

# 稀土元素对水母雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的影响

袁晓凡, 王谦, 赵兵, 王玉春

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要:**研究了稀土元素钕( $\text{Nd}^{3+}$ )、铈( $\text{Ce}^{3+}$ )、镧( $\text{La}^{3+}$ )和混合稀土(MRE)对摇瓶液体培养的水母雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的影响. 发现  $\text{Ce}^{3+}$  和  $\text{La}^{3+}$  及混合稀土可促进雪莲细胞的生长及黄酮类化合物的合成, 其中以  $\text{Ce}^{3+}$  效果最佳. 当初始浓度为 0.025 mmol/L 的  $\text{Ce}^{3+}$  添加到改良的 MS 培养基中时, 细胞生物量和黄酮类化合物产量最高, 分别可达 17.7 g/L 及 942 mg/L, 分别是不添加稀土元素的对照实验的 134.4% 和 166.7%; 同时发现在培养基中不含外源激素 6-BA 的条件下, 合适浓度的  $\text{Ce}^{3+}$  可替代 6-BA 对雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的促进作用, 而在培养基中不含 NAA 时,  $\text{Ce}^{3+}$  不能替代 NAA 对雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的促进作用.

**关键词:** 水母雪莲; 黄酮类化合物; 稀土元素; 植物细胞培养

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2004)04-0325-05

## 1 前言

雪莲(*Saussurea medusa* Maxim.)系菊科凤毛菊属植物,是我国高山地区常见的一种名贵中药材,具有散寒除湿、活血通络、抗癌、抗炎、抗疲劳等功效,民间用于治疗风湿性关节炎、妇女月经不调、胎衣不下、肺寒咳嗽、高山不适等症<sup>[1]</sup>. 它含有黄酮、生物碱、挥发油等多种有效成分,其中以黄酮为主<sup>[2]</sup>. 采用植物细胞培养技术进行雪莲细胞的大规模培养生产黄酮类化合物,既可以满足临床上对雪莲药物的需求,又可以保护自然资源,维护生态环境.

从 20 世纪 70 年代起,我国开展了稀土农用及植物生理作用研究,发现稀土能促进小麦、水稻等种子的发芽和幼苗的生长<sup>[3,4]</sup>. 随着人们对生物体系中广泛分布的稀土元素重要性的不断认识,稀土生物效应的研究已成为令人瞩目的热点领域,并取得了丰硕的成果. 近年来,应用稀土元素促进植物细胞培养过程中次生代谢物质合成的研究已有报道<sup>[5,6]</sup>.

本工作以水母雪莲愈伤组织细胞为实验材料,研究了稀土元素对摇瓶液体培养的水母雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的影响,初步探讨了其作用机理,同时还研究了在培养基中不含外源激素 6-苄氨基嘌呤(6-BA)或萘乙酸(NAA)的情况下,稀土元素对雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的影响.

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

实验选用由本实验室筛选得到的水母雪莲(*Saussurea medusa*)细胞系. 稀土  $\text{Ce}_2(\text{CO}_3)_3$ ,  $\text{NdCl}_3$  和  $\text{La}_2\text{O}_3$ , 纯度大于 99%, 上海跃龙有色金属公司生产. 混合稀土 MRE[含  $\text{La}_2\text{O}_3$  71.5%,  $\text{Ce}_2(\text{CO}_3)_3$  25.9%,  $\text{Pr}_6\text{O}_{11}$  3.44%,  $\text{Sm}_2\text{O}_3$  0.3%], 内蒙古包头稀土研究所生产.  $\text{NdCl}_3$  用蒸馏水溶解,  $\text{Ce}_2(\text{CO}_3)_3$ ,  $\text{La}_2\text{O}_3$  和 MRE 用稀硝酸溶解, 配成一定浓度的溶液备用.

收稿日期: 2003-08-18, 修回日期: 2003-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20076047)

作者简介: 袁晓凡(1972-), 女, 辽宁省沈阳市人, 博士, 助理研究员, 生物化工专业.

## 2.2 培养方法及条件

100 ml 三角瓶中装 40 ml 改良的 MS 培养基(附加 2.0 mg/L NAA, 0.2 mg/L 6-BA, 3%蔗糖) pH 5.8~5.9. 培养基灭菌后, 在超净工作台中接种 20 d 种龄的固体培养基上的细胞, 鲜重接种量保持在每瓶 2~2.5 g. 培养条件: 温度(25±1)°C, 2000 lux 光照 16 h/d 下培养 20 d, 摇床转速 110 r/min. 培养期间每隔 4 d 分别测量各三角瓶中雪莲细胞的干重、黄酮类化合物含量, 计算黄酮类化合物的产量; 测定培养液中残糖、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>及 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度.

## 2.3 实验测定与分析方法

培养结束后, 从三角瓶中取出雪莲细胞, 以滤纸吸净其表面水, 60°C 烘干至恒重, 此时称得的质量为干重(DW). 培养液的 pH 采用 Beckman 酸度计测定, 黄酮含量的测定参见紫外分光光度法<sup>[7]</sup>, 黄酮类化合物产量(mg/L)=黄酮含量(mg/g)×细胞浓度(g/L). 可溶性糖的测定采用蒽酮法<sup>[8]</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>及 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的测定分别参见文献<sup>[9,10]</sup>.

# 3 结果与讨论

## 3.1 稀土元素对雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的影响

培养基中添加不同的稀土元素对细胞生长及黄酮类化合物合成的影响见表 1. 从表可看出, 合适浓度的 Ce<sup>3+</sup>, La<sup>3+</sup>及混合稀土对细胞生长及黄酮类化合物合成都有一定的促进作用, 其中 0.025 mmol/L 的 Ce<sup>3+</sup>的促进作用最显著, 细胞最大生物量可达 17.7 g/L, 黄酮类化合物的产量可达 942 mg/L, 分别比不添加稀土元素的对照组高 34%及 67%. La<sup>3+</sup>的促进作用比 Ce<sup>3+</sup>低; 混合稀土主要由 La<sup>3+</sup>和 Ce<sup>3+</sup>组成, 其促进作用介于 Ce<sup>3+</sup>和 La<sup>3+</sup>之间; 而 Nd<sup>3+</sup>则抑制了雪莲细胞的生长及黄酮类化合物的合成. 从表中还可看出, 当培养基中添加了 0.001 和 0.005 mmol/L 的 La<sup>3+</sup>及 0.001 mmol/L 的 MRE 后, 实验结果比对照的结果偏低, 说明在此浓度范围内, 两种稀土对雪莲细胞的生长及黄酮的合成起抑制作用.

表 1 培养基中添加不同的稀土元素对细胞生长及黄酮类化合物合成的影响  
Table 1 Effects of concentrations of RE on cell growth and flavonoids production after 20 d culture

RE conc. (mmol/L)	La <sup>3+</sup>		Ce <sup>3+</sup>		Nd <sup>3+</sup>		Mixture of RE	
	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)
0.000	13.2±1.6	565±30	13.2±1.6	565±30	13.2±1.6	565±30	13.2±1.6	565±30
0.001	11.2±1.3	453±34	13.1±1.4	579±33	10.4±1.2	408±31	11.6±1.0	505±37
0.005	12.3±1.1	525±31	13.7±1.3	632±46	10.8±1.1	436±34	13.3±1.5	539±35
0.010	12.5±1.7	561±35	15.4±1.7	769±60	11.4±1.3	482±37	14.2±1.4	656±40
0.025	14.1±1.6	672±54	17.7±1.6	942±78	12.5±1.2	543±29	16.4±1.9	805±56
0.050	13.5±1.2	593±46	16.7±1.8	795±63	11.3±1.1	472±27	14.6±1.7	670±49
0.100	11.5±1.3	441±32	13.5±1.2	578±37	9.5±0.8	356±21	12.2±1.3	483±33
0.020	8.7±0.9	312±23	10.5±1.1	382±22	8.3±0.7	276±19	9.5±0.8	329±24

此外, 不同浓度的 4 种稀土元素对雪莲细胞生长与黄酮类化合物合成的促进作用都有其最适值, 超过最适浓度, 则起抑制作用. 推测高浓度的稀土可能会使多余的稀土离子在细胞膜表面积累, 使细胞膜表面的微观结构<sup>[6]</sup>和通透性<sup>[11]</sup>发生改变, 从而影响营养物质的传递和转运, 抑制细胞的生长及黄酮的合成.

## 3.2 Ce<sup>3+</sup>对雪莲细胞生长、黄酮类化合物合成及底物消耗动力学的影响

鉴于 0.025 mmol/L 的 Ce<sup>3+</sup>对雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的显著促进作用, 研究了在培养基中添加 0.025 mmol/L Ce<sup>3+</sup>时, 细胞的生长、黄酮类化合物的合成及底物消耗动力学, 并与未

添加  $Ce^{3+}$  的对照组进行了对比,从营养物质利用角度探讨了  $Ce^{3+}$  的作用机理. 由图 1 和 2 可知,培养基中添加  $Ce^{3+}$  后,细胞提前 2 d 进入对数生长期,细胞中的黄酮产量也相应地有所提高. 培养结束后,未添加  $Ce^{3+}$  的摇瓶中的糖从 25.7 g/L 降到 4.2 g/L,剩余 16%;而添加了 0.025 mmol/L  $Ce^{3+}$  的细胞在第 16 d 时已将糖利用完(图 3). 添加了  $Ce^{3+}$  的细胞对氮源( $NH_4^+$ 及  $NO_3^-$ )的利用也比未添加  $Ce^{3+}$  的细胞利用得快(图 4, 5). 由此可见,  $Ce^{3+}$  主要是促进了细胞对营养物质的利用,使细胞生长的延迟期缩短,快速进入对数生长期,从而促进了细胞的生长及黄酮类化合物的合成.

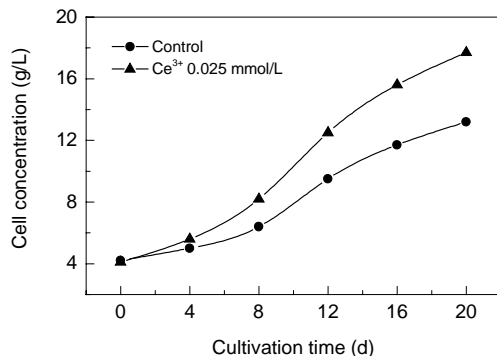


图 1 添加  $Ce^{3+}$  对细胞生物量的影响

Fig.1 Time course of cell growth with or without  $Ce^{3+}$  in the culture medium

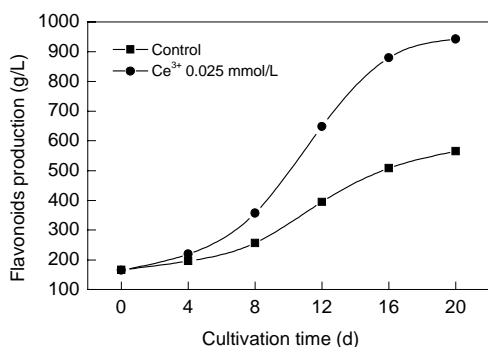


图 2 添加 0.025 mmol/L  $Ce^{3+}$  对黄酮产量的影响

Fig.2 Time course of flavonoids production with or without  $Ce^{3+}$  in the culture medium

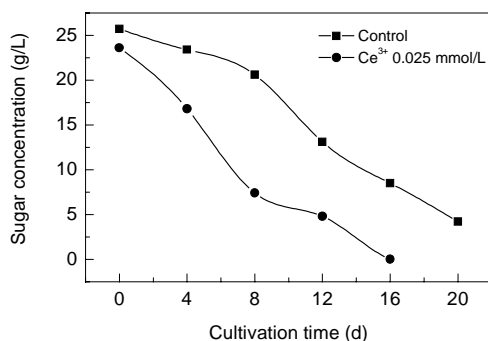


图 3 添加 0.025 mmol/L  $Ce^{3+}$  对总糖利用的影响

Fig.3 Time course of residual sugar with or without  $Ce^{3+}$  in the culture medium

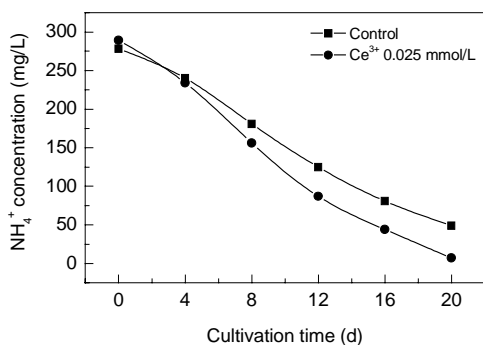


图 4 添加 0.025 mmol/L  $Ce^{3+}$  对  $NH_4^+$  利用的影响

Fig.4 Time course of residual ammonium with or without  $Ce^{3+}$  in the culture medium

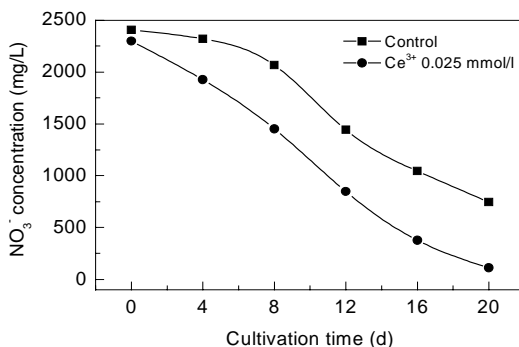


图 5 添加 0.025 mmol/L  $Ce^{3+}$  对  $NO_3^-$  利用的影响

Fig.5 Time course of residual nitrate with or without  $Ce^{3+}$  in the culture medium

### 3.3 以稀土元素替代外源激素 6-BA 和 NAA 对雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的影响

从理论上讲,稀土处理能促进植物生长,必然与植物体内促进生长的生长激素有一定的关系. 方能虎等<sup>[12]</sup>在研究稀土元素对水稻种子萌发初期内源激素含量的动态影响实验中发现,混合稀土使 IAA,  $GA_3$  和 ZT 分别提高了 58.4%, 37.5% 和 28.4%, 其中以 IAA 最显著,表明对生长产生了促

进作用. 在植物愈伤组织细胞的培养中, 必须添加一定量的外源激素以促进细胞的生长与分裂. 本工作中, 在雪莲细胞的培养基中去掉外源激素 6-BA 或 NAA, 代之以添加不同种类及浓度的稀土元素, 研究稀土元素对雪莲细胞生长及黄酮合成的影响.

实验表明, 当 0.005~0.05 mmol/L 的  $Ce^{3+}$  或 0.01~0.025 mmol/L 的混合稀土添加到不含 6-BA 的培养基中时, 细胞生物量、黄酮类化合物产量(表 2)都分别比不加稀土而含 NAA 和 6-BA 的 MS 培养基上得到的结果(13.2 g/L 及 565 mg/L, 表 1)高. 当添加初始浓度为 0.025 mmol/L 的  $Ce^{3+}$  时可得到最大的生物量及黄酮类化合物产量(分别为 15.7 g/L 及 750 mg/L). 这说明 0.005~0.05 mmol/L 的  $Ce^{3+}$  或 0.01~0.025 mmol/L 的混合稀土在液体培养条件下可替代 6-BA 对雪莲细胞生长及黄酮合成的促进作用, 其中 0.025 mmol/L 的  $Ce^{3+}$  效果最佳. 表 3 的结果表明, 当 0.01 mmol/L 的  $Ce^{3+}$  添加到不含 NAA 的培养基中时, 得到了最大的生物量及黄酮类化合物产量(12.0 g/L 及 548 mg/L), 但比同时添加 6-BA 和 NAA 而不添加稀土元素时所得到的结果(13.2 g/L 及 565 mg/L 表 1)稍低. 因此,  $Ce^{3+}$  不能替代 NAA 对雪莲细胞生长及黄酮合成的促进作用.

表 2 培养基中以不同的稀土元素替代 6-BA 时对雪莲细胞生长及黄酮合成的影响

Table 2 Effects of RE conc. on cell growth and flavonoids production without 6-BA but with NAA in the culture medium after 20 d culture

RE conc. (mmol/L)	$La^{3+}$		$Ce^{3+}$		$Nd^{3+}$		Mixture of RE	
	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)
0.000	10.5±1.2	414±33	10.5±1.2	414±33	10.5±1.2	414±33	10.5±1.2	414±33
0.001	10.3±1.1	383±27	12.0±1.1	484±28	8.4±0.7	319±22	11.2±1.3	441±32
0.005	11.2±1.4	443±38	14.2±1.6	606±43	8.8±0.9	343±25	12.5±1.4	505±38
0.010	11.4±1.3	480±27	14.5±1.8	663±46	9.2±0.8	377±30	13.2±1.6	576±40
0.025	12.6±1.5	561±30	15.7±1.7	750±51	10.7±1.2	450±34	13.8±1.5	643±44
0.050	11.8±1.2	504±28	14.4±1.3	665±39	9.4±1.1	373±28	12.6±1.2	570±39
0.100	10.4±1.4	407±26	12.1±1.0	537±34	7.6±0.6	292±21	10.8±1.1	463±31
0.200	8.3±0.9	310±18	10.0±0.8	391±29	6.2±0.5	226±18	9.1±1.0	350±27

表 3 培养基中以不同的稀土元素替代 NAA 时对雪莲细胞生长及黄酮合成的影响

Table 3 Effects of concentrations of REEs on cell growth and flavonoids production without NAA but with 6-BA in the culture medium after 20 d culture

RE conc. (mmol/L)	$La^{3+}$		$Ce^{3+}$		$Nd^{3+}$		Mixture of RE	
	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)	Cell conc. (g/L)	Flavonoids production (mg/L)
0.000	9.3±0.8	375±24	9.3±0.8	375±24	9.3±0.8	375±24	9.3±0.8	375±24
0.001	6.3±0.5	229±16	9.2±1.0	384±21	4.9±0.5	171±14	6.9±0.8	263±25
0.005	8.4±0.7	342±21	10.8±1.2	469±33	6.8±0.8	261±19	9.4±0.7	394±32
0.010	9.7±0.8	420±23	12.0±1.1	548±41	8.3±0.7	334±22	11.2±1.4	504±37
0.025	8.8±1.0	364±28	10.8±1.3	480±43	7.8±0.5	302±24	9.4±1.1	412±38
0.050	7.5±0.9	297±32	9.6±0.8	407±30	6.8±0.6	256±18	7.9±0.7	322±24
0.200	5.6±0.6	198±27	5.7±0.7	208±15	4.3±0.3	149±16	4.9±0.6	178±20

稀土元素  $Ce^{3+}$  能够在一定浓度范围内替代 6-BA 对雪莲细胞生长及黄酮合成的促进作用, 可能是它能与胞内的特定酶发生作用, 促进营养物质的吸收、利用和转化, 从而加速雪莲细胞的生长. 已有研究<sup>[13,14]</sup>表明, 适宜浓度的硝酸铈能够提高水稻种子萌发期的呼吸速率、提高淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶等水解酶的活性, 从而促进幼苗的生长. 此外, 据报道苯丙氨酸解氨酶是黄酮类化合物合成过程中的第一个关键酶<sup>[15]</sup>, 它的活性与黄酮类化合物的合成具有正相关特性. 在南方红豆杉细胞悬浮培养的研究中发现, 铈的加入可以显著提高苯丙氨酸解氨酶的活性<sup>[5]</sup>, 并且能够改变红豆杉细胞的超微结构, 促进细胞的分化<sup>[6]</sup>.

在细胞、亚细胞和分子水平上深入探讨稀土元素对雪莲细胞生长和黄酮类化合物合成的影响机理的研究还有待进一步开展。

## 4 结论

(1) 一定浓度的  $Ce^{3+}$  及  $La^{3+}$ 、混合稀土可促进雪莲细胞的生长及黄酮类化合物的合成, 其中以 0.025 mmol/L 的  $Ce^{3+}$  效果最佳, 使雪莲细胞生物量和黄酮类化合物产量分别比对照实验提高了 34.4% 和 66.7%。

(2) 在培养基中不含外源激素 6-BA 的条件下, 适当浓度的  $Ce^{3+}$  可替代 6-BA 对雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的促进作用。

(3) 在培养基中不含外源激素 NAA 时,  $Ce^{3+}$  不能替代 NAA 对雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的促进作用。

参考文献:

- [1] 李君山, 蔡少青. 雪莲花类药材的化学和药理研究进展 [J]. 中国药学杂志, 1998, 33(8): 449-452.
- [2] 陈发菊, 杨映根, 赵德修, 等. 我国雪莲植物的种类、生境分布及化学成分的研究进展 [J]. 植物学通报, 1999, 16(5): 561-566.
- [3] 汪华源. 我国稀土农用专题文献研究 [J]. 稀土, 1998, 19(2): 68-72.
- [4] 宁加贵. 稀土在农业上应用 [M]. 湖南: 湖南科技出版社, 1988. 94.
- [5] 葛志强, 李景川, 元英进, 等.  $Ce^{4+}$  对悬浮培养南方红豆杉细胞 DNA 含量和 PAL 活性的影响 [J]. 稀土, 2000, 21(5): 35-37.
- [6] 胡国武, 元英进. 硝酸铈对红豆杉细胞培养及紫杉醇合成的影响 [J]. 稀土, 2000, 21(2): 49-51.
- [7] 沙世炎. 中草药有效成分分析法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 232.
- [8] 薛应龙. 植物生理学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 136-138.
- [9] Weatherburn M V. Phenol-hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia [J]. J. Anal. Chem., 1967, 39: 971-974.
- [10] 王令今, 张振宇. 分析化学 [M]. 北京: 北京化学工业出版社, 1988. 351-353.
- [11] 焦根林, 汤锡珂, 吴兆明. 氯化镧对玉米根组织膜透性的影响 [J]. 中国稀土学报, 1992, 10(3): 256-258.
- [12] 方能虎, 洪法水, 赵贵文. 稀土元素对水稻种子萌发初期的酶活性和内源激素含量的动态影响 [J]. 稀土, 2001, 22(1): 31-34.
- [13] 郭伯生. 稀土在生物领域中应用研究进展 [J]. 稀土, 1999, 20(1): 64-68.
- [14] 洪法水, 方能虎, 顾月华, 等. 硝酸铈对水稻种子萌发期间酶活性的影响 [J]. 稀土, 1999, 20(3): 45-47.
- [15] 赵德修, 李茂寅. 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 [J]. 生物工程学报, 2000, 16(1): 99-102.

## Promotion of Cell Growth and Flavonoids Production in *Saussurea medusa* Cell Suspension Cultures by Rare Earth Elements

YUAN Xiao-fan, WANG Qian, ZHAO Bing, WANG Yu-chun

(State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, CAS, Beijing 100080, China)

**Abstract:** Cell suspension culture of *Saussurea medusa* was cultivated with either  $Ce^{3+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$  or a mixture of rare earth elements (MRE) supplemented. After 20 d culture, moderate concentrations of  $Ce^{3+}$ ,  $La^{3+}$  and MRE can promote cell growth and flavonoids biosynthesis, while  $Nd^{3+}$  presented an inhibiting effect.  $Ce^{3+}$  at 0.025 mmol/L, gave the highest cell dry weight (17.7 g/L) and flavonoids production (942 mg/L) with both NAA and 6-BA in the culture medium. They were 34% and 67% higher than those without  $Ce^{3+}$  addition, respectively.  $Ce^{3+}$  at 0.005~0.05 mmol/L or the mixture of rare earth elements at 0.01~0.025 mmol/L, can substitute for 6-BA in promoting cell growth and the biosynthesis of total flavonoids of *S. medusa* while without 6-BA in the culture medium. When NAA were removed from the culture medium, none of the four rare earth elements can substitute for it in promoting *S. medusa* cell growth and the flavonoids biosynthesis. The kinetic curves of cell biomass, flavonoids production, residual sugar,  $NH_4^+$  and  $NO_3^-$  concentration with or without 0.025 mmol/L  $Ce^{3+}$  in the culture medium were also obtained. The mechanism of the promotion effect of  $Ce^{3+}$  on cell growth and the biosynthesis of total flavonoids of *Saussurea medusa* was explained in some degree.

**Key words:** *Saussurea medusa*; rare earth element; flavonoids production; plant cell culture