

红豆杉细胞悬浮培养中不同添加物 对细胞生长和紫杉醇合成的影响

李干雄 黄巧明

(广东梅县梅雁生物工程研究所, 梅县 514787)

摘要: 采用正交实验检测红豆杉(*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.)细胞悬浮培养中水杨酸、D-果糖、甘露醇和硫酸镧对细胞生长和紫杉醇(taxol)积累的影响。添加 10 g/L D-果糖,可使细胞的鲜重和干重明显增加;添加 60 g/L 甘露醇使细胞的鲜重和干重明显减少;1 mg/L 水杨酸仅使细胞鲜重增加,对干重影响不明显;硫酸镧对细胞生长无明显影响。单独添加这 4 种物质,紫杉醇含量均下降,同时添加 10 g/L D-果糖和 2 mg/L 硫酸镧,紫杉醇含量明显增加,比对照提高 127%,这可能是它们协同促进作用的结果。

关键词: 紫杉醇;红豆杉;悬浮培养;正交设计

中图分类号: S791.49;Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2000)03-0011-04

Effects of different additions on cell growth and taxol biosynthesis in cell suspension culture of *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. LI Gan-xiong, HUANG Qiao-ming (Meiyan Institute of Biotechnology, Meixian 514787), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(3): 11~14

Abstract: The effects of salicylic acid, D-fructose, mannitol and lanthanum sulfate on cell growth and taxol biosynthesis in cell suspension culture of *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. were studied by using orthogonal design experiment. The increase or decrease of fresh and dry weight of cell occurred when 10 g/L D-fructose or 60 g/L mannitol was added respectively; only fresh weight could be increased by adding 1 mg/L salicylic acid while no obvious effect was on cell growth by lanthanum sulfate. Taxol amount decreased when each chemical was added to culture separately but it could be improved 127% in contrast to control if D-fructose and lanthanum sulfate were added simultaneously.

Key words: taxol; *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.; cell suspension culture; orthogonal design

红豆杉(*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.)及红豆杉属植物作为抗癌新药紫杉醇(taxol)的原料,引起了国内外的广泛关注。但由于资源短缺以及紫杉醇含量低等原因,开发利用成本十分昂贵。近年研究表明^[1-3],在细胞悬浮培养中加入前体、诱导子、激素等均有可能提高紫杉醇的最终得率。为此,作者在红豆杉的细胞悬浮培养中分别加入不同量的水杨酸诱导剂、D-果糖碳源、甘露醇高渗剂及硫酸镧,以观察在红豆杉细胞悬浮培养中这 4 种物质对细胞生长和紫杉醇积累的影响,并通过正交实验,分析这 4 个因素的主要作用以及它们之间的相互作用,旨在探讨提高紫杉醇得率进行规模化生产的途径。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和培养条件

供试材料为梅雁生物工程研究所组培实验室诱

导并继代培养 3 年以上的红豆杉细胞株,以 B₅为基本培养基^[4],添加 1 mg/L NAA、0.2 mg/L 6-BA 和 30 g/L 蔗糖为继代培养基。在内装 50 mL 继代培养基的瓶中,接入 50 mL 悬浮培养细胞,于 24℃ 恒温 120 r/min 振荡培养。细胞培养 14 d 后作为种子做正交实验。

1.2 实验

基础生产培养基为 B₅ + 50 mg/L 苯丙氨酸 + 50 mg/L 赖氨酸 + 50 mg/L 乙酸钠 + 7 mg/L NAA + 0.2 mg/L 6-BA。于内装 45 mL 基础生产培养基的瓶中,接入 60 mL 继代培养 14 d 的红豆杉细胞悬浮培养液,接种量为 50 g/L 鲜细胞。培养至第 15

收稿日期: 2000-04-05

基金项目: 梅雁经济发展总公司资助

作者简介: 李干雄,男,1972 年 4 月生,广东五华人,大学,助工,主要从事组织培养工作。

天,添加不同量的水杨酸、D-果糖、甘露醇、硫酸钪,进行7因素2水平正交实验 $L_8(2^7)^{[5-9]}$,继续培养至第28天收获,测定细胞鲜重和干重,分析紫杉醇积累量。

1.3 分析检测

1.3.1 细胞鲜重和干重的测定 用120目不锈钢筛网过滤收获细胞后,用蒸馏水冲洗3次,再用干纱布吸干表面水分,称鲜重,将湿细胞置60℃烘箱烘至恒重,称干重,干、鲜重量皆用g/L表示。

1.3.2 紫杉醇含量的测定 取20 mL过滤后的培养液,加入20 mL二氯甲烷连续萃取3次,收集萃取液,减压蒸干回收二氯甲烷,蒸干物加入5 mL甲醇溶解定容,经过0.45 μm 的过滤器过滤,用

Waters HPLC 进行测定,分离柱是反相硅胶柱(Nova-Pak C_{18} 4 μm , 150mm \times 3.9mm),流动相为V(甲醇):V(乙腈):V(水)=29:27:44,柱温为35℃,流速1 mL/min,洗脱时间11 min,在227 nm下用紫外检测器检测,紫杉醇定量采用外标法,每次进样量为5 μL ,紫杉醇标准品为Sigma公司生产。

2 结果与讨论

2.1 正交实验结果

红豆杉细胞悬浮培养7因素2水平正交实验结果见表1。

表1 红豆杉细胞培养正交实验结果

Table 1 Experimental results of cell suspension culture of *Taxus chinensis* by orthogonal design

组合 ³⁾ Combination ³⁾	因素 Factors ^{1),2)}							实验结果 Result of experiment		
	A	B	E	C	F	G	D	鲜重 Fresh weight (g/L)	干重 Dry weight (g/L)	培养基中紫杉醇含量 Taxol in medium (mg/L)
1	1	1	1	1	1	1	1	179	13.7	1.15
2	1	1	1	2	2	2	2	124	10.5	0.34
3	1	2	2	1	1	2	2	228	18.0	2.39
4	1	2	2	2	2	1	1	166	14.2	0.36
5	2	1	2	1	2	1	2	185	12.7	0.54
6	2	1	2	2	1	2	1	126	9.6	0.18
7	2	2	1	1	2	2	1	245	16.9	0.24
8	2	2	1	2	1	1	2	180	15.5	0.64
鲜重 Fresh weight I (g/L)	174	154	182	209	178	178	179			
鲜重 Fresh weight II (g/L)	184	205	176	149	180	180	179			
干重 Dry weight I (g/L)	14.1	11.6	14.2	15.3	14.2	14.0	13.6			
干重 Dry weight II (g/L)	13.7	16.2	13.6	12.5	13.6	13.8	14.2			
紫杉醇 Taxol I (mg/L)	1.06	0.55	0.59	1.08	1.09	0.67	0.48			
紫杉醇 Taxol II (mg/L)	0.40	0.91	0.87	0.38	0.37	0.79	0.98			

¹⁾A: 水杨酸 salicylic acid; B: D-果糖 D-fructose; E: 表示A与B相互作用及C与D相互作用之和 Showing the sum of the interaction between A \times B and C \times D; C: 甘露醇 mannitol; F: 表示A与C相互作用及B与D相互作用之和 Showing the sum of interaction between A \times C and B \times D; G: 表示A与D相互作用及B与C相互作用之和 Showing the sum of interaction between A \times D and B \times C; D: 硫酸钪 lanthanum sulfate; ²⁾表中1和2为水平序号1 and 2 in the table show order of level; 水平 level 1: 水杨酸 salicylic acid 0 mg/L, D-果糖 D-fructose 0 g/L, 甘露醇 mannitol 0 g/L, 硫酸钪 lanthanum sulfate 0 mg/L; 水平 level 2: 水杨酸 salicylic acid 1 mg/L, D-果糖 D-fructose 10 g/L, 甘露醇 mannitol 60 g/L, 硫酸钪 lanthanum sulfate 2 mg/L. ³⁾I代表水平1结果之和, II代表水平2结果之和 I indicates the sum of the results in level 1, II indicates the sum of the results in level 2.

2.2 实验结果统计分析^[10]

2.2.1 细胞鲜重统计分析 红豆杉细胞鲜重统计分析结果见表2,从表1和表2可以看出,水杨酸、D-果糖、甘露醇对红豆杉细胞鲜重都有极显著影响。添加60 g/L甘露醇后细胞鲜重减少29%,添加10 g/L D-果糖能增加细胞鲜重33%,而添加1 mg/L水杨酸能增加细胞鲜重6%,硫酸钪对细胞鲜重无影

响,另外A \times B与C \times D之间的相互作用之和也达到了显著水平。

2.2.2 细胞干重统计分析 红豆杉细胞干重统计分析结果见表3,从表1和表3可以看出,D-果糖和甘露醇对细胞干重的影响较显著,水杨酸和硫酸钪对细胞干重的影响未达显著水平,各因素之间无相互作用,添加10 g/L D-果糖可增加细胞干重40%,

但添加 60 g/L 甘露醇后细胞干重降低 18%。

表2 红豆杉细胞悬浮培养中鲜重数据方差分析

Table 2 Analysis of variance of cell fresh weight in suspension culture of *Taxus chinensis*

变异来源 ¹⁾ Source of variation	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F ³⁾
A	125	1	125	38**
B	325	1	325	980**
C	450	1	450	1360**
D	0	1	0	
E	4.5	1	4.5	14*
F	0.5	1	0.5	
G	0.5	1	0.5	
误差 Error ²⁾	1	3	0.33	

¹⁾A: 水杨酸 salicylic acid; B: D-果糖 D-fructose; C: 甘露醇 mannitol; D: 硫酸镧 lanthanum sulfate; E: 表示 A 与 B 相互作用及 C 与 D 相互作用之和 Showing the sum of the interaction between A×B and C×D; F: 表示 A 与 C 相互作用及 B 与 D 相互作用之和 Showing the sum of interaction between A×C and B×D; G: 表示 A 与 D 相互作用及 B 与 C 相互作用之和 Showing the sum of interaction between A×D and B×C; ²⁾误差包括 D、F 和 G 三项之和 The error includes the sum of the three items (D, F and G); ³⁾ $F_{1,3,0.05} = 10.13$, $F_{1,3,0.01} = 34.12$

表3 红豆杉细胞悬浮培养中干重数据方差分析

Table 3 Analysis of variance of cell dry weight in suspension culture of *Taxus chinensis*

变异来源 ¹⁾ Source of variation	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F ³⁾
A	0.02	1	0.02	
B	2.6	1	2.60	81**
C	0.98	1	0.98	31**
D	0.045	1	0.045	
E	0.045	1	0.045	
F	0.045	1	0.045	
G	0.045	1	0.045	
误差 Error ²⁾	0.16	5	0.032	

¹⁾A: 水杨酸 salicylic acid; B: D-果糖 D-fructose; C: 甘露醇 mannitol; D: 硫酸镧 lanthanum sulfate; E: 表示 A 与 B 相互作用及 C 与 D 相互作用之和 Showing the sum of the interaction between A×B and C×D; F: 表示 A 与 C 相互作用及 B 与 D 相互作用之和 Showing the sum of interaction between A×C and B×D; G: 表示 A 与 D 相互作用及 B 与 C 相互作用之和 Showing the sum of interaction between A×D and B×C; ²⁾误差包括 A、D、E、F 和 G 五项之和 The error includes the sum of the five items (A, D, E, F and G); ³⁾ $F_{1,5,0.01} = 16.26$

2.2.3 培养基中紫杉醇含量统计分析 紫杉醇含量的统计分析结果见表 4, 结合表 1 和表 4 可以看出, 这 4 种物质对紫杉醇含量的影响均未达显著水平。单独添加 1 mg/L 水杨酸或 60 g/L 甘露醇后, 紫杉醇含量均下降 60% 左右, 同时添加 1 mg/L 水杨酸和 60 g/L 甘露醇, 紫杉醇的含量也无明显增加, 表明水杨酸和甘露醇之间的相互协同作用极小;

而 D-果糖与硫酸镧之间则有明显的相互协同作用, 当此二物质均不添加时, 紫杉醇含量为 0.67 mg/g, 单独添加 10 mg/L D-果糖或 2 mg/L 硫酸镧时, 紫杉醇含量分别为 0.30 mg/g 和 0.44 mg/g, 均明显低于对照, 但当同时添加 10 mg/L D-果糖和 2 mg/L 硫酸镧时, 紫杉醇的含量明显提高高达 1.52 mg/g, 比对照增加 127%。

表4 红豆杉细胞悬浮培养中紫杉醇数据方差分析

Table 4 Analysis of variance of taxol in suspension culture of *Taxus chinensis*

变异来源 ¹⁾ Source of variation	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F ³⁾
A	0.054	1	0.054	30
B	0.016	1	0.016	10
C	0.061	1	0.061	34
D	0.031	1	0.031	17
E	0.009 8	1	0.009 8	5.5
F	0.065	1	0.065	36
G	0.001 8	1	0.001 8	
误差 Error ²⁾	0.001 8	1	0.001 8	

¹⁾A: 水杨酸 salicylic acid; B: D-果糖 D-fructose; C: 甘露醇 mannitol; D: 硫酸镧 lanthanum sulfate; E: 表示 A 与 B 相互作用及 C 与 D 相互作用之和 Showing the sum of the interaction between A×B and C×D; F: 表示 A 与 C 相互作用及 B 与 D 相互作用之和 Showing the sum of interaction between A×C and B×D; G: 表示 A 与 D 相互作用及 B 与 C 相互作用之和 Showing the sum of interaction between A×D and B×C; ²⁾误差只包括 G 项 The error includes one items (G); ³⁾ $F_{1,1,0.05} = 161.4$

3 结论

7 因素 2 水平正交实验结果表明, 诱导因子水杨酸并无诱导和提高紫杉醇含量的作用; 高渗剂甘露醇不仅未能促进红豆杉细胞生长和提高紫杉醇含量, 反而使红豆杉细胞的鲜重、干重和紫杉醇含量降低; 添加 10 g/L D-果糖可明显提高红豆杉细胞的鲜和干重, 若同时添加 2 mg/L 硫酸镧, 可明显提高紫杉醇含量, 可见 D-果糖与硫酸镧对提高紫杉醇含量可能有较好的协同作用。此研究结果为促进红豆杉细胞生长提高紫杉醇含量提出了一条可供参考的途径, 值得深入研究。

参考文献

- [1] 元英进, 许 晖, 王传贵, 等. 前体饲喂东北红豆杉细胞强化紫杉醇生产研究[J]. 中草药, 1997, 28(增刊): 9~12.
- [2] 甘烦远, 郑光植, 彭丽萍, 等. 云南红豆杉细胞的悬浮培养[J]. 植物生理学报, 1997, 23(1): 43~46.

- [3] 余龙江,朱敏,周莹,等. 茉莉酸甲酯对紫杉醇生物合成的诱导作用[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(5):1~7.
- [4] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells [J]. Expt Cell Res, 1968, 50: 151~158.
- [5] 谢秋玲,郭勇. 诱导剂对植物细胞培养生产次生代谢物的作用[J]. 生物工程进展, 1998, 18(4):50~52.
- [6] Zeng Q P, Guo Y. Adaptive response of plant cells to environmental stress I: Salicylic acid-enhanced induction of superoxide dismutase in cultured *Allium sativum* L. cells[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(2):152~155.
- [7] Hirasuna T J, Pestchanker L J, Srinivasan V, et al. Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996, 44:95~102.
- [8] Kim J H, Yan J H, Hwang Y S, et al. Production of taxol and related taxanes in *Taxus brevifolia* cell cultures: effect of sugar [J]. Biotechnology Letters, 1995, 17(1):101~106.
- [9] 卢萍,郭洪祝,鲁宽科,等. 稀土对黄连愈伤组织生长及生物碱含量的影响[J]. 中国药理学杂志, 1999, 34(3):153~155.
- [10] 杜荣寿编. 生物统计学[M]. 北京:高等教育出版社, 1985. 419~430.

(责任编辑:宗世贤)

虎舌红的繁殖栽培与推广利用*

庐山植物园 徐祥美

虎舌红(*Ardisia mamillata* Hance)为紫金牛科常绿小灌木,高约15~20 cm,栽培条件下可达50~60 cm,产四川、云南、贵州、广东、广西、福建及江西等省,生于海拔500~1 200 m的山谷及沟边阴湿阔叶林下。

作者通过多年的引种栽培,发现该种叶、果奇特,是一种很好的观叶和观果植物,且易繁殖栽培,具有较大的观赏和推广利用价值。

1. 繁殖栽培

虎舌红结果量大,成熟度高,种子易萌发,故种子繁殖是最基本的繁殖方法。种子无休眠期,可随采随播,盆播效果较佳。取疏松透气的腐殖土或拌入锯末、细沙的土壤,放入具孔并垫铺3 cm碎瓦片的干净钵中,去果肉后的种子穴播,浇透水置无阳光直射处。在整个种子萌发过程中,要保持土壤湿润,3~4 d浇水1次,喷灌或浸灌皆宜。虽然种子发芽率高(可达100%),但出苗不整齐,出苗过程长达2~6个月。

除有性繁殖外,嫩枝扦插成活率也很高,细沙作基质,盆插或露地扦插均可,保持沙床及空气湿润,气温20~25℃下,20 d可萌发新芽,发根后即可移栽。

虎舌红为耐阴植物,高温季节应避免阳光直射,开花结果期保持一定的光照,常年放室内光线充足处即可。该种

喜温暖湿润的生境,20~28℃为最适生长温度,能耐0℃左右的低温,南方可露天栽培,北方则宜盆栽于温室;要经常浇水,保持土壤湿润,叶面喷雾每天至少1次,但要防止积水。肥料以少施勤施为宜,开花结果期适当加重磷肥的施用,盆栽植株,需每年换盆,并施底肥。水肥等管理适当,播种苗当年株高可达4~5 cm,翌年开花;扦插苗当年即可开花结果。

2. 观赏价值

叶、果奇特,叶倒卵形至长圆状倒披针形,叶面覆盖长绒毛,毛密而红,侧观似放射紫红色的光芒,喷雾时,无数小水珠在阳光下似粒粒钻石,放射出闪动的光亮。花浅粉或近白色,自花授粉植物,结果率高,结果量大,1个花枝可结果10~20个,整个植株结果量可达500个,果实直径约1 cm,圆形,色泽红而发亮,形似珍珠,甚为美观。果实顶端长2~3 mm的红色芒状细毛,更增加了观赏效果。果实周年不落,甚至2~3年不落,常见1~3年的果实同存一树的现象,挂果期之长,实为植物界少见。因而该植物可作为观叶和观果新种类在各地推广利用。

* 虎舌红在1999年昆明世界园艺博览会上获观叶植物大奖