

长春花细胞培养与吲哚生物碱的生产

周立刚 郑光植

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

摘要 本文简要介绍长春花细胞培养与吲哚生物碱生产的研究概况,包括培养方法、培养系统、分析方法、培养条件的影响、高产细胞系的筛选和保存、生物碱的生物合成等方面。以求对我国的细胞培养工业化生产药用成分的研究有所借鉴。

关键词 长春花, 细胞培养, 吲哚生物碱

长春花(*Catharanthus roseus*)是中
医要药之一。具有镇静安神,平肝降压,
能治肺癌、以及各种恶性肿瘤等^[1]。现
代医学认为^[1,2],从长春花中提取的长
春花碱(Vinblastine)和长春新碱(Vi-
ncristine)能有效地抗白血病,阿吗碱
(Aimalicine)能抗高血压,与利血平
(Reserpine)和蛇根碱(Serpentine)
混合使用时,具有明显的止痛效果。

国内外近年来的研究很活跃,先后从
长春花的不同部位分离出100多种吲哚类
生物碱,且大部分具有生理活性。这些生
物碱在植物体内的含量甚微,人们企图采
用化学合成和半合成的方法人工生产生物
碱^[3,4],但结果不尽人意。

鉴于长春花供不应求以及栽培技术上的
困难,促使许多研究者开展了长春花组
织和细胞培养工业化生产生物碱的研究。
通过优良细胞株的筛选,一些生物碱的含
量超过了原植物。本文拟就此方面的研究
进展作一综述。

一、培养方法

长春花细胞培养在培养规模上通常分
为愈伤组织培养、细胞悬浮培养、细胞大
规模发酵培养。长春花愈伤组织培养的方
法生产生物碱在理论上是可行的,但采用
的固体静止培养,细胞繁殖速率低、培养
时期长、培养规模小,从而不适宜于大规
模的工业化生产。

常常采用悬浮培养来进行长春花细胞
培养的环境条件优化的研究,即确定长春
花培养细胞适宜的生长参数和适宜的产物
形成条件。对生物碱的代谢调控、细胞生
长与生物碱合成的关系、以及悬浮培养细
胞的生长动力学等进行了一系列的研究^[5,6,7,8]。为了使生物碱的产量提高,
任务仍相当艰巨。

细胞大规模发酵培养由于具有体积
大、易于通气、易于搅拌、能进行各种操
作等优点,因而能适宜于长春花细胞培养

工业化生产生物碱的要求。关于长春花细胞发酵培养的研究已进行了一系列的研究^[9,10,11,12,13],培养规模达5000升^[9],采用的发酵罐(或称反应器),有气升式、搅拌式等。每种方法都有优缺点,如采用气升式培养,高通气速率会对细胞生长呈现抑制效应^[11,12],培养液的粘性和细胞易聚集成团等,使培养规模难于放大;采用搅拌式培养,由于细胞的抗切变能力差,常常因强有力的搅拌而破裂,培养液到后期会变成异质性而形成不运动的死角等。

除了正常的细胞培养外,近年来还进行了长春花的器官培养。如Davioud等报道了^[14]采用20升发酵罐培养长春花的毛状根(毛状根生长比悬浮细胞更快),培养5周后生物碱含量最高,并从中分离出17种生物碱,其中5种为新的化合物。

二、培养系统

早期的长春花细胞培养为批式培养(或称一步法培养),批式培养的生物碱含量往往很低,这主要是由于细胞生长和生物碱生产要求的培养条件(主要是培养基成分)不同。

目前,逐步采用步法培养系统^[15,16,17,18],通过改进营养成分和激素的组成,先使细胞在生长培养基上迅速增殖,然后转入生产培养基中大规模合成生物碱,但采用两步培养法使培养成本相对增加,同时也增加了污染的可能性。

研究发现^[19],长春花培养细胞中的生物碱也能外渗到培养液中,这样促使人们采用细胞固定化培养技术来培养长春花细胞。细胞固定包埋在胶质中,生长缓慢,有利于生物碱的积累,并延长了细胞的培养时间,同时生物碱也易于收集。采

用此技术,同时加入前体和诱导剂将可能发展成为连续的工业化生产程序,从而使成本大大降低。有人应用培养液的pH梯度的变化^[20]和增大培养液的渗透压^[21]来促使胞内生物碱的胞外释放,Asada等^[19]将*Phytophthora cactorum*的培养物灭菌后作为诱导剂加入到长春花细胞培养液中,可诱导阿吗碱的生产,同时加入大网状树脂(Amberlite XAD-7)促使阿吗碱从胞内释放到胞外,经过23天的培养后,培养液中阿吗碱含量为90mg/L,而对照组仅为2mg/l。研究表明^[22,23],长春花细胞培养物较理想的包埋材料为藻酸钙,用这种材料包埋的细胞显示出稳定的生活力和生物合成能力。

三、分析方法

长春花细胞培养生产吲哚生物碱需要稳定而又高产的细胞系,而细胞系的筛选、培养条件的优化要求有一个适宜的评价方法即生物碱的分离测定。要求使用该法不仅灵敏度高、专一性强,而且能对较大数目的样品进行快速分析。

以前,长春花细胞培养物和植物体内的生物碱含量,常采用薄层层析进行定量和定性测定^[24],该方法的缺点是需要样品的预处理、测定的灵敏度低、测定速度也慢。取而代之的高效液相色谱和气相色谱法测定生物碱含量,使得测定灵敏度和测定速度大为提高,但仍需要样品的预处理。现在用得较多的是放射免疫测定(RIA)和酶连免疫测定(ELISA)技术^[5,25,26],使得生物碱在毫微摩尔浓度范围内就能准确地测定出来,样品也不需预处理,使得分离和测定步骤大为简化,一个人能在一天内能将几百个粗提物样品进行定量测定。这一方法已成功地应

用于大规模的克隆筛选模式中。但由于RIA和ELISA方法所用的仪器设备较为昂贵,故暂时尚未广泛普及,相信今后会作为常规分析方法用于生物碱的测定。

此外,由于阿吗碱和蛇根碱这类化合物具有荧光活性,故可采用荧光检测,该方法非常有效^[5],但荧光检测目前还很难给出定量的信息,因此荧光检测技术还有待于进一步改进。

四、培养条件的影响

长春花细胞培养与吲哚生物碱的生产,既受内部因素(遗传、变异)的控制,又受外部培养条件的影响。现仅就培养条件的影响作一简单的讨论。

1. 培养基成分

碳源 碳源既是细胞生长所需又是生物碱合成所需,典型的碳源为蔗糖和葡萄糖。蔗糖在细胞内酶解为葡萄糖和果糖,而葡萄糖可直接为细胞所利用。研究发现^[27,28],在富含蔗糖的培养基中,长春花细胞衰老速度减慢、死亡率降低、前体物质色氨酸含量迅速下降、色氨酸脱羧酶活性增加,从而明显地促进生物碱的合成。此外,蔗糖含量的变化还能影响培养细胞对其它活性成分的利用,以及培养液的渗透压等。

氮源 对长春花培养细胞来说,氮源的加入常常促进了细胞的生长而抑制了生物碱的合成^[28,29],氮源对培养细胞的影响不能与碳源分开来考虑。因此,研究过程中既要考虑氮的含量水平,又要考虑氮/碳的比例。氮源一般为硝酸盐和铵盐,其它氮源如氨基酸也能为细胞所利用。

磷源 研究表明^[30],促进长春花细胞生长的磷,对吲哚生物碱合成往往呈现

抑制效应。当培养液中磷的含量低于某一临界值时,细胞内才会大量地合成生物碱。Li等^[31]报道,磷酸盐还能强烈地促进长春花细胞对糖的转运和糖代谢的活性。

生长调节剂 植物生长调节剂不仅影响细胞的生长、分化,还影响生物碱的合成,且调节剂的种类、浓度不同,影响差别很大。研究表明^[5,32],2,4-D和NAA能促进细胞生长,而强烈地抑制生物碱的合成。仅加入BA时,细胞产量下降,但能诱导生物碱的合成,加入IAA既促进细胞生长又促进生物碱的合成。以上结果表明,可以采用两步培养法,先在含生长素的培养基中让细胞大量地增殖,然后转入含BA的培养基中使细胞大规模合成生物碱。

pH 研究表明^[33],培养液的pH值变化对细胞生长影响不大,但能影响生物碱的合成,pH值影响生物碱的合成机理尚不明了。此外,在培养液和胞内液泡间形成pH梯度,有利于生物碱的胞外释放^[20]。

除了上述提到的各因子外,培养基中的其它成分如维生素、微量元素等,在细胞生长和生物碱的生产方面可能起到重要的作用,因此,实验有待于深入进行下去,以便获得一个最佳的培养基组成。

2. 前体

在长春花细胞培养过程中,加入生物碱合成过程中的前体,有可能增加最终产物生物碱的产量。由于长春花生物碱的合成途径比较复杂,因此前体加入的影响有时并不十分明显。如Naudascher等^[34,35]在细胞培养过程中加入前体物马钱子甙(Loganin)和环马钱子甙(Secologanin),培养一段时间后,发现它们浓度均已降低,但未见生物碱含量的明

显变化。Merillon等^[36]在培养基中加入马钱子甙和环马钱子甙却明显地增加了生物碱的含量。造成结果不一致的原因,可能是各自所用细胞株不同以及培养的其它条件不同所致。Deus等^[37]报道,培养液中加入色胺(Tryptamine)和色氨酸(Tryptophan),能不同程度地刺激生物碱的生产。

3. 光照

光对长春花的细胞生长和生物碱的生长均有影响。研究表明,光照能明显地促进长春花细胞中花色甙(Anthocyanin)的形成^[29,38],对蛇根碱^[29,39]和泻花碱(Catharanthine)^[30]的形成也有促进作用。在黑暗下培养,阿吗碱的含量要比蛇根碱高^[28,30]。关于光照对其生物碱合成影响的机理还有待于进一步研究。

4. 温度

不同温度,对培养细胞生长和生物碱的生产影响是不同的,研究表明^[40,41],温度40—45℃以上,细胞死亡;低10℃,细胞能生存但不能生长;27—35℃时,细胞生长基本上保持恒定;35℃时,细胞生长最快。

5. 空气

空气中的氧气为细胞呼吸所必需。研究表明,当氧气充足时,培养基中的碳源能够被充分地利用,当限制氧供应时,生长明显减慢^[42]。空气中二氧化碳含量水平对培养结果的影响不大^[43]。

五、高产细胞系的筛选和保存

在长春花细胞培养工业化生产有价值的生物碱之前,令人乏味的高产细胞系的筛选工作是非常必要的。

众所周知,单个的植物细胞其生理学特性并不完全一样,如产生色素的细胞团,其产生色素的细胞与不产生色素的细胞分布是混杂的。故早期采用的愈伤组织或小细胞团进行高产细胞系的筛选应该得到改进,而代之以单细胞克隆筛选程序,因此测定单个细胞中痕量生物碱技术而成为关键,由于高灵敏度的快速测定技术(RIA和ELISA)的建立,使得长春花高产细胞系的筛选进入一个新的水平^[44]。

筛选程序开始于愈伤组织和悬浮培养细胞并要求这些亲本细胞的生物碱含量比较高,为了使筛选的各细胞克隆能进行比较,实验条件应保持高度的一致性。筛选后的高产细胞系,其优良性状并不能按我们的要求长久地保存下来。研究表明^[6],筛选后的细胞系其生物碱类型和含量是常常在变的。目前,还很难解释这种细胞变异的原因,或许是细胞内染色体的畸变^[45]。

为了保存高产细胞系的优良性状,我们可以对细胞进行重复筛选,使其优良性状保存下来,但这并非理想的办法。冰冻贮藏法也许能使细胞系的优良性状保存下来,研究表明^[46,47],冰冻技术同样能引起长春花细胞系的变异和生物碱合成能力的丧失。因此,冰冻技术应用前必须进行较为深入的研究。

总之,如果没有长春花优良细胞系的筛选和保存,细胞培养工业化生产生物碱几乎是不可能的。

六、生物合成

长春花细胞培养物中生物碱类型有两种,即具一个吲哚环的生物碱和具两个吲

啉环的二聚体生物碱, 培养细胞中含量最多的是具一个吡啉环的生物碱, 有的仅存于培养细胞中, 这说明培养细胞的酶系统和环境条件与整体植物是不相同的, 从而导致某些合成途径受阻, 某些合成途径增加, 而出现许多新的化合物。

以前, 吡啉生物碱的合成途径是采用整体植物进行同位素示踪研究, 但此法具有许多缺点^[48], 所加入的前体注入植物体后, 浓度变得很低, 不是被体内酶系统降解, 就是转为其它化合物, 渗入到目的化合物中去的机会很少, 往往导致实验的失败。由于长春花细胞培养系统的建立, 加之配备了快速而又灵敏的分析测定方法, 使得生物碱的生物合成研究成为可能。

共同意见认为^[48,49], 培养细胞内吡啉生物碱合成的第一步是色胺和环马钱子甙通过Strictosidine合成酶的立体专一性聚合成Strictosidine。后来Zenk^[50]已分离纯化了此酶, 并证实了它的生物合成作用。下一步是Strictosidine的脱糖基水解反应, 经过一系列的步骤后生成阿吗碱和四氢鸭木脚碱(Tetrahydroalastanine)等, 其具体步骤还不太清楚。

Fahn等^[51]发现, 17-O-脱乙酰文朵碱通过17-O-乙酰转移酶生成文朵灵(Vindoline), 而文朵灵被认为是二聚体生物碱合成过程中较为直接的前体。色氨酸脱羧酶是吡啉生物碱合成过程中的一个重要酶, Pennings等^[52]从长春花细胞培养物中分离、纯化了该酶, 证明其由两个亚基组成, 并对其理化特性进行了详细的研究。

生物碱生物合成途径中, 最为重要的是两个吡啉生物碱的偶合反应。Stuart等^[53]向培养细胞饲喂文朵灵和泻花碱,

二者在细胞内迅速偶合为3', 4'-脱水长春花碱(3'4'-anhydrovinblastine), 3', 4'-脱水长春花碱的形成, 是二聚体生物碱生物合成过程中的一个重要的中间步骤。细胞内合成长春花碱和长春新碱较为直接的前体可能就是文朵灵和泻花碱。

总之, 吡啉生物碱的生物合成步骤相当复杂, 在这个领域还有许多工作要做。

七、问题和展望

近年来, 由于细胞培养技术进展很快, 长春花细胞培养与生物碱生产的研究已取得了可喜的成就。但还存在一些问题, 主要是培养物中有效的药用成分含量较低, 细胞培养技术上还有待改进。鉴于长春花的应用范围日益扩大, 业已引起国内同行们的注意, 我国的长春花细胞培养法生产生物碱的研究才刚刚开始。相信, 长春花细胞大量培养工业化生产特效药物吡啉生物碱, 将成为最经济有效的来源。

参 考 文 献

- [1] 江苏新医学院编, 中药大辞典上册, 上海人民出版社; 1977: 456-57
- [2] Deconti RC and Creasey WA. In: Taylor WI, et al. eds. The Catharanthus Alkaloids. Marcel Dekker, 1975: 237-40
- [3] Potier P. J Nat Prod, 1980; 43: 72
- [4] Lounasmaa M and Nemes A. Tetrahedron 1982; 38: 223
- [5] Zenk MH, et al. In: Barz W, et al. eds. Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Applications. Springer-Verlag,

- Berlin and New York, 1977; 27-43
- [6] Kurz WGW, et al. *Phytochemistry* 1980; 19: 2583
- [7] Kurz WGW, et al. *Planta Medica* 1981; 42: 22
- [8] Drapeau D, et al. *Biotechnol Bioeng* 1986; 28: 1555
- [9] Ohnishi N, et al. *Physiologia Plantarum* 1990; 80: 95
- [10] Schiel O, et al. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1987; 8:153
- [11] Smart NJ, et al. *Appl Biochem Biotechnol* 1984; 9: 209
- [12] Hegarty PK, et al. *J Exp Bot* 1986; 37: 1911
- [13] Scragg AH, et al. *Enzyme Microb Technol* 1989; 11: 329
- [14] Davioud E, et al. *Phytochemistry* 1989; 28: 2675
- [15] Eilert U, et al. *Arch Biochem Biophys* 1987; 254: 491
- [16] Eilert U, et al. *J Plant Physiol* 1986; 126: 11
- [17] Smith JI, et al. *Plant Cell Reports* 1987; 6: 142
- [18] Smith JI, et al. *J Exp Bot* 1987; 38: 1501
- [19] Asada M, et al. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989; 30: 475
- [20] Bouyssou H, et al. *Plant Cell Tissue Org Cult* 1987; 10: 91
- [21] Brodelius P, et al. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 1983; 17: 275
- [22] Majerus F, et al. *Plant Cell Reports* 1986; 5: 302
- [23] Majerus F, et al. *Biotechnol Lett* 1986; 8: 863
- [24] Farnsworth NR, et al. *J Nat Prod* 1964; 27: 302
- [25] Lapinjoki SH, et al. *Planta Medica* 1987; 53: 565
- [26] Deus-Neumann B, et al. *Planta Medica* 1987; 53: 184
- [27] Merillon JM, et al. *Planta Medica* 1984; 50: 497
- [28] Knobloch KH, et al. *Z Naturforsch* 1980; 35c: 551
- [29] Knobloch KH, et al. *Phytochemistry* 1982; 21: 591
- [30] Drapeau D, et al. *Planta Medica* 1987; 53: 373
- [31] LiXN, et al. *Ann Bot* 1989; 64: 33
- [32] Morris P. *Planta Medica* 1986; 52: 121
- [33] Kutney JP, et al. *Helv Chim Acta* 1981; 64: 1837
- [34] Naudascher F, et al. *J Plant Physiol* 1989; 134: 608
- [35] Naudascher F, et al. *J Plant Physiol* 1989; 135: 366
- [36] Merillon JM, et al. *Plant Cell Reports* 1986; 5: 23
- [37] Deus B, et al. *Biotechnol Bioeng* 1982; 24: 1965
- [38] Carew DP, et al. *Phytochemistry* 1976; 15: 442
- [39] Doller G, et al. *Planta Medica* 1976; 30: 14
- [40] Morris P, et al. *Plant Cell Reports* 1986; 5: 427
- [41] Courtois D, et al. *Plant Sci-*

- ence Lett 1980; 17: 473
- [42] Pareilleux A, et al. J Ferment Technol 1983; 61: 429
- [43] Maurel B, et al. Biotechnol Lett 1985; 7: 313
- [44] Huhtikangas A, et al. Planta Medica 1987; 53: 85
- [45] Deus-Neumann B, et al. Planta Medica 1984; 50: 427
- [46] Chen THH, et al. Plant Physiol 1984; 75: 720
- [47] Chen THH, et al. Plant Physiol 1984; 75: 726
- [48] Stockigt J and Zenk MH. J C S Chem Commun 1977; 646
- [49] Scott AI, et al. Heterocycles 1977; 7: 979
- [50] Zenk MH, J Nat Prod 1980; 43: 438
- [51] Fahn W and Stockigt J. Plant Cell Reports 1990; 8: 613
- [52] Pennings EJM, et al. J Chromatography 1989; 483: 311
- [53] Stuart KL, et al. Heterocycles 1978; 9: 1419

CATHARANTHUS ROSEUS CELL CULTURE AND INDOLE ALKALOID PRODUCTION

Zhou Ligang, Zheng Guangzhi

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

Abstract

This paper reviews briefly the progress of *Catharanthus roseus* cell culture and indole alkaloid production including culture methods, culture systems, analytical methods, effects of culture conditions, selection and keeping of high yielding cell lines, biosynthesis of alkaloids, and etc. It will help us to produce medicines by using large scale cell culture method.

Key words *Catharanthus roseus*, cell culture, indole alkaloid