326-330 红豆杉，细胞系，细胞培养 28844(21)

维普资讯 http://www.cqvip.com

生物工程学报13(3):326～330,1997
Chinese Journal of Biotechnology

云南红豆杉培养细胞系的建立

罗建平 牛炳韬 贾敬芬* 郑光植[1]
(兰州大学生物系 兰州 730000)
(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)[1]

S791.490.3

紫杉醇(Taxol)最初是从红豆杉属植物短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)树皮中分离出的一种二萜类化合物[1],对卵巢癌,转移性乳腺癌和恶性黑色素瘤等患者疗效显著[2],全世界红豆杉属植物有近11种,都含紫杉醇成分,但含量很低,加之现存数量很少,生长极为缓慢,造成了紫杉醇原料供应的危机[3]。紫杉醇化学合成已经成功[4~6],但繁杂的反应过程及前体化合物来源的限制使得它们无法实现商业化生产。最近从短叶红豆杉中分离出一种生产紫杉醇的内寄生真菌 *Taxomyer andreanae*[7],由于紫杉醇含量仅为24～50ng/L,没有实用价值。

植物细胞和组织培养可能是解决天然抗肿瘤药物长期供应的有效方法之一[8]。自1991年Christen等人申请利用红豆杉细胞培养物生产紫杉醇专利以来[9],有关红豆杉细胞培养的研究已有不少报道[10~12]。但云南红豆杉(*T. yunnanensis*)仅见愈伤组织诱导的报道[13]。本文报道云南红豆杉愈伤组织诱导和细胞培养的初步结果,并分析了细胞培养物中紫杉醇含量。

1 材料和方法

1.1 愈伤组织的诱导和培养

云南红豆杉(*T. yunnanensis*)外植体,系采自云南昆明中国科学院昆明植物研究所植物园。取当年生幼嫩枝条,75%乙醇浸蘸后于0.2%升汞中灭菌15min,无菌的幼茎和针叶分开并剪成约1cm长,接种到诱导培养基中。40d后,将愈伤组织从外植体剥离下来,进行驯化和继代培养的研究。每35d继代培养一次,平均接种量为3.5gL^{-1}培养基。每次比较试验均在前一步试验结果的基础上进行。诱导和继代培养基为MS[14]和B_5[15]两种基本培养基,均附加1.5mg/L 2,4-D和0.5mg/L KT。培养基在0.1MPa压力下灭菌15min。灭菌前用NaOH调至pH5.8,愈伤组织于暗中、25±2℃的条件下诱导和培养。

1.2 生长参数

细胞冰冻干燥至恒重,计算细胞干重增加和细胞生长速率。细胞干重增加以每升培养基增加的细胞干重表示(g·L^{-1});细胞生长速率以每天每升培养基增加的细胞干重表示(g·(L·d)$^{-1}$)。比生长速率μ按[ln(收获的细胞干重/细胞接种干重)/培养天数]求出(g·(L·d)$^{-1}$);细胞增长的倍增时间t(d)=$\ln 2/\mu_{max}$。除不同愈伤组织无性系的变异分析外,所有比较研究,均采用生长较快的愈伤组织无性系,至少3次重复。

1.3 愈伤组织紫杉醇提取分离和HPLC分析

收集冰冻干燥的培养细胞,按文献[16]的方法进行提取分离和HPLC分析。紫杉醇标准样品从天然红豆杉树皮中分离得到,纯度97.8%。紫杉醇含量用干重细胞中所含紫杉醇的百分比表示(%),同时计算紫杉醇产率(mg/L),以每升培养基增加的干细胞中所含紫杉醇毫克数表示。

* 通讯联系人。
国家自然科学基金资助。
本文于1996年7月8日收到。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结 果

2.1 愈伤组织的诱导和培养

云南红豆杉(*T. yuunanensis*)的嫩茎和针叶作为外植体诱导愈伤组织,在MS和B_5两种培养基诱导10d后,一些外植体伤口处膨大,20d左右,外植体伤口处形成愈伤组织。统计结果表明,不同部位的外植体和不同诱导培养基影响愈伤组织的发生(表1)。嫩茎愈伤组织诱导率大于针叶愈伤组织诱导率,

表1 云南红豆杉愈伤组织诱导情况

Medium	Explant	Explant number	Callus number	Efficiency /%	Colour and texture of callus
MS	Young stem	68	59	86.76	Yellow, friable
	Young needle	63	34	53.97	Brown, compact
B_5	Young stem	46	16	34.78	Yellow, friable
	Young needle	47	5	10.64	Brown, compact

MS培养基诱导愈伤组织的形成优于B_5培养基。嫩茎和针叶两者愈伤组织颜色和状态明显不同,这些特征不受培养基类型的影响。诱导30d后,明显可见愈伤组织处有棕褐色素形成。培养40d后,剥离愈伤组织到新鲜培养基中进行驯化培养。驯化培养中,针叶愈伤组织生长极为缓慢,不如嫩茎愈伤组织,而且色素分泌能力大于嫩茎愈伤组织,经过3~4代的驯化培养,愈伤组织变褐变硬而渐死亡,最后仅得到嫩茎愈伤组织。愈伤组织驯化采用两种培养基MS和B_5。图1为嫩茎愈伤组织于MS和B_5培养基中第2~6代驯化培养的动态变化,表明两者均于第3代开始趋于稳定。愈伤组织在B_5中生长快于MS。B_5中愈伤组织平均生长速率是MS中的1.54倍(均为5代驯化培养的平均值)。以后愈伤组织的继代培养均采用B_5基本培养基。

2.2 激素和有机附加物对愈伤组织生长的影响

激素间相互作用对培养细胞的生长有显著影响。当KT浓度为0.5mg/L时,试验不同浓度2,4-D对云南红豆杉愈伤组织生长的影响。图2表明,当2,4-D浓度低于1.5mg/L时,生长速率显著降低,而

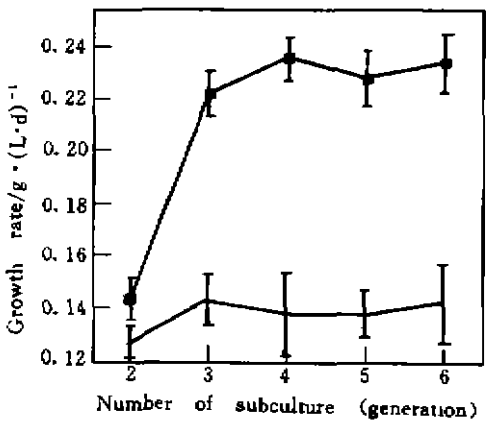

图1 云南红豆杉愈伤组织的继代培养
-■- cultured in B_5, - - cultured in MS

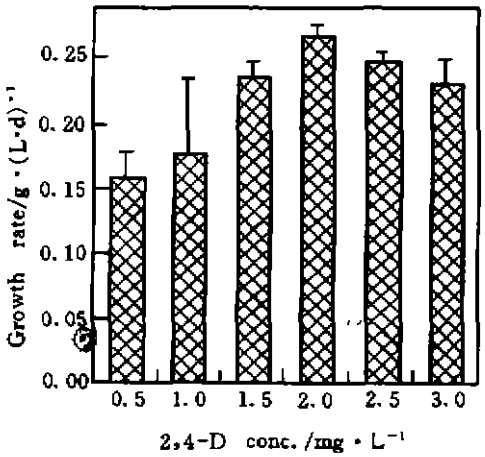

图2 不同2,4-D浓度对云南红豆杉愈伤组织生长的影响

较高浓度的2,4-D对愈伤组织生长具有一定的抑制作用,当2,4-D浓度为2mg/L时细胞生长速率最快,为0.264g/L·d。培养基中附加10%椰子乳(CM)和0.1%水解酪蛋白(CH)能较显著促进愈伤组织的生长,其生长速度分别为0.265g/L·d和0.283g/L·d,比对照高8.16%和15.91%,但附加0.1%水解乳蛋

维普资讯 http://www.cqvip.com

白(LH)和0.1%酵母提取物(YE)于培养基中对愈伤组织的生长影响不大(见图3)。

2.3 愈伤组织生长的动态变化

图4为云南红豆杉愈伤组织继代培养的生长曲线,表明愈伤组织生长有较长的生长延滞期,约15d左右。细胞培养从第15d起进入对数生长期,最大比生长速率 μ_{max} 为0.046g/d,干重细胞倍增时间 t 为14.9d,从第30d开始生长速率减缓进入稳定生长期,整个愈伤组织生长周期大约35d,最大细胞干重达11.631g/L,是起始接种量的3.32倍。当愈伤组织生长进入40d后,生长速率下降,细胞干重增加降低,愈伤组织衰老变黑而死亡(图4)。

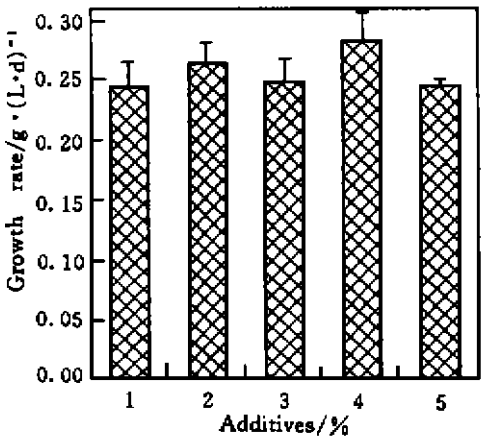

图3 不同有机附加物对云南红豆杉愈伤组织生长的影响
1.Control, 2.CM, 3.LH, 4.CH, 5.YE

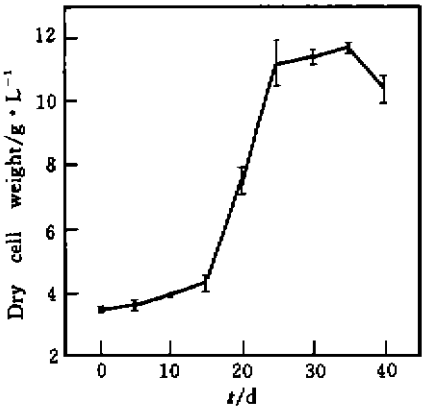

图4 云南红豆杉愈伤组织生长的时间进程

2.4 愈伤组织的紫杉醇分析

将培养35d的云南红豆杉愈伤组织经过一定分离提取步骤后,进行高效液相色谱层析(HPLC)分析,图5为云南红豆杉愈伤组织甲醇提取物经硅胶柱层析纯化后所得样品的HPLC图谱,样品中紫杉醇保留时间和对照相同,表明云南红豆杉培养细胞具有合成紫杉醇的能力。

2.5 愈伤组织无性系的变异分析

不同愈伤组织无性系在生长和紫杉醇合成能力上差异较大,通过对60个愈伤组织无性系生长和紫杉醇含量的分析,结果表明生长速率变化在0.1~0.3g·(L·d)$^{-1}$之间,紫杉醇含量变化在0~0.03%之间(表2)。从变异系数(CV)上可看出,紫杉醇含量的变异程度高于生长的变异。无性系TY-15、TY-37和TY-53生长速率较高,分别比所分析的无性系平均值高31.38%、45.60%和36.17%,但紫杉醇含量不到万分之一。无性系TY-11、TY-20和TY-50紫杉醇合成能力较强,无性系TY-11紫杉醇含量最高是平均值的2.39倍,但生长速率却较低。仅为平均值的79.54%。综合生长和紫杉醇含量结果,无性系TY-11和TY-53的紫杉醇产率最高,是平均值的2.16倍和2.11倍。回归分析表明愈伤组织生长和紫杉醇合成之间具有一定的负相关性($r=-0.6375$)。

3 讨 论

红豆杉植物不同部位均可作为外植体诱导愈伤组织,但以幼茎、形成层或树皮诱导效果最好[10~12]。本文表明云南红豆杉幼茎愈伤组织发生率高于针叶并且生长最好,和东北红豆杉(*T. cuspidata*)诱导和培养的结果相似[10]。许多报道愈伤组织诱导和继代培养的最适培养基是B_5或改良的B_5培养基[10~12,17]。但对于云南红豆杉,愈伤组织诱导时采用MS培养基最佳,维持愈伤组织正常生长采

维普资讯 http://www.cqvip.com

用 B_5 培养基最有效。

红豆杉属植物培养细胞生长普遍较慢的现象反映了红豆杉植物本身的遗传特性[11]。继代培养中细胞总是向培养基中分泌一些酚类化合物，也是导致细胞褐化和生长缓慢的原因之一[18]。优化培养基组成和改善培养条件可以显著促进细胞生长[16,17]。云南红豆杉愈伤组织在附加适宜浓度的激素和有机附加物的 B_5 培养基中继代培养，生长速率能被明显提高。最近，Ketchum(1995)对短叶红豆杉愈伤组织培养基全面优化组合后，使细胞生物量增加 5 倍之多[17]。和东北红豆杉培养细胞相似[19]，云南红豆杉愈伤组织生长和紫杉醇合成之间存在一定的负相关性。本文试验是以生长较快的愈伤组织为材料，所选择的条件可能不适合紫杉醇的合成。下一步试验可以通过优化培养条件、前体饲喂、诱导子处理以及高产细胞系的筛选等途径来提高细胞合成紫杉醇能力[16,18,20-22]。也可采用两步培养法或固定化细胞培养法[23]，促进紫杉醇的积累。

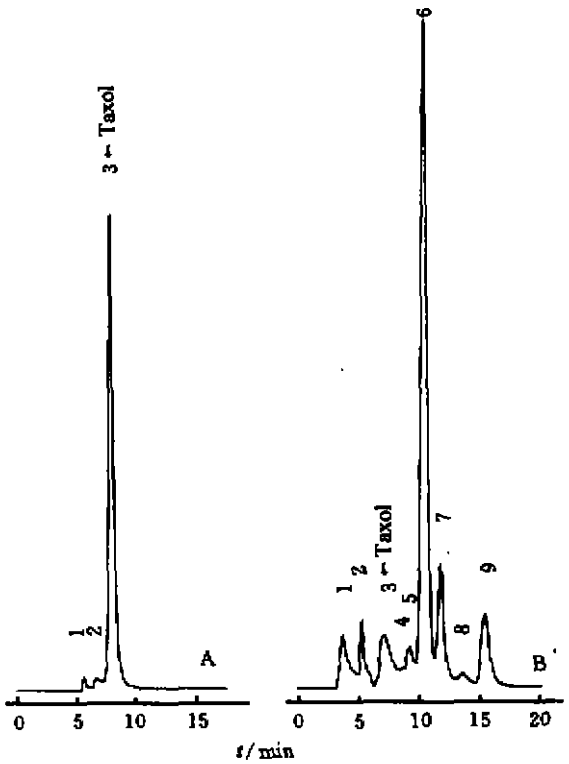

图 5　云南红豆杉愈伤组织紫杉醇的高效液相色谱分析

A、标准样品，B、愈伤组织抽提物

表 2　一些愈伤组织无性系的变异分析

Callus line	Growth rate /g·(L·d)$^{-1}$	Taxol content /%	Taxol yield /mg·L^{-1}
TY-02	0.162	0.018	1.038
TY-04	0.206	0.015	1.051
TY-08	0.229	0.009	0.736
TY-11	0.154	0.029	1.539
TY-15	0.256	0.002	0.215
TY-20	0.103	0.020	0.734
TY-23	0.207	0	0
TY-29	0.135	0.021	1.006
TY-34	0.154	0.002	0.140
TY-37	0.281	0.007	0.659
TY-42	0.180	0.010	0.748
TY-46	0.161	0.013	0.748
TY-50	0.188	0.023	1.503
TY-53	0.262	0.001	0.129
TY-57	0.209	0.007	0.461
The mean value of analysed lines	0.192±0.05	0.012±0.009	0.714±0.471
C V	0.2604	0.7479	0.6599

参 考 文 献

[1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E *et al*. J Amer Chem Soc, 1971, **93**: 2325～2327.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[2]Slichemyer W J, Von Hoff D D. Anti-Cancer Drugs, 1991, **2**:519～530.
[3]Cragg G M, Snader K M. Cancer Cells, 1991, **3**:233～235.
[4]Denis J N, Greene A E, Guenard D *et al*. J Amer chem Soc, 1988, **110**:5917-5919.
[5]Holton R A, Somozac, Kim H B *et al*. JACS, 1994, **116**:1597～1598.
[6]Nicolaou K C, Yang Z, Liu J J *et al*. Nature, 1994, **367**:630～634.
[7]Stierle A, Strobel G, Stoerle D. Science, 1993. **260**:214～216.
[8]Stafford A. In: Stafford A, Warren G eds., Plant Cell and Tissue. Culture. BucKingham: Open University Press, 1991, pp. 125～126.
[9]Christen A A, Gibson D M, Bland J. US Patent. 1991. 5 019. 504.
[10]Fett-Neto A G, Dicomo F, Reynolds W F *et al*. Bio/technology, 1992. **10**:1572～1575.
[11]Gibson D M, Ketchum R E B, Vance N C *et al*. Plant Cell Rep, 1993. **12**:479～482.
[12]Wickremesinhe E R M, Arteca R N. Plant Cell Tissue and OrganCulture, 1993. **35**:181～193.
[13]朱蔚华, 陆 俭, 李新兰等. 中药材, 1991. 9:5～7.
[14]Murashige T, Skoog F. Physiol Plant, 1962. **15**:473～497.
[15]Gamborn O L, Miner R A, Ojima K. Exp Cell Res, 1968. **50**:148～151.
[16]Fett-Neto A G, Melanson S J, Skata K *et al*. Bio/Technology, 1993. **11**:731～734.
[17]Ketchum R E B, Gibson D M, Gallo G L. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1995. **42**:185～193.
[18]Wickrewesinhe E R M, Arteca R N. J Plant physiol, 1994. **144**:183～188.
[19]Fett-Neto A G, Zhang W Y, Dicosmo F. Biotechnol Bioeng, 1994. **44**:205～210.
[20]Edgingto S M. Bio/Technology, 1991. **9**:933～938.
[21]Fett-Neto A G, Melanson S J, Nicholsin S A *et al*. Biotechnol Bioeng, 1994. **44**:967～971.
[22]Srinivasan V, Pestchanker L, Moser S R A *et al*. Biotechnol Bioeng, 1995. **47**:666～676.
[23]叶和春, 李国凤. 见: 孙敬三等主编, 植物生物技术和作物改良. 北京: 中国科学技术出版社 1990, pp. 181～203.

Establishment of Tissue Culture from *Taxus yunnanensis*

Luo Jianping Niu Bingtao Jia Jingfen Zheng Guangzhi[1]
(*Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou* 730000)
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming* 650204)[1]

Abstract Callus culture system was established from *Taxus yunnanensis* cheng et L. K. Fu. using different explants including young stems and needles on MS and B_5 medium. Young stems were easier than young needles for initiating callus. Callus derived from stem segments displayed better growth on defined media. B_5 medium was more suitable than MS medium for callus growth, although lower frequency of callus formation was observed. The callus growth was evidently influenced by different 2, 4-D concentrations in combination with kinetin or different organic additives. The best growth rate was $0.283g\cdot(L\cdot d)^{-1}$, which was obtained when calli were maintained on subculture medium supplemented with 2mg/L 2, 4-D, 0.5mg/L kinetin and 0.1% casein hydrolysate. The growth curve of *T. yunnanensis* callus exhibited that the optimum period for callus subculture was 35 days and the maximum increase in biomass was 3.32 times of the initial dry weight during the stationary phase. A lag phase was apparent between day 0 and the fifteenth day. The dry weight doubling time was about 15 days during the exponential phase. *T. yunnanensis* cell cultures were able to synthesize taxol by high performance liquid chromato-graphy (HPLC) analysis and the highest taxol content was 0.029% DW. The comparsion between cell growth rate and taxol content showed that there was extreme variability among different established callus lines and revealed that there was an inverse relationship between cell growth rate and taxol content ($r=-0.6375$) to some extent.

Key words *Taxus yunnanensis*, tissue culture, taxol