

甘草细胞悬浮培养初期褐化发生的机理研究

王佳琦,牛雯倩,李雅丽,赵舟,郭荣

(内蒙古科技大学 生命科学与技术学院,内蒙古 包头 014010)

摘要:利用植物细胞培养技术直接生产药用成分是解决甘草资源问题的有效途径,但该技术产业化过程中存在一系列的问题,其中包括最普遍且贯穿于放大过程始终的细胞褐化问题.研究以鄂尔多斯高原乌拉尔甘草细胞为研究对象,通过测定固-液转化之初细胞多酚氧化酶(Polyphenol oxidase,PPO)活性、胞内外总酚含量、细胞膜通透性、线粒体活性,确定该褐化反应发生的类型.通过测定不同初始蔗糖质量浓度的液体培养基与不同摇床转速下细胞褐化程度、PPO 活性与胞内外总酚含量分析悬浮体系的环境因素与细胞酶促褐化发生之间的关系,了解主要影响因素并探析其引发褐化反应的途径,推动甘草细胞大规模培养的工业化进程.

关键词:甘草;悬浮培养;褐化;多酚氧化酶

中图分类号:G2813.1

文献标志码:A

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch),豆科(*Leguminosae*)多年生草本或半灌木的植物,是世界上最古老也是人们普遍利用的中草药之一.因其良好的临床疗效,传统中药配方制剂的 80%都把甘草作为主要成分,甘草也广泛应用于食品、烟草和化妆品等行业.近年来随着临床用量的增加及开发利用范围的扩大,甘草的需求量急剧增长,利用细胞培养技术直接生产药用成分是解决目前甘草资源问题的有效途径,但该技术产业化运用过程中仍存在一系列的难关,有细胞本身的生物学问题,也有反应器放大过程中的工程学问题等,其中包括最普遍且贯穿于全部放大过程始终的细胞褐化问题.

在植物细胞培养领域,褐化现象普遍存在,如甘草细胞^[1-2]、红豆杉细胞^[3-4]、长春花细胞^[5]等等,从愈伤组织诱导、细胞继代、悬浮体系建立、反应器小试到大规模培养的整个过程中,特别是在细胞固-液转化之初及进入反应器放大阶段,褐化严重影响细胞生长,导致生物量积累和次级代谢物产量下降,成为制约植物细胞培养工业化应用的瓶颈问题之一^[6-8].本研究选取极易发生褐化且具有广泛应用的乌拉尔甘草细胞为研究材料,研究固-液转化之初细胞褐化发生的类型,分析悬浮培养的环境因素与细胞酶促褐化发生之间的关系,探析其引起褐化发生的途径并在此基础上提出安全有效的控制策略.

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试甘草品种为“乌拉尔甘草”,种子购自内蒙古包头市土默特右旗.甘草细胞由课题组前期经无菌苗外植体脱分化诱导而来,连续继代培养 20 代以上,保存于内蒙古科技大学植物细胞培养室.悬浮培养系统的建立参考李雅丽等人^[9]的方法,取 6 g 分散性强、生长状态良好的固体细胞置于 250 mL 三角瓶中,120 r·min⁻¹震荡培养,悬浮培养基为 100 mL 液体 MS 培养基+质量浓度 30 g·L⁻¹蔗糖+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA,光照强度 36 μmol·m⁻²·s⁻¹,光照时间 16 h·d⁻¹,培养温度 25 ℃.

收稿日期:2019-01-20;修回日期:2019-11-20.

基金项目:国家自然科学基金(31460064;81960688);内蒙古自然科学基金(2017MS(LH)0304);内蒙古科技大学科研仪器专项(2015KYYQ03).

作者简介(通信作者):王佳琦(1994-),女,山西太原人,内蒙古科技大学硕士研究生,主要从事植物生物技术研究.

通信作者:李雅丽,博士,教授,E-mail:btliyali@126.com.

1.2 实验方法

1.2.1 细胞内 PPO 活性测定

真空抽滤分离悬浮细胞,取 1 g 鲜细胞(Fresh weight,FW)加入 2 mL 预冷的浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH7.0),加入适量石英砂充分研磨.研磨液以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$,离心 5 min,上清液用于胞内 PPO 活性测定.取 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 胞内 PPO 溶液与 $5\,900 \text{ }\mu\text{L}$ 磷酸缓冲液(摩尔浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH7.0)充分混合, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水浴 5 min, 410 nm 条件下测定混合液的吸光值(每 min 吸光值增加 0.001 代表一个单位的 PPO 活性),分别于细胞固-液转化后的第 0、3、6、9、12 d 测定,以下实验取样测定时间相同.

1.2.2 细胞内、外总酚含量测定

总酚含量测定参考 Ainsworth 等^[10]的方法进行.取 1 g 鲜细胞(FW)置于研钵中,加入适量石英砂与 2 mL 预冷的体积分数 95% 的乙醇充分研磨.匀浆于 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min,上清液稀释 10 倍,取 2 mL 稀释液依次加入 2 mL 福林酚、2 mL 体积分数 10% 碳酸钠溶液, $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 60 min, 765 nm 测定吸光值为细胞内总酚含量.细胞外培养液中总酚含量测定直接取 2 mL 培养液同上述方法进行测定.使用邻苯二酚通过同样方法测定绘制标准曲线,计算总酚含量.

1.2.3 甘草细胞膜通透性测定

细胞膜通透性测定参考 Suzuki 等^[11]方法,大分子物质不能渗入完整的细胞膜,如 Evans Blue,当细胞遇到伤害后大分子物质就能逐渐渗入.进入细胞内的 Evans Blue 的数量反映了细胞受伤害的程度.取 0.2 g 鲜细胞加入 0.5 mL 质量分数为 0.1% 的 Evans blue 染色 5 min,真空抽滤去除染色液,取 0.2 g 染色细胞置于含有质量分数为 1.0% SDS 的体积分数为 50% 甲醇溶液中, $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心,取上清于 600 nm 测定吸光值.同样的细胞在沸水中煮 5 min,使用上述方法处理细胞, 600 nm 测定的吸光值定义为细胞膜通透性为 100%.

1.2.4 甘草细胞线粒体活性测定

线粒体活性测定操作参考 Iborra 等^[12]方法.真空抽滤分离悬浮细胞,取 0.2 g 鲜细胞于试管中,加入 5 mL 质量分数 0.6% TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)溶液(溶解于 pH 6.5 磷酸缓冲液),暗处理 24 h 后真空抽滤置于含有 5 mL 体积分数 95% 的乙醇中, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min,离心去除沉淀, 485 nm 条件下测定上清液的吸光值,吸光值与细胞重量的比值代表线粒体活性(Abs $\cdot \text{g}^{-1}$).

1.2.5 流体剪切力对细胞褐化的影响

调整摇床转速变化流体剪切力,设置转速分别为 0、60、120、180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,测定细胞第 0、3、6、9、12 d 的胞内外总酚积累、培养液褐化程度.

1.2.6 渗透压变化对细胞褐化的影响

配置蔗糖质量浓度为 10、30、60、90 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基,测定在不同蔗糖质量浓度的条件下,细胞第 0、3、6、9、12 d 的胞内外总酚积累、培养液的褐化程度.

2 实验结果

2.1 甘草细胞固-液转化后胞内 PPO 活性变化

正常情况下,PPO 存在于植物细胞叶绿体或其他质体当中,细胞转入液体培养基后,有褐化现象的产生.如图 1 所示,0~3 d,PPO 活性迅速上升,表明悬浮培养环境下细胞遭受外界窘境,胞内组织完整性破坏或膜受到伤害,潜在的 PPO 大量被激活.接下来的培养过程中,脆弱不适应的细胞被淘汰,有些细胞逐渐适应新环境开始增殖,因此 3~12 d,PPO 活性开始下降.

2.2 甘草细胞内、外总酚含量

酚类化合物作为酶促褐化的底物,储存在液泡当中.细胞悬浮培养初期,生长环境发生很大的改变,部分细胞因不适应环境而受伤,导致胞内功能分区被破坏,酚类物质外泄.对甘草细胞内、外总酚含量进行检测,结果如图 2 所示,0~3 d 细胞内外总酚含量均迅速上升,接下来的培养过程中,部分细胞逐渐适应新环境,开始增殖,所以 3~12 d 细胞内外总酚含量缓慢减少.

2.3 细胞膜通透性

Evans blue 是一种生物染色剂,有活性的细胞因细胞膜是完整的无法被其染色,细胞损伤越严重,染色越深.甘草细胞在固-液转化之初,由于培养环境的改变,0~6 d 细胞一直处于旋转振荡的条件下,部分细胞受到较严重的损伤,细胞膜通透性增加,染色深.6~12 d 期间,适应环境存活下来的细胞生长旺盛,所以测得的细胞的膜通透性液有所降低(图 3).

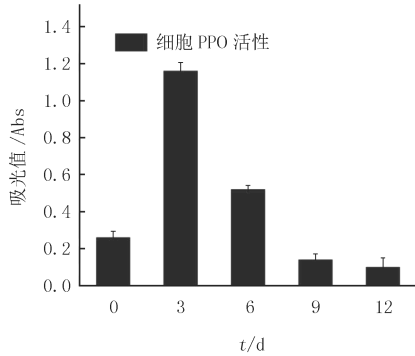


图1 细胞 PPO 活性

Fig.1 PPO activity in cells

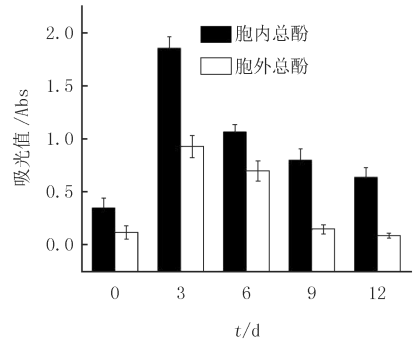


图2 细胞内外总酚

Fig.2 Total phenols inside and outside cells

2.4 细胞线粒体活性测定

TTC 可用于鉴定细胞存活状态.具有生命力的细胞中的脱氢酶可以将 TTC 还原,而使细胞呈红色,如果细胞死亡则无法被染色.0~3 d 期间,甘草悬浮细胞正在适应环境,部分细胞受到损伤死亡,TTC 染色细胞稀少,表明线粒体活性也一直下降.综合来看,3~9 d,细胞快速增殖,因此 TTC 染色细胞增加,线粒体活性增强.至 12 d,细胞生长趋于稳定,线粒体活性有所下降(图 4).

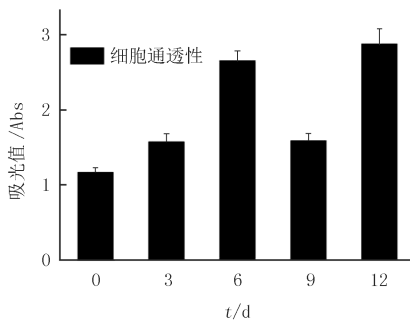


图3 细胞膜通透性

Fig.3 Membrane permeability

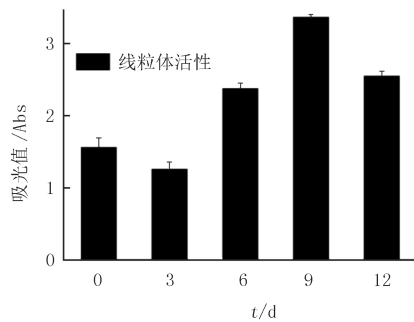


图4 线粒体活性

Fig.4 Mitochondrial activity

2.5 不同转速对细胞褐化的影响

2.5.1 褐化程度

悬浮培养的前 3 d,取不同培养条件下(摇床转分别为 0、60、120 与 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)的细胞悬浮液,10 000 g 离心 20 min,420 nm 波长下测定上清液的吸光度评估悬浮体系的相对褐化程度.结果显示,随着摇床转速的增加,细胞褐化程度迅速提高,细胞所受的流体剪切力升高(图 5).由于剪切力对细胞的破坏,部分细胞膜透性显著增加,酚类化合物外泄,酶促褐化反应增强.

2.5.2 细胞内外总酚

摇床的旋转震荡主要是为了提供溶氧,但同时流体剪切力也存在很大影响.随着流体剪切力的增大,细胞破损,因此可以断定是细胞内的酚类物质外泄释放到培养液中,细胞外比细胞内的酚类物质含量更高(图 6(a),图 6(b)).

流体剪切力升高,会对细胞造成非常大的伤害.随着流体剪切力的升高,细胞膜透性显著增加,引起细胞

内酚类物质和 PPO 释放到培养液中,细胞内总酚含量下降,而细胞外总酚含量上升.从整体水平来看,流体剪切主要表现出对细胞造成损伤,引起细胞内酚类物质和 PPO 释放到培养液中,从而发生酶促褐化反应,促进褐化程度升高.

2.6 蔗糖浓度对细胞褐化的影响

2.6.1 褐化程度

通过对褐化程度的测定,可以得出一个结论:随着蔗糖浓度的提高,褐化程度也在提高.低蔗糖存在的条件下,细胞不会发生褐化反应,而在一定范围内提高蔗糖浓度又能够提高褐化程度,不同的蔗糖浓度(10 、 30 、 60 、 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)导致完全不同的褐化程度(图 7).

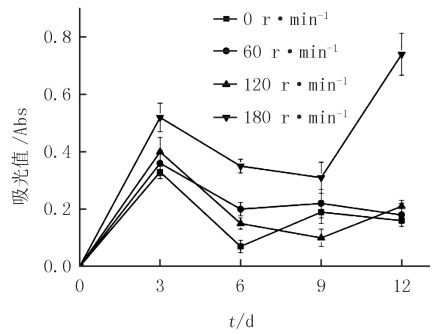


图 5 褐化程度

Fig.5 Degree of Browning

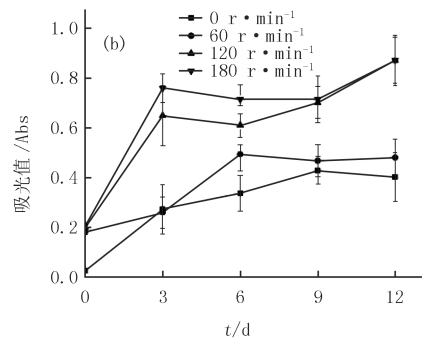
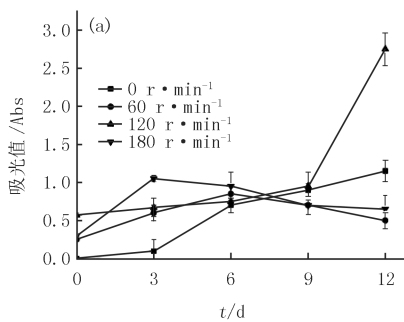


图 6 胞内总酚含量变化 (a)、胞外总酚含量变化 (b)

Fig.6 Total intracellular phenols(a), total extracellular phenols(b)

2.6.2 细胞内外总酚

随着蔗糖浓度的增加,细胞内、外总酚含量呈上升趋势,在第 3 d 达到最大值.随后细胞内外总酚含量表现出下降趋势,并且蔗糖为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 存在条件下,培养液中总酚含量最低(图 8(a),图 8(b)).

培养基里没有蔗糖存在时,细胞不会发生褐化反应,而在一定范围内提高蔗糖质量浓度,褐化程度也会提高,不同的蔗糖浓度导致完全不同的褐化程度.因此,蔗糖浓度是引起酶促褐化的关键因素.

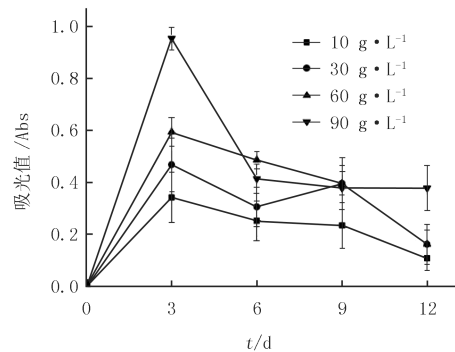


图 7 褐化程度

Fig.7 Degree of Browning

3 讨 论

植物酶促褐化的主要原因是酚类化合物和多酚氧化酶在氧气的作用下,生成单醌类化合物,单醌类进一步积聚成为褐色的多醌类物质,褐化现象发生.甘草细胞固-液转化初期,胞内外酚类化合物明显增加,细胞 PPO 活性增强.通过 Evans blue 染色和 TTC 法可知,甘草细胞培养发生的褐化现象属于典型的生理学酶促褐化反应,证明细胞受伤破损,与 Richter C 等在蒲公英中的研究结果一致^[13].影响细胞褐化的因素主要有两个:悬浮培养产生的流体剪切力与培养基的蔗糖浓度.从整体水平来看,流体剪切主要表现出对细胞造成损伤,引起细胞内酚类物质和 PPO 释放到培养液中,从而发生酶促褐化反应.蔗糖作为植物细胞培养基最重要的组成成分,为植物细胞的生长

代谢提供能量和物质基础.没有蔗糖存在的条件下,细胞不会发生褐化反应,不同的蔗糖浓度导致细胞处于不同的渗透压环境中,渗透压过高会使细胞处于高渗失水,细胞膜通透性增加,同样会引起酚类化合物外泄,因此蔗糖浓度是引起酶促褐化的关键因素,DONG等在红豆杉细胞中也发现了相同的结论^[14].

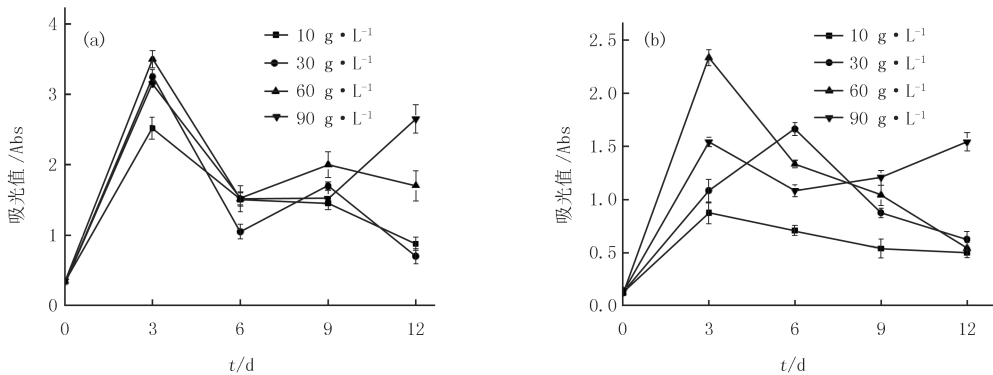


图8 胞内总酚含量变化 (a), 胞外总酚含量变化 (b)

Fig.8 Total intracellular phenols (a), total extracellular phenols (b)

为了对酶促褐化达到有效的控制,建议采取以下措施:(1)蔗糖流加培养:通过以上实验发现,蔗糖浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,甘草细胞褐化程度最低,因此我们可以通过蔗糖流加培养的方式,降低初始培养条件下蔗糖浓度对细胞的影响,从而降低了酚类物质的合成,另一方面降低蔗糖浓度能够降低渗透压对细胞的损伤,并且促进了生物量的积累。(2)逐步提高转速:通过逐渐提高转速,控制细胞初始培养条件下流体剪切力对细胞造成的损伤,减少胞内总酚的外泄,从而达到降低酚类物质与 PPO 的接触,降低细胞褐化程度.甘草作为世界上最古老也是应用最广泛的中草药之一,被广泛应用于食品、烟草和化妆品等行业,也是我国传统中草药配方制剂的重要组成成分.近年来,随着临床用量的增加及开发利用规模的扩大,甘草的需求量急剧增长,因此克服甘草细胞培养过程中遇到的褐化现象发生是十分重要的.

参 考 文 献

- [1] MAYER A, HAREL E. Polyphenol oxidases in plants[J]. *Phytochemistry*, 1979, 18(2): 121-193.
- [2] CHEYNIER V. Phenolic compounds: from plants to foods[J]. *Phytochem Rev*, 2012, 11(2/3): 153-177.
- [3] GAO F, CAO XF, SI JP, et al. Characterization of the alkaline/neutral invertase gene in *Dendrobium officinale* and its relationship with polysaccharide accumulation[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2): 1-8.
- [4] LIU S, LAN J, ZHOU B, et al. HbNIN2, a cytosolic alkaline/neutral-invertase, is responsible for sucrose catabolism in rubber-producing laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree)[J]. *New Phytol*, 2015, 206(2): 709-725.
- [5] DONG H, ZHONG J. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed[J]. *Biochem Eng J*, 2001, 8(2): 145-150.
- [6] KIM S, CHOI H, KIM J, et al. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 28(2): 202-209.
- [7] DONG Y S, DUAN W L, HE H S, et al. Enhancing taxane biosynthesis in cell suspension culture of *Taxus chinensis* by overexpressing the neutral/alkaline invertase gene[J]. *Process Biochem*, 2015, 50(4): 651-660.
- [8] 王清, 王蒂. 温度、pH 对马铃薯多酚氧化酶活性的影响[J]. *中国马铃薯*, 2003, 17(3): 157-161.
WANG Q, WANG D. THE EFFECTS OF TEMPERATURE AND PH ON THE POLYPHENOL OXIDASE ACTIVITY OF POTATOES[J]. *Chinese Potato Journal*, 2003, 17(3): 157-161.
- [9] 李雅丽, 孟婷婷, 张小利, 等. 甘草细胞放大培养中搅拌式反应器操作策略优化[J]. *植物科学学报*, 2015, 33(6): 867-872.
LI Y L, MENG T T, ZHANG X L, et al. Operation Strategy Optimization of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch Cell Amplification Culture in a Stirring Bioreactor[J]. *Plant Science Journal*, 2015, 33(6): 867-872.
- [10] AINSWORTH E A, GILLESPIE K M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(4): 875-877.

electrospinning nanofibers loaded with adipose-derived mesenchymal stem cells(ADSCs).[Methods]Rat ADSCs were isolated, cultured and expanded in vitro.ADSCs were examined by flow cytometry.ADSCs were loaded on polypropylene carbonate/ poly ϵ -caprolactone/ poly L-lactic acid-grafted tetracalcium phosphate(PPC/PCL/g-TTCP)nano electrospinning carriers and implanted into the cartilage defects of rat knee joints.Experimental rats were randomly divided into two groups;1) Normal control group; 2)Exercise training group.The training group uses moderate-intensity horizontal treadmill exercise(12 meters per minute,last for 30 minutes).Training began in the third week after surgery.Training was conducted twice daily and five days a week.After eight weeks of training,hematoxylin-eosin(HE)and type II collagen were stained and histologically examined.Wakitan score system was used to evaluate the cartilage repair degree.Statistical analysis was performed by using Graphpad Prism 6.01.[Results]Rat ADSCs can proliferate and differentiate into osteocytes on PPC/PCL/g-TTCP; In the exercise training group,the scores of five indexes(cell morphology,matrix staining intensity,surface regularity, cartilage thickness and graft-host integration)were significantly lower than that of the control group; HE and type II collagen staining showed that the proliferation of chondrocytes and the proportion of type II collagen was significantly increased in the training group.[Conclusion]Moderate-intensity exercise training can significantly improve the level of repair of rat articular cartilage injury by electrospinning nanofiber loaded with ADSCs.

Keywords: aerobic exercise; cartilage injury; cartilage repair; mesenchymal stem cell; electrospinning nanofiber

[责任编辑 杨浦 王凤产]

(上接第 100 页)

- [11] SUZUKI K, YANO A, SHINSHI H. Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells[J]. *Plant Physiol J*, 1999, 119(4): 1465-1472.
- [12] IBORRA J, GUARDIOLA J, MONTANER S, et al. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for immobilized plant cells[J]. *Biotechnol Tech*, 1992, 6(6): 319-322.
- [13] COETZER C, CORSINI D, LOVE S, et al. Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase[J]. *J Agr Food Chem*, 2001, 49(2): 652-657.
- [14] DONG Y S, FU C H, SU P, et al. Mechanisms and effective control of physiological browning phenomena in plant cell cultures[J]. *Physiol. Plant*, 2016, 156(1): 13-28.

Mechanism of browning in suspension culture of licorice cells

Wang Jiaqi, Niu Wenqian, Li Yali, Zhao Zhou, Guo Rong

(School of Biology science and technology, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China)

Abstract: The direct production of medicinal ingredients using plant cell culture technology is an effective way to solve the problem of licorice resources, but there are a series of problems in the industrialization process of this technology, including the most common problem of browning cells throughout the amplification process. To determine the type of browning reaction, we measured the PPO activity, the total phenol content inside and outside the cell, the membrane permeability, mitochondrial activity at the early stage of solid-liquid transformation using ordo plateau urals licorice cell as the research object. Then under the different initial concentrations of sucrose of the liquid medium and different initial shaker rotational speed, the browning degree of cells, PPO activity and the total phenol content inside and outside cell were measured to analyze the relationship between the environmental factors of the suspension system and its enzymatic browning, understanding the main influence factors and the browning reaction pathway would promote the industrialization process of licorice cell mass culture.

Keywords: licorice; suspension culture; browning; polyphenol oxidase

[责任编辑 王凤产 杨浦]