

紫苏细胞悬浮培养生产迷迭香酸条件研究

李会珍, 张志军*, 乔绍俊
(中北大学化工与环境学院, 山西 太原 030051)

摘 要: 通过诱导紫苏下胚轴和子叶外植体产生愈伤组织, 建立细胞悬浮培养体系, 以提高细胞产量及细胞中迷迭香酸含量。结果表明, 在 MS 液体培养上添加 3.0mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+0.3mg/L 萘乙酸(NAA)培养基上, 下胚轴愈伤组织呈嫩黄色松散状态, 出愈时间短, 出愈率可达 100%。紫苏细胞悬浮培养产生迷迭香酸的最佳条件为培养时间 7d、接种量鲜质量浓度 20g/L、摇床转速 110r/min、蔗糖 30g/L、L-苯丙氨酸 0.15g/L, 此条件下可获得高达 2.283mg/g 的迷迭香酸。

关键词: 紫苏; 愈伤组织; 细胞悬浮培养; 迷迭香酸

Rosmarinic Acid Accumulation in Cell Suspension Culture of *Perilla frutescens*

LI Hui-zhen, ZHANG Zhi-jun*, QIAO Shao-jun
(College of Chemical and Environmental Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China)

Abstract: Cotyledon and hypocotyl explants were subjected to callus induction and a cell suspension culture system was established for *Perilla frutescens*. The effects of different culture conditions on the growth of suspension cells and the accumulation of rosmarinic acid were studied. The results showed that 100% callus induction, loose tender yellow cotyledon callus tissue cultures was achieved in a short period of time when hypocotyl explants were cultured on MS medium supplemented with 3.0 mg/L 6-BA and 0.3 mg/L NAA. The optimal culture conditions for the cell growth of *Perilla frutescens* and rosmarinic acid synthesis were culture time of 7 days, inoculum amount of 20 g/L, rotation speed of 110 r/min, sucrose concentration of 30 g/L and phenylalanine concentration of 0.15 g/L. Under these conditions, the yield of rosmarinic acid was as high as 2.283 mg/g.

Key words: *Perilla frutescens*; callus; cell suspension culture; rosmarinic acid

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)09-0149-05

紫苏(*Perilla frutescens* Britt.)属于唇形科紫苏亚族的紫苏属, 是药食兼用的油料作物, 主要产于中国、日本和韩国等少数亚洲国家。紫苏中含有较为丰富的迷迭香酸(rosmarinic acid, RosA), 它是一种天然水溶性酚酸类化合物^[1], 具有超氧化物清除活性, 能明显抑制 HL-60 变异细胞内超氧化物和过氧化物的形成^[2], 同时具有抗菌消炎、免疫调节、抗病毒、抗癌等多种生物活性, 主要应用于医药、化妆品及食品等方面^[3-8]。李荣贵等^[9]研究报道紫苏愈伤组织中迷迭香酸水溶液对大肠杆菌、金黄色葡萄糖球菌等有明显的抑制作用。另外迷迭香酸还是一种多功能医药中间体, 能抑制皮肤中透明质酸酶的活性, 具有很强的紫外线吸收能力, 是良好的化妆品添加剂, 也可用于食品防腐^[10]。基于迷迭香酸

的重要应用价值及广阔开发前景, 紫苏有望成为生产迷迭香酸的重要来源。

应用植物愈伤组织和细胞悬浮培养, 提取用于治疗疾病或食品添加剂的植物次生代谢产物, 并进行工厂化生产, 是解决资源危机的一种理想途径^[5], 近年来这一领域发展极为迅速^[11-12]。通过细胞悬浮培养生产迷迭香酸可为控制条件下迷迭香酸生物合成研究提供实验系统, 为植物生物反应器工业化生产紫苏迷迭香酸提供技术和理论支撑。目前国内外对紫苏的研究大多为紫苏油及茎叶有效成分的提取、分离及鉴定, 而通过离体培养生产次生代谢产物的研究还相对较少。本研究通过优化紫苏愈伤组织诱导体系, 筛选紫苏细胞悬浮培养条件, 建立适宜紫苏细胞生长和迷迭香酸合成的紫苏细胞

收稿日期: 2011-05-04

基金项目: 山西省科技攻关项目(20110313003-3); 山西省筹资金资助回国留学人员科研资助基金项目(2009065); 山西省留学人员科技活动项目择优资助基金项目(20110302)

作者简介: 李会珍(1974—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为细胞培养与食品生物技术。E-mail: hzli@nuc.edu.cn

* 通信作者: 张志军(1973—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物产品分离提取。E-mail: zjzhang@nuc.edu.cn

悬浮培养体系,为通过紫苏细胞大规模生产迷迭香酸提供理论和技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

紫苏种子 山西省农科院旱地农业研究中心。

6-苄氨基嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)、L-苯丙氨酸、迷迭香酸标准品 美国 Sigma 公司;MS 培养基以及各种无机盐试剂均为分析纯。

1.2 愈伤组织的诱导

将紫苏种子用体积分数 70% 乙醇消毒 30s, 0.1% HgCl₂ 消毒 10min, 无菌水冲洗 3~5 次, 接种于无激素 MS 培养基上, 每瓶 15 粒。25℃、黑暗培养。种子萌发后转至光强 2000lux 的光照条件下培养, 光照时间 10h/d。分别取 13d 龄无菌苗下胚轴和子叶作为外植体, 下胚轴切成 1cm 左右长的小段, 子叶切成面积约 0.5cm² 的小块, 接种于含不同质量浓度 6-BA 和 NAA 的 MS 液体培养基上。记录外植体出愈时间、出愈率(是诱导出愈伤组织的外植体数占接种外植体总数的百分比)、愈伤组织颜色、质地状况等, 选择最佳脱分化培养基作为继代培养基, 每 20d 继代 1 次, 每个处理重复 3 次。

1.3 细胞悬浮培养体系的建立

紫苏愈伤组织继代 4 次后, 将生长旺盛、质地疏松、分散性好的愈伤用无菌镊子夹成小块, 转入装有 50mL MS 液体培养基的 150mL 三角瓶中, 摇床振荡悬浮培养。液体培养基中 6-BA 3.0mg/L、NAA 0.3mg/L、蔗糖 30g/L、培养温度 25℃、摇床转速 100r/min、起始接种量鲜质量浓度 20g/L。每天观察培养情况, 发现有稍大的细胞团时将培养物静置 1h, 将上层培养物连同单细胞和小细胞团一起转移到 100mL 三角瓶中, 摇匀后各取 20mL 转移到装有 30mL 新鲜培养液的 150mL 三角瓶中继续培养。反复 3~4 次, 得到均一稳定的悬浮系, 后续研究均以稳定悬浮系中的培养物为基础。悬浮培养细胞经 400 目不锈钢筛网过滤, 蒸馏水洗涤 3 次, 称量细胞鲜质量, 80℃ 烘干至恒定即得干质量。

1.4 细胞悬浮培养体系的优化

通过单因素试验分析接种量、培养时间和摇床转速 3 个因素对紫苏细胞生长及迷迭香酸含量的影响, 并在此结果基础上采用 L₉(3³) 正交试验进一步优化紫苏细胞悬浮培养合成迷迭香酸的工艺条件。

1.5 添加物对悬浮细胞生长及迷迭香酸含量的影响

将悬浮细胞培养物先后接入不同质量浓度的蔗糖和 L-苯丙氨酸于 MS 新鲜培养液中, 在最佳工艺条件下进行培养, 分别研究其对悬浮细胞生长及迷迭香酸含量的影响。

1.6 迷迭香酸的提取及含量测定

1.6.1 迷迭香酸的提取

将细胞培养物烘干至质量恒定, 称取 1g 置于三角瓶中, 加水 30mL, 在 80℃ 水浴中浸提 30min, 浸提两次, 滤纸粗滤, 合并滤液, 用 1mol/L 的盐酸调 pH 值至 2.0~2.5, 进行抽滤, 滤清液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液, 旋转蒸发仪除去乙酸乙酯, 浓缩液经真空干燥制得紫苏提取物。加入 20mL 无水乙醇溶解后移入容量瓶, 无水乙醇定容至 25mL, 待测^[13]。

1.6.2 迷迭香酸含量测定

采用紫外分光光度法测定迷迭香酸含量^[14]。吸取待测液 1.0mL, 加 3.97mL、pH6.0 的 0.1mol/L NaAc, 30μL 新配的 0.2mol/L FeSO₄ 溶液, 暗反应 60min, 以不加 FeSO₄ 而加 30μL 水为对照, 572nm 波长处测定吸光度。根据迷迭香酸标准曲线计算得出紫苏细胞培养物中迷迭香酸的含量。以 572nm 波长处测定的吸光度为横坐标(X), 1mL 待测样品中迷迭香酸含量为纵坐标(Y, μg), 绘制回归方程为 $Y = 0.0087X + 0.0022$, $R^2 = 0.9982$ 。

$$C = \frac{m_1 \times V}{m} \times 10^{-3}$$

式中: m_1 指 1mL 待测样品中迷迭香酸的含量/μg; V 为提取液总体积/mL; m 为紫苏愈伤组织干质量/g; C 为待测样品中总迷迭香酸含量/(mg/g)。

2 结果与分析

2.1 激素对紫苏愈伤组织诱导和生长状态的影响

以无菌苗子叶和下胚轴为外植体, 选用细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 进行不同质量浓度组合诱导愈伤组织, 结果见表 1。研究表明, 不同激素配比诱导的愈伤组织颜色、形态和生长势不同^[15]。外植体接种后约 4~10d, 下胚轴两端膨大, 呈哑铃状, 随着培养时间的延长, 两端切口处形成愈伤组织并逐渐覆盖整个下胚轴。在添加 3.0mg/L 6-BA 和 0.3mg/L NAA 的 MS 培养基上, 下胚轴出愈时间较短, 为 8d, 并可获得 100% 的出愈率。观察发现, 愈伤组织呈嫩黄色松散状态, 质地疏松, 易于分散, 生长速度迅速, 继代稳定, 表明适宜做进一步的悬浮培养^[16]。子叶接种到培养基上 15d 后, 大多数逐渐皱缩、变厚、绿色变浅, 出愈时间较晚, 约 22d 后, 从叶片切口处开始长出愈伤组织。在添加 2.0mg/L 6-BA 和 0.3mg/L NAA 的 MS 培养基上, 可获得 33.6% 的出愈率, 但愈伤组织呈米黄色, 生长一般, 质地较硬, 不宜做悬浮培养。可见外植体具有不

表1 不同激素质量浓度对比对紫苏子叶和下胚轴愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of hormone concentration on callus induction of cotyledon and hypocotyl explants from *Perilla frutescens*

6-BA 质量浓度/(mg/L)	NAA 质量浓度/(mg/L)	出愈时间/d		出愈率/%		生长状况	
		子叶	下胚轴	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴
1.0	0.2	25	15	15.6	57.3	淡黄色, 生长慢	嫩黄色, 生长好
	0.3	25	13	17.2	68.8	淡黄色, 生长慢	嫩黄色, 生长好
	0.4	22	14	17.7	70.2	淡黄色, 生长慢	嫩黄色, 生长好
2.0	0.2	22	14	35.7	97.9	米黄色, 生长好	嫩黄色, 生长好
	0.3	22	12	33.6	100	米黄色, 生长一般	嫩黄色, 生长良好
	0.4	22	12	29.3	100	米黄色, 生长一般	嫩黄色, 生长较好
3.0	0.2	23	10	31.2	100	淡黄色, 生长慢	嫩黄色, 生长良好
	0.3	23	8	30.9	100	淡黄色, 生长慢	嫩黄色, 生长良好
	0.4	23	8	27.5	100	淡黄色, 生长慢	黄白色, 生长较好

同分化能力, 其诱导的愈伤组织频率和组织形态也不同。因此紫苏下胚轴是诱导愈伤组织的最佳外植体, 其诱导的愈伤组织是进行悬浮培养的最佳材料。

2.2 培养时间对紫苏悬浮细胞生长及迷迭香酸含量的影响

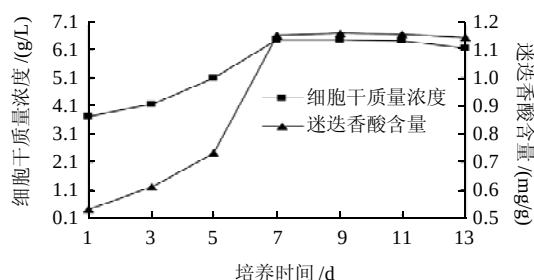


图1 培养时间对紫苏悬浮细胞生长和迷迭香酸含量的影响

Fig.1 Effect of culture time on cell growth and rosmarinic acid content in suspension culture of *Perilla frutescens*

由图1可知, 紫苏下胚轴悬浮培养细胞生长曲线符合S型曲线, 其中0~3d为缓慢生长期, 3~7d快速生长期, 7~11d生长停滞期, 11~13d为衰亡期。迷迭香酸含量与细胞生长有很大关系, 在缓慢生长期, 即接种后3d内细胞增殖质量较小, 迷迭香酸含量最低。第7天细胞干质量浓度达到最大值6.44g/L, 迷迭香酸含量也逐渐增加至最高且趋于稳定。细胞进入生长停滞期第9天时, 细胞干质量保持稳定, 迷迭香酸含量仍略有升高。到衰亡期时细胞干质量浓度和迷迭香酸含量均开始下降。因此综合考虑细胞增长及迷迭香酸含量两个因素, 选取第9天时收获细胞, 迷迭香酸含量可达到1.158mg/g。

2.3 接种量对紫苏悬浮细胞生长及迷迭香酸含量的影响

接种量是进行大规模液体悬浮培养的最关键因素之一。由图2可知, 当接种量为鲜质量浓度6g/L时, 悬

浮细胞活力低, 增殖缓慢, 容易衰老, 最终失去分化能力而死亡; 当接种量为鲜质量浓度6~18g/L时, 随着接种量的增加, 细胞干质量浓度和迷迭香酸含量也增加, 接种量在18g/L时达到最大值, 分别为7.94g/L和1.603mg/g, 并且悬浮液中有较多游离单细胞及小的细胞团, 细胞团颗粒均匀, 分散度良好, 有利于进一步继代培养。当接种量大于24g/L时, 细胞干质量浓度和迷迭香酸含量出现下降趋势, 培养液变得浑浊, 细胞分散度差, 培养瓶上开始聚集衰败细胞, 这可能是接种量过大, 导致通气不足, 并且由于过多细胞消耗大量养分, 致使悬浮细胞生长后期营养不足大量死亡, 不利于继代培养, 这与颜日明等^[15]对杜仲细胞悬浮培养研究结果相似。因此选择既能使细胞达到最大的生长速率, 又不会引起养分浪费的适宜接种量是悬浮细胞培养过程中一个重要的因素^[16]。

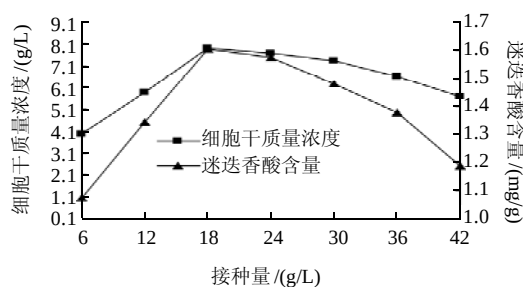


图2 接种量对紫苏悬浮细胞生长和迷迭香酸含量的影响

Fig.2 Effect of inoculum amount on cell growth and rosmarinic acid content in suspension culture of *Perilla frutescens*

2.4 摇床转速对紫苏悬浮细胞生长及迷迭香酸含量的影响

由图3可知, 发现当摇床转速为80r/min时, 愈伤组织多数褐变死亡, 培养液颜色深暗, 这可能是由于转速慢, 培养基中气体交换差, 各种代谢受到抑制,

致使紫苏细胞生长缓慢,褐化严重;随着摇床转速的增加,紫苏细胞干质量浓度和迷迭香酸含量也增加,当转速为 110r/min 时,液体剪切力增大,培养液氧气供应充足,随着新生细胞的增殖,结合不紧密的细胞逐渐脱落并分散在悬浮液中,形成较为均一的悬浮培养体系,紫苏细胞生长和迷迭香酸合成最好,分别达到 8.64g/L 和 1.78mg/g;已有研究表明适当的剪切力可以改善通气,使植物细胞保持良好的生长状态并能维持悬浮细胞系的分散性,但过高剪切力可使细胞受到机械损伤,甚至导致细胞丧失活性^[17]。当摇床转速提到 130r/min 时,细胞生长较差,细胞干质量浓度和迷迭香酸含量分别仅有 6.42g/L 和 1.513mg/g,这可能是由于过高剪切力引起多数细胞破碎死亡,从而抑制了细胞生长和迷迭香酸的合成。

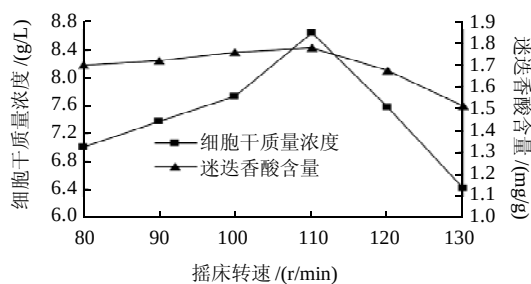


图3 摇床转速对紫苏悬浮细胞生长和迷迭香酸含量的影响
Fig.3 Effect of rotation speed on cell growth and rosmarinic acid content in suspension culture of *Perilla frutescens*

2.5 正交试验优化迷迭香酸合成的培养条件

表2 $L_9(3^3)$ 正交试验设计表

Table 2 Factors and levels of orthogonal array design for optimizing the production of rosmarinic acid

试验号	A 初始接种量/(g/L)	B 培养时间/d	C 摇床转速/(r/min)	迷迭香酸含量/(mg/g)
1	1(18)	1(7)	1(100)	1.778
2	1	2(9)	2(110)	1.809
3	1	3(11)	3(120)	1.648
4	2(24)	1	2	1.761
5	2	2	3	1.578
6	2	3	1	1.463
7	3(30)	1	3	1.512
8	3	2	1	1.433
9	3	3	2	1.575
K_1	5.235	5.051	4.674	
K_2	4.802	4.820	5.145	
K_3	4.520	4.686	4.738	
R	0.238	0.122	0.157	

表3 方差分析表

Table 3 ANOVA for the experimental results of orthogonal array design

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	$F_{0.05(2,2)}$	显著性
A	0.086471	2	0.043236	23.678	19	*
B	0.022727	2	0.011364	6.223		
C	0.043510	2	0.021755	11.914		
误差	0.003652	2	0.001826			
总和	0.156360	8				

从表2极差分析可知,各因素对迷迭香酸含量的影响大小顺序为:初始接种量>摇床转速>培养时间,直观分析可见,最佳悬浮细胞培养条件为 $A_1B_1C_2$,即接种量 18g/L、培养时间 7d 和摇床转速 110r/min。在此条件下进行验证实验,迷迭香酸含量可达 1.835mg/g。从表3方差分析结果显示,仅有初始接种量对迷迭香酸的合成有显著影响($P < 0.05$),而摇床转速和培养时间无显著影响。

2.6 蔗糖质量浓度对紫苏悬浮细胞生长及迷迭香酸含量的影响

在组织培养中,蔗糖不仅是植物赖以生长的重要能量来源,而且也是渗透压调节剂,因而起着十分重要的作用^[18]。在悬浮培养液中加入 10~60g/L 的蔗糖,采用最佳悬浮培养体系培养。由图4可知,蔗糖质量浓度为 10g/L 时,紫苏细胞褐化早,长势差,细胞增长和迷迭香酸含量都很低,表明碳源用量不足,会限制细胞生长。随着蔗糖质量浓度的升高,细胞干质量浓度和迷迭香酸含量也随着升高,尤以 20~30g/L 间增加率最大,30g/L 蔗糖时细胞干质量浓度达到最大为 8.82g/L,迷迭香酸含量在 40g/L 蔗糖时仍略有提高为 1.877mg/g。当蔗糖质量浓度大于 50g/L 时,高质量浓度的蔗糖可能是由于高渗透压而造成细胞生理胁迫,从而抑制了紫苏细胞生长和迷迭香酸的合成。由于在 30~40g/L 范围内迷迭香酸的含量增加较小,同时为了减小成本,故确定紫苏悬浮培养体系中最佳蔗糖质量浓度为 30g/L。

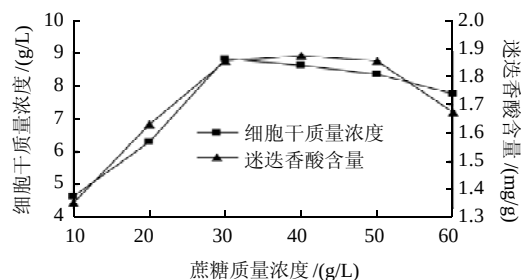


图4 蔗糖质量浓度对紫苏悬浮细胞生长和迷迭香酸含量的影响
Fig.4 Effect of sucrose concentration on cell growth and rosmarinic acid content in suspension culture of *Perilla frutescens*

2.7 L-苯丙氨酸对紫苏悬浮细胞生长及迷迭香酸含量的影响

在植物细胞的次生代谢中, L-苯丙氨酸是一个代谢中间体, 它对生物碱、木质素、黄酮等多种次生代谢物质的生物合成都有重要作用, 因而 L-苯丙氨酸被广泛作为附加物来提高植物细胞悬浮培养中次生代谢产物的含量^[19]。迷迭香酸属于酚酸类化合物, L-苯丙氨酸是其前体物质。本实验将悬浮细胞培养物接入 30g/L 蔗糖于 MS 新鲜培养液中, 分别添加不同质量浓度(0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30g/L)的 L-苯丙氨酸, 在最佳工艺条件下进行培养研究其对悬浮细胞生长及迷迭香酸含量的影响, 结果见图 5。

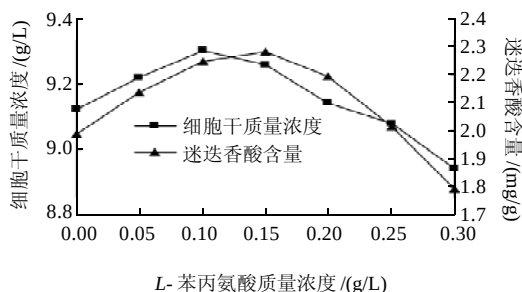


图5 苯丙氨酸对紫苏悬浮细胞生长和迷迭香酸含量的影响

Fig.5 Effect of phenylalanine concentration on cell growth and rosmarinic acid content in suspension culture of *Perilla frutescens*

由图 5 可知, L-苯丙氨酸质量浓度对紫苏细胞干质量及迷迭香酸合成有较大影响。在低质量浓度 0.05~0.10g/L 范围内的 L-苯丙氨酸能促进紫苏细胞生长, 当 L-苯丙氨酸质量浓度为 0.1g/L 时, 细胞干质量浓度达到最大(9.3g/L)。而迷迭香酸含量在 L-苯丙氨酸质量浓度为 0.05~0.15g/L 时, 随着其质量浓度的增加而升高, 在 0.15g/L 时达到最高(2.283mg/g)。说明前体物质 L-苯丙氨酸对紫苏悬浮细胞中迷迭香酸的合成有较大影响。

3 结 论

利用植物愈伤组织和细胞悬浮培养生产用于治疗疾病或食品添加剂的植物次生代谢产物, 近年来这一领域的发展极为迅速^[20]。国内外对紫苏的研究大多为紫苏油的提取及成分鉴定, 对紫苏离体培养及次生代谢产物的合成、代谢途径的研究还相对较少。在供试材料愈伤组织诱导中, 不同外植体得到的愈伤组织形态和质量不同。在添加 3.0mg/L 6-BA 和 0.3mg/L NAA 的 MS 培养基上, 以无菌苗下胚轴作为悬浮培养外植体, 可得到结构松散、分散性好的嫩黄色愈伤组织, 符合胚性愈伤组织的一般形态, 适合做为悬浮培养的材料, 这与曹有龙^[11]、毛艳萍^[21]等的研究结果一致。

对紫苏细胞悬浮培养的影响因素进行了筛选和优化, 结果表明, 紫苏愈伤组织悬浮培养生产迷迭香酸最佳培养条件为: 初始接种量 18g/L、培养时间 7d、摇床转速 110r/min。在紫苏愈伤组织悬浮培养体系中添加蔗糖和 L-苯丙氨酸可提高细胞产量和迷迭香酸含量, 最适添加质量浓度为蔗糖 30g/L、L-苯丙氨酸 0.15g/L, 可获得高达 2.283mg/g 的迷迭香酸。紫苏细胞生长和迷迭香酸合成悬浮细胞培养体系的建立, 可为紫苏迷迭香酸大规模工业化生产提供技术参考, 同时也可利用该体系生产紫苏中多种活性物质, 或通过代谢调控合成在原植株中含量较低的化合物, 还可以为进一步研究紫苏中各类次生代谢途径提供理论依据。

参考文献:

- [1] PETERSEN M, MONIQUE S J S. Rosmarinic acid[J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 121-125.
- [2] NAKAMURA Y, OHIO Y, MURAKAMI A. Superoxide scavenging activity of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* Britt. var. *acuta* f. *viridis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(11): 4545-4550.
- [3] 吴建章, 郁建平, 赵东亮. 迷迭香酸的研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2005, 17(3): 383-388.
- [4] LEE H J, CHO H S, PARK E, et al. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis[J]. *Toxicology*, 2008, 250: 109-115.
- [5] KIM J H, LEE B J, KIM J H, et al. Rosmarinic acid suppresses retinal neovascularization via cell cycle arrest with increase of p21WAF1 expression[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2009, 615: 150-154.
- [6] MOON D O, KIM M O, LEE J D, et al. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF- α -induced NF- κ B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells[J]. *Cancer Letters*, 2010, 288: 183-191.
- [7] LI Guisheng, JIANG Wanglin, TIAN Jingwei, et al. *in vitro* and *in vivo* antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis[J]. *Phytomedicine*, 2010, 17: 282-288.
- [8] GELLER F, SCHMIDT C, GOTTERT M, et al. Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia alliodora*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 128: 561-566.
- [9] 李荣贵, 滕大为, 杜桂彩, 等. 紫苏愈伤组织迷迭香酸的纯化及抗菌活性研究[J]. *微生物学通报*, 2000(5): 324-326.
- [10] ALKAM T, NITTA A, MIZOGUCHI H, et al. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A β ₂₅₋₃₅[J]. *Behavioural Brain Research*, 2007, 180(2): 139-145.
- [11] 曹有龙, 许兴, 赵军, 等. 麻黄愈伤组织细胞的悬浮培养[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(1): 36-38.
- [12] 罗盛旭, 梁振益, 张德拉, 等. 薄荷迷迭香酸的提取及分析研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(11): 192-193.
- [13] 张鑫, 张志军, 李会珍, 等. 紫苏叶中迷迭香酸的提取及测定[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(11): 235-236.
- [14] ZHAN Yulian, MA Xiaojun, DAI Jungui, et al. Analysis of the components in callus and cell suspension cultures of *Ligusticum chuanxiong* Hort. by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *李时珍国医国药*, 2006(6): 1116-1118.
- [15] 颜日明, 张志斌, 邱晓芳, 等. 杜仲细胞悬浮培养产黄酮及其动力学研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(10): 60-65.
- [16] 杨帆, 赵君, 张之为, 等. 植物悬浮细胞的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2010, 14(3): 257-262.
- [17] 李雅丽, 包金龙, 杨英, 等. 搅拌式生物反应器进行植物细胞培养常见问题分析[J]. *药物生物技术*, 2009, 16(5): 468-471.
- [18] 吴春霞. 植物细胞悬浮培养的影响因素[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(1): 36-38.
- [19] 马玉芳, 许继宏. 提高植物细胞培养中次生代谢产物产量的方法[J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2003, 25(增刊 1): 142-145.
- [20] 于寒松, 于亚桐, 贾帅, 等. 利用悬浮细胞培养方法提高荞麦中总黄酮含量的研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(22): 37-39.
- [21] 毛艳萍, 苏智先, 胡进耀, 等. 濒危植物珙桐愈伤组织的诱导及悬浮细胞培养初探[J]. *武汉植物学研究*, 2010, 28(4): 510-515.