

不同营养因子对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物形成的影响

方德秋 侯嵩生 李新明

叶和春 李国凤

(中国科学院武汉植物研究所 武汉 430074)

(中国科学院植物研究所 北京 100044)

提 要 报道了不同碳源、维生素、氨基酸、钙盐及肌醇对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物形成的影响。蔗糖是最适碳源、最佳浓度为3%。B族维生素对细胞生长及紫草宁衍生物形成的促进效果不大。酪氨酸以及甘氨酸会抑制产物的形成;而 10^{-5} mol/l的L-苯丙氨酸以及 10^{-7} — 10^{-6} mol/l维生素C可明显提高紫草宁衍生物的含量及产量。肌醇对细胞生长的影响不大,但200mg/l肌醇可促进产物的形成。适于细胞生长及紫草宁衍生物形成的钙源分别为332mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和1400mg/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。文末列出了改良的生长培养基及其配方。

关键词 新疆紫草,细胞悬浮培养,细胞生长,紫草宁衍生物,营养因子

紫草色素为紫草植物根部的萘醌类化合物,主成分为紫草宁及其衍生物。它们具有显著的抗菌、抗炎、抗生育等生理活性。目前应用的几个主要属、种中以新疆紫草(*Arnebia euchroma*)的临床药效最佳^[1]。近年来,由于过量的挖掘,加之环境的恶化及引种栽培困难,致使紫草资源迅速减少。因此,人们试图通过细胞培养方法来生产紫草色素。Tabata^[2]于70年代诱导获得了硬紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)愈伤组织;Mizukami等^[3,4]则研究了影响愈伤组织生长及紫草色素形成的营养因子,并进行了优良细胞株的筛选。Fujita等^[5]进一步优化了细胞悬浮培养条件,获得了适于紫草色素形成的M-9培养基。国内周立刚^[6]、朱汝幸等^[7]分别诱导得到了滇紫草(*Onosma paniculata*)愈伤组织。李国凤等^[8]则成功地获得了新疆紫草愈伤组织,并鉴定出其中含有与原植物基本一致的色素成分;叶和春等^[9]进一步研究了不同理化因子对愈伤组织生长及紫草色素形成的影响。但是,迄今尚未见任何有关碳源、维生素或氨基酸对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草衍生物形成的影响方面的报道。而悬浮培养则是走向工业化发酵培养的关键步骤。为此,本试验进行了这方面的研究,摸索出了适于新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物形成的培养基,为以后的工业化生产打下了基础。

1 试验材料及方法

1.1 试验材料

供试新疆紫草愈伤组织系由中国科学院植物研究所提供的高产细胞系A-1。

本文于1992年8月24日收到,同年12月4日收到修改稿

1.2 培养基

生长培养基为改良的 LS^[10]培养基。即将 LS 中的 NH_4NO_3 为改 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 463mg/l KNO_3 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 以及 KH_2PO_4 的含量分别改为 2830mg、166mg、185mg 和 400mg/l。附加 1.0mg/l IAA 和 0.5mg/l KT, pH5.6。生产培养基为 M-9 培养基^[6],附加 0.1mg/l KT 和 0.75mg/l IAA, pH5.6。灭菌前,在培养基中加入不同的营养成分,之后在 120℃ 下灭菌 15 分钟。

1.3 培养方法

将生长旺盛的愈伤组织接入到液体生长培养基中培养 3 代(每代 14 天)。之后,将细胞分别接种至不同的培养基中,在生长培养基中的接种量为 5g 鲜重/瓶(250ml 三角瓶,内盛 70ml 培养基),而在生产培养基中的接种量则为 10g/瓶。在 20—25℃、黑暗条件下进行培养,摇床转速为 100—110rpm,重复 3 次。

试验用反应器为本室设计、制造的内循环式气升式反应器。总体积为 9 升,工作体积为 6 升。接种量为 250g 鲜细胞,在生长培养基中培养,通气率为 0.25vvm。

1.4 细胞生物量及紫草宁衍生物含量的测定

在生长培养基中培养 16 天,或在生产培养基中培养了 23 天后,收获细胞。用 40 目筛过滤,收取细胞,称鲜重。后在 60℃ 下烘至恒重,称干重,碾碎。根据叶和春等^[9]所述方法测定干细胞中紫草宁衍生物的含量。

2 结果与讨论

2.1 不同碳源对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物形成的影响

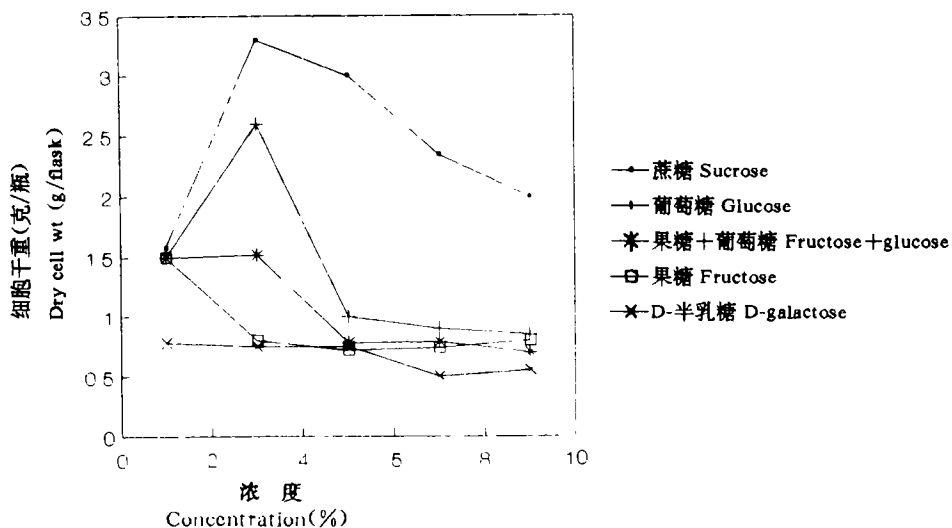


图1 不同碳源对新疆紫草悬浮培养细胞生长的影响(生长培养基)

Fig. 1 Effect of carbohydrates of the cell growth in suspension cultures of *A. euchroma* cells (growth medium)

Ikeda^[11]等报道,在低蔗糖浓度下,烟草悬浮培养细胞中泛醌含量较高,而 Zenk^[12]则报道最适于海巴戟细胞中蒽醌积累的蔗糖浓度高达 7%。Mizukami^[3]在进行硬紫草愈伤组织培养时,认为蔗糖是最适碳源,浓度为 3%。周立刚^[6]的研究表明 6% 葡萄糖有利于滇

紫草中紫草色素的合成。为了确定适于新疆紫草细胞生长及紫草宁衍生物形成的碳源及浓度,我们研究了 4 种碳源的影响,结果见图 1 及表 1。图 1 结果表明,蔗糖是最适于细胞生长的碳源,浓度为 3%。从表 1 中可见,D-半乳糖、高浓度(9%)及低浓度(1%)的其余糖类严重抑制细胞生长及紫草宁衍生物的形成。综合比较研究表明,3%蔗糖是适于新疆紫草细胞中紫草色素含量及产量提高的碳源及浓度。

表 1 不同碳源对新疆紫草悬浮培养细胞中紫草宁衍生物形成的影响(生产培养基)

Table 1 Effect of carbohydrates on shikonin derivative formation in suspension cultures of *A. euchroma* cells (Production medium)

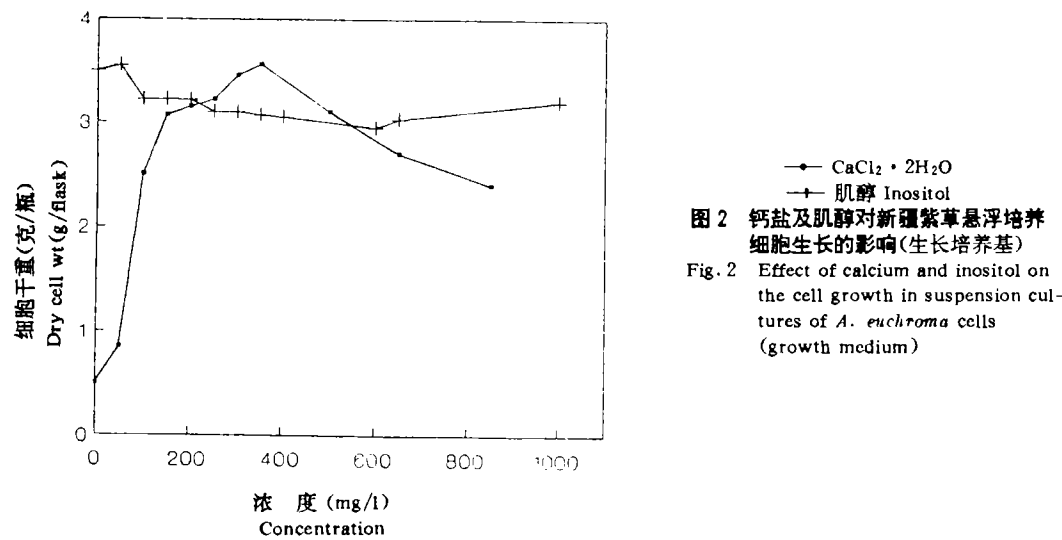
浓度 Concentration (%)	蔗糖		葡萄糖		果糖		果糖+葡萄糖**		D-半乳糖	
	Sucrose		Glucose		Fructose		Fruc. + Gluc.		D-galactose	
	PC	PY	PC	PY	PC	PY	PC	PY	PC	PY
1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3	17.52	170.32	12.12	139.08	14.24	153.90	15.48	142.58	*	*
5	14.21	137.15	9.46	98.51	12.18	106.12	10.34	116.80	*	*
7	11.13	113.40	6.44	81.52	*	*	*	*	*	*
9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* 细胞褐化死亡,色素含量低于 0.5%; ** 等比例加入,例如总浓度为 3%时,则二者的浓度各为 1.5%
* Cells died and pigment content lower than 0.5%; PC=色素含量(Pigment content (%DW)); PY=色素产量(Pigment yield (mg/flask));
** Equal amount, eg, when total concentration is 3%, the conc. of fructose and glucose will be 1.5% respectively

2.2 不同营养成分对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物形成的影响

2.2.1 钙盐及肌醇

Mizukami^[3]报道认为,当 CaCl₂ 的浓度高达 120mg/l 时,硬紫草愈伤组织生长显著下降,色素形成受抑制。本研究结果与此不同。图 2 结果表明,当无 Ca²⁺存在时,新疆紫草



细胞褐化死亡。在低浓度下,细胞生长随 Ca^{2+} 浓度增加而增加,当达 332mg/l 时,细胞鲜重最多。此时若再提高 Ca^{2+} 浓度,则生长量下降。肌醇对细胞生长的影响不大,高浓度时对细胞生长有轻微的抑制作用(图 2)。

在生产培养基中,如果没有钙盐,则细胞死亡(表 2)。钙离子浓度过高或过低,皆不利于紫草色素含量及产量的提高。当 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的含量为 1400mg/l 时,色素含量及产量分别达 18.24% 和 184.25mg/瓶 。在 M-9 原配方中,没有肌醇,但表 2 结果表明, 200mg/l 肌醇可促进紫草色素的形成。

表 2 钙盐及肌醇对新疆紫草悬浮培养细胞中紫草宁衍生物形成的影响(生产培养基)

Table 2 Effect of calcium and inositol on shikonin derivative formation in suspension cultures of *A. euchroma* cells (production medium)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$			肌醇 Inositol		
浓度(mg/l)	色素含量	色素产量	浓度(mg/l)	色素含量	色素产量
Concentration	PC	PY	Concentration	PC	PY
0	*	*	10	13.6	136.96
70	5.6	59.4	100	15.1	153.98
700	16.16	162.18	200	16.9	186.86
1400	18.24	184.25	500	12.6	140.28
3500	16.50	172.11	1000	11.1	123.49
7000	14.50	150.36			

* 细胞褐化死亡,色素含量低于 0.5%
* Cells died and pigment content lower than 0.5%;PC=pigment content, PY=pigment yield

表 3 不同氨基酸对新疆紫草悬浮培养细胞中紫草宁衍生物形成的影响(生产培养基)

Table 3 Effect of amino acids on shikonin derivative formation in suspension cultures of *A. euchroma* cells (production medium)

L-苯丙氨酸			酪氨酸			甘氨酸		
L-phenylalanine			Tyrosine			Glycine		
浓度(mol/l)	PC	PY	浓度(mol/l)	PC	PY	浓度(mol/l)	PC	PY
Concentration			Concentration			Concentration		
0	16.16	162.18				4×10^{-5}	15.62	148.00
10^{-6}	18.20	189.42				2×10^{-4}	16.41	164.84
10^{-5}	19.24	205.07	10^{-5}	15.41	157.95	4×10^{-4}	14.83	133.47
10^{-4}	17.31	155.35	10^{-4}	14.92	143.32	1.2×10^{-3}	16.00	133.44
10^{-3}	14.50	149.80	10^{-3}	11.00	110.07	4×10^{-3}	14.74	144.82
10^{-2}	6.10	73.20	10^{-2}	*	*			
10^{-1}	4.21	41.57	10^{-1}	*	*			

* 细胞褐化死亡,色素含量低于 0.5%
* Cells died and pigment content lower than 0.5%;PC=pigment content, PY=pigment yield

2.2.2 氨基酸

Lutz Heide^[13]研究表明,紫草宁及其衍生物的前体是苯丙氨酸。因此,研究者们曾设计在培养基中加入苯丙氨酸,从而提高细胞中产物的含量。Mizukami^[3]报道认为, 10^{-3}mol/l 苯丙氨酸可显著提高硬紫草愈伤组织中的色素含量。本研究结果表明(表 3),

在培养基中加入 10^{-5}mol/l L-苯丙氨酸可明显提高新疆紫草细胞的色素含量及产量,但更高的浓度则会抑制产物的形成。酪氨酸以及甘氨酸既抑制了细胞生长也阻碍了紫草色素的形成,其中酪氨酸的抑制作用尤甚。

2. 2. 3 维生素

与前述营养物质不同,有关维生素对次生物质形成的影响方面的报道不多。Matsumoto^[3]曾报道,VB₂ 可促进光照条件下白杨悬浮培养细胞中花青苷的形成。Tabata 等^[2]、叶和春等^[9]的研究认为,光几乎完全抑制紫草色素的形成。本研究发现,在培养基中加入 10^{-5}mol/l 维生素 B₂,并连续光照,细胞生长正常,虽然紫草色素含量很低,但不表现为痕量(表 4)。这表明,VB₂ 可部分消除光对紫草色素的抑制作用。从表 4 中还可看出,VB₁、VB₂ 及 VB₆ 虽对紫草色素的形成有一定的促进作用,但效果不明显。低浓度的维生素 C 则可促进紫草色素的形成及产量的提高,浓度为 10^{-7}mol/l 。

表 4 不同维生素对新疆紫草悬浮培养细胞中紫草宁衍生物形成的影响(生产培养基)

Table 4 Effect of vitamins on shikonin derivative formation in suspension cultures of *A. euchroma* cells (production medium)

浓度(mol/l) Concentration	VB ₁		VB ₂		VB ₆		V _c	
	PC	PY	PC	PY	PC	PY	PC	PY
0	16. 16	162. 18						
10^{-7}	16. 2	167. 95	15. 2	156. 4	16. 5	171. 37	19. 1	211. 24
10^{-8}	14. 3	144. 34	14. 3	162. 72	17. 2	138. 05	17. 89	192. 20
10^{-6}	16. 8	163. 13	14. 5	151. 59	15. 0	163. 00	17. 2	184. 37
10^{-4}	14. 2	153. 45	17. 4	159. 94	12. 2	127. 49	14. 2	124. 31
10^{-3}	10. 6	124. 90	16. 5	171. 67	11. 4	116. 72	13. 3	138. 94
10^{-5}a			9. 6	89. 41				

PC=pigment content, PY=pigment yield

a:连续光照(Exposure to light)

总之,在生长培养基中,加入 332mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 有利于细胞生长。原 LS 培养基中的肌醇可略去。在生产培养基中加入 10^{-5}mol/l L-苯丙氨酸、 10^{-7}mol/l 维生素 C、 1400mg/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 以及 200mg/l 肌醇有利于紫草色素的形成。

2. 3 改良的生长及生产培养基

通过前文^[14]及本试验的研究,我们对 LS 及 M-9 培养基进行了改良,获得了适于新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物形成的改良生长培养基(G-1)和生产培养基(P-1),配方见表 5。

为研究 G-1 以及 P-1 培养基的效果,本试验分别用摇瓶及 9L 气升式反应器进行了比较研究,结果见表 6。在 G-1 培养基中培养时,细胞鲜嫩,生长旺盛,其生长量显著大于在 LS 培养基中培养的。在细胞生长量方面,P-1 培养基与 M-9 的差异不大,但前者更有利于紫草色素的形成。

表 5 LS、G-1、M-9 及 P-1 培养基组成(mg/l)

Table 5 Components of LS,G-1,M-9 and P-1 media(mg/l)

	LS	G-1	M-9	P-1
NH ₄ NO ₃	1650	—	—	—
KNO ₃	1900	2830	80	80
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	463	—	—
C ₄ (NO ₃) ₂ · H ₂ O	—	—	694	1400
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	332	—	—
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	185	750	750
KH ₂ PO ₄	170	400	—	—
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	—	—	19	19
KCl	—	—	65	65
Na ₂ SO ₄	—	—	1480	1480
NaFe—EDTA	a	a	1.8	a
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	22.3	—	—
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	8.6	3	3
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	4.5	4.5
KI	0.83	0.83	—	—
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25	—	—
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025	0.3	0.3
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025	—	—
Inositol	100	—	—	200
Thiamine · HCl	0.4	1.6	—	—
Vitamine C	—	—	—	0.0176
L-phenylalanine	—	—	—	1.65
IAA	—	1.0	—	0.75
KT	—	0.5	—	0.10
Sucrose	30000	30000	30000	30000
pH	5.8	5.6	5.8	5.6

a:FeSO₄ · 7H₂O 27.8mg/l+Na₂EDTA 37.3mg/l

表 6 培养基类型对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草衍生物形成的影响

Table 5 Effect of medium types on the cell growth and shikonin derivative formation in suspension cultures of *A. euchroma* cells

培养基 Media	细胞干重 Dry cell weight		色素含量(%干重)	色素产量(mg/瓶)
	摇瓶(g/瓶)	9L 反应器	Pigment content	Pigment yield
	Flask (g/flask)	9L bioreactor (g)	(% dry wt)	(mg/flask)
LS	2.21	104.52		
G-1	3.53*	147.42		
M-9	2.75		16.24	164.74
P-1	2.90		19.76	216.59

* p=0.05

参 考 文 献

1 高菊红. 紫草的资源、化学、药理和临床研究概况 中草药,1988,17(6):268—271
2 Tabata M, Mizukami H, Hiraoka N et al. Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Phytochem, 1974, 13:927—932

- 3 Mizukami H, Konoshima M, Tabata M. Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. *Phytochem*, 1977, 16:1183-1186
- 4 Mizukami H, Konoshima M, Tabata M. Variation in pigment production in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. *Phytochem*, 1978, 17:95-97
- 5 Fujita Y, Hara Y, Ugino T et al. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Report*, 1981, (1):59-63
- 6 周立刚, 郑光植, 王世林. 滇紫草愈伤组织培养与紫草素产生. *云南植物研究*, 1991, 13(3):315-320
- 7 朱汝幸, 曹日强, 王曼丝等. 滇紫草愈伤组织中的紫草色素. *植物学报*, 1990, 32(10):749-753
- 8 李国凤, 伍正蓉, 叶和春等. 离体培养的新疆紫草萘醌色素的诱导形成. *植物学通报*, 1988, 5:84-86
- 9 叶和春, 尹作鸿, 李国凤等. 不同理化因子对新疆紫草愈伤组织生长及紫草宁衍生物合成的影响. *植物学报*, 1991, 33(12):927-931
- 10 Linsmaier E M, Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1965, 18:100-127
- 11 Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M. Studies on the culture conditions of higher plant cells in suspension culture. part VIII: effects of nutritional factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. *Agric Biol Chem*, 1976, 40:1765-1770
- 12 Lutz Heide, Nishioka N, Fukui H et al. Enzymatic regulation of shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Phytochem*, 1989, 28(7):1873-1877
- 13 Zenk M H, El-Shangi H, Schulte U. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica*, 1975, Suppl:79-101
- 14 方德秋, 侯嵩生, 李新明等. pH 值、激素对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物合成的影响. *武汉植物学研究*, 1994, 12(2):159-164

EFFECT OF NUTRITIONAL FACTORS ON CELL GROWTH AND SHIKONIN DERIVATIVE FORMATION IN SUSPENSION CULTURES OF *ARNEBIA EUCHROMA* CELLS

Fang Deqiu Hou Songsheng Li Xingming

Ye Hechun Li Guofeng

(Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy
of Sciences Wuhan 430074)

(Institute of Botany, The Chinese Academy
of Sciences Beijing 100044)

Abstract A study on the effect of carbohydrates, vitamins, amino acids, calcium and inositol on the cell growth and shikonin derivative formation in suspension cultures of *Arnebia euchroma* cells was carried out. Sucrose is better than any other carbohydrates tested for cell growth and pigment formation, and the optimum concentration is 3%. Neither vitamin B₂ nor vitamin B₆ is effective for shikonin derivative formation, but vitamin B₁ can promote cell growth. Both tyrosine and glycine retard the formation of shikonin derivatives, however, 10⁻⁵ mol/l L-phenylalanine and 10⁻⁷ — 10⁻⁶ mol/l vitamin C stimulate their biosynthesis. Although inositol has no effect on cell growth, 200mg/l inositol can increase pigment content. The optimal concentration of calcium salts for cell growth and shikonin derivative formation are 332mg/l CaCl₂ · 2H₂O and 1400mg/l Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, respectively. The better "growth medium" and "production medium" have been developed and listed in the present paper.

Key words *Arnebia euchroma*, Cell suspension culture, Cell growth, Shikonin derivatives, Nutritional factors