

DOI:10.11937/bfyy.201605035

怀牛膝悬浮细胞培养的动力学研究

李金亭¹, 郭晓双¹, 王召阳², 韩学娉¹, 周志强¹, 朱凯莉¹

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南省高校道地性中药保育及利用工程研究中心, 河南 新乡 453007;

2. 河南省南召县中药材开发办公室, 河南 南阳 474650)

摘要:以怀牛膝悬浮细胞系为试材,对牛膝细胞悬浮培养动力学进行了研究,采用 HPLC、原子吸收分光光度法和电导率测定等方法,分析了牛膝悬浮细胞生长、营养消耗和三萜皂苷积累的动力学关系。结果表明:牛膝细胞悬浮培养周期约为 24 d,经 24 d 的悬浮培养,最大生物量和齐墩果酸含量分别达到了 13.47 mg/L 和 1.418 mg/g;牛膝悬浮细胞生长与三萜皂苷积累的动力学关系属于生长偶联型。培养过程中培养液的 pH 值呈先下降后回升的趋势,而电导率逐渐减小,24 d 时降到最低点,而后略有上升。经 15 d 培养,培养基中的蔗糖即消耗殆尽;培养 21 d 后,培养基中大量的氮源、磷源、K⁺ 和 Mg²⁺ 被消耗,而 Ca²⁺ 比较充足,基本可以满足细胞生长的需要。由此可推断,培养液中营养成分的不足限制了细胞的快速增长和三萜皂苷含量的提高。

关键词:牛膝;悬浮细胞;细胞生长;齐墩果酸**中图分类号:**S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)05-0132-05

牛膝(*A. bidentata* Bl.)属苋科多年生草本植物,以干燥根入药,主产于河南古怀庆府地区,是我国重要的大宗药材之一^[1]。中国药典 2010 年版一部中记载牛膝味苦、酸、平,具有补肝肾、强筋骨,逐瘀通经,引血下行的功效^[2]。据报道,从牛膝中分离鉴定的多种皂苷均为以齐墩果酸为苷元的三萜皂苷,经水解后生成齐墩果酸、

葡萄糖醛酸等,齐墩果酸具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、降脂、利胆和保肝等作用^[3]。随着天然植物资源的匮乏和栽培品种的日益退化,通过药用植物细胞悬浮培养生产药用次生代谢产物,是提高有效成分含量的有效途径之一,近年来受到广泛关注^[4]。目前通过细胞悬浮培养获得天然活性产物的植物已达 1 000 多种,我国的西洋参、人参、紫草等药用植物细胞培养技术已实现了工业化生产,有效成分的含量远远超过原植株^[5]。但通过牛膝细胞的悬浮培养生产次生代谢产物的报道极少^[6-7]。因此,利用牛膝细胞悬浮培养技术对大规模生产牛膝活性成分具有重要的现实意义。该试验在已建立的牛膝

第一作者简介:李金亭(1962-),女,博士,教授,硕士生导师,现主要从事药用植物学等研究工作。E-mail:Ljt66882004@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81274076);河南省基础与前沿资助项目(122300410430,132300410214)。

收稿日期:2015-10-08

Study on Cryopreservation of Shoot Tips From *in vitro* Plants of *Chrysanthemum* by Vitrification Method

ZHANG Yanqiu, QU Lianwei, SU Junwei, XING Guimei, LU Jiaojiao, ZHANG Xiaofei

(Institute of Floriculture, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: *Chrysanthemum* 'Jinba' was used as test material, and the experiment design of single factor optimization was used to research the effect of sucrose concentration in pre-culture medium, time of pre-culture, loading, exposure of PVS-2, size of shoot tips and the time of frozen on cryopreservation. The results showed that the optimal treatment combination realizing long-period preservation of the shoot tip of *Chrysanthemum* by vitrification method including: 0.25 mol/L of sucrose in pre-culture medium, pre-culturing 3 days, loading treatment at 25°C for 40 minutes, vitrification process at 0°C for 60 minutes and 1.5-2.0 mm of shoot tips. The survival rate of shoot tips preserved for 180 days using this system could reach 71.33% after unloading and recovery training.

Keywords: *Chrysanthemum*; tissue culture; shoot tips; cryopreservation

悬浮细胞培养体系基础上,进一步研究牛膝细胞悬浮培养周期内,不同培养阶段牛膝细胞生长和培养液中碳源、氮源、磷源、钾、钙、镁的消耗,电导率的变化,以及细胞鲜重与干重的变化,从而了解牛膝细胞生长、营养消耗与次生代谢产物积累的基本规律,为提高牛膝悬浮细胞中三萜皂苷的积累和建立结构化动力学模型提供理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以牛膝无菌苗的叶片为外植体,参照李明军等^[8]方法,接种于改良的 B_5 固体培养基($B_5 + 30 \text{ g/L}$ 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA, pH 5.8) 中诱导愈伤组织,筛选生长快、分散性好的愈伤组织多次继代后转到液体培养基中进行细胞悬浮培养,通过不断选择获得分散性好的悬浮细胞,经过 5 代以上的转接,建立稳定的悬浮细胞系。

1.2 试验方法

牛膝细胞液体培养基为 $B_5 + 30 \text{ g/L}$ 蔗糖 + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 g/L 水解酪蛋白(CH), pH 5.8,在 100 mL 锥形瓶中加入 30 mL 液体培养基,接种 1 g 牛膝愈伤组织进行悬浮培养。悬浮细胞在 25°C 、120 r/min 条件下振荡暗培养,通过多次继代培养,获得分散好的细胞系。

在 100 mL 锥形瓶中加入 30 mL 培养液,接种 1 g 悬浮细胞系进行悬浮培养。培养条件与上述条件相同。自接种日起,每 3 d 取样 1 次,测定培养基中蔗糖、钾、氮、磷、镁的浓度,电导率的变化, pH 值的变化,以及细胞的鲜重与干重变化和齐墩果酸含量。

1.3 项目测定

1.3.1 生物量的测定 取悬浮培养细胞经 3 000 r/min 离心 10 min,离心沉淀的细胞称得细胞鲜重(FW), 60°C 烘干至恒重即得细胞干重(DW)。

1.3.2 营养物质分析 收集摇瓶中的培养液,蔗糖含量采用苯酚法^[9]测定。胞外磷源采用钼酸铵分光光度法^[10]测定。胞外总氮含量采用碱性过硫酸钾消解分光光度法^[11]测定。钾、钙、镁含量采用原子分光光度法^[12]测定。

1.3.3 pH 值和电导率测定 采用 PB-20 型 pH 计和雷磁 DDSJ-308A 型电导率仪分别测定细胞培养液的 pH 值和电导率。

1.3.4 齐墩果酸含量测定 参照 LI 等^[3]方法,将干燥的牛膝细胞粉碎后,用 100 目筛过滤,精确称得待测样品 100 mg,加甲醇 10 mL,超声提取 3 次,每次 30 min,过滤除残渣,并用甲醇洗涤容器和残渣 3 次,于旋转蒸发器中减压浓缩至干燥。浓缩后样品用 10 mL 4 mol/L 的盐酸于 85°C 水解 1 h,冷却后加入 10 mL 氯仿,在 60°C 回流

萃取 2 次,每次 15 min,收集下层液减压蒸干,用色谱甲醇定容至 1 mL,混匀, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,得样品供试溶液,用于 HPLC 测定。色谱条件:色谱柱 C18 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$);流动相为甲醇:冰醋酸:水(90:0.1:10),流速 1.0 mL/min ,检测波长 210 nm,柱温 25°C ,进样量 $10 \mu\text{L}$ 。以齐墩果酸为标准品,回归方程为 $y = 8\,672.1x + 44.65$, $R^2 = 0.999\,7$ 。

1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS 和 Excel 软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 牛膝细胞悬浮培养生长曲线

由图 1 可知,2 种不同生长指标的生长曲线基本一致,均呈“S”型,并明显分为 4 个阶段:0~6 d 悬浮细胞生长较慢,为延迟期,可能是由于细胞转入新的培养液中时,新培养液的渗透压较高,盐浓度也较高,细胞不能迅速适应的缘故;7~21 d 牛膝细胞快速增长,处于对数生长期;21~24 d 进入稳定期,细胞增殖速度变慢,之后细胞生长进入衰亡期,生物量呈下降趋势。根据牛膝细胞生长曲线,确定牛膝细胞的最佳收获期为培养的 21~24 d。

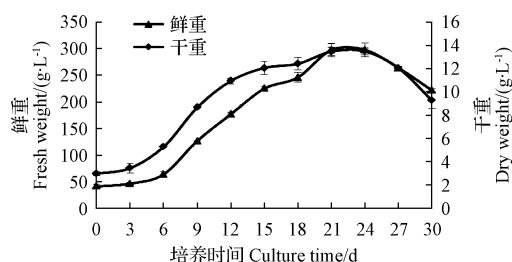


图 1 牛膝细胞生长曲线

Fig. 1 Cell growth curve of *A. bidentata* Bl.

2.2 牛膝细胞生长和三萜皂苷生物合成动态化学

由图 2 可知,牛膝细胞内三萜皂苷元-齐墩果酸的积累与细胞生长曲线联系紧密,细胞的生长曲线与齐墩果酸的积累曲线类似,属于生长偶联型。在延迟期,细

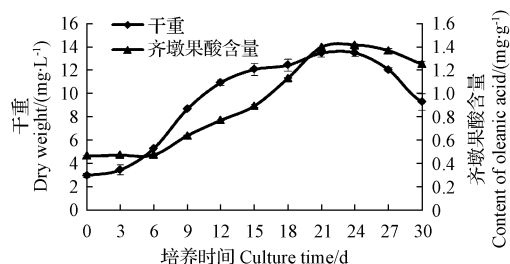


图 2 牛膝细胞悬浮培养过程中细胞生长和三萜皂苷含量的动态变化

Fig. 2 Dynamic change of cell growth and triterpenoid saponin content during cell suspension of *A. bidentata* Bl.

胞内次生代谢较慢,齐墩果酸的含量仅为 0.465 mg/g。进入对数生长期,牛膝细胞快速增殖,24 d 时细胞干重达 13.47 mg/L,细胞的内存齐墩果酸含量也快速增加到 1.418 mg/g。而在衰亡期,细胞逐渐褐化、死亡,细胞内齐墩果酸的含量也呈现下降的趋势。可见,三萜皂苷积累与牛膝细胞的分裂生长呈正相关,与紫草宁及其衍生物的生物合成发生在细胞停止生长的静止期不同^[13]。

2.3 培养液中 pH 值变化

由图 3 可知,培养液初始 pH 5.8,接种后 6 d 后迅速降至 5.21,以后又开始回升,到细胞生长的稳定期(21~24 d)pH 达 7.17~7.58,细胞生长进入衰亡期,培养液的 pH 值呈继续上升趋势,与九连小檗细胞培养液中 pH 值变化相似^[14]。由此可见,培养液的 pH 值变化与细胞生长呈现一定的相关性。培养液的 pH 值是研究细胞培养的一个重要参数,它反映了植物生长过程中营养成分的吸收以及代谢物如氨基酸、生物碱的释放,图 3 的变化趋势可能与不同离子的利用和新物质的形成有关。

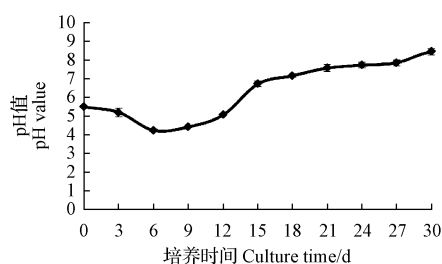


图 3 牛膝细胞悬浮培养过程中培养液 pH 值的变化

Fig. 3 The change of pH value of medium during cell suspension culture of *A. bidentata* Bl.

2.4 培养液中电导率的变化

由图 4 可知,在达到最大生物量(24 d)之前,无机盐的浓度逐渐降低,而细胞进入衰亡期后(24 d 以后),随着死亡细胞的增多,死亡细胞的细胞液进入培养基中,使培养基中无机盐增多,电导率又开始回升。

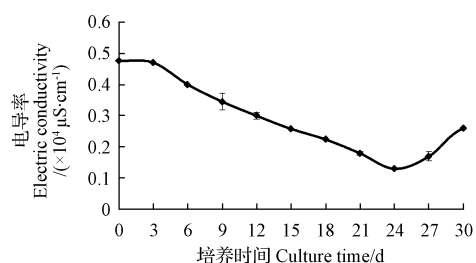


图 4 牛膝细胞悬浮培养过程中培养液中电导率的变化

Fig. 4 The change of medium conductivity during cell suspension culture of *A. bidentata* Bl.

2.5 牛膝细胞悬浮培养基中蔗糖的消耗

糖类在植物细胞培养中具有重要的作用,既为细胞生长提供能量,也为初级和次级代谢物的合成提供碳

架,同时对维持培养基中的渗透压有一定作用,糖类在细胞培养过程中的转化、吸收具有重要意义。在牛膝细胞悬浮培养的前 15 d(图 5),培养液中的蔗糖逐渐减少,细胞质量逐渐增加,表明糖代谢快。碳源的消耗趋势与细胞的生长阶段较为吻合。在细胞生长的延迟期,蔗糖迅速被分解为葡萄糖和果糖(还原糖)。在细胞对数生长期,蔗糖已被大量分解,浓度急速下降,15 d 时细胞仍然继续增殖,而蔗糖已基本被完全吸收,因此蔗糖含量不能满足细胞生长和繁殖的需要,这也是限制细胞继续增殖的重要因素之一。

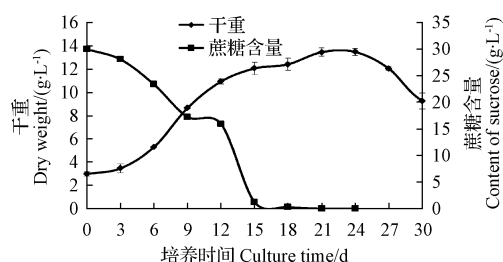


图 5 牛膝细胞悬浮培养过程中培养液中蔗糖含量的变化

Fig. 5 The change of medium sucrose content during cell suspension culture of *A. bidentata* Bl.

2.6 牛膝细胞悬浮培养基中氮源的消耗

由图 6 可知,在牛膝细胞的生长过程中,氮源的消耗速度很快,接种后即快速下降,到培养的第 21 天(稳定期)总氮源已经消耗近 73.75%,达到了最低点。21 d 后又稍有回升,这可能是随着细胞的衰老死亡,其氮源进入培养基中的原因。

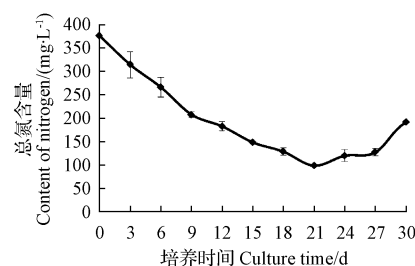


图 6 牛膝细胞悬浮培养过程中培养液总氮含量的变化曲线

Fig. 6 The change curve of medium total nitrogen content during cell suspension culture of *A. bidentata* Bl.

2.7 牛膝细胞悬浮培养基中无机磷的消耗

PO_4^{3-} 是植物细胞内重要的营养成分之一,参与核苷酸、DNA、RNA、磷酸化糖和蛋白质等的形成,是植物细胞内萜类和甾类物质合成途径的中间组分^[15]。由图 7 可知,与氮源相似,在牛膝细胞的培养过程中, PO_4^{3-} 呈先下降后回升趋势。通过 21 d 的培养,磷源随着牛膝细胞的生长基本被消耗殆尽,随后又有所回升。

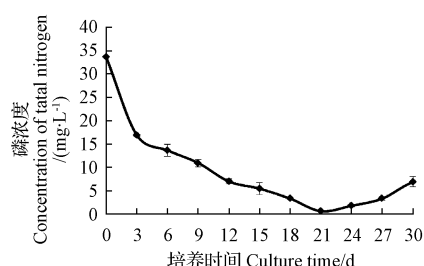


图7 牛膝细胞悬浮培养过程中无机磷含量变化

Fig. 7 The change of inorganic phosphorus content during cell suspension culture of *A. bidentata* Bl.

2.8 牛膝悬浮培养基中主要矿质元素的消耗

由图8可知, K^+ 在细胞生长过程中起着“离子泵”的作用, 对细胞渗透压及物质吸收具有调节作用^[16]。在接种初期, 细胞快速吸收 K^+ , 在细胞生长延迟期就吸收了将近一半的 K^+ 。进入对数生长期以后, 前12 d吸收了355 mg/L左右, 培养液中的 K^+ 因此而消耗殆尽。细胞虽然还在增殖, 但是由于培养液中 K^+ 浓度较低, 影响了细胞增殖的幅度。说明 K^+ 是影响细胞快速增殖的重要因素之一。

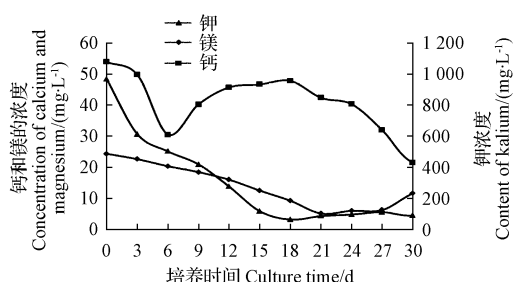


图8 牛膝悬浮培养过程中主要矿质元素的含量变化

Fig. 8 The change of main mineral element content during cell suspension culture of *A. bidentata* Bl.

在细胞新陈代谢过程中, Mg^{2+} 是许多活性酶的重要激活因子或组成元素之一, 其消耗与细胞的增殖也密切相关。由图8可知, 培养液中 Mg^{2+} 浓度从接种之日起即开始快速下降, 从24.343 mg/L下降到5.110 mg/L (20 d)。培养液中 Mg^{2+} 浓度过低, 可能会使细胞内相关酶活性降低, 从而影响细胞的生长及分裂, 致使进入衰老期后细胞开始衰老死亡, 物质再分解使培养液中 Mg^{2+} 浓度有所回升。所以培养后期的 Mg^{2+} 浓度不足也是影响细胞继续增殖的重要因素之一。

钙是植物细胞壁的重要组成成分, 其吸收过程存在被快速吸收(延迟期)和释放(对数生长期)现象(图8), 可能是因为继代培养后期的细胞处于“饥饿”状态, 接种后对 Ca^{2+} 产生快速的吸收, 由于延迟期的细胞没有发生快速分裂, 当膜内外达成电位平衡后, 没有被利用的 Ca^{2+} 即被释放出来, 致使对数生长期 Ca^{2+} 浓度又出现回升的现象。由于此时细胞开始快速增殖, 对于 Ca^{2+} 的

需求逐渐增加, 因此, 后期培养液中 Ca^{2+} 浓度又出现逐渐下降的趋势。在整个培养过程中, Ca^{2+} 浓度从55.89 mg/L减少到21.48 mg/L, 吸收利用了34.41 mg/L。说明在牛膝细胞培养过程中, 没有因为 Ca^{2+} 浓度不足从而影响细胞的正常增殖, 表明该培养液中的 Ca^{2+} 浓度基本可以满足细胞生长的需要。

3 结论与讨论

在植物细胞培养生产次生代谢产物的研究中, 培养物的生长规律和次生代谢物合成的规律, 对于提高次生代谢物的产量, 进行商业化生产具有重要意义^[15]。该研究确立牛膝细胞悬浮培养周期约为24 d, 经过24 d的悬浮培养, 最大生物量和齐墩果酸含量分别达到了13.47 mg/L和1.418 mg/g。牛膝悬浮细胞生长与三萜皂苷积累的动力学关系属于生长偶联型。

牛膝细胞培养浓度为1 g/30mL的接种量进行悬浮培养的前期, 培养液中就出现了碳源、氮、磷和钾的不足, 培养15 d后, 培养基中的蔗糖即消耗殆尽, 培养21 d后, 消耗了培养基中大量的氮源、磷源及 K^+ 和 Mg^{2+} , 培养液中的 Ca^{2+} 比较充足, 基本可以满足细胞生长的需要。培养液的pH值呈先下降后回升的趋势, 而电导率随细胞生长而逐渐减小, 24 d时降到最小, 而后又略有上升。在多数植物细胞培养过程中, 细胞并不是直接吸收蔗糖, 而是先将蔗糖水解成葡萄糖和果糖, 果糖转化成葡萄糖, 再被吸收^[18]。葡萄糖被细胞吸收后, 其中一部分可以转化成细胞壁等, 另一部分被细胞呼吸利用产生能量, 为细胞的其它生命活动提供能量。氮和磷主要用于合成细胞生长所需的结构蛋白和次生代谢途径中的一些酶。细胞衰老期时对氮和磷的吸收减少^[19]。该试验结果与李琰等^[20]的结论相似。磷代谢与糖代谢密切相关, 在细胞培养开始阶段, 细胞快速吸收磷, 并将其储藏在细胞中, 随着细胞的增殖, 逐渐被消耗, 当细胞培养进入稳定期时, 部分细胞开始凋亡, 细胞中的磷进入培养液中使 PO_4^{3-} 含量有所回升^[21]。

该研究结果表明, 牛膝细胞生长与营养物质消耗具有密切联系, 氮、磷、钾、镁和蔗糖均在牛膝细胞生长进入稳定期前消耗殆尽, 可以在牛膝细胞培养过程中采用分批添加营养成分的方法来延长牛膝细胞生长的对数期, 提高三萜皂苷的产量。如在细胞培养的第15天添加蔗糖, 第21天添加氮、磷、钾和镁, 以补充培养基中的营养成分, 并可缓冲培养液的pH值。

参考文献

- [1] 李金亭, 彭励, 胡正海, 等. 牛膝根的结构发育与三萜皂苷积累的关系[J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(4): 121-128.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 67-68.
- [3] LI J T, HU Z H, LI P, et al. Accumulation and dynamic trends of triter-

- penoid saponin in vegetative organs of *Achyranthes bidentata* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2009, 51(2): 122-129.
- [4] TEPE B, SOKMEN A. Production and optimisation of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures [J]. Nat Prod Res, 2007(21): 1133-1144.
- [5] 刘群, 李天祥, 李庆和, 等. 药用植物细胞悬浮培养产生次生代谢产物的研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(6): 375-377.
- [6] 薛建平, 石晶莹. 怀牛膝愈伤组织悬浮培养及其多糖含量的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(21): 2467-2469.
- [7] 李明军, 李萍, 赵喜亭. 怀牛膝细胞悬浮培养及多糖含量变化的研究 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(3): 494-500.
- [8] 李明军, 李萍, 张晓丽, 等. 培养基成分对怀牛膝愈伤组织诱导及牛膝多糖含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(7): 745-749.
- [9] 戴向辰. 长鞭红景天悬浮体系建立及反应器培养的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- [10] 北京环保监测中心. 水质总磷的测定(钼酸铵分光光度法): GBT11893-1989[S]. 北京: 中国北京标准出版社, 1989.
- [11] 环境保护部. 水质总氮的测定(碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法): HT636-2012[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
- [12] 方琦, 黄艳. 火焰原子吸收法测定地表水中钾钠钙镁的方法改进 [J]. 环境科学与技术, 2011, 6(31): 238-239.
- [13] 董教望, 叶和春, 吴新, 等. 新疆紫草细胞悬浮培养和发酵培养的研究 [J]. 植物学报, 1993, 35(1): 57-61.
- [14] 侯嵩生, 李新明, 李洪林. 九连小檗悬浮培养细胞生理生化特性的研究 [J]. 武汉植物学研究, 1995, 13(2): 163-166.
- [15] 范桂枝, 翟俏丽, 于海娣, 等. 白桦细胞悬浮培养产三萜及其营养成分消耗的动态 [J]. 林业科学, 2011, 47(1): 62-67.
- [16] 郭志刚, 都军, 刘瑞芝. 紫杉细胞生长过程与营养物质消耗的动态研究 [J]. 清华大学学报(自然科学版), 2002, 5(42): 599-602.
- [17] 陈志宏, 陈因良. 细胞培养工程 [M]. 上海: 华东化工学院出版社, 1992: 256-257.
- [18] 董杰, 詹亚光, 任健. 茶条槭悬浮培养的动力学 [J]. 林业科学, 2012, 10(48): 18-23.
- [19] SUN P, LI Y, YANG X J. Microwave technique extraction and determination of total flavonoids in *Cistanche deserticola* [J]. Resand Practice of Chin Med, 2003, 2(6): 28-29.
- [20] 李琰, 杨钰琪, 冯俊涛, 等. 离体条件下雷公藤不定根生长与营养成分消耗动态研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(11): 134-138.
- [21] LIU C Z, GUO C, WANG Y C. Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. [J]. Process Biochemistry, 2002, 7(38): 581-585.

Kinetics in Suspension Cell Culture of *Achyranthes bidentata* Bl.

LI Jinting¹, GUO Xiaoshuang¹, WANG Zhaoyang², HAN Xueping¹, ZHOU Zhiqiang¹, ZHU Kaili¹

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University/Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, Xinxiang, Henan 453007; 2. Chinese Drugs Development Office in Nanzhao County, Nanyang, Henan 474650)

Abstract: Taking the cell culture of *Achyranthes bidentata* Bl. as material, using HPLC, atomic absorption spectrometry method and conductivity measurement, the kinetic relationships of suspension cell growth, triterpenoid saponins production and nutrient consumption were analyzed. The results showed the suspension cell culture cycle lasted about 24 days by which the maximum biomass in dry weight and the oleanolic acid content reached to 13.47 mg/L and 1.418 mg/g. The kinetics analysis for suspension cell culture of *A. bidentata* Bl. showed that triterpenoid saponins production was increasing with the cell growth during a cell subculture cycle. The electrical conductivity of the culture medium gradually descended during culture procedure, reached to the lowest point on the 24th day, and then slightly increased. The pH value declined and then increased. After 15 days of the cell culture, sucrose were consumed in culture medium. The large amounts of nitrogen, phosphate, K⁺ and Mg²⁺ were consumed on the 21st days. Compared with K⁺, Ca²⁺ could meet the needs of the cell growth. The results suggested that the nutrient deficiencies in medium would limite the cell rapid multiplication and triterpenoid saponins content accumulation.

Keywords: *Achyranthes bidentata* Bl.; suspension cell; cell growth; oleanolic acid