

岩黄连细胞生长与营养物质消耗的动态学研究

程 华^{1,2}, 熊 斌¹, 余龙江^{3*}

(1. 湖北中烟工业有限责任公司 技术研发中心, 武汉 430051; 2. 武汉科技大学 医学院, 武汉 430065; 3. 华中科技大学 生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘 要: 在岩黄连细胞悬浮培养过程中, 对培养液 pH 值, 碳源、氮源和磷酸盐含量, 以及细胞生物量和生物碱含量进行测定, 分析其动态变化过程。结果显示培养液 pH 值在培养初期降低, 后逐渐升高; 碳源在培养过程中逐渐被利用, 磷酸盐和氮源在培养中期几乎耗尽, 其中磷酸盐的消耗速率最快; 悬浮细胞的生长周期为 20 d 左右, 第 18 天细胞鲜重和干重达最大, 而第 21 天脱氢卡维丁和小檗碱的含量最高, 分别为 8.22 mg/L 和 4.31 mg/L。结果表明营养物质(碳、氮和磷)的吸收与细胞生长以及生物碱的合成密切相关, 营养元素的相对消耗速率为磷>氮>碳, 推测氮和磷是影响岩黄连细胞培养的主要因素。

关键词: 细胞培养; 岩黄连; 脱氢卡维丁

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)06-0795-05

Studies on the kinetics of cell growth and nutrient consumption in cell suspension cultures of *Corydalis saxicola*

CHENG Hua^{1,2}, XIONG Bin¹, YU Long-Jiang^{3*}

(1. Technical Research & Development Center, China Tobacco Hubei Industrial Co. Ltd., Wuhan 430051, China; 2. Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China; 3. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: The kinetics of cell growth and nutrient consumption were investigated in cell suspension cultures of *Corydalis saxicola*. The results showed that the pH value decreased during the early period of cultivation and increased later. Total carbohydrate and nitrate were assimilated gradually throughout the growth period, and the absorption of phosphate was the fastest. The growth period of cell suspension cultures was around 20 days with the highest dry weight and fresh weight of biomass on day 18. However, the highest contents of alkaloids were obtained on day 21, with 8.22 mg/L of dehydrocavidine and 4.31 mg/L of berberine. These obtained results indicated that nutrient consumption was deeply related to cell growth and biosynthesis of alkaloids in cell suspension cultures of *C. saxicola*. Phosphate was absorbed fastest, followed by nitrate and carbohydrate. It was suggested that phosphate and nitrate were the main compounds, which had effects on cell suspension cultures of *C. saxicola*.

Key words: cell suspension culture; *Corydalis saxicola*; dehydrocavidine

岩黄连(*Corydalis saxicola*), 紫堇科紫堇属植物, 多年生草本(文和群等, 1993a)。全草含脱氢卡维丁(dehydrocavidine)、小檗碱(berberine)等多种活性生物碱成分(柯珉珉等, 1982); 是桂西北山区常用于消炎止痛、排毒, 治疗急慢性肝炎和肝硬化等疾

病的一种中草药(何金祥, 2003; 蒋水元等, 2002)。岩黄连野生资源少, 属于石山特有种(文和群等, 1993b), 被列入中国南部石灰岩濒危植物名录(文和群等, 1993a)。目前制成岩黄连总生物碱的注射液和片剂, 临床主治肝炎, 疗效较佳, 特别是乙型肝炎

收稿日期: 2007-04-01 修回日期: 2007-12-28

作者简介: 程华(1978-), 男, 湖北应城人, 博士, 从事植物生理生化与天然产物方面研究, (E-mail)hbchh2008@163.com。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: yulongjiang@hust.edu.cn)

炎、肝硬化、肝癌等(柯珉珉等,1982;蒋水元等,2002;何金祥,2003)。由于岩黄连巨大的经济价值,引起人们大量采挖和收购,导致岩黄连资源匮乏。因此,有必要考虑开发其他途径来获得更多的岩黄连资源,维持其可持续开发利用。

植物细胞培养是利用现代生物技术开发植物资源的重要手段之一(Yang等,2001;Ramachandra等,2002;Cheng等,2006)。如能实现岩黄连细胞的大规模培养,将为解决岩黄连资源短缺提供新的方法。我们已经建立岩黄连的细胞悬浮培养体系,并确定其中含有脱氢卡维丁、小檗碱等活性生物碱成分(Cheng等,2006)。由于培养细胞中岩黄连生物碱的含量低以及细胞的增值速度较慢,利用岩黄连细胞培养生产岩黄连生物碱的研究进展缓慢。为了提高岩黄连细胞生物碱的含量,找到细胞增殖缓慢的原因,必需了解在悬浮培养过程中的细胞生长和生物碱的合成情况,以及营养物质消耗的动态变化,这对于培养过程控制、优化和放大必不可少。依此作为理论基础,才能设计出适合岩黄连细胞快速增殖的营养水平,合理调整培养基的组成结构,为岩黄连细胞的放大培养奠定基础。本文主要研究了悬浮培养过程中岩黄连细胞的生长、生物碱合成以及主要营养物质消耗的动态特性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

岩黄连悬浮细胞系的建立和培养条件参考文献(Cheng等,2006)。培养基为改良的B5(Gamborg)培养液,添加0.5 mg/L 2,4-D,2 mg/L BA,30 g/L 蔗糖。使用250 mL三角瓶,分装80 mL培养液进行摇瓶培养,接种量10%(W/V)。于25℃,130 r/min摇床培养。

1.2 pH值的测定

采用PHS-2C酸度计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)测定。

1.3 糖的测定

还原糖含量测定:吸取1 mL适当稀释的培养液,加入0.5 mL DNS。混匀后沸水浴中加热5 min,测定在520 nm处的吸光值,从标准曲线中计算还原糖含量。总糖含量测定:将1 mL适当稀释的培养液置于试管中,加入1 mL 6 mol/L盐酸,在沸水中消化10 min,立即用冷水冷却,加入2滴酚

酞试剂,用10%氢氧化钠滴定至微红,定容到10 mL。再用DNS法测定其中的还原糖。利用公式换算成总糖含量。总糖=样品水解后还原糖mg数×样品稀释倍数/样品重量。蔗糖含量测定:吸取1 mL适当稀释的培养液于试管中,加入0.1 mL 2 mol/L氢氧化钠溶液,在沸水中加热10 min(盖住试管口),破坏其中的还原糖,立即冷却至室温,加入1 mL间苯二酚溶液,3 mL 10 mol/L盐酸,摇匀后放入80℃水浴中加热8 min,冷却后于500 nm处测定吸光值。根据标准曲线计算蔗糖含量。

1.4 磷酸盐的测定

用磷钼蓝显色法测定磷酸根离子(无机磷)含量。测定时吸取1 mL适当稀释的培养液于试管中,加入2 mL水和3 mL定磷试剂,立即混匀,于45℃水浴中加热25 min,取出冷却至室温,测定660 nm处的吸光值。根据标准曲线计算磷酸盐含量。

1.5 硝酸盐测定

吸取1 mL适当稀释的培养液,加入1%乙酸和0.8 mol/L的乙酸钠4.0 mL,摇匀后,加入20 mg锌粉,摇动20 min,过滤,取滤液4 mL,加入1 mL α-萘胺-磺胺试剂,摇匀10 min后,测定540 nm处的吸光值。根据标准曲线计算硝酸盐的含量。

1.6 铵盐测定

吸取2 mL适当稀释的培养液,加3 mL茚三酮试剂,0.1 mL 1%的抗坏血酸,混匀。盖上漏斗或球形盖,沸水浴15 min,试管从水中取出后,间歇搅拌并于空气中冷却15 min。加热形成的红色茚满酮在冷却和氧化而退色,得到茚三酮与氨基酸的蓝紫色反应产物,在580 nm下测定吸光值。

1.7 细胞生长的检测

用布氏漏斗真空抽滤后收集培养液作下一步的分析,得到的细胞用多倍体积蒸馏水充分洗涤,抽干后称取细胞湿重,然后于50℃烘箱中烘至恒重,冷却后称取干重。以培养基中的干重作为细胞生长的依据。

1.8 总生物碱含量测定

参考Cheng等(2006)的方法。将烘干的细胞研磨成粉次,精确称取100 mg细胞和叶样品,加5 mL 75%乙醇(含1%盐酸),室温下超声提取3次,每次1 h,过滤去沉淀,滤液用氨水调至pH9.0,然后用5 mL氯仿萃取3次,加少量无水硫酸钠,过滤,滤液加热蒸干,加入0.1 mL甲醇溶解备用。取5 mL培养液,氨水调pH值为9.0,然后用5 mL氯

仿萃取 3 次,合并有机相,加少量无水硫酸钠,过滤,滤液加热蒸干,加入适量甲醇溶解备用。上样前过 0.45 μm 滤膜,取 10 μL 上样,采用 Waters 510 液相色谱仪,C18 柱(Dikma Diamonsil, 5 μm , 250 mm \times 4.6 mm),流动相为乙腈:水(40:60),每升流动相加 3.4 g 磷酸二氢钾和 1.7 g SDS,检测波长 345 nm,流速 1 mL/min,柱温:室温,灵敏度:0.08 AUFS。样品中生物碱含量包括细胞和培养液中的生物碱含量。

2 结果与分析

2.1 培养过程中培养液 pH 值的变化

在培养过程中,培养液 pH 值在 5.0~7.0 范围内波动,呈先降后升的变化,即先短期上升,然后下降,至 10 d 后再慢慢上升(图 1)。

2.2 培养液中的糖浓度变化

由图 2 可以看出,总糖浓度在整个培养过程中逐渐降低,开始 6 d,下降缓慢,6 d 后,含量下降迅速,直至降低为 0。蔗糖浓度在培养的前 10 d 急剧降低,10 d 后,在培养液中已几乎检测不到蔗糖。还原糖的浓度在培养的初期逐渐升高,第 9 d 最高,之后迅速降低,至培养末期降低为 0。

2.3 培养过程中培养液的含氮盐消耗

图 3 为培养液中硝酸盐和氨盐浓度变化曲线。氨盐代谢的相对速度(%)比硝酸盐代谢的相对速度快,至 9 d 左右消耗殆尽。而硝酸盐浓度在培养的前 12 d 下降较快,之后逐渐被消耗完全。

2.4 培养过程中培养液磷酸盐消耗

如图 4 所示,磷酸盐浓度在培养的初期(前 6 d)急剧降低,表明磷酸盐已经大部分被吸收。之后磷酸盐逐渐被消耗完全。

2.5 培养过程中岩黄连细胞生长

岩黄连细胞悬浮培养的生长周期为 20 d 左右,细胞鲜重和干重增长的时间曲线相似(图 5)。在培养的前 6 d,细胞生长缓慢,有明显的延迟期,之后,生物量迅速增长,为指数生长期,第 18 d 鲜重和干重都达到最高值。与培养初期相比,细胞鲜重增长了 3 倍左右,干重提高了 5 倍左右。18 d 后,细胞生物量趋于稳定,进入稳定期。

2.6 培养过程中生物碱合成

图 6 显示岩黄连细胞悬浮培养过程中主要生物碱的合成情况。脱氢卡维丁在培养前 6 d 合成缓

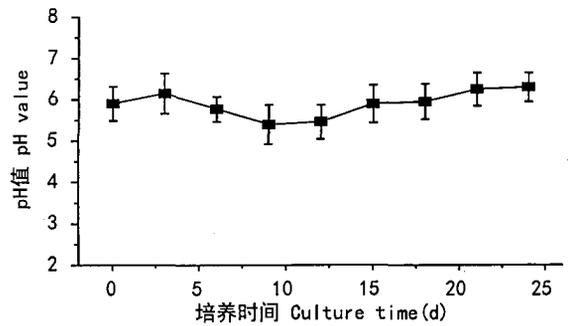


图 1 培养液的 pH 值变化

Fig. 1 Time course of pH value in liquid medium. Values are means of three independent cultures. Error bars represent \pm S. D. The same below.

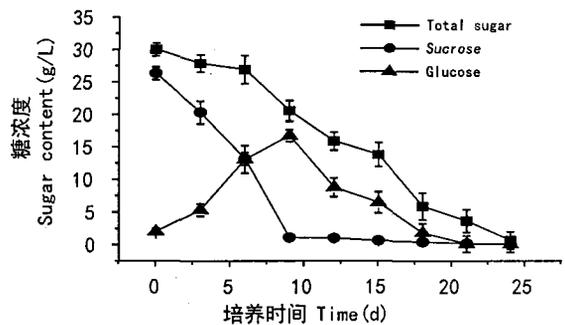


图 2 培养液中糖代谢曲线

Fig. 2 Sugar metabolic curves in liquid medium

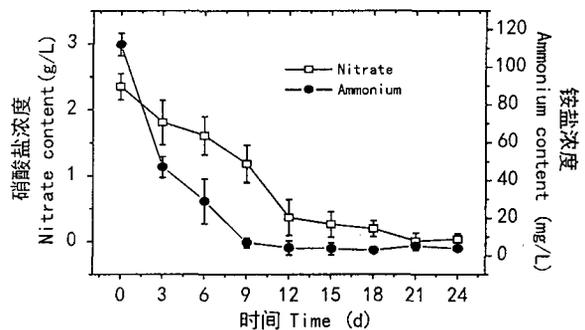


图 3 培养基中硝酸盐和氨盐代谢曲线

Fig. 3 The metabolic curves of nitrate and ammonium in liquid medium

慢,之后含量迅速增加,到第 21 天达到最高,8.22 mg/L。小檗碱的含量变化与脱氢卡维丁相似,但增长比较缓慢,也在第 21 天达到最高值,4.31 mg/L。在培养过程中,脱氢卡维丁的含量较小檗碱的含量高,合成速度也较小檗碱快。

3 讨论

在植物细胞悬浮培养过程中,培养液的 pH 值

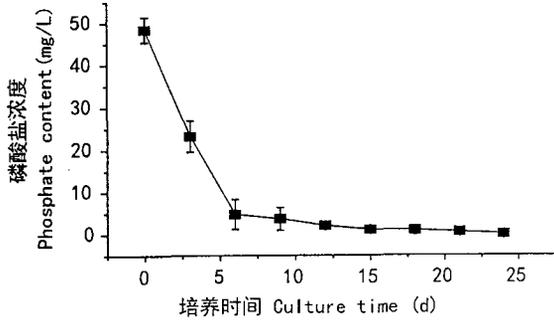


图 4 培养基中磷酸盐消耗曲线
Fig. 4 The metabolic curves of phosphate in liquid medium

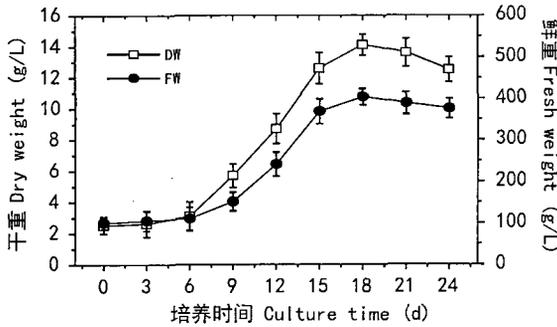


图 5 岩黄连细胞生长曲线
Fig. 5 The growth curves of *C. saxicola* suspension-cultured cells

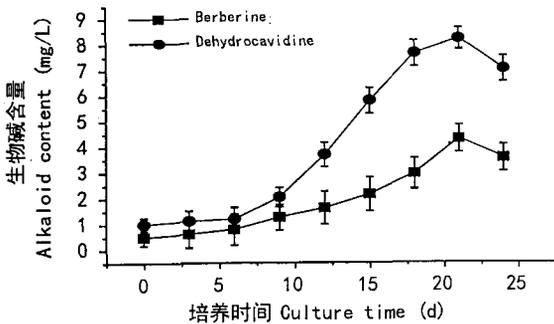


图 6 悬浮培养中生物碱合成曲线
Fig. 6 Time courses of alkaloid production in *C. saxicola* suspension cultures

会随着培养时间出现波动性变化。在本实验中,培养液 pH 值在 5.0~7.0 之间变化,先降后升。一般认为,培养早期出现 pH 下降与植物细胞吸收培养基中的 NH_4^+ 有关,其结果为细胞水解蔗糖所需的某些酸性水解酶提供适宜的环境(候学文等,2001)。另外,细胞在生长过程中,能对周围环境 pH 值进行细微调节,使保持在一个恒定的外环境中,以利于细胞自身的生长代谢。

蔗糖是本实验培养基中的主要碳源供给体。随

着细胞的生长,蔗糖逐渐被消耗,在延迟期,蔗糖消耗较慢,进入快速生长期培养液中蔗糖基本被水解完全(图 2),为细胞的增殖提供大量能量。在开始培养的初期,可以检测到一定量的葡萄糖,这主要是由于培养基在高压灭菌时部分蔗糖被水解。灭菌过程中通常会有 15%~20% 的蔗糖水解为葡萄糖与果糖。本实验中总糖含量在培养末期才被消耗尽(图 2),表明添加 3% 蔗糖足以维持岩黄连细胞生长一代时所需碳源。蔗糖在培养基中不仅起着碳源供给作用,还有维持培养基渗透压的作用,蔗糖浓度过低,不足以满足细胞生长、发育、代谢和维持渗透压的要求;浓度过高,渗透压高,不利于细胞生长,同时也不利于降低生产成本(张美萍等,2003)。细胞培养体系中碳源的消耗因植物种类、培养方式和生长状态的不同而有所差别,如候学文等(1999)在研究玫瑰茄细胞悬浮培养时,发现蔗糖第 4 天就全部分解为葡萄糖和果糖,第 16 天葡萄糖和果糖全部被吸收利用,之后细胞因无碳源供给而生长受阻。

B5 培养基中的氮源主要为硝态氮(NO_3^-)和铵态氮(NH_4^+)。在本实验中,铵态氮的浓度下降速度明显超过硝态氮的浓度下降速度(图 3),表明岩黄连细胞优先吸收铵态氮。氮源对植物细胞的生长和次生代谢的合成也是必不可少的(Akita 等,2000),从利用难易上来说,植物细胞一般优先利用 NH_4^+ ,随后在利用 NO_3^- 。磷可参与糖代谢和能量代谢中的许多重要中间产物,如 6-p-葡萄糖、6-p-果糖以及 ATP 等。如果磷酸盐浓度过低,会导致细胞中糖代谢水平降低,影响糖的吸收。本实验中,岩黄连细胞对磷酸盐的吸收非常快速(图 4)。Ashihara 等(1985)研究了磷酸盐限制和非限制下,长春花细胞的初级代谢,发现磷酸盐被快速吸收,参与合成核苷酸、DNA、RNA、磷酸化糖及蛋白质等。细胞内磷酸盐的积累水平对植物细胞生长及培养周期有重要调节作用,积累水平的不同是引起细胞生理状况发生变化的重要原因。姜绍通等(2006)研究发现磷是霍山石斛类原球茎细胞悬浮生长的限制性因素,提高磷的起始浓度有利于多糖产物的积累。

在岩黄连细胞悬浮培养过程中,碳、氮、磷元素的吸收与细胞生长以及生物碱的合成密切相关。延迟期,营养物质消耗缓慢,细胞生长缓慢,生物碱含量低;进入快速生长期后,营养成分快速被吸收,为细胞生长代谢提供能量和物质基础,生物碱的含量快速升高。到生长后期,由于营养植物消耗殆尽,细

胞生长受阻,生物量出现缓慢下降,生物碱的合成也随之降低。比较岩黄连细胞悬浮培养过程中,大量元素的相对消耗速率,发现磷>氮>碳,在大量元素中无机磷消耗最快,其中氮和磷在细胞进入快速生长中期几乎耗尽,提示氮和磷可能是影响岩黄连细胞培养的主要营养因素。张美萍等(2003)在西洋参悬浮细胞培养研究中也发现磷酸根消耗最快,氮源消耗次之。郭志刚等(2002)在研究紫杉细胞悬浮培养过程中,得到了相似的结果,认为氮、磷和钾是影响紫杉细胞培养的主要营养因素。

参考文献:

- Akita T, Hina Y, Nishi T. 2000. Production of betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris*) [J]. *Biosci Biotech Biochem*, **64**(9):1 807—1 812
- Ashihara H, Tokoro H. 1985. Metabolic rate of inorganic phosphate absorbed by suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* [J]. *J Plant Physiol*, **118**(3):227—237
- Cheng H, Yu LJ, Hu QY, et al. 2006. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Corydalis saxicola* Bunting, a rare medicinal plant [J]. *Z Naturforsch*, **61**(3—4):251—256
- Guo ZG(郭志刚), Du J(都军), Liu RZ(刘瑞芝). 2002. Kinetic investigation of *Taxus* cell growth and nutrient consumption(紫杉细胞生长过程与营养物质消耗的动态研究) [J]. *J Tsinghua Univ (Sci Tech)* (清华大学学报·自然科学版), **42**(5):599—602
- He JX(何金祥). 2003. Separation and identification of the pathogen causing the basilar stem of *Corydalis saxicola* Bunting and its prevention [J]. *Guihaia* (广西植物), **23**(5):473—475
- Hou XW(侯学文), Zheng SP(郑穗平), Guo Y(郭勇). 2001. The culturing process and kinetic model construction of *Hibiscus sabdariffa* suspension culture(悬浮培养玫瑰茄细胞的生长行为及动力学方程的建立) [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学杂志), **19**(4):317—322
- Hou XW(侯学文), Guo Y(郭勇). 1999. The effect of various carbon sources on the assimilation of nutrients in Roselle suspension culture(不同碳源对悬浮培养玫瑰茄细胞主要基质消耗的影响) [J]. *Guihaia* (广西植物), **19**(1):73—77
- Jiang ST(姜绍通), Wei M(魏明), Luo JP(罗建平). 2006. Effect of phosphate on growth and polysaccharide production by suspension cultures of protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense* (磷对霍山石斛类原球茎悬浮培养细胞生长和多糖合成的影响) [J]. *Chin J Biotech* (生物工程学报), **22**(4):613—618
- Jiang SY(蒋水元), Hu XH(胡兴华), Zhao RF(赵瑞峰). 2002. Study on the introduction and cultivation of *Corydalis saxicola* Bunting(岩黄连引种栽培研究) [J]. *Guihaia* (广西植物), **22**(5):469—473
- Ke MM(柯珉珉), Zhang XD(张宪德), Wu LZ(吴练中). 1982. Studies on the active principles of *Corydalis saxicola* (岩黄连有效成分的研究) [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **24**(3):289—292
- Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites [J]. *Biotech Adv*, **20**(2):101—153
- Wen HQ(文和群), Xu ZR(许兆然), Villa LJ, et al. 1993a. A list of threatened limestone plants in south China(中国南部石灰岩稀有濒危植物名录) [J]. *Guihaia* (广西植物), **13**(2):110—127
- Wen HQ(文和群), Xu ZR(许兆然), Villa LJ, et al. 1993b. A preliminary study on the threatened limestone plants in South China(中国南部石灰岩濒危植物的初步研究) [J]. *Guihaia* (广西植物), **13**(1):41—47
- Yang S, Ubillas R, McAlpine J, et al. 2001. Three new phenolic compounds from a manipulated plant cell culture, *Mirabilis jalapa* [J]. *J Nat Prod*, **64**(3):313—317
- Zhang MP(张美萍), Wang Y(王义), Sun CY(孙春玉), et al. 2003. Study on the consumption of sucrose and inorganic elements in the basal media of suspension culture of *Panax quinquefolium* Linn. callus(西洋参愈伤组织悬浮培养基中蔗糖和无机元素的消耗状况) [J]. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), **12**(3):60—61

(上接第 805 页 Continue from page 805)

- 20 02. Effects of CPPU and PP333 on three starch synthase activity and grain quality of hybrid rice (CPPU 和 PP333 对杂交稻 3 个淀粉合成酶活性和米质的影响) [J]. *Hybrid Rice* (杂交水稻), **17**(3):44—46
- Tsai CY. 1965. Correlation of enzymatic activity with Wx dosage [J]. *Maize Genet Coop Newslett*, **39**:153—156
- Van D, Leij FR, Visser RGG, et al. 1987. Complementation of the amylase-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum*) [J]. *Theor Appl Genet*, **75**:2—17
- Wang YF(王月福), Yu ZW(于振文), Li SX(李尚霞), et al. 2003. Activity of enzymes related to starch synthesis and their effect during the filling of winter wheat(小麦籽粒灌浆过程中有关淀粉合成酶的活性及其效应) [J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), **29**(1):75—81
- Wang F(王芳), Wang XZ(王宪泽). 2004. Study on the dynamic

- changes of starch synthesis and their related enzymes in wheat (小麦籽粒淀粉合成动态及其相关酶活性的研究) [J]. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), **24**(2):57—60
- Wu B(武波), Wei D(韦东), Ou Q(欧倩). 2006. SCAR marker of Bph from rice(水稻抗褐飞虱基因 SCA 标记的获得) [J]. *Guihaia* (广西植物), **26**(6):617—620
- Xie ZJ, Jiang D, Cao WX, et al. 2003. Effects of post-anthesis soil water status on the activities of key regulatory enzymes of starch and protein accumulation in wheat grains [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, **29**(4):309—316
- Zhong LJ(钟连进), Cheng FM(程方民). 2003. Varietal differences in amylose accumulation and activities of major enzymes associated with starch synthesis during grain filling in rice(水稻籽粒灌浆过程直链淀粉的积累及其相关酶的品种类型间差异) [J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), **29**(3):452—456