

## 共生培养法促进石杉碱甲增量富集的研究

李靖<sup>1</sup>, 李姝漪<sup>2</sup>, 付俊璇<sup>3</sup>, 张起辉<sup>3\*</sup><sup>1</sup>重庆兴泰濠制药有限公司, 重庆 400000; <sup>2</sup>中南大学材料科学与工程学院, 长沙 410083;<sup>3</sup>重庆大学化学化工学院, 重庆 400000

**摘要:** 为了促进蛇足石杉中石杉碱甲增量富集, 本文利用内生真菌与蛇足石杉的共生进化关系, 以共培养体系 (co-culture system, CCS) 为基础, 提出了增加石杉碱甲产率的新方法。以蛇足石杉植株存活率为指标, 确定共培养体系最佳培养条件; 以细胞存活率、愈伤组织诱导率和增殖率为指标, 确定最佳培养基条件; 以石杉碱甲和麦角甾醇为指标性成分, 控制植物细胞和内生真菌比例关系, 维持培养体系内植物细胞和内生真菌之间的生长平衡, 获得最佳的继代时间。结果表明: CCS 的最佳培养条件为光照强度 100 Lux, 湿度 95%, MS 液体培养基, 蔗糖 20.0 g/L, 2,4-二氯苯氧基乙酸 5.0 mg/L 和激动素 1.0 mg/L; 4 d 为最佳继代时间, 其石杉碱甲的浓度最高, 与 1 d 时相比增加了 49.34%, 并且石杉碱甲与麦角甾醇的浓度比值控制在 1.5~2.2 之间时, 内生真菌生长对石杉碱甲的富集有良性促进作用。该研究为高效、低成本增加石杉碱甲产量提供新的探索路径, 亦可以有效解决药源不足问题, 具有很好的应用前景。

**关键词:** 蛇足石杉; 石杉碱甲; 植物细胞; 共培养体系; 内生真菌

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)11-1956-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.11.014

## Study on promoting effect of co-culture system on the increment and enrichment of huperzine A

LI Jing<sup>1</sup>, LI Shu-yi<sup>2</sup>, FU Jun-xuan<sup>3</sup>, ZHANG Qi-hui<sup>3\*</sup><sup>1</sup>Chongqing Sintaho Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 400000, China;<sup>2</sup>School of Materials Science and Engineering, Central South University, Changsha 410083, China;<sup>3</sup>School of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400000, China

**Abstract:** In order to promote the efficient enrichment of huperzine A, a new co-culture system (CCS), utilizing the symbiotic relationship between *Huperzia serrata* and endophytic fungi, was proposed. The optimal culture conditions of the CCS were obtained based on the cell survival rate, callus induction rate and multiplication rate. Huperzine A and ergosterol were applied as indicators to control the proportion of botanical cells and endophytic fungi. The growth balance between botanical cells and endophytic fungi was maintained for the optimal time of subculturing. The results showed that the best culture conditions for CCS was: 100 Lux luminous level, 95% humidity, MS liquid medium, 20.0 g/L sucrose, 5.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 1.0 mg/L kinetin. The 4<sup>th</sup> day was the optimal subculturing time with the highest concentration of huperzine A, which increased by 49.34% compared with the huperzine A level on the 1<sup>st</sup> day. The growth of endophytic fungal had a positive effect on the enrichment of huperzine A when the concentration ratio of huperzine A to ergosterol was kept between 1.5 and 2.2. This study provides a new proposal to increase the production of huperzine A with high efficiency and low cost, which can effectively solve the problem of insufficient drug source and has a good application prospect.

**Key words:** *Huperzia serrata*; huperzine A; botanical cells; co-culture system; endophytic fungi

蛇足石杉 (*Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev) 为石杉科石杉属蕨类植物, 是一种治疗跌打损

伤、解毒、止痛以及治疗精神分裂症的珍稀中草药<sup>[1]</sup>。蛇足石杉也是目前研究较好的用于治疗阿尔茨海默病的药物, 其有效成分石杉碱甲是一种治疗重症肌无力和阿尔茨海默病的高效、低毒性、可逆和高选择性的乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制剂, 它可

收稿日期: 2023-03-23

接受日期: 2023-07-24

基金项目: 国家自然科学基金 (81973451); 重庆市技术预见与制度创新项目 (cstc2019jsyj-yzysbAX0020)

\* 通信作者 Tel: 86-23-65102531; E-mail: qhzhang@cqu.edu.cn

以增强乙酰胆碱的作用,而乙酰胆碱是一种与注意力、警惕性、专注力和记忆力有关的中枢神经递质<sup>[2,3]</sup>。在1982年,石杉碱甲成功从蛇足石杉中分离出来,被当做“希望之星”。据调查,到2025年,发达国家65岁以上的阿尔茨海默病患者将达到710万人,比2018年的550万患者增加近29%,除非有医学上的突破,否则到2050年,该病患者数量可能从550万增加到1380万<sup>[4]</sup>,而仅在美国,大约每10万人中就有14~20人患有重症肌无力,患者总人数约为36000~60000人,这也是一个十分惊人的数字<sup>[5]</sup>。对于阿尔茨海默病和重症肌无力,目前市面上药物的最大问题是药物毒性以及耐药性。与目前的药物相比,石杉碱甲是天然植物提取物,安全性好、不良反应少、可被人体快速吸收,并且抑制方式为竞争性和非竞争性的混合型抑制,治疗效果显著,有效时间长<sup>[6]</sup>。

蛇足石杉在世界各地均有分布,但其资源十分有限,其中一个限制因素是蛇足石杉生长缓慢,从孢子到成熟至少需要15年时间。且在成熟阶段蛇足石杉的高度也仅有10~30 cm。同时,其生长环境难以复刻<sup>[7]</sup>,在实际栽培过程中难以推广。因此,在不久的将来,蛇足石杉将面临灭绝的威胁。近年来,对这种珍稀植物开展了多项研究,例如对外植体和愈伤组织的体外培养。Kan'ichiro Ishiuchi的团队先后从*H. pinifolia*的茎尖中获得外植体,并在灭菌培养基中培养2个周期(每个周期为7 d),最后成功地将外植体转入愈伤组织生长培养基中<sup>[8]</sup>,此外,研究人员对蛇足石杉培养方法进行了各种改进,例如培养基成分筛选以及茎尖培养技术的研究,但组培过程中外植体的消杀问题仍未得到有效的解决,限制了石杉碱甲的大规模化生产<sup>[9,10]</sup>。由于蛇足石杉的自然资源匮乏以及以上所提及的原因,急需找到一种以较低成本就可提高石杉碱甲含量的新方法。

内生真菌是一类生活在植物茎和叶组织内的真菌,已有研究发现,如果内生真菌与植株长时间共生进化,它们就可以通过基因重组获得宿主植物的某些基因,产生与宿主植物相同的次生代谢物<sup>[11-13]</sup>。同时,内生真菌还可以产生激素促进寄主植物的生长发育。因此,在共培养体系中,内生真菌被认为是激发子<sup>[13]</sup>,这意味着植物细胞可以在一定浓度范围内与内生真菌共培养,在共培养体系中内生真菌和

植物细胞相互影响,促进植物积累产物。麦角甾醇是真菌细胞膜的重要组成成分,属于真菌类的特征甾醇,可作为衡量真菌生物量的代表性指标<sup>[14]</sup>。

本研究引入了一种新型的共培养体系(co-culture system, CCS),以一种经济、便捷的方式提高蛇足石杉中石杉碱甲的含量,以改善蛇足石杉因为资源短缺而无法广泛应用的现状。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

植株取自湖北省神农架多年生的野生蛇足石杉植株,经重庆大学药学院张传瑞研究员鉴定为石杉科石杉属蕨类植物蛇足石杉(*Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev),样品(202005006)存于重庆大学植物园室外设施网室内;腐殖土取自重庆市四面山森林公园。

### 1.2 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent 有限公司);BDS200 型倒置生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司);RE-52 型旋转蒸发器(上海雅荣生化仪器厂)。

MS 培养基(批号:20200406,纯度:BR,杭州百思生物技术有限公司);激动素(KT)(批号:I2020156,纯度 $\geq 99\%$ ,金坦生物技术分公司);2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)(批号:I1846732,纯度97%,金坦生物技术分公司);青霉素(批号:B184012,纯度98%,北京华迈科生物技术有限公司);链霉素(批号:B160603,纯度90%,北京华迈科生物技术有限公司);两性霉素B(批号:B200208,纯度 $\geq 90.0\%$ ,北京华迈科生物技术有限公司);特美汀(批号:B173024,纯度 $\geq 99\%$ ,北京华迈科生物技术有限公司);中性红(批号:20200123,规格:指示剂,天津博迪化工股份有限公司);石杉碱甲(批号:100243-202003,纯度 $\geq 98\%$ ,四川维克奇生物科技有限公司);麦角甾醇(批号:111845-202004,纯度 $\geq 98\%$ ,四川维克奇生物科技有限公司);甲醇(批号:2020031702,纯度:色谱纯,天津盾特特种化工有限公司);乙酸铵(批号:2020041323,纯度:色谱纯,成都科隆化工有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 蛇足石杉的驯化

为了获得蛇足石杉最佳培养条件,参考 Huang 等<sup>[15]</sup>对蛇足石杉适宜生长环境研究结果,对其驯化

条件进行考察。将野生蛇足石杉样本种植于重庆大学室外设施网室内,以蛇足石杉植株的存活率为指标,对驯化时腐殖土与河沙比例、空气湿度、光照强度进行单因素考察,每次试验供试植株为 10 株,重

复 3 次。植株存活率计算方法为:植株存活率 = 植株存活数量/供试植株总数  $\times 100\%$ 。

蛇足石杉在设定的条件下开始发芽(见图 1A),即蛇足石杉成功驯化。

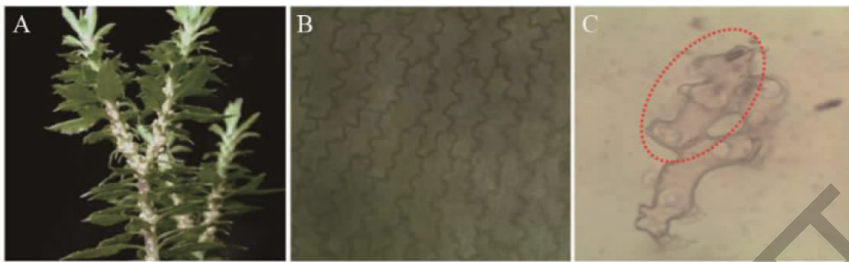


图 1 萌发的蛇足石杉植株(A),植株表皮细胞(B)和海绵细胞(C)

Fig. 1 Germinate *Huperzia serrata* (A), botanical epidermal cells (B) and spongy cells (C)

### 1.3.2 组织培养基的制备

以真菌生长情况和叶肉细胞存活率为指标,对培养基制备过程中基础培养基种类(1/2 MS, MS 和 B<sub>5</sub>)进行研究<sup>[16,17]</sup>;以丛生芽萌发率和茎段数量为指标考察蔗糖浓度(1%、2%、3%、4%)<sup>[17]</sup>;以愈伤组织诱导率和愈伤组织增殖率为指标考察最佳植物激素 2,4-D 浓度(0、2、5、7 mg/L)<sup>[18]</sup>。控制培养基 pH 为 5.8,采用青霉素(30.0 mg/L)、链霉素(50.0 mg/L)、两性霉素 B(0.5 mg/L)、特美汀(5.0 mg/L)等抗生素控制培养基中其他微生物的无限增殖,通过分析未植入外植体的灭菌空白培养基的真菌生长情况判断培养基制备过程灭菌是否彻底。愈伤组织诱导率和增殖率的计算方式为:愈伤组织诱导率 = 诱导出愈伤组织的胚胎数/接种的胚胎数  $\times 100\%$ ;愈伤组织增殖率 = (收获的愈伤组织重量-接种的愈伤组织重量)/接种的愈伤组织重量  $\times 100\%$ 。

### 1.3.3 外植体的体外杀菌和繁殖

据报道,蛇足石杉叶片中石杉碱甲的产量最高,因此体外培养的靶细胞为叶肉细胞<sup>[16]</sup>。将健康叶片用普通肥皂洗净,分别用 70% 酒精浸泡 50 s, 0.5 mg/L 孔雀石绿浸泡 8 min, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡 10 min,再用无菌水洗涤 3 次。将灭菌后的外植体在含有 5 ~ 10 mL 液体灭菌介质的研钵中机械粉碎。1 ~ 3 min 后,将叶肉细胞悬液转入容量瓶中稀释,然后转入培养基中,在室温(24 ℃),光照强度(100 Lux 左右),湿度(95%)下培养<sup>[19]</sup>。

### 1.3.4 单细胞计数

每 2 d 测定一次叶肉细胞数。样品以 4:1 的比例悬浮于含 0.04% 中性红的沉积物中,孵育 20 min

后,用血细胞计计数染色活细胞。

在显微镜下,可以清晰地观察到悬浮液中的表皮细胞和海绵状细胞(见图 1B、1C)。海绵状细胞中的石杉碱甲的浓度最高,其成像长约 23 ~ 38  $\mu\text{m}$ ,宽约 15 ~ 23  $\mu\text{m}$ <sup>[20]</sup>。

### 1.3.5 提取

取 5 mL 培养基悬液,通过 3 次冻融提取,2 次超声提取(单次 40 min,每次间隔 10 min)提取石杉碱甲和麦角甾醇<sup>[21]</sup>。将悬液减压蒸馏浓缩,提取液用甲醇溶解。将溶液转移到 10 mL 容量瓶中定容。在 HPLC 分析前溶液用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

每天测定一次石杉碱甲和麦角甾醇的浓度和混合比例。

### 1.3.6 色谱条件

采用高效液相色谱仪和紫外检测器对提取物进行色谱分析。色谱柱:Agilent TC-C<sub>18</sub>(150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),进样量 10  $\mu\text{L}$ ,流速 1.0 mL/min,柱温 25 ℃。石杉碱甲和麦角甾醇的检测波长分别为 310 nm 和 282 nm。流动相由水和甲醇(含 0.008 mol/L 乙酸铵)组成,比例为 75:25<sup>[22,23]</sup>。

### 1.3.7 方法验证

以 5 ~ 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  石杉碱甲和麦角甾醇标准溶液绘制标准曲线。采用相关系数法( $r$ )测定标准曲线的线性度。

精密度试验:在相同条件下,将标准溶液(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )进样 5 次,测定方法精密度。重复性试验:样品在相同条件下操作 5 次,测试方法重复性。稳定性实验:样品分别于 1、2、4、8、12 h 测定,测试方法稳定性<sup>[24]</sup>。以上三种试验结果均以峰面积的相

对标准偏差 (RSD, %) 表示。取已测定石杉碱甲和麦角甾醇含量的样品 (1 mL) 加入石杉碱甲 (0.5 mL, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和麦角甾醇 (1 mL, 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 在“1.3.6”的色谱条件下进行加标回收试验, 重复 5 次, 计算回收率, 并根据回收率进行评价: 回收率 = (加标试样测定值 - 样品测定值) / 加标量  $\times$  100%。

#### 1.4 数据处理方法

用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 所有结果用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用最小显著差异 (least significant difference, LSD) 法,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 驯化条件考察

为了研究共培养体系最佳培养条件, 对蛇足石

杉驯化条件进行了单因素考察, 并选取各因素考察试验中存活率较高的三组进行显著性差异分析。如图 2A 所示, 土壤由腐殖土和河沙组成, 在不同土壤配比下植株存活率存在显著差异, 土壤配比为 2:1 时植株存活率最高, 并且 2:1 与 1:1 之间的  $P$  值小于 0.01, 2:1 与 4:1 之间的  $P$  值小于 0.05, 故选取 2:1 作为最佳土壤配比。在最佳光照强度研究中, 不同光照强度下植物存活率存在着显著差异, 见图 2B, 100 Lux 与 300 Lux 之间的  $P$  值小于 0.01, 100 Lux 与 80 Lux 的  $P$  值小于 0.05, 最佳光照强度为 100 Lux。由图 2C 可知, 空气湿度对植物存活率也存在着显著影响, 95% 与 85% 和 95% 与 100% 之间的  $P$  值均小于 0.01, 最佳空气湿度为 95%。

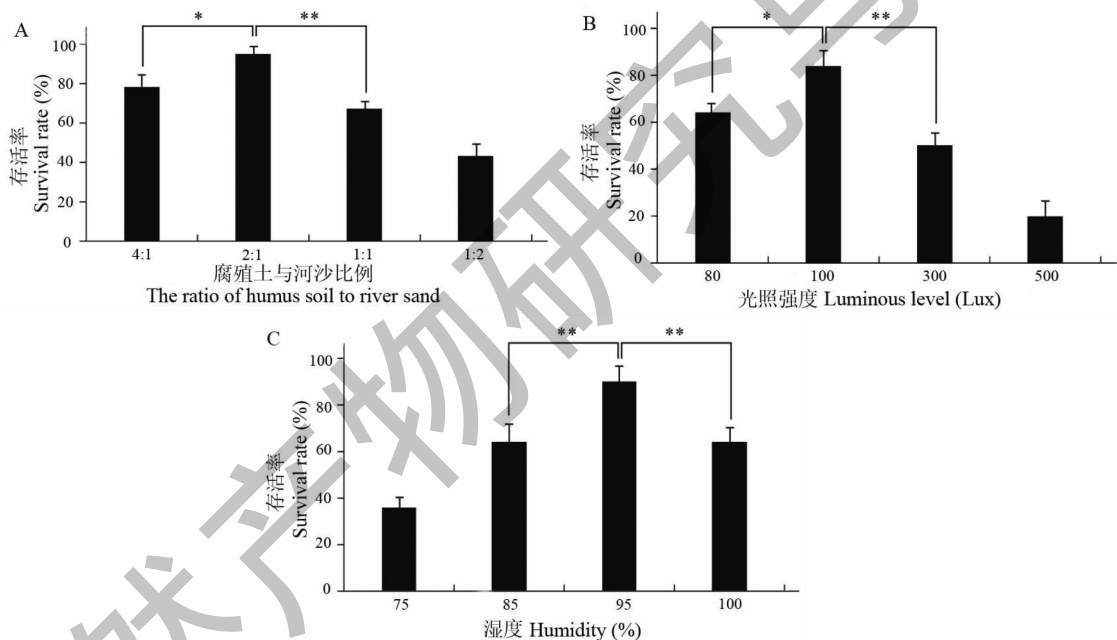


图 2 驯化条件对植株存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 Effect of domestication conditions on plant survival rate ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

注: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

### 2.2 不同培养基条件研究

由表 1 结果所示, 空白对照组在相同培育条件下未见真菌污染物, 表明培养基制备过程中灭菌彻底, 只有使用 MS 培养基时, 叶肉细胞存活率为 12.5%, 并且伴随着内生真菌的生长, 说明基础培养基的种类对蛇足石杉内生真菌的生长和细胞培养体系有显著影响; 改变培养体系蔗糖浓度, 丛生芽萌发率和茎段数量发生明显变化, 在蔗糖浓度为

(2%) 20.0 g/L 时, 丛生芽萌发率和茎段数量最高; 添加植物激素有利于蛇足石杉愈伤组织的诱导, 在 5.0 mg/L 时诱导率最佳, 但植物激素对愈伤组织增殖有着不利影响, 随着植物激素浓度增加增殖率不断减小, 综合选择 5.0 mg/L 2,4-D 作为最适浓度。因此, 最佳培养基条件为 MS 液体培养基, 蔗糖 (20.0 g/L)、2,4-D (5.0 mg/L) 和 KT (1.0 mg/L)。

表 1 培养条件对比结果

Table 1 Comparison of cultural conditions

培养基 Medium	真菌污染物 Fungal contaminant	叶肉细胞存活率 Survival rate of mesophyll cell (%)	蔗糖浓度 Sucrose concentration (%)	丛生芽萌发率 Initiation rate of cluster bud (%)	茎段数量 Amount of stem	植物激素浓度 Concentration of plant hormone (mg/L)	愈伤组 织诱导率 Initiation rate of callus (%)	愈伤组织增殖率 Multiplication rate of callus (%)
1/2MS	+	0	1	0	0	7.0	76	50.2
MS	+	12.5	2	100.0	6.2	5.0	100	59.8
B <sub>5</sub>	-	0	3	91.1	4.1	2.0	67	76.0
空白对照 Control	-	0	4	60.0	2.7	0	0	126.9

注:此研究均在 1.0 mg/L KT 下收集;“-”代表未检出,“+”代表检出。

Note: This research was collected at 1.0 mg/L KT;“-” means not detected,“+” means detected.

### 2.3 共培养体系指标性成分含量测定

我们采用机械破碎法制得蛇足石杉的叶肉细胞悬液。在 CCS 过程中,内生真菌的增殖被控制在一定的范围内,以维持叶肉细胞和内生真菌之间的平衡,而其他类型的微生物则受到抗生素的有效抑制。通过 HPLC 检测培养体系内石杉碱甲和麦角甾醇含量,探究内生真菌生长对石杉碱甲富集的影响。石杉碱甲是蛇足石杉的主要活性成分,反映了叶肉细胞的数量。而麦角甾醇是真菌细胞膜的重要组成部分,

是衡量生物量的代表性指标<sup>[25]</sup>。

按照上述原则,对提取物进行色谱分析。石杉碱甲和麦角甾醇的代表性色谱图见图 3。A 和 B 图分别显示了石杉碱甲和麦角甾醇在培养基中的相应色谱峰和结构,在相同色谱条件下,标准品 2 个峰的基线分离时间分别为 9.31 min 和 10.95 min。通过提取物与对照品进行对比,证明提取物中存在石杉碱甲和麦角甾醇。

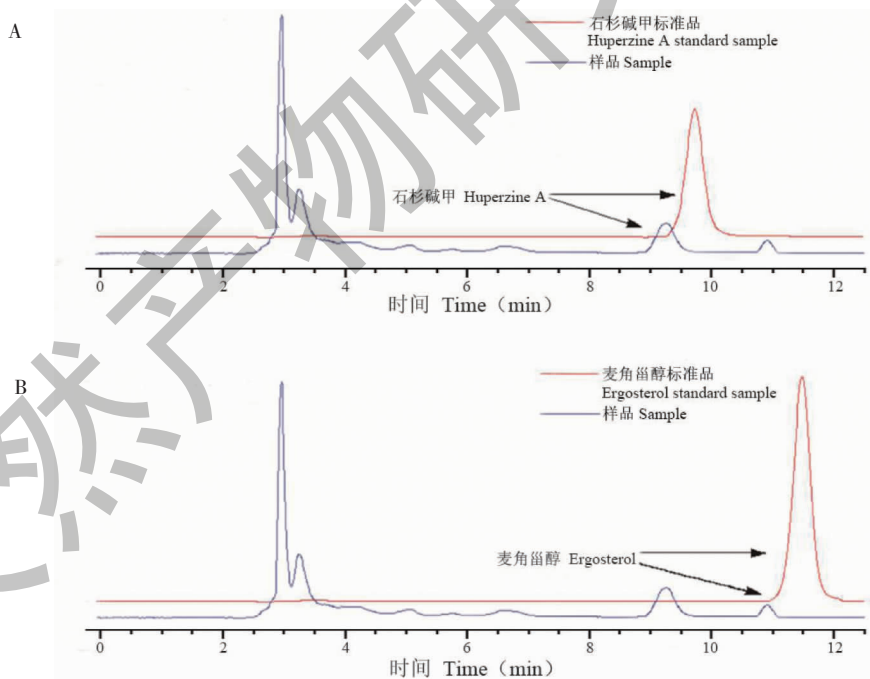


图 3 标准品与样品 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of standards and samples

图 4A 显示石杉碱甲和麦角甾醇浓度随时间的变化规律。由图分析可知,在 6 d 时石杉碱甲上升至最高水平,麦角甾醇下降到最低水平,在 12 d 时,麦角甾醇浓度达到峰值。这两种特征化合物的峰值

浓度不是同步的,石杉碱甲比麦角甾醇更早达到峰值浓度,说明当石杉碱甲与麦角甾醇的浓度比在 2.2 ~ 1.5 之间时,内生真菌的生长对石杉碱甲富集具有促进作用。

图 4B 展示了蛇足石杉细胞数量随培养周期的变化规律,植物细胞在 4 d 内生长稳定,在第 4 d 时每体积细胞计数中活细胞数为 8 个,达到最大值,随后细胞数量开始下降,通过对第 4 d 与第 2 d 以及第 6 d 之间的显著性差异分析,发现 4 d 时的活细胞数量显著高于 2 d 和 6 d 时的数量,因此初步确定第 4 d 为采收和继代的最佳时间点。

为进一步验证采收和继代的最佳时间,采用 HPLC 法测定石杉碱甲在 1~6 d 的含量,每天取样 1 次。由图 4C 可知,在蛇足石杉植物细胞与内生真

菌的共培养体系中,石杉碱甲含量在 1~4 d 内逐渐增加,达到最大值 13.68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,4 d 后石杉碱甲含量呈现降低趋势,表明第 4 d 是石杉碱甲含量变化的拐点。通过拐点与相邻两天含量之间的显著性差异分析,第 4 d 与第 5 d 的  $P$  值小于 0.05,第 4 d 与第 3 d 的  $P$  值小于 0.01,说明 4 d 时石杉碱甲含量显著高于相邻两天时的含量,因此认为第 4 d 是石杉碱甲采收和继代的最佳时间。经过 4 d 共培养之后石杉碱甲含量较 1 d 时的 9.16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  增长了 49.34%。

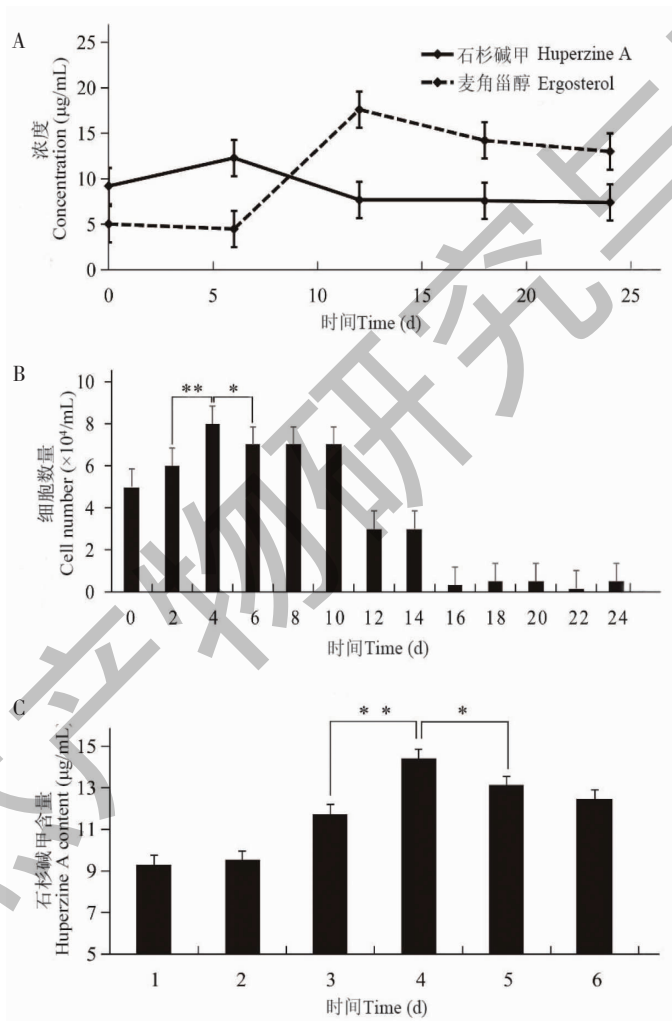


图 4 分析指标随时间的变化

Fig. 4 The change of analysis indicators with time

注: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

## 2.4 检测方法学研究

方法学研究结果如表 2 所示,经计算,石杉碱甲和麦角甾醇浓度分析精密度 RSD 分别为 0.81% 和 1.07%,重复性分别为 1.36% 和 2.7%。说明方法

精密度和重复性良好,稳定性 RSD 分别为 1.33% 和 2.45%,说明方法稳定,两种分析物的回收率分别为 101.81% 和 100.01%,并且 RSD 小于 5%,说明测试方法结果准确。



表2 方法线性度

Table 2 Linearity of the method

化合物 Compound	精密度 Precision RSD(%)	重复性 Repeatability RSD(%)	稳定性 Stability RSD(%)	回收率 Recovery rate(%)	RSD(%)	线性范围 Linear range(μg/mL)	标准曲线 Standard curve	相关系数 Correlation coefficient(r)
石杉碱甲 Huperzine A	0.81	1.36	1.33	101.81	3.02	5~45	$Y = 17.234X + 0.9029$	0.9985
麦角甾醇 Ergosterol	1.07	2.71	2.45	100.01	2.23	5~45	$Y = 14.407X + 2.9770$	0.9996

### 3 讨论与结论

石杉碱甲是一种用于治疗老年痴呆和重症肌无力的 AChE 抑制剂,其主要来源是蛇足石杉,但石杉碱甲在蛇足石杉中含量较低,并且蛇足石杉资源有限,限制了石杉碱甲在医药领域的进一步发展<sup>[3]</sup>。有研究表明,在植物体内存在着多种内生真菌,它们在长期的进化过程中与宿主植物形成了一种复杂的互利共生关系,一方面,内生真菌需要从植物中吸取营养,以满足自身生存<sup>[26]</sup>。另一方面,内生真菌为了抵抗宿主的防御系统,与宿主植物产生了特殊的生物化学交流,可通过识别宿主的化学信号或者雇用宿主酶系来合成与宿主相似的次级代谢产物<sup>[27]</sup>。如 Jiang 等<sup>[28]</sup>在半红树植物黄槿中通过分离纯化内生真菌,固体发酵得到了与宿主相同的次生代谢产物。Tong 等<sup>[29]</sup>通过对蛇足石杉内生真菌 FS4 次级代谢产物的分离研究,发现其 5 种代谢产物表现出与石杉碱甲相似的强抑制乙酰胆碱酯酶生物活性。

本研究中对野生蛇足石杉的驯化条件和组织培养基条件进行了试验,确定了最佳培养条件为光照强度 100 Lux,湿度 95%,MS 液体培养基,蔗糖 20.0 g/L,2,4-D 5.0 mg/L 和 KT 1.0 mg/L,并以石杉碱甲和麦角甾醇这两种化合物的相对变化趋势来反映 CCS 的动态生长过程,由其拐点确定第 4 d 为采收和继代的最佳时间。通过 CCS 培养 4 d 之后,石杉碱甲的含量提升了 49.34%,达到最大值,培养体系内石杉碱甲含量总体呈现先上升后下降的趋势,这是由于在生长后期内生真菌的繁殖能力比植物细胞分化能力更强,抢夺了培养基中的营养成分和生长空间,导致细胞数量减少,所以采收和继代时间的选择是共培养体系实现石杉碱甲增量富集的关键,同时植物激素 2,4-D 浓度对体系有着较大的影响,2,4-D 对植物器官的脱分化、愈伤组织的诱导具有促进作用,但浓度过高时对细胞的分化有抑制作用,所以在培养体系中,采用 5 mg/L 作为最适浓度<sup>[30]</sup>。本实验成功采用共培养体系实现石杉碱甲的生物合成,此方法克服了传统的固定观念,因为植物体细胞

培养不需要事先彻底灭菌,植物体细胞与内生真菌可以实现共培养,并且在特定比例下可以促进石杉碱甲的生成。只要准确掌握培养周期规律,就可以利用这种方便快捷的方法积累石杉碱甲,对保护植物资源和丰富石杉碱甲重要的生物活性物质具有重要意义。

### 参考文献

- Sang X, Yang MH, Su JQ. Research on endophytic fungi for producing huperzine A on a large-scale[J]. Crit Rev Microbiol, 2020, 46: 654-664.
- Little JT, S Walsh S, Aisen PS. An update on huperzine A as a treatment for Alzheimer's disease[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2008, 17: 209-215.
- Yan YP, Chen JY, Lu JH. Disease-modifying activity of huperzine A on Alzheimer's disease: evidence from preclinical studies on rodent models[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 15238.
- Liu JY, Guo HY, Quan ZS, et al. Research progress of natural products and their derivatives against Alzheimer's disease[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2023, 38: 2171026.
- Nacu A, Andersen JB, Lisnic V, et al. Complicating autoimmune diseases in myasthenia gravis: a review[J]. Autoimmunity, 2015, 48: 362-368.
- Yuan JQ, Zhou XL, Wang S, et al. Advances in studies on chemical constituents of *Huperzia serrata* and their pharmacological effects[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43: 399-407.
- Ma X, Tan C, Zhu D, et al. Is there a better source of huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A content of Huperziaceae species in China[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 1393-1398.
- Ishiyuchi K, Park JJ, Long RM, et al. Production of huperzine A and other *Lycopodium* alkaloids in *Huperzia* species grown under controlled conditions and *in vitro*[J]. Phytochemistry, 2013, 91: 208-219.
- Huang Q, Tu YS, Yu X, et al. The effects of different colored light on Hup A accumulation and endogenous hormone content produced by the thallus of *Huperzia serrata* *in vitro*[J]. J Jiangxi Normal Univ(江西师范大学学报), 2019, 43: 249-

- 252.
- 10 Chen M, Yi S, Tu LY, et al. Effect of amino acids on thallus growth and huperzine-A accumulation in *Huperzia serrata* [J]. Chin Bull Bot(植物学报), 2017, 52:218-224.
  - 11 Brakhage AA. Regulation of fungal secondary metabolism [J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11:21-32.
  - 12 Wang XY, Zhang LH, Fan N, et al. Research progress on application of endophytic in Chinese medicinal materials [J]. Shandong Chem Ind(山东化工), 2020, 49:62-64.
  - 13 Ali H, Ries MI, Nijland JG, et al. A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum* [J]. PLoS One, 2013, 8:e65328.
  - 14 Barajas-Aceves M, Hassan M, Tinoco R, et al. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass [J]. J Microbiol Meth, 2002, 50:227-236.
  - 15 Huang XF, Li WC. The growth environmental and symbiotic relation between fungi and *Huperzia serrata* [J]. Forest By-Prod Spee China(中国林副特产), 2011, 2:73-76.
  - 16 Liu JH, Xu H, Ma YZ, et al. *In vitro* culture of *Huperzia serrata* [J]. Plant Physiol J(植物生理学报), 2015, 51:465-470.
  - 17 Li XJ, Yang XF, Zhu WN, et al. Plant regeneration of *Huperzia serrata* by rapid propagation of shoot tips [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2014, 16:387-390.
  - 18 Qi BW, Mo T, Zhang X, et al. Isolation and identification of endophytic fungi from *Huperzia serrata* and their metabolites' inhibitory activities against acetylcholinesterase and anti-inflammatory activities [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44:3213-3220.
  - 19 Ji ZD, Tu YS, Ding MH, et al. *In vitro* culture of *Huperzia serrata* thallus for the medicinal component production [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2014, 26:645-649.
  - 20 Wu YD, Han QQ, He MN, et al. Leaf epidermal features of five species plants of *Huperzia* [J]. Bull Bot Res(植物研究), 2016, 36:4-9.
  - 21 Li WK, Zhou JY, Lin ZW, et al. Study on ultrasonic extraction of huperzine A from an endophytic fungus 2F09P03B of *Huperzia serrata* [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2008, 48:578-580.
  - 22 Wu Q, Gu Y. Quantification of huperzine A in *Huperzia serrata* by HPLC-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40:993-998.
  - 23 Gessner MO, Schmitt AL. Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62:415.
  - 24 Szypluła WJ, Wilenska B, Misicka A. Huperzine A and huperzine B production by prothallus cultures of *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank et Mart [J]. Molecules, 2020, 25:3262.
  - 25 Liu Y, Wei XY. The Microbial transformation of plant endophyte on plant secondary metabolites [J]. Nat Prod Res Dev, 2014, 26:300.
  - 26 Mo YN, Hao BC, Yang Z, et al. Advances in swainsonine-producing locoweed endophytes and swainsonine [J]. Prog Vet Med(动物医学进展), 2022, 43:102-107.
  - 27 Dhole AM, Shelat NH, Patel HK, et al. Evaluation of the coinoculation effect of *Rhizobium* and plant growth promoting non-rhizobial endophytes on *Vigna radiata* [J]. Curr Microbiol, 2023, 80:167.
  - 28 Jiang YT, Chen WF, Tian J, et al. Study on diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from semi-mangrove plant *Hibiscus tiliaceus* [J]. J Anhui Agric Univ(安徽农业大学学报), 2022, 49:838-847.
  - 29 Tong ZY, Liang HL, Zhang ZB, et al. Secondary metabolites of an endophytic fungus FS4 obtained from *Huperzia serrata* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:1371-1375.
  - 30 Li DX, Xu ZL, Fu HQ, et al. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction of zygotic embryo in date palm [J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2022, 20:502-5079.