

# 溶氧水平对红豆杉细胞悬浮培养的影响研究

罗 杰\* 余 斐 刘 凌 吴诚德 梅兴国

( 华中科技大学生命科学与技术学院 武汉 430074 )

关键词 红豆杉, 紫杉醇, 溶氧控制

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0215-03

紫杉醇(Taxol)是源自红豆杉提取物的一种高度衍生化的二萜类化合物,临床实验结果表明紫杉醇对于卵巢癌、乳腺癌、胃肠道癌等具有明显的抗肿瘤活性<sup>[1]</sup>,因而受到世界各国的广泛关注,并已被美国食品与药品管理局(FDA)批准用于卵巢癌与乳腺癌的治疗<sup>[2]</sup>。到目前为止紫杉醇仍然主要从树皮中提取,但由于红豆杉生长缓慢,天然资源非常有限,加快其替代来源的研究势在必行。利用植物细胞悬浮培养生产紫杉醇作为一种可行的选择,近年来取得了较大的进展<sup>[3-6]</sup>。本文研究了摇瓶及 20-L 反应器培养过程的溶氧水平对细胞生长及紫杉醇合成的影响,可以作为红豆杉细胞培养放大的基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株

实验所用的红豆杉细胞来自 *Taxus chinensis*。

### 1.2 培养基

(mg/L) 6-BA 0.5, NAA 0.5, 2,4-D 0.1, 肌醇 100, 水解乳蛋白 100, 其余同 MS 培养基<sup>[5]</sup>。另加蔗糖 30g/L。

### 1.3 培养条件

1.3.1 摇瓶培养条件:除特别注明外,在 300mL 摇瓶中装入 150mL 培养基,120r/min,25℃ 培养。

1.3.2 反应器培养条件:采用进口全自动 20-L 机械搅拌式反应器,25℃,60r/min 培养。培养过程中的溶氧水平(DO 值以溶解氧的百分饱和度表示,%)由反应器通过自动调节通气量(0.05~0.4vvm)及搅拌转速(60~90r/min)实现。

### 1.4 分析方法

1.4.1 细胞团粒径分布的测定:培养物过 1、2、3、4mm 不锈钢筛网,分别测定各个粒径分布的干重( $w_i$ )由此计算出各粒径分布所占的重量百分比( $E_i$ )。

$$E_i = \frac{w_i}{\sum_{i=0}^4 w_i}$$

1.4.2 细胞鲜、干重测定:培养物经砂芯漏斗真空抽滤,滤饼洗涤、抽滤后称其鲜重,再经真空干燥后测干重。

1.4.3 紫杉醇含量的测定:取 200mg 干细胞用 4mL 甲醇超声萃取 3h(1h×3)。萃取液合并后 5000r/min 离心 5min。上清液用等体积 CHCl<sub>3</sub> 萃取 3 次,减压蒸干,重新溶于甲醇中,0.22μm 滤膜过滤后,用反相 HPLC 测定紫杉醇含量<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 摇瓶培养过程中溶氧水平对细胞生长及紫杉醇合成的影响

2.1.1 摇瓶培养过程中细胞生长及紫杉醇合成的动态变化:细胞经过 4d 的延迟期后进入对数生长期,并于第 16 天后进入减速生长期。干重于第 20 天达到最大(13.0g/L),以后逐渐下降。紫杉醇在细胞生长进入减速期后开始合成,第 24 天达到最大,为 3.9mg/L。继续延长培养时间,紫杉醇含量迅速下降,至第 32 天时仅为 0.8mg/L。与 Fetto-Neto 等<sup>[7]</sup>的实验结果不同的是,在这里我们观察到紫杉醇的积累与细胞的生长呈部分相关性,此结果与 Srinivasan 等<sup>[8]</sup>的结果一致。

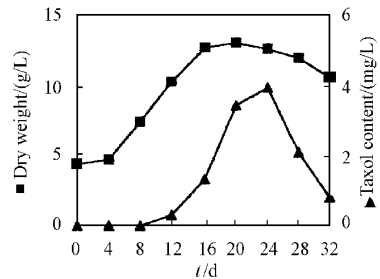


图 1 摇瓶培养过程中细胞生长及紫杉醇合成动力学

Fig. 1 Kinetics of biomass and taxol production in shake flasks

2.1.2 不同转速下细胞生长及紫杉醇合成:不同转速条件下培养时,细胞团颗粒大小分布见表 1,细胞生长及紫杉醇

积累见表 2。

表 1 显示 粒径为 1~2mm 的细胞占整个细胞的比例较大,这与植物细胞有成团的趋向有一定关系。随着转速的增加,细胞团的分布有向小粒径方向移动的趋势,说明转速的增加使细胞的分散度提高。

表 1 不同转速下细胞团粒径分布

Table 1 The size distribution of cells under different rotating speeds

Rotating speed (r/min)	$E_r/mm$				
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5
60	0.04	0.29	0.39	0.15	0.13
90	0.12	0.33	0.34	0.11	0.10
120	0.15	0.42	0.25	0.10	0.08
150	0.16	0.44	0.21	0.09	0.06
180	0.23	0.45	0.20	0.07	0.05

表 2 转速对细胞生长及紫杉醇合成的影响

Table 2 The effect of rotating speed on cell growth and taxol production

Rotating speed (r/min)	60	90	120	150	180
DW/(g/L)	8.6	9.5	11.5	11.8	12.0
Taxol/(mg/L)	2.2	3.0	4.0	2.4	1.5

当转速在 60~180r/min 时细胞生长随着摇瓶转速的增加而增加,但转速大于 120r/min 后生物量的变化不大,说明较高的溶氧水平有利于细胞的生长。近年来关于植物细胞对剪切力非常敏感的观念有所改变<sup>[9]</sup>,我们所用的细胞经过长期的诱导及驯化后其抗剪切能力较强,细胞生长并未因剪切力增强而受到很大影响。紫杉醇含量在转速为 120r/min 时达到最大,为 4.0mg/L。继续增大转速紫杉醇含量下降,至 180r/min 分时仅为 1.5mg/L(表 2)。由于紫杉醇的积累主要集中在细胞生长后期(图 1),因此紫杉醇含量随转速的显著变化可能有两个原因:

(1) 细胞在生长后期时对剪切力较为敏感,过高的剪切力虽未造成细胞的死亡或破裂,却使细胞的生理状态发生了变化,阻碍了紫杉醇的合成。不同转速下细胞粒径的变化与细胞生理状态的关系及对紫杉醇合成的影响有待进一步研究。

(2) 由于细胞在生长后期对氧的需求降低,造成溶氧水平显著增加,而后期过高的溶氧水平对紫杉醇积累不利。

2.1.3 改变培养基装量的细胞生长及紫杉醇合成的影响:在 300mL 摇瓶中装入 50mL 培养基,培养 14d 后,合并部分摇瓶,使摇瓶中培养基分别为 50、100、150mL,其余条件均相

同,再培养 10d 后收获细胞,结果(见图 2)显示:随着摇瓶中培养基装量的提高,细胞干重并无明显变化,说明后期供氧的降低对细胞的生长影响不大,这一点可由第 16 天后细胞开始进入减速生长期得到解释。与生物量的变化不同的是,增加培养基装量对紫杉醇的产量有明显的促进作用。说明在细胞生长进入减速期后低供氧量有助于紫杉醇在细胞内的积累。

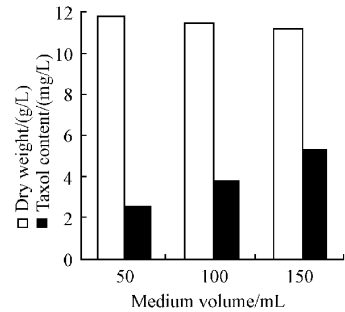


图 2 摇瓶培养后期培养基装量对细胞生长及紫杉醇合成的影响

Fig. 2 The effect of medium volume in the late phase on the biomass and taxol production in shake flasks

在摇瓶研究的基础上,我们进行了 20L 反应器培养过程的溶氧水平控制研究。

## 2.2 反应器培养过程的溶氧控制

2.2.1 不同溶氧水平下细胞紫杉醇合成:当 DO 值大于 20% 时细胞干重显著增加。紫杉醇含量及比紫杉醇含量均在 DO 为 40% 时达到最大,分别为 3.6mg/L 及 0.33mg/g。DO 为 60% 时紫杉醇含量与 DO 为 40% 时接近,细胞干重有一定增加。DO 为 20% 及 80% 时紫杉醇含量均较低(表 3)。

表 3 反应器培养过程中不同溶氧水平下生物量及紫杉醇含量

Table 3 The effect of dissolved oxygen level on cell growth and taxol production in bioreactor

DO (%)	DW (g/L)	Taxol (mg/L)	STC (mg/g DW)
20	6.2	1.9	0.31
40	10.9	3.6	0.33
60	12.2	3.4	0.28
80	12.5	1.7	0.14

(DO: Dissolved oxygen; DW: Dry weight; STC: Specific taxol content)

2.2.2 两段式溶氧控制及其优化研究:反应器培养过程中前期控制 DO 为 60%,第 14 天后改变不同的溶氧水平,结果见表 4。在细胞培养后期控制不同的溶氧水平时生物量差别不大,但不同的溶氧水平却对紫杉醇的合成有显著影响。DO 在 20%~40% 时紫杉醇含量明显高于 DO 在 60%~80% 的水平,紫杉醇含量分别达到 7.2mg/L 及 6.7mg/L。

表 4 培养后期溶氧控制对细胞生长  
及紫杉醇合成的影响

Table 4 Effect of DO control during the second  
phase of the cultivation on cell growth and  
taxol production by *Taxus chinensis*

DO (%)	DW (g/L)	Taxol (mg/L)	STC (mg/g DW)
20	11.0	7.2	0.65
40	11.5	6.7	0.58
60	11.9	3.1	0.26
80	12.1	2.0	0.17

(DO Dissolved oxygen ; DW Dry weight ; STC Specific taxol content)

溶氧控制影响紫杉醇合成的原因还不清楚,但我们观察到当培养后期处于高溶氧水平(DO 值为 80%)时,培养液呈现出棕红色,与 Pestchanker 等<sup>[10]</sup>观察到的结果一致,说明细胞培养后期的高溶氧可能会导致代谢途径转向酚类物质的合成从而不利于紫杉醇的合成。后期控制低溶氧水平对紫杉醇合成的促进作用可能是因为低溶氧所造成的部分缺氧胁迫在一定程度上促进/启动了紫杉醇的合成,从而提高了紫杉醇的含量,其确切原因有待进一步研究。

#### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Holmes F A , Kudelka A P , Kavanagh J J *et al.* Current status of clinical trials with paclitaxel and docetaxel. In : Georg T T ed. Taxane anticancer agents( ACS Symposium Series 583 ). American Chemical Society. Washington DC. 1995 **99** 31~57
- [ 2 ] Rowinsky E K , Cazenave L A , Donehower F C. Taxol : a novel

investigational antimicrotubule agent , *Journal of the National Cancer Institute* , 1990 **82** : 1 , 1247~1259

- [ 3 ] Jaziri M , Zhiri A , Guo Y W *et al.* *Taxus sp.* cell , tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production : A literature survey , *Plant Cell , Tissue and Organ Culture* , 1996 **46** ( 1 ) 59~75
- [ 4 ] Pezzutto J. Taxol production in plant cell culture comes of age , *Nature Biotechnology* , 1996 **14** ( 9 ) : 1083~1087
- [ 5 ] Murashige T , Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures , *Plant Physiology* , 1962 **15** ( 4 ) 473~497
- [ 6 ] Witherup , K M , Look , S A , Stasko , M W *et al.* High performance liquid chromatographic separation of taxol and related compounds from *Taxus brevifolia* , *J Liquid Chromatography* , 1989 **12** ( 11 ) 2117~2123
- [ 7 ] Fetto-Neto A G , Wen Y Z , DiCosmo F. Kinetics of taxol production , growth , and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata* , *Biotechnology and Bioengineering* , 1994 **44** ( 2 ) : 205~210
- [ 8 ] Srinivasan V , Pestchanker L , Moser S *et al.* Taxol production in bioreactors : Kinetics of biomass accumulation , nutrient uptake , and taxol production by cell suspensions of *Taxus baccata* , *Biotechnology and Bioengineering* , 1995 **47** ( 6 ) 666~676
- [ 9 ] Kieran , P M , MacLoughlin , P F , Malone , D M *et al.* Plant cell suspension cultures : Some engineering considerations , *Journal of Biotechnology* , 1997 **59** ( 1~2 ) 39~52
- [ 10 ] Pestchanker L J , Roberts S C , Shuler M L. Kinetics of taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and a Wilson-type bioreactor , *Enzyme and Microbial Technology* , 1996 **19** ( 4 ) 256~260

## Effect of Dissolved Oxygen on the Suspension Culture of *Taxus chinensis*

LUO Jie YU Fei LIU Ling WU Cheng-De MEI Xing-Guo

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

**Abstract** The effect of dissolved oxygen controlled level on the taxol production by suspended cell culture of *Taxus chinensis* was examined in shake flasks and in a 20L aerated and agitated bioreactor with a six-flat-bladed turbine. It was found in shake flasks that oxygen supply exhibited significant influence on the production of taxol. Further investigation in bioreactor showed that only 1.5mg/L taxol was produced when DO( dissolved oxygen ) level was 20%. Taxol production increased when DO level was increased to 40%~60%. Moreover , taxol accumulation was remarkably improved by the cultivation of cells initially at the DO level of 60% during the growth phase for 14 days followed by changing the DO level to 20%~40% during the taxol production phase for another 10 days. An optimum taxol level of 7.2mg/L was obtained by the dissolved oxygen controlled process.

**Key words** *Taxus chinensis* , taxol , dissolved oxygen level control

Received July 5 2000

This work was supported by Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development ( 96-c02-03-1 ) .

\* Corresponding author. Tel 86-27-87543633 ; Fax 86-27-87543833 ; E-mail jie\_luo@163.net <http://journals.im.ac.cn>