

欧洲红豆杉细胞培养的研究*

甘烦远 郑光植 彭丽萍

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

摘 要

从欧洲红豆杉(*Taxus baccata*)的嫩茎及针叶诱导出愈伤组织,并对之进行了愈伤组织培养及细胞悬浮培养研究;利用 HPLC 方法测定了培养物合成紫杉醇的能力. 探索了提高培养细胞生长率及紫杉醇含量的一些措施. 结果表明,欧洲红豆杉愈伤组织及悬浮培养细胞的生长速率已分别达到 $0.27 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $0.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 紫杉醇含量分别为 0.0031% 和 0.017%.

关键词 欧洲红豆杉;紫杉醇;愈伤组织培养;细胞悬浮培养

STUDY ON CELL CULTURE OF *TAXUS BACCATA*

Gan Fanyuan, Zheng Guangzhi and Peng Liping

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract

Calli were induced from new stems and needles of *Taxus baccata*, and the callus culture and cell suspension culture were studied. The taxol produced from the culture cells were analyzed by HPLC method. Some conditions able to increase the growth rate and taxol content of the culture cells were tested. The growth rates of calli and suspension culture cells from *Taxus baccata* were 0.27 and 0.35 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (dry weight), and their taxol contents were 0.0031 and 0.017%, respectively.

Key words *Taxus baccata*; taxol; callus culture; cell suspension culture

红豆杉为红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus*)植物^[1],其树皮分离物紫杉醇(Taxol)已于1992年底被美国FDA批准为治疗晚期卵巢癌的上市新药^[2],成为近年来从天然植物中提取到的活性最强的抗癌药物. 由于目前所知紫杉醇只存在于红豆杉属的植物中,并且含量极低^[3],红豆杉的栽培亦非常困难. 尽管近年来在紫杉醇的人工合成、红豆杉栽培以及其他紫杉醇资源寻找等工作都取得了比较好的成果^[4,5],但仍不能取代从天然红豆杉植物中提取紫杉醇的方法. 致使药源紧缺,药价昂贵,限制了紫杉醇的临床扩大应用. 同时,由于红豆杉的大量砍伐,造成了红豆杉的生态和环境危机. 因此,以组织培养方法生产紫杉醇便成为世界科学界的热点,且国外已有不少相关报道^[6~8]. 虽然我国也有不少实验室在进行这项工作,但至今进展不大^[9]. 本文报道用欧洲红豆杉(*Taxus baccata*)进行愈伤组织和细胞悬浮培养的一些研究结果.

收稿日期:1995-07-31 接受日期:1995-10-18

* 中国科学院“八五”重点科研项目

1 材料与方法

1.1 愈伤组织诱导

取欧洲红豆杉(*Taxus baccata*)(本所植物园)的当年生嫩枝条及针叶片,清水洗干净后,滤纸压干,用 0.2% 升汞减压消毒 10 min,于超净工作台上将材料剪成长 1.0~1.5 cm 的切段,无菌条件下接种到已预先高温、高压灭菌的培养基上,按常规方法进行愈伤组织诱导。诱导培养基为 MS、B5 和 6,7-V 等 3 种固体培养基,并附加不同的植物激素或其组合。培养基的琼脂含量 0.6%,pH 5.8 左右,25±2℃ 下于黑暗中培养。

1.2 愈伤组织培养及细胞悬浮培养

分离诱导出的愈伤组织,培养于 B5 基本培养基上,同时进行不同培养基及不同植物激素的筛选试验。愈伤组织接种于含 20 mL 固体培养基的 50 mL 三角瓶中,每三角瓶接种量约为 50 mg(干重)左右,愈伤组织每 30 d 继代一次。细胞悬浮培养的培养基与愈伤组织的相同,但去掉琼脂。每 250 mL 三角瓶分装 60 mL 左右的培养液,每三角瓶接种量约 150 mg(干重)。摇床转速 120 r/min,其他培养条件同上。

1.3 有效成分含量测定

收集冰冻干燥的愈伤组织,甲醇提取,提取液蒸干,少量水溶解,二氯甲烷萃取,萃取液蒸干,乙醚提取,收集乙醚不溶物,用二氯甲烷溶解,定容后进行 HPLC 分析,HPLC 分析条件如下(详细方法另文发表):

岛津 LC-3A HPLC 色谱仪,Spherisorb C6H5(10 μm,4×250 mm)分析柱(中国科学院大连物化所),检测波长 228 nm。以甲醇:乙腈:水(2:3:8)为流动相。另外,对分离纯化所得紫杉醇进行了各种理化常数及光谱的鉴定,其数据与文献^[10,11]报道的从天然植物中分离到的紫杉醇相同(光谱分析将另文发表)。

1.4 实验参数

培养细胞的生长速率以每 d、每 L 培养基增加的细胞干重克数表示($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),紫杉醇的含量以百分率($\omega/\%$)表示。实验重复不少于 3 次,结果取其平均值。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织诱导

不同的培养基对欧洲红豆杉的嫩枝条外植体的愈伤组织诱导的效果不同,在所试 B5、MS 和 6,7-V 等 3 种培养基中,以 MS 培养基为佳。在 MS 培养基上,不同的植物激素种类及其组合(包括不同浓度的 2,4-D、NAA、IBA、IAA、KT 和 BA)对欧洲红豆杉嫩枝条愈伤组织诱导的影响实验结果表明:添加 2,4-D 或含 2,4-D 的激素组合,对诱导嫩枝条形成愈伤组织效果较好。在其中,添加 1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KT,可使欧洲红豆杉嫩枝条的愈伤组织诱导率达到最高(51.8%);而欧洲红豆杉针叶经 3 次重复诱导,在 MS 培养基上均未得到愈伤组织,但在添加适量 2,4-D 的 B5 培养基可有极少量的愈伤组织形成,其诱导率低于 20%。外植体接种大约 3 周左右,开始形成愈伤组织,由嫩枝条诱导出的愈伤组织颜色较浅,为灰白色或浅棕色,亦较分散,生长较好;而由针叶诱导出的愈伤组织,颜色较深,多为棕色,成团,较硬,生长极差。

此外,试验还发现,在培养基中添加 10% 的椰子汁(CM),可提高愈伤组织诱导率达 15% 以上. 在黑暗培养条件下的愈伤组织诱导率要比在光照(约 1 000 lx, 8 h/d)培养条件下的高.

2.2 愈伤组织培养及驯化

虽然在 MS 培养基上欧洲红豆杉嫩枝条的愈伤组织诱导率较高,但在该培养基上,愈伤组织的生长却较差. 不同的培养基及不同的植物激素比对红豆杉愈伤组织的生长影响试验结果表明,由嫩枝条诱导而来的愈伤组织在 B5 培养基添加 2.0 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KT 激素条件下,生长较好,其生长率达 $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 细胞干重,而在其它种类的培养基及植物激素配比下,愈伤组织生长均较差. 由于叶愈伤组织生长仍很差,并在以后的继代培养中逐渐死亡,故以后实验所用的试验材料均为嫩枝愈伤组织.

在愈伤组织的每次继代培养中,均挑选生长旺盛、疏松的新鲜愈伤组织作为接种的“种子”. 在继代培养中,嫩枝愈伤组织的生长在 8 代左右之前极不稳定,以后的生长速率明显加快(图 1). 经过大约 10 代的不断筛选,愈伤组织被驯化形成了生长及性状均比较一致并稳定的无性系. 在以后的继代过程中,这种愈伤组织无性系生长较快、较分散,水分含量较大,不成团块,易分离,颜色较浅且均一. 同时在继代培养中,会有少量棕色色素分泌到培养基中,但分泌的色素含量与细胞生长无明显的相关性.

2.3 愈伤组织的生长周期

欧洲红豆杉嫩枝条的愈伤组织的生长周期均为 35 d 左右(图 2). 愈伤组织的生长延缓期时间较长,约 20 d 左右;d 21~28 天进入生长的指数生长及对数生长周期,此后进入稳定期. 过了稳定期之后,愈伤组织很快衰老、变黑死亡

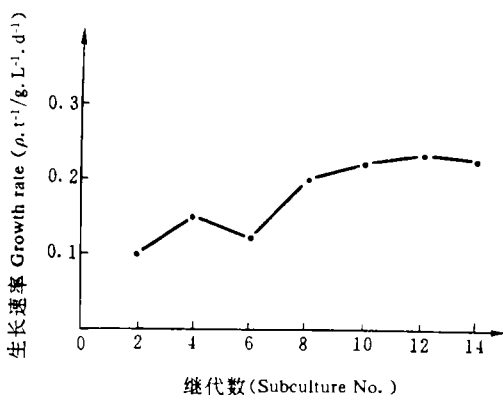


图 1 欧洲红豆杉愈伤组织的继代过程

Fig. 1 The subculture process of the callus from *Taxus baccata*

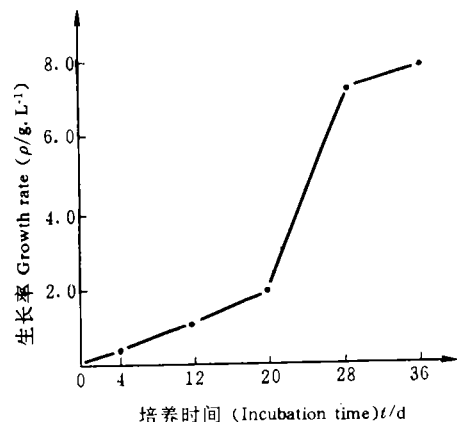


图 2 欧洲红豆杉愈伤组织的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of the callus from *Taxus baccata*

2.4 有机添加物对愈伤组织生长的影响

上面已提及,培养基中添加适宜浓度的有机添加物可以提高愈伤组织的诱导率. 同样,培养基中附加 CM、水解酪蛋白(CA)(0.1%)等有机添加物也可使欧洲红豆杉的愈伤组织生长得更快,并且可以使愈伤组织保持更长时间的旺盛生长. 其中椰子汁的效果比水解酪蛋白的效果更好,愈伤组织生长率分别达到 $0.27 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $0.24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 分别比对照($0.22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)增加 22.7% 和 9.1%.

2.5 欧洲红豆杉细胞悬浮培养的初步研究

在细胞悬浮培养中,欧洲红豆杉的悬浮培养细胞生长较好,细胞分散程度亦较好,可见的新生细胞较多,培养基颜色较浅. 悬浮培养的细胞生长率已达 $0.35\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

与愈伤组织培养的相比,细胞悬浮培养的生长周期略短,约为 30 d. 主要是培养细胞的生长延缓期减短,为 10 d 左右;d 15~25 进入细胞生长的指数生长及对数生长周期;此后进入稳定期. 但与愈伤组织不同,在稳定期之后,细胞并不很快死亡,可一直生长到大约 40 d 左右.

对继代培养的基本培养基(B5 + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KT)进行的 2,4-D 浓度调节试验结果见表 1.

表 1 不同 $\rho(2,4\text{-D})$ 对欧洲红豆杉细胞悬浮培养的影响

Table 1 The effect of different concentrations of 2,4-D on cell suspension culture of *Taxus baccata*

$\rho(2,4\text{-D})/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
细胞生长速率 Cell growth rate($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	0.282	0.348	0.350	0.378	0.356	0.360

从表 1 可以看出,对细胞生长较适的 $\rho(2,4\text{-D})$ 在 1.0~3.0 mg/L 之间,低于此浓度范围,细胞生长明显下降. 试验中还发现,激素浓度低时,分泌到培养基的色素较多,从深黄色至浅棕色不等;收获的培养物颜色亦较深. 随着激素浓度升高,培养基颜色转淡,收获的培养物颜色亦较浅.

从降低生产成本出发,我们选择的 $\rho(2,4\text{-D})$ 为 1.0~2.0 mg/L.

另外,试验还发现,悬浮培养基中最适的蔗糖浓度可降低至 20 g/L,与文献报道的结果相似^[6]. CA、CM 对培养细胞的影响与愈伤组织的试验结果相近. 培养细胞的培养温度降低至 20℃ 时,细胞的生长并不降低.

2.6 培养细胞中紫杉醇的含量测定

经 HPLC 分析结果表明,欧洲红豆杉的愈伤组织和悬浮培养细胞均有合成紫杉醇的能力(见图 3),含量分别为 0.0031% 和 0.017% (其中,液体培养基中的含量为 0.007%,悬浮细胞中的含量为 0.01%). 紫杉醇在悬浮培养细胞中的含量要比在愈伤组织中的高得多. 但是紫杉醇在培养细胞中的含量还是比较低的,因此在今后的试验中,应以提高紫杉醇的含量为主要目标. 改变培养条件、加入合成前体、筛选高产细胞株等措施都有可能使培养细胞的紫杉醇含量提高^[9].

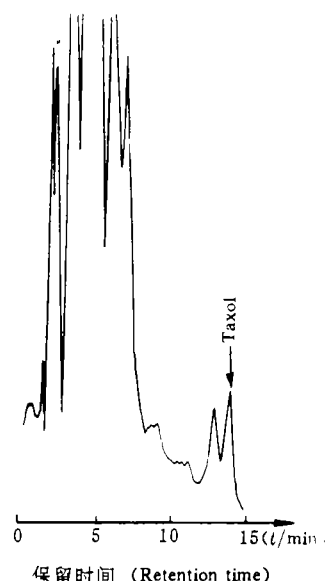


图 3 欧洲红豆杉培养细胞中紫杉醇的高效液相色谱图

ig. 3 The HPLC chromatogram of taxol in the culture cells from *Taxus baccata*

参 考 文 献

- 1 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志. 第1版. 北京: 科学出版社, 1978. 7: 438~448
- 2 Scrip. 1993, 1783~1784: 27
- 3 Vidensek N, Lim P, Campbell A *et al.* Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig and seedling from several *Taxus* species. *J Nat Prod.* 1990, 53: 1609~1610
- 4 Nicolaou KC, Yang Z, Liu J J *et al.* Total synthesis of taxol. *Nature.* 1994, 367: 630~634
- 5 陈毓享, 程克棣. 近年来国外紫杉醇资源研究进展. 国外医学药学分册. 1994, 21: 36~39
- 6 Fett-Neto AG, DiCosmo F, Reynolds WF *et al.* Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. *Bio/Technology.* 1992, 10: 1572~1575
- 7 Gibson DM, Ketchum REB, Vance NC *et al.* Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific yew). *Plant Cell Reports,* 1993, 12: 479~485
- 8 Ma W, Park GL, Gomez GA *et al.* New bioactive taxoids from cell cultures of *Taxus baccata*. *J Nat Prod.* 1994, 57: 116~122
- 9 甘炳远, 郑光植. 红豆杉的细胞工程学研究进展. 国外医药植物药分册. 1994, 9: 156~159
- 10 Wani MC, Taylor MC, Wall ME *et al.* Plant antitumor agents, VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc.* 1971, 93: 2325~2327
- 11 陈未名, 张佩玲, 吴 斌等. 云南红豆杉抗肿瘤活性成分的研究. 药学报. 1991, 26: 747~754

欢迎投稿、订阅《生理学报》

《生理学报》= *Acta Physiologica Sinica* 1927 年创刊 双月刊

国内统一刊号: CN 31-1352/Q 国内发行: 全国各地邮电局 国内出发代号: 4-157

国外代号: BM-73 国外发行: 中国国际图书贸易总公司(中国国际书店)北京 399

信箱

广告经营许可证: (徐)工商广临字 95-018 号 国内定价: 14.80 元(1997)

《生理学报》由杨雄里院士任主编, 中国科学院上海生理研究所主办, 科学出版社出版。

《生理学报》是中国自然科学核心期刊, 主要刊登生理学及其邻近学科有关方向的研究论文, 兼登研究简报, 酌登实验技术和方法, 以及以本人研究工作为主的简要综述。刊物内容丰富翔实, 能及时反映我国生理科学最新研究水平。已被选入 SCT, CA, BA 等国际检索系统。1992 年荣获全国优秀科技期刊二等奖。

从 1997 年起, 《生理学报》同时刊登中文、英文稿件。欢迎广大生理科学研究者、大专医学院校师生踊跃投稿并订阅《生理学报》。欢迎各有关厂商在《生理学报》上刊登广告。来稿来件请邮寄: 210031 上海岳阳路 320 号中国科学院上海生理研究所《生理学报》编辑部。