

露水草的根培养和 β -蜕皮激素的形成*

周立刚** 杨崇仁⁺

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 用加 NAA 和 BAP 的 MS 培养基, 从露水草 (*Cyanotis arachnoidea*) 根、茎和叶的外植体诱导出根, 并用升液式生物反应器成功地进行放大规模培养。胆甾醇和法呢醇对培养根的生长无明显影响, 但胆甾醇能促进 β -蜕皮激素的合成。

关键词 露水草, β -蜕皮激素, 根培养物, 次生代谢

ROOT CULTURE AND β -ECDYSONE FORMATION OF CYANOTIS ARACHNOIDEA

ZHOU Li-Gang, YANG Chong-Ren⁺

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)

Abstract The cultured roots have been induced from explants of stems, leaves and roots of *Cyanotis arachnoidea* using MS medium complemented with NAA and BAP. A liquid-lift bioreactor with 2600 mL volume was tested for the root cultivation. It is noticed that farnesol and cholesterol have no obvious effect on the root growth. But β -ecdysone synthesis was stimulated by cholesterol with an appropriate concentration.

Key words *Cyanotis arachnoidea*, β -ecdysone, Root cultures, Secondary metabolism

露水草 (*Cyanotis arachnoidea*) 系鸭跖草科 (Commelinaceae) 蓝耳草属多年生草本植物, 富含蜕皮甾酮类化合物 (ecdysterones), 是提取 β -蜕皮激素 (β -ecdysone, 或称 20-hydroxyecdysone) 的理想原料 (聂瑞麟等, 1978)。通过植物生物技术化学研究, 探讨该植物中 β -蜕皮激素形成的规律, 不仅可为植物中蜕皮甾酮类化合物的生物转化和生物合成研究奠定基础, 也将有可能为 β -蜕皮激素的来源提供新的途径, 使露水草植物资源得到合理的利用。

本文报道从露水草根、茎、叶外植体 (explants) 诱导形成正常根及其培养, 讨论前体化合物法呢醇和胆甾醇的加入对培养根中 β -蜕皮激素形成的影响。

材料和方法

植物材料和培养条件

露水草种子采自云南, 种子在无菌条件下发芽, 从根、茎、叶外植体诱导形成根, 诱导条件见结果部

*国家自然科学基金资助课题 (29272071)

**现为华中理工大学 95 级博士研究生, ⁺通讯联系人 Author to whom correspondence should be addressed

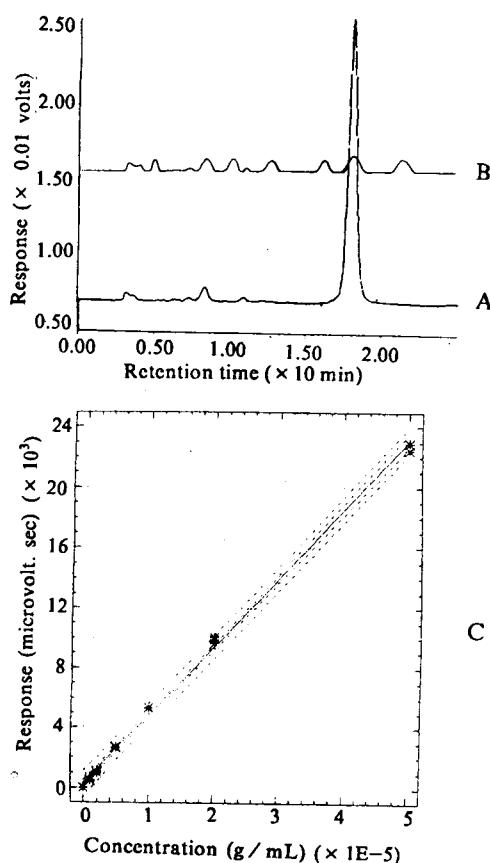


图 1 β -蜕皮激素的 HPLC 分析。标准品 (A)、培养根提取物 (B)、标准曲线 (C)

Fig. 1 HPLC analysis of β -ecdysone. (A) standard of β -ecdysone, (B) cultured root extracts, (C) calibration curve

HPTLC 高效薄层层析采用 60F254 硅胶板 (Merck), 展开剂为醋酸乙酯-甲醇-二氯甲烷 (75/20/5, v/v), 在 246 nm 紫外光下检测。HPLC 仪器及其参数 色谱柱: Zorbax Silica (5 μm), 25 cm \times 4.6 mm (ID) (Shandon); 流动相: 二氯甲烷-异丙醇-水 (125/40/3, v/v); 流速: 1.0 mL/min; L-4000 紫外检测器 (Merck), 检测波长: 245 nm; AS-4000 进样器 (Merck), 进样体积: 20 μL ; L-6200 泵 (Merck), 压力: 940psi; 灵敏度: 2.5 aufs; 温度: 室温约为 20°C; 用 Waters Maxima 820 chromatography Workstation 进行数据处理。

HPLC 标准曲线 在 $10^{-10}\text{g}/\text{ml} \sim 10^{-2}\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内制作 β -蜕皮激素(Sigma)标准曲线 (如图 1), 线性方程 $Y = 4.55831 \times 10^{-10}X + 2919.07$, 相关系数 $r = 0.9987$ 。

结 果

根的诱导和培养

露水草根、茎、叶的外植体, 在加 NAA 2 mg/L 和 BAP 0.1 mg/L 的 MS 培养基上, 均可诱导出

分。根培养在附加 NAA 2 mg/L 和 BAP 1 mg/L 的琼脂培养基上, 21°C, 暗培养, 30~40 d 继代培养 1 次, 亦可在附加 NAA 2 mg/L 和 BAP 0.1 mg/L 的 1/2 MS 液体培养基上, 21°C, 暗培养。旋转式摇床 (Setric Genie Industriel, 法国) 的振幅为 2.0 cm, 转速为 100 r/min, 每 7 d 继代培养 1 次。此外, 还采用体积为 2.6 L 的升液式生物反应器 (liquid-lift bioreactor, Setric Genie Industriel, 法国) 进行根培养, 接种量为 40 g fw/L, 氧溶浓度保持在最大饱和度的 90%。

法呢醇和胆甾醇的加入

法呢醇和胆甾醇分别溶于乙醇中, 经过滤器 (0.22 μm) 过滤, 保存备用。根培养 1 周后, 分别加入法呢醇和胆甾醇, 再经 3 周的连续培养, 即可收获。

β -蜕皮激素的化学分析

提取和纯化 培养根经冰冻干燥至恒重; 取 1 g 干燥样品, 溶于 40 mL 甲醇中, 室温下超声波提取 3 次, 每次 20 min, 甲醇提取液浓缩至 1 mL, 加入 3 mL 乙腈, 过滤, 滤液浓缩干燥, 溶于水, 用 Sep-Cartridge Rp-18 短柱 (Interchim 公司) 处理后, 即可进行 HPLC 定量分析。

培养液中 β -蜕皮激素的提取: 40 mL 培养液过 Sep-Cartridge Rp-18 短柱, 用水和甲醇各 10 mL 相继洗脱, 甲醇洗脱液浓缩干燥后进行 HPTLC 定性和 HPLC 定量分析。

根, 其中以从根中诱导的培养根生长最好(图2)。如果在MS培养基中加入2,4-D 2 mg/L和BAP 0.1 mg/L, 则均诱导出愈伤组织。

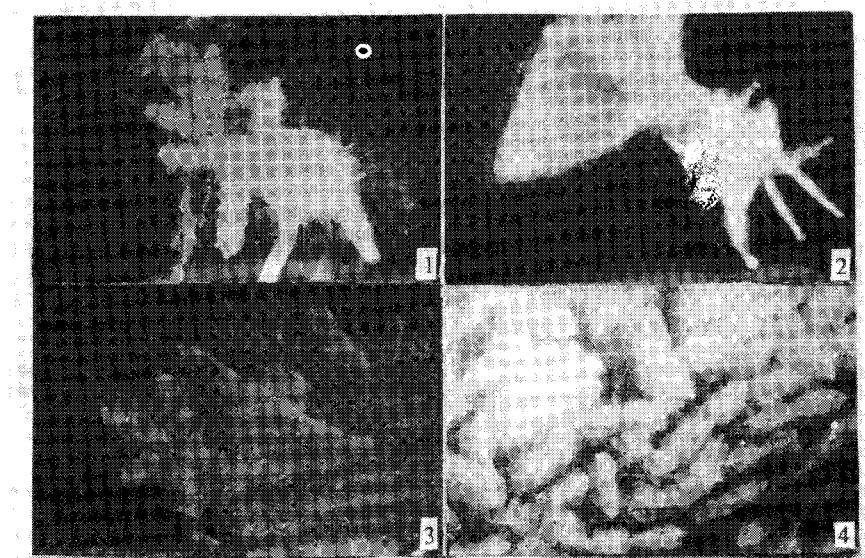


图2 露水草外植体诱导出的培养根。1. 从根外植体诱导的培养根; 2. 从叶外植体诱导的培养根; 3. 从茎外植体诱导的培养根; 4. 1/2 MS液体培养基中生长的培养根

Fig. 2 Cultured roots induced from the explants of *C. arachnoidea*. 1. from root explants; 2. from leaf explants; 3. from stem explants; 4. cultured roots in 1/2 MS liquid medium

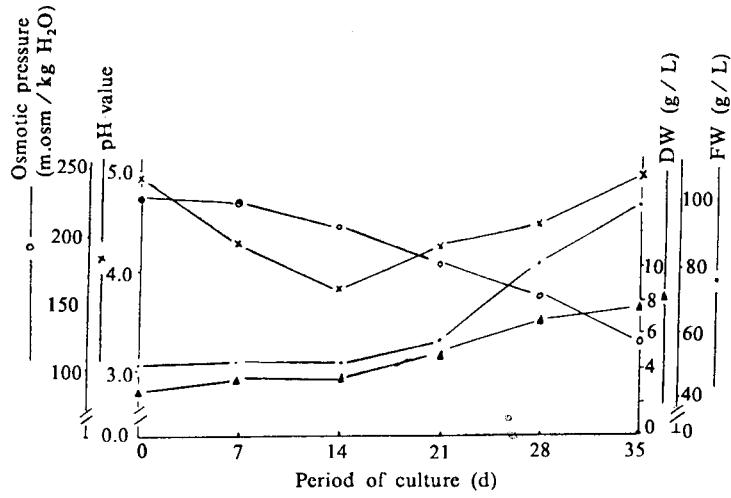


图3 根悬浮培养的时间进程

Fig. 3 Time course of root suspension culture of *C. arachnoidea*

渗透压 osmotic pressure; pH值 pH value; 干重 DW; 鲜重 FW

根悬浮培养的时间进程

如图3所示, 在液体培养的条件下, 当悬浮培养到第35 d时, 培养根的干重达最大值, 为7.52±

0.5g / L。在培养根和培养液中均未检测到 β -蜕皮激素。在整个培养过程中, pH 值是先呈降低的趋势, 培养两周后, 逐渐回升并高到 4.86 ± 0.05 。开始培养时, 培养液的渗透压为 225.0 m.osm / kg H₂O, 在培养过程中逐渐降低, 到培养结束时为 121.0 ± 9.43 m.osm / kg H₂O。

胆甾醇对根悬浮培养的影响

根悬浮培养 1 周后, 加入不同浓度的胆甾醇, 继续培养至 28 d, 结果表明胆甾醇可显著地促进培养根中 β -蜕皮激素的形成, 其适当的浓度为胆甾醇浓度为 5.0 mg / L。随着胆甾醇浓度的增加, 除培养根外, 培养液中也存在有 β -蜕皮激素(表 1)。

为进一步了解 β -蜕皮激素在培养液中存在的原因, 进行了如下的实验: 将悬浮培养 1 周后的材料分为 3 种情形处理: (1) 滤除培养根后, 保留培养液; (2) 将培养根移至新的培养液中; (3) 培养根在与原培养液中继续培养。分别向培养液中添加 5mg / L 的胆甾醇, 连续培养 3 周后收获, 对根和培养液分别进行 β -蜕皮激素含量测定。结果表明, 培养 1 周后, 若在滤去培养根的培养液中加入适量的胆甾醇, 该培养液仍具有形成 β -蜕皮激素的能力, 从而提示培养根中的 β -蜕皮激素合成酶有可能在悬浮培养的早期阶段就有一部分渗入到培养液中了。

表 1 胆甾醇对露水草悬浮培养根中 β -蜕皮激素形成的影响

Table 1 Effects of cholesterol on β -ecdysone formation of root suspension culture of *C. arachnoidea*

conc. of cholesterol (mg / L)	yield of roots (DW) (g / L)	β -ecdycione in roots (DW) (mg / g) ($\times 10^{-4}$)	β -ecdysone in medium (mg / L) ($\times 10^{-4}$)	total β -ecdysone (mg / L) ($\times 10^{-4}$)
0.0	6.405	0.000	0.000	0.000
0.1	5.036	0.000	0.000	0.000
0.5	5.863	0.530	0.000	3.109
1.0	4.930	2.372	3.830	15.524
5.0	5.093	13.492	6.614	75.328
10.0	4.578	8.814	14.967	55.049
25.0	4.804	9.938	0.000	47.741

Period of culture was 28 days, and inoculum quantity was about 30 g FW / L.

表 2 胆甾醇对 β -蜕皮激素形成的影响

Table 2 Effects of cholesterol on β -ecdysone formation

groups of experiment	conc. of cholesterol (mg / L)	yield of roots (DW) (g / L)	β -ecdysone in roots (DW) (mg / g) ($\times 10^{-3}$)	β -ecdysone in medium (mg / L) ($\times 10^{-3}$)	total β -ecdysone (mg / L) ($\times 10^{-3}$)
1	2	0.000	0.000	18.165	18.165
	0	0.000	0.000	0.000	0.000
2	2	6.925	4.9687	8.337	42.747
	0	8.172	3.6112	0.000	29.511
3	2	7.174	5.0851	3.415	39.897
	0	6.669	0.3158	0.000	21.062

Inoculum quantity was about 30 g FW / L. Group 1: only original cultured medium; Group 2: cultured roots plus fresh medium; Group 3: cultured roots with the original medium.

实验结果还提示, 如果更换新的培养液继续培养, 适量的胆甾醇对培养根中 β -蜕皮激素的形成仍有促进作用(表2)。

法呢醇对根悬浮培养的影响

如图4所示, 根培养物干重随法呢醇浓度的增加而降低, 薄层层析分析表明, 在根和培养基中均检测不到法呢醇, 而培养物中也检测不到 β -蜕皮激素, 提示法呢醇对培养根中 β -蜕皮激素的形成无直接的促进作用, 而法呢醇已被培养体系所利用并转化为其它产物。法呢醇的生物转化途径正在进行之中。

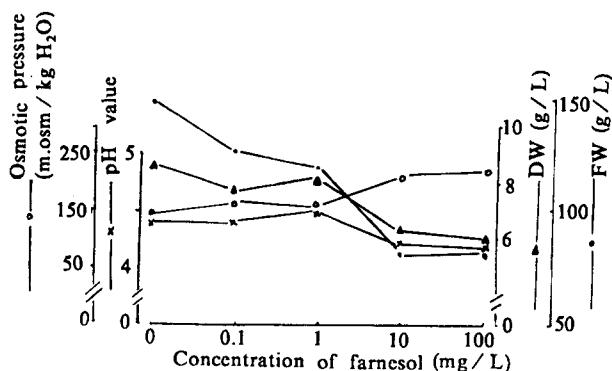


图4 法呢醇对露水草悬浮培养根的影响

Fig. 4 Effects of farnesol on suspension cultured roots of *C. arachnoidea*

升液式生物反应器中的培养

在升液式生物反应器中进行培养, 其 pCO_2 和pH值的时间进程如图5所示, 培养10天后, 根的得率为2.602 g DW/L, β -蜕皮激素产率为 4.47×10^{-4} mg/L。

讨 论

尽管植物的培养细胞不需要器官化即可产生次生代谢物质, 如三七、人参、西洋参等细胞, 在合适的培养基中即可产生皂甙成分(Zhou等, 1991)。然而, 一些分化的植物培养组织, 往往有利于次生代谢物的形成和积累, 如希腊毛地黄(*Digitalis lanata*)细胞培养物中强心甙的含量随着器官化程度的提高而增加(Game等, 1980)。

露水草为单子叶植物, 毛状根的诱导和培养均甚为困难。本文采用外植体诱导形成培养根, 实验结果表明, 生长调节物质2,4-D、NAA和BAP均能够明显地影响露水草培养物的形态形成, 而且培养根可进行大规模的液体悬浮培养, 若进行代谢调控, 探讨各种激素、碳源、氮源、金属离子、前体物质、有机添加剂、温度、光照等因素的影响, 有可能显著提高培养根的生物产量。

胆甾醇能明显地促进培养根中 β -蜕皮激素的形成, 提示胆甾醇可能是 β -蜕皮激素生物合成中的一个

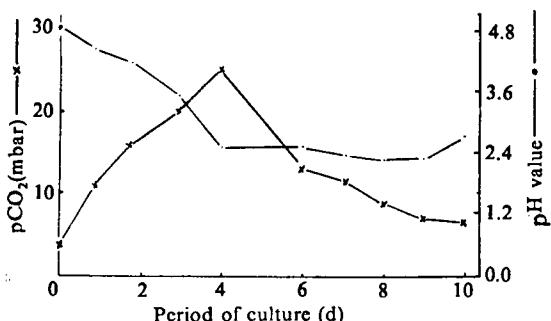


图5 在升液式生物反应器中露水草根培养的时间进程

Fig. 5 Time course of root culture of *C. arachnoidea* in liquid-lift bioreactor

前体，或者胆甾醇在 β -蜕皮激素酶促合成过程中起重要作用。若用标记的胆甾醇进行 β -蜕皮激素生物合成途径研究将有助于阐明这一问题。实验中还发现，在根悬浮培养一周后的培养液中加入适量胆甾醇，即使没有培养根，该培养液亦有形成 β -蜕皮激素的能力，这似乎说明在根培养的初期阶段，就有一部分 β -蜕皮激素合成酶从培养根渗入到培养液中了。在我们的实验条件下，法呢醇对培养根的生长和 β -蜕皮激素的形成均无明显的影响，这是否与法呢醇作为 β -蜕皮激素形成的前体较胆甾醇远有关，尚需进一步的研究。

目前，利用器官化培养物进行次生代谢的研究的例子不多。露水草培养根的诱导与放大规模培养，对于阐明蜕皮甾酮类化合物代谢过程中的生理生化现象与生物合成途径将是颇有意义的，同时也将可能为有商业价值的生物技术化学生体系提供新的机会与可能。

致谢 本文的大部分工作是在法国 LVMH RECHERCHE 完成的，得到该研究所 Dr. A. Meybeck, Dr. M. Boulay, Dr. F. Bonte 等诸位先生的大力支持协助，在此深表谢意。

参 考 文 献

- 聂瑞麟, 许祥誉, 何 敏等, 1978. 露水草植物中蜕皮激素的分离和鉴定. 化学学报, 36(2): 138
 Game R, Luckner E, Vogel E et al, 1980. Growth morphogenesis and cardenolide formation in long-term cultures of *Digitalis lanata*. *Planta Medica*, 40: 92
 Zhou L, Zheng G, Wang S et al, 1991. Comparative studies on large scale cell culture of *Panax notoginseng*, *P. ginseng* and *P. quinquefolium*. *Chinese J Bot*, 3(2): 161