

取,但这一方法费用远高于 LLE法 其它各种在线的处理技术大都需要专门的装置,在药动学研究需对大批量样品处理时则实验费用显然太高。

胶束荧光技术是利用表面活性剂在水溶液中能聚集形成胶束,刚性荧光分子在胶束中形成分子探针而起到增溶、富集和增敏的技术,能够提高测定的灵敏度,除此之外,还有设备要求不高的优点,但需多步提取,并通过大量实验选择表面活性剂。有报道曾设计乌头碱-胶束荧光分子模型和磺胺甲基异噁唑-胶束荧光分子模型均未获成功^[15]。薄层分析作为一种中药血样本预处理方法具有提取后干扰物质少的优点,但操作繁琐、时间长、常使用有毒的有机试剂等。

水浴法作为一种新方法,尚有待进一步开发,但它提示人们要重视中药成分中兼有水溶性的成分,诸如甘草甜素、芍药苷等相当一部分可溶于水。热水或沸水中,符合溶解度一般随温度升高而增大的规律。笔者根据“相似相溶”原理推测,对那些极性较强的植物药成分,水可能具有一定的溶解性。同时,这一方法与中药传统的服用高温水煎液的实际情况相一致,且可多成分一次提取。因此,此法可能更接近方剂进入体内的有效成分作用情况,可能更为适合方剂的血样预处理。步骤简单、无毒、价廉,同时大批量处理无乳化现象,无需特别设备,这是该法突出的优点,作者认为进一步研究会有广泛的应用前景。

2.2 意义: 血样预处理方法是中药药动学血药浓度法的重要组成部分。药动学是一门借助先进仪器设备,利用动力学原理和方法,用数学模型反映药物在

体内经时过程的一门定量化科学^[16]。血药浓度法的贡献在于提供了较为精确而严谨的研究方法。中药方剂血样本是一复杂体系,预处理乃是将其“白化”的过程。因此,改进预处理方法可能使更多的有效成分得到研究,特别是有关中药体内成分谱和靶成分的研究^[17],从而有助于揭示药效物质基础及其作用机制。

参考文献

- 1 黄教成. 药学报, 1987, 9(2): 31
- 2 庞志功, 汪宝琪. 西安医科大学学报, 1997, 18(3): 417
- 3 潘国宇, 刘晓东. 中草药, 1998, 29(9): 462
- 4 黄熙, 任平, 张莉, 等. 中草药, 1999, 30(3): 175
- 5 黄熙, 陈可冀. 中医杂志, 1997, 38(12): 745
- 6 Yukihiro O, Mamora N, Hiroyuki K, *et al.* Yakugaku Zasshi, 1990, 110(1): 77
- 7 Rie M, Takeshi M, Masahiro N, *et al.* Yukugaku Zasshi, 1998, 118(3): 79
- 8 汪宝琪, 庞志功, 曹治权. 西安医科大学, 1993, 14(3): 226
- 9 庞志功, 汪宝琪, 张清. 分析化学, 1993, 21(12): 1417
- 10 汪宝琪, 庞志功, 朱慧勤. '92中国药理学杂志岛津杯全国药物分析优秀论文评选论文集. 北京: 中国药理学杂志社, 1992: 208
- 11 庞志功, 汪宝琪, 李生有. 西安医科大学学报, 1993, 1(4): 346
- 12 Masato H, Kitaro O, Tadashi Y, *et al.* Anal Biochem, 1992, 202: 179
- 13 Masato H, Kitaro O, Chizu T, *et al.* Biome Chromatogr, 1997, 11: 125
- 14 黄熙. 第三届生命科学青年学者研讨会论文摘要汇编. 西安, 1998: 94
- 15 汪宝琪, 庞志功. 西北药学分析杂志, 1993, 8(2): 90
- 16 黄圣凯. 药代动力学. 南京: 南京药学院出版社, 1980: 3
- 17 黄熙. 第四军医大学学报, 1999, 20(4): 277

(1999-11-24收稿)

2000-04-07修回)

红豆杉细胞培养生产紫杉醇的研究进展[△]

河北师范大学生命科学学院(石家庄 050016) 庄晓蕾* 张秀清 于树宏 王刚**

摘要 利用红豆杉细胞培养技术生产紫杉醇是目前的研究热点之一,并已取得了较大进展。就近年来在红豆杉细胞培养及紫杉醇生产方面的研究进展进行简要论述,主要包括代谢机制、细胞培养条件、代谢调节等几部分,其中着重介绍了促进紫杉醇代谢的基本方法。

关键词 紫杉醇 细胞培养 关键酶 前体 诱导子

紫杉醇 (paclitaxel, 商品名为 Taxol) 是存在于红豆杉科红豆杉属 (*Taxus* L.) 植物中的一种四环二萜酰胺类化合物^[1], 由于其对癌症的独特疗效而日益受到人们关注。随着对紫杉醇需求的日益增加,

仅靠从红豆杉树中直接提取已不能满足目前的需要,因此,对其他途径的开发就显得尤为必要,细胞培养就是其中一条很重要的途径。利用离体培养的红豆杉细胞生产紫杉醇,一方面能加强对红豆杉野

* Address: Zhuang Xiaolei, College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang
庄晓蕾 女, 24岁, 河北师范大学生命科学学院硕士研究生, 主要从事植物细胞培养和次生代谢研究。

** 联系人

△河北省自然科学基金资助项目 No. 300162

生资源及其生态环境的保护,另一方面又大大缩短供需间差距,并且细胞培养繁殖率高,培养条件易于优化和控制,产物较易分离,从长远来看,这是解决紫杉醇供需矛盾的最佳途径。

紫杉醇是具有细胞毒的次生代谢产物,红豆杉细胞在正常生理条件下很难大量合成^[2],若要大幅度提高细胞中紫杉醇含量,进行其生物合成的代谢调控将是决定性的措施。植物的次生代谢产物积累是产物形成、运输、贮藏、循环、降解之间动态平衡的结果,只有详细了解其代谢途径、中间代谢酶以及调节手段等,才能达到有效调控代谢、促进紫杉醇大量合成的目的。笔者简要论述近年来红豆杉细胞培养中在紫杉醇代谢机制及生产方面的研究状况。

1 代谢途径

1.1 主链: 1992年, Zamir等^[3]利用同位素示踪法发现紫杉醇由甲羟戊酸经异戊二烯途径衍生而来。它与其他萜类一样,首先经历从焦磷酸异戊烯酯(IPP)到牻牛儿苗牛儿焦磷酸酯(GGPP)的共同途径(图1),然后GGPP环化为一个紫杉烷类中间体,经氧化、酰化反应,最终合成紫杉醇^[4]。

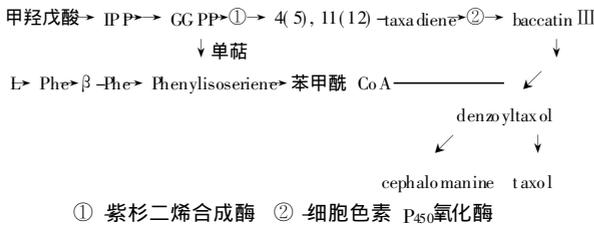


图1 紫杉醇代谢途径

紫杉醇四环二萜骨架形成的第一步反应是由直链烷类向环状萜类的转化;第二步是一个羟基化反应。1995年, Croteau等确认二萜环化酶(即紫杉二烯合成酶)催化GGPP环化为紫杉二烯;同时还推断依赖于NADPH和O₂的细胞色素P₄₅₀氧化酶促进紫杉二烯[4(5), 11(12)-taxadiene]C-5位的羟化,从而生成5-hydroxy-4(20), 11(12)-taxadiene^[6]。他们的研究结果恰好与Koepf等一致。Flemming等^[7]提出baccatin III就是紫杉醇的直接前体,它的C-13位羟基与侧链结合发生酯化反应形成终产物——紫杉醇,该观点得到大多数人的认同。但近来对于紫杉醇的直接前体问题人们产生争议。Srinivasan等^[8]发现baccatin III主要存在于胞质中,而紫杉醇在质粒中聚集。当baccatin III的合成被抑制时,紫杉醇的合成并不受影响。由此判断baccatin III极有可能不是紫杉醇的直接前体,而是它合成中的可逆分支路径,或者说不是紫杉醇唯一

的直接前体。Ketchum等^[9]在最新报道中提出紫杉醇的直接前体可能是baccatin VI或13-acetyl-9-dihydrobaccatin III,并发现后者具有潜在的医疗价值。但这方面的工作还有待进一步确证。

1.2 侧链: 自从1996年Leete等报道紫杉醇的侧链来自苯丙氨酸(Phe)以来,人们一直认为Phe经桂皮酸合成侧链。Flemming等^[7]在实验中使用Phe-β-Phe和苯基异丝氨酸(phenylisoseriene)作为前体,发现均能结合到紫杉醇上,而桂皮酸却不能,由此确认Phe首先在氨基变位酶的作用下形成β-Phe, C-2位再发生羟化反应生成phenylisoseriene。其苯甲酰部分与baccatin III结合生成去苯甲酰紫杉醇(denzoyltaxol),进而合成紫杉醇。

红豆杉细胞中紫杉醇的三环二萜骨架类前体分子相对于紫杉醇来说较为丰富,且向培养基中加入侧链前体能显著促进紫杉醇合成^[10],这说明侧基与侧链的生物合成是十分重要的限速步骤。

1.3 关键酶: 在紫杉醇代谢的关键酶中,尤以紫杉二烯合成酶的研究较多,亦较为深入。早在1992年, Lewis等人就从太平洋紫杉*T. brevifolia*树皮中得到了它的粗提液,经实验证实能够催化GGPP环化为4(5), 11(12)-taxadiene。1995年, Hezari等^[11]又从非洲红豆杉幼树中纯化到紫杉二烯合成酶,并进一步研究了其结构和性质。该酶是一个单体,分子量7.5 × 10⁵,最适pH值为8.5,高于大部分萜类环化酶。它与所有的萜类环化酶一样,也需要二价金属离子来束缚底物中的阴离子焦磷酸基团,辅助完成反应的离子化,它对Mg²⁺的依赖性最强。进一步研究发现,酶活性部位附近的His和Cys残基极大地影响该酶活力,而Arg残基在维持蛋白质结构方面起重要作用。紫杉二烯合成酶活性很低且不受伤害诱导,当加入一系列生物或非生物诱导子后,虽然紫杉醇含量有所提高,但此酶活性并未被高水平诱导,因此它是紫杉醇合成中的重要限制因子之一。目前,已成功克隆到紫杉二烯合成酶的cDNA片段^[5,12],并获得了具有活性的蛋白质。它能催化由GGPP到4(5), 11(12)-taxadiene的反应,分子量为98 000,大于纯化的天然紫杉二烯合成酶。但至今还没有关于该cDNA片段导入红豆杉细胞后对紫杉醇含量影响的报道。

细胞色素P₄₅₀氧化酶也是紫杉醇代谢的一个重要限速酶,pH最适为中性,活性易被CO抑制。它能够催化4(5), 11(12)-taxadiene羟化为baccatin III,该反应需要O₂和NADPH^[6],是一个慢速反应。

细胞色素 P₄₅₀氧化酶是紫杉醇合成中的又一重要限制因子。

2 培养条件

自 Christen 等^[13]首先报道利用红豆杉细胞培养的方法生产紫杉醇以来,现已从多种红豆杉(如 *Taxus chinensis* *T. cuspidata* *T. brevifolia* *T. canadensis* *T. media* *T. baccata* 等)的外植体诱导出愈伤组织,实验中普遍发现树皮、幼茎等部位较易诱导出愈伤。常用的培养基多为改良 B₅培养基,它较适于愈伤组织的诱导和以后的培养^[14]。近期有报道使用改良的 MS 和 TA 培养基能够维持细胞正常生长^[15,2]。Gibson 等^[14]发现最初外植体中紫杉醇浓度并不影响愈伤组织的诱导,且与后来的生长率关系不大。培养过程中,细胞对于外界条件(如细胞起始密度、继代周期、温度等)非常敏感^[16],它们细微的变化直接影响细胞的正常生长。

Fett-Neto 等^[17]选用 B₅ SH MS SHN 等几种培养基同时培养红豆杉细胞,结果发现细胞在 MS 培养基中生长速度最慢,但紫杉醇产量却明显高于其它培养基中的细胞。因此,认为 MS 培养基较适于紫杉醇的合成,可以作为两相培养中生产培养基的基础。

培养基中的糖浓度直接影响细胞干重和紫杉醇产量。通过对细胞营养吸收动力学的研究,发现细胞继代后培养基中葡萄糖和果糖浓度快速上升,一般在继代 6~7 d 后达到高峰。由此说明,培养基中的碳水化合物首先水解为果糖和葡萄糖用于吸收^[18,19],因此,果糖和葡萄糖可能较适于细胞的生长,果糖能促进紫杉醇合成的某一限速步骤。高浓度蔗糖能够促进紫杉醇的合成^[20],并且随着蔗糖浓度的升高,细胞干重也相应增加,同时干鲜比由 1/14 提高到 1/7,但葡萄糖却不具该效应^[21]。

培养基中氮源的还原态和氧化态的相对含量对细胞生长影响很大。Fett-Neto 等^[18]认为细胞的生长主要以 NO₃⁻作为氮源,而高浓度 NH₄⁺则会抑制生长。高浓度的 NH₄NO₃可使细胞生长速率提高 1~2 倍^[31]。另外,气体的浓度与细胞对营养物质的吸收关系密切,因而也相应地影响细胞的生长和紫杉醇的合成。高浓度 CO₂或乙烯均抑制细胞对钙的吸收,而促进对磷的吸收。Mirjalili 等^[22]发现,10% O₃ 0.5% CO₂和 5 mol/L 乙烯联合使用时,可显著提高紫杉醇含量。

植物激素的种类及浓度对细胞的生长、代谢均有很大影响。张宗勤等提出以添加 1.0 mg/L NAA

及 0.5 mg/L BA 替代 2,4-D 效果较好^[15]。KT 和 6-BA 单独使用均不能促进细胞生长,但 6-BA 在缓解褐变上有一定作用^[31]。Fett-Neto 等^[17]向培养基中添加 0.5 mg/L GA₃,细胞生长量提高近 1 倍。甘烦远等认为提高激素浓度能有效缓解褐变,更全面地研究植物激素对细胞代谢的影响,将是有效提高细胞产量的重要措施。

大量研究表明,红豆杉细胞的生长周期中存在两个紫杉醇分泌高峰,一个发生在转培后的延迟期,另一个位于对数生长期后的静止期^[18,23],由此可见细胞的快速生长与紫杉醇的大量生产并不同步进行,而呈现负相关,原因可能是:(1)代谢过程中碳利用的分歧;(2)关键酶的低活性;(3)缺乏合适的贮藏部位或运输机制;(4)产物降解失调^[18]。另外,由于紫杉醇的微管聚合作用,能够明显地改变植物或动物的细胞形态,因此对其自身的细胞生长也有影响。

针对紫杉醇合成的特性,有人提出使用两相法来培养红豆杉细胞^[17,23],以期缓解生长与生产之间的冲突。所谓两相法就是使细胞的生长和生产分别不同的培养基中进行,以便使二者均能获得较好的培养条件,目的产物在生产培养基中富集,不仅能够提高产量,而且简化了后续处理工作。这是一个很有前途的实验构想。此外,吴兆亮等^[24]采用植物细胞培养-分离耦合技术生产紫杉醇,使用两液相培养红豆杉细胞取得了一定成果,发现油酸、邻苯二甲酸二丁酯是红豆杉细胞培养体系的良好有机溶剂,可将紫杉醇产量提高 3~4 倍。这种方法能够促使代谢产物及时释放到胞外,进而被有机溶剂萃取、吸收,从而减少对细胞生长的反馈抑制作用,同时也保护产物免受分解,也是提高紫杉醇产量的一个关键技术。

3 代谢调节

3.1 前体饲喂: 前体饲喂细胞一方面可通过增加底物量来加快反应速度和提高产率,另一方面还能够反馈抑制分支路径而促进反应顺利进行,有效提高紫杉醇产量。

Fett-Neto 等^[25]在培养中选用了多种前体: Phe 苯甲酸、苯甲酰甘氨酸、Gly、Ser 等,发现它们不论在愈伤培养还是悬浮培养中均能显著促进紫杉醇合成。在液体培养基中加入 0.05 mmol/L 苯甲酰甘氨酸,紫杉醇产量可高达对照的 500%,这是该实验的最佳结果。另外,苯甲酸、Phe 的作用效果也较好,愈伤培养中紫杉醇产量分别为对照的 4.6 倍、2.25 倍;而悬浮培养时,分别提高了 2~3 倍、1

~ 3倍。认为苯甲酸可能结合到紫杉醇的侧链上, 亦或提供苯甲酰基团, 促使 C₃侧链上 phenylisoserine 发生酰化反应; Ser-Gly 能够进入莽草酸途径, 促进 Phe 和苯甲酸的合成; 苯甲酰甘氨酸也可水解为苯甲酰和 Gly 两部分, 从而间接促进紫杉醇的合成。

此外, 余龙江等^[2]采用正交实验证实 Phe 与乙酸铵联合使用效果较好, 二者的最适浓度分别为 10 和 5 mg/L。乙酸铵能够进入甲羟戊酸途径并参与紫杉醇母核基因的形成, 而 Phe 是侧链合成的前体, 因此它们具有较好的协同效应。当 Phe 与真菌诱导物联合使用时, Phe 消耗增多、加快, 细胞中紫杉醇含量显著提高^[26]。

牻牛儿醇和蒎烯也是很有前途的前体添加物。牻牛儿醇在培养基中可以转化为 GGPP^[16]; 蒎烯是单萜代谢过程中的关键产物, 它的积累可反馈抑制单萜合成^[2, 16], 从而使紫杉醇合成有更充足的底物源。但是它们水溶性差, 极大地影响了细胞的吸收, 给应用带来一定难度。

前体饲喂虽然能够提高紫杉醇产量, 但对细胞生长的促进作用并不明显^[27, 28], 这方面的工作仍有待进一步研究。

3.2 添加诱导子: 紫杉醇是二萜类化合物, 与植物防卫系统对抗昆虫和病原菌侵袭产生植保素的合成路径有部分重叠, 诱导子能够通过刺激植物防卫系统而促进紫杉醇的代谢, 形成更有利的产物分布, 同时诱导产物分泌入培养基。

茉莉酮酸甲酯 (methyl jasmonate) 是植物次生代谢中重要的信号传导物, 也是一个非常灵敏的诱导子。Ketchum 等^[9]在不同培养时间加入不同浓度的 methyl jasmonate, 发现均能促进紫杉醇合成, 只是增加量略有不同。其中, 以继代培养 7 d 后加入 100 μmol/L 作用效果最为明显, 产量可达 14.4 mg/L。Yukihito 等^[29]的工作又进一步证实 methyl jasmonate 对紫杉醇有很强的增产作用, 而对 baccatin III 和 cepholamanine 作用不显著。另外将茉莉酮酸 (jasmonate acid) 南瓜酸甲酯 (methyl cucurbitate) 同型茉莉酮 (cis-jasmonone) 与之比较使用, 发现只有 jasmonate acid 有一定作用。

花生四烯酸的诱导效果也较好^[30], 浓度为 5 μg/g 时即可将紫杉醇含量提高 9.3 倍, 而 baccatin III 量不增加。花生四烯酸的这种特异促进作用在细胞培养中十分重要^[8]。

一些生物或非生物诱导子 (如座线孢属、青霉菌

属、硫酸钬、3, 4-二氯苯氧基胺等) 在提高紫杉醇的产量的同时, 能诱导紫杉醇向培养基中分泌^[31]。元英进等^[32]成功地应用真菌诱导子促进愈伤组织中紫杉醇的生产; 50 μg/mL 的橘青霉菌丝提取物能够显著提高指数生长期的细胞的紫杉醇产量^[33]。另有报道红豆杉细胞与赤霉菌之间存在交互诱导效应。经红豆杉细胞壁、细胞浆诱导后的赤霉菌对红豆杉细胞生产紫杉醇能力的诱导作用显著增强。这主要由于交互诱导增加了赤霉菌细胞壁水解物——相关糖类的诱导作用^[34]。

迄今为止在红豆杉细胞的代谢机制和培养方面均取得了一定成果, 为今后的进一步研究奠定了基础, 但前景仍不容乐观。在紫杉醇的生产体系中存在一个关键矛盾, 即细胞增殖与产物积累间的冲突; 并且细胞生长状况及生产能力变化很大, 难于控制^[16, 21, 19], 极大地限制了培养工作。Bringi 等^[23]提出的在生长和生产两个不同的体系中培养细胞, 一方面筛选出高产稳产的细胞系, 另一方面调节细胞的代谢能力, 可望解决上述矛盾。

目前, 虽然已有人进行了一定规模的小试、中试, 但离工业化大规模生产还有相当大的距离, 主要原因在于缺乏关于紫杉醇生产的基础研究。因此, 今后要进一步探讨影响紫杉醇生物合成的因子, 促使这一药用植物资源的研究与开发早日走上工业高科技化道路。

参考文献

- 1 Srinivasan V, Pestchanker L, Moser S, *et al.* Biotech Bioeng, 1995, 47: 666
- 2 余龙江, 李为, 梅兴国, 等. 生物技术, 1999, 9(1): 4
- 3 Zamir L O, Nedeia M E, Garneau F X. Tetrahedron Lett, 1992, 33: 5235
- 4 Koepf A E, Hezari M, Zajicek J, *et al.* J Biol Chem, 1995, 270(15): 8686
- 5 Wildung M R, Croteau R. J Biol Chem, 1996, 271: 9201
- 6 Hefner J, Rubenstein S M, Croteau R. Chem Biol, 1996, (36): 479
- 7 Flemming P E, Knaggs A R, He X G, *et al.* J Am Chem Soc 1994, 116: 4137
- 8 Srinivasan V, Giddi V, Bringi J, *et al.* Biotech Prog, 1996, 12: 457
- 9 Ketchum R E B, Gibson D M, Croteau R B, *et al.* Biotech Bioeng, 1999, 62(1): 97
- 10 Croteau R, Hefner J, Hezari M, *et al.* Curr Top Plant Physiol, 1995, 15: 95
- 11 Hezari M, Lewis N G, Croteau R. Archives Biochem Biophys, 1995, 322 (2): 437
- 12 Lin X Y, Hezari M, Koepf A E, *et al.* Biochem, 1996, 35: 2968
- 13 Christen A A, Bland J, Gibson D M. Proc Am Assoc Cancer Res, 1989, 30: A2252
- 14 Gibson D M, Ketchum R E B, Vance N C, *et al.* Plant Cell Rep, 1993, 12: 479

- 15 张宗勤,杨建英,吴耀武. 西北植物学报, 1998, 18(4): 488
- 16 Hrasuna T J, Peatchanker L J, Srinivasan V, *et al.* Plant Cell Tiss and Org Cul, 1996, 44 95
- 17 Fett-Neto A G, Melanson S J, Sakata K, *et al.* Bio Technol, 1993, 11 731
- 18 Fett-Neto A G, Zhang W Y, Dicosmo F, Biotech Bioeng, 1994, 44 205
- 19 Wickremesinha E R M, Arteca R N, J Plant Physiol, 1994, 144 183
- 20 甘烦远,郑光植,袁丽萍,等. 植物生理学报, 1997, 23(1): 43
- 21 Ketchum R E B, Gibson D M. Plant Cell Tiss Org Cul, 1996, 46 9
- 22 Mirjalili N, Linden J C. Biotech Bioeng, 1995, 48 123
- 23 Biringi V, Prakash G. WO Patent 17121, 1993
- 24 吴兆亮,元英进,胡萍,等. 中草药, 1998, 29(9): 589
- 25 Fett-Neto A G, Melanson S J, Nicholson S A, *et al.* Biotech Bioeng, 1994, 44 967
- 26 Dai Q L, Xingguo M ei, Lu Ming Bo. 华中理工大学 1997年研究生学术年会优秀论文集, 1997 170
- 27 李家儒,曹孟德,刘曼西,等. 植物研究, 1999, 19(3): 356
- 28 甘烦远,彭丽萍,郑光植. 云南植物研究, 1996, 18(4): 451
- 29 Yukihiro Y, Tabata H, Higashi Y, *et al.* Nature Biotech, 1996, 14 1129
- 30 Ciddi V, Srinivasan V, Shuler M J. Biotech Lett, 1995, 17(12): 1343
- 31 Christen A A, Gibson D M, Bland J. US Patent 5019504, 1991
- 32 元英进,董芳,韩金玉,等. 迎接 21 世纪新的挑战——第七届全国生物化学学术会议论文集. 北京: 北京工业出版社, 1996 537
- 33 李家儒,刘曼西,曹孟德,等. 植物研究, 1998, 18(1): 78
- 34 荆迎军,刘曼西,柯铁,等. 生物技术, 1998, 8(4): 21

(1999-12-14 收稿)

药用植物发根培养及发根培养器[△]

广州暨南大学生物工程系 (510632) 徐明芳*

摘要 分析了发根培养技术生产次级代谢产物及发根培养器(反应器)在中药领域的国内外研究动态,表明药用植物发根培养的基础理论研究已远远超过了发根培养器的应用研究,而药用植物发根培养生产次级代谢产物的工业化前景则主要取决于多功能发根培养器的研制成功。

关键词 发根培养 药用植物 发根培养器

80年代后期,在植物细胞培养技术领域中出现一项发状根(hairy roots)培养的新技术。它是发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 含有的 Ri-质粒中的 T-DNA 片段整合到植物细胞的 DNA 上,诱导出发状根,从而建立起毛状根培养系统。目前世界上许多国家如美国、英国、日本、韩国及中国等都对中药植物和农用植物进行了大量深入的发根培养的基础理论研究。实验证明,毛状根培养系统具有发根生长迅速、不需要外源性生长激素、生产次级代谢物高和遗传特性稳定等特点,这是细胞培养和一般器官培养所不能兼备的,因此,几乎所有双子叶植物中由根部合成的次级代谢物大多数都可以用毛状根来生产,为利用发根培养技术生产药用重要植物次级代谢物(如紫杉醇、抗疟疾青蒿素等药物)及食品天然色素、香精香料开辟了新的途径^[1]。然而利用发根培养器对毛状根培养研究却远远落后于发根培养的基础研究,目前除日本、英国、南朝鲜等各国研究人员在发根培养器方面进行了一些基本的实验研究外^[2-5],发根培养用于大规模生产药用植物次级代谢产物并正向工业化的发展方向几乎为空白,

因此中药植物发根培养生产药用植物次级代谢产物能否实现产业化,则关键取决于发根培养器的研制成功。发根培养器已成为制约发根生物技术应用与医药和农业领域的关键因素,大规模植物发根培养生物反应器的研究迫在眉睫。

1 药用植物发根培养系统与次级代谢物生产

植物细胞培养的最大问题是培养中的细胞遗传和生理的高度不稳定性,细胞间的不一致性,在培养过程中高产菌株不能实现高产率,且易形成遗传变异产生其他代谢产物,造成生长周期长,收得率低,生产成本低,阻碍了其工业化的发展前景。然而,自80年代后期国内外大力开展研究发根培养技术生产次级代谢产物以来,由于发根处于器官化的分化状态,这往往有利于次生代谢物的形成和积累,并能够合成许多悬浮细胞所不能合成的物质,生理生化、遗传特性也相当稳定,在医药行业受到广泛的重视^[6]。目前已有不少的药用植物被诱导并产生了发根,且次生代谢物的含量与植物细胞培养相比也大大提高。

天花粉为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kir-*

* Address: Xu Mingfang, Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou

徐明芳 副教授,博士后,1996年毕业于华南理工大学食品与生物工程学院,获工学博士学位,1996-1998年在华南师范大学生物学博士后工作站专职研究两年,现任暨南大学生物工程系教师。主要研究方向是光生物反应器及其在生物领域中的应用和环境生物生物技术等。

[△]本项目由广东省自然科学基金资助 (NO: 980022)