

红豆杉细胞培养生产紫杉醇产量稳定性的探讨

余龙江, 蔡永君, 兰文智

(华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北武汉 430074)

摘要: 通过磷酸盐双饥饿和秋水仙碱这两种经典的同步化方法处理悬浮培养的红豆杉细胞, 以实现培养物的均一性, 并比较了同步化与非同步化细胞及不同同步化方法处理的细胞紫杉醇产量。结果表明, 不同同步化方法处理的细胞紫杉醇产量有差异; 秋水仙碱同步处理处于中期的细胞紫杉醇产量高于非同步化细胞, 而磷酸盐双饥饿同步处理处于间期的细胞紫杉醇产量则相反。这表明紫杉醇产量与培养物的均一性有关, 且与细胞同步的周期时相有关, 采用同步化方法来选择合适的细胞周期时相有利于紫杉醇产量的稳定, 通过比较不同同步化方法处理对细胞生物量和 POD 活性的影响进一步探讨紫杉醇产量产生差异的原因。

关键词: 红豆杉细胞; 紫杉醇; 同步化处理; 诱导子

中图分类号: Q942.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)01-0085-04

Research on the stability of taxol yield of *Taxus chinensis* suspension cultures

YU Long-jiang, CAI Yong-jun, LAN Wen-zhi

(School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Two classical synchronization methods, double phosphate starvation and colchicines, were adopted to realize homogeneity of *Taxus chinensis* suspension cultures, and the taxol yields of cells treated with these different methods were compared. The results showed that different synchronization methods resulted in different taxol yields. After being treated with colchicine, cells at metaphase had higher taxol yield than that of asynchronous cells, however, after being treated with double phosphate starvation, cells at G1 phase had the contrary result. That indicated that taxol yield had relativity with the homogeneity of culture cells, and also had close relativity with cell cycle phase. Therefore, to select suitable cell cycle phase by use of synchronization methods is important for stable taxol production. In addition the effects of different synchronization methods on the biomass and POD activity were investigated to analyze the reasons for difference of taxol yield.

Key words: *Taxus chinensis* cell; taxol; synchronization treatment; elicitor

红豆杉细胞培养生产紫杉醇是近几年研究的热点, 但目前研究中普遍存在紫杉醇产量不稳定性问题^[1]。诱导作用虽然可以大幅度提高紫杉醇产量^[2], 但我们实验室在长期研究中发现该方法所

得到紫杉醇高产量也是不稳定的。我们报道过在红豆杉细胞继代过程中染色体变异, 细胞发生多核现象, 但仍具有很好的紫杉醇合成能力^[3]。可见, 紫杉醇产量的不稳定性, 不是紫杉醇合成基因的丢失,

收稿日期: 2001-03-22

作者简介: 余龙江(1966-), 男, 湖北黄冈人, 博士, 教授, 从事生物技术领域的科研和教学工作。

基金项目: "九五"国家重点科技攻关项目(96-C02-03-01); "八六三"国家重点项目(102-12-06-01); 2000年教育部骨干青年教师基金资助项目。

而是与细胞本身所处的生理生化状态有关,特别与培养物的均一性有关,因为培养过程中各个植物细胞参与细胞周期的进程是不一致的,本文通过两种经典的同步化方法对细胞进行处理,使培养物尽可能处于同一生理生化状态,以探讨培养物的均一性与紫杉醇生物合成稳定性的关系,为红豆杉细胞培养生产紫杉醇产量稳定性提供新的依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料与培养条件

以本实验室继代培养,分散性良好,同一来源的红豆杉(*Taxus chinensis*)细胞为实验材料。生长培养基为本实验室配制的 62² 培养基,含水解乳蛋白 0.2 g/L,蔗糖 30 g/L,2,4-D 0.1 mg/L,6-BA 0.5 mg/L,NAA 0.5 mg/L,pH 为 5.8;生产培养基为本实验室配置的 YPC 培养基,含蔗糖 40 g/L,NAA 0.5 mg/L,6-BA 0.5 mg/L。所有实验均采用 250 mL 三角瓶,装液量 100 mL,接种量 100 g/L,摇床转速为 120~130 rpm,培养温度为 24±1 °C,暗培养。

1.2 真菌诱导子的制备

真菌诱导子的制备参照文献[2]。

1.3 悬浮培养红豆杉细胞的同步化处理方法

1.3.1 磷酸盐双饥饿处理(double phosphate starvation treatment,简称 PS) 参照文献[4]略有改动,将在 YPC 培养基中培养至第 8 天的细胞转入 YPC 缺磷培养基对细胞进行磷酸盐双饥饿处理,处理完毕再转入新鲜的 YPC 完全培养基。

1.3.2 秋水仙碱处理(colchicine treatment,简称 CC) 参照文献[5]略有改动,将在 YPC 培养基中培养至第 8 天的细胞转入含秋水仙碱 0.02% 的 YPC 新鲜培养基中,处理 5 h 后用不含秋水仙碱的 YPC 新鲜培养基将残留的秋水仙碱洗掉(洗 3 次),再转入新鲜的 YPC 正常培养基中。秋水仙碱过滤灭菌后使用。

1.4 诱导作用实验

以同步化处理后继续恢复培养 24 h 的细胞做实验组,以在 YPC 培养基中培养至第 8 天无同步化处理的细胞作为对照组,将制备好的真菌诱导子按 100 mg/L 与茉莉酸甲酯 100 μM 作为诱导子进行联合诱导作用实验。

1.5 细胞内紫杉醇含量的测定

诱导作用实验后第 8 天分别取样,细胞内紫杉醇含量的测定参照文献[6]。

1.6 过氧化物酶(POD)酶液的提取及活性测定

同步化处理后及诱导作用实验后第 24 h 分别取样测酶活,细胞经抽滤后用磷酸缓冲液(0.05 M, pH 5.5)按 1:2(w/v,细胞鲜重/缓冲液体积)提取 POD;冰浴匀浆,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为粗酶液;酶活测定参照殷俊^[7] 等的方 法,以愈创木酚和 H₂O₂ 为底物,以每分钟 ΔA₄₇₅ 变化 0.01 为一个酶活单位(U)。

1.7 细胞重量的测定

接种时,细胞鲜重(g/FW)是用布氏漏斗减压抽滤细胞培养物,在无菌条件下称取;将接种时及诱导作用实验后第 8 天收获的鲜细胞分别放置在 60 °C 烘箱中烘至恒重,为细胞的干重(g)。生物量(g)=收获细胞的干重(g)-接种时细胞的干重(g)。

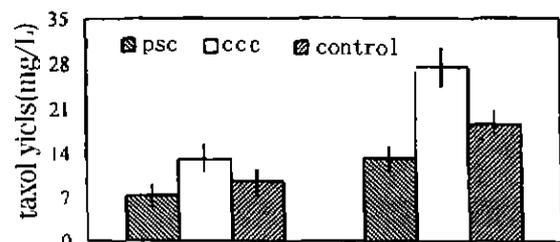


图 1 悬浮培养红豆杉细胞紫杉醇产量的变化

Fig. 1 Changes of taxol yield of *Taxus chinensis* suspension cultures

st 为同步化处理;se 为同步化后加诱导子;PSC 表示磷酸盐双饥饿同步处理的细胞;CCC 表示秋水仙碱同步处理的细胞;control 表示无同步化处理的细胞。
st, synchronization treatments; se, elicitor added after synchronization treatments; PSC, cells treated with double phosphate starvation; CCC, cells treated with colchicine; control, cells without synchronization treatment.

2 实验结果与讨论

2.1 悬浮培养红豆杉细胞紫杉醇产量的变化

由图 1 可看出,同步化与非同步化细胞的紫杉醇产量明显不同,而且不同同步化方法处理得到的紫杉醇产量亦不同。与非同步化细胞相比,磷酸盐双饥饿处理的细胞紫杉醇产量较低,而秋水仙碱处理的细胞紫杉醇产量较高;诱导后,3 种细胞紫杉醇产量均有增加,但增加幅度不同。磷酸盐双饥饿处理的细胞紫杉醇产量为 13 mg/L,是原来的 1.8 倍;

非同步化细胞紫杉醇产量为 19 mg/L, 是原来的 2.0 倍; 而秋水仙碱处理的细胞紫杉醇产量达 28 mg/L, 是原来的 2.2 倍。

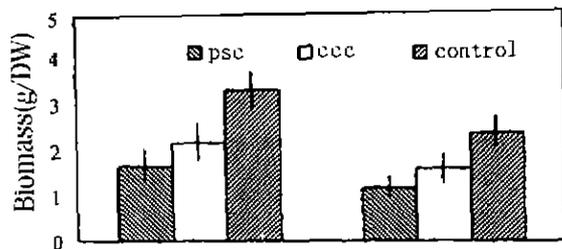


图 2 悬浮培养红豆杉细胞生物量的变化

Fig. 2 Changes of biomass of *Taxus chinensis* suspension cultures

st 为同步化处理; se 为同步化后加诱导子; PSC 表示磷酸盐双饥饿同步处理的细胞; CCC 表示秋水仙碱同步处理的细胞; control 表示无同步化处理的细胞。

st, synchronization treatments; se, elicitor added after synchronization treatments; PSC, cells treated with double phosphate starvation; CCC, cells treated with colchicine; control, cells without synchronization treatment.

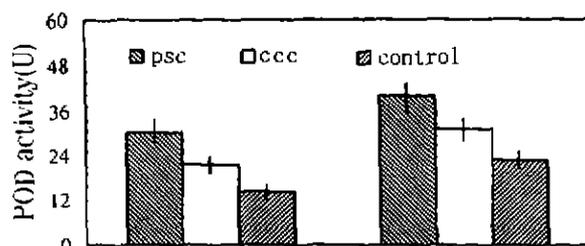


图 3 悬浮培养红豆杉细胞 POD 活性的变化

Fig. 3 Changes of POD activity of *Taxus chinensis* suspension cultures

st 为同步化处理; se 为同步化后加诱导子; PSC 表示磷酸盐双饥饿同步处理的细胞; CCC 表示秋水仙碱同步处理的细胞; control 表示无同步化处理的细胞。

st, synchronization treatments; se, elicitor added after synchronization treatments; PSC, cells treated with double phosphate starvation; CCC, cells treated with colchicine; control, cells without synchronization treatment.

这首先表明细胞紫杉醇产量与培养物均一性有关, 且与同步处理后细胞同步的周期时相密切相关。磷酸盐饥饿处理使细胞处于静止期, 转入新鲜的完全培养基后细胞可同步化地进入 G₁ 期^[4], 而秋水仙碱为纺锤体阻抑物, 可将细胞阻止在有丝分裂中期^[5]。所以这两种同步化方法处理的细胞转入新鲜培养基后, 培养细胞所处的周期时相不同, 即细胞所处的均一性状态不同。而无同步化处理的细胞培养物中处于各时相的细胞是随机变化的, 则紫杉醇产量亦随之发生变化, 从而可能导致紫杉醇产

量的不稳定性。其次, 诱导作用后紫杉醇产量都明显升高, 表明同步化处理与诱导子协同作用能进一步提高紫杉醇含量。因此, 采用同步化方法处理细胞以选择合适的细胞周期时相相对诱导紫杉醇稳定合成具有重要意义。

2.2 悬浮培养红豆杉细胞生物量的变化

图 2 显示同步化处理后, 在诱导前, 细胞生物量均低于对照, 磷酸盐饥饿处理的细胞生物量最低, 分别为秋水仙碱处理的细胞和对照组生物量的 3/4 和 1/2; 而诱导后, 包括对照组, 其细胞生物量进一步降低, 但与诱导前大小趋势相同。说明同步化处理及诱导作用都对细胞具有损害作用, 且磷酸盐双饥饿处理对细胞的损害程度大于秋水仙碱处理。

2.3 悬浮培养红豆杉细胞 POD 活性的变化

图 3 显示了不同同步化处理的细胞其 POD 活性是不同的。其中磷酸盐双饥饿处理的细胞 POD 活性大于秋水仙碱处理的细胞; 加入诱导子后 POD 活性都有所上升, 而且 POD 活性大小趋势与诱导前相同。

植物中 POD 参与多种生理生化过程, 是植物抗氧化系统中一种重要的酶, 参与对病原的防御及对胁迫的反应等^[6], 因此可作为植物细胞响应外界不良环境的一个指标。Logemann^[7]等研究发现防御基因的激活与细胞周期相关基因的表达具有相同的信号传导途径。由图 3 可看出不同同步化方法处理处于不同细胞周期时相的细胞, 其 POD 活性亦不同, 这表明 POD 基因的激活可能与细胞所处的周期时相相关。而且由图 2、3 可看出, POD 活性高则细胞生物量低。POD 活性升高与细胞质膜过氧化有关, 而质膜过氧化对细胞有损害, 从而导致细胞生物量下降。磷酸盐饥饿处理引起 POD 活性升高过度, 导致生物量明显下降, 从而影响紫杉醇产量。

参考文献:

- [1] Mondher Jaziri, Abdesslam Zhiri, Yan-Wen Guo, et al. *Taxus* sp. Cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production; a literature survey[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, 46: 59-75.
- [2] 鲁明波, 苏湘鄂, 梅兴国. 真菌诱导物对红豆杉细胞的影响[J]. *华中理工大学学报*, 1998, 26(7): 107-109.

- [3] 余龙江, 张长河, 梅兴国, 等. 红豆杉离体培养染色体数变异与细胞多核现象[J]. 华中理工大学学报, 1998, 26(4): 100-102.
- [4] Shin-ichi Amino, Tatsuhito Fujimura, Atsushi Komamine. Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of *Catharanthus roseus* [J]. *Physiol. Plant.*, 1983, 59: 393-396.
- [5] 张自立, 俞新大. 植物细胞和体细胞遗传学技术与原理[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [6] 余龙江, 李 为, 刘幸福, 等. 担子菌及其木质素降解液在红豆杉细胞培养中的作用[J]. 西北植物学报, 2000, 20(6): 992-996.
- [7] 殷 俊, 刘 超, 管培珠, 等. 纤维素酶降解人参细胞胞壁产生的激发子诱导人参培养细胞的反应[J]. 实验生物学报, 1999, 32(3): 301-307.
- [8] Perid Limam, Karim Chahed, Nedra Ouelhazi, et al. Phytohormone regulation of isoperoxidases in *Catharanthus roseus* suspension cultures [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(5): 1 219-1 225.
- [9] Logemann E, Wu SC, Schröder J, et al. Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes[J]. *Plant J.* 1995, 8(6): 865-876.

~~~~~  
 (上接第 91 页 Continue from page 91)

- [3] 吴国荣, 邹玉珍, 程光宇, 等. 猴头子实体锰型超氧化物歧化酶(SOD)的纯化及其鉴定[J]. 植物资源与环境, 1996, 5(2): 9-14.
- [4] 傅爱根, 王爱国, 罗广华. 铜锌超氧化物与过氧化氢反应中羟自由基的形成[J]. 热带亚热带植物学报, 1998, 6(2): 111-116.
- [5] 南京农业大学. 土壤农化分析(第二版)[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [6] 西北农业大学植物生理生化教研组. 植物生理生化实验指导[M]. 陕西: 科学技术出版社, 1987.

\*\*\*\*\*  
 (上接第 54 页 Continue from page 54)

- [5] 吴承祯, 洪 伟. 观光木群落物种多度分布的 Weibull 模型研究. 福建林学院学报, 1997, 17(1): 20-24.
- [6] 吴承祯, 洪 伟, 吴继林, 等. 两种珍稀植物群落物种多度分布的核方法研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2000, 8(4): 301-307.
- [7] 曾庆文, 周仁章, 刘银至, 等. 濒危植物厚叶木莲的群落学特征及其保护[J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7(2): 109-119.
- [8] Pielou E. C. *Ecological Diversity* [M]. New York: John Wiley & Sons, 1966.
- [9] Simpson E. H. Measurement of Diversity [J]. *Nature*, 1949, 163: 688.
- [10] 黄久香, 庄雪影. 车八岭苗圃三种国家级自然保护植物的菌根研究[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(2): 38-41.