

周笑如, 周昱成, 刘学, 等. 狭叶薰衣草叶片愈伤组织和悬浮细胞组织培养及其代谢物差异[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(12): 2356-2366.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.12.019

狭叶薰衣草叶片愈伤组织和悬浮细胞组织培养及其代谢物差异

周笑如, 周昱成, 刘学, 刘春环, 杨成

(江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为明确狭叶薰衣草(*Lavandula angustifolia* Mill.) 叶片产生活性代谢物的能力, 本研究以狭叶薰衣草无菌苗叶片为外植体, 建立无菌苗叶片愈伤组织和悬浮细胞培养体系, 利用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱仪(UHPLC-Q-TOF-MS)对愈伤组织和悬浮细胞的代谢物进行表征, 并分析差异代谢物的代谢通路, 比较代谢物对 ABTS (2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 自由基的清除能力。结果表明, 狭叶薰衣草种子在培养 30 d 后即可得到无菌苗, 愈伤组织和悬浮细胞在培养 8 d 后, 生长量可提升 7 倍以上。愈伤组织和悬浮细胞中共检测出 1 403 种代谢物, 包括迷迭香酸、齐墩果酸、咖啡酸甲酯等薰衣草特色活性物质和未报道过的人参皂苷 F3、积雪草酸、羟基积雪草酸、刺囊酸等活性物质。从 1 403 种代谢物中筛选得到 218 种差异显著性代谢物, 包括 49 种生物活性物质。愈伤组织和悬浮细胞表现出不同的代谢物合成能力, 愈伤组织偏向于酚酸类化合物的合成而悬浮细胞偏向于萜类化合物的合成。差异代谢通路主要富集于代谢途径(Metabolic pathways)和核苷酸代谢(Nucleotide metabolism)通路。愈伤组织和悬浮细胞乙醇提取物均具有较高的 ABTS 自由基清除能力, 半清除质量浓度(IC_{50})分别为 0.50 mg/mL 和 0.49 mg/mL。因此, 利用狭叶薰衣草无菌苗叶片作为外植体, 利用不同的组织培养方式, 可以得到多样化的次生代谢产物。本研究结果为狭叶薰衣草叶片愈伤组织和悬浮细胞组织培养及其代谢物提取提供了依据。

关键词: 狭叶薰衣草; 组织培养; 愈伤组织; 悬浮细胞; 次生代谢物; 代谢组学

中图分类号: Q942.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)12-2356-11

Leaf callus and suspension cell tissue culture of *Lavandula angustata* Mill. and their metabolite differences

ZHOU Xiaoru, ZHOU Yucheng, LIU Xue, LIU Chunhuan, YANG Cheng

(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to clarify the ability of *Lavandula angustifolia* Mill. leaves to produce bioactive metabolites, the sterile seedlings of *L. angustifolia* were used as explants to establish the culture system of callus and suspension cells of sterile seedling leaves. The metabolites of callus and suspension cells were characterized by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS), and the metabolic pathways of differential metabolites were analyzed. The scavenging ability of metabolites to ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) free radicals was compared. The results showed that the aseptic seedlings could be obtained after 30 days of culture, and the growth of callus and suspension cells could be increased by more than seven times after eight days of culture. A total of 1 403 metabolites were detected in callus and suspension cells, including rosmarinic acid, oleanolic acid, caffeic acid methyl ester and other characteristic ac-

收稿日期: 2024-04-15

基金项目: 江苏省自然科学基金青年项目(BK20221069)

作者简介: 周笑如(1999-), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 研究方向为植物组织培养及活性成分研究。(E-mail) xiaoru0901@163.com

通讯作者: 刘学, (E-mail) xueliu@jiangnan.edu.cn

tive substances of lavender and unreported ginsenoside F3, asiatic acid, hydroxyasiatic acid, echinocystic acid and other active substances. A total of 218 significantly different metabolites were screened from 1 403 metabolites, including 49 bioactive substances. Callus and suspension cells showed different ability to synthesize metabolites. Callus preferred the synthesis of phenolic acids, while suspension cells preferred the synthesis of terpenoids. The differential metabolic pathways were mainly enriched in Metabolic pathways and Nucleotide metabolism pathways. The ethanol extracts of callus and suspension cells had high ABTS free radical scavenging ability, and the half scavenging mass concentration (IC_{50}) was 0.50 mg/mL and 0.49 mg/mL, respectively. Therefore, using the leaves of *Lavandula angustata* aseptic seedlings as explants, using different tissue culture methods, a variety of secondary metabolites can be obtained. The results of this study can provide a basis for callus and suspension cell tissue culture and metabolite extraction of *Lavender angustifolia* leaves.

Key words: *Lavandula angustifolia* Mill.; tissue culture; callus; suspension cell; secondary metabolites; metabolomics

狭叶薰衣草 (*Lavandula angustifolia* Mill.) 是唇形科薰衣草属植物,原产于地中海一带。中国的狭叶薰衣草种植主要集中在新疆自治区。狭叶薰衣草富含黄酮类、酚类等次生代谢产物,具有抗氧化和消炎等功能,其挥发油具有芳香味,可缓解焦虑和治疗失眠症^[1-2],因此,狭叶薰衣草被广泛应用于食品、药品和化妆品生产中。目前,对狭叶薰衣草的开发利用多集中于花、穗等器官,而对茎、叶的利用较少,造成了资源的浪费。

植物组织培养技术以“植物细胞具有全能性”为理论基础,可以克服自然环境对植物生长的限制,并促进植物中活性成分的生物合成。对薰衣草的组织培养和代谢物成分研究已有一些报道。杨鑫等^[3]比较了薰衣草无菌苗和自然生长植株中的挥发性成分差异,初步揭示了培养方式对薰衣草成分的影响。许耀祖等^[4]以孟斯泰德薰衣草叶片为材料,建立了薰衣草叶片悬浮细胞培养体系,奠定了薰衣草细胞培养技术的基础。Kovatcheva 等^[5]和 Pavlov 等^[6]从狭叶薰衣草叶片悬浮细胞中提取得到迷迭香酸,开拓了薰衣草细胞的应用潜力。但上述研究中对薰衣草不同细胞培养方式的代谢物差异及其形成机制仍缺乏深入分析。此外,由于植物代谢物种类繁多,传统的检测方法难以进行全面分析。近年来发展起来的代谢组学技术为植物体代谢物的全面分析、不同生长环境下植物差异代谢物挖掘及代谢通路的揭示提供了新的手段^[7]。

基于狭叶薰衣草不同细胞培养方式的代谢物差异及其形成机制缺乏研究的现状,本研究在狭叶薰衣草无菌苗培养的基础上,以无菌苗叶片为外植体,建立其愈伤组织和悬浮细胞的培养体系,并利用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱联用仪(UHPLC-Q-

TOF-MS)对培养得到的愈伤组织、悬浮细胞进行代谢物鉴定,明确其差异代谢物及代谢通路,为利用植物组培技术进行狭叶薰衣草叶片天然活性物质的提取和细胞次生代谢产物的合成调控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

狭叶薰衣草种子购于宿迁山丘园艺有限公司,MS培养基(pH为5.85~5.88)购于青岛海博生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织及悬浮细胞培养基配制 愈伤组织诱导及继代培养基:分别称取2.0 mg 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、0.5 mg 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、30.0 g 蔗糖及7.0 g 琼脂,利用MS培养基定容至1 000 mL,调节混合液pH至5.85~5.88得到。悬浮细胞培养基:分别称取2.0 mg 6-BA、0.5 mg 2,4-D和30.0 g 蔗糖,利用MS培养基定容至1 000 mL,并调节混合液pH至5.85~5.88得到。配好的培养基均在121℃条件下高压蒸汽灭菌20 min,冷却备用。

1.2.2 无菌苗培养 10 g 狭叶薰衣草种子用0.04%赤霉素浸种10 h后取出,利用无菌水清洗3次,在超净工作台中将清洗后的狭叶薰衣草种子用3%次氯酸钠(NaClO)溶液浸泡消毒5 min,然后利用无菌水冲洗3~5次,再用无菌枪头吸取狭叶薰衣草种子点播到MS培养基上,在恒温25℃、光周期16 h/d的条件下培养30 d,得到狭叶薰衣草无菌苗。

1.2.3 愈伤组织的诱导及继代培养 愈伤组织诱导:在超净工作台中,将狭叶薰衣草无菌苗叶片切成3~5 mm长的小块,以狭叶薰衣草无菌苗叶片小块为外植体,接种到愈伤组织诱导培养基中,在恒温

25℃、光周期 16 h/d 的条件下培养 30 d, 统计长出愈伤组织的外植体数, 得到外植体的出愈率。

出愈率 = (长出愈伤组织的外植体数 / 接种的外植体总数) × 100% (1)

愈伤组织形态观察及继代培养: 采用徒手制片的方法, 利用 0.9% 生理盐水配制的 0.2% 亚甲基蓝溶液将愈伤组织染色后, 再利用 Leica DM500 正置显微镜(德国 Ernst Leitz Wetzlar GmbH 公司产品)对不同形态的愈伤组织进行形态观察。选取无明显褐变的愈伤组织接种于继代培养基中, 每皿(培养皿尺寸 100 mm × 100 mm)接种 1 g, 在恒温 25℃、湿度 50% ± 5%、光周期 16 h/d 的条件下培养, 每 7~10 d 继代 1 次, 继代培养至 15 代。

1.2.4 悬浮培养体系的建立 悬浮细胞培养: 选取继代培养 3 次以上的疏松愈伤组织接种于悬浮细胞培养基中, 每皿接种量为 1 g, 置于摇床上 100 r/min 振荡培养, 每 7 d 用 100 μm 无菌筛网过滤后接种到新培养基中, 过滤物在 25℃ 的培养箱中暗培养, 直至形成稳定的悬浮细胞系, 继代培养至 15 代。

1.2.5 细胞生长曲线及细胞生长活力曲线的绘制

细胞生长曲线: 愈伤组织接种后在超净工作台中每 2 d 取出培养皿中的愈伤组织进行称重 1 次, 共 7 次, 建立愈伤组织细胞生长曲线; 将悬浮细胞摇匀后用 100 μm 细胞滤网过滤, 称取滤渣的重量即为悬浮细胞鲜重, 每 2 d 称重 1 次, 共 7 次, 建立悬浮细胞生长曲线。

细胞生长活力检测: 采用 TTC 染色法^[8], 用 UV-1800PC 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司产品)测得 485 nm 处的吸光度。每 2 d 检测 1 次, 共 7 次, 以生长天数为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制细胞生长活力曲线。

1.2.6 愈伤组织和悬浮细胞差异代谢物及其代谢通路分析 样品制备: 取愈伤组织和悬浮细胞各 40 mg, 分别加入体积比 2:2:1 的甲醇、乙腈、水混合溶液, 利用漩涡混合器 QT-1(上海琪特分析仪器有限公司产品)涡旋混合, 4℃ 低温超声 30 min, -20℃ 静置 10 min, 4℃ 离心 20 min, 取上清液真空干燥, 然后加入 100 μL 体积分数 50% 的乙腈稀释液, 涡旋复溶, 离心后取上清液用于质谱分析, 每组样品重复 6 次。

利用 Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪及 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱

(1.7 μm × 2.1 mm × 100.0 mm)(美国 H&E 公司产品)对愈伤组织和悬浮细胞离心上清液进行色谱分析。色谱条件为柱温 25℃, 流速 0.5 mL/min, 进样量 2 μL; 流动相 A 相为乙酸铵含量 25 mmol/L、氨水含量 25 mmol/L 的混合溶液, B 相为乙腈; 梯度洗脱程序为 0~0.50 min 95% B 相, 0.51~7.00 min 95%~65% B 相, 7.01~8.00 min 65%~40% B 相, 8.01~9.00 min 40% B 相, 9.01~9.10 min 40%~95% B 相, 9.11~12.00 min 95% B 相。

利用 Thermo Scientific Orbitrap Exploris 480 质谱仪, 采用电喷雾电离(ESI)正离子模式和负离子模式对愈伤组织和悬浮细胞离心上清液进行质谱分析。ESI 源条件为离子源温度 350℃, 喷雾电压(IS-VF)为 3 500 V(正离子模式)和 2 800 V(负离子模式)。一级质荷比检测范围 70~1 200, 分辨率 60 000, 扫描累积时间 100 ms。二级质荷比扫描范围 70~1 200, 分辨率 60 000, 扫描累积时间 100 ms, 动态排除时间 4 s。

原始质谱数据经 ProteoWizard 软件转换成 mzXML 格式, 然后采用 XCMS 软件进行峰对齐、保留时间校正和峰面积提取等处理, 以一级质谱确定分子量, 再用二级质谱碎片和同位素分布信息与中科新生命植物代谢物数据库进行信息匹配, 鉴定代谢物结构。

以主成分分析、正交偏最小二乘判别分析和 *t* 检验筛选出愈伤组织和悬浮细胞显著性差异代谢物, 并进行生物信息学分析。利用 KEGG 数据库, 对差异显著代谢物的代谢通路进行注释和分析。

1.2.7 代谢物对 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)自由基清除能力比较 将愈伤组织和悬浮细胞冻干处理后, 分别取冻干悬浮细胞和愈伤组织 10 mg, 加入无水乙醇充分研磨, 37℃ 超声 30 min, 得到愈伤组织和悬浮细胞的乙醇提取液, 将上述提取液用无水乙醇稀释为质量浓度 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL 稀释液。

称取 6.6 mg 过硫酸钾定溶解于 10 mL 去离子水, 配制成为 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液, 然后称取 7.7 mg ABTS 溶解于 2 mL 过硫酸钾溶液, 混合反应 16 h 后, 用水将其稀释为 734 nm 吸光度为 0.7 的 ABTS 工作液。在 96 孔板中加入 50 μL 不同质量浓度的稀释液和 150 μL ABTS 工作液及 50 μL 无水乙

醇和 150 μL ABTS 工作液,每处理 3 次重复。反应 15 min 后,分别测得不同质量浓度的稀释液和无水乙醇 734 nm 处的吸光度,分别记为 A_s 和 A_c 。ABTS 自由基清除率按下式计算:

$$\text{ABTS 自由基清除率} = (1 - A_s/A_c) \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_s 为稀释液的吸光度; A_c 无水乙醇的吸光度。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导及继代培养

狭叶薰衣草种子培养 30 d 即可获得完整的狭叶薰衣草无菌苗,具有薰衣草芳香气味。叶片片段为外植体进行愈伤组织诱导培养,出愈率为 76%,整体呈

现灰白色。叶片愈伤组织在继代培养过程中,细胞形态会呈现 3 种情况:绿色且质地坚硬不易分开的细胞团,记为“绿色坚硬”;白色且质地疏松、形态松散的细胞团,记为“白色疏松”;白色且质地软烂、含水量较多的细胞团,记为“白色软烂”(图 1)。将这 3 种细胞形态的细胞团经过 0.2% 亚甲基蓝染色后在显微镜下观察可知,“绿色坚硬”细胞团的细胞团聚紧凑,不易分开;“白色疏松”细胞团的细胞结构松散,细胞分界明显,多呈大小均一的圆形细胞;“白色软烂”细胞团的细胞在视野内多呈巨大圆形状,细胞形态不均。因此,选取“白色疏松”细胞团的细胞作为继代培养的材料,其细胞在形态上基本符合分生细胞增殖较快、形态均匀且等径的特征。

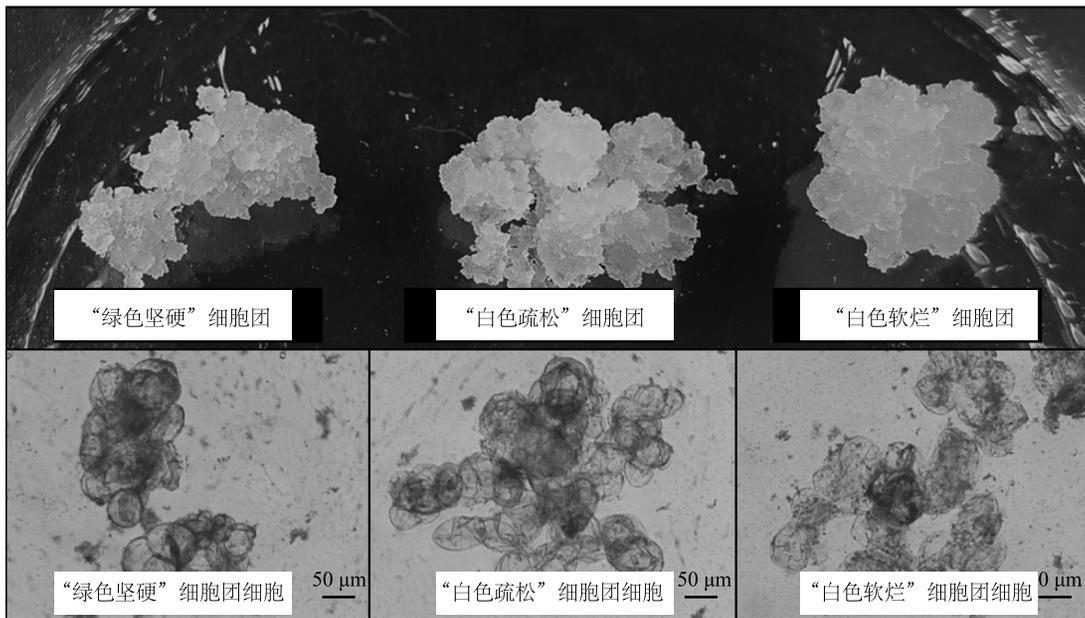


图 1 狭叶薰衣草叶片愈伤组织形态和显微结构

Fig.1 Morphological and microstructural drawings of *Lavandula angustifolia* leaf callus

叶片愈伤组织细胞生长曲线和细胞活力变化如图 2 所示。从图中可以看出,叶片愈伤组织生长呈“S”形特征,0~4.0 d 细胞缓慢增长,4.1~10.0 d 细胞快速增长,10.1~14.0 d 细胞又缓慢增长。随着时间变化,细胞活力呈先上升后下降的变化特征。0~4.0 d 细胞活力增加,4.1~8.0 d 细胞活力快速下降,8.1~14.0 d 细胞活力缓慢下降,因而 8.0 d 为适宜的继代培养时间。

2.2 悬浮细胞生长曲线及细胞生长活力曲线特征

狭叶薰衣草叶片愈伤组织经过 3 代以上悬浮培养后,细胞呈匀浆状,显微镜下可观察到细胞为小圆

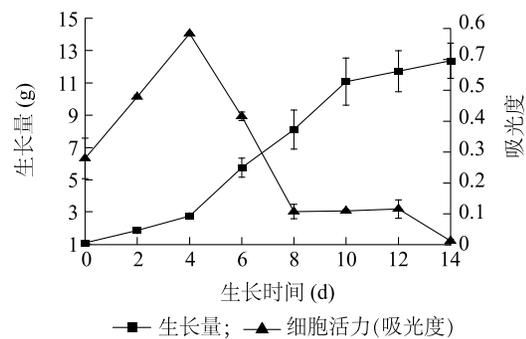


图 2 叶片愈伤组织细胞生长曲线、细胞活力变化特征

Fig.2 Changes in cell growth curve and cell vitality of *Lavandula angustifolia* leaf callus

球状,细胞分裂增殖旺盛(图3)。狭叶薰衣草叶片悬浮细胞培养0~4.0 d缓慢生长,4.1~10.0 d生长迅速,10.1 d后生长速率变缓。细胞活力同样呈先上升后下降的趋势,在生长第6.0 d达到峰值,6.1~10.0 d细胞活力快速下降,10.1~14.0 d细胞活力缓慢下降,因此,悬浮细胞的最佳继代时间为7.1~10.0 d(图4)。

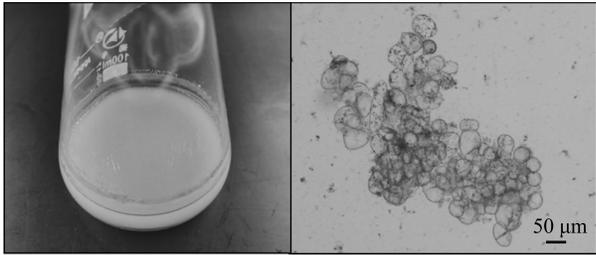


图3 狭叶薰衣草叶片悬浮细胞形态及显微结构

Fig.3 Morphological and microstructural drawings of *Lavandula angustifolia* leaf suspension cells

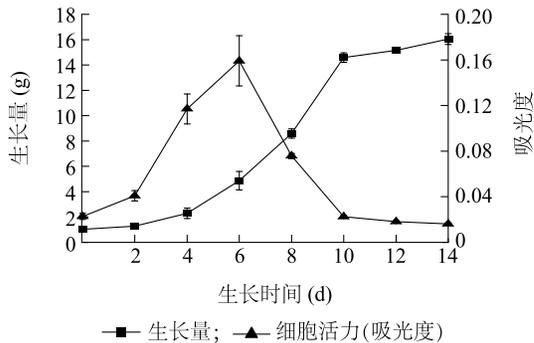


图4 狭叶薰衣草叶片悬浮细胞生长曲线、细胞活力变化特征

Fig.4 Changes in cell growth curve and cell vitality of *Lavandula angustifolia* leaf suspension cells

2.3 愈伤组织和悬浮细胞中的代谢物

利用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱仪(UHPLC-Q-TOF-MS)从狭叶薰衣草愈伤组织(LC)和悬浮细胞(LS)提取液中共检测到1403种代谢物,其中正离子模式922种,负离子模式481种。常见种类代谢物统计结果如表1。脂类和类脂类化合物的含量高达21.60%,这与Topçu等^[8]研究结果相一致。2种细胞培养物中均含有较为丰富的天然活性成分,狭叶薰衣草细胞培养物检测到已报道的迷迭香酸、绿原酸、咖啡酸甲酯、牡荆素、齐墩果酸等薰衣草特征活性物^[9-10],还检测到未见报道过的人

参皂苷F3、积雪草酸、羟基积雪草酸、刺囊酸等活性物质,说明狭叶薰衣草细胞培养物除了拥有与传统植株相似的次生代谢物合成能力,还能合成更多种类的生物活性物,展现出合成次生代谢物的多样性。

表1 常见种类代谢物

Table 1 Common types of metabolites

类别	数量	比例(%)
脂类和类脂类	303	21.60
有机酸及其衍生物	298	21.24
甾体及其衍生物	73	5.20
萜类	67	4.78
黄酮类	42	2.99
酚类	26	1.85
香豆素类	15	1.07
肉桂酸类	14	1.00
生物碱及其衍生物	7	0.50

2.4 愈伤组织和悬浮细胞中的差异代谢物

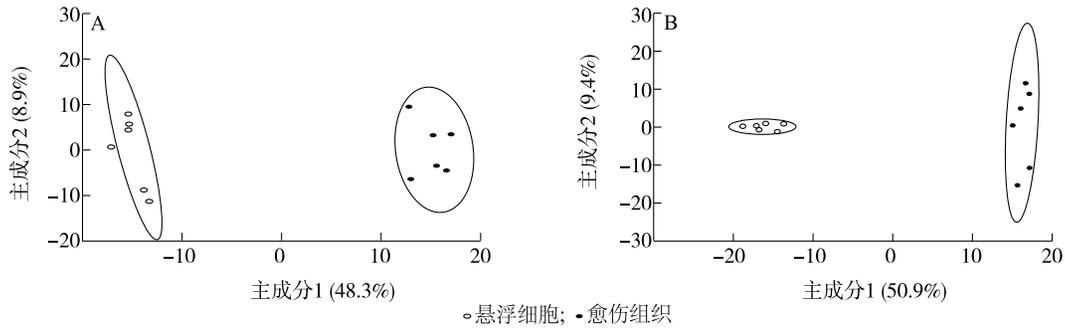
正、负离子模式下狭叶薰衣草愈伤组织(LC)和悬浮细胞(LS)鉴定中得到的代谢物主成分得分如图5所示。从图中可以看出,同组样品聚集,说明组内的重复性较好;不同组样品分离,说明组间的差异较为显著。

正、负离子模式下狭叶薰衣草愈伤组织(LC)和悬浮细胞(LS)代谢物的正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)结果如图6所示。从图中同样可以看出,样品具有组内相对聚集、组间分离的特征。

基于OPLS-DA分析,可以得到各代谢物的VIP(变量重要性投影值)。以VIP>1和t检验的P<0.05为标准,共筛选得到218种愈伤组织(LC)和悬浮细胞(LS)的差异显著性代谢物。其中,49种差异代谢物为生物活性物质(表2),包括4种黄酮类、23种酚酸类、14种萜类、4种生物碱类、3种醌类、1种芪类。差异倍数排名前20的差异代谢物绘制的蝴蝶图如图7所示。与愈伤组织(LC)相比,悬浮细胞(LS)代谢物中含量显著上升(差异倍数>1)的代谢物共有78种物质,主要为羟基积雪草酸、齐墩果酸等三萜类物质。差异倍数最高(32.75倍)的差异代谢物是齐墩果酸,一种五环三萜类化合物,主要存在于天然生长的薰衣草茎叶中^[11],具有抗氧化和消炎等功效^[12]。其次为羟基积雪草酸,亦是五环三萜类化合物,对氧

化应激和 UVB 辐射具有保护作用,还有促进伤口愈合、防止皮肤老化、消炎等功效^[13]。悬浮细胞(LS)代谢物中含量下调的物质共有 140 种,主要为咖啡酸、紫丁香苷等酚酸类化合物。以上结果说明,薰衣草细

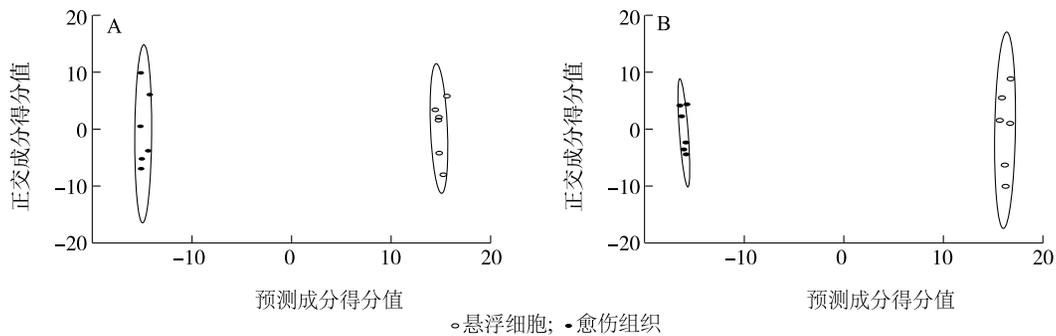
胞中天然活性物质种类丰富,且不同的细胞培养方式对薰衣草细胞中次生代谢物的合成调控存在差异。愈伤组织偏向于酚酸类化合物的合成,而悬浮细胞偏向于萜类化合物的合成。



A:正离子模式;B:负离子模式。

图5 不同离子模式下狭叶薰衣草愈伤组织和悬浮细胞中代谢物的主成分得分

Fig.5 Principal component scores of metabolites in callus and suspension cells of *Lavandula angustata* under different ion modes



A:正离子模式;B:负离子模式。

图6 正、负离子模式下狭叶薰衣草愈伤组织和悬浮细胞中代谢物的正交偏最小二乘法判别分析得分图

Fig.6 Orthogonal partial least squares discriminant analysis scores of metabolites in callus and suspension cells of *Lavandula angustata* under positive and negative ion modes

表2 愈伤组织和悬浮细胞中差异显著的生物活性物质

Table 2 Bioactive substances with significant differences between callus and suspension cells

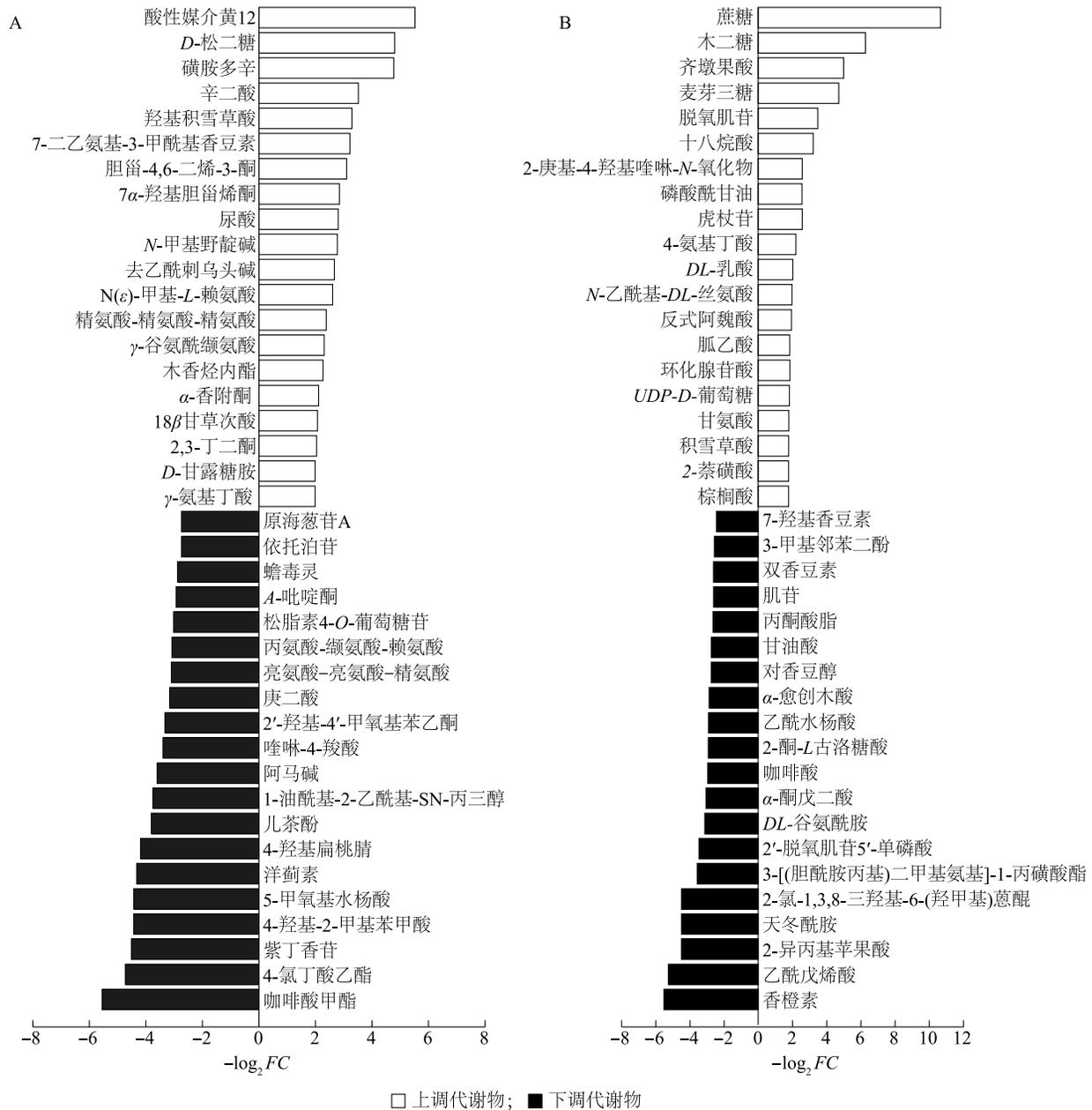
类别	中文名	质荷比	保留时间 (s)	化学式	离子模式	P 值	VIP 值	差异倍数
黄酮类	表儿茶素	291.10	312.89	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	3.63×10 ⁻³	1.45	0.46
	3,7,3'-三甲氧基黄酮	313.09	205.92	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	[M+H] ⁺	3.80×10 ⁻⁶	1.75	0.24
	丁香亭	347.07	324.29	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	[M+H] ⁺	2.83×10 ⁻⁵	1.89	0.18
	梔子黄素 B	359.12	317.27	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	[M+H] ⁺	3.01×10 ⁻³	1.32	1.22
酚酸类	香草醇	137.07	233.48	C ₈ H ₁₀ O ₃	[M+H-H ₂ O] ⁺	3.07×10 ⁻⁶	2.42	0.35
	4-羟基扁桃腈	150.05	42.96	C ₈ H ₇ NO ₂	[M+H] ⁺	2.17×10 ⁻³	5.47	0.05
	4'-O-β-D-葡萄糖基-5-O-甲基维沙氮醇	453.17	39.00	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	[M+H] ⁺	2.91×10 ⁻³	3.40	1.62
	咖啡酸	181.05	180.56	C ₉ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	2.68×10 ⁻⁴	1.31	0.22
	咖啡酸甲酯	195.07	43.40	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	1.41×10 ⁻⁷	3.23	0.02
	洋茴素	163.04	43.23	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M+H-C ₁₆ H ₁₈ O ₉] ⁺	7.17×10 ⁻⁴	10.57	0.05
	紫丁香苷	395.13	177.04	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	[M+Na] ⁺	6.32×10 ⁻⁵	2.00	0.04

续表2 Continued 2

类别	中文名	质荷比	保留时间 (s)	化学式	离子模式	P 值	VIP 值	差异倍数
	依托泊苷	589.17	164.92	C ₂₀ H ₃₂ O ₁₃	[M+H] ⁺	5.59×10 ⁻⁵	1.15	0.15
	异嗪皮啶	190.01	274.65	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	[M+H-CH ₃ O] ⁺	1.70×10 ⁻²	1.16	0.48
	紫草酸	341.08	166.26	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	[M+H-C ₉ H ₁₀ O ₅] ⁺	3.41×10 ⁻²	1.54	0.24
	木防己苦毒宁	293.12	247.83	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	[M+H] ⁺	8.75×10 ⁻³	1.07	0.48
	松脂素-4-O-葡萄糖苷	538.23	164.38	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	[M+NH ₄] ⁺	1.85×10 ⁻⁴	1.36	0.12
	西蒙辛-2'-阿魏酸酯	339.11	128.03	C ₂₆ H ₃₃ NO ₁₂	[M+H-C ₁₀ H ₁₅ O ₄ N] ⁺	3.38×10 ⁻³	1.19	0.16
	3-羟基-4-甲氧基肉桂酸	178.05	110.66	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H-CH ₃] ⁻	3.59×10 ⁻⁶	2.45	0.30
	7-羟基香豆素	161.02	37.31	C ₉ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	2.87×10 ⁻⁸	16.11	0.19
	五加苷 B	579.21	148.43	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	4.85×10 ⁻³	1.05	0.20
	丹酚酸 B	358.09	186.55	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	[M-2H] ²⁻	2.50×10 ⁻²	1.87	0.33
	状芸香素	253.09	203.30	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	[M-H] ⁻	1.26×10 ⁻⁵	1.54	0.24
	双香豆素	335.05	70.96	C ₁₉ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	9.30×10 ⁻⁴	1.86	0.17
	香橙素	287.08	167.14	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	2.16×10 ⁻⁷	1.09	0.02
	补骨脂乙素	323.13	319.23	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	[M-H] ⁻	2.00×10 ⁻²	1.77	0.66
	对香豆醇	149.05	325.28	C ₉ H ₁₀ O ₂	[M-H] ⁻	4.94×10 ⁻⁷	6.27	0.15
	虎杖苷	425.11	312.06	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	[M+Cl] ⁻	9.19×10 ⁻⁴	1.38	5.87
萜类	α-香附酮	201.16	118.77	C ₁₅ H ₂₂ O	[M+H-H ₂ O] ⁺	1.50×10 ⁻⁵	1.16	4.30
	18β-甘草次酸	471.35	62.71	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	[M+H] ⁺	1.07×10 ⁻⁴	2.40	4.16
	儿茶酚	435.33	41.53	C ₆ H ₆ O ₂	[M+H-3H ₂ O] ⁺	5.72×10 ⁻⁵	3.15	0.07
	木香炔内酯	187.15	118.91	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	[M+H-CH ₂ O ₂] ⁺	2.56×10 ⁻⁵	1.28	4.90
	羟基积雪草酸	451.32	118.93	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	[M+H-3H ₂ O] ⁺	8.96×10 ⁻⁶	3.25	9.89
	球姜酮	201.16	62.12	C ₁₅ H ₂₂ O	[M+H-H ₂ O] ⁺	1.77×10 ⁻³	1.89	2.41
	23-羟基委陵菜酸	503.34	119.05	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	[M-H] ⁻	1.36×10 ⁻⁶	23.56	3.33
	积雪草酸	487.34	62.97	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	[M-H] ⁻	5.80×10 ⁻⁵	20.02	3.52
	刺囊酸	471.35	56.54	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	[M+H] ⁺	3.47×10 ⁻⁶	8.82	3.21
	刺囊酸-3-O-葡萄糖苷	633.38	52.52	C ₃₆ H ₅₈ O ₉	[M+H] ⁺	1.12×10 ⁻³	1.58	0.32
	齐墩果酸	455.35	42.79	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	[M+H] ⁺	1.16×10 ⁻⁶	6.52	32.75
	商陆皂苷元	531.33	66.51	C ₃₁ H ₄₈ O ₇	[M+H] ⁺	2.04×10 ⁻⁵	1.22	1.81
	奎亚酸	485.33	118.67	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	[M+H-H ₂ O] ⁺	3.04×10 ⁻³	2.24	1.66
	罗莎白素	685.37	183.66	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	[M+H] ⁺	2.53×10 ⁻⁴	2.09	0.23
醌类	2-氯-1,3,8-三羟基-6-(羟甲基)蒽醌	319.02	34.78	C ₁₅ H ₉ ClO ₆	[M+H] ⁺	4.67×10 ⁻⁶	1.04	0.04
	2-羟基蒽醌	223.03	35.61	C ₁₄ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	1.56×10 ⁻⁵	3.20	1.67
	大黄素甲醚	283.06	66.97	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	8.10×10 ⁻⁶	1.25	0.30
芪类	紫檀芪	257.11	186.25	C ₁₆ H ₁₆ O ₃	[M+H-C ₁₆ H ₁₈ O ₉] ⁺	7.84×10 ⁻⁶	1.72	0.30
生物碱类	阿马碱	353.18	319.98	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	[M+Na] ⁺	4.13×10 ⁻⁴	1.21	0.08
	N-甲基野靛碱	205.16	118.99	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	[M+H] ⁺	1.92×10 ⁻⁵	1.09	6.91
	蝙蝠葛苏林碱	611.30	248.29	C ₃₇ H ₄₂ N ₂ O ₆	[M+H-CH ₃ O] ⁺	3.26×10 ⁻⁴	1.10	2.80
	去乙酰刺乌头碱	543.31	118.94	C ₃₀ H ₄₂ N ₂ O ₇	[M+H-C ₉ H ₁₀ O ₅] ⁺	1.26×10 ⁻⁶	1.51	6.43

除次生代谢物外,愈伤组织(LC)和悬浮细胞(LS)中蔗糖、木二糖等初生代谢物的含量亦有显著

差异。悬浮细胞中蔗糖含量比愈伤组织中高1 000倍以上,其原因可能是一方面悬浮细胞相较于愈伤



A: 正离子模式下与愈伤组织(LC)相比悬浮细胞(LS)中前20上调差异性代谢物和前20下调差异性代谢物; B: 负离子模式下与愈伤组织(LC)相比悬浮细胞(LS)中前20上调差异性代谢物和前20下调差异性代谢物。FC: 差异倍数。

图7 正离子模式和负离子模式下与愈伤组织相比悬浮细胞中前20上调差异性代谢物和前20下调差异性代谢物

Fig.7 Top 20 up-regulated and down-regulated differential metabolites in suspension cells compared with callus under positive ion mode and negative ion mode

组织更易于吸收培养基的蔗糖,并利用蔗糖产生更多能量进行细胞分裂和代谢物生产;另一方面,蔗糖作为一种渗透调节物质可以保卫细胞^[14],悬浮细胞为保持细胞在液体中的细胞形态,产生更高蔗糖浓度来维持细胞内外的渗透压。悬浮细胞中的高蔗糖含量一方面有利于淀粉、果聚糖、蛋白质等细胞所需

化合物的合成,为细胞生长发育和逆境防御提供能量和关键碳源,另一方面,作为糖信号分子直接或间接参与到各类代谢途径中调节植物对逆境胁迫的响应^[15]。悬浮细胞中木二糖含量比愈伤组织中高64倍以上,有利于细胞保持形态稳定并抵抗外部环境的压力^[16]。

2.5 差异代谢物注释

根据 KEGG、HMDB 等数据库,愈伤组织(LC)与悬浮细胞(LS)差异代谢物注释到 203 条代谢通路中。其中,差异显著性最高的前 20 种代谢物的主要合成通路如图 8 所示。从图中可以看出,LC 和 LS 差异显著性最高的代谢通路为代谢途径(Metabolic pathways)和核苷酸代谢通路(Nucleotide metabolism)。代谢途径是酶介导的生化反应,可以通过糖酵解等代谢途径产生各种重要的细胞分子前体,并引导细胞内小分子天然产物的生物合成或分解代谢^[17]。除氨基酸、脱氧胸苷-5-磷酸(dTMP)等植物活动所需的物质在代谢途径中得到注释外,香橙素、阿魏酸、香草醇等次生代谢物也参与到代谢途

径中。愈伤组织(LC)与悬浮细胞(LS)中次生代谢物含量的差异表明,同种植物不同培养方式所得到的细胞对次生代谢产物具有不同的合成调控能力。2-脱氧肌苷-5-单磷酸、脱氧肌苷、dTMP、D-谷氨酰胺等富集到核苷酸代谢通路中。核苷酸作为构成核酸的基本单元,是植物新陈代谢和发育的重要化合物,除了作为细胞内的信号分子参与植物的生理活动,还为细胞的防御系统提供能量,增强植物的抗病能力^[18]。悬浮细胞相较于愈伤组织,生长速度更快,需要更多的核酸合成原料为细胞分裂和生理活动提供能量^[19],这可能是愈伤组织与悬浮细胞代谢物在核苷酸代谢通路中差异显著的原因。

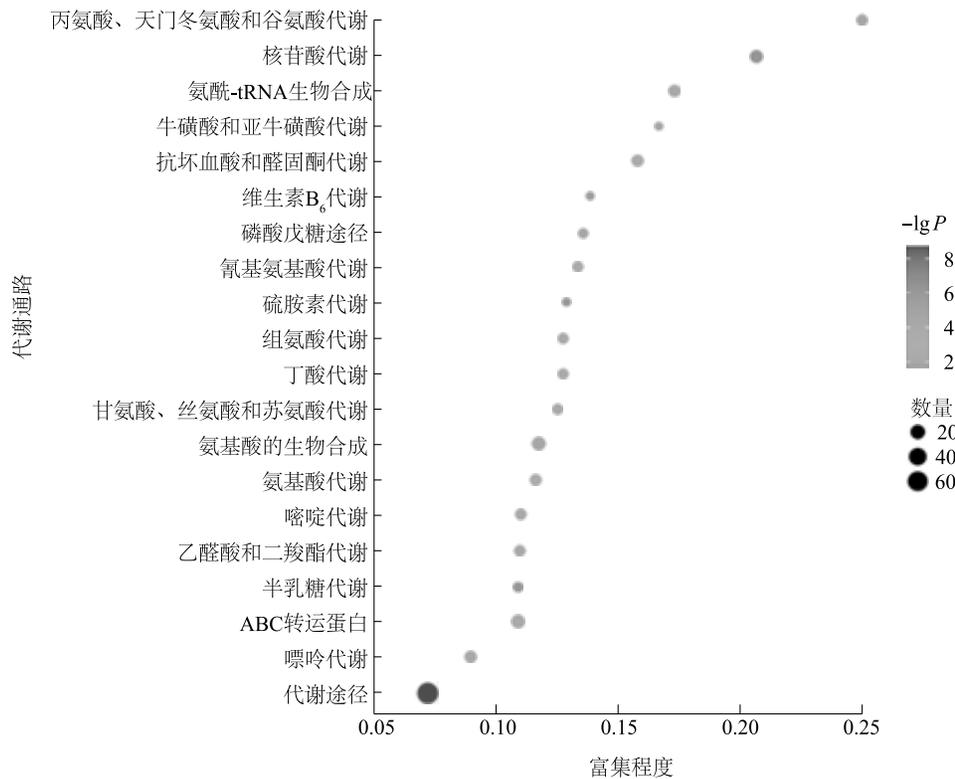


图 8 愈伤组织与悬浮细胞中差异代谢物的 KEGG 通路富集

Fig.8 KEGG pathway enrichment of differential metabolites between callus and suspension cells

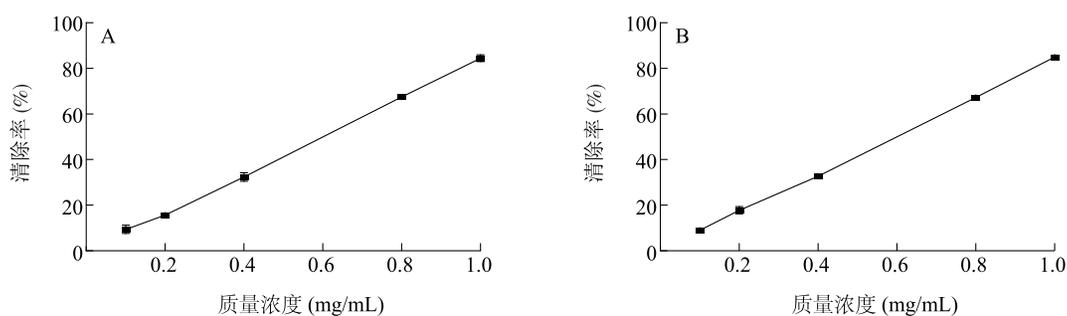
2.6 愈伤组织与悬浮细胞对 ABTS 自由基的清除能力

狭叶薰衣草叶片愈伤组织和悬浮细胞乙醇提取液 ABTS 自由基清除率如图 9 所示。从图中可以看出,随着愈伤组织和悬浮细胞乙醇提取液质量浓度升高,其对 ABTS 自由基清除率逐渐增强,说明愈伤组织和悬浮细胞均具有抗氧化活性。叶片愈伤组织和悬浮细胞对 ABTS 自由基的半清除质量浓度(IC_{50})分

别为 0.50 mg/mL、0.49 mg/mL,低于桂花果皮、人参茎叶等乙醇提取物^[20-21]的 IC_{50} ,说明狭叶薰衣草叶片愈伤组织和悬浮细胞乙醇提取液比桂花果皮、人参茎叶乙醇提取液更具有市场潜力。

3 结论

本研究通过植物组织培养技术,约 30 d 可以将狭叶薰衣草种子培养成无菌苗,在 MS+6-BA 2 mg/L+



A:愈伤组织;B:悬浮细胞。

图9 愈伤组织和悬浮细胞乙醇提取物的 ABTS 自由基清除率

Fig.9 The ABTS free radical scavenging rates of ethanol extracts from callus and suspension cells

2,4-D 0.5 mg/L培养基中,可将无菌苗叶片诱导培养成愈伤组织,并以形态疏松、呈胚性圆球状的细胞作为材料,建立了悬浮细胞培养体系。愈伤组织和悬浮细胞的生长均符合 Logistic 生长模型,说明利用植物组织培养技术可以在较短时间内获得增殖速度快且生长稳定的狭叶薰衣草细胞培养物。

愈伤组织和悬浮细胞代谢物中均检测出丰富的生物活性物质,包括迷迭香酸、齐墩果酸、咖啡酸甲酯等已知薰衣草特征活性物,还在狭叶薰衣草叶片细胞培养物中检测到未见报道的人参皂苷 F3、积雪草酸、羟基积雪草酸、刺囊酸等活性物质,说明狭叶薰衣草细胞培养物除了拥有与传统植株相似的次生代谢物合成能力,还能合成更多种类的生物活性物质,展现出更强的次生代谢物合成能力。愈伤组织和悬浮细胞合成次生代谢物的能力也有所差异,前者合成酚酸类化合物(咖啡酸、紫丁香苷等)能力更强,而悬浮细胞合成萜类化合物(齐墩果酸、羟基积雪草酸等)的能力更强,因此,在后续的薰衣草应用中需要根据需求选择合适的培养方式。除次生代谢物外,愈伤组织和悬浮细胞中蔗糖、木二糖等初生代谢物含量亦存在显著差异,说明不同培养条件会影响叶片细胞生长及代谢过程。愈伤组织和悬浮细胞差异代谢物的 KEGG 通路主要富集于代谢途径和核苷酸代谢通路,这说明不同的细胞培养方式对代谢物合成通路有影响。狭叶薰衣草叶片愈伤组织和悬浮细胞的乙醇提取物对 ABTS 自由基的半抑制浓度(IC_{50})分别为 0.50 mg/mL和 0.49 mg/mL,都表现出较好的抗氧化活性,未来可通过合成调控、提取富集等手段进一步提高其活性,增强细胞培养物的应用潜力。

综上,本研究以狭叶薰衣草叶片为外植体,建立了增殖稳定的狭叶薰衣草愈伤组织和悬浮细胞培养

体系,并分析了愈伤组织和悬浮细胞的差异代谢物及其代谢通路,拓展了狭叶薰衣草离体培养产物的应用潜力,为进一步的狭叶薰衣草叶片细胞组织培养体系次生代谢产物的开发利用及合成调控奠定基础。

参考文献:

- [1] 杨莹,位凯,吕达平. 吸入薰衣草精油对原发性失眠症患者的临床疗效[J]. 中国医药导报,2016,13(24):144-147.
- [2] 陈莘雨,陈新梅. 薰衣草化学成分与药理作用研究进展[J]. 中华中医药杂志,2022,37(3):1600-1604.
- [3] 杨鑫,詹爽,彭尽晖,等. 狭叶薰衣草的离体培养及挥发性成分的分析[J]. 热带亚热带植物学报,2020,28(1):84-90.
- [4] 许耀祖,王晓军,赵民安,等. 薰衣草细胞悬浮培养体系的优化[J]. 细胞生物学杂志,2005,27(6):701-704.
- [5] KOVATCHEVA E, PAVLOV A, KOLEVA I, et al. Rosmarinic acid from *Lavandula vera* MM cell culture[J]. Phytochemistry, 1996,43(6):1243-1244.
- [6] PAVLOV A, ILIEVA M, MINCHEVA M. Release of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension in two-phase culture systems[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001,17(4):417-421.
- [7] YULIANA N D, KHATIB A, CHOI Y H, et al. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products[J]. Phytotherapy Research, 2011,25(2):157-169.
- [8] TOPÇU G, HERRMANN G, KOLAK U, et al. Isolation of fatty acids and aromatics from cell suspension cultures of *Lavandula angustifolia*[J]. Natural Product Research, 2007,21(2):100-105.
- [9] HÉRAL B, STIERLIN É, FERNANDEZ X, et al. Phytochemicals from the genus *Lavandula*: a review[J]. Phytochemistry Reviews, 2021,20(4):751-771.
- [10] MOSHARI-NASIRKANDI A, ALIREZALU A, ALIPOUR H, et al. Screening of 20 species from Lamiaceae family based on phytochemical analysis, antioxidant activity and HPLC profiling[J]. Scientific Reports, 2023,13(1):16987.

- [11] 谭周倩,钱 骅,黄晓德,等. 薰衣草茎叶中几种有机酸的含量测定[J]. 中国野生植物资源,2020,39(11):34-38.
- [12] AYELESO T B, MATUMBA M G, MUKWEVHO E. Oleanolic acid and its derivatives:biological activities and therapeutic potential in chronic diseases[J]. Molecules,2017,22(11):1915.
- [13] TAN S C, BHATTAMISRA S K, CHELLAPPAN D K, et al. Actions and therapeutic potential of madecassoside and other major constituents of *Centella asiatica*; a review [J]. Applied Sciences, 2021,11(18):8475.
- [14] LIMA V F, MEDEIROS D B, DOS ANJOS L, et al. Toward multifaceted roles of sucrose in the regulation of stomatal movement [J]. Plant Signaling & Behavior,2018,13(8):e1494468.
- [15] YOON J, CHO L H, TUN W, et al. Sucrose signaling in higher plants[J]. Plant Science,2021,302:110703.
- [16] DEWANGAN B P, GUPTA A, SAH R K, et al. Xylobiose treatment triggers a defense-related response and alters cell wall composition[J]. Plant Molecular Biology,2023,113(6):383-400.
- [17] WURTZEL E T, KUTCHAN T M. Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future[J]. Science,2016,353(6305):1232-1236.
- [18] WANG C G, HUANG X E, LI Q, et al. Extracellular pyridine nucleotides trigger plant systemic immunity through a lectin receptor kinase/BAK1 complex [J]. Nature Communications, 2019, 10(1):4810.
- [19] WITTE C P, HERDE M. Nucleotide metabolism in plants[J]. Plant Physiology,2020,182(1):63-78.
- [20] 刘 刚,伍佩珂,蒋小妹,等. 桂花果皮醇提物的抑菌活性和抗氧化活性的研究[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2018,41(5):672-676.
- [21] 金学俊,栗铭鸿,崔福顺. 人参茎叶成分分析及提取物抗氧化活性研究[J]. 食品科技,2018,43(9):279-284.

(责任编辑:石春林)