

促进丹参悬浮培养细胞生长和水溶性 酚酸含量的因素

杨芳¹, 孙磊¹, 王继花¹, 步营¹, 杜旭东¹, 刘同祥², 张宗申¹

(1. 大连工业大学 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034

2. 中央民族大学 中国少数民族传统医学研究中心, 北京 100081)

摘要: 研究了影响丹参悬浮细胞生长及水溶性酚酸生物合成的因素, 包括激素、碳源及基本培养基等. 结果表明: MS + 2, 4-D 0.5 mg/L 有利于丹参悬浮细胞的生长, 6, 7-V + 2, 4-D 0.5 mg/L 有利于丹参悬浮细胞水溶性酚酸的合成; 丹参细胞能有效地利用蔗糖并得到较高的丹参酚酸产量; 丹参悬浮细胞的生长周期约为 18 d 在 16 d 时收获细胞可得到最高的生物量和丹参酚酸含量.

关键词: 丹参; 悬浮细胞; 碳源; 植物激素; 细胞培养

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-855X(2008)03-0096-04

Factors to Improve Growth and Depsides Content in Suspension Cell Culture of *Salvia Miltiorrhiza*

YANG Fang¹, SUN Lei¹, WANG Jihua¹, BU Ying¹,

DU Xudong¹, LIU Tongxiang², ZHANG Zongshen¹

(1. School of Biology and Food Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China

2. China Minority Traditional Medical Center, The Central University for Nationalities, Beijing 100081, China)

Abstract The effects of several factors (hormones, carbon sources and different culture media) on growth and production of depsides in suspension cell culture of *salvia miltiorrhiza* are investigated in this paper. It is indicated through the results that the optimized medium for suspension cells growth is MS + 2, 4-D 0.5 mg/L, and for accumulation of depsides is 6, 7-V + 2, 4-D 0.5 mg/L. For both suspension cells growth and accumulation of depsides, sucrose is proved to be the most suitable carbon source. The cell growth period is approximately 18 days long and it arrives at the peak point of both biomass and depsides content by the time of 16 days.

Key words *salvia miltiorrhiza*; suspension cells; carbon sources; phytohormones; cell culture

0 引言

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 为唇形科鼠尾属多年生草本植物, 分布于辽宁、河北、山西、甘肃、四川等省区. 丹参以其干燥根入药, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦的功效, 起到改善心脑血管系统功能、抗肿瘤和抗菌消炎的作用^[1, 2]. 由于医药市场对丹参原材料的需求急剧增加, 再加上丹参野生资源破坏严重、质量参差不齐, 加剧了丹参的供需矛盾^[3]. 前人的研究表明, 离体培养的细胞或组织中可以合成活性物质, 使细胞培养技术显示出巨大的潜力^[4-6].

收稿日期: 2007-11-02 基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科学技术研究项目 (051072); 大连市青年科技人才基金资助项目 (项目编号: 2006J23JH031).

第一作者简介: 杨芳 (1982-), 女, 在读硕士研究生. 主要研究方向: 中草药细胞工程.

E-mail: springwater200507@163.com

以丹参愈伤组织为材料, 建立稳定的细胞悬浮培养体系, 并优化了培养条件. 结果为悬浮培养法规模化生产丹参材料提供了一些基础数据.

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

以丹参幼嫩叶片为外植体, 在 MS+ 2, 4-D 0.5 mg/L+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂 9 g/L, pH 5.8 的培养基上成功诱导形成愈伤组织. 培养条件为: 黑暗, 温度 (24 ± 1) °C. 继代培养基为 MS+ 2, 4-D 0.5 mg/L+ 6-BA 0.5 mg/L+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂 9 g/L, pH 5.8 每隔 20 d 继代一次.

1.2 试验方法

丹参悬浮培养细胞的制备 取继代生长 14 d 左右分散性好的愈伤组织 3 g (根据固体生长曲线和伊文思兰染色观察在 14 d 左右时细胞生长迅速、活力最强), 置于无菌的 150 mL 三角瓶中, 加入 50 mL 液体培养基, 在 120 r·min⁻¹, (21 ± 1) °C, 恒温摇床上进行悬浮培养.

细胞总量的测定 取悬浮细胞培养液在 4 000 r/min 下离心 10 min, 收集沉淀并在 50 °C 恒温箱中干燥至恒重, 精确称重、保存.

迷迭香酸含量测定 精确称取 100 mg 细胞样品粉末, 加 10 mL 75% 乙醇, 利用超声波破碎细胞 1 h, 室温静置 12 h 然后过滤收集提取液. 使用黄喜茹^[7] 等方法测定水溶性酚酸含量.

激素的影响 以 MS 培养基为基本培养基, 附加蔗糖 30 g/L 和不同浓度的激素, pH 5.8 激素质量浓度如下:

- 1) 2, 4-D (2, 4-二氯苯氧乙酸) 0.5 mg/L
- 2) 2, 4-D 1.0 mg/L
- 3) 2, 4-D 0.5 mg/L + 6-BA (6-苄氨基嘌呤) 0.5 mg/L
- 4) 2, 4-D 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L
- 5) 2, 4-D 1.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L
- 6) 2, 4-D 3.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L

碳源的影响 以 MS 培养基为基本培养基, 激素浓度为 2, 4-D 0.5 mg/L, 并附加不同碳源: 蔗糖、葡萄糖、果糖和麦芽糖, 质量浓度均为 30 g/L, pH 调节至 5.8

培养基的影响 分别以 MS 和 6, 7-V 培养基为基本培养基, 添加 2, 4-D 0.5 mg/L, 蔗糖 30 g/L, pH 5.8 文中测定细胞干重和丹参酚酸含量的样品均是取自培养 16 d 的悬浮细胞, 每次试验做 3 个平行, 重复 3 次.

2 实验结果与讨论

2.1 不同激素配比对丹参悬浮细胞生长及水溶性酚酸生物合成的影响

表 1 表明, 以 MS 为基本培养基, 当 2, 4-D 质量浓度为 0.5 mg/L 时细胞生物量最大, 当 2, 4-D 浓度达到 1.0 mg/L 时丹参酚酸含量最高. 在培养基中同时添加 6-BA 和 2, 4-D, 对细胞生长和水溶性酚酸生物合成没有明显促进作用; 相反, 随着 2, 4-D 质量浓度的增大, 细胞生长和水溶性酚酸生物合成受到了抑制. 综合考虑, 在培养基中添加的激素 2, 4-D 0.5 mg/L 时得到的丹参酚酸产量 (细胞干重 * 丹参酚酸含量) 最高为 219.63 mg/L.

表 1 不同激素浓度下丹参悬浮细胞生长量和丹参酚酸含量

Tab. 1 Effects of phytohormones on growth and depsides yield in suspension cells of *Salvia miltiorrhiza*

激素浓度	细胞干重 / (g·L ⁻¹)	丹参酚酸含量 / (mg·g ⁻¹)
1	13.71 ± 0.65	16.02 ± 0.39
2	9.78 ± 0.47	18.66 ± 0.52
3	7.79 ± 0.49	13.13 ± 0.64
4	9.11 ± 0.52	11.17 ± 0.68
5	7.04 ± 0.21	8.81 ± 0.32
6	6.18 ± 0.36	4.90 ± 0.55

黄炼栋^[8] 等认为低浓度的 2, 4-D 对丹参

细胞的生长有一定的促进作用,与本结果一致,他们的研究还发现当单加 6-BA 时对丹参细胞生长促进作用不明显,但是对迷迭香酸和紫草酸 B 的含量具有促进作用.将 2,4-D 和 6-BA 一起加入到培养基中,不仅没有促进细胞生长和次生代谢物生成,而且还产生抑制作用.分析其原因可能有两点:①添加激素的对比对细胞生长和次生代谢物生成有很大影响,当将两种激素同时使用时,在细胞生长和分裂方面相互影响,进而影响到次生代谢速率;②可能是两种丹参的基因型不同,其自身的激素水平不同,所需外源激素的浓度和配比也不同,如添加过量或过少都会影响到细胞生长和次生代谢合成.

2.2 不同碳源对丹参悬浮细胞生长及水溶性酚酸生物合成的影响

表 2 不同碳源对细胞生长量和丹参酚酸含量的影响

Tab. 2 Effects of carbon sources on growth and depsides yield in suspension cells of *Salvia miltiorrhiza*

碳源	细胞干重 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	丹参酚酸含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
蔗糖	14.82 ± 0.91	15.84 ± 0.72
葡萄糖	13.11 ± 0.78	18.01 ± 0.92
麦芽糖	6.53 ± 0.45	11.48 ± 1.21
果糖	11.21 ± 0.82	15.99 ± 0.89

碳源的主要作用是提供能源、碳骨架、调节渗透压以及影响细胞的分化等,对细胞的生长及次生产物的积累具有重要的影响^[9].表 2 表明,相同条件下,蔗糖、葡萄糖和果糖都能促进细胞的生长,对细胞生物量的影响大小为蔗糖 > 葡萄糖 > 果糖,而麦芽糖不能被细胞利用,生物量最低.葡萄糖最有利于水溶性酚酸的积累,蔗糖和果糖差别不明显,麦芽糖效果最差.综合成本、生物量和酚酸含量等因素,蔗糖比较适合作为丹参悬浮细胞培养基的碳源.

2.3 不同基本培养基对丹参悬浮细胞生长及水溶性酚酸

表 3 表明,MS 培养基有利于悬浮细胞的生长,其细胞干重可达到 14.82 g/L; 6,7-V 培养基则有利于丹参酚酸的合成积累,其含量可达到 34.83 mg/g 为 MS 培养基的 2.2 倍,细胞生长略低于 MS 培养基.综合考虑,应选用 6,7-V 培养基作为丹参悬浮细胞培养基,其丹参酚酸含量可达到 428.41 mg/L

表 3 MS 和 6,7-V 培养基对细胞生长量和丹参酚酸含量的影响

Tab. 3 Effects of culture media on growth and depsides yield in suspension cells of *Salvia miltiorrhiza*

培养基	细胞干重 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	丹参酚酸含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
MS	14.82 ± 0.91	15.84 ± 0.72
6,7-V	12.30 ± 0.44	34.83 ± 1.01

营养元素对细胞生长和次生代谢的作用不一定完全有利,只有在适当的浓度时才能兼顾这两个方面^[10].MS 培养基的特点是无机、有机元素含量高,可为细胞提供充足的营养,有利于细胞迅速增长;但是丹参酚酸作为次生代谢物在细胞生长旺盛时积累缓慢或是不积累.因此,实际培养过程中可以考虑两步法,即将 MS 培养基作为生长培养基,促进生物量的增长,然后利用 6,7-V 培养基作为生产培养基,促进丹参酚酸的积累.

2.4 丹参悬浮细胞生长与水溶性酚酸生物合成的曲线图

从图 1 可知,丹参悬浮细胞生长基本呈“S”曲线.开始的 0~4 d 为延迟期,4~8 d 为快速生长期,细胞

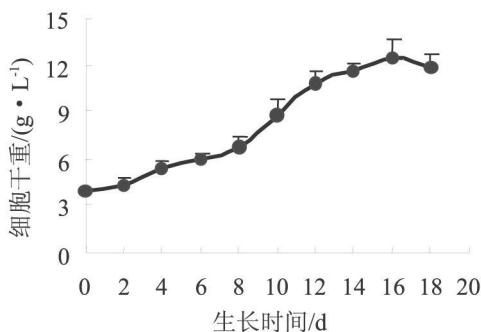


图1 丹参悬浮细胞生物量变化

Fig.1 Time-dependent curve of suspension cells biomass of *Salvia miltiorrhiza*

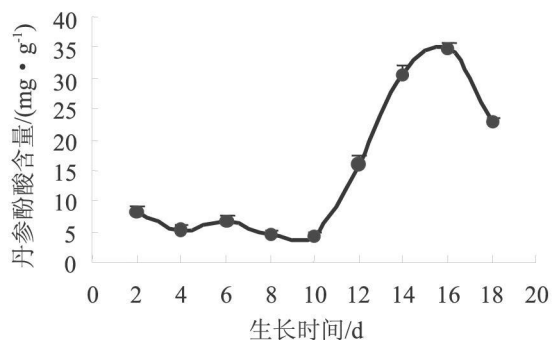


图2 丹参酚酸生物合成曲线

Fig.2 Time-dependent curve of depsides yield in suspension cells of *Salvia miltiorrhiza*

数量逐渐增加; 8~ 16 d 细胞生长进入对数期, 细胞总量迅速增加; 随后细胞生长缓慢进入稳定期, 细胞干重趋于下降。

从图 2 可知, 丹参酚酸含量在前 10 d 一直较低, 从第 10 天开始迅速升高, 一直到第 16 天达到最高值 34.76 mg/g 而后又迅速下降。综合考虑, 在细胞培养 16 d 时收获比较合适, 此时细胞干重和丹参酚酸含量均达到最大值。

3 结 论

- 1) 2, 4-D 0.5 mg/L 有利于丹参悬浮细胞的生长和水溶性酚酸的合成;
- 2) MS 培养基有利于丹参悬浮细胞的生长, 而 G 7-V 培养基则有利于丹参水溶性酚酸的合成;
- 3) 蔗糖、葡萄糖和果糖都能促进细胞的生长, 当以蔗糖为碳源时最优;
- 4) 丹参悬浮细胞的生长周期约为 18 d 在 16 d 时收获细胞可得到最高的生物量和丹参酚酸含量。

研究结果为丹参悬浮细胞的规模化培养提供了一些基础数据。今后将进一步优化适合丹参细胞悬浮培养的培养基系统, 以及筛选诱导子和研究其作用的细胞、分子机理。

参考文献:

- [1] 国家药典委员. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 57.
- [2] 韩永卫, 林敏. 丹参的药理作用 [J]. 畜牧兽医, 2003, 22(4): 22-23.
- [3] 冯玲玲, 周吉源. 丹参的研究现状与应用前景 [J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(2): 4-8.
- [4] Chen H, Chen F. Effect of Yeast Elicitor on the Secondary Metabolism of Ti-Transformed *Salvia miltiorrhiza* Cell Suspension Cultures [J]. Plant Cell Reports 2000, 19: 710-717.
- [5] Chen H, Chen F. Kinetics of cell Growth and Secondary Metabolism of a High-Tanshinone-Producing Line of the Ti-Transformed *Salvia miltiorrhiza* Cells in Suspension Culture [J]. Biotechnology Letters, 1999, 21: 701-705.
- [6] 张荫麟, 宋经元, 吕桂兰, 等. 丹参毛状根培养的建立和丹参酮的生产 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(5): 269.
- [7] 黄喜茹, 曹冬, 樊淑彦, 等. $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 显色测定丹参及其制剂中水溶性酚酸总量 [J]. 化学试剂, 2005, 22(12): 745-746.
- [8] 黄炼栋, 刘涤, 胡之璧. 植物激素对丹参悬浮培养细胞生长和酚酸类化合物含量的影响 [J]. 中药材, 2000, 23(1): 1-4.
- [9] 方从兵, 李贺勤, 宛晓春, 等. 不同理化因子对野葛悬浮培养细胞生长及异黄酮合成的影响 [J]. 中国中药, 2006, 31(19): 1580-1583.
- [10] 黄炼栋, 周吉燕, 刘涤, 等. 丹参组织培养研究及其水溶性有效成分迷迭香酸的含量测定 [J]. 上海中医药大学学报, 1999, 13(4): 56-59.