

云南红豆杉愈伤组织培养及其生产紫杉醇的研究

甘烦远 彭丽萍 郑光植

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

从红豆杉科红豆杉属植物如短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)等的树皮或枝叶提取到的紫杉醇(Taxol)是一种具有强抗癌活性的二萜烯类化合物^[1]。作为一种治疗晚期卵巢癌、乳腺癌的新药已经在欧美等一些国家被批准上市,成为迄今从植物中提取的最有效的抗癌药之一^[2]。但由于紫杉醇在红豆杉中的含量很低,为万分之一左右,因此药源来源非常困难^[3,4]。近年来研究取代从红豆杉树皮来提取紫杉醇的方法如紫杉醇的化学合成、半合成,从真菌中提取紫杉醇以及改善红豆杉的栽培措施等等均已取得了较大进展,但离实际应用还相差太远^[5,6]。而利用组织和细胞培养方法替代砍伐天然红豆杉树皮来提取紫杉醇,也已成为近几年来红豆杉研究的一个重要课题之一并已取得了较大进展^[7]。

云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)主要分布于我国云南省,是分布于我国的主要品种之一,其含量在我国现有的几种红豆杉植物中属于较高的一种^[3],在我国,近些年来亦有不少实验室在红豆杉细胞培养方面取得了较好的成绩,但文献报道的较少^[8-10]。本文报道利用云南红豆杉细胞培养方法来生产紫杉醇,以最终取代从天然来源的树皮和枝叶中提取的可能性,对云南红豆杉进行的愈伤组织的诱导和培养研究的进展。

1 材料和方法

1.1 愈伤组织诱导

供试植物材料云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)取自本所植物园。取其嫩枝条(当年生)及针叶片,清水洗净后,滤纸压干,用0.2%升汞消毒10min,于超净工作台上无菌操作将材料剪成长约1.0~1.5cm的切段,常规方法进行愈伤组织诱导。诱导培养基为MS、B5和6,7-V等3种固体培养基,并附加不同的植物激素或其组合。培养基的琼脂粉含量为0.6%,pH5.8左右,培养温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,于黑暗中培养。

1.2 愈伤组织培养

分离诱导出的愈伤组织,于B5基本培养基上,进行培养基及植物激素的筛选试验。愈伤组织接种于含20ml固体培养基的50ml三角瓶中,每个三角瓶接种量约为50mg(干重)左右,愈伤组织每35d继代1次。

1.3 紫杉醇的HPLC分析

收集冰冻干燥的愈伤组织,甲醇提取,提取液蒸干,少量水溶解,二氯甲烷萃取,萃取液蒸干,甲醇溶解,定溶后进行HPLC分析,HPLC分析条件如下:岛津LC-3A HPLC色谱仪,Spherisorb C6H5($10\mu\text{m}$, $4 \times 250\text{mm}$)分析柱(中科院大连物化所)。检测波长228nm。以甲醇:乙腈:水(2:3:8)为流动相。

1.4 细胞生长及紫杉醇的含量测定

培养细胞的生长速率以每天每升培养基增加的细胞干重克数表示 $[(\text{g/L}\cdot\text{d})]$,计算公式如下:

$$\text{细胞生长速率}(\text{g}(\text{L}\cdot\text{d})^{-1})[\text{g/L}\cdot\text{d}] = \frac{\text{收获细胞干重}(\text{g}) - \text{接种细胞干重}(\text{g})}{\text{培养基体积}(\text{L}) \times \text{培养时间}(\text{d})}$$

中国科学院“八五”重点科研项目。

本文于1995年3月21日收到。

紫杉醇的含量以百分率(%)表示。根据进样量与峰面积的关系,以双点外标法进行紫杉醇的 HPLC 含量测定。以上实验结果至少 3 次重复,结果取其平均值。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织诱导

不同培养基对云南红豆杉外植体的愈伤组织诱导有不同的效果,在所试验的 B5、MS 和 6,7-V 3 种培养基中,以 MS 培养基为佳(表 1)。在 MS 培养基上,试验了不同植物激素种类及其组合对云南红豆杉外植体愈伤组织诱导的影响。结果见表 1:添加 2,4-D 或含 2,4-D 的激素组合,对诱导外植体形成愈伤组织效果较好。在 MS 培养基中附加 $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA} + 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}2,4\text{-D} + 0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}$ 和植物激素,可使云南红豆杉的愈伤组织诱导率达到最高,其中嫩枝条的愈伤组织诱导率达到 100%,针叶的诱导率达到 78%。外植体接种大约 3 周左右,开始形成愈伤组织,由云南红豆杉嫩枝条诱导出的愈伤组织颜色较浅,为灰白色或淡黄色,亦较分散,生长较好;而由针叶诱导出的愈伤组织,颜色较深,多为棕色,成团,较硬,生长较差。云南红豆杉的外植体在进行愈伤组织诱导时,会向培养基分泌棕红色的色素,但并未影响其诱导率。因此采用一年生的嫩枝条作为诱导愈伤组织的外植体,愈伤组织的诱导率较高,生长亦较快。

表 1 云南红豆杉愈伤组织的诱导

Table 1 Inducing of callus from *Taxus yunnanensis*

Medium and hormone combination /mg·L ⁻¹	Rate of callus inducing/%	
	twig	needle
6,7-V+2,4-D(2.0)+KT(0.1)	54	31
B5+2,4-D(2.0)+KT(0.1)	66	45
MS+2,4-D(2.0)+KT(0.1)	84	60
MS+2,4-D(1.0)+NAA(1.0)+KT(0.5)	84	53
MS+2,4-D(1.0)+NAA(1.0)+KT(0.1)	100	78
MS+2,4-D(1.0)+IAA(1.0)+BA(0.1)	75	62
MS+IAA(2.0)+BA(0.5)	30	10
MS+NAA(2.0)+KT(0.5)	42	28

2.2 愈伤组织培养及驯化

虽然在 MS 培养基上云南红豆杉的愈伤组织诱导率较高,但在该培养基上,愈伤组织的生长却较差(表 2)。不同的培养基及植物激素对比对云南红豆杉愈伤组织的生长影响很大。试验结果表明(表 2),在 B5 培养基中附加 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}2,4\text{-D} + 0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}$ 激素条件下,由嫩枝条而来的愈伤组织的生长较好,而在其它种类的培养基及植物激素配比下,愈伤组织生长均较差。这些结论与一些有关红豆杉组织培养的文献报道的相近^[7]。在所试验的 3 种培养基中,愈伤组织均具有合成紫杉醇的能力(图 1,表 2),其中以 MS 培养基稍好。

针叶的愈伤组织生长仍较差,生长率较高的亦只有 $0.13\text{g}(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$,在以后的继代培养中已逐渐死亡。因此在以后的实验中,我们采用的试验材料均为由云南红豆杉嫩枝条诱导出的愈伤组织。在愈伤组织的每次继代培养时,均挑选生长旺盛、疏松的新鲜愈伤组织作为接种的“种子”。在继代过程中,由嫩枝条诱导而来的愈伤组织在经过大约 10 代的不断筛选之后,愈伤组织被驯化形成了生长及性状均比较一致并稳定的无性系(图 2)。愈伤组织生长速率平均为 $0.30\text{g}(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$,紫杉醇含量平均为 0.014%。愈伤组织中紫杉醇的含量与云南红豆杉树皮的含量相似,但比枝叶的含量高。在以后的继代过程中,这种愈伤组织无性系生长较快,较分散,浅黄红色或棕黄色,愈伤组织培养 35d 左右,其与培养基的接触面开始形成棕黑色,出现老化现象。同时在继代培养中,亦会有棕色色素分泌到培养基中,但分泌的色素含量与细胞生长无明显的相关性。

表 2 云南红豆杉愈伤组织培养

Table 2 Culture of callus from *Taxus yunnanensis*

Medium and hormone combination /mg·L ⁻¹	Growth rate/g·(L·d) ⁻¹		Taxol content/% (twig)
	twig	needle	
6, 7-V + 2, 4-D(2.0) + KT(0.1)	0.18	0.06	0.008
MS + 2, 4-D(2.0) + KT(0.1)	0.20	0.10	0.017
B5 + 2, 4-D(2.0) + KT(0.1)	0.30	0.13	0.014
B5 + 2, 4-D(1.0) + NAA(1.0) + KT(0.1)	0.20	0.10	0.010
B5 + 2, 4-D(1.0) + NAA(1.0) + KT(0.5)	0.18	0.09	0.015
B5 + 2, 4-D(1.0) + IAA(1.0) + BA(0.1)	0.10	0.05	0.011
B5 + IAA(2.0) + BA(0.5)	0.15	0.05	0.007
B5 + NAA(2.0) + KT(0.5)	0.15	0.05	0.010

2.3 愈伤组织的生长周期

云南红豆杉嫩枝条的愈伤组织的生长周期为 35d 左右(图 3)。愈伤组织的生长延缓期时间较长,约 16d 左右;第 18~32d,进入生长的指数生长及对数生长周期;此后进入稳定期。过了稳定期之后,愈伤组织很快衰老,变为棕黑色,其生长曲线与一般植物愈伤组织的生长曲线相似。紫杉醇含量曲线与愈伤组织生长曲线不同,在培养的 30d 之前,紫杉醇含量一直很低,紫杉醇最高含量出现在培养的 35d 左右,此后随着愈伤组织的衰老而下降。因此愈伤组织的收获时间应为 35d 左右。

2.4 有机添加剂对愈伤组织生长的影响

在培养基中附加椰子汁(CM, 10%),水解酪蛋白(CA, 0.1%)等有机添加剂可使云南红豆杉的愈伤组织生长得更快,并且可以使愈伤组织保持更长时间的旺盛生长。其中椰子汁的效果比水解酪蛋白的效果更好,愈伤组织生长率分别达到 0.33 和 0.30g(L·d)⁻¹,分别比对照(生长率为 0.27g(L·d)⁻¹)增加 22.2 和 11.1%(表 3)。有机添加剂对紫杉醇含量的影响不是很显著。

经过以上的一些研究,得到了云南红豆杉

表 3 有机添加剂对云南红豆杉愈伤组织的影响

Table 3 The influence of organ additives on callus from *Taxus yunnanensis*

Organ additive	Growth rate/g·(L·d) ⁻¹	Taxol content/%
CM(10%)	0.33	0.012
CA(0.1%)	0.30	0.018
Control	0.27	0.015

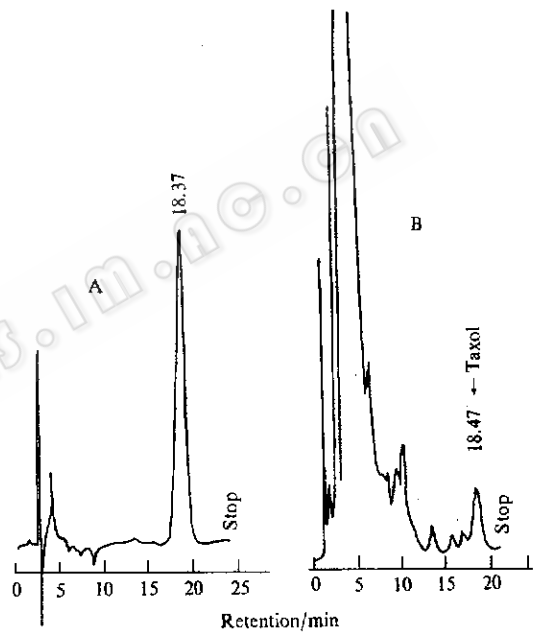


图 1 云南红豆杉培养细胞中紫杉醇的高效液相色谱图

Fig. 1 The HPLC chromatogram of taxol in the culture cells from *Taxus yunnanensis*

A. Standard, B. Callus

愈伤组织培养的较好的培养条件、培养系统及较适宜的收获时间。使愈伤组织的生长率达到了较快的水平,但愈伤组织中紫杉醇的含量仍然较低。因此有今后的研究中,应以提高紫杉醇的含量为主要目标。改变培养条件、加入合成前体或生物转化、筛选高产细胞株等等措施都有可能使紫杉醇在细胞中的含量大大提高。

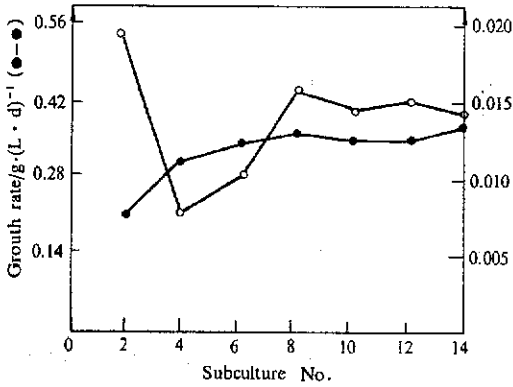


图2 云南红豆杉愈伤组织的继代过程

Fig. 2 The subculture process of the callus from *Taxus yunnanensis*

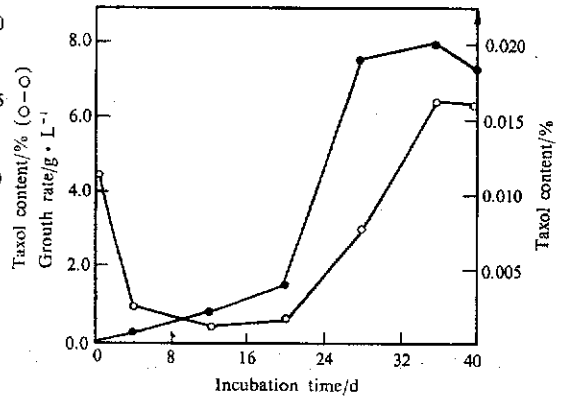


图3 云南红豆杉愈伤组织的生长周期

Fig. 3 The growth charge of the callus from *Taxus yunnanensis*

○—○Taxol content, ·—·Growth rate

参 考 文 献

[1] Wani M C, Taylor M C, Wall M E *et al.* J Am Chem Soc, 1971, **93**:2325~2327.
 [2] 张桂兰, 中国新药杂志, 1995, **4**:3~5.
 [3] 罗士德, 宁冰梅, 阮德春等. 植物资源与环境, 1994, **331**~33.
 [4] Vidensek N, Lim P, Campbell A *et al.* J Nat Prod, 1990, **53**:1609~1610.
 [5] 陈毓享, 程克棣. 国外医学药学分册, 1994, **21**:36~39.
 [6] Nicolaou K C, Yang Z, Liu J J *et al.* Nature, 1994, **367**:630~634.
 [7] 甘烦远, 郑光植. 国外医药植物药分册, 1994, **9**:156~159.
 [8] 甘烦远, 郑光植, 彭丽萍等. 细胞生物学杂志, 1995, 增刊 I:53.
 [9] 高山林, Towers G H N. 中国药科大学学报, 1994, **25**:321~324.
 [10] 孙安慈, 巩志忠, 叶亚平等. 细胞生物学杂志, 1995, 增刊 I:54.

Studies on Callus Culture and Its Taxol Production of *Taxus yunnanensis*

Gan Fanyuan PengLiping Zheng Guangzhi

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract Callus could be induced from twigs and needles from *Taxus yunnanensis*. Synthesis for taxol in callus was analyzed by HPLC method. A callus strain with stable growth rate and taxol yield was selected by successively subcultured and habituated for above 10 generations. Its growth rate and taxol content had reached 0.30 g/L · d and 0.014% respectively. Some regulating conditions including different medium, different kinds of hormones and their concentrations, different organ additives and others were studied. From them, the culture condition and culture system which was more suit for callus was set up. Also, the most suitable harvest time of callus was found by investigated the growth charge of callus and the synthesis process of taxol.

Key words *Taxus yunnanensis*, taxol, callus induced and culture, callus strain