

稀土元素对冬凌草细胞合成冬凌草甲素的影响

刘晨 李冬杰 李楠 薛志忠 冯丹 魏景芳* (河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

摘要 [目的] 探讨稀土元素对冬凌草细胞合成冬凌草甲素的影响。[方法] 以冬凌草悬浮培养细胞为材料, 研究不同浓度的2种稀土离子镧和亚铈对冬凌草细胞分泌和释放冬凌草甲素的影响。[结果] 添加不同种类、不同浓度的稀土离子均可促进冬凌草甲素的合成。添加镧离子的细胞合成的冬凌草甲素明显高于添加铈离子的细胞。当细胞处于延滞期时, 添加稀土元素并未产生明显的影响; 悬浮培养指数期和稳定期加入稀土元素, 均可促进冬凌草细胞对冬凌草甲素的合成, 且在稳定期添加稀土元素的效果更加显著。在稳定期加入500 μ 镧溶液的培养液, 获得的冬凌草甲素含量最高, 可达28.89 ng/g。[结论] 该研究为冬凌草细胞的工业化生产奠定了基础。

关键词 稀土元素; 冬凌草细胞; 悬浮培养; 冬凌草甲素

中图分类号 Q945 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)13-05965-02

Effects of Rare Earth Elements on the Synthesis of Rubescensin A in *Robdosia rubescens* Cell

LIU Chen et al (College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018)

Abstract [Objective] The aim was to discuss the effect of rare earth elements on rubescensin A synthesis by *Robdosia rubescens* cell. [Method] With suspension culture cell of *R. rubescens* as material, the effect of 2 kinds of rare earth ions, lanthanum and cerous nitrate, with different concn. on the rubescensin A excreted and released by *R. rubescens* cell were studied. [Result] Adding different kinds and concn. rare earth ions all could promote the synthesis of rubescensin A. The rubescensin A synthesized by the cell added lanthanum ion was obvious higher than that added cerium ion. When the cell was in the lag phase, adding rare earth elements could not produce obvious effect, while adding rare earth elements in the exponential phase and stationary phase of suspension culture all could promote *R. rubescens* cell to synthesize rubescensin A, and the effect of adding rare earth elements in the stationary phase was more prominent. Adding 500 μ lanthanum solution to the culture solution in the stationary phase, the obtained rubescensin A content was highest, being 28.89 ng/g. [Conclusion] The research laid the foundation for the industrial production of *R. rubescens* cell.

Key words Rare earth element; *Robdosia rubescens* cell; Suspension culture; Rubescensin A

冬凌草 [*Robdosia rubescens* (Hensl) Hara.] , 又名冰凌草、冰凌花, 为唇形科香茶菜属多年生草本或亚灌木植物, 是近年发现的一种天然抗癌抑菌植物。从冬凌草中分离出一种含量较高的强苦味物质——冬凌草甲素, 属于二萜类物质, 是一种较强的抗癌物质。因其对肿瘤有较好的活性, 且其抗癌活性有较强的选择性及低毒性, 在临床中被广泛应用。由于冬凌草甲素主要从植物冬凌草中提取, 随着市场需求的增大, 冬凌草资源严重匮乏, 致使其药用成分的获得受到阻碍。因此, 利用植物细胞培养技术直接生产冬凌草甲素具有特殊意义, 而如何提高细胞中冬凌草甲素的含量已成为关注的热点。利用某些分子生物及重金属盐作为促进细胞合成与释放次级代谢物质的诱导因子已普遍采用, 其中, 稀土元素在体外培养动物细胞中应用较为广泛, 但在植物组织和细胞培养中的应用仅有少量报道。鉴于稀土元素对植物细胞次生代谢产物的积累有一定的促进作用, 笔者研究镧、铈的化合物对冬凌草细胞悬浮培养中冬凌草甲素合成的影响, 为进一步探讨稀土元素对生物体的作用提供更多的证据, 也为冬凌草细胞培养寻求一类有效的诱导因子, 以提高冬凌草甲素的释放, 进而为冬凌草细胞的工业化生产奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 采用的细胞株系由冬凌草当年生嫩茎诱导而来, 在改良的 MS 培养基(2,4-D 1.0 ng/L, NAA 0.5 ng/L, 6-BA 0.1 ng/L, 30 g/L 蔗糖, Vc 0.1 ng/L, pH 值为 5.8) 中保持和继代。挑选在改良的 MS 固体培养基上多次继代的冬凌草愈伤组织细胞转接入 MS 液体培养基中, 培养温度 25 $^{\circ}$ C, 摇床 110 r/min, 于黑暗处培养。冬凌草草药为市售。培养基所用试剂为国产分析纯, 冬凌草甲素标品为成都曼斯特生物有限

公司生产, 碳酸镧、碳酸亚铈、95% 乙醇均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 稀土溶液的配制^[1]。碳酸镧(相对分子质量 457.8)、碳酸亚铈(相对分子质量 460.2) 各取 0.4578、0.4602 g, 分别用浓盐酸定容至 100 mL, 然后各取 10 mL 用去离子水定容至 1 L, 即配成终浓度为 0.1 mmol/L 的镧溶液、0.1 mmol/L 的铈溶液。再用 1 mol/L 的 NaOH 和 1 mol/L 的 HCl 将两溶液 pH 值调至 5.8, 通过细菌过滤器(0.22 μ m 滤膜) 过滤到无菌试剂瓶中保存、备用。

1.2.2 添加稀土元素的冬凌草细胞的悬浮培养。将悬浮培养的冬凌草细胞在相同的培养条件下分别在不同的细胞生长时期加入不同种类、不同浓度的稀土元素进行悬浮培养。

1.2.3 冬凌草甲素标准曲线的绘制。依次量取冬凌草甲素的标准溶液 10、50、100、200、300、500 μ L, 加入 95% 乙醇, 使终体积达到 1 mL, 充分摇匀。以无菌水做对照, 用紫外分光光度计在 238 nm 的紫外光下^[2], 以浓度 (C) 对吸光度 (A) 作图, 建立标准曲线及回归方程。其中, 冬凌草甲素的标准溶液浓度为 1 ng/mL。

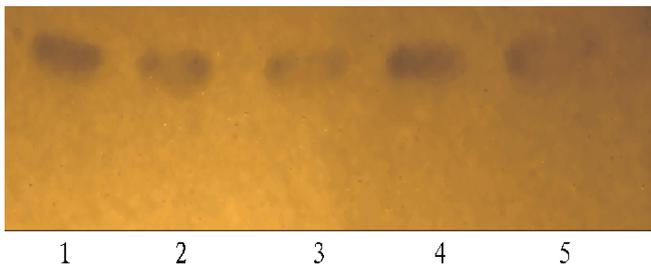
1.3 冬凌草甲素的萃取 取冬凌草草药 0.5 g, 用蒸馏水清洗过后, 放入研钵中研磨, 加入 40 mL 95% 乙醇, 超声波振荡破碎细胞 10 min, 浸泡 24 h, 放入离心机离心 10 min (3 600 r/min, 4 $^{\circ}$ C), 取出上清液过滤脱色, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 备用。

取悬浮培养的愈伤组织, 称取 1 g, 加入 95% 乙醇 50 mL, 超声波振荡破碎细胞 5 min, 浸泡 24 h, 将其置放入离心机离心 10 min (3 600 r/min, 4 $^{\circ}$ C), 取出上清液, 重复上述操作 1 次。合并所得的上清液, 过滤、活性炭脱色作为待测样品。

2 结果与分析

2.1 稀土元素对冬凌草甲素产生的影响(定性分析) 将冬凌草草药和冬凌草的悬浮细胞(添加稀土元素, 未添加稀土元素) 采用“1.3”的方法处理。在相同的处理条件下, 量取待

测样品10 μ 点于GF₂₅₄ 硅胶板上。选择氯仿 甲醇=13 2 作为展开剂^[3], 于254 nm 的紫外光下观察薄层层析结果, 做样品的定性检验。其结果见图1。



注:1 为冬凌草甲素的标准品,2 为未添加稀土元素的悬浮细胞,3 为添加稀土元素铈的悬浮细胞,4 为添加稀土元素镧的悬浮细胞,5 为草药提取液。

Note:1,Standard substance of rubescensin A;2,Suspension cells without adding rare earth elements;3,Suspension cells with adding rare earth element Ce;4,Suspension cells with adding rare earth element La;5,Extracts from herbal medicine.

图1 冬凌草甲素检测的薄层层析

Fig.1 The thin layer chromatography for detecting rubescensin A

薄层层析结果显示, 草药与悬浮细胞均跑出与标品位置相接近的黑点, 说明试验所采用的悬浮细胞均含有冬凌草甲素。

2.2 稀土元素对冬凌草甲素含量的影响(定量分析)

2.2.1 标准曲线的绘制。根据“1.2.3”的方法绘制冬凌草甲素的标准曲线, 结果见图2。由图2可知, 回归方程为 $A = 2.3682574C + 0.033804$, 相关系数 $r = 0.998877$ 。

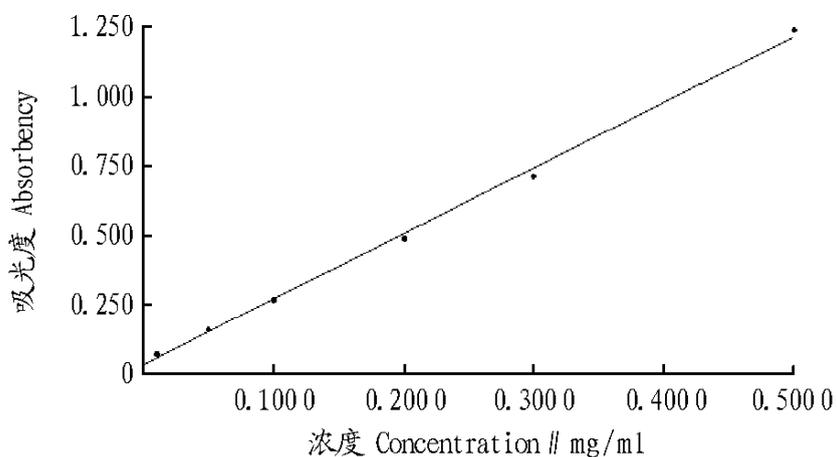


图2 冬凌草甲素标准品的标准曲线

Fig.2 The standard curve of rubescensin A standard substance

2.2.2 冬凌草甲素含量的测定。吸取处理的样品液用紫外分光光度计作定量检验。吸取待测样品液1 ml, 以无菌水作对照, 测待测样品液的吸光度(A)。根据标准曲线及回归方程计算出样品待测液中冬凌草甲素的含量(C)。冬凌草甲素含量(ng/g) = (冬凌草样品液的甲素浓度 \times 样品稀释倍数) / 待测样品质量。式中, 待测冬凌草悬浮培养细胞样品质量为1 g, 样品稀释倍数为100 ml; 冬凌草草药样品质量为0.5 g, 样品稀释倍数为40 ml。

2.2.3 稀土元素对冬凌草甲素含量的影响。将悬浮培养的冬凌草细胞在培养条件相同的情况下分为若干组, 同时进行试验。其中1~6组在培养初期(第1天)加入稀土元素, 1~3组添加镧溶液, 加入量分别为50、500、5000 μ ; 4~6组添加铈溶液, 加入量分别为50、500、5000 μ 。7~12组在培养指数期(即延滞期末期, 第3天)加入稀土元素, 7~9组添加镧溶液, 加入量分别为50、500、5000 μ ; 10~12组添加铈溶液, 加入量分别为50、500、5000 μ 。13~18组在培养稳定期(即指数期

末期, 第15天)加入稀土元素, 13~15组添加镧溶液, 加入量分别为50、500、5000 μ ; 16~18组添加铈溶液, 加入量分别为50、500、5000 μ 。19组采用未加入稀土元素的悬浮细胞进行悬浮培养。将不同的冬凌草悬浮系(1~19组)至25 d收获, 采用“1.3”的方法处理。在相同的处理条件下, 对样品中的冬凌草甲素进行定量检测, 结果见表1。

表1 添加稀土元素对冬凌草甲素含量的影响

Table 1 Influences of adding rare earth elements on the content of rubescensin A

样品 Samples	时期 Phase	稀土元素 Rare earth elements	加入量 Addition μ	吸光度 Absorbency	冬凌草甲素含量 Rubescensin A content ng/g
1	培养初期	镧 La	50	0.320	12.08
2			500	0.389	15.00
3			5000	0.372	14.28
4		铈 Ce	50	0.305	11.45
5			500	0.378	14.53
6			5000	0.333	12.63
7	培养指数期	镧 La	50	0.431	16.77
8			500	0.580	23.06
9			5000	0.557	22.09
10		铈 Ce	50	0.347	13.22
11			500	0.469	18.38
12			5000	0.444	17.32
13	培养稳定期	镧 La	50	0.480	18.84
14			500	0.718	28.89
15			5000	0.652	26.10
16		铈 Ce	50	0.457	17.87
17			500	0.583	23.19
18			5000	0.561	22.26
19	-	-	-	0.285	10.61
草药 Herbal medicine	-	-	-	0.156	4.13

不同时期添加不同浓度的稀土元素对冬凌草甲素含量的影响, 其变化关系如图3、4所示。

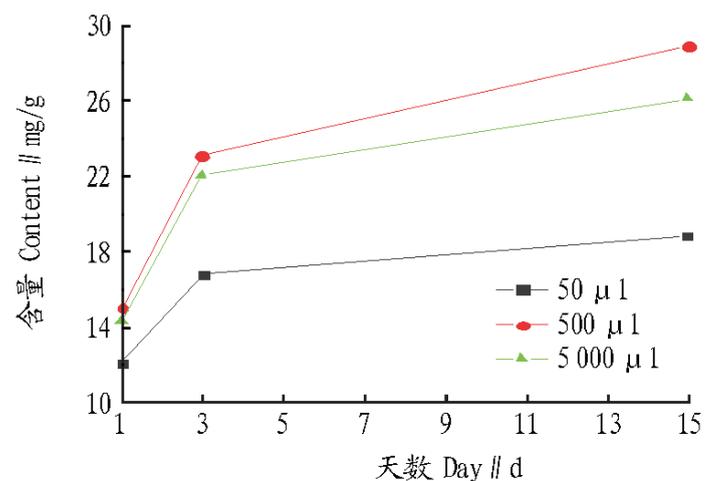


图3 添加镧对冬凌草甲素的影响

Fig.3 Influences of adding La on the content of rubescensin A

相同的培养条件下分别在不同的细胞生长时期加入不同种类、不同浓度的稀土元素对细胞合成冬凌草甲素的影响强弱不同, 添加镧离子的细胞合成的冬凌草甲素明显高于添加铈离子的细胞, 未添加稀土元素的细胞合成的冬凌草甲素较低, 因此, 添加稀土元素均在不同程度上提高了冬凌草甲素的含量。并且在细胞生长的稳定期添加稀土元素对细胞合成冬凌草甲素的影响均高于在细胞生长的其他时期。其

(下转第5969页)

的⁹⁻¹¹。氧化胁迫会造成质膜大分子物质的降解,并引起膜通透性加大¹²。一般来说,耐逆性植物在逆境环境中的膜损伤较小,因此它们的膜透性较低,电导率较小。而且MDA含量也是衡量植物在逆境条件下氧化损伤程度大小的一个重要指标。MDA是膜脂质过氧化产生的一种细胞毒产物,它的含量可以作为衡量体内自由基多少的标志¹³。试验结果表明,在0.3%、0.5%、0.8% NaCl胁迫下,薄荷植株的电导率和MDA含量变化平缓,说明在低浓度盐胁迫下,薄荷膜脂质过氧化反应并不激烈,对膜系结构和功能的破坏不是很大,使植株细胞仍能维持其高度有序的结构而不会死亡。在1.0%、1.2% NaCl胁迫下,植株的电导率和MDA含量都有了急剧升高,说明高浓度的NaCl胁迫对植株造成了较严重的伤害。

(3) 试验结果显示,椒样薄荷植株在低浓度NaCl胁迫时能维持叶片中较低的Na⁺含量,推测可能是在植株根部储存了较多的Na⁺,以阻止Na⁺在地上部分积累,从而减少Na⁺对叶片的伤害,提高了植物的耐盐性¹⁴⁻¹⁵。抗氧化酶如CAT等在清除或降低活性氧产生及缓解活性氧积累对植物造成伤害方面起重要作用¹⁶⁻¹⁷。试验表明,轻度离子胁迫下薄荷过氧化氢酶活性逐渐增强,而重度离子胁迫下其活性降低,此时薄荷清除活性氧的能力降低。过氧化氢酶活性增强可能是氧自由基诱导产生H₂O₂,而H₂O₂又诱导过氧化氢酶活性增强,来清除H₂O₂,使叶绿体不致受自由基的攻击而避免伤害¹⁸⁻¹⁹。高浓度离子胁迫时叶片过氧化氢酶活性急剧下降的原因可能是H₂O₂的积累和部分酶的光失活所引起的。

(4) 试验结果表明,椒样薄荷能耐受0.8% NaCl胁迫,在该浓度下,薄荷植株能正常生长,并维持较高的含水量、较低的渗透势、较低的电导率和MDA含量以及较高的CAT酶活性,而在遭受更高的NaCl胁迫时会受到一定程度的伤害。综上所述,椒样薄荷有一定的耐盐性,综合其耐寒、抗病虫、耐瘠薄、繁殖力强、适应性广等生长特点和易于栽培、经济效益好等优点,因此认为椒样薄荷值得在盐渍地大力推广

(上接第5966页)

中,在稳定期(即指数期末期),加入镧溶液500 μl培养液获得的冬凌草甲素含量最高,可达28.89 ng/g。

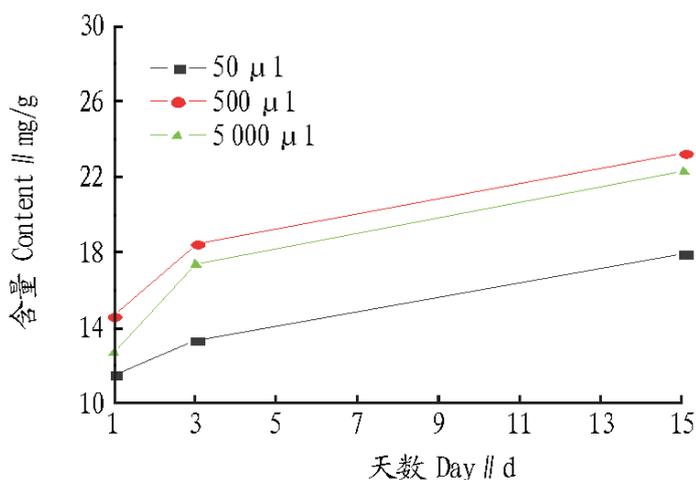


图4 添加镧对冬凌草甲素的影响

Fig.4 Influences of adding Ce on the content of rubescensin A

3 讨论

冬凌草甲素是冬凌草细胞在培养的过程中产生的次生代谢产物。目前,有关研究冬凌草细胞合成冬凌草甲素的报道不多,在冬凌草细胞培养中添加诱导因子的报道甚少,

种植。

参考文献

- [1] 苟兴文, 奚宏涛. 椒样薄荷优质高产栽培技术研究[J]. 西北农业学报, 2002, 11(4): 72-76.
- [2] 陈小军. 椒样薄荷高产栽培技术[J]. 新疆中草药, 2008(7): 72-73.
- [3] 姜殿勤, 姜滨, 张俭卫. 野薄荷实用价值及人工栽培[J]. 特种经济动植物, 2008(1): 36-37.
- [4] 许鹏翔, 贾卫民, 毕良武, 等. 中国新疆椒样薄荷油的化学成分分析及品种研究[J]. 林产化学与工业, 2003, 23(1): 43-45.
- [5] 苟兴文, 奚宏涛. 陕西椒样薄荷精油的成分分析及品质研究[J]. 香料香精化妆品, 2002(1): 8-10.
- [6] ZHANG X, ZHOUS, FUY, et al. Identification of a drought tolerant introgression line derived from Dongxiang common wild rice (*O. rufipogon* Giff.) [J]. *Hort. Mol. Biol.*, 2006, 62: 247-259.
- [7] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 131-135.
- [8] LUZ, NEUMANN P. Water stress inhibits hydraulic conductance and leaf growth in rice seedlings but not the transport of water via mercury-sensitive water channels in the root [J]. *Hort. Physiol.*, 1999, 120(1): 143-52.
- [9] 胡学俭, 孙明高, 夏阳. NaCl胁迫对无花果与海棠膜脂过氧化作用及保护酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(5): 937-943.
- [10] 毛桂莲, 哈新芳, 孙婕, 等. NaCl胁迫下枸杞愈伤组织可溶性蛋白含量的变化[J]. 宁夏大学学报: 自然科学版, 2005, 26(1): 64-66.
- [11] 田敏, 饶龙兵, 李纪元. 植物细胞中的活性氧及其生理作用[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2): 235-241.
- [12] BARTOSZ G. Oxidative stress in plant [J]. *Acta Physiol. Hort.*, 1997, 19: 47-64.
- [13] KUNERT K, EDERER M. Leaf aging and lipid peroxidation: the role of antioxidants vitamin C and E [J]. *Hort. Physiol.*, 1985, 65: 85-88.
- [14] 杨敏生, 李艳华, 梁海永, 等. 盐胁迫下白杨无性系苗木体内离子分配及比较研究[J]. 生态学报, 2003, 23(2): 271-278.
- [15] GARCIA F, JIFON J, CARVAJAL M. Gas exchange, chlorophyll and nutrient contents in relation to Na⁺ and Cl⁻ accumulation in 'surburst' mandarin grafted on different rootstocks [J]. *Hort. Sci.*, 2002, 162: 705-712.
- [16] 何金环, 李存法, 梁月丽, 等. 植物细胞活性氧及其胞内信号转导[J]. 河南农业科学, 2005(8): 18-20.
- [17] HERNANDEZ J, CORPAS F, GOMEZ M, et al. Salt induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria [J]. *Physiol. Hort.*, 1993, 89: 103-110.
- [18] 苗雨晨, 董发才, 宋纯鹏. 过氧化氢——植物体内的一种信号分子 [J]. 生物学杂志, 2001, 18(2): 4-6.
- [19] KAR M, MISHRA D. Catalase peroxidase and polyphenolase activities during rice leaf senescence [J]. *Hort. Physiol.*, 1976, 57: 315-319.

试验主要研究稀土元素对冬凌草细胞合成冬凌草甲素的影响。相关研究表明,稀土元素本身并不能进入细胞,但其作为一种非生物诱导因子,在诱导培养中,不仅能改变细胞膜通透性促进次生代谢产物分泌到培养基当中,还可能使次生代谢中特有的基因转录增强,进而促进次生代谢产物的合成。由试验结果可以看出,稳定期(即指数期末期),加入镧溶液500 μl的培养液获得的冬凌草甲素含量最高,可达28.89 ng/g,说明镧可以作为一种有效的诱导因子用以提高冬凌草甲素的合成。试验表明,当细胞处于延滞期时,添加稀土元素并未产生明显的影响;悬浮培养指数期和稳定期加入稀土元素,均可发现其明显增强次生代谢作用,促进了冬凌草细胞对冬凌草甲素的合成,且在稳定期添加稀土元素的效果更加显著。

参考文献

- [1] 刘颖, 魏景芳, 李冬杰, 等. 稀土元素对甘草细胞生长及甘草酸合成的影响[J]. 广西植物, 2006, 26(1): 101-104.
- [2] 赵清治, 晁金华, 王汉清. 注射剂“癌得宁”中冬凌草甲素含量的紫外分光光度定量测定[J]. 河南医学院学报, 1981, 16(2): 351-354.
- [3] 赵世明, 伦西全. 薄层扫描法测定冬凌草叶中冬凌草甲素的含量[J]. 中成药研究, 1987(9): 33.