

红豆杉细胞培养中紫杉醇 高产细胞株的筛选及其稳定性分析

李志良, 李干雄, 饶秋容, 黄巧明, 曾腾锋

(梅雁生物工程研究所, 广东 梅州 514787)

摘要: 对中国红豆杉 (*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.)、云南红豆杉 (*T. yunnanensis* Cheng et L. K. Fu) 和东北红豆杉 (*T. cuspidata* Sieb. et Zucc.) 不同部位的愈伤组织进行培养及分析比较。结果表明, 中国红豆杉愈伤组织生长较快, 其叶片诱导的愈伤组织紫杉醇含量较高, 且紫杉醇含量与培养物的外观特征有明显相关性, 颜色浅、块状或颗粒较明显的细胞团紫杉醇含量较高。运用细胞看护培养技术, 从中国红豆杉愈伤组织中筛选出生长速率达 $0.52 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、紫杉醇含量超过 0.01% 的细胞优株, 经 20 次继代培养, 其生长和紫杉醇含量均较稳定。

关键词: 红豆杉; 紫杉醇; 高产细胞株; 看护培养

中图分类号: S567.1⁺9, Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2007)01-0062-04

Selection and stability research on taxol high-yield cell strain during *Taxus* cell culture LI Zhi-liang, LI Gan-xiong, RAO Qiu-rong, HUANG Qiao-ming, ZENG Teng-feng (Meiyan Institute of Biotechnology, Meizhou 514787, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(1): 62-65

Abstract: Calli from different parts of *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd., *T. yunnanensis* Cheng et L. K. Fu and *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. were induced and analyzed. The results showed that callus growth of *T. chinensis* was quicker, taxol content of callus which induced from leaves of *T. chinensis* was higher, and taxol content had a relationship with external characteristics of the callus. The cell aggregate which lumped up or obvious granulate and the color was shallow had higher content of taxol. Using technology of cell nurse culture, the excellent cell strain which growth rate reached to $0.52 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and taxol content was more than 0.01%, was selected from callus of *T. chinensis*, and its growth and taxol content were more stable after subcultured twenty times.

Key words: *Taxus* L.; taxol; high-yield cell strain; nurse culture

紫杉醇 (taxol) 是来源于红豆杉属 (*Taxus* L.) 植物树皮或枝叶中、具有良好活性的抗癌药^[1], 对卵巢癌、乳腺癌及非小细胞性肺癌有明显疗效。由于自然条件下红豆杉生长慢、资源紧缺且紫杉醇含量低 (仅为 0.01%), 无法满足日益增长的市场需要, 导致紫杉醇药源奇缺, 价格昂贵。目前, 国内外众多科学家及企业家均在寻求解决紫杉醇药源的途径, 其中, 采用红豆杉细胞培养技术生产紫杉醇的研究是当前的热点^[2-4], 被认为是解决紫杉醇资源问题的长期替代方法。目前, 有关细胞培养法生产紫杉醇的研究已取得较大进展, 但红豆杉愈伤组织细胞生长及紫杉醇合成不稳定仍然是制约其工业化培养的关键因素。因而, 筛选出细胞生长快、紫杉醇含量高且稳定的细胞株是非常必要的。

用于诱导愈伤组织的红豆杉属植物在中国共有

4 种 1 变种, 分别是中国红豆杉 [*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.]、云南红豆杉 (*T. yunnanensis* Cheng et L. K. Fu)、东北红豆杉 (*T. cuspidata* Sieb. et Zucc.)、西藏红豆杉 (*T. wallichiana* Zucc.) 和南方红豆杉 [*T. chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairai* (Lemée et Lévl.) Cheng et L. K. Fu]。已有研究结果表明, 次生代谢产物含量高的外植体诱导出的愈伤组织的次生代谢产物含量也高^[5], 因此, 必须利用愈伤组织的异质性及变异性, 通过细胞克隆技术对红豆杉愈伤组织进行筛选, 以获得优良细胞株。有关红豆杉细胞克隆技术已有报道^[6,7], 主要为克

收稿日期: 2006-05-08

基金项目: 广东省科学技术厅工业攻关项目 (2005B10401032)

作者简介: 李志良 (1973-), 男, 广东梅县人, 本科, 工程师, 主要从事植物组织与细胞培养工作。

隆细胞生长方面的研究,也有关于紫杉烷类化合物的优株筛选报道^[8]。作者对来源于不同种类红豆杉的愈伤组织细胞进行了比较,运用细胞克隆法并结合细胞看护培养技术进行紫杉醇高产细胞株的筛选,以期紫杉醇的工业化生产提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

中国红豆杉、云南红豆杉及东北红豆杉的新生嫩枝叶和中国红豆杉的种子均来自梅雁生物工程研究所种植园;所用培养基均为添加 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖及 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水解酪蛋白的B₅培养基,pH5.8,固体培养基则另外添加 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织诱导和初步筛选 将外植体清洗干净后用70%酒精消毒1 min,NaClO溶液消毒30 min,用无菌水清洗4次并切成1.5 cm小段,在其上划出伤痕并接种至固体培养基上,黑暗条件下培养3~5周。获得的愈伤组织在固体培养基上每22天继代1次。选颜色浅且长势好的表层细胞用于继代培养。经3~5代相同条件培养后,分别取样进行生长量及紫杉醇含量的测定,从中选出生长快且紫杉醇含量较高的愈伤组织用于优株筛选实验。

1.2.2 单细胞悬液的制备 将初步筛选获得的愈伤组织转至锥形瓶中悬浮培养,转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。黑暗条件下,每10天继代1次。待第3代培养7 d后,取出,静置片刻,无菌条件下吸出含有单细胞或小细胞团的上层培养液,过150目不锈钢筛,滤液为单细胞或含少量3~5个细胞的小细胞团悬液。将上述悬液稀释到细胞密度为 $2.0 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ (血球计数板计数)后,进行看护培养。

1.2.3 细胞克隆的看护培养 将在固体培养基上经20 d培养且生长良好的细胞接种到新鲜培养基上,接种量为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (DW)。上面铺1层无菌滤纸(滤纸大小以能阻止下层细胞转移至上层为宜),培养1周后,将已稀释的同种类细胞悬液接种到滤纸上,接种密度为每瓶 2.0×10^3 个(100 mL锥形瓶)。培养20 d后,即长出肉眼可见的小细胞团;培养30 d后,陆续将小细胞团(为1个克隆)转移至新鲜培养基上看护培养(操作方法同上)。待克隆细

胞长至 2 mm^3 以上时,接种到新鲜培养基中扩大培养。培养至足够量时,每个克隆分成2部分,一部分继续培养用作进一步实验的材料,另一部分用于紫杉醇含量检测。经检测,剔除紫杉醇含量低的克隆,选择含量高的克隆进行悬浮培养和稳定性实验。

1.2.4 稳定性实验 将筛选出的细胞株转至锥形瓶中悬浮培养,14 d继代1次,接种量为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (DW),每隔2~5代取样进行细胞干质量、胞内(胞内)及胞外(培养液)紫杉醇含量的测定。

1.2.5 细胞生长速率和紫杉醇含量检测 经22~25 d看护培养后,收获待测的培养物并称重,60℃以下烘干至恒重并称重,计算干鲜比,根据接种前后的质量差及收获的细胞量计算生长速率。将烘干的培养物研碎,过80目筛。精密称取0.25 g培养物粉末,甲醇浸提过夜,超声提取(每次30 min),静置后收集上清液(3次重复)。用蒸馏水溶解回收甲醇后的残留物并用相同体积的二氯甲烷分3次进行萃取,收集并回收二氯甲烷相,残留物用少量甲醇溶解并定容,供HPLC测定。细胞悬浮培养时,生长速率测定方法同上;培养物经过滤(固液分离)后胞内紫杉醇含量测定方法同上;胞外紫杉醇含量测定则取10 mL培养液用二氯甲烷萃取后同上述方法处理并测定。

HPLC检测条件:Waters HPLC系统,流动相为V(甲醇):V(乙腈):V(水)=29:27:44,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长227 nm,标准品购自SIGMA公司。

2 结果和分析

2.1 不同来源的愈伤组织细胞生长及紫杉醇含量的比较

对来源于中国红豆杉、云南红豆杉及东北红豆杉不同部位的愈伤组织细胞的生长速率和紫杉醇含量进行测定,结果见表1。由表1可见,来源于不同外植体的愈伤组织的生长速率及紫杉醇含量差异显著;来源于中国红豆杉叶片的愈伤组织的紫杉醇含量最高,达0.0086%;来源于中国红豆杉胚(种子)的愈伤组织的细胞生长速率最高,可达 $0.67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (DW);细胞生长速率与紫杉醇含量没有相关性。

表1 红豆杉不同部位愈伤组织细胞生长及紫杉醇含量比较
Table 1 Comparison of cell growth rate and taxol content in callus from different parts of *Taxus* spp.

种名 Species name	外植体 Explant	生长速 率 /g · L ⁻¹ · d ⁻¹ Growth rate	紫杉醇 含量/% Taxol content
中国红豆杉 <i>T. chinensis</i>	茎 stem	0.62	0.000 5
	叶 leaf	0.60	0.008 6
	胚 embryo	0.67	0.000 3
云南红豆杉 <i>T. yunnanensis</i>	茎 stem	0.39	0.005 3
	叶 leaf	0.40	0.000 5
东北红豆杉 <i>T. cuspidata</i>	茎 stem	0.54	0.000 3
	叶 leaf	0.50	0.000 3

2.2 愈伤组织外观特征与胞内紫杉醇含量的关系

在继代培养过程中发现,不同细胞系及同一细胞系不同细胞团的生长及外观形态不一致,通过检测发现紫杉醇含量也不同。对来源于中国红豆杉叶片的愈伤组织细胞进行比较观察,结果表明(表2),颜色浅、块状或颗粒较明显的细胞团的紫杉醇含量

较高,其中,含水量少、疏松且颗粒明显的T-9细胞株的紫杉醇含量最高,达0.016 7%。

2.3 优质细胞株的筛选

依据表1的实验结果,选取来源于中国红豆杉叶片的愈伤组织进行悬浮培养及细胞克隆。选择生长快、颜色浅且颗粒较明显的(均匀小粒)细胞继代培养,定期检测紫杉醇含量,从中选出含量高的细胞株进行继续培养。获得克隆细胞后,依据细胞外观特征与紫杉醇含量的相关性,有选择地进行HPLC分析,获得含量较高的细胞优株(表3),优质细胞株(T-9)的生长速率从0.37 g · L⁻¹ · d⁻¹提高到0.53 g · L⁻¹ · d⁻¹,紫杉醇含量超过0.01%,其中,胞外紫杉醇含量达19.8 mg · L⁻¹。

2.4 优质细胞株的稳定性对比

在运用细胞克隆方法进行优株筛选的过程中,由于单细胞分离法获得的克隆细胞可能有一部分来自小细胞团,而且培养条件的变化和细胞自身因素

表2 中国红豆杉叶片愈伤组织的外观特征及紫杉醇含量的分析
Table 2 External characteristics and taxol content in callus of *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. leaf

编号 No.	紫杉醇 含量/% Taxol content	含量排序 Rank of content	外观特征 Characteristics of callus
T-1	0.000 27	10	暗黄色棉絮状细胞团,含水量高 Dark yellow and cell mass like waste cotton, rich in water
T-2	0.000 45	9	浅红色疏松细胞团,含水量高 Shallow red and loose cell mass, rich in water
T-3	0.001 00	8	黄色颗粒状疏松细胞团,含水多 Yellow grain and loose cell mass, rich in water
T-4	0.001 70	7	黄色颗粒状疏松细胞团,含水多 Yellow grain and loose cell mass, rich in water
T-5	0.004 60	6	浅黄色疏松细胞团 Shallow yellow and loose cell mass
T-6	0.005 10	5	浅黄色疏松细胞团 Shallow yellow and loose cell mass
T-7	0.008 70	4	浅黄色疏松细胞团,颗粒不明显 Shallow yellow and loose cell mass, the grain is not obvious
T-8	0.010 80	3	黄色大颗粒状细胞团,颗粒不易碎 Yellow and big grain form cell mass, the grain is not easy smashed
T-9	0.016 70	2	浅黄色沙粒状细胞团,颗粒明显、疏松且含水少 Shallow yellow and sand cell mass, the grain is obvious and loose, little in water
T-10	0.017 00	1	浅黄色块状细胞团,表面有白色颗粒,疏松且含水少 Shallow yellow and lumped cell mass, some white and loose grain in surface, little in water

表3 筛选前后中国红豆杉细胞生长及紫杉醇含量比较
Table 3 Comparison of cell growth rate and taxol content in callus of *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. leaf before and after selecting

项目 Item	培养方式 Way of culture	生长速 率 /g · L ⁻¹ · d ⁻¹ Growth rate	胞内紫杉醇含量/% Content of intracellular taxol	胞外紫杉醇含量/mg · L ⁻¹ Content of extracellular taxol
筛选前 Before selection	固体培养 Solid culture	0.37	0.001 - 0.005	
	悬浮培养 Suspension culture	0.50	0.008	0.7
目测筛选 Select with eyes	固体培养 Solid culture	0.60	0.008 - 0.012	
	悬浮培养 Suspension culture	0.61	0.013 - 0.019	4.0 - 7.3
筛选后(T-9细胞株) After selection (T-9)	固体培养 Solid culture	0.53	0.017	
	悬浮培养 Suspension culture	0.52	0.029	19.8

(如突变等)等均影响细胞株的稳定性,因此,有必要对获得的高产细胞株进行稳定性实验。

优质细胞株 T-9 的悬浮培养结果见表 4, 稳定性实验结果见表 5。从表 5 可以看出, 经 20 代悬浮培养实验, 细胞干质量保持在 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右, 说明这一细胞株的生长是稳定的; 细胞内外累积的紫杉醇总量维持在 $17 \sim 24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 说明这一细胞株产物累积也是相对稳定的。

表 4 悬浮培养时中国红豆杉叶片 T-9 细胞株的生长及紫杉醇含量的变化

Table 4 Changes of cell growth and taxol content in T-9 cell strain of *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. leaf in suspension culture

培养时间/d Culture time	细胞干质量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Dry weight of cell	胞内紫杉醇含量/% Content of intracellular taxol	胞外紫杉醇含量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Content of extracellular taxol
15	9.5	0.010	5.0
21	11.3	0.015	9.1
24	12.5	0.021	14.3
27	12.0	0.029	19.8
29	11.5	0.026	18.2

表 5 中国红豆杉叶片 T-9 细胞株生长及紫杉醇含量的稳定性
Table 5 Stability of cell growth and taxol content of T-9 cell strain of *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. leaf

培养代数/代 Batch of cultivation	细胞干质量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Dry weight of cell	紫杉醇总含量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Total content of taxol
1	11.2	18.1
3	12.6	19.0
5	12.3	23.3
7	11.7	18.0
10	11.5	20.3
15	13.0	17.5
19	12.4	17.9

3 讨论和结论

筛选植物细胞次生代谢物高产细胞系的方法很多^[9], 选择适当方法是提高筛选效率的关键。红豆杉细胞培养的目的产物——紫杉醇的含量较低, 测定步骤多且所需时间较长、费用高, 因此, 观察分析培养物外部特征与目标产物的相关性, 并用目测法对培养物进行筛选是值得深入研究和推广的方法。

由于愈伤组织的生长和紫杉醇含量受到培养条件(特别是外源激素种类)的影响, 因此, 以 B_5 为基本培养基(添加 NAA 和 6-BA)可能较适于中国红豆杉愈伤组织的生长, 对此还需进行详细研究。

固体培养时紫杉醇含量较高的优质细胞株(如 T-10)在悬浮培养时紫杉醇含量低且不稳定, 这可能与采用的细胞克隆方法(过滤)有关。使用该方法获得的细胞克隆不完全是单细胞克隆, 可能含有由 3~5 个性状不同的细胞组成的小细胞团, 经悬浮培养后各种细胞的比例及总体性状发生变化, 导致紫杉醇含量发生改变。

红豆杉细胞培养过程中, 可以对细胞培养物进行反复的目测筛选以提高细胞系的生长速率和紫杉醇含量, 结合植物细胞克隆技术就可以获得稳定高产的细胞株, 为大规模的工业化培养奠定基础。

参考文献:

- [1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. J Amer Chem Soc, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [2] 胡萍, 李淑颖, 元英进. 南方红豆杉细胞悬浮培养条件优化研究[J]. 天然产物研究与开发, 1998, 11(4): 30-34.
- [3] 仇燕, 贾宁, 王丽, 等. 诱导子在红豆杉细胞培养生产紫杉醇中的应用研究进展[J]. 植物学通报, 2003, 20(2): 184-189.
- [4] 李干雄, 黄巧明. 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[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(3): 11-14.
- [5] 孙彬贤, 章国瑛, 刘涂, 等. 红豆杉细胞培养与紫杉醇生产[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(2): 135-140.
- [6] 邱德有, 李如玉, 韩一凡. 东北红豆杉细胞克隆技术研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(5): 265-267.
- [7] 李家儒, 唐晓红, 黄颢, 等. 红豆杉单细胞克隆的建立[J]. 生物技术, 1996, 6(3): 8-10.
- [8] 吴蕴祺, 朱蔚华, 陆俭, 等. 红豆杉愈伤组织中 *sinenxans* 高产细胞系的选择及其培养[J]. 中国药理学杂志, 1998, 33(1): 15-18.
- [9] 甘烦远, 郑光植. 植物培养细胞次级代谢产物高产细胞系的筛选[J]. 国外医药·植物药分册, 1990, 5(1): 10-15.