

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20150159

# 匍枝筋骨草悬浮培养中 $\beta$ -蜕皮甾酮的积累与调控

钱晶晶<sup>1</sup> 黎 昕<sup>1</sup> 杨月月<sup>1</sup> 林 健<sup>1</sup> 迟德富<sup>2</sup>

(1 东北林业大学生命科学学院 2 东北林业大学林学院)

**摘要:**植物源蜕皮激素—— $\beta$ -蜕皮甾酮( $\beta$ -EC)是一种细胞生长调节激素,在医疗和生物农药等方面有极高的应用价值。利用匍枝筋骨草细胞中含有较高 $\beta$ -EC这一特性,为从改善细胞悬浮培养、监测及加入添加物等途径找出一个可以高效、快速生产 $\beta$ -EC的生物学方法,通过紫外分光光度法和高效液相色谱等研究方法在前期已建立的匍枝筋骨草细胞悬浮培养体系的基础上,进一步研究了细胞培养过程中的营养消耗、次生代谢产物生成的动力学曲线;并探索了向细胞悬浮培养体系中添加L-苯丙氨酸(L-PAL)、甲羟戊酸(MVA)、 $\alpha$ -蒎烯、松油醇、NO(硝普钠 SNP)等来提高匍枝筋骨草细胞中 $\beta$ -EC含量。结果表明:匍枝筋骨草细胞生长符合逻辑斯蒂方程曲线“S”型,生长周期共19 d并在第11天进入细胞生长稳定期;电导率与细胞干质量、蜕皮甾酮的积累呈负相关,因而,可利用电导率的变化确定最佳细胞收获时间;多次继代会弱化细胞生产蜕皮甾酮的能力;通过将 $\alpha$ -蒎烯、MVA、SNP联合添加于弱化的细胞中,可以显著提高细胞悬浮培养体系中 $\beta$ -EC的含量,联合添加的适宜组合和最优浓度为: $\alpha$ -蒎烯 50  $\mu$ L/L、MVA 10 mg/L、SNP 80  $\mu$ mol/L。

**关键词:**匍枝筋骨草;动力学;前体;诱导子;代谢抑制剂; $\beta$ -蜕皮甾酮;代谢调控

**中图分类号:**Q891   **文献标志码:**A   **文章编号:**1000-1522(2015)09-0091-10

QIAN Jing-jing<sup>1</sup>; LI Xin<sup>1</sup>; YANG Yue-yue<sup>1</sup>; LIN Jian<sup>1</sup>; CHI De-fu<sup>2</sup>.  **$\beta$ -ecdysterone accumulation and regulation in *Ajuga lobata* suspension culture.** *Journal of Beijing Forestry University*(2015)**37**(9) 91-100 [Ch, 37 ref.]

1 College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang, 150040, P. R. China;  
2 College of Forest, Northeast Forest University, Harbin, Heilongjiang, 150040, P. R. China.

Ecdysterone is a naturally occurring steroid hormone secreted by arthropods, including insects, to regulate the molting process of larvae. Ecdysterone also has many pharmacological functions such as promoting cell growth and inducing human epidermal cell differentiation. Suspension culture of *Ajuga lobata* D. Don cells provides a method of synthesis of the phytoecdysteroid  $\beta$ -ecdysterone ( $\beta$ -EC). In this study, we tried to characterize the culture conditions to optimize  $\beta$ -EC production. Growth of *A. lobata* cells fit the logistic equation curve, with a growth cycle of 19 days and the stationary phase of 11 to 17 days. Medium conductivity was negatively correlated with dry cell weight and  $\beta$ -EC accumulation, thus could be used to determine the optimal time for cell harvest. Continuous subculture reduced  $\beta$ -EC synthesis, but supplementing medium with  $\beta$ -EC precursors mevalonic (MVA), metabolic inhibitors  $\alpha$ -pinene and elicitor NO could significantly promote cell growth and influence  $\beta$ -EC accumulation. Combination of  $\alpha$ -pinene, MVA and SNP significantly elevated  $\beta$ -EC accumulation, thus may synergistically enhance  $\beta$ -EC synthesis in *A. lobata*. The optimal concentrations of  $\alpha$ -pinene, MVA and NO donor SNP in the suspension culture were 50  $\mu$ L/L, 10 mg/L, 80  $\mu$ mol/L, respectively.

**Key words** *Ajuga lobata*; kinetics; precursors; elicitors; metabolic inhibitor;  $\beta$ -ecdysterone; metabolic regulation

收稿日期: 2015-05-11    修回日期: 2015-06-17  
基金项目: 国家自然科学基金项目(31370649)。  
第一作者: 钱晶晶。主要研究方向:昆虫分子生物学、害虫生物防治。Email:qianjingjing19@126.com    地址:150040 黑龙江省哈尔滨市和兴路26号东北林业大学生命学院。  
责任作者: 迟德富,教授,博士生导师。主要研究方向:林学。Email:chidefu@126.com    地址:150040 黑龙江省哈尔滨市和兴路26号东北林业大学林学院。  
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

蜕皮甾酮是包括昆虫在内的节肢动物的一类内源激素,可以调节节肢动物幼虫蜕皮过程。同时,作为细胞生长调节激素,具有促进细胞生长、促进表皮细胞的分化、改善脑功能障碍的药理活性<sup>[1]</sup>。植物源蜕皮甾酮因其结构与蜕皮甾酮相似,同样可影响昆虫的整个发育过程,从而达到安全无污染地防治害虫的目的<sup>[2-3]</sup>。植物源蜕皮甾酮在植物体中的含量较昆虫体内高<sup>[4]</sup>,而且存在于多种植物中,所以其来源广泛<sup>[5-9]</sup>。匍枝筋骨草中所含的植物源蜕皮激素主要为 $\beta$ -蜕皮甾酮( $\beta$ -EC),且含量较高,测得其含量可达 $0.1828\text{ g/L}$ <sup>[10]</sup>,有较强的应用及经济价值<sup>[11]</sup>。

匍枝筋骨草(*Ajuga lobata*),隶属于唇形科(Lamiaceae),筋骨草属(*Ajuga*),多年生草本,在中国南方有广泛分布<sup>[12-14]</sup>。从野生筋骨草中提取分离 $\beta$ -EC,受到野生资源限制;若采用人工栽培方式培育,生长周期相对较长;而植物组织或细胞培养具有不受环境和季节影响、培养周期短等优点。匍枝筋骨草根 $\beta$ -EC含量较高,易于离体培养,且利用悬浮培养的细胞系提取植物源 $\beta$ -EC的操作流程也更简单<sup>[11]</sup>。因此,采用植物细胞工程技术培养匍枝筋骨草细胞生产 $\beta$ -EC是生产蜕皮甾酮的又好又快的途径之一,不仅为规模化生产 $\beta$ -EC提供充足的原料,还可以降低生产成本,同时降低对野生匍枝筋骨草资源的破坏程度。

目前,对于筋骨草属的研究主要集中在化学成分的分析以及提取物的药理活性、杀虫效果等<sup>[12-15]</sup>;有研究<sup>[16]</sup>发现,福建的金疮小草(*A. decumbens*)中蜕皮甾酮的含量明显高于紫背全盘(*A. nipponensis*)和网果筋骨草(*A. dictyocar*),且以苗期含量最高,可达到 $4.49\text{ mg/g}$ ;还有关于金疮小草中环烯醚萜苷动力学<sup>[16]</sup>,以及匍枝筋骨草的组培苗培养和生根培养的研究<sup>[17]</sup>。但尚未见通过建立匍枝筋骨草细胞的悬浮培养体系,获得可大量生产 $\beta$ -EC的细胞系的相关报道。

东北林业大学森林生物工程学科昆虫实验室于2009年4月从浙江省杭州蓝天园林种苗公司余姚镇引进匍枝筋骨草。2011年,建立了成熟的再生体系。2013年,初步建立匍枝筋骨草的悬浮培养体系<sup>[11]</sup>,并研究了匍枝筋骨草的悬浮培养条件及添加不同物质对次生代谢产物 $\beta$ -EC的影响,找出了高效、稳定的匍枝筋骨草悬浮培养体系及 $\beta$ -EC提取工艺。

$\beta$ -EC作为一种主要的植物甾酮,在植物体中的生物合成途径与萜类化合物有密切关系,均通过类异戊二烯途径合成。类异戊二烯途径由甲羟戊酸

(MVA)途径和5-磷酸-D-脱氧木酮糖/2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸酯(DOXP/MEP)途径组成<sup>[18-21]</sup>。MVA途径是植物体一条主要合成途径,以乙酰CoA为起始物,通过合成甲羟戊酸,最后合成甾酮类及萜类物质。而DOXP/MEP途径则是以丙酮酸和3-磷酸甘油醛为起始物,合成萜类物质。这2条途径的主要区别在于前体物质异戊烯基焦磷酸酯(IPP)及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸酯(DMAPP)的合成机制、代谢终产物及在细胞中的位置不同,即2种途径有着相同的中间产物DMAPP和IPP。可见 $\alpha$ -蒎烯(小分子单环单萜化合物)作为MVA途径及DOXP/MEP途径的萜类产品,可以抑制萜类合成,从而达到增加甾酮产量的目的。而松油醇作为 $\alpha$ -蒎烯的终产物的一种,也属于单环萜醇类化合物,同样具有抑制萜类合成途径的作用<sup>[22]</sup>。MVA作为MVA途径的关键物质,完全可以看做植物体内合成甾酮途径的前体。而L-苯丙氨酸(L-PAL)作为一种生物体必须的氨基酸,被认为是一种普遍性的次生代谢途径的前体<sup>[23]</sup>。另外,NO作为信号分子在植物次生代谢生产中普遍作为诱导子而使用<sup>[24]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 基础培养

基础悬浮液体培养基为:MS +  $0.4\text{ mg/L}$  2,4-D +  $0.5\text{ mg/L}$  6-BA。初始pH值5.8,蔗糖质量分数2%。接种量为 $0.1\text{ g/mL}$ ,即每个培养瓶中添加 $50\text{ mL}$ 培养液,接种5g。

细胞培养条件:培养室内光照培养,光/暗周期为 $16\text{ h}/8\text{ h}$ ,光照强度 $2000\text{ lx}$ ;温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、湿度为70%、悬浮摇床转速 $120\sim130\text{ r/min}$ 。

### 1.2 悬浮细胞培养动力学研究

选取继代4次、培养7d的匍枝筋骨草细胞做动力学研究。在培养的第1、3、5、7、9、11、13、15、17、19天测定(接种当天记为第0天)细胞鲜质量、细胞干质量、pH值、电导率、 $\beta$ -EC含量,以及可溶性总糖、磷酸盐、硝酸盐、铵盐的含量。设4次重复,每组10瓶。

#### 1.2.1 细胞鲜质量和干质量的测定及细胞生长动力学模型的建立

每次取3瓶,每组取1瓶,将细胞悬浮液经300目细胞筛过滤,将滤出的细胞用滤纸吸干多余水分,称重得到细胞鲜质量(FW)。 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重后,得到细胞干质量(DW)。

细胞生长动力学模型拟合,依据细胞工程中细胞反应动力学公式:

$$\frac{1}{c_x} \frac{dc_x}{dt} = K \left( 1 - \frac{c_x}{c_{x\max}} \right)$$

式中： $c_{x\max}$  为细胞的最高质量浓度 (g/L)， $c_x$  为细胞质量浓度 (g/L)， $t$  为培养时间 (d)， $K$  为比例系数。

1.2.2 培养液 pH 值测定

采用 pH S-25 酸度计(上海精科雷磁仪器厂)测定细胞悬浮培养过程中培养液的 pH 值,记录数据并绘制曲线。

1.2.3 培养液电导率的测定

采用 BEC 微机型电导率仪 (BEC-11AW, Bell Analysis Instrument Co Ltd)测定培养液中电导率。

1.2.4 培养液中营养物质消耗动态及糖消耗动力学模型

采用磷钼蓝法测定培养液中磷酸盐含量<sup>[25]</sup>,水杨酸分光光度法测定硝酸盐含量<sup>[25]</sup>,茚三酮测定氨基游离氮的方法测定铵盐含量<sup>[25]</sup>,蒽酮比色法测定细胞悬浮培养过程中培养液的可溶性总糖含量<sup>[25]</sup>。

糖消耗动力学模型依据基质消耗的动力学方程:

$$c_s = c_{s0} - \frac{mY_{x/s}}{Y_{x/s}} \left( e^{1 - \frac{Y_{x/s}}{Y_{x/s}^*}} - 1 \right)$$

式中: $c_s$  为基质质量浓度 (mg/L), $c_{s0}$  为底物的初始质量浓度 (mg/L), $m$  为细胞的维持系数, $Y_{x/s}$  为宏观得率, $Y_{x/s}^*$  为理论得率。

1.2.5 悬浮细胞中β-EC 含量的测定及动力学模型

0.2 g(干质量)匍枝筋骨草细胞于 5 mL 色谱甲醇浸泡 24 h,超声 1 h,微波消解(微波消解仪 WT-8000);有机过滤膜过滤后将滤液直接用于 HPLC (Waters-2900)检测。β-EC 检测色谱柱:MS C18 (4.6×250 mm,5 μm 粒度),紫外可见光检测器(波长范围:190~800 nm)检测波长 242 nm,流动相( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=50:50$ )溶液 0.8 mL/min,进样量 20 μL。

配置质量浓度为 0、0.08、0.16、0.24、0.32、0.40 g/L 的β-EC 标准品溶液,每次分别进样 20 μL,重复 3 次,以峰面积的平均值为纵坐标,质量浓度为横坐标,得β-EC 回归方程。按照液相色谱检测试样的峰面积,由标准曲线求出β-EC 含量。

考虑到产物的积累与细胞的生长的相关性,β-EC 生成的动力学模型依据细胞生长动力学公式

(参考 Logistic 方程)拟合  $p_p = \frac{p_{\max}}{1 + \frac{p_{\max} - p_0}{p_0} e^{-kt}}$ ,令

$b = \frac{p_{\max} - p_0}{p_0}$ ,化简后的方程为:

$$p_p = \frac{p_{\max}}{1 + be^{-kt}}$$

式中: $p_p$  为产物质量浓度 (mg/L), $p_{\max}$  为产物的最大质量浓度 (mg/L), $p_0$  为产物的初始浓度质量 (mg/L), $k$  为产物生成系数。

1.3 继代次数对悬浮细胞内β-EC 含量的影响

取 5 g 第 1 代、培养 7 d 的愈伤组织细胞,接种到 50 mL 基础悬浮液体培养基中,再培养 7 d 后测定悬浮培养细胞中β-EC 含量(此时是第 2 代愈伤组织细胞)。重复试验 2 次。然后依次进行第 3~15 次继代悬浮培养细胞的β-EC 含量测定。

1.4 外源添加物对悬浮细胞生长及β-EC 含量的影响

1.4.1 不同外源添加物

选取 5 g 继代 10 次的匍枝筋骨草细胞,接种到 50 mL 基础悬浮液体培养基中。再分别添加不同种类及浓度的前体,并在添加后培养到第 7 天时,观察细胞生长状况、测定细胞活力和悬浮细胞中β-EC 含量。每 4 瓶培养物为 1 个试验重复。

细胞活力采用 TTC 法:取鲜细胞 0.2 g,加入 2.5 mL 0.4% TTC,再加入 2.5 mL PBS 缓冲液 (pH=7),常温下暗处理 14 h;去除上清液,用蒸馏水清洗细胞 3 次;洗净的细胞加入 5 mL 95% 乙醇,60℃水浴脱色 30 min,期间每 5 min 轻晃摇匀。在 485 nm 处,用紫外分光光度仪测其吸光度。

1.4.1.1 L-PAL 的配制

称取 0.165 2 g L-PAL,用无菌水定容到 10 mL,即其浓度为 0.1 mol/L。向 50 mL 的培养体系中分别加入 0、50、100、200 μL 浓度为 0.1 mol/L 的 L-PAL,使 L-PAL 终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4 mmol/L。

1.4.1.2 MVA 的配制

用 0.1 mol/L 的 KOH 溶解 MVA,配成 50 g/L 的溶液。向 50 mL 的培养体系中分别加入 0、5、10、20、80 μL 的 50 g/L 的 MVA 溶液,使 MVA 终质量浓度分别为 0、5、10、20、80 mg/L。

1.4.1.3 α-蒎烯的配制

用无水乙醇溶解 α-蒎烯( $V_{\alpha\text{-蒎烯}}:V_{\text{无水乙醇}}=8:2$ )配制 α-蒎烯无水乙醇溶液。向 50 mL 的培养体系中分别加入 0、31.25、62.5、125 μL α-蒎烯无水乙醇溶液,使体系中 α-蒎烯终浓度(体积比)分别为 0、25、50、100 μL/L。

1.4.1.4 松油醇的配制

取 8.4 mL 松油醇溶于 1.6 mL 无水乙醇中,配制松油醇无水乙醇溶液。向 50 mL 的培养体系中分别加入 0、5、20、30 μL 松油醇无水乙醇溶液,使松油醇终浓度(体积比)分别为 0、100、400、600 μL/L。



1.4.1.5 诱导子 NO 的配制

称取 0.029 8 g 硝普钠(SNP),用去离子水定容至 2 mL,配成浓度 50 mmol/L 的 SNP 溶液(0.5 mmol/L 的 SNP 能释放 2.0 μmol/L 的 NO)。向 50 mL 的培养体系中分别加入 0、10、20、40、80、160 μL SNP 溶液,使体系中 SNP 终浓度分别为 0、10、20、40、80、160 μmol/L。

1.4.2 不同外源物组合

选用添加单种外源物试验中筛选出来的,对悬浮细胞生长影响较小且对 β-EC 含量促进作用效果显著的各种外源物的最优添加浓度进行外源物的组合:①MVA + SNP,② α-蒎烯 + SNP,③MVA + α-蒎烯,④MVA + α-蒎烯 + SNP。将各外源物组合添加到已经培养了 7 d 的加有 5 g 继代 10 次悬浮细胞的 50 mL 悬浮培养体系中。同时以添加 50 μL/L α-蒎烯、10 mg/L MVA、80 μmol/L SNP 的培养体系做对照。

2 结果与分析

2.1 悬浮细胞培养的动力学研究

2.1.1 细胞生长曲线

由图 1 可知:细胞生长符合 Logistic 方程。匍枝筋骨草的生长周期为 19 d,生长曲线为“S”型,1~3 d 为延滞期,细胞生长速率缓慢,细胞生物量积累少;3~11 d 为细胞对数生长期;第 11 天,生长速率减慢,进入细胞生长稳定期,此时生物量达到最大为 34.74 g/瓶,稳定期持续到第 17 天;在第 17 天细胞生物量有所下降,进入细胞衰亡期。

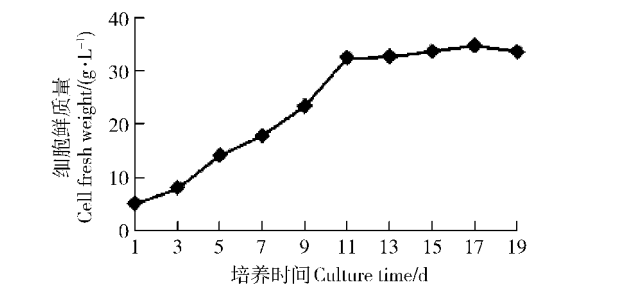


图1 筋骨草细胞的生长曲线  
Fig.1 Dynamic changes of cells growth in *Ajuga lobata*

2.1.2 细胞培养液 pH 值的变化

由图 2 可知:整个细胞生长周期内,培养液 pH 值处于动态变化中;随培养时间出现先下降后上升的变化过程,但始终都在 4.5~6.0 之间;培养结束时,pH 值为 5.8。

2.1.3 培养时间对电导率、细胞干质量、β-EC 含量的影响

由图 3 可知:在一个生长周期里,随着培养时间的延长,电导率呈下降趋势,细胞干质量随之上升;

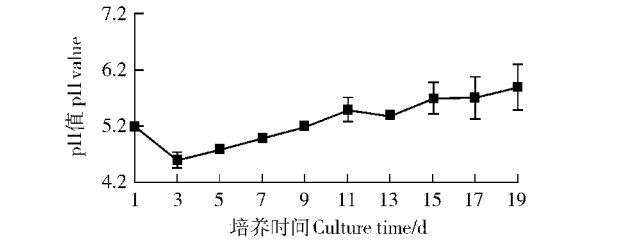


图2 细胞培养液的 pH 值  
Fig.2 Dynamic changes of pH in *Ajuga lobata*

第 9 天,细胞干质量到达最大(0.63 ± 0.021) g 时,相应的电导率为(2.78 ± 0.318) (m·s)/cm;从第 11 天即细胞进入稳定期后,电导率下降至 2 (m·s)/cm 以下。

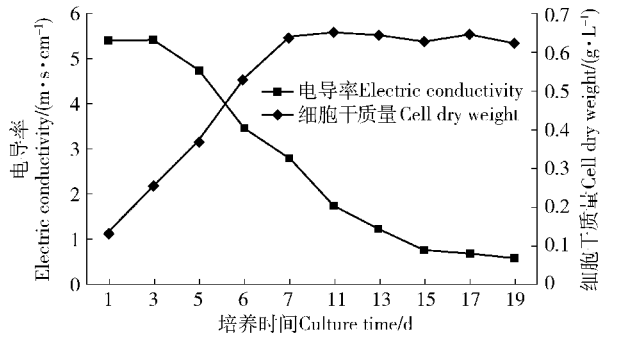


图3 匍枝筋骨草细胞培养液中培养时间与电导率、细胞干质量的变化  
Fig.3 Dynamic changes of electric conductivity and cell dry weight in culture solution

用 origin8.6 对匍枝筋骨草细胞干质量与细胞生长情况进行拟合(见图 4),得到拟合方程为  $c_x = c_{x0} + \frac{c_{x\max} - c_{x0}}{1 + e^{\frac{t-t_0}{dt}}}$ ,其中  $c_{x0}$  为细胞的起始质量浓度(g/L), $t_0$  为细胞生长的时间常数(d)。经拟合得到: $c_{x\max}$  为 0.641 56, $c_{x0}$  为 0.102 85, $t_0$  为 4.849 55 d, $dt$  为 1.535 38,相关性系数为 0.982 96。这说明提出的模型具备合理性和较高的准确性,能够比较好地描述

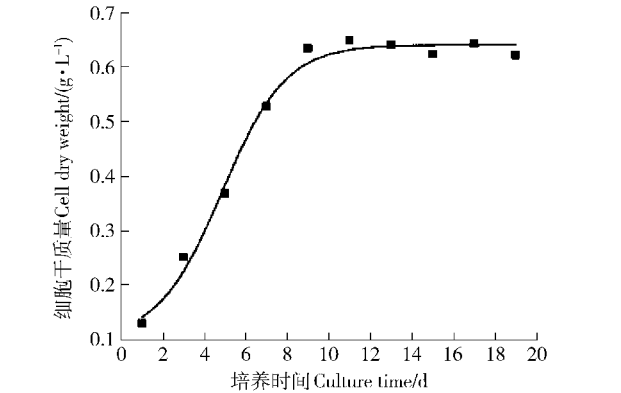


图4 匍枝筋骨草细胞干质量的试验值和拟合曲线  
Fig.4 Comparison of model parameters between experimental values and calculated values

匍枝筋骨草细胞悬浮培养过程中生长的动力学。

由图 5 可知:随着细胞培养时间的增加,细胞内 β-EC 积累量逐渐增加;当培养到第 9 天时,β-EC 含量最高可达(0.246 ± 0.011 3) g/L。

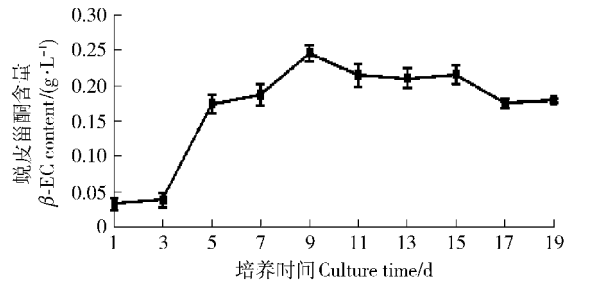


图5 匍枝筋骨草细胞培养液β-EC含量的变化  
Fig. 5 Dynamic changes of β-ecdysterone content

用 origin8. 6 对匍枝筋骨草细胞 β-EC 含量与细胞生长情况进行拟合(见图 6)。拟合方程  $p_p = \frac{P_{\max}}{1 + be^{-kt}}$ , 相关系数为 0. 874 92,  $P_{\max} = 0. 204 49$ ,  $k = 1. 424 09$ 。该方程不能概括反应过程中所有 β-EC 含量的变化,只能在一定程度上反映 β-EC 的积累水平。

2. 1. 4 培养液中各种营养基质的消耗曲线

比较细胞生长曲线(图 1)和各种营养基质的消耗曲线(图 7),可见它们有明显的相关性。随着细胞生长,各种营养基质逐渐消耗,并且随着细胞生长的延迟期、对数生长期和生长平稳期,营养基质的消耗也存在明显的延迟期、增速期和稳定期。

根据总糖测定结果对糖消耗动力学模型  $c_s =$

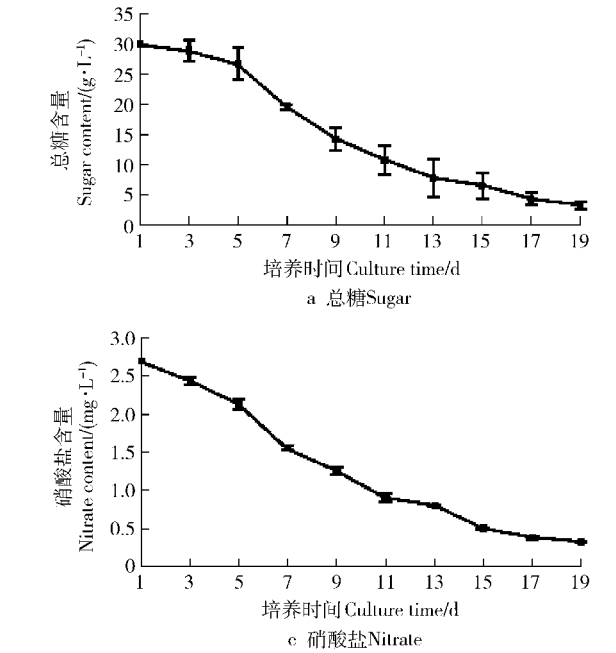


图7 悬浮培养细胞液中各营养基质的变化  
Fig. 7 Dynamic changes of nourishment content in culture solution

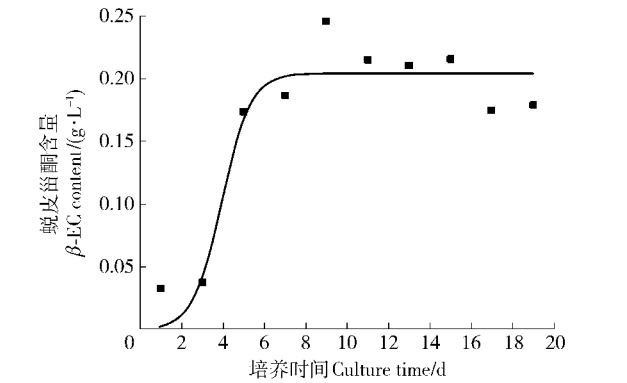
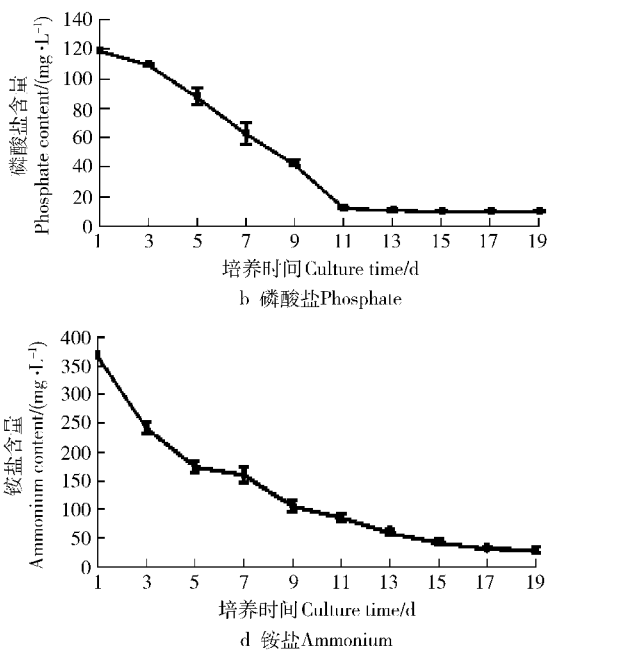


图6 匍枝筋骨草细胞β-EC含量拟合曲线和试验值的比较  
Fig. 6 Comparison of model parameters between experimental values and calculated values

$c_{s0} - \frac{mY_{x/s}}{Y_{x/s}} e^{1 - \frac{Y_{x/s}}{Y_{x/s}^*}}$ 进行拟合,得到  $Y_{x/s}^*$  为 7. 931,  $m$  为 0. 095 8,  $R^2$  为 0. 997 47。说明该方程具有一定的可信度和合理性,能够比较好地描述反应过程中总糖的消耗情况。

2. 2 继代次数对细胞内β-EC含量的影响

由图 8 可知:在筋骨草细胞悬浮继代培养中,前几代培养细胞所含的 β-EC 含量呈增加趋势,第 4 次继代细胞的 β-EC 可达 0. 204 ± 0. 025 6 g/L。随着继代次数的增加,细胞的 β-EC 积累越来越来少。第 10 次继代细胞的 β-EC 开始低于 2 代细胞;并且随着继代次数的增加,下降趋势明显( $p < 0. 01$ );当继代到 15 代时,细胞内 β-EC 含量只有 2 代细胞的 23. 5%,只有 4 代细胞的 14. 4%。说明继代次数会



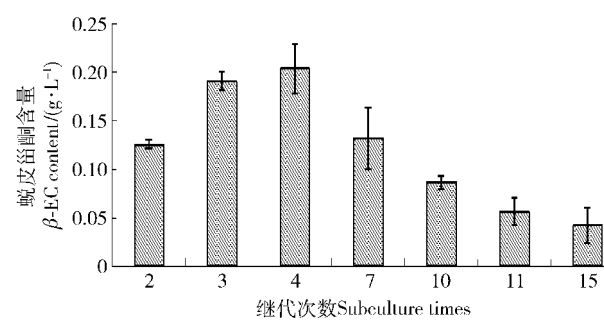


图 8 继代次数对细胞内  $\beta$ -EC 含量的影响  
Fig. 8 Effect of Subculture times on  $\beta$ -ecdysterone content in suspension cultural

显著弱化筋骨草细胞生产  $\beta$ -EC 的能力。此时,或者利用各种手段(如适当提高温度、添加前体、补充营养素、改良激素水平等)刺激细胞生产次生代谢产物,或者从植株上重新获得愈伤细胞再悬浮培养。

2.3 外源添加物对匍枝筋骨草细胞生长及  $\beta$ -EC 的影响

2.3.1 L-PAL

由表 1 可知:不同浓度的 L-PAL 均能极显著地提高细胞活力,最高活力是对照的 2.4 倍;但对刺激细胞合成  $\beta$ -EC 的作用很小,仅少量提高了细胞的  $\beta$ -EC 含量,各浓度 L-PAL 之间的  $\beta$ -EC 含量差异不

表 1 L-PAL 对筋骨草细胞的影响

Tab. 1 Effect of L-PAL on *Ajuga lobata* cells in suspension culture

L-PAL 浓度 L-PAL concentration/(mmol·L <sup>-1</sup> )	细胞生长状况 Cell growth	细胞活力 Cell activity	蜕皮甾酮含量 $\beta$ -EC content/(g·L <sup>-1</sup> )
0	++	0.32 ± 0.042	0.087 ± 0.007 1
0.1	++	0.58 ± 0.051 **	0.104 ± 0.013 0
0.2	++	0.78 ± 0.092 **	0.112 ± 0.005 8
0.4	++	0.66 ± 0.057 **	0.108 ± 0.003 7

注:++表示细胞长势良好,培养液绿白;\*\*表示差异极显著( $p < 0.01$ )。下同。Notes:++cells are growing very well,the culture solutions are green;\*\*Extremely significant differences ( $p < 0.01$ ). The same below.

明显。鉴于继代次数会影响细胞的生长,因此,在继代 10 次后可以将 L-PAL 作为细胞活化剂添加进培养基中,浓度为 0.2 mmol/L 的 L-PAL 最适合用于改善活力减弱的细胞系。

2.3.2 MVA

由表 2 可知:高浓度 MVA 会抑制细胞的生长,但也会提高细胞的活力,并且显著刺激细胞合成  $\beta$ -EC。5 mg/LMVA 下的筋骨草细胞所积累的  $\beta$ -EC 较

对照提高了 127%,差异显著;10 mg/L MVA 下细胞内的  $\beta$ -EC 较对照提高了 394.8%,差异极显著。但高浓度的 MVA 对细胞的毒害作用很大,细胞会很快褐化死亡。5 mg/L 的 MVA 下,细胞能正常生长,细胞呈灰白色,长势一般;20 mg/L 的 MVA 下,细胞有褐化死亡现象, $\beta$ -EC 积累量也会急剧下降;当浓度再高时,细胞会在很短时间内全部褐化,不再积累生物量。

表 2 MVA 对筋骨草细胞的影响

Tab. 2 Effect of MVA on *Ajuga lobata* cells in suspension culture

MVA 质量浓度 MVA concentration/(mg·L <sup>-1</sup> )	细胞生长状况 Cell growth	细胞活力 Cell activity	蜕皮甾酮含量 $\beta$ -EC content/(g·L <sup>-1</sup> )
0	++	0.32 ± 0.042	0.09 ± 0.007
5	+	0.38 ± 0.028	0.21 ± 0.042 *
10	+	0.38 ± 0.054 **	0.47 ± 0.016 **
20	-	0.43 ± 0.059 **	0.17 ± 0.061
80	-	-	-

注: + 表示细胞长势一般,培养液灰白; - 细胞受到抑制,有褐化死亡现象; \* 表示差异显著( $p < 0.05$ )。下同。Notes: + cells are growing moderately,the culture solutions are gray; - means that cells are inhibited and dead; \* significant differences( $p < 0.05$ ). The same below.

2.3.3  $\alpha$ -蒎烯

由表 3 可知:不同浓度的  $\alpha$ -蒎烯对细胞活力影响很大,差异显著;过低和过高浓度的  $\alpha$ -蒎烯对细胞活力均有抑制作用,而中浓度 50  $\mu$ L/L 能显著提高细胞活力,活力将近是对照的 2 倍,此时细胞内积累的  $\beta$ -EC 含量也最高,达到 0.14 ± 0.006 g/L,较对

照提高了 60%。随着  $\alpha$ -蒎烯浓度的增加,细胞内  $\beta$ -EC 的积累增加,均多于对照,但并非浓度越高, $\beta$ -EC 含量越高,而是呈先上升再下降的趋势;并且,随浓度的升高,细胞生长受到抑制。正常悬浮细胞液浓稠发绿,而添加了  $\alpha$ -蒎烯的悬浮培养液灰白,二者之间差异极明显。

表 3 α-蒎烯对筋骨草细胞的影响

Tab. 3 Effect of α-pinene on *Ajuga lobata* cells in suspension culture

α-蒎烯浓度	细胞生长状况	细胞活力	蜕皮甾酮含量
α-pinene concentration/(μL·L <sup>-1</sup> )	Cell growth	Cell activity	β-EC content/(g·L <sup>-1</sup> )
0	++	0.32 ± 0.042	0.09 ± 0.007
25	+	0.28 ± 0.038	0.11 ± 0.021 **
50	+	0.60 ± 0.059 **	0.14 ± 0.006 **
100	-	0.39 ± 0.047 **	0.13 ± 0.005 **

2.3.4 松油醇

由表 4 可知:低浓度松油醇能促使细胞大量合成β-EC,与对照相比较,提高了 145.4%;但松油醇

的浓度提高后,会导致细胞失活,致使β-EC 的积累急剧减少,低于空白对照。

表 4 松油醇对筋骨草细胞的影响

Tab. 4 Effect of terpineol on *Ajuga lobata* cellss in suspension culture

松油醇浓度	细胞生长状况	细胞活力	蜕皮甾酮含量
Terpineol concentration/(μL·L <sup>-1</sup> )	Cell growth	Cell activity	β-EC content/(g·L <sup>-1</sup> )
0	++	0.32 ± 0.042	0.087 ± 0.007
100	+	0.30 ± 0.055	0.213 ± 0.029 **
400	-		0.079 ± 0.021
600	-		0.078 ± 0.016

2.3.5 诱导子 NO

从图 9 可以看出:低浓度 NO 对筋骨草的次生代谢产物β-EC 作用较小,在 10、20、40 μmol/L 的 SNP 作用下,β-EC 含量较对照略低;当 SNP 浓度达到 80 μmol/L 时,细胞中的β-EC 含量可达到 0.12 ± 0.03 g/L,显著高于对照;而当 SNP 浓度为 160 μmol/L 时,β-EC 含量虽高于对照,但低于 80 μmol/L 下的。

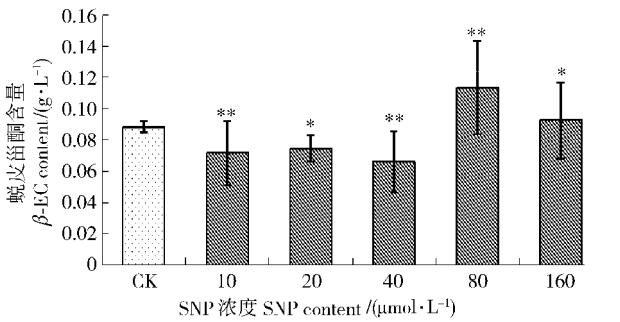


图 9 不同 NO 浓度对细胞内β-EC 的影响

Fig. 9 Effect of different NO concentrations on β-ecdysterone content in suspension culture

2.3.6 不同外源物组合

50 μL/L α-蒎烯、80 μmol/L SNP、10 mg/L MVA 形成 8 种组合(即添加物最优浓度),其中 α-蒎烯、MVA 在第 1 天添加,SNP 在第 7 天添加,24 h 后,即细胞生长了 7 d 后收获细胞,结果如表 5。

由表 5 可知:各外源组合均刺激细胞合成β-EC。1)添加 MVA 后,细胞内β-EC 含量显著提高,单独添加时较对照提高 440%,与 SNP 和 α-蒎烯组

合后,分别提高 478%、325%,三者结合后提高 486%。其中 MVA、MVA + SNP、MVA + α-蒎烯 + SNP 差异不显著,而 MVA + α-蒎烯处理效果较差。

表 5 外源组合对细胞中β-EC 含量的影响

Tab. 5 Effect of different combination of exogenous agents on *Ajuga lobata* cells in suspension culture

添加物种类	细胞鲜质量	蜕皮甾酮含量
Substrate	Cell fresh weight/ g	β-EC content/ (g·L <sup>-1</sup> )
CK	26.74 ± 1.87	0.087 ± 0.007
α-蒎烯	24.93 ± 0.32	0.14 ± 0.006 *
SNP	27.98 ± 0.56	0.12 ± 0.030
MVA	25.89 ± 0.31	0.47 ± 0.016 **
MVA + SNP	27.11 ± 0.60	0.50 ± 0.007 **
α-蒎烯 + SNP	27.78 ± 1.05	0.37 ± 0.109 **
MVA + α-蒎烯	25.15 ± 0.68	0.37 ± 0.089 **
MVA + α-蒎烯 + SNP	25.44 ± 0.69	0.51 ± 0.031 **

2)添加 α-蒎烯后,细胞内β-EC 含量明显提高,单独添加时较对照提高 60%,α-蒎烯 + SNP 处理下较对照提高 325%,α-蒎烯 + MVA 处理下提高 326%,三者共同作用下提高了 486%,各处理差异显著。

3)添加 SNP 后,细胞内β-EC 含量明显提高,单独添加时较对照提高 38%,α-蒎烯 + SNP 处理下较对照提高 325%,SNP + MVA 处理下提高了 478%,三者共同作用下提高了 486%,各处理差异显著。



4) 3 种物质均能刺激筋骨草细胞合成  $\beta$ -EC, 按效果排序:  $MVA + SNP + \alpha$ -蒎烯 >  $MVA + SNP$  >  $MVA$  >  $MVA + \alpha$ -蒎烯 =  $SNP + \alpha$ -蒎烯 >  $\alpha$ -蒎烯 >  $SNP$  > CK。直接作用最显著的是 MVA; 而  $\alpha$ -蒎烯、SNP 与其他物质共同作用时, 刺激细胞合成  $\beta$ -EC 效果显著。但添加了  $\alpha$ -蒎烯的 MVA 却较单独的 MVA 作用差。

### 3 结论与讨论

研究表明匍枝筋骨草悬浮细胞生长符合逻辑斯蒂方程曲线; 多次继代会弱化细胞生产蜕皮甾酮的能力; 但是通过将  $\alpha$ -蒎烯、MVA、SNP 联合添加于弱化的细胞中, 可以显著提高细胞悬浮培养体系中  $\beta$ -EC 的含量。筋骨草细胞的悬浮培养过程中, 可以通过电导率的变化来监测其细胞生长高峰和  $\beta$ -EC 含量的积累高峰。电导率直接反应的是培养体系中的离子浓度, 而培养基中的营养成分多以离子存在, 因此, 从电导率的变化程度可以看出培养基中营养成分的变化, 而细胞的生长和次生代谢产物的积累与营养基质直接相关<sup>[26]</sup>。

筋骨草细胞悬浮培养的过程中, 营养消耗与细胞的生长和产物的生产明显相关, 各种营养消耗曲线基本相符。但需要指出的是, 铵盐和硝酸盐的消耗并不同步。培养结束时, 细胞培养液中只有 11.96% 的硝酸盐没有被消耗掉, 而铵盐为 7.59%。产生这种现象原因可能是: 1) 匍枝筋骨草的悬浮培养在氮源消耗上, 延滞期细胞生长所需的蛋白对铵盐的依赖性更大, 进入对数生长期细胞开始积累次生代谢  $\beta$ -EC 的过程与硝酸盐密切相关; 2) Cusido 等<sup>[27]</sup>指出细胞吸收的  $NH_4^+$  或  $NO_3^-$  在体内会被立即同化, 是因为高浓度的  $NH_4^+$  对细胞是有害的。

在筋骨草细胞悬浮继代培养中, 前几代培养细胞所含的  $\beta$ -EC 含量呈增加趋势, 第 4 次继代细胞的  $\beta$ -EC 可达最高为  $0.204 \pm 0.0256$  g/L。随着继代次数的增加, 细胞的  $\beta$ -EC 积累越来越来少。植物细胞、细胞团或组织在离体培养时, 表现出基因组不稳定, 因此在细胞传代过程中出现代谢产物丢失的现象, 这一点在大规模培养中尤为重要<sup>[28-29]</sup>。考虑到以上因素, 本试验选择向已经继代 10 次的悬浮细胞培养体系中添加前体、抑制剂和诱导子。

许多研究指出添加前体<sup>[30-31]</sup>、代谢旁路抑制剂<sup>[32-33]</sup>、诱导子<sup>[34-37]</sup>会影响目标终产物的产量。本试验中, L-PAL 能显著提高细胞活力, 而 MVA 能刺激细胞合成  $\beta$ -EC; 前体 + 诱导子 + 代谢抑制剂的组合 ( $MVA + SNP + \alpha$ -蒎烯) 可以显著提高  $\beta$ -EC 的产量。在前体中,  $\alpha$ -蒎烯与 MVA 共同作用时, 却会降

低 MVA 提高细胞合成  $\beta$ -EC 的能力, 这一点需要更进一步探讨。

### 参 考 文 献

- [1] 王洪明, 陈炜, 刘冬洁, 等. HPLC 测定牛膝和决津颗粒中  $\beta$ -蜕皮甾酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 256-257.  
WANG H M, CHEN W, LIU D J, et al. Determination of ecdysterone in radix achyranthis bidentatae and juejin granula by HPLC[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(9): 256-257.
- [2] 李建飞. 植物源杀虫剂概述[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(1): 160-163.  
LI J F. Introduction of botanical pesticides [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2009, 15(1): 160-163.
- [3] 何玲, 王李斌, 贾丽. 植物源杀虫剂作用机理的研究[J]. 农药科学与管理, 2013, 34(6): 16-20.  
HE L, WANG L B, JIA L. The study on the mechanism of plant-insecticide[J]. Pesticide Science and Administration, 2013, 34(6): 16-20.
- [4] SYROV V N, SAIITKULOV A M, KHUSHBAKTOVA Z A, et al. Isolation of phytoecdysteroids from *Ajuga turkestanica* and their interferon-inducing activity[J]. O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasining Ma'ruzalari, 2003, 2: 53-57.
- [5] BALTAEV U A. Phytoecdysteroids: structure, sources, and biosynthesis in plants [J]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2000, 26(12): 799-831.
- [6] ADLER J H, GREBENOK R J. Biosynthesis and distribution of insect molting hormones in plants[J]. Lipids, 1995, 30: 257-261.
- [7] BENDEROTH M, TEXTOR S, WINDSOR A J, et al. Positive selection driving diversification in plant secondary metabolism[J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103: 9118-9123.
- [8] CATALAN R E, ARAGONES M D, GODOY J E. Ecdysterone induces acetylcholinesterase in mammalian brain [J]. Comp Biochem Physiol C, 1984, 78(1): 193-195.
- [9] CATALAN R E, MARTINEZ A M, ARAGONES M D, et al. Alterations in rat lipid metabolism following ecdysterone treatment [J]. Comp Biochem Physiol, 1985, 81(3): 771-775.
- [10] 陈小霞, 卢伟. 福建省三种常用筋骨草属植物中蜕皮甾酮的含量测定[J]. 海峡药学, 2007, 19(12): 64-65.  
CHEN X X, LU W.  $\beta$ -ecdysterone accumulation in three kinds of *Ajuga* genus of Fujian[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2007, 19(12): 64-65.
- [11] 黎昕, 钱晶晶, 李晓灿, 等. 匍枝筋骨草悬浮培养生产蜕皮甾酮的研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(34): 127-133.  
LI X, QIAN J J, LI X C, et al. A study on edysterone production of *Ajuga lobata* cell lines in suspension culture [J]. Chinese Agricultural Science, 2013, 29(34): 127-133.
- [12] 熊焰, 曲玮, 梁敏钰. 筋骨草属植物化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学, 2012, 24(12): 1-7.  
XIONG Y, QU W, LIANG J Y. Progress on chemical constituents and biological activities of the genus *Ajuga* [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2012, 24(12): 1-7.



[13] 李卫文,吴文玲,刘守金,等. 筋骨草属植物的化学成分[J]. 安徽医药,2009,13(3):329-337.

LI W W, WU W L, LIU S J, et al. The chemical components of the genus *Ajuga* [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2009, 13(3):329-337.

[14] 陈芳, 李孝栋, 吴符火. 筋骨草抗炎有效部位及其量效关系研究[J]. 福建中医学院学报,2009,19(12):27-30

CHEN F, LI X D, WU F H. *Ajuga decumbens* Thunb and its dose-effect relation[J]. Journal of Fujian College of Traditional Chinese Medicine, 2009, 19(6):27-30.

[15] 南丽红,彭卫华,郑省兰,等. 筋骨草总黄酮对慢性血清病肾炎大鼠自由基损伤的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2009,10(10):867-872.

NAN L H, PENG W H, ZHEN S L, et al. Experimental effects study of total flavonoids of *Ajuga* on free radical damage in chronic serum sickness glomerulonephritis rats [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology, 2009, 10(10):867-872.

[16] 余鸽,龙凤来,黄时伟. 环烯醚萜药理作用研究进展[J]. 陕西林业科技,2009(2):69-73.

YU G, LONG F L, HUANG S W. Research progress concerning biological activities of iridoids [J]. Shanxi Forest Science and Technology, 2009 (2):69-73.

[17] 赵晓杰,李晓灿,宇佳,等. 生长调节剂和培养方式对匍枝筋骨草生根及β-蜕皮激素量的影响[J]. 中草药,2011,42(9):1828-1832.

ZHAO X J, LI X C, YU J, et al. Effects of growth regulator and culture methods on rooting of *Ajuga lobata* and content of β-ecdysone [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(9):1828-1832.

[18] ROHMER M, KNANI M, SIMONIN P, et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate[J]. Biochem J, 1993, 295(2):517-524.

[19] LIAO Z, CHEN M, WANG J W. Isoprenoid biosynthesis in plants: pathway, genes, regulation and metabolic engineering[J]. J Bio Sci, 2006, 6(1):209-219.

[20] REUTER K, SANDERHRAND S, JOMAA H, et al. Crystal structure of 1-deoxy-dxylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. J Biol Chem, 2002, 277(7):5378-5384.

[21] JOMAA H, WIESNER J, SANDERHRAND S, et al. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drug [J]. Science, 1999, 285(5433):1573-1576.

[22] 何景昌,张正波,李琴,等. 生物合成途径及关键酶的研究进展[J]. 江西中医学院学报,2003,3(15):45-50.

HE J C, ZHANG Z B, LI Q, et al. Research advances on core enzymes of biosynthesis [J]. Journal of Jianxi College of Traditional Chinese Medicine,2003,3(15):45-50.

[23] 曹孝鲍, 王震, 彭炎, 等. 硝酸镧、L-苯丙氨酸对半夏愈伤组织生长和总生物碱积累的影响[J]. 山东农业科学,2012,44(7):26-28.

CAO X B, WANG Z, PENG S, et al. Effects of lanthanum nitrate and L-phenylalanine on callus growth and total alkaloid accumulation of *Pinellia ternata* [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2012, 44(7):26-28.

[24] 乔妹,孙嘉伟,陈琰,等. 小麦悬浮细胞应答激发子刺激的过敏反应中Ca<sup>2+</sup>和NO的动态变化及其相互作用[J]. 植物学报,2015,50(1):1-11.

QIAO M, SUN J W, CHEN Y, et al. Wheat suspension cell replication elicitor stimulation of Ca<sup>2+</sup> and NO allergic reaction dynamics and its interactions [J]. Bulletin of Botany, 2015, 50(1):1-11.

[25] 杨吉成. 细胞工程[M]. 北京:化学工业出版社,2008:119-123.

YANG J C. Cell engineering [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008:119-123.

[26] 李志良,饶秋容,李干雄,等. 应用电导率监测红豆杉细胞悬浮培养中细胞生长与紫杉醇的累积[J]. 天然产物研究与开发,2008(20):346-348.

LI Z L, YAO Q R, LI G X, et al. Monitor of cell growth and taxol accumulation in cell suspension culture of *Taxus chinensis* by conductivity of medium [J]. Natural Product Research and Development, 2008(20):346-348.

[27] OH K, KATO T, XU H L. Transport of nitrogen assimilation in xylem vessels of green tea plants fed with NH<sub>4</sub><sup>+</sup>—N and NO<sub>3</sub>—N [J]. Pedosphere, 2008, 18(2):222-226.

[28] 胡峰,施琼,黄烈健. 马占相思和大叶相思优树组培不定根诱导研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2015,39(3):57-62.

HU F, SHI Q, HUANG L J. Induction of adventitious roots during tissue culture of *Acacia mangium* and *A. auriculiformis* elite trees [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition, 2015,39(3):57-62.

[29] 苏艳丽,田鹏,魏闻东,等. 红星梨叶片不定梢诱导及增殖培养[J]. 经济林研究,2015(3):103-106.

SU Y L, TIAN P, WEI W D, et al. Induction and proliferation culture of adventitious shoots from *Pyrus communis* leaves [J]. Nonwood Forest Research,2015(3):103-106.

[30] 宋婷, 彭菲, 谭朝阳. 添加前体物质对水培益母草中盐酸水苏碱含量的影响[J]. 中南药学,2012,10(11):814-816.

SONG T, PENG F, TAN C Y. Effect of precursors on the content of stachydrine hydrochloride in the hydroponic herba leonuri [J]. Central South Pharmacy, 2012, 10(11):814-816.

[31] 吕建军,胡高升,李经奎,等. 前体饲喂和真菌诱导子对肉苁蓉悬浮培养细胞次生代谢产物的影响[J]. 中药材,2009(2):33-35.

LÜ J J, HU G S, LI J K, et al. Effects of precursor feeding and fungal elicitors on secondary metabolites in cell suspension culture of *Cistanche deserticola* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2009(2):33-35.

[32] 龚帅帅, 韩进, 高彦征, 等. 抑制剂和安全剂对高羊茅根中酶活性和菲代谢的影响[J]. 生态学报,2011,31(14):4027-4033.

GONG S S, HAN J, GAO Y Z, et al. Effects of inhibitor and safener on enzyme activity and phenanthrene metabolism in root of

tall fescue[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(14):4027-4033.

[33] 陈雄伟, 马艳萍, 徐锡增, 等. 多胺及其代谢抑制剂对盐胁迫下枣树叶绿体离子稳态和类囊体膜 H<sup>+</sup>-ATP 酶活性的影响[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(10):2-8.

CHEN X W, MA Y P, XUN X Z, et al. Effects of exogenous polyamines and polyamine metabolism inhibitors on and chloroplastsionic homeostasisand thylakoid membrane conjugated H<sup>+</sup>-ATPase activity of *Ziziphus jujuba* Mill. under salt stress[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2012, 32(10):2-8.

[34] 王晓娟, 李州, 彭燕. NO 参与 Spd 诱导白三叶抗氧化酶活性及其基因表达[J]. 草业学报, 2015, 24(4):140-146.

WANG X J, LI Z, PENG Y. The antioxidant enzyme activities and gene expression induced by spermidine in leaves of white clover[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(4):140-146.

[35] LIU J X, HU H B, WANG X, et al. Effects of nitric oxide on proline accumulation in ryegrass seedlings subjected to salt stress[J]. Acta Agrestia Sinica, 2009, 18(6):786-790.

[36] 王芳, 常盼盼, 陈永平, 等. 外源 NO 对镉胁迫下玉米幼苗生长和生理特性的影响[J]. 草业学报, 2013, 22(2):178-186.

WANG F, CHANG P P, CHEN Y P, et al. Effects of exogenous nitric oxide on seedling growth and physiological characteristics of maize seedlings under cadmium stress[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2013, 22(2):178-186.

[37] 徐茂军, 董菊芳, 朱睦元. NO 通过水杨酸(SA)或者茉莉酸(JA)信号途径介导真菌诱导子对粉葛悬浮细胞中葛根素生物合成的促进作用[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2006, 36(1):66-75.

XU M J, DONG J F, ZHU K Y. NO accommodate puerarin in kudzu suspension cell biosynthesis through SA and JA signaling pathways[J]. Science in China Ser. C: Life Sciences, 2006, 36(1):66-75.

(责任编辑 李文军  
责任编辑 周 禾)