

曼地亚红豆杉细胞系的建立与评价

杨秦, 李丽琴, 付春华, 余龙江*

(华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要: 红豆杉(*Taxus*)细胞内紫杉醇的含量低且不稳定,限制了利用细胞培养大规模生产紫杉醇的产业化进程。以紫杉醇含量较高的曼地亚红豆杉(*Taxus media*)为试材,诱导得到了曼地亚红豆杉愈伤组织,在添加抗坏血酸(VC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、活性炭(activated carbon)的改良B5培养基上,15次反复继代培养后获得了高产紫杉醇的细胞系。对新建立的曼地亚红豆杉细胞系(MC)与同期诱导的东北红豆杉细胞系(NC)及实验室继代多年的中国红豆杉细胞系(SC)在细胞生长周期、紫杉醇含量和细胞死亡率等方面进行了分析比较。结果表明,SC的生长量达5.9倍,高于MC和NC的3.6和4.2倍。在初始接种量相近的情况下,MC的悬浮培养细胞在一个周期内紫杉醇产量可达9.5 mg/L,经过茉莉酸甲酯(MJ)诱导后可达到41 mg/L。

关键词: 红豆杉; 细胞培养; 生长周期; 紫杉醇

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)06-0536-05

Establishment and Assessment of *Taxus media* Cell Line

YANG Qin, LI Li-Qin, FU Chun-Hua, YU Long-Jiang*

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

Abstract: Taxol in *Taxus* cell is little and unstable, which prevents the industrialization process of producing taxol by cell culture. Using *Taxus media* as material, the *T. media* callus was accrued. After subculturing on solid modified B5 medium for 15 time, and supplied with VC, PVP and activated carbon, cell line with the ability of high taxol production was attained. Cell growth cycle, taxol content and cell death rate of *T. media* (MC), *T. cuspidate* (NC) which was successfully established at the same time and *T. chinensis* (SC) which was subcultured for several years in the lab was studied. The results show that the biomass of SC reaches the peak of 5.9 times, which is higher than that of NC and MC. With the same initial inoculation weight, taxol production of MC reached at 9.5 mg/L, and that could reach at 41mg/L after induced by MJ.

Key words: *Taxus*; Cell culture; Growth cycle; Taxol

紫杉醇(taxol)最初是从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)的树皮中分离出的具有抗癌活性的二萜类生物碱^[1]。从红豆杉属植物的树皮中提取紫杉醇是目前紫杉醇来源的主要途径,然而这种方法严重破坏了红豆杉野生资源。因此,研究人员一直致力于解决紫杉醇的来源问题。红豆杉细胞培养大规模生产紫杉醇是公认的最有希望解决紫杉醇供应紧张问题的途径之一^[2]。由于红豆杉细胞内紫杉醇的含量很低且不稳定,长期以来没能很好的应用到大规模生产中。马玺等认为,得到高产紫杉醇的红豆杉细胞株是工业化生产紫杉醇的关键因素之一^[3]。曼地亚红豆杉(*Taxus media*)是北美太平洋沿岸的一种灌木,其三年生树叶中紫杉醇的含量高

达0.017%~0.051%,高于云南红豆杉树皮中的含量^[4]。以紫杉醇含量高的外植体作为诱导材料,可能获得紫杉醇产量高的细胞系,因此诱导曼地亚红豆杉愈伤组织并进行继代筛选可能是获得高产细胞系的一个良好途径。但是迄今为止,国内尚未有曼地亚红豆杉高产细胞系的报道。因此我们以紫杉醇含量高的曼地亚红豆杉作为诱导材料,建立高产紫杉醇的曼地亚红豆杉细胞系,并对其进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

以曼地亚红豆杉(*Taxus media* var. *hickss*)和东北红豆杉(*Taxus cuspidate*)的嫩茎、茎尖和叶片(采

收稿日期: 2006-04-25, 修回日期: 2006-07-28。

基金项目: 国家863计划(102-12-06-01)湖北省新世纪人才项目资助。

作者简介: 杨秦(1981-), 女, 硕士, 从事植物生物技术研究。

* 通讯作者(E-mail:yulongjiang@mail.hust.edu.cn)。

于2003年7月)为诱导材料,分别用75%乙醇消毒10 s,双氧水消毒5 min,0.5%HgCl₂消毒8 min,无菌水漂洗5次,切成1~2 cm长的小段,接种在MS培养基上进行愈伤组织诱导。用于愈伤组织诱导的MS培养基中含蔗糖30 g/L,二氯苯氧乙酸0.2 mg/L, α -萘乙酸0.5 mg/L,pH为5.8。

1.2 继代培养

待愈伤组织形成后转入改良B5培养基^[5]中继代培养,该培养基含水解乳蛋白0.5 g/L,蔗糖30 g/L,二氯苯氧乙酸0.1 mg/L,6-苄氨基嘌呤0.5 mg/L, α -萘乙酸0.5 mg/L,pH为5.8。培养温度为(24±1)℃,暗培养,每隔30 d挑取疏松透明的愈伤组织继代一次。改良B5培养基中反复多次加入抗坏血酸、聚乙烯吡咯烷酮、活性炭等进行抗褐变培养,并参照文献[6]进行条件培养,直至最终得到稳定增殖的细胞系。

1.3 细胞生长周期

取新建立的曼地亚红豆杉细胞系(MC)、东北红豆杉细胞系(NC)和本实验室继代了多年的分散性良好的中国红豆杉(*Taxus chinensis*)细胞系(SC)的鲜重细胞各10 g,分别接种于100 mL的固体和液体培养基中,每4 d称其细胞鲜重和干重,以28 d为1个周期。液体培养基为继代所用的改良B5固体培养基去掉琼脂组成。

细胞鲜重的称量以蒸馏水冲洗细胞后抽滤至完全无水分滤出为准。细胞干重的称量以新鲜细胞放入40℃烘箱里烘至恒重为准。干鲜重的比值为烘干后的细胞重量与新鲜细胞重量之比。所有实验均重复3次。

1.4 紫杉醇含量测定

每4 d取液体悬浮培养的3种红豆杉细胞系进行紫杉醇含量的测定。另设一实验组在液体悬浮培养第12 d,在3种红豆杉细胞中分别加入100 $\mu\text{mol/L}$ 的茉莉酸甲酯(MJ)进行诱导,每4 d取一次样分

析。使用HPLC测定细胞中紫杉醇含量,具体方法参见文献[7]:将鲜细胞冷冻干燥至恒重,称取100 mg干细胞,用3 mL CH₃OH-CH₂Cl₂混合液(1:1)浸泡,超声处理10 min,取出浸提液,向其中加入CH₂Cl₂2.0 mL、水8.0 mL、(NH₄)₂SO₄饱和溶液1.0 mL,振荡萃取,收集CH₂Cl₂层液体,40℃下真空干燥,最后用1.0 mL CH₃OH重新溶解干燥残留物后进行HPLC检测。HPLC仪为法国Gilson公司全自动高效液相色谱仪,色谱柱为C-18反相柱,柱温为25℃,流动相为甲醇:水=7:3,流速为1.0 mL/min,紫杉醇标准品由美国NCI提供。

1.5 细胞死亡的测定

经MJ诱导的实验组细胞每4 d取样分析其细胞死亡率,参见文献[8]进行:取细胞悬浮液在砂芯漏斗过滤,1 g细胞在0.05%Evans Blue浸泡10 min,用蒸馏水洗至无色,在4 mL 1% SDS(50%甲醇配成)50℃保温30 min,加入2 mL蒸馏水稀释。震荡后在8 000 r/min离心3 min。取上清夜,以600 nm处的吸光值为细胞死亡率。Evans Blue对衰老或死亡的细胞具有很好的染色效果,而对健康或活力高的细胞基本不染色,因此,常用于鉴定细胞的死亡程度。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导和细胞系的建立

幼嫩的外植体在接种后10 d左右即开始发生愈伤组织,出愈率达到100%,愈伤组织一般出现在茎段的两端或是切口处以及叶腋间,初生愈伤组织多为淡黄或淡绿色,必须及时继代转到继代培养基中,否则会迅速褐化,向培养基分泌棕色物质并最终死亡。继代过程中向培养基反复添加活性炭的抗褐变效果优于抗坏血酸和聚乙烯吡咯烷酮,添加条件培养液对于细胞的生长有明显的促进作用,继代15次后得到了生长活跃、颗粒疏松、分散性良好的细胞系。图1即为新建立的曼地亚红豆杉细胞系(MC)、



A:曼地亚红豆杉细胞系(MC); B:东北红豆杉细胞系(NC); C:中国红豆杉细胞系(SC)
A: *Taxus media* cell line(MC); B: *Taxus cuspidata* cell line(NC); C: *Taxus chinensis* cell line(SC)

图1 3种红豆杉细胞系离体培养
Fig. 1 Pictures of three *Taxus* cell lines *in vitro* cultivation

东北红豆杉细胞系(NC)和本实验室继代了多年的中国红豆杉细胞系(SC)。

2.2 3种细胞系的生长周期

2.2.1 细胞鲜重的生长

在固体和液体培养条件下,3种细胞系均能持续分裂和生长增殖。无论是固体培养还是液体悬浮培养,均以中国红豆杉细胞系(SC)倍增率最高,分别为5.5和5.9(见图2:A,B)。新建立的曼地亚红豆杉细胞系(MC)和东北红豆杉细胞系(NC)的倍增率在固体培养的条件下为3.3和4.1,在液体悬浮培养的条件下分别为3.6和4.2。3种细胞在2种条件下培养均呈典型的S型生长曲线。

但在固体培养的条件下,MC和NC进入指数生长期的时间基本上滞后于SC 5 d,液体培养的条件下也滞后3 d,进入平台期的时间则相对较为一致。这可能是由于两种新建细胞系离体培养继代的时间少于中国红豆杉,在较短的适应离体环境的过程中,根据外界环境的变化和营养成分的改变而迅速启动细胞分裂增殖的相关基因和酶类的表达较SC迟钝。

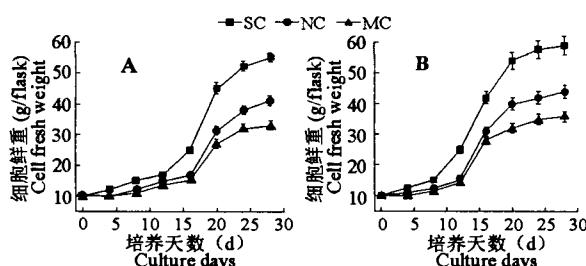


图2 3种细胞系固体培养(A)和液体培养(B)鲜重的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of cell fresh weight of three cell lines in solid state cultivation (A) and in liquid state cultivation (B)

2.2.2 细胞干重的增长

从图2中可以看出,在液体悬浮培养和固体培养两种情况下,MC的细胞鲜重在28 d的生长周期内均明显低于SC和NC。但MC在整个生长周期的前期和中期,其干鲜重的比值是最高的,在后期略低于SC,但始终高于NC(见图3:A,B)。经过计算可以得出MC的最高干鲜重比为1/15.35,NC和SC的依次为1/22.96,1/23.02,这说明MC的细胞中胞质含水量最少。对3种细胞进一步在光学显微镜下观察,随机选取3种细胞各100个,测量其细胞大小,3种细胞大小并无明显差异,细胞直径约为

29 μm 。说明MC细胞中细胞壁、细胞核和其他细胞器占有较大的比例,这可能与MC褐化程度较NC和SC要严重、细胞在生长过程中还要产生大量的酚类化合物和其他次生代谢产物有关。

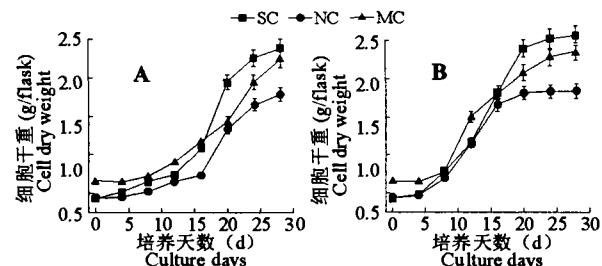


图3 3种细胞系固体培养(A)和液体培养(B)干重的增长曲线

Fig. 3 The growth curve of cell dry weight of three cell lines in solid state cultivation (A) and in liquid state cultivation (B)

2.3 MJ诱导前后3种液体悬浮培养细胞紫杉醇产量和细胞死亡率

从细胞培养的第4 d开始检测紫杉醇,SC在悬浮培养的4~16 d均未检测到紫杉醇,而MC和NC在培养的第4 d即可检测出紫杉醇,并随着培养天数的增加紫杉醇的含量逐渐提高(图4)。到培养的第28 d,MC的紫杉醇产量达到9.7 mg/L,约为细胞干重的0.054%,高于SC经MJ诱导12 d的紫杉醇含量(3.1 mg/L)。用MJ诱导12 d的MC紫杉醇产量高达41 mg/L(图5),约为细胞干重的0.23%。

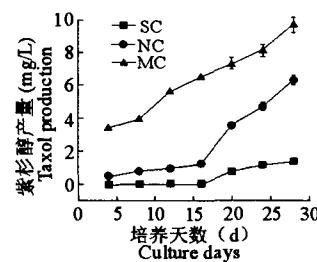


图4 三种细胞系液体悬浮培养紫杉醇产量

Fig. 4 The taxol production of three cell lines in liquid state cultivation

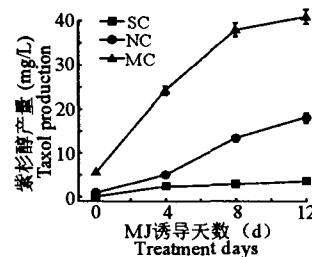


图5 MJ诱导后的紫杉醇产量

Fig. 5 The taxol production after inducing by MJ

实验结果表明,SC 中紫杉醇含量远低于 MC, 同时诱导培养的 NC 中紫杉醇含量也低于 MC。本实验室在 2000 年曾报道,中国红豆杉细胞系在诱导成功一年左右时,紫杉醇含量为 $20 \sim 45 \mu\text{g/g}$ ^[9]。其结果与本实验成功诱导的东北红豆杉细胞系的紫杉醇产量接近,而远低于曼地亚红豆杉细胞系,说明不同种的红豆杉细胞系中紫杉醇含量并不相同。而且一般外植体的紫杉醇含量越高,得到的细胞系中紫杉醇的含量也越高。

除了来源于不同的红豆杉物种的原因外,可能还与不同的离体继代培养时间有关。本实验室的 SC 在不断继代过程中已逐渐适应了外界的生长环境,呈现出良好的生长状态。而紫杉醇是红豆杉为了防御外界侵袭而产生的一种植物抗毒素,是受植物防御基因调控的次生代谢产物^[10],长期在适宜的环境下生长,细胞中启动紫杉醇合成的与植物防御相关的基因可能会发生关闭。SC 中紫杉醇含量低的原因可能也正是由于该细胞系在长期继代的过程中逐渐适应,逐渐驯化,从而紫杉醇含量也逐渐下降。

经 MJ 诱导后,悬浮培养的 MC 的细胞死亡率较 NC 和 SC 高,且随着 MJ 诱导时间的增加,细胞死亡率也在逐渐增加(见图 6)。紫杉醇本身也是一种强烈的凋亡诱导剂,可通过调控细胞的基因表达和一些酶的合成诱导细胞发生凋亡^[11]。从而导致了生长快的细胞系中紫杉醇含量较低,而生长慢的细胞系中紫杉醇含量高^[11,12]。本实验建立的 MC 生长较 SC 慢,但紫杉醇含量远高于后者。两步培养是解决细胞生长与紫杉醇合成矛盾的有效方法^[13]。通过诱导筛选得到高产紫杉醇的细胞株系,不仅能在第一步迅速积累最多的生物量,也能在第二步生产培养过程中通过添加各种前体物质和诱导子快速提高紫杉醇的产量。

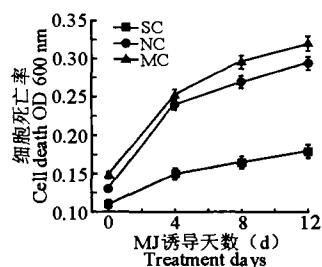


图 6 经 MJ 诱导后的 3 种悬浮培养细胞系的死亡率

Fig. 6 Cell death rate of three kinds of cell line inducing by MJ

3 讨论

新诱导建立的细胞系和继代多年的细胞系无论是在细胞的生长周期、紫杉醇含量和细胞死亡率上都有明显的区别。本研究报道的 MC 是国内首次成功建立的曼地亚红豆杉悬浮培养细胞系,1 个培养周期内紫杉醇的总产量不仅远高于 SC,也高于本实验室同期建立的东北红豆杉细胞系,同样也高于唐丽娟报道的紫杉醇总产量为 0.127 mg/L 和 0.487 mg/L 的细胞系^[14]、甘烦远等报道的紫杉醇产量为 0.02% 的细胞系^[15]。近些年来,一些筛选出的高产细胞系紫杉醇含量达到了细胞干重的 $0.1\% \sim 0.3\%$ ^[16]。本研究中的 MC 在培养 1 个周期后,紫杉醇含量达到细胞干重的 0.054% ,且 MC 在生产较多紫杉醇的同时能够保持细胞旺盛的分裂增殖,在受到 MJ 诱导刺激后又能迅速地促进与紫杉醇合成相关的植物防御基因的启动,使紫杉醇的产量迅速提高。MC 是目前得到的非常有希望进行大规模产业化培养的高产紫杉醇的红豆杉细胞系。

Jaziri M 等^[17]提出若不经常更换高产细胞系,则紫杉醇的产量也会下降且极不稳定。梅兴国等^[18]提出高产细胞系的稳定性问题,一般可分为两种情况:一种是细胞系能够多年稳产高产,另一种是细胞系高产性不稳定,这些细胞系大多必须经过反复不断的筛选才能稳产高产。由于紫杉醇是一种抗有丝分裂剂,在有丝分裂过程中,干扰了细胞的正常分裂,使红豆杉细胞染色体数目发生变异,高产紫杉醇的红豆杉细胞系应属于第二种情况。因此,稳定地保存并不断地筛选高产紫杉醇细胞系已成为细胞培养实现工业化生产最基础、最重要的任务。在今后的研究中,我们将继续利用 MC 的良好性状,利用合理的生产培养基,添加合适的前体物质和诱导子进一步提高紫杉醇的产量,为进行大规模的工业化生产奠定基础。

参考文献:

- [1] Wrick E M, Arteca R V. Methodology for the identification and purification of taxol and cephalomanine from *Taxus callus* cultures [J]. *J Lip Chromatogram*, 1993, 16:3263 - 3274.
- [2] Jennewein S, Croteau R. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57: 13 - 19.
- [3] 马玺,马英,刘威,周东坡. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇 [J]. 药物生物技术,2004,11(6): 401 - 405.

- [4] 谈锋,庞永珍,熊能湘. 北美红豆杉的引种繁殖和叶片中紫杉醇的积累[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2000, 25(4): 448-451.
- [5] Yu L J, Lan W Z, Qin W M, Xu H B. High stable production of taxol in elicited synchronous cultures of *Taxus chinensis* cells[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 38(2): 207-210.
- [6] 张长河,刘华文,梅兴国. 条件培养液对红豆杉细胞生产的促进作用[J]. 生命科学研究, 2001, 5(1): 63-67.
- [7] 余龙江,李为,刘幸福,张晓呈. 担子菌及其木质纤维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.
- [8] 陈超,付春华,姜革民,兰文智. 红豆杉细胞中的酚类化合物含量与紫杉醇产量之间的关系[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(1): 83-87.
- [9] 张长河,梅兴国,余龙江. 红豆杉胚源细胞株的培养和紫杉醇的生产[J]. 华中理工大学学报, 2000, 28(增刊): 82-84.
- [10] Woo D D L, Miao S Y B, Pelayo J C. Taxol inhibits progression of congenital polycentric kidney disease[J]. *Nature*, 1994, 368: 750-753.
- [11] Perid L, Karim C, Nedra O. Phytohormone regulation of isoper-
- oxidases in *Catharanthus roseus* suspension cultures[J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(5): 1219-1225.
- [12] Gan F Y, Zheng G Z. Study on cell culture in *Taxus chinensis* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1996, 18(2): 134-138.
- [13] Bringi V, Kadkade P G, Prince C L. Enhanced production of taxol and taxanes by cell cultures of *Taxus* species [P]. US Patents: 5407816, 1995.
- [14] 唐丽娟. 两种红豆杉属植物细胞悬浮培养生产紫杉醇的初步研究[J]. 淮海工学院学报, 2004, 13(4): 364-369.
- [15] 甘烦远,彭丽萍,郑光植. 云南红豆杉愈伤组织培养及其生产紫杉醇的研究[J]. 生物工程学报, 1996, 12(增刊): 308-311.
- [16] Hu Y M, Gan F Y, Lu C H. Production of taxol and related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus yunnanensis* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(3): 373-379.
- [17] Jaziri M, Zhiri A, Guo Y W. *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey[J]. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1996, 46: 59-75.
- [18] 梅兴国,潘学武,董妍玲. 高产紫杉醇红豆杉细胞系的紫外诱变筛选[J]. 华中科技大学学报, 2001, 29(1): 48-51.

2007年《中国药学文摘》征订启事

《中国药学文摘》(ISSN 1003-3521/CN 11-2529/R)是由国家食品药品监督管理局主管,国家食品药品监督管理局信息中心主办,国内外公开发行的医药科技性专业期刊。月刊,16开本,每期280页左右,每期约80万字。是国内药学期刊中唯一的综合性文摘类刊物。收载国内外公开发行的700余种药学相关学科期刊中的精粹文献。全年定价:476元

《中国药学主题词表》(2007年)征订启事

《中国药学术语词库与主题词表》是科技部的重点科技基础性项目,由国家食品药品监督管理局信息中心组织完成。是我国第一部涵盖药学及其相关学科主题词的主题词表,填补了多年来国内药学词表领域的空白。该书的问世,使药学名词的统一和标准化得以实现,对于药学科学技术知识的传播,图书文献的编辑、出版、标引、编目、建库、查新、文献数据库建设、数据库检索、咨询服务、信息交换和国内外学术交流等起着重要的作用。共收录正式主题词34000多条,非正式主题词近20000条。包括字顺表(主表)、树型结构表以及以下五个辅表:英汉主题词对照表、拉汉中草药及药用植物主题词对照索引表、主题词汉语拼音索引表、副主题词表和文献出版物类型表。

读者对象为医药文献工作者,医药期刊编辑,科研、临床、教学、情报人员及广大用户群。适合于各大中型图书馆、各大中专院校、医药科研事业单位、医药专业媒体、医院图书馆、医药研发及制药企业图书馆和资料室、医药情报信息机构、医药网站等单位收藏和使用。

《中国药学主题词表》(精装本)(上、中、下三册)总计:570元

《中国药学大辞典》(2007年)征订启事

《中国药学大辞典》是我国第一部收录词量最大的药学辞典,收集词汇近30000条,涉及药用动物植物矿物、中药和方剂、药用化学物质、化学药物、药剂学、药剂学、药物化学、中医学和生药学、微生物药学、生物药学、药物分析、药理学和毒理学、医院药学、临床药学、药学史、药事管理、信息科学、药学相关学科和专业、技术和设备、教育学名词等方面内容。堪称我国药学期科的百科全书。该书是中西医药科研、临床、教学、制药、药剂、药政管理等人员必备的工具书和参考书。零售价:352元

单位名称:国家食品药品监督管理局信息中心 通讯地址:北京市西城区北礼士路甲38号(邮编:100810)

开户名称:国家食品药品监督管理局信息中心 开户银行:建设银行北京展览路支行

账号:6510003042610002517 电话:010-62214715, 62214665 传真:010-62214866