

γ -射线对滇紫草细胞产生色素的影响

张 华 曹日强 杨永华

(南京大学生物科学与技术系, 南京 210093)

摘要 应用 500~2 500 伦琴(R)的⁶⁰钴 γ -射线照射滇紫草(*Onosma paniculatum* Bur. et Franch.) 细胞系, 确定了应用 γ -射线处理促进紫草素合成的最适辐照剂量为 1 500 R, 处理后的细胞系在生产培养基上培养 21 d 后紫草素含量(以干重计)达到 94.79 mg/g, 较对照提高了 144.6%, 通过小团块选种法从中筛选到了色素含量(以干重计)高达 103.42 mg/g 的高产细胞系 Mut-1, 其营养生长与对照相比没有差别。

关键词 ⁶⁰钴; γ -射线; 滇紫草; 紫草素

Influence of gamma-ray on shikonin formation in cultured cells of *Onosma paniculatum* Bur. et Franch. Zhang Hua, Cao Riqiang, Yang Yonghua (Department of Biological Science & Technology, Nanjing University, Nanjing 210093), *J. Plant Resour. & Environ.* 1999, 8(1): 42~45

The effect of different dosages 500 R, 1 000 R, 1 500 R, 2 000 R and 2 500 R of gamma-ray on the shikonin formation in cultured cells of *Onosma paniculatum* Bur. et Franch. is reported. It is determined that the optimum dosage to stimulate the formation of shikonin is 1 500 R, a 144.6% increase of shikonin content was observed in the irradiated callus, with the 94.79 mg/g (dry weight) of shikonin content. Furthermore, a high production cell line Mut-1 with 103.42 mg/g (dry weight) of shikonin content was selected from the callus, there was no significant difference in growth between Mut-1 and the control.

Key words ⁶⁰cobalt; gamma-ray; *Onosma paniculatum* Bur. et Franch.; shikonin

紫草素为紫草中含有的萘醌类混合物, 具抗菌、消炎和抗肿瘤作用, 也可作为食品、日化品等的着色剂^[1], 应用细胞培养方法生产紫草素是开发紫草资源的有效途径之一。由于大多有用的次生物质在植物细胞中含量极低, 要将其用于工业化生产, 其首要条件是提高次生物质在细胞中的含量, 这可以通过两个途径解决: 一是筛选高产的细胞系, 二是通过改变培养条件或利用物理因子如光线、射线或磁场等来促进次生物质的合成。关于筛选高产细胞系已有许多详尽的论述, 如日本学者采用小团块选种法筛选出紫草素含量极高的细胞系^[2], 应用发酵培养技术生产紫草素在日本已获成功^[3]。物理因子对次生物质合成影响极大, 如: 光照可完全抑制紫草素和小檗碱的合成^[4,5]; 激光和磁场处理均可提高紫草细胞中紫草素的含量^[6], 因此对物理因子的研究也十分必要。紫草细胞产生紫草素的一个特点是需经过两阶段培养, 第一

· 国家“八五”生物技术攻关计划基金资助

张 华: 男, 1971 年 2 月生, 硕士, 主要从事植物组织培养及次生代谢研究。

收稿日期 1998-09-07

阶段培养采用 B₅培养基^[7],以增加生物量;第二阶段培养采用改良 M₉培养基^[7]以生成紫草素。应用 γ -射线处理第一阶段培养的细胞是否对第二阶段合成次生物质有促进作用尚未见报道,本文以滇紫草(*Onosma paniculatum* Bur. et Franch.)细胞为材料就此作一些探讨。

1 材料和方 法

1.1 材 料

由滇紫草的幼嫩根茎诱导愈伤组织,采用小团块选种法筛选得到的色素形成稳定的自然变异株(R85)和不产生色素的变异株(LDR.W),在改良 B₅培养基上继代培养 120 代以上,每 18 d 继代一次,培养温度为 25℃,光照时间为每天 8 h,光照强度为 4 000 lx。

1.2 辐照处理

在 B₅培养基上生长 3 d 的滇紫草细胞置于⁶⁰Co γ -射线照射,剂量分别为:500 R, 1 000 R, 1 500 R, 2 000 R, 2 500 R, 辐照时间均为 15 min,以不经辐照处理的细胞为对照。继续培养 15 d 后将生长正常的细胞转移到改良 M₉培养基上遮光悬浮培养以形成紫草素(培养方法详见参考文献 7),21 d 后测定色素含量。

1.3 细胞生长量的测定

将培养物过滤除去培养液后于 60℃ 烘干称重,取 3 次重复的平均值。

细胞干重增加倍数 = (收获时干重 - 接种干重) / 接种干重。

1.4 色素含量的测定

测定方法详见参考文献 7,取 3 次重复的平均值。

2 结果与讨论

2.1 γ -射线对滇紫草细胞生长的影响

滇紫草细胞经 γ -射线照射后的最初 2~3 d 形态正常,随后有部分细胞变为黄褐色,生长缓慢并逐渐死亡,颜色最终呈黑褐色,在培养基上可见暗褐色液体,这是由于细胞解体,细胞内含物渗出所致。另一部分为生长正常的细胞,颜色呈淡黄色,这部分细胞为经受射线辐照而存活的细胞,推测它们对 γ -射线有较高的耐受能力。随着辐照剂量的增加,死亡细胞的比例增大,并且存活细胞的生长有变缓的趋势,在经 γ -射线辐照后的紫杉培养细胞中也观察到相似的现象(未发表资料)。由于部分细胞死亡,导致最终在 B₅培养基培养的细胞干重增加倍数无法确定。细胞转至 M₉培养基培养 21 d 后干重增加倍数见表 1。由表 1 可见,除 2 000 R 和 2 500 R 处理外,其余处理在 M₉培养基上培养结束后的细胞干重增加倍数差别不大,说明细胞生长正常。

γ -射线可引起细胞 DNA 的损伤,如造成单链或双链断裂,破坏核酸的碱基等,如受损严重,就可造成细胞死亡。细胞内含有的重接合酶可修复单链断裂的损伤^[8],使细胞核酸代谢恢复正常,从而使细胞不致死亡。可能在上述处理中存活的细胞内这种重接合酶的活性较高,使其能耐受 γ -射线的照射。

有工作表明,低剂量的 γ -射线对细胞的生长有促进作用^[9,10],具体原因尚不明了,但本实

验未观察到该现象,推测是由于 γ -射线破坏了培养基中的对生长有促进作用的激素成分(如 IAA、BA 等),从而影响细胞生长。

表 1 M_0 培养基培养 21 d 后受不同剂量 γ -射线照射的滇紫草细胞干重增加倍数

Tab 1 The increase of cell dry weight of *Onosma paniculatum* after 21 days cultured in the M_0 medium by irradiation of different γ -ray dosages

γ -射线照射剂量 γ -ray dosages	干重增加倍数 Dry weight increase ratio	γ -射线照射剂量 γ -ray dosages	干重增加倍数 Dry weight increase ratio	γ -射线照射剂量 γ -ray dosages	干重增加倍数 Dry weight increase ratio
对照 Control	0.237	1 000 R	0.235	2 000 R	0.218
500 R	0.230	1 500 R	0.239	2 500 R	0.223

2.2 最适剂量的选择

将上述经射线处理后的滇紫草细胞转至改良 M_0 培养基上培养,细胞均于第 3~4 d 开始变红,表明细胞已经开始形成紫草素,之后色素迅速形成,至第 21 d 时色素含量达到稳定。随着辐照剂量的增加,紫草素含量有增加的趋势(图 1),并且在剂量为 1 500 R 时色素含量达到最高(以干重计为 94.79 mg/g),较对照(以干重计为 38.75 mg/g)提高了 144.6%,因此可以确定 1 500 R 为 γ -射线处理的最适剂量。许多次生代谢物被认为是在胁迫条件下形成的^[11], γ -射线可能是作为一种胁迫因子而促进当代细胞产生色素。电离辐射可诱导产生大量自由基,自由基可造成组成生物膜的膜脂的过氧化,从而对生物膜造成破坏。也有研究者认为:自由基可使生物膜透性提高,同时激活依赖于 cAMP 的第二信使系统,进而促进细胞代谢^[12]。电离辐射能引起细胞突变,如引起染色体倍数的增加,有资料显示,多倍体可能是造成紫草愈伤组织色素含量高于原植物的原因(陈蔚,待发表资料),因此色素含量的增加可能是上述几种作用的综合表现。由图 1 可见,当辐照量超过 1 500 R 时,色素含量又趋于下降,当辐照剂量超过 2 000 R 时,色素含量低于对照,可见低于 2 000 R 的 γ -射线普遍促进当代细胞产生紫草素,并且应用 γ -射线处理第一阶段培养的细胞对第二阶段合成次生物质确有促进作用。

上述经 1 500 R γ -射线处理后的细胞系继代多次后其色素含量趋于下降,这可能是由于细胞分裂和细胞中的自由基清除系统的作用而使受辐照而产生的自由基逐渐减少造成的。将该细胞系以小团块选种法^[2]选种 1 次,得到了色素含量高达 103.42 mg/g(以干重计)的高产细胞株 Mut-1,经继代后色素含量基本保持稳定(图 2),它在 B_5 培养基上的营养生长与对照相比没有太大差异(细胞干重增加倍数分别为:对照:2.29;Mut-1: 2.20)。推测 Mut-1 是由于射线诱导产生的突变系,这有待于细胞学和分子生物学的进一步研究。

用 1 500 R γ -射线照射不形成色素的滇紫草细胞突变系 LDR.W,发现最终该细胞系也能形成少许紫草素(色素含量为 4.32 mg/g,以干重计);用 1 500 R 剂量 γ -射线照射紫杉细胞,最终其抗癌成分紫杉醇(taxol)的含量较对照也有一定程度的增加(本实验室未发表资料);郑光植等曾用 4 000 R γ -射线辐照筛选得到了东莨菪碱含量高的三分三愈伤组织突变体,其东莨菪碱含量较对照提高了 30%^[9],可见用 γ -射线处理以提高次生物质含量是一条可行的途径,但辐照剂量可能有所不同。

3 结 论

实验证明用 γ -射线辐照处理滇紫草细胞系以促进紫草素合成是一个十分可行的方法,尽

管经射线照射后有部分细胞死亡,但存活细胞经 1 次小团块选种可得到色素含量极高的细胞系,与通过调整培养基成分促进紫草素含量或通过自然突变筛选高产细胞系相比,它有简便易行,收效显著的特点,这为工业化生产紫草素奠定了基础,也为提高其他细胞系的次生物质含量提供了借鉴。

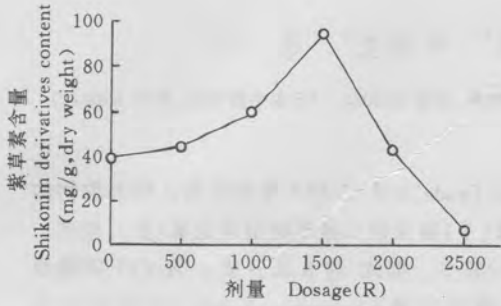


图 1 不同剂量 γ -射线照射后滇紫草细胞色素含量曲线
Fig 1 The curve of the shikonin derivatives content of *Onosma paniculatum* cell after irradiation by different γ -ray dosages

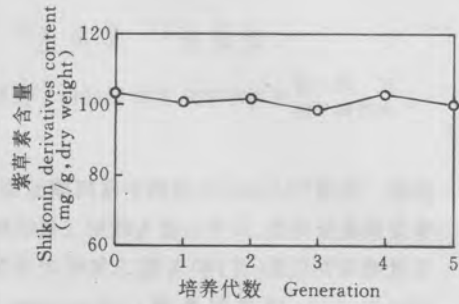


图 2 不同细胞代滇紫草高产细胞株 Mut-1 中紫草素含量
Fig 2 Shikonin derivatives content of high yield *Onosma paniculatum* cell line Mut-1 in different generations

参 考 文 献

- 1 高菊红. 紫草的资源、化学、药理和临床研究概况. 中草药, 1986, 17(6):268.
- 2 Tabata Mamoru. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In: Barz W, et al (ed), Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1977. 3~6.
- 3 刘 涤. 植物细胞的大规模培养. 植物生理学通讯, 1986, (5):1~6.
- 4 Tabata Mamoru, Hajime Mizukami, Noboru Hiraoka, et al. Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Phytochemistry, 1974, 13(6): 927~932.
- 5 Yasuyuki Yamada, Fumihiko Sato. Production of berberine in cultured cells of *Coptis japonica*. Phytochemistry, 1981, 20 (3): 545~547.
- 6 王曼丝, 李鸣镛, 曹日强, 等. 滇紫草愈伤组织辐照和磁场效应研究初报. 南京大学学报, 1994, 30(1):81~85.
- 7 宁 文, 曹日强. 硬紫草细胞悬浮培养和紫草宁及其衍生物的形成. 生物工程学报, 1994, 10(1):76~80.
- 8 顾瑞琦. 辐射对植物细胞的伤害及其修复. 植物生理学通讯, 1981, (5):1~6.
- 9 郑光植, 何静波, 王世林. 药用植物组织培养的研究 V. 生长速率和东莨菪碱含量皆高而稳定的变异体. 植物生理学报, 1983, 9(2):129~134.
- 10 彭永康, 阎炳宗, 王 坚, 等. 不同剂量⁶⁰钴 γ -射线辐射对高粱种子发芽率、幼苗生长及过氧化物酶的影响. 植物生理学通讯, 1984, (4):18~20.
- 11 韩迎山. 植物细胞培养中次生代谢物的生产. 植物生理学通讯, 1988, (4):11~17.
- 12 林廷安. 梯度磁场对农作物的增产效应及其机理. 核农学通报, 1990, 11(4):189~190.

(责任编辑: 惠 红)