

文章编号:1671-6833(2004)03-0022-04

小叶丁香的悬浮细胞培养研究

吴鸣建

(郑州大学化工学院, 河南 郑州 450002)

摘要:小叶丁香(*Syringa pubescens* Turcz.) 为木犀科(Oleaceae) 丁香属(*Syringa*) 植物, 其中主要药用有效成分为属于裂环烯醚萜苷类化合物的橄榄苦苷. 选择小叶丁香的叶、茎、芽为外植体, 在 MS 和 LS 等培养基上进行愈伤组织诱导与培养, 并在继代 3 次以后转入悬浮细胞培养, 测定了悬浮培养的细胞生长周期, 首次建立了小叶丁香的悬浮细胞培养体系; 采用 RP-HPLC 方法测定悬浮细胞培养物和培养液中橄榄苦苷的含量, 并且利用 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 确定其结构.

关键词:小叶丁香; 橄榄苦苷; 悬浮细胞培养

中图分类号:R 286.2; Q 949.6

文献标识码:A

0 引言

小叶丁香(*Syringa pubescens* Turcz.), 又名毛丁香、巧玲花等, 为木犀科(Oleaceae) 丁香属(*Syringa*) 灌木植物, 多为野生, 生长在海拔 800~2 400 m 山地、沟内或崖石上, 分布于河南、河北、陕西、山西、甘肃等地, 河南省则主要分布于伏牛山和太行山脉^[1]. 药用未见文献报道, 亦未被收录于各版药典. 在豫西部分地区, 民间将其作为药茶, 即用小叶丁香的花、实晾干后泡茶饮用, 具有消炎、镇咳、治疗肝炎和肝硬化之疗效.

橄榄苦苷(oleuropein) 具有多种药理作用, 例如, 抗菌抗炎、抗病毒、抗真菌、抗癌、抗氧化、降血压与抗心律不齐、降血糖等^[2~7]. 研究结果表明^[8], 橄榄苦苷是小叶丁香中的主要有效成分, 具有很好的药用价值与开发前景. 本文选择了以小叶丁香为外植体进行悬浮细胞培养生成橄榄苦苷的研究, 为进一步解决小叶丁香的资源问题探索有效途径.

1 实验部分

1.1 外植体的来源与选择

外植体采自河南省嵩县车村镇南山坡, 经河南农业大学朱长山教授鉴定为木犀科(Oleaceae)

丁香属(*Syringa*) 植物小叶丁香(*Syringa pubescens* Turcz.) .

选取生长良好、健康的小叶丁香的植物叶片、嫩茎、芽或根尖, 清洗干净并用 0.1% HgCl_2 溶液处理后, 用无菌滤纸吸干水分, 将叶片切成正方形(约 5 mm × 5 mm)、茎或根切成段(长约 6~8 mm), 置于无菌容器中备用.

1.2 愈伤组织的诱导

将消毒灭菌处理后的外植体放入分别附加植物生长调节剂(PGR), 并经过灭菌的培养基表面, 置于培养箱中进行愈伤组织诱导. 诱导条件分别采用暗诱导(无光照) 和光诱导(10 h/d), 诱导温度为 25 °C.

1.3 愈伤组织的继代培养

愈伤组织生长到一定时间后进行转接继代. 选择生长良好、健壮的愈伤组织并将大的愈伤组织切成小块(直径约为 3~5 mm), 放入相应的新培养基上继续培养. 继代培养所选用的培养基为 LS 培养基或 MS 培养基, 所用的植物生长调节剂和培养条件与愈伤组织诱导条件相同.

1.4 悬浮细胞培养体系的建立

挑选松散性好, 健康的愈伤组织, 继代 3 次以后, 在无菌条件下分别放入装有 25 mL 液体培养基的锥形瓶内, 加入已消毒灭菌的玻璃珠振摇后,

收稿日期:2004-04-07; 修订日期:2004-06-18

基金项目:河南省自然科学基金资助项目(0411034300); 河南省重点科技攻关项目(0423022800)

作者简介:吴鸣建(1957-), 女, 河南省郑州市人, 郑州大学副教授, 博士, 主要从事有机化学、天然产物与制药工程方面的教学与研究.

置于振荡培养箱中进行水平振荡培养,培养条件为培养温度 25℃,光照 10~12 h/d,转速 110~120 r/min.

1.5 悬浮细胞生长的测定

定时测定悬浮细胞培养试样,并与空白样对照,计算细胞的相对生长量,培养一定时间后,定期取出样品,过滤出培养物,经蒸馏水冲洗,用滤纸吸干细胞表面的水分,测定鲜重;干燥至恒重测定细胞干重. 悬浮细胞生长量(P)、细胞增长率(L ,%) 和生长倍数(S) 分别按下式计算:

$$P=W_F-W_{F0};$$
$$L=\frac{W_D-W_{D0}}{W_{D0}}\times 100\%;$$
$$S=\frac{W_F}{W_{F0}}.$$

式中: W_F 为收获鲜重; W_{F0} 为接种鲜重; W_D 为收获干重; W_{D0} 为接种干重.

1.6 橄榄苦苷的提取和含量测定

将收获的悬浮细胞置于恒温干燥箱中,在 40℃下烘干至恒重后研碎,加入无水乙醇或甲醇回流 3 次,每次 3 h,收集滤液,减压浓缩至干,样品采用 RP-HPLC 法测定其中橄榄苦苷的含量.

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织的不同细胞系的生长状况比较

外植体的不同部位诱导所产生的愈伤组织,在不同条件下进行培养形成的不同细胞系有所不同.实验结果表明,在添加有 1.0 mg/L KT 和 1.0 mg/L NAA 的 LS 培养基上,嫩叶在诱导 5 d~7 d 后,切口边缘开始膨大,7 d~9 d 后有浅绿色愈伤组织出现,愈伤组织呈块状,较松散,触之易碎.而用幼茎诱导产生的愈伤组织则相对较硬并有较深的绿色,含水量较低.不同条件下培养所得愈伤组织的生长状况比较列于表 1.

表 1 愈伤组织的形态特征和生长状况比较
Tab.1 Comparison among form and growth of different calli

编 号	培养基	外植体	培养条件	形态特征	生长状况
A 1	LS	嫩叶	25℃,光照 10 h/d	质地较软,微黄色	+++
A 2	LS	幼茎	25℃,光照 10 h/d	质地较硬,微黄绿色	++
A 3	LS	嫩叶	25℃,暗培养	质地较软,白色	+
B 1	MS	嫩叶	25℃,光照 10 h/d	质地较软,微黄色	+
B 2	MS	幼茎	25℃,暗培养	质地较软,浅绿色	—
C 1	N6	幼茎	25℃,光照 10 h/d	质地硬,绿色	++
C 2	B5	嫩叶	25℃,光照 10 h/d	质地较软,黄色	+

2.2 悬浮细胞培养生长周期

图 1 为测得的悬浮细胞生长曲线.在培养初期,细胞生长呈现出一定的生长延迟期,细胞需要逐渐适应新的生长环境,并为分裂繁殖进行准备,延迟期的长短根据环境条件的不同而异,且受到种子细胞本身条件的影响.进入对数生长期后,细胞迅速繁殖,细胞生长明显加快,随着时间的延长和环境条件的改变(如营养物质的消耗、细胞生长空间的减少等),细胞生长经过减速期后逐渐进入平稳期(约为 40 d 左右),最后进入衰亡期.

悬浮细胞培养选择 LS 培养基作为基本培养基,添加植物生长调节剂(PGR) 为:KT 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L,培养条件包括:培养温度 25℃;光照时间 10 h/d;摇床转速 110~120 r/min;培养周期为 28 d/代,采用试样为 100 mL 培养基/250 mL 三角瓶.悬浮细胞继代生长列于表 2.从中可以看

出,经过继代 2~3 次之后,细胞生长趋于稳定.

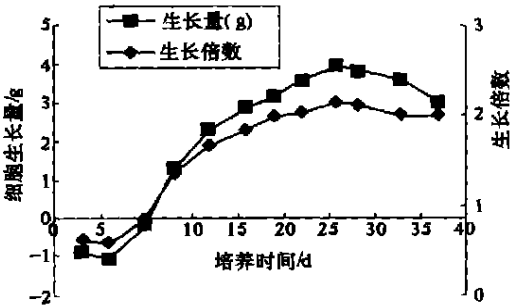


图 1 悬浮细胞培养生长周期
Fig.1 Growth curve of the suspension cell culture

2.3 橄榄苦苷含量测定与化学结构鉴定

橄榄苦苷(oleuropein) 属于裂环烯醚萜苷类化合物,其结构如下所示:

表 2 悬浮细胞生长继代

Tab .2 The subculture periods on suspension cell cultures

实验号	继代次数	细胞生长量/g	生长倍数	细胞生长形态
S-1	1	3.246 4	2.63	浅黄色,有小细胞团,不均匀
S-2	2	4.674 5	3.17	浅黄色,有小细胞团,不均匀
S-3	3	4.238 2	3.65	微黄色,较均匀
S-4	4	5.124 0	4.32	微黄色,较均匀
S-5	5	4.535 9	3.46	微黄色,较均匀

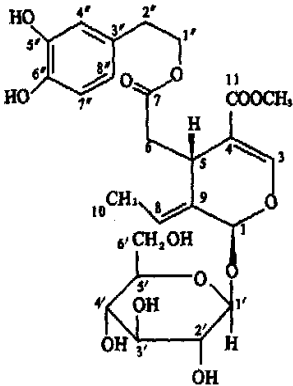


表 3 为利用 RP-HPLC 法测定的悬浮细胞培养体系中橄榄苦苷的含量,包括培养细胞中分离提取部分和剩余培养液中分离提取部分的含量.实验条件:所用仪器为 Shimadzu 高压液相色谱仪,包括 LC-10AD 型泵,SPD-M10AVP,光电二极管阵列型检测器.色谱柱为 Shim-pack CLC- ODS 柱(Switzerland),柱长 4.6 mm×200 mm,孔径 5 μm,流动相为 CH₃OH-H₂O=50:50,柱温 25℃,流速为 1.0 mL/min;检测波长为 285 nm.结果表明,相对于其它类型的次生代谢产物,橄榄苦苷在

剩余培养液中的含量较高.这种现象主要是由于橄榄苦苷具有一定水溶性,在培养细胞生长和次生代谢产物的合成过程中会有一部分逐渐溶于培养液中,如能进一步采取某些措施,例如添加萃取剂促使其更多地进入培养液,将有利于工业化放大实验与生产的应用.

经过溶剂回流提取、柱层析和高压制备液相,从培养的悬浮细胞中分离纯化得到目标产物橄榄苦苷,并且利用 ¹HNMR 和 ¹³CNMR 证实其结构,¹HNMR 和 ¹³CNMR 数据归属列于表 4.

表 3 悬浮细胞培养体系中橄榄苦苷的含量

Tab .3 The concentrations of oleuropein from the suspension culture

实验号	样品来源	含量/(mg g ⁻¹)
L-1	悬浮培养细胞	0.428
L-2	悬浮培养细胞	0.361
L-3	悬浮培养细胞	0.622
L-4	培养液	0.207
L-5	培养液	0.289

表 4 悬浮细胞中橄榄苦苷的 NMR 数据 (MeOD,400 MHz)

Tab .4 NMR data of oleuropein from callus culture (MeOD,400 MHz)

C			H		
编号	实验值 δ _c	文献值 δ _c	编号	实验值 δ _H	文献值 δ _H
1	95.22	95.24 _d	1	5.80 _{quint like} (1.2)	5.90 _{quint like} (1.5)
3	155.14	155.14 _d	3	7.4 _q	7.5 _q
4	109.40	109.3 _q	5	3.86 _{dd} (9.2, 4.4)	3.96 _{dd} (9.0, 4.5)
5	31.81	31.80 _d	6 _a	2.33 _{dd} (14.0, 9.2)	2.44 _{dd} (14.0, 9.0)
6	41.26	41.2 _q	6 _b	2.60 _{dd} (14.0, 4.4)	2.70 _{dd} (14.0, 4.5)
7	173.21	173.2 _q	8	5.97 _{qd} (7.2, 1.2)	6.08 _{qd} (7.0, 1.5)
8	124.87	124.8 _d	10	1.56 _{dd} (7.2, 1.2)	1.66 _{dd} (7.0, 1.5)
9	130.75	130.7 _q	OMe	3.6 _q	3.7 _q
10	13.54	13.55 _q	1'	4.6 _q (7.6)	4.8 _q (8.0)
11	168.69	168.6 _q	2', 4', 5'	3.19 ~ 3.21 _m	
OMe	51.90	51.92 _q	3'	3.3 _q (8.8)	
1'	100.90	100.88 _d	6' _a	3.58 _{dd} (12.0, 5.6)	3.67 _{dd} (12.0, 5.5)
2'	74.76	74.74 _d	6' _b	3.78 _{dd} (12.0, 1.6)	3.88 _{dd} (12.0, 2.0)
3'	78.42	78.40 _d	1'' _a	4.0 _q (10.8, 7.2)	4.1 _q (11.0, 7.0)
4'	71.46	71.45 _d	1'' _b	4.10 _q (10.8, 7.2)	4.20 _q (11.0, 7.0)

续表

C			H		
编号	实验值 δ_C	文献值 ^[9] δ_C	编号	实验值 δ_H	文献值 ^[9] δ_H
5'	77.94	77.94d	2''	2.6f (7.2)	2.7f (7.0)
6'	62.73	62.74	4''	6.5gd (2.0)	6.6gd (2.0)
1''	66.88	66.88	7''	6.5gd (8.0)	6.6gd (8.0)
2''	35.39	35.38	8''	6.44dd (8.0, 2.0)	6.54dd (8.0, 2.0)
3''	130.50	130.48			
4''	117.06	117.06d			
5''	146.24	146.22			
6''	144.92	144.91			
7''	116.44	116.43d			
8''	121.31	121.31d			

说明:文献值的测试条件为频率 500 MHz , 溶剂为 CD₃OD .

3 结论

选择小叶丁香不同部位作为外植体,在LS、MS、B₅和N₆培养基上添加相应的PGR,诱导产生愈伤组织,并在继代3次以后转入悬浮细胞培养,测定了悬浮培养的细胞生长周期,首次建立了小叶丁香的悬浮细胞培养体系.

采用RP-HPLC方法测定悬浮细胞培养物和培养液中橄榄苦苷的含量,并且利用¹HNMR和¹³CNMR确定其结构.

参考文献:

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴·第三册[M]. 北京:科学出版社,1983.350.
[2] BISI GNOAO G,TOMAINO A,CASCIOR L,et al .On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol[J] J Pharm Pharmacol ,1999,51(8) :971~974.
[3] AZIZ N H,FARAG S E,MONSA L A,et al .Comparative

anti -bacterial and antifungal effects of some phenolic compds[J] .Microbios ,1998,93 (374) :43~54.
[4] METZ G .Medical effects of polyphenols[J] .Pharm Ztg ,2000,145(6) :1278.
[5] VISOLI F,ROMAN A, MULINACC N,et al .Derivs , antioxidants and other biol activities of olive mill wastewater[J] J Agric Food Chem,1999,47(8) :3397~3401.
[6] CIRICOSTA C,OCCHUTO F,GREGORIO A et al Cardiovascular activity of young shoots and leaves of *Olea europaea* L and oleuropein[J] .Plant Med Phytother ,1990,24 (4) :264~277.
[7] TROVATO A,FORESTIER A MIANK L,et al Hypoglycemic activity of different extracts of *Olea europaea* L in rats[J] .Plant Med Phytother ,1993,29(4) :300~308.
[8] 吴鸣建,赵天增,张海艳,等. 小叶丁香化学成分的研究 I)[J] .中草药,2003,34(1) :7~9.
[9] HIROSH K,MASAM M,KIYOKAZU I,et al Secoiridoid , coumarin and secoiridoid -coumarin glucoside from *fraxinus chinensis*[J] .Phytochemistry ,1992,31(4) :1277~1280.

The Cultivation of Suspension Cell of *Syringa Pubescens*

WU Ming -jian

(College of Chemical Engineering , Zhengzhou University , Zhengzhou 450002, China)

Abstract : *Syringa pubescens* Turcz . is a kind of shrub widely found in China .Oleuropein , a secoiridoid glucoside , is the primary chemical constituent in this plant with an active potential medicine .Some types of calli were induced and cultured from the cotyledon , the spire , and the caulide of *Syringa pubescens* Turcz . on LS or MS culture mediums in this paper .After three times of subculture periods , the calli are transferred into the suspension cell culture .Growth curve of the suspension cell culture is determined .The suspension cell culture system of *Syringa pubescens* Turcz is established on this plant for the first time .The content of oleuropein from the callus cultured cell is determined by RP-HPLC and its chemical structure is elucidated by ¹HNMR and ¹³CNMR . The experiment provides data for the production of oleuropein by the tissue (cell) culture .
Key words : *Syringa pubescens* Turcz . ; oleuropein ; suspension cell culture