

# 细胞培养技术在神香草天然产物研究中的应用

王岩

齐齐哈尔市实验中学, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

DOI: 10.61369/EAE.2024020007

**摘 要 :** 神香草是重要的药用植物, 具有抗氧化、抗真菌和止咳等多种活性。利用现代细胞培养技术获得神香草次级代谢产物, 对于开发新型药物具有重要意义。本文介绍了神香草细胞悬浮培养技术和农杆菌介导转基因毛状根培养技术的研究现状及影响因素, 同时提出了未来的研究方向。

**关 键 词 :** 神香草; 愈伤组织; 悬浮培养; 毛状根; 次级代谢产物

## Application of Cell Culture Technology in the Study of Natural Products from *Hyssopus Officinalis*

Wang Yan

Qiqihaer shiyan middle school, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006

**Abstract :** The *Hyssopus officinalis* is an important medicinal plant used for antispasmodic, antioxidant, antifungal and cough treatment. The harvest of the secondary metabolites of *H. officinalis* uses modern cell culture technology, which is of great significance for the development of new drugs. This paper introduced the research status and influencing factors of cell suspension culture technology and *Agrobacterium*-mediated transgenic hairy root culture technology, and proposes future research directions.

**Keywords :** *Hyssopus officinalis*; callus; suspension culture; hairy roots; secondary metabolites

神香草 (*Hyssopus officinalis*) 属于双子叶植物纲、唇形科、神香草属、神香草种, 生长于欧洲、西南亚和中亚以及印度西北部的干燥、石灰质的土壤上, 是一种集观赏、药用、烹饪和芳香为一体的植物<sup>[1-2]</sup>。神香草的基因具有高度变异性, 到目前为止, 已有报道了包括 *Hyssopus officinalis* L.<sup>[3]</sup>、*Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.)<sup>[4]</sup>、*Hyssopus officinalis* subsp. *Aristatus*<sup>[5]</sup>、*Hyssopus officinalis* L. subsp. *pilifer* (Pant.) Murb.<sup>[6]</sup>在内的多个亚种。

神香草已于2017年被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 列入 GRAS (Generally Recognized as Safe) 数据库, 其植株可合成多种具有重要活性的次级代谢产物, 包括占干重0.3-1%的精油 (顺式-pinocamphone、松果体酮、 $\beta$ -pine烯、1,8-cineole、 $\beta$ -水芹烯、烯基甲基醚、肉豆蔻醇、月桂烯和反式 pinocamphone 等)、迷迭香酸和紫草酸等<sup>[7-8]</sup>, 赋予神香草抗菌<sup>[9]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>、抗肿瘤<sup>[10]</sup>、抗病毒<sup>[11]</sup>等多种活性, 使其在医药、食品、化妆品行业具有重要应用价值。然而, 由于受植物生理和环境变化等各种原因的影响, 神香草的次级代谢产物产量极低, 因此, 为了满足其在医药和食品中的需求, 迫切需要应用非常规方法来增加这些生物活性天然产物的产量。愈伤组织培养能够产生与植株栽培相同类型的次级代谢产物<sup>[12]</sup>。愈伤组织作为接种物, 可用于细胞悬浮培养、植株再生、诱导体细胞胚和不定根培养中<sup>[13-16]</sup>。将体外细胞培养技术用于植物次级代谢产物的研究, 不仅可以获得产量高、回收率高的目的产物, 而且质量和产量不受季节和地理限制<sup>[17]</sup>。因此, 植物细胞培养已成为在植物中获得次生代谢产物的主要方法<sup>[18]</sup>。

本文对神香草悬浮细胞培养法和转基因毛状根培养法产次级代谢产物的影响因素进行了探讨, 以期为了更好的开发神香草在医药领域的应用价值奠定基础。

### 一、悬浮细胞培养法

细胞悬浮培养方法是连续大规模生产次级代谢产物的主要方法之一。基于植物细胞全能性原理, 将愈伤组织或毛状根接种到具有适当生长刺激剂的液体培养基中, 经过细胞悬浮培养生产次

级代谢产物。愈伤组织是产生完全遗传自亲本植物的代谢产物的良好来源, 因此, 悬浮培养物中的所有细胞都能够产生与整个植物相同的化合物, 且产物浓度更高并更易于分离<sup>[19]</sup>。

#### (一) 愈伤组织的诱导及发育

在不同浓度激素的作用下, 发育后的愈伤组织呈紧密型或松

脆型。松散型愈伤组织细胞间隙大、易分散，是进行悬浮培养的适宜材料。外植体类型、植物生长调节剂（plant growth regulators, PGR）及其浓度、营养环境对愈伤组织的诱导及发育有重要影响<sup>[20]</sup>。

植物的叶片、叶柄、根、下胚轴和茎均可以作为诱导愈伤组织的外植体。Pakseresht研究发现，*H. Officinalis*的下胚轴和叶片作为外植体对愈伤组织诱导和愈伤组织发育没有显著影响；但是，当调整培养基中的植物生长调节剂种类和浓度时，会产生显著的影响<sup>[21]</sup>。

植物生长调节剂是对植物生长具有特定作用的简单分子，即使在低浓度下也有效刺激植物生长、代谢及次级代谢产物的产量<sup>[22-23]</sup>。 $\alpha$ -萘乙酸（NAA）和6-苄基氨基嘌呤（BAP）是常用的植物生长调节剂<sup>[24]</sup>。Pakseresht发现，在不同的NAA（N，分别是0、0.5、1、2 mg/L）和BAP（B，分别是0、0.5、1 mg/L）水平下*H. Officinalis*的不同外植体会引起愈伤组织发育的显著差异。结果表明，添加N2B1和N0.5B1的培养基分别显示出最高的愈伤组织诱导和愈伤组织生长速率。N<sub>0.5</sub>B<sub>0.5</sub>和N<sub>1</sub>B<sub>0.5</sub>培养基对叶片外植体的愈伤组织诱导最高，N<sub>2</sub>B<sub>1</sub>培养基对下胚轴外植体的愈伤组织诱导最高。另外，叶外植体愈伤组织在N<sub>0.5</sub>B<sub>0.5</sub>和N<sub>2</sub>B<sub>0.5</sub>培养基中生长速率最高；下胚轴外植体愈伤组织在N<sub>0.5</sub>B<sub>1</sub>培养基中生长速率最高。添加N<sub>2</sub>B<sub>1</sub>和N<sub>0.5</sub>B<sub>1</sub>的培养基分别表现出最高的愈伤组织诱导和愈伤组织生长速率<sup>[21]</sup>。Kochan等以神香草下胚轴作为外植体诱导愈伤组织，研究发现当MS琼脂培养基添加0.2 mg/LNAA和0.1 mg/L BAP时会导致愈伤组织生长不良；当将NAA和BAP浓度提高至1 mg/L和0.2 mg/L时即产生较好的效果<sup>[25]</sup>。Skrzypek对牛膝草下胚轴愈伤组织的细胞悬浮培养进行了研究，在B5培养基中补充1 mg/mL NAA和0.2 mg/mL BAP，在100 rpm/min、26℃条件下连续光照培养21天，在细胞悬浮培养物中检测到谷甾醇、豆甾醇，以及几种具有齐墩果烯和熊果烯骨架的五环三萜<sup>[26]</sup>。上述研究表明，生长素与细胞分裂素的协同使用加速了神香草愈伤组织的启动并增加了愈伤组织的诱导率。

不同的生长调节剂的协同使用会导致愈伤组织产生不同种类和不同产量的次级代谢产物。枸杞愈伤组织培养时，BA/NAA的组合能显著增加绿原酸和咖啡酸的产生和积累；TDZ/IAA组合、TDZ和TDZ/NAA组合分别显著提高了香草酸和芦丁、没食子酸、槲皮素的合成<sup>[27]</sup>。

## （二）悬浮培养的引发剂

悬浮培养细胞经过几次传代后，次级代谢产物生产力可能会下降。因此，研究愈伤组织在液体培养基中悬浮培养条件很重要。为了提高目的产物的产量，悬浮培养时往往需要添加茉莉酸甲酯、酵母提取物等作为引发剂<sup>[28]</sup>。

Pakseresht等研究了酵母提取物（0、5、10、20和40 mg/L）、水杨酸（0、2、4、8和16 mg/L）和柠檬酸（0、2、4、8和16 mg/L）对*H. officinalis*悬浮细胞培养物中 $\beta$ -蒎烯、1,8-桉树脑、顺式松香油等次级代谢产物产量的影响。结果发现，上述引发剂不仅没有引起 $\beta$ -蒎烯、1,8-桉树脑产量的提高，在实验范围内产量还显著降低了，但是顺式松香油的产量随着酵母提

取物含量的提高有显著增加<sup>[21]</sup>。

## 二、转基因毛状根培养技术及其影响因素

近年来，农杆菌介导的水平基因转移的机理和应用都取得了重大进展，特别是农杆菌介导的基因瞬时转化技术被开发用于植物生物技术领域<sup>[29-30]</sup>。已有多种报道应用转基因植物细胞培养技术生产重要药用植物的次级代谢产物<sup>[31-32]</sup>。

高等植物的根系生长较慢，并且收获根部代谢产物也较困难。毛状根培养系统是器官（根）培养的替代方法，适用于植物生化和药理研究，是药用化合物的重要来源之一<sup>[33-34]</sup>。发根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）通过伤口感染植物后，它的Ri质粒的T-DNA片段插入植物基因组，参与控制植物生长素和细胞分裂素的生物合成。*A. rhizogenes*诱发双子叶植物毛状根病，毛状根在适宜条件下生长迅速。经*A. rhizogenes*遗传转化的毛状根与植物相比具有相同或更高的次级代谢产物生产能力<sup>[35]</sup>。另外，毛状根遗传稳定，生长速度通常快于细胞培养物，并且培养基中不需要添加激素。营养物质、共培养时间等条件是制约毛状根培养法生产效率的主要因素。

### （一）营养物质对毛状根生产次级代谢产物的影响

在许多毛状根培养物中，毛状根生物量及次生代谢产物合成都受到初始糖浓度的影响，例如，西洋参（*Panax quinquefolium*）毛状根中皂苷的积累<sup>[35]</sup>、松果菊毛状根中菊苣酸的合成以及青蒿中青蒿素的合成等。Kochan等利用带有Ri1855质粒的发根农杆菌LBA 9402感染神香草四周龄的幼苗叶柄诱导了毛状根形成，并研究了蔗糖浓度对毛状根产迷迭香酸的影响。研究发现，经过四次传代培养后，B5培养基中高浓度的蔗糖对毛状根生长速率和迷迭香酸的产生有积极的影响，当B5培养基中的蔗糖浓度从3%w/v增加到10%w/v时，毛状根（新鲜\干燥）生物量逐渐增加，10%蔗糖培养基中生物质干重较3%蔗糖的高出5倍以上，所含的迷迭香酸几乎是3%蔗糖中的2倍。该水平比一年生田间生长的植物的愈伤组织、细胞悬浮培养物和根中的水平至少高出60%<sup>[25]</sup>。

不同的培养环境会导致毛状根分泌代谢产物的不同。Murakami等研究了不含激素的MS、1/2 MS、Woody Plant（WP）和B5培养基对*H. officinalis*毛状根产酚类化合物的影响。在WP液体培养基中培养第7周时迷迭香酸产量最大，达到干重的8.03%，该水平是观察到的在亲本植物的叶子部分水平的8倍以上，培养至第8周时紫草酸B产量达到最大，是干重的3.89%。在MS培养基中培养时，转化根中的紫草酸产量最大，占干重0.18%。

### （二）共培养时间的影响

*A. rhizogenes*和植物细胞在无抗生素的培养基中共培养可以实现农杆菌对植物细胞的转化，共培养时间的长短对转化率有显著的影响。如果共培养时间太短，则外源基因将不能完全整合，转化率会降低；如果共培养时间过长，将导致*A. rhizogenes*过度生长，从而破坏愈伤组织细胞对养分的正常吸收，抑制植物细胞

的正常生长,导致外植体褐变甚至死亡。

获得 *H. officinalis* 转基因毛状根通常需要较同为唇形科的黄芩、丹参更长的共培养时间。Kochan 等选择 *H. officinalis* 叶片作为外植体,在 B5 培养基中与发根农杆菌黑暗条件下 26℃ 共培养了 21–28 天,至出现不定根(长 1–2 cm)后通过氨苄西林抗性筛选获得了毛状根培养物<sup>[25]</sup>。Murakami 等将发根农杆菌 ATCC 15834 菌株通过针刺接种到 *H. officinalis* 的茎的切端,在 YEB 琼脂培养基上共培养 20 天获得了转化的根,在 1/2 MS 琼脂培养基上经克拉霉素筛选获得了毛状根培养物。

此外,外植体类型、乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)浓度也是影响毛状根产物合成的主要因素。在土牛膝(*Achyranthes aspera*)毛状根诱导研究中发现,体外生长的幼龄叶片对发根农杆菌的转化高度敏感,其次是下胚轴和子叶,茎的毛状根诱导率极低,根和愈伤组织不能诱导形成毛状根。AS 对土牛膝的毛状根形成的诱导的最佳浓度也是 100 μmol/L,当共培养培养基中缺乏

AS 时不产生毛状根,当 AS 的浓度增加到 300 μmol/L 以上时,对外植体产生毒性,发根诱导率显著下降。

### 三、展望

通过 *H. officinalis* 悬浮细胞培养法和转基因毛状根培养法获得次级代谢产物的研究在上个世纪就已见报道,但是进展缓慢,还存在较大的研究空间。未来研究可以从以下几方向进行:(1) *H. officinalis* 的基因组信息不足,使通过体外和体内方法增加其产物合成的设计受到了限制。通过不同外植体积累植物化学物质的基因组序列信息可广泛了解 *H. officinalis* 各种代谢过程,可为设计活性化合物高效生物合成途径提供支持;(2) *H. officinalis* 次级代谢产物种类繁多,功能多样,通过悬浮细胞培养法和转基因毛状根培养法可以深入挖掘次级代谢产物并分析其功能,为 *H. officinalis* 在医药领域的应用奠定理论基础。

### 参考文献

- [1] Jhantigh O, Najafi F, Naghdi Badi H, et al. Essential oil composition of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) under salt stress at flowering stage[J]. *Journal of Essential Oil Research*, 2016, 28(5): 458–464.
- [2] Rashidi S, Eikani M H, Ardjmand M. Extraction of *Hyssopus officinalis* L. essential oil using instant controlled pressure drop process[J]. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1579: 9–19.
- [3] Kara N, Baydar H. Morphogenetic, ontogenetic and diurnal variabilities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) [J]. *Res. Crop*. 2012, 13: 661–668.
- [4] Venditti A, Bianco A, Frezza C, et al. Essential oil composition, polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy[J]. *Industrial Crops & Products*, 2015, 77: 353–363.
- [5] Borrelli F, Pagano E, Formisano C, et al. *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus*: An unexploited wild-growing crop for new disclosed bioactives[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 140(11): 111594.
- [6] Džamić A M, Soković M D, Novaković M, et al. Composition, antifungal and antioxidant properties of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *pilifer* (Pant.) Murb. essential oil and deodorized extracts[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 51: 401–407.
- [7] Özer H, Sökmen M, Güllüce M, et al. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius* [J]. *Italian Journal of Food Science*, 2006, 18(1): 73–84.
- [8] Murakami Y, Omoto T, Asai I, et al. Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, 53(1): 75–78.
- [9] Hristova Y, Wanner J, Jirovetz L, et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Hyssopus officinalis* L. from Bulgaria against clinical isolates of *Candida* species[J]. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2015, 29: 592–601.
- [10] Kizil S, Guler V, Kirici S, et al. Some agronomic characteristics and essential oil composition of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) under cultivation conditions[J]. *Acta Scientiarum Polonorum– Hortorum Cultus*, 2016, 15: 193–207.
- [11] Mohan M, Seth R, Singh P, et al. Composition of the Volatiles of *Hyssopus officinalis* (L.) and *Thymus serpyllum* (L.) from Uttarakhand Himalaya[J]. *National Academy Science Letters*, 2012, 35(5): 445–448.
- [12] Nikolaeva T N, Zagorskina N V, Zaprometov M N. Production of phenolic compounds in callus cultures of tea plant under the effect of 2,4-D and NAA[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2009, 56: 45–49.
- [13] Mustafa N R, De Winter W, Van Iren F, et al. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures[J]. *Nature Protocol*, 2011, 6(6): 715–742.
- [14] Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(9): 3159–3173.
- [15] Abbasi B H, Ali H, Yücesan B, et al. Evaluation of biochemical markers during somatic embryogenesis in *Silybum marianum* L.[J]. *3 Biotech*, 2016, 6(1): 71–78.
- [16] Sivakumar G, Yu K, Paek K. Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2005, 5: 333–342.
- [17] Jiao J, Gai Q Y, Wang W, et al. Remarkable enhancement of flavonoid production in a co-cultivation system of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures and immobilized *Aspergillus niger* [J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 112: 252–261.
- [18] Mulabagal V, Tsay H S. Plant cell cultures—an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites[J]. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2004, 2: 29–48.
- [19] Ma J K, Drake P M, Christou P. Genetic modification: the production of recombinant pharmaceutical proteins in plants[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4: 794–805.
- [20] Khan T, Abbasi B H, Zeb A, et al. Carbohydrate-induced biomass accumulation and elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica* [J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 126: 168–176.

- [21] Pakseresht G, Kahrizi D, Mansouri M, et al. Study of callus induction and cell culture to secondary metabolite production in *Hyssopus officinalis* L.[J]. Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences, 2016, 5(2): 104–111.
- [22] Zhao J, Davis L C, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites[J]. Biotechnology Advances, 2005, 23 (4): 283–333.
- [23] Teale W D, Paponov I A, Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, 7 (11): 847–859.
- [24] Mohammad S, Khan M A, Ali A, et al. Feasible production of biomass and natural antioxidants through callus cultures in response to varying light intensities in olive (*Olea europaea*. L) cult. Arbosana[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2019, 193(4): 140–147.
- [25] Kochan E, Wysokinska H, Chmiel A, et al. Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis*[J]. Zeitschrift Fur Naturforschung C, 1999, 54c: 11–16.
- [26] Skrzypek Z, Wysokińska H. Sterols and triterpenes in cell culture of *Hyssopus officinalis* L.[J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2003, 58(5–6): 308–312.
- [27] Karakas F P. Efficient plant regeneration and callus induction from nodal and hypocotyl explants of goji berry (*Lycium barbarum* L.) and comparison of phenolic profiles in calli formed under different combinations of plant growth regulators[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 146(1): 384–391.
- [28] Máthé Á, Hassan F, Kader A A. In Vitro micropropagation of medicinal and aromatic plants. Berlin: Springer 2015: 305–336.
- [29] Guo M L, Ye J Y, Gao D W, et al. Agrobacterium-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy[J]. Biotechnology advances, 2019, 37(1): 259–270.
- [30] Hussain M S, Fareed S, Saba A M, et al. Current approaches toward production of secondary plant metabolites[J]. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2012, 4: 10–20.
- [31] Yin Y C, Zhang X D, Gao Z Q, et al. Over-expressing root-specific  $\beta$ -amyrin synthase gene increases glycyrrhizic acid content in hairy roots of *glycyrrhiza uralensis*[J]. Chinese Herbal Medicines, 2019, 11(2): 192–199.
- [32] Vinterhalter B, Savić J, Zdravković-Korać S, et al. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of *Gentiana utriculosa* L. and xanthones decussatin-1-O-pri-meverside and decussatin accumulation in hairy roots and somatic embryo-derived transgenic plants[J]. Industrial Crops & Products, 2019, 130: 216–229.
- [33] Deepthi S, Satheeshkumar K. Effects of major nutrients, growth regulators and inoculum size on enhanced growth and camptothecin production in adventitious root cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. [J]. Biochemical Engineering Journal, 2017, 117: 198–209.
- [34] Wang J, Li J L, Li J, et al. Production of active compounds in medicinal plants: from plant tissue culture to biosynthesis[J]. Chinese Herbal Medicines, 2017, 9(2): 115–125.
- [35] Kochan E, Szymańska G, Szymczyk P. Effect of sugar concentration on ginsenoside biosynthesis in hairy root cultures of *Panax quinquefolium* cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactor[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36: 613–619.