

# 红豆杉细胞培养过程中抗褐变剂研究进展

李冬杰<sup>1</sup>, 魏景芳<sup>1\*</sup>, 张进献<sup>2</sup>, 李世杰<sup>3</sup>, 刘颖<sup>1\*</sup>

(1. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018; 2. 河北省林业局, 河北 石家庄 050081; 3. 河北农业大学生命科学学院, 河北 保定 070001)

**摘要:** 利用红豆杉细胞培养技术直接分离得到紫杉醇是解决紫杉醇供需矛盾的最佳途径之一。如何减轻和控制细胞培养过程中发生的褐变问题, 又成为细胞培养法成败的关键因素。现就近几年来红豆杉细胞培养法生产紫杉醇过程中有关抗褐变剂方面的研究, 从愈伤组织诱导、继代及细胞悬浮培养 3 个环节分别进行了简要论述。

**关键词:** 红豆杉属; 愈伤组织; 细胞悬浮培养; 抗褐变剂

**中图分类号:** R282.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2004)07-0834-03

## Advances in study on antibrowning reagents in cell culture of *Taxus L.*

L I Dong-jie<sup>1</sup>, W E I Jing-fang<sup>1</sup>, Z H A N G Jin-xian<sup>2</sup>, L I Shi-jie<sup>3</sup>, L U Ying<sup>1</sup>

(1. Department of Life Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. Forestry Bureau of Hebei, Shijiazhuang 050081, China; 3. Department of Life Science, Hebei University of Agriculture, Baoding 071001, China)

**Key words:** *Taxus L.*; callus tissue; cell suspending culture; antibrowning reagents

紫杉醇(taxol)是从红豆杉属(*Taxus L.*)植物中分离出来的一种具有抗肿瘤活性的二萜生物碱, 现已成为临床上治疗乳腺癌和卵巢癌的重要药物。但由于红豆杉属植物资源十分有限, 且生长非常缓慢, 体内紫杉醇含量又极低, 所以紫杉醇的药源问题一直是人们关注的焦点<sup>[1,2]</sup>。利用红豆杉细胞培养技术直接分离得到紫杉醇是解决紫杉醇供需矛盾的最佳途径之一<sup>[3,4]</sup>。但在红豆杉组织及细胞培养过程中常常发生褐变现象, 轻者影响细胞生长和繁殖, 重者导致细胞死亡<sup>[5,6]</sup>。所以如何减轻和控制褐变的发生、发展, 就成为红豆杉组织培养中重要的研究内容。

由于红豆杉培养细胞发生褐变的原因复杂, 与材料的基因型、生理状态、培养基成分及激素配比等因素有关<sup>[7]</sup>, 因此为防止、减轻褐变, 除了选择合适的外植体、培养基和适宜的激素组合外, 添加抗褐变剂是方便有效的常规手段。本文就近几年来红豆杉细胞培养法生产紫杉醇过程中有关抗褐变剂方面的研究进展, 分别从红豆杉愈伤组织诱导、继代培养及细胞悬浮培养 3 个环节进行简要论述。

### 1 褐变机制

褐变包括酶促褐变和非酶促褐变。目前认为植物组织培养中的褐变主要是由酶促引起的。酶促褐变必须具有酶、底物和氧 3 个条件。引起褐变的酶有多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)等, 但最主要的是 PPO<sup>[8]</sup>, 它使植物组织细胞中含有的酚类物质氧化成棕褐色醌类, 从而产生酶促褐变。醌类累积的结果, 抑制了细胞中多

种酶的活性, 使细胞生长受到抑制<sup>[9]</sup>。红豆杉属植物的褐化也是由于愈伤组织、培养细胞形成的酚类物质氧化所致。另外, 紫杉醇是次生代谢物, 次生代谢途径与植物防御反应的一部分途径相重叠, 从而会进一步加重褐变的程度<sup>[7,9]</sup>。

### 2 抗褐变剂

由于 PPO 是一种含铜离子的蛋白质, 因此, 寻找良好的抗褐变剂可从 3 个方面入手: (1) 用将 Cu<sup>2+</sup> 络合掉使酶失活的物质, 如植酸(PA)和乙二胺四乙酸钠盐(EDTA)等; (2) 加入与酶蛋白和底物的结合部位能够结合的酶抑制剂, 从而抑制醌类的产生; (3) 加入能减少酚类或使醌类还原的物质, 如活性炭(AC)、抗坏血酸(Vc)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等。由于不同物种的 PPO 存在着性质上的差异, 适宜不同植物抗褐变剂也会有所不同<sup>[7]</sup>。黄浩等<sup>[10]</sup>首先进行了红豆杉细胞 PPO 性质的研究, 从培养的细胞中提取 PPO, 以分光光度法研究了 PPO 最适条件、动力学性质及抑制剂对酶活性的影响。为寻找抑制该酶活性的有效抑制剂, 防止或延缓红豆杉培养细胞褐变提供了理论依据。在细胞法生产紫杉醇的过程中抗褐变剂的筛选研究已有不少学者涉足。

2.1 愈伤组织诱导: 红豆杉是木本裸子植物, 由于其本身所具有的特殊性质, 诱导愈伤组织比较困难。一般而言, 以幼茎、形成层或树皮诱导愈伤组织的最好, 诱导率亦高, 其他的外植体诱导能力较差或根本不能诱导愈伤组织<sup>[2]</sup>。红豆杉愈伤组织诱导中的褐化现象与常见的木本植物培养初期发生的褐化不同, 后者通过选用较小的外植体、频繁继代可

\* 收稿日期: 2003-10-23

作者简介: 李冬杰(1966—), 女, 河北承德人, 硕士, 河北科技大学生物科学与工程学院副教授, 研究方向为药用植物组织培养与细胞工程。 Tel: (0311)8632642 E-mail: LDJ618@163.com

\* 通讯作者 T E: (0311)6617322 E-mail: WJF @h b t d

以克服且以后不会发生<sup>[11]</sup>。而就红豆杉而言,无论何种外植体来源的愈伤组织,常连续发生褐变,严重时抑制细胞的增殖生长,以致死亡<sup>[5]</sup>。所以人们尝试在培养基中添加一些抗褐变剂来解决这一问题。康强胜等<sup>[12]</sup>是最早报道在愈伤组织诱导的培养基中加入 0.015~0.03 g/L PVP 或 1 g/L AC 或 1 g/L Vc 可以防止愈伤组织变黑。夏铭等<sup>[5]</sup>报道,使用抗氧化、吸附剂等多种方法,都只能减轻褐化。但王关琳等<sup>[13]</sup>以东北矮紫杉 *T. cuspidate* Sieb. et Zucc. var. 的幼叶、幼茎为外植体,在 WPM 培养基中添加硫代硫酸钠、AC、Vc、PVP、二巯苏糖醇(DTT)5 种抗氧化剂,都有不同程度的解褐化作用,愈伤组织诱导率明显高于对照,愈伤组织褐化死亡率都显著低于对照,其中 PVP 较优。

2.2 愈伤组织继代:红豆杉属植物细胞培养都是用愈伤组织建立起来的,所以维持愈伤组织的长期培养是该研究的基础。愈伤组织的褐化是妨碍其长期继代培养的主要因素<sup>[3]</sup>。

韩金玉等<sup>[14]</sup>提出在愈伤组织继代培养基中添加一些还原剂和酚类吸附剂等可以部分解决组织褐化问题。赵芳等<sup>[15]</sup>在研究南方红豆杉 *T. chinensis* var. *mairei* (Lemee et Levl.) Cheng et L. K. Fu 愈伤组织生长过程中,在 MS 培养基中分别附加了 AC、Vc 或水解酪蛋白(CA)等,未能彻底解决褐化问题。盛长忠<sup>[16]</sup>等也利用南方红豆杉的愈伤组织,分别添加了不同浓度的 AC、Vc 或 CA,但用的是 B5 培养基,30 d 后观察培养基和愈伤组织的褐化程度,结果三者都能比较明显地抑制 POD 和 PPO 活性,减轻培养基和愈伤组织的褐化程度,促进愈伤组织的生长。此外,还证明添加一定量的赤霉素(GA<sub>3</sub>)、脱落酸(ABA)、果糖或葡萄糖外源物质也能明显地减轻褐化。

在东北矮紫杉愈伤继代培养中,添加 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、AC、Vc、PVP、DTT 等抗氧化剂,都有减轻褐化的作用<sup>[13]</sup>。但陈永勤等<sup>[3]</sup>在解决云南红豆杉 *T. yunnanensis* Cheng et L. K. Fu 愈伤培养褐化试验中,提出了 L-谷氨酰胺和桂皮酸的解褐化作用。即在植物细胞的氮代谢中,谷氨酰胺是转移氨基的重要中间体,它与谷氨酸构成一个转移氨基的谷氨酰胺-谷氨酸循环;桂皮酸是植物细胞中苯丙烷类物质代谢的关键酶—苯丙氨酸裂解酶的抑制剂,可以阻止黄酮和类黄酮类植物色素的形成。红豆杉属植物愈伤组织的褐化可能与其细胞中谷氨酰胺—谷氨酸循环受阻及黄酮和类黄酮类的形成有关。所以在培养基中同时添加 0.30 mg/L L-谷氨酰胺和 0.074~0.22 mg/L 桂皮酸则改善了愈伤组织的严重褐化现象而使其能长期培养继代。

2.3 细胞悬浮培养:在红豆杉细胞培养过程中,尤其是在继代培养及高产细胞株的筛选过程中,遇到的一个突出问题也是褐化现象,严重时细胞停止生长直至死亡<sup>[17]</sup>,阻碍紫杉醇的生物合成。

黄浩<sup>[10]</sup>首先研究 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、ABA、EDTA、PVP、NaCl、Vc、二乙基二硫代氨基甲酸钠、苯甲酸几种试剂对红豆杉 *T. chinensis* (Pilg.) Rehd. PPO 酶活性的影响。结果显示,NaCl、苯甲酸、二乙基二硫代氨基甲酸钠为强抑制剂。接着

黄浩等<sup>[7]</sup>专门进行了抗褐变剂的筛选,研究了 8 种试剂对红豆杉愈伤组织的传代细胞株的抗褐变影响,结果证实:以 AC(1 g/L)、水解乳蛋白(60 mg/L)和 PA(1 g/L)3 种试剂抗褐变效果较好,PPO 相对活性较低,褐变等级为 0 级;Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和枸橼酸(Cit)效果最差,褐变等级为 4 级,而 Vc(200 mg/L)、半胱氨酸(1×10<sup>-3</sup> mol/L)和 ABA(2.5 mg/L)抗褐变效果一般。之后,他们<sup>[18]</sup>又进一步研究了 CA 及 Vc 对红豆杉细胞培养的影响,发现 0.08% 的 AC、高浓度的 Vc 对红豆杉细胞生长有促进作用,其 POD 活性强,鲜重大,而 PPO 活性弱,褐变强度小,褐变等级低。

在中国红豆杉细胞继代培养中,梅兴国等<sup>[17]</sup>证明,加入 DTT 和 Cit 的培养细胞褐变明显减轻,且生长速度也高;Vc 和半胱氨酸(Cys)有一定的抗褐变效果,但不如 DTT 和 CA;Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 抗褐变的效果最差,细胞的褐变强度几乎与对照相近;吸附剂 AC 效果最好,细胞生长指数最高,而 PVP 在对数生长期以前加入时防褐变和生长情况均比较好。梅兴国等<sup>[19]</sup>又重点报道了 AC 对细胞悬浮培养褐变的抑制作用,优化出 AC 培养基(2% AC),确定了 AC 加入的最佳时间为对数生长期;并与 PVP 进行了比较,结果 AC 对褐变的抑制和对生长的促进均优于 PVP。

在东北红豆杉 *T. cuspidate* Sieb. et Zucc. 细胞培养过程中,胡风庆等<sup>[20]</sup>发现:Vc、NaCl、Cit、苯甲酸、亚硫酸钠、草酸、苯酚为 PPO 抑制剂(以 Vc 抑制程度最强),可有效抑制 PPO 的活性,降低褐化,促进细胞培养物的生长,经 30 d 培养的细胞鲜重增长明显高于对照组;而添加 PVP、CA、椰乳、硫酸铜,可有效促进 PPO 的活性,加重褐化,抑制细胞培养物的生长。在东北矮紫杉细胞培养中,王关琳等<sup>[13]</sup>证实 PVP 解除褐化作用最好,优于 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、AC、Vc 等其他抗氧化剂。

### 3 问题与展望

3.1 使用各种添加剂包括抗氧化剂、吸附剂或其他抑制剂等对解决红豆杉的褐化问题都有不同程度的作用。但因实验材料、所用培养基及添加浓度不同,其作用各有差异,甚至出现相反的效果。例如,就 PVP 而言,以东北矮紫杉为材料,在 WPM 培养基中添加 1.0 mg/L PVP,愈伤组织诱导、继代及细胞培养过程中均表现优,能有效地减轻褐变<sup>[13]</sup>;而以东北红豆杉为材料,在 B5 培养基中添加 2.0% PVP,进行细胞培养,反而有效促进 PPO 的活性,加重褐化,抑制细胞鲜培养物的生长<sup>[20]</sup>。其主要原因与材料存在着不同的酚类物质,而 PVP 又存在不同相对分子质量的类型有关<sup>[21]</sup>。但培养基的成分是否对抗褐变剂作用的发挥也有一定的影响,有待进一步研究。

3.2 在筛选红豆杉抗褐变剂过程中,其适宜浓度的选择也是非常重要的。例如,AC 是一种吸附性较强的无机吸附剂,能吸附各种微量物质和微小颗粒;粉末状的活性炭与颗粒状的活性炭相比,吸附性更强,因而可用来防止组织培养中细胞褐变的发生和发展。但对物质的吸附选择性差,除从培养基吸附酚类物质外,还会吸附无机盐和激素等物质,所以随浓度增高会使组织产生伤害,褐变反而加重<sup>[16]</sup>。在中国红

豆杉细胞培养实验中以 1 g/L AC 抗褐变效果最好, 超过 5 g/L, 生长受影响, 褐变严重<sup>[17]</sup>。而在南方红豆杉的愈伤组织实验中以 0.1 g/L AC 抗褐变效果最好<sup>[16]</sup>。又如, CA 的主要成分为氨基酸和少量的肽, 0.1% ~ 0.5% CA 能参与细胞分裂和生长, 促进愈伤组织的生长; 浓度较高时不仅抑制天然氨基酸的正常合成, 而且 CA 中过量的芳香族氨基酸进入次级代谢途径, 产生了许多酚类物质, 从而激活了 PPO、POD 等与酚类物质氧化有关的酶类, 导致醌类物质积累, 褐变反而加重。所以, 在南方红豆杉的愈伤组织培养中添加 0.1% CA, 能明显抑制 PPO 活性, 减轻培养基和愈伤组织的褐化程度, 促进愈伤组织的生长<sup>[16]</sup>。而在东北红豆杉的细胞培养过程中添加 1.0% CA, 却有效促进 PPO 的活性, 加重褐化, 抑制细胞培养物的生长<sup>[20]</sup>, 作用效果完全相反。

3.3 对红豆杉抗褐变效果较好且使用较多的有抗氧化剂类 Vc、吸附剂类 AC。实验中也得到类似结果。另外添加 PVP、CA、PA、LH、谷氨酰胺和桂皮酸等也有一定的抗褐变效果。

3.4 各种添加剂对褐变作用的描述各不相同, 有“防止”、“减轻”、“改善”、“抑制”等。但“有效防止或抑制”的抗褐变剂还有待于进一步的研究和筛选。值得注意的是无论使用何种抗褐变剂, 其目的是保持红豆杉细胞的正常生长, 保证紫杉醇的稳定合成, 所以既要考虑其经济实用性, 又不能影响这一总目标。

References

[1] Huang X, Huang L Q, Qiu D Y. Progress in the study of taxol biosynthetic enzymes [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2002, 22(5): 27-33.  
 [2] Ma X C, Wu L J, Jia J M. Development and studies on taxoid [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2002, 19(2): 147-152.  
 [3] Cheng Y, Zhu W H, Wu Y Q, et al. Effects of L-glutamine and cinnamic acid on *Taxus yunnanensis* callus tissue growth [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, (30)7: 542-544.  
 [4] Christen A A, Gibson D M, Bland J. Production of taxol or taxol-like compounds in cell culture [P]. US: 5019504, 1991-05-28.  
 [5] Xia M, Wu J Y, Zhang L M, et al. Studies on browning in the tissue culture of *Taxus hinensis* [J]. *B iotechnology* (生物技术), 1996, 6(3): 18-20.  
 [6] Wickremesinhe E R M, Arteca R N. Taxus callus cultures:

initiation, growth optimization, characterization and taxol production [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1993, 35: 181-193.  
 [7] Huang H, Lu M P. Selection of antioxidant in the cell cultures of *Taxus chinensis* [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol* (华中理工大学学报), 1994, 4(2): 107-108.  
 [8] Cao Z Y, Liu G M, Wang D, et al. *Textbook of Practical Techniques on Plant Tissue Culture* (实用植物组织培养技术教程) [M]. Lanzhou: Gansu Science and Technology Publishing House, 1996.  
 [9] Maenduen P, James C, Linden K. Studies of paclitaxel production by *Taxus canadensis* cultures in batch semicontinuous with total cell recycle [J]. *Biotechnol Prog*, 1999, 15(6): 1027-1077.  
 [10] Huang H. Preliminary study on the properties of PPO from suspension on cells of *Taxus chinensis* [J]. *Jiangxi Sci* (江西科学), 1999, 17(3): 261-263.  
 [11] Zhang Z Q, Yang J Y, Wu Y W. Taxol production in tissue culture *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 1998, 18(4): 488-492.  
 [12] Kang Q S, Hou G S. Advances of taxol as natural anticancer drug [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1993, 5(3): 61-67.  
 [13] Wang G L, Fang H J, Hu F Q. Tissue culture and cell suspension culture of *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. var. and taxol production [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2001, 34(4): 373-378.  
 [14] Han J Y, Wang C G, Na P, et al. Advances of producing taxol in taxus cell culture [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27(7): 433-437.  
 [15] Zhao F, Ni L, Geng Z, et al. Studies on the tissue culture of *Maire Yew* (*Taxus chinensis* var. *mairei*) I. Callus induction and optimization of the culturing methods [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30: 213-215.  
 [16] Sheng C Z, Wang S F, Wang N N, et al. Preliminary studies on decreasing browning in *T. chinensis* var. *mairei* tissue cultures [J]. *Acta Sci Univ Nankai* (南开大学学报), 2001, 34(4): 120-122.  
 [17] Mei X G, Dong Y L, Pan X W. Studies of avoiding browning in tissue subculture of *Taxus chinensis* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2001, 13(4): 8-11.  
 [18] Huang H. Effects of chemical agent on the growth of cell culture in *Taxus chinensis* [J]. *J Gansu Educ Coll* (甘肃教育学院学报), 2001, 15(1): 34-37.  
 [19] Mei X G, Dong Y L, Pan X W. Browning restrain effects of activated charcoal on taxus cell [J]. *Straits Pharm J* (海峡药科学), 2001, 13(2): 51-53.  
 [20] Hu F Q, Wang S L, Ma H, et al. The PPO active study of cell culture substance of *Taxus cuspidate* [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 2001, 21(4): 583-586.  
 [21] Yao H J, Luo X F, Tian Y T. Development of explant browning researches [J]. *J Beijing Forestry Univ* (北京林业大学学报), 1999, 21(3): 78-83.

## 杜仲次生代谢物的研究进展

王亚琴<sup>1</sup>, 张康健<sup>2\*</sup>

(1. 华南理工大学食品与生物工程学院, 广东 广州 510640; 2. 西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 详细介绍了贵重药材杜仲所含的各种次生代谢物以及各自的功效, 其中重要次生代谢物松脂素二葡萄糖苷是降压的主要成分, 环烯醚萜类的桃叶珊瑚苷具有预防和治疗肿瘤、强效抗菌、利尿等功效, 绿原酸抗菌作用明显, 对消化系统、血液系统和生殖系统均有药理作用; 重点阐述了运用植物组织培养法这一新兴生物技术生产杜仲

\* 收稿日期: 2003-10-21  
 基金项目: 广州市科技计划项目(2004J-E-C0231)  
 作者简介: 王亚琴(1972—), 女, 博士, 讲师, 1998年毕业于西北农林科技大学药用植物资源开发与利用专业, 现任教于华南理工大学食品与生物工程学院, 主要研究方向为生物工程制药。 T: (020)87113841 E: 19@htil.com