

云南红豆杉细胞培养中紫杉醇的代谢调控*

甘烦远 彭丽萍 郑光植

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

METABOLIC REGULATION ON TAXOL OF CELL CULTURE FROM TAXUS YUNNANENSIS

GAN Fan-Yuan, PENG Li-Ping, ZHENG Guang-Zhi

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)

关键词 云南红豆杉, 细胞培养, 紫杉醇, 代谢调控

Key words *Taxus yunnanensis*, Cell culture, Taxol, Metabolic regulation

在前期对云南红豆杉愈伤组织及细胞悬浮培养的研究基础上, 对提高培养细胞中紫杉醇含量的方法包括加入诱导子、生物合成前体以及代谢抑制剂等进行了研究。现报告如下。

材料与方 法

细胞培养 实验材料为已连续继代 25 代以上的云南红豆杉愈伤组织无性系。细胞培养方法及条件见前文(甘烦远等, 1995)。

生长速率测定 以每 d 每 L 培养基增加的细胞干重 g 数, 即 g/L.d, 表示细胞的生长速率。实验重复不少于 3 次, 结果取其平均值。

紫杉醇的含量测定 按我们建立的 HPLC 法测定培养细胞中紫杉醇含量(甘烦远等, 1996), 并以%表示。结果亦为 3 次重复的平均值。

试剂的配制及用法 人参寡糖素(Ginseng-oligosaccharin, 简称 GO)由本实验室从新鲜人参培养细胞制备而来, 可直接溶于水并与培养基一起高压灭菌使用(甘烦远, 郑光植, 1995); 苯丙氨酸(Phe)、亮氨酸(Leu)、氯化胆碱(Chlorocholine chloride, 简称 CCC)用水溶解后, 巴苦亭Ⅲ(Baccatin Ⅲ)用吐温-80 混溶后, 通过细菌过滤膜过滤, 然后加入到已灭菌的培养基中。

结 果 与 讨 论

人参寡糖素对培养细胞的作用

在云南红豆杉的悬浮培养细胞中, 加入不同浓度人参寡糖素的试验结果表明, 5.0 mg/L 的人参寡糖素不仅可提高培养细胞的生长率(比对照增加 36.7%), 而且还大大提高紫杉醇的含量(比对照增加 3 倍), 并且可使紫杉醇分泌到培养基的比例增加(表 1), 其比例由对照的 30% 提高到处理后的 50% 左

*中国科学院“八五”重点项目

1995-11-21 收稿, 1996-01-12 修回

右。加入 1.0 mg/L 的人参寡糖素亦有明显的效果, 但高浓度(10.0 mg/L)的人参寡糖素作用不明显。诱导子能增加红豆杉培养细胞中紫杉醇含量的研究亦有一些报道(Chang 等, 1994; Christen 等, 1991)。

加入紫杉醇生物合成前体的效果

加入紫杉醇生物合成的不同前体的试验结果表明: 添加适宜浓度的 Phe、Leu 或 Baccata III 均能提高紫杉醇的含量(表 2)。100 mg/L 的 Phe 以及 20 mg/L 的 Baccata III 均能使紫杉醇的含量提高 1 倍左右; 而 50 mg/L 的 Leu 亦能使紫杉醇含量增加 30% 以上。添加前体对培养细胞的生长率作用不大。我们的研究结果为进一步深入研究紫杉醇的生物合成途径打下了基础。

表 1 人参寡糖素对云南红豆杉培养细胞的作用

Table 1 Effects of ginseng-oligosaccharin on culture cells of *Taxus yunnanensis*

Ginseng-oligosaccharin concentrations(mg/L)	Growth rate (g/L.d)	Taxol content(%)		
		in cell	in medium	total
0	0.26	0.019	0.007	0.026
1.0	0.32	0.032	0.015	0.047
5.0	0.35	0.038	0.041	0.079
10.0	0.27	0.022	0.003	0.025

表 2 不同浓度前体对紫杉醇合成的影响

Table 2. Effects of different concentrations of preseuors on taxol synthesis

Concentrations (mg/L)	Growth rate (g/L.d)	Taxol content(%)		
		in cell	in medium	total
0	0.28	0.015	0.010	0.025
Phe(25)	0.27	0.018	0.012	0.030
Phe(50)	0.30	0.017	0.015	0.032
Phe(100)	0.27	0.032	0.015	0.047
Leu(50)	0.29	0.014	0.020	0.034
Baccata III(20)	0.27	0.022	0.032	0.054

添加代谢抑制剂的效果

在培养基中添加抑制甾体合成的代谢抑制剂的试验结果表明: 添加适宜浓度的 CCC 对紫杉醇的含量亦起到提高作用。5.0 mg/L 的 CCC 可使紫杉醇含量提高 60% 以上(表 3)。但高浓度的 CCC 反而抑制紫杉醇的合成。CCC 对细胞的生长作用影响不大。

培养细胞中紫杉醇产生的最佳培养条件

在上述各单因素研究的基础上, 我们对之进行了一些组合试验, 结果表明: 在云南红豆杉的细胞悬浮培养中, 在添加 5.0 mg/L 人参寡糖素及 10 mg/L Baccatin III 的条件下, 悬浮培养细胞的生长速率达到最高, 为 0.35 g/L.d(即 10.5g/L)。同时, 培养细胞中紫杉醇含量亦达到最高水平, 为 0.109%, 与单因子的 GO 或 Baccatin III 不同, 在两者的组合试验中, 只有约 40% 的紫杉醇分泌到培养基中。在其他单因素的组合试验中, 紫杉醇的含量亦有不同程度的提高(表 4)。

表 3 不同浓度氯化胆碱对紫杉醇形成的影响

Table 3 Effects of different concentrations of CCC on taxol production

Concentrations (mg/L)	Growth rate (g/L.d)	Taxol content(%)		
		in cell	in medium	total
0	0.26	0.015	0.010	0.025
5.0	0.31	0.020	0.021	0.041
25.0	0.29	0.015	0.010	0.025
50.0	0.25	0.014	0.008	0.022
75.0	0.26	0.009	0.007	0.016

表 4 云南红豆杉的最佳悬浮培养条件

Table 4 The optimum suspension culture condition of *Taxus yunnanensis*

Culture combination* (mg/L)	Growth rate (g/L.d)	Taxol content(%)		
		in cell	in medium	total
0	0.30	0.015	0.012	0.027
GO(5)+BAT(10)	0.35	0.062	0.047	0.109
GO(5)+BAT(20)	0.30	0.044	0.036	0.080
GO(5)+Phe(100)	0.31	0.041	0.028	0.069
GO(5)+CCC(5)	0.28	0.050	0.024	0.074

* 基本培养基为 B5 + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KT.

缩写: BAT = Baccatin III.

参 考 文 献

- 甘烦远, 郑光植, 彭丽萍等, 1995. 红豆杉细胞培养及其生产紫杉醇的研究. 细胞生物学杂志, 增刊 I: 53
- 甘烦远, 郑光植, 1995. 寡糖素对红花及三七培养细胞的生理作用. 植物学通报, 12(3): 36~40
- 甘烦远, 郑光植, 彭丽萍等, 1996. 红豆杉培养细胞中紫杉醇的HPLC测定. 色谱, 14: (4): 306~307
- Chang C I, Heinstei P, Wang M, *et al*, 1994. Taxol and taxanes production from cell culture of *Taxus brevifolia*. Abstracts VIII the International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, Italy, 242
- Christen A A, Gibson D M, Bland J, 1991. Production of taxol or taxol-like compounds with *Taxus brevifolia* callus cell cultures. US Patent, 5019504