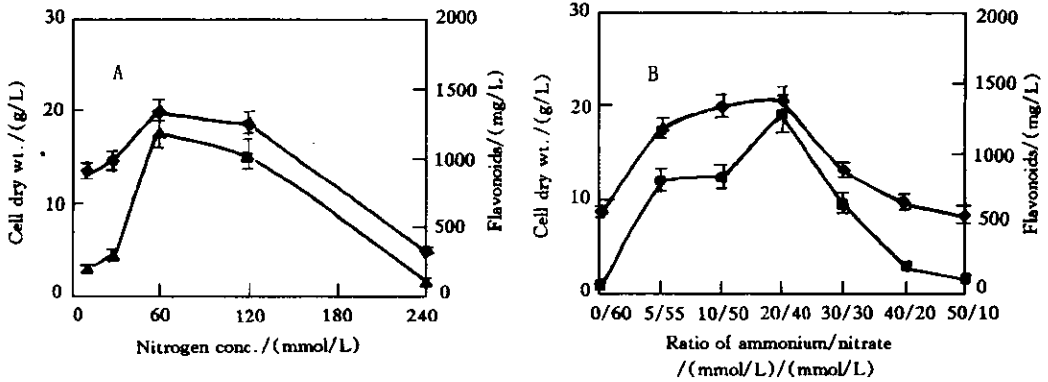


图3 氮源浓度(包括 NH₄⁺ 和 NO₃⁻)和 NH₄⁺/NO₃⁻ 比例对水母雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮合成的影响

Fig.3 Effects of nitrogen concentration and the ratio of ammonium to nitrate on cell growth and flavonoids production in suspension cultures of *S. medusa*

A ◆ Cell dry wt.; ▲ Flavonoids; B ◆ Cell dry wt.; ■ Flavonoids

当 NH₄⁺/NO₃⁻ 的比例为 5/55、10/50 和 20/40 时,细胞生长量都比较大,其中,在 NH₄⁺/NO₃⁻ 的比例为 20/40 时,细胞生长量最大。其它比例下,细胞生长比较差。NH₄⁺/NO₃⁻ 比例对黄酮合成的影响更加明显,当 NH₄⁺/NO₃⁻ 的比例为 20/40 时,黄酮合成量可达 1275.33mg/L。其它比例下黄酮的合成量都很少。在 NH₄⁺ 浓度为 0 时,培养到第 5 天,培养液变成橙色,pH 值上升到 6.25,细胞生长和黄酮的合成都停止,说明 NH₄⁺ 的供应不足限制了细胞的生长和代谢。NH₄⁺/NO₃⁻ 的比例为 30/30、40/20 和 50/10 时,细胞生长速度慢,培养到第 12 天时培养液 pH 的变化小于 0.5。

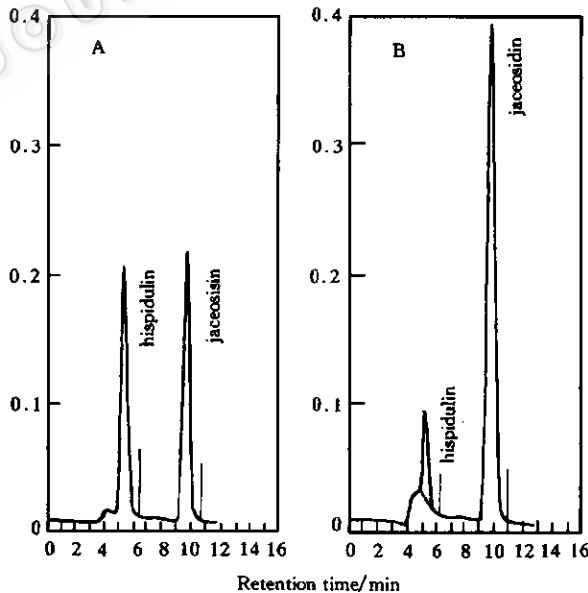


图4 水母雪莲悬浮培养物中黄酮的高效液相色谱分析

Fig.4 Determination of jaceosidin and hispidulin in suspension cultures by HPLC

A: Standards; B: Cultured cells

2.4 HPLC 法测定培养物中的两种具有生物活性的黄酮

雪莲中含有多种具生物活性的黄酮类化合物^[11,12]。刘力生等曾经从新疆雪莲中分离得到两种具有生物活性的黄酮 4', 5, 7-三羟基 3', 6-二甲氧基黄酮(Jaceosidin)和 4', 5, 7-三羟基-6-甲氧基黄酮(Hispidulin)^[13]。我们用高效液相色谱法分析了水母雪莲细胞悬浮培养物,从高效液相图谱(图 4)可见,水母雪莲细胞悬浮培养物中这两种组分的含量分别为细胞干重的 1.46% 和 0.010%。

参 考 文 献

- [1] 刘秀珍,王国祥. 药学报, 1986, 21:220~22.
- [2] 赵德修,赵丽丽. 中草药, 1996, 27:372~374.
- [3] 倪志诚. 西藏经济植物志, 北京:北京科技出版社, 1990, p. 694.
- [4] 吴征镒. 西藏植物志, 第四卷, 北京:科学出版社, 1985, p. 878.
- [5] 赵德修,乔传令,汪沂等. 植物学报, 1998, 40(6):515~519.
- [6] 赵德修,汪沂,赵敬芳. 生物工程学报, 1998, 14(3):259~263.
- [7] 邢建民,赵德修,李茂寅等. 植物学报, 1998, 40(9):836~841.
- [8] T. Murashige, F. Skoog. *Physiol Plant*, 1962, 15:473~497.
- [9] 薛应龙. 植物生理学实验手册, 上海:上海科技出版社, 1985, pp. 136~138.
- [10] 关家彦,王玮文,马嘉提等. 沈阳药学院学报, 1995, 12:209~211.
- [11] 贾志建,费厚满,李瑜等. 高等学校化学学报, 1986, 7:789~792.
- [12] 陈宝珍,王叶富,邱林刚等. 云南植物研究, 1989, 11:271~275.
- [13] 刘力生,肖显华,张龙弟等. 兰州大学学报自然科学版, 1985, 21(4):80~83.

Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Cell Growth and Flavonoids Production in Suspension Cultures of *Saussurea medusa**

Xing Jianmin^{1,2} Zhao Dexiu² Li Maoyin² Ye Hechun² Li Guofeng² Li Zuohu¹

¹(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy,
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

²(Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract The effects of different sugar concentration and of *Saussurea medusa* different nitrogen concentrations on cell growth and flavonoids formation in the suspension cultures were studied. Sucrose is better than glucose and fructose for the suspension cultures. The optimum sucrose concentration was 40g/L, and the flavonoids produced could be as much as 1423.25mg/L. Sucrose in the culture medium was rapidly hydrolyzed to fructose and glucose, and the glucose was utilized first. The most favorable nitrogen concentration was 60~120 mmol/L. The best ratio of ammonium to nitrate was 20/40. High performance liquid chromatographic analysis of cell suspension culture extracts showed that the concentrations of jaceosidin and hispidulin in the flavonoids were 1.46% and 0.010% of the cell dry weight, respectively.

Key words *Saussurea medusa*, suspension culture, carbon sources, nitrogen sources, cell growth, flavonoids production

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.39570862).