

磁胁迫对烟草细胞生长和 CoQ₁₀ 含量的影响

吴玉荷* 胡章立 张永夏

深圳大学生命科学学院, 广东深圳 518060

摘要 用 0.4 T 恒定磁场处理烟草细胞 0.5~1.5 h 后, 细胞活力和存活率可受到一定的影响, 但处理间差异不显著。处理 0.5~1.0 h 的细胞分裂指数和细胞生物量显著提高, 分别提高 15.4% 和 49.6%, 细胞干重分别提高 18.4% 和 42.3%, 但 CoQ₁₀ 的生物合成和积累受抑。处理 1.5 h 的细胞分裂和细胞生长受抑, 但 CoQ₁₀ 的生物合成和积累得到促进, CoQ₁₀ 含量提高 25.2%。

关键词 悬浮培养; 细胞分裂指数; CoQ₁₀; 细胞活力

Effect of Magnetic Field on Cell Growth and CoQ₁₀ Content of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

WU Yu-He*, HU Zhang-Li, ZHANG Yong-Xia

College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

Abstract The effect of magnetic field on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cell growth and CoQ₁₀ production was studied. The results showed that exposure to 0.4 T magnetic field for 0.5~1.5 h could indistinctively affect the cell viability and survival rate, for 0.5~1.0 h could increase mitotic index and cell biomass markedly, but the CoQ₁₀ content was decreased. After exposed to the magnetic field for 1.5 h, the CoQ₁₀ content was higher (25.2%) and the cell biomass was lower (18.1%) than that of the control.

Key words suspension culture; cell mitotic index; CoQ₁₀; cell viability

CoQ₁₀ (coenzyme Q₁₀) 是一种醌环类化合物, 称为类维生素物质。它至少是 3 种线粒体酶(多酶复合体 I、II 和 III) 的辅酶, 化学结构为 6 位碳上连有一个十单位异戊二烯侧链的 2, 3-二甲氧基-5-甲基-1, 4-苯醌衍生物, 其醌环在氧化呼吸链中起传递电子和质子的作用^[1]。临床上广泛用于心血管病的治疗, 对急性癌症和病毒性肝炎等也有一定的疗效, 可提高人体免疫力, 保养皮肤, 增加细胞活力。Ikeda 等^[2]最先从烟草组织培养细胞中分离出 CoQ₁₀ 结晶, 采用植物细胞培养技术生产 CoQ₁₀ 是当前的研究热点。细胞培养的关键是如何增加细胞生物量和次生代谢产物的含量, 利用合理的外界条件促进细胞生长, 再利用合适的胁迫条件使细胞从初生代谢转向次生代谢, 是提高次生代谢产物的常用手段之一^[3, 4]。本文用恒定磁场处理烟草悬浮细胞, 探讨其对细胞生长和 CoQ₁₀ 合成的影响, 以期能为调控细胞代谢提供参考。

材料与amp;方法

烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 品种 K326, 由广东南雄烟草研究所提供。实验中的水解酪蛋白、6-糠基氨基嘌呤(6-furfuryl aminopurine, KT)、2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxy acetic acid) 均购自中国医药集团上海化学试剂公司, 酵母粉为 OXOID LID., Basingstore, Hampshire, ENGLAND 产品, CoQ₁₀ 标准品由 Sigma 公司生产, 其余为市售分析纯、生化试剂或色谱纯试剂。测定仪器为 HP Agilent 1100 series 高效液相色谱仪, 磁场为 DW-6000 多功能磁疗装置, 调节磁场强度为 0.4 T。

磁场处理和悬浮培养 先取盆栽烟草叶片洗净, 用体积分数为 70% 乙醇浸泡 5~8 s, 再用质量分数为 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 8~10 min, 无菌水

收稿 2004-12-09 修定 2005-03-17

资助 深圳市科技三项费用项目(200217)。

*E-mail: wuyh@szu.edu.cn, Tel: 0755-26535286

冲洗5~6次, 切成约0.5 cm×0.5 cm小块, 接种于MS +1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA培养基中诱导愈伤组织。21 d后, 将获得的愈伤组织转入Ls+0.05 mg·L⁻¹ 6-BA +1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ NAA培养基中进行继代培养。每隔21 d继代1次, 连续继代6次, 获得分散度好的疏松愈伤组织。将此愈伤组织转到继代培养基上培养7 d作为悬浮培养的“种子”细胞, 每瓶准确称取4 g“种子”细胞, 接种于100 mL的三角瓶中(内含30 mL Ls+1.0 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.05 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5% 酵母膏的悬浮培养基), 每组10瓶, 分别置0.4 T旋转磁场中处理0.5、1.0和1.5 h, 以不处理的为对照。磁场处理完毕后从磁场取出, 先测定细胞活力和细胞成活率, 然后放在转速为105 r·min⁻¹的摇床上, 于(25±1)°C暗中培养10 d, 隔天定期取样测定细胞分裂数, 培养结束后测定细胞干重和CoQ₁₀含量。各处理重复3次, 取平均数。

细胞活力的测定 用TTC法^[5], 测定时取200 mg(FW)细胞置于试管中, 分别加入0.1 mol·L⁻¹ pH 7.0的磷酸缓冲液和0.4% TTC溶液各2.5 mL混匀, 于25°C下避光静置13~16 h后细胞即变成红色。弃去上清液, 加入5 mL蒸馏水洗涤细胞3~4次, 加入5 mL 95%乙醇, 置于60°C水浴中30 min。在此期间, 轻轻摇动试管1~2次, 静置于室温下至细胞完全无色。取上清液, 以分光光度计测定485 nm处的吸光值(OD₄₈₅)。

细胞存活率的测定 取少量悬浮细胞, 用滴管吹吸, 将细胞打散混匀。取1滴细胞悬液置于干燥清洁的载片上, 加1滴中性红染色, 盖上盖玻片于普通光镜下镜检。先在低倍镜下选择分散较好、细胞着色清楚的细胞, 再用高倍镜观察细胞。每个样品计数1000个以上细胞, 纪录活细胞数与死细胞数。按公式: 存活率(%)=活细胞数/总的细胞数(活细胞数+死细胞数)×100% 计算存活率。

细胞分裂指数的测定 用醋酸洋红染色、镜检, 每个样品检测1000个左右细胞, 分别记录分裂细胞数和间期细胞数。然后, 按公式: 分裂

指数(%)=分裂期细胞数/细胞总数(分裂期细胞数+间期细胞数)×100% 计算分裂指数。

细胞干重的测定 将培养液减压抽滤后得的细胞60°C烘干至恒重后称重。抽提与测定CoQ₁₀时, 将烟草细胞与丙酮按1:2(m/V)混合、研磨、过滤, 滤渣重复抽提2次, 合并滤液, 用0.5倍石油醚萃取2次, 得CoQ₁₀的抽提液, 并将抽提液置于旋转蒸发器(60°C)上蒸干, 用10 mL无水乙醇溶解, 即得到HPLC测定的样本。用HPLC测定烟草细胞培养物中CoQ₁₀含量。

结果与讨论

1 磁场对细胞活力和存活率的影响

测定各处理细胞的生活力和存活率的结果(图1、2)表明, 磁场对细胞活力和存活率有一定影响, 但处理间的差异不显著($P>0.05$)。

2 磁场对细胞分裂指数的影响

细胞经磁场处理1 h后, 再进行悬浮培养, 可显著地提高细胞分裂指数($P<0.01$), 尤其是对数生长期的细胞分裂指数。此期的分裂指数比未作处理的提高49.7%, 但细胞的迟滞期和培养周期延长。磁场处理0.5 h的与未作处理的相比差异不显著, 而磁场处理1.5 h的细胞分裂指数有下降

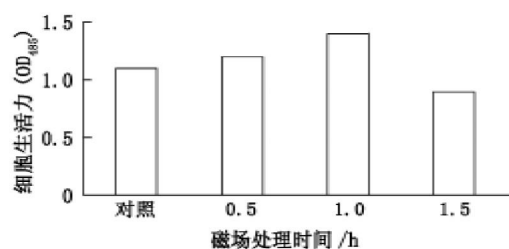


图1 磁场对细胞生活力的影响

Fig. 1 Effect of magnetic field on cell viability

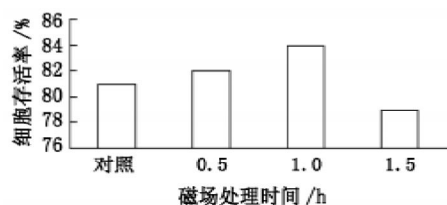


图2 磁场对细胞存活率的影响

Fig. 2 Effect of magnetic field on cell survival rate

的趋势(图3)。磁场强度一定, 处理时间不同, 细胞效应表现不同^[6], 这与前人的结果相同。在该处理时间范围内所表现出的促进或抑制的效应可能是此范围内的最佳阈值, 但更宽广的磁场处理时间和磁场强度范围的效应还须进一步探讨。

3 磁场对细胞干重和CoQ₁₀合成的影响

培养周期结束后测定细胞干重和CoQ₁₀含量的结果表明, 磁场处理0.5~1.0 h的细胞生物量显著提高, 但抑制了CoQ₁₀的合成和积累。磁场处理1.5 h的细胞生物量虽然降低, 但CoQ₁₀含量却有所提高(表1)。这可能与植物细胞对外界刺激所产生的防御反应有关^[7]。通常认为, 磁场对细胞的效应主要是因为细胞在磁场作用下, 可造成细胞内磁通量的变化, 由此导致产生感应电流, 使细胞内的电子和离子的传递发生改变, 细胞内酶的活性也发生改变, 从而导致细胞产生一系列的生理变化^[8]。

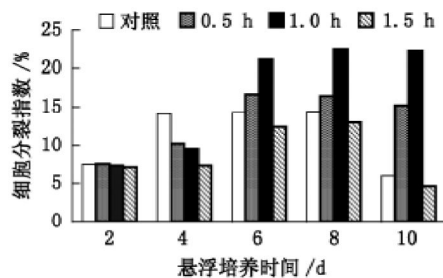


图3 磁场对细胞分裂指数的影响

Fig. 3 Effect of magnetic field on mitotic index

表1 磁场处理对细胞生长和CoQ₁₀含量的影响

Table 1 Effect of magnetic field on cell biomass and CoQ₁₀ content

处理时间/h	生物量/g(DW)·L ⁻¹	CoQ ₁₀ 含量/mg·L ⁻¹
0	11.44	2 756.5
0.5	13.54	2 025.0
1.0	16.28	1 822.8
1.5	9.39	3 451.8

参考文献

- 1 张鸿, 吴玉荷. 类维生素物质——辅酶Q₁₀的研究进展. 国外医学(卫生学分册), 2002, 29(6): 370~373
- 2 Ikeda T, Matsumoto T, Kato K et al. Isolation and identification of ubiquinone Q₁₀ from cultured cells of tobacco. Agr Biol Chem, 1974, 38 (11): 2297~2298
- 3 Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB et al. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension culture of taxus following elicitation with methyl jasmonate. Biotechnol Bioeng, 1999, 62: 97~105
- 4 王传贵, 余斐, 张姝等. 几种胁迫因素对中国红豆杉细胞培养的影响. 华中科技大学学报, 2001, 29(2): 111~113
- 5 刘华, 梅兴国. TTC法测定红豆杉细胞活力. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 537~539
- 6 张小云, 张维德, 卢丽等. 磁场的细胞效应. 基础医学与临床, 1994, 14(5): 335~340
- 7 崔堂兵, 郭勇, 林炜铁. 提高植物细胞培养法生产次级代谢物产量的方法. 植物生理学通讯, 2001, 37(5): 479~482
- 8 习岗, 傅志东. 外磁场对小麦萌发期过氧化物酶合成的影响及其激活效应. 植物生理学报, 1993, 19(2): 155~161