

培养基及其组成对水母雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响

赵德修 李茂寅

(中国科学院植物研究所 北京 100093)

摘 要 8 种不同的基本培养基对水母雪莲(*Saussurea medusa*)细胞生长和黄酮形成的影响不同。实验结果表明, MS 培养基较有利于细胞生长和黄酮形成。从 MS 培养基修饰得到的 MG 和 MP 培养基比前者细胞生长量与黄酮产量分别提高 32% 和 70%。碳源、氮源、植物激素对细胞生长及黄酮形成的影响较为明显。用 HPLC 对细胞培养物中两种有效黄酮(Jaceosidin 和 Hispidulin)作了定性定量分析。

关键词 水母雪莲 悬浮培养 培养基 黄酮

分类号 Q947.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)01-0099-04

水母雪莲(*Saussurea medusa* Maxim)为菊科(Compositae)风毛菊属雪兔子亚属植物,分布于我国青海、甘肃、西藏等地,是我国高山地区常用的一种名贵药材^[1]。

雪莲含多种有效提取物,其中黄酮为主要成分,如用来治疗偏瘫的雪莲动脉丸^[2]和雪莲注射液^[3],都是以黄酮含量为质量标准的,以及 4',5,7-三羟基-3',6-二甲氧基(Jaceosidin)和 4',5,7-三羟基-6-甲氧基(Hispidulin)黄酮对治疗腹水型肝癌、消除自由基、抗疲劳有良好效果^[4]。本文对水母雪莲细胞悬浮培养条件下,不同基本培养基及其组分以细胞生长和黄酮形成的影响作了调查,这对提高水母雪莲细胞培养物中有效成分产率,实现大规模生产具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

采用本实验室筛选得到的水母雪莲(*Saussurea medusa*)红色细胞系^[5]。

1.2 培养方法

水母雪莲悬浮细胞在 25℃ ± 1℃ 下培养,40W 白色荧光灯连续光照,辐照强度为 60 μmol·m⁻²·s⁻¹。摇床转速为 90r/min。接种量为鲜重 30g/L。2.1 中的各种基本培养基均添加 BA 0.5 mg/L, NAA 2 mg/L。在对 MS 基本培养基修饰实验中,一旦得到一个较理想的组分浓度后,就开始使用,并对下一个

组分的浓度作调查。

1.3 培养细胞生长测定

参考文献 5]

1.4 培养细胞中黄酮含量测定的紫外分光光度法、2 种有效黄酮的高压液相色谱法

参考文献 5]

2 结果与讨论

2.1 基本培养基对水母雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响

不同种类的基本培养基对植物培养细胞生长和次生产物的形成有很大的影响^[6]。为了探索不同基本培养基对雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮形成的影响,我们选择了 8 种基本培养基:White(W)、Nitsch(N)、B₅(B)、MS、Miller(M)、T、H 培养基^[7]和 FPM 培养基^[8],其余 3 种培养基的组成见表 1。测定了对雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响。

实验结果见图 1,MS 培养基不仅最有利于细胞生长,也最有利于黄酮的形成。依次是 Miller、T、H 培养基。较差的分别是 White、Nitsch、B₅、FPM 培养基。从 8 种培养基的成分组成中可以看出,后 4 种培养基其成分不含 NH₄NO₃。实验结果表明,硝酸氨的浓度与黄酮含量虽并非绝对的相关性,但含高浓度的 NH₄NO₃ 培养基较适合于雪莲细胞生长及黄酮形成。

表 1 MS、MP、MG 三种培养基成分

Table 1 Compositions of MS, MP, MG media

Composition	MS/(mg/L)	MP/(mg/L)	MG/(mg/L)
H ₄ NO ₃	1 650	800	800
KNO ₃	1 900	1000	1000
H ₂ PO ₄	170	170	340
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	370
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	220	110
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	13.7	27.85
Na ₂ -EDTA	37.25	18.5	37.25
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	22.3	11.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	10	—
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2
KI	0.83	—	—
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.2	0.1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	—	0.013
Sucrose	30000	45000	30000
Glucose	—	15000	10000
Glycine	2	1	1
Thiamine·HCl	0.4	0.4	0.4
Nicotinic acid	0.5	0.5	—
Inositol	100	100	100
pH	5.8	5.8	5.8

Note: MP (production medium) and MG (growth medium) were obtained from MS medium.

基提高 32% 和 70%。从表 1 中可以看到, MP、MG 培养基的 N、C 离子浓度与 MS 培养基有明显差别。

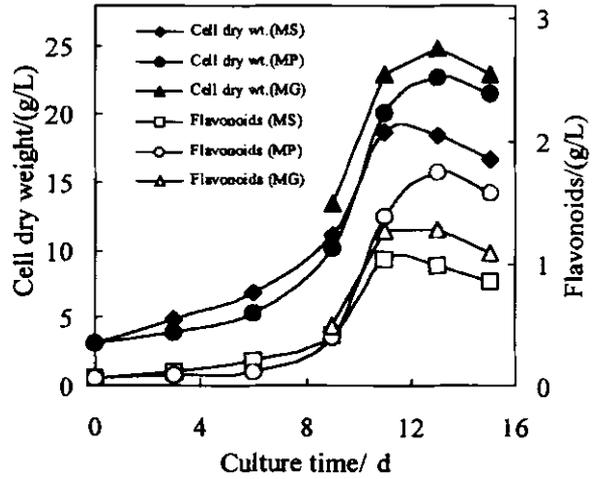


图 2 水母雪莲悬浮培养细胞在 MS、MG 和 MP 培养基中细胞生长及黄酮形成动态

Fig. 2 Time-course of cell growth and flavonoids production in suspension culture of *S. medusa* at MS, MG and MP media

2.2 MS 培养基中无机成分对水母雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响

用 MS 培养基分别对钙盐、EDTA 铁盐等 11 种无机成分的浓度作了调查。如图 3 所示, 当钙盐浓度为 1.5 mmol/L 时, 细胞生长量和黄酮产量分别为 19.66 g/L 和 1.117 g/L。但随钙盐浓度的提高, 细胞生长量和黄酮的产量不断下降。因此, 钙盐浓度为 1.5 mmol/L 可代替原来的 3 mmol/L。从图 4 中可以看出, 当 EDTA 铁盐浓度为 0.05 mmol/L 时较适合于黄酮的形成, 但铁盐浓度为 0.1 mmol/L

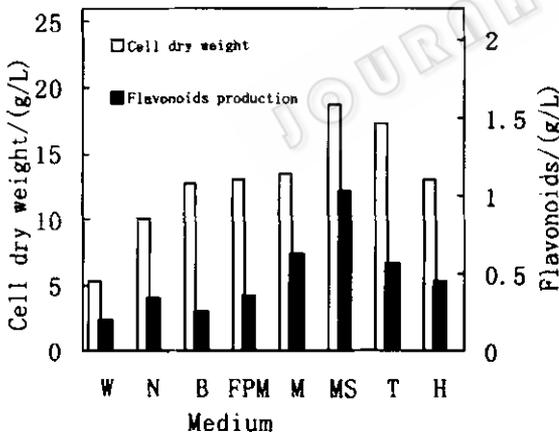


图 1 不同基本培养基对水母雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响

Fig. 1 Effects of different basic media on cell growth and favonoids production suspension culture of *S. medusa*

图 2 中 MG、MP、MS 三种不同的培养基对细胞生长及黄酮形成的影响存在着差异。MG 培养基细胞生长速率快, 而糖浓度低, 可降低生产成本。MP 培养基细胞中黄酮含量高, 可提高产物生产率。2 种新的培养基其细胞生长量和黄酮产量比 MS 培养

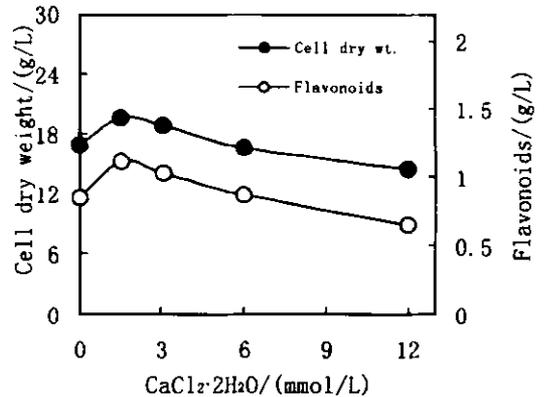


图 3 钙盐对水母雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响

Fig. 3 Effects of the concentration of CaCl₂ on cell growth and flavonoids production in suspension cultures of *S. medusa*

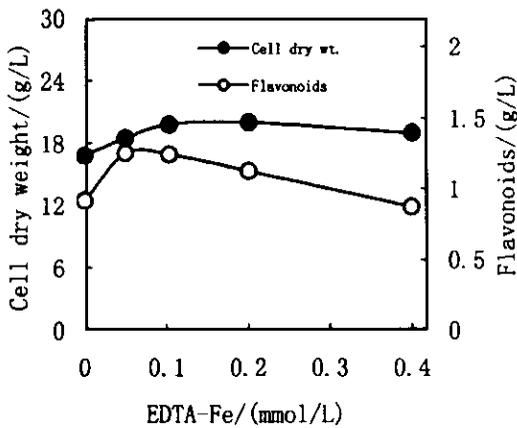


图4 EDTA 铁盐对水母雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响

Fig. 4 Effects of the concentration of EDTA-Fe on cell growth and flavonoids production in suspension cultures of *S. medusa*

时较适合于细胞的生长。

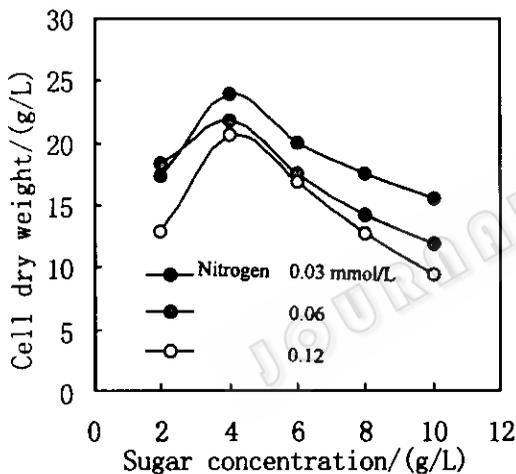


图5 碳源与氮源的不同比例对水母雪莲悬浮培养细胞生长的影响

Fig. 5 Effects of sugar and inorganic nitrogen concentration on the cell growth in suspension cultures of *S. medusa*

The ratio of ammonium to nitrate was 1:2(mol: mol)in the inorganic nitrogen source, and the ratio of sucrose to glucose was 3:1(g:g)in the sugar source.

2.3 MS培养基中有机成分对水母雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响

曾有研究者发现,碳源与氮源的不同比例影响 *Vitis* 悬浮培养细胞生长和花色素形成^[9]。因此,我们用 MS 培养基的碳源与氮源不同比例对雪莲细胞生长和黄酮形成的影响作了调查。如图 5, 6 所示,当总氮浓度为 0.03 mg/L 与糖浓度为 40 g/L 时的组合,对细胞生长较为有利;而与糖浓度为 60 g/L 时的组合,对细胞中黄酮的形成较为有利,其黄酮产量为 1.7 g/L。由此看出适合于雪莲细胞生长和黄酮形成的碳源、氮源组合不在一定比例的范围。

2.4 植物激素对水母雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响

Meyer^[10]发现,生长素影响 *Oxalis linearis* 培养细胞生长和花色苷形成。生长素对水母雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮形成也有很大影响。如表 2 所示,用 BA 浓度为 0.1 mg/L 与不同浓度的 2, 4-D 组

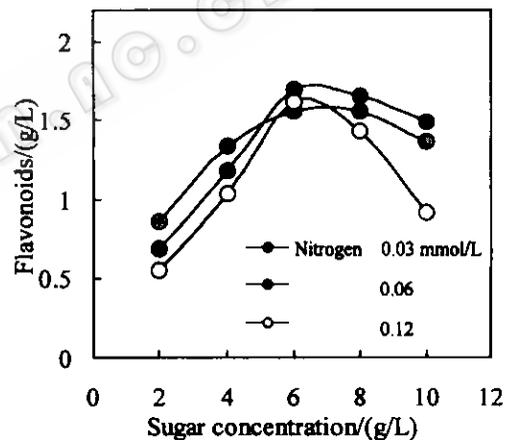


图6 碳源与氮源的不同比例对水母雪莲悬浮培养细胞黄酮形成的影响

Fig. 6 Effects of sugar and inorganic nitrogen concentration on the flavonoids production in suspension cultures of *S. medusa*

表2 2,4-D、NAA 和 BA 对水母雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响*
Table 2 Effects of combination of BA 2,4-D and NAA on cell growth and flavonoids production in suspension cultures of *S. medusa*

2,4-D/(mg/L)	NAA/(mg/L)	Cell dry weight/(g/L)	Flavonoids/(%)	Flavonoids/(g/L)
0.01	0.00	18.21 ± 0.52	2.10 ± 0.09	0.38
0.10	0.00	9.65 ± 0.35	0.24 ± 0.02	0.02
1.00	0.00	6.94 ± 0.19	0.23 ± 0.01	0.02
0.00	0.01	8.75 ± 0.44	2.75 ± 0.21	0.24
0.00	0.10	18.35 ± 1.04	2.85 ± 0.09	0.34
0.00	1.00	18.69 ± 1.20	4.03 ± 0.12	0.75

* BA 0.1mg/L.

表 3 NAA 和 BA 组合对水母雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响

Table 3 Effect of combinations of NAA with BA on cell growth and flavonoids production in suspension cultures of *S. medusa*

NAA/(mg/L)	BA/(mg/L)					
	0.1		0.5		1.0	
	A*	B*	A	B	A	B
1.0	18.88±1.20	0.76±0.12	19.53±0.69	1.22±0.19	20.90±0.73	1.20±0.23
2.0	19.87±0.80	1.12±0.26	24.80±1.05	1.75±0.31	25.62±1.11	1.56±0.23
3.0	19.78±0.56	0.79±0.11	23.20±0.66	1.43±0.24	22.07±0.75	0.89±0.13

* :A Cell dry wt/(g/L) ;B Flavonoids/(mg/L)

合发现,随着 2,4-D 浓度的升高,细胞生长和黄酮形成受到抑制;而 NAA 的作用正好相反,随着 NAA 浓度的升高,细胞生长量和黄酮产量有所增加。进一步作不同浓度的 NAA 与 BA 组合实验(表 3),结果表明:NAA2.00 mg/L 与 BA1.00 mg/L 组合细胞生长率最高,达到 25.62 g(dwt)/L,适合细胞中黄酮形成的激素组合为 NAA2.00 mg/L 与 BA0.5mg/L,达到 1.75 g/L。

2.5 培养物中活性产物分析

HPLC 对培养物中 Jaceosidin 和 Hispidiulin 黄酮的定量定性分析表明,3 种不同培养基条件下,水母雪莲培养细胞中抗癌黄酮成分 Jaceosidin、Hispidiulin 的含量分别占黄酮的 20%~24% 和 0.0%~0.16%。培养基不同,2 种黄酮单体在黄酮中所占的比例差异不大。

致谢 标准品由兰州大学化学系贾忠建教授提供,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 李观海,刘发,赵荣春.药学报,1980,15:368~370
- [2] 梁文生,柴进.江苏中药,1996,17(1):14
- [3] 王本富,路杰,关家彦.中国药学杂志,1996,31(5):299~30
- [4] 韩书亮.癌变·畸变·突变,1995,7:80~83
- [5] 赵德修,乔传令,汪沂.植物学报,1998,40:515~520
- [6] Fujita Y, Hara C, Suga C *et al.* Plant Cell Rep, 1981, 1:61~63
- [7] 孙敬三,桂耀林.植物细胞工程实验技术,北京:科学出版社,1995,pp.403~408
- [8] Yamakawa T, Kato S, Ishida K *et al.* Agric Biol Chem, 1983, 47(10):2185~2191
- [9] Meyer H, Staden J, Van. J Plant Cell Tissue Organ Cult, 1995, 40:55~58

Effects of Media on the Production of Flavonoids by Suspension Cultures of *Saussurea medusa*

ZHAO De-xiu Li Mao-yin

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

Abstract Flavonoids were produced from cell suspension cultures of *Saussurea medusa*. The results of studies on eight types of culture media showed that the MS medium was the best for cell growth and flavonoids formation. We investigated the effects of all the components of MS medium on the cell growth and flavonoids production and found that carbon, nitrogen and phytohormone had especially marked effects. With MG medium a modified MS medium, the yield of cell growth was 24.8 g(dwt)/L, with MP medium another modified MS medium, the yield of flavonoids production was 1.75 g/L. The yield of cell growth and flavonoids production in MG and MP medium were 32% and 70% higher than that in MS medium respectively.

Key words *Saussurea medusa*, suspension culture, cultured medium, flavonoids