

培养基成分对云南红豆杉细胞生长和产生 10-去乙酰巴卡亭 的影响

李海峰¹, 赵志莲², 刘光明^{1*}

(1. 云南省大理学院药学院, 云南 大理 671000; 2. 大理农业学校, 云南 大理 671003)

摘要:目的 研究 B₅ 培养基主要成分对云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* 细胞生长和产生 10-去乙酰巴卡亭 的影响。方法 利用植物组织培养技术结合 HPLC 分析手段, 通过改变 B₅ 培养基中 CaCl₂、NaH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 的质量浓度, 研究其对云南红豆杉细胞生长及 10-去乙酰巴卡亭 量的影响。结果 试验组与对照相比, B₅ 培养基中高质量浓度的 NaH₂PO₄ 能够显著促进云南红豆杉细胞生长, CaCl₂、(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 浓度对细胞生长无显著影响; B₅ 培养基中低质量浓度的 CaCl₂、NaH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 能够显著促进 10-去乙酰巴卡亭 合成与释放。结论 B₅ 培养基中 NaH₂PO₄ 为 300 mg/L 时, 能够显著促进云南红豆杉细胞生长, 细胞生长量是对照的 1.2 倍, CaCl₂、(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 分别在 75~300、134~268 和 2 500~5 000 mg/L 对细胞生长无显著影响; B₅ 培养基中 CaCl₂、NaH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 的质量浓度分别为 75、75、33.5、625 mg/L 时, 能够显著促进细胞中 10-去乙酰巴卡亭 合成与释放, 10-去乙酰巴卡亭 的量分别是对照的 1.5、1.4、2.4 倍。

关键词: 云南红豆杉; 细胞生长; 10-去乙酰巴卡亭; 培养基

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)10-1644-03

10-去乙酰巴卡亭 (10-deacetyl baccatin, 简称为 10-DAB) [1] 是从红豆杉短枝叶中分离、提取得到的一种紫杉烷二萜类化合物, 不但自身有抗癌活性, 而且是生物合成与化学半合成紫杉醇和多烯紫杉醇的重要前体化合物, 在解决临床治疗和科学研究用紫杉醇和多烯紫杉醇的药源问题中起着不可替代的作用。自从 1991 年 Christen 等 [2] 获得红豆杉细胞培养的第一个专利以来, 红豆杉细胞培养生产紫杉醇成为植物组织培养生产次生代谢产物研究的热点之一。虽然这方面的报道很多 [3-5], 笔者在云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu [6] 细胞培养过程中发现, 细胞培养物中 10-DAB 的量高达千分之一以上, 比天然云南红豆杉植物枝叶中的量高 5~8 倍, 所以提高红豆杉细胞培养物中 10-DAB 的量比提高紫杉醇的量更容易。通过红豆杉细胞培养生产 10-DAB, 再经过化学半合成生产紫杉醇和多烯紫杉醇, 是一条不破坏红豆杉野生植物资源基础上能实现资源再生利用的有效途径。因此, 本实验主要研究了 B₅ 培养基中 CaCl₂、NaH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 的质量浓度对云南红豆杉细胞生长和 10-DAB 合成与释放的影响。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂: 美国惠普公司 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 赛样台式计算机 (Agilent ChemStation

色谱工作站)。SY8200T 超声波清洗器 (上海声源超声波仪器设备有限公司), AB104 电子天平 (瑞士 Mettletoledo 公司)。

10-DAB 对照由 Sigma 公司提供 (质量分数 > 99%); 高效液相用水为三重蒸馏水、乙腈和甲醇均为色谱纯; 其余试剂为分析纯。

1.2 材料: 供试材料云南红豆杉 *T. yunnanensis* Cheng et L. K. Fu 细胞株 TYN06, 为本课题组从云南红豆杉生长点诱导而来的一个普通细胞系。

1.3 诱导试验 [7]: CaCl₂ 质量浓度以 B₅ 培养基标准量为对照, 分别设为标准量的 1/4、1/2、2、4 倍 4 个水平; NaH₂PO₄ 质量浓度以 B₅ 培养基标准量为对照, 分别设为标准量的 1/4、1/2、2、4 倍 4 个水平; (NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 质量浓度以 B₅ 培养基标准量为对照, 分别设为 (NH₄)₂SO₄ 标准量、KNO₃ 标准量、(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 标准的 1/4、(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 标准量的 1/2、(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 标准量的 2 倍、(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 标准量的 4 倍 6 个水平。基本培养基均为: B₅ + 2, 4-D 1.0 mg/L + KT 0.1 mg/L、蔗糖 30 g/L, pH 值为 5.8 的液体培养基。按实验设计在培养基配制时分别添加不同质量浓度的物质, 培养容器为 250 mL 玻璃三角瓶, 每瓶加入 100 mL 培养液, 120 °C 高压灭菌 15 min, 每瓶接种新鲜细胞 10.0 g, 每个处理设 5 次重复。培

* 收稿日期: 2008-12-15

基金项目: 云南省教育厅科研基金资助项目 (06J316C)

作者简介: 李海峰 (1971—), 男 (白族), 云南大理人, 副教授, 硕士, 从事药用植物细胞培养及次生代谢产物的研究工作。

Tel: 13170764216 E-mail: lihzh888@sina.com

养条件均为 25 ℃ 暗培养,摇床转速 120 r/min。

1.4 细胞生长量的测定:各试验培养 30 d 后收集细胞,蒸馏水洗涤,在 50 ℃ 下真空干燥至恒重,进行细胞生长量(细胞生长量 = 最终收获细胞干质量 - 接种细胞干质量)测定。每个处理重复测定 5 次,所得数据用 SPSS13.0 统计软件进行差异显著性多重(Duncan)分析。

1.5 10-DAB 的提取和测定:10-DAB 的提取和测定按照李海峰等^[8]建立的方法进行。精密称取真空干燥至恒重的样品粉末 0.5 g 到 100 mL 量瓶中,加入 20 mL 甲醇,超声处理 30 min,浸泡 24 h,滤过,滤渣分别用 10 mL 甲醇按此步骤重复处理 2 次,合并 3 次提取的滤液,水浴浓缩,加入醋酸乙酯-5% NaHCO₃(1:1)40 mL 萃取,收集醋酸乙酯层,水层再分别用 10 mL 醋酸乙酯萃取两次,合并 3 次萃取的醋酸乙酯层,水浴挥干溶剂,用 5 mL 甲醇定容,0.45 μm 滤膜滤过,滤液供高效液相色谱分析用。色谱条件: C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相甲醇-乙腈-水(42:13:45),检测波长 234 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 32 ℃,进样量 10 μL, HPLC 测定 10-DAB 量(干物质量),色谱图见图 1。每个处理重复测定 3 次,所得数据用 SPSS13.0 统计软件进行差异显著性多重(Duncan)分析。

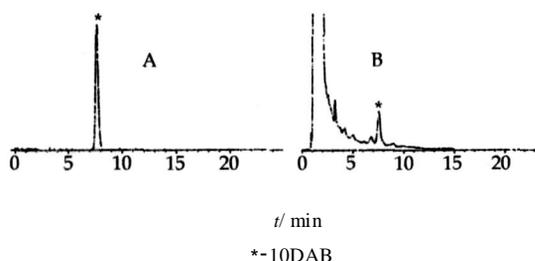


图 1 10-去乙酰巴卡亭 对照品(A)和样品(B)色谱图
Fig 1 HPLC Chromatograms of 10-deacetyl baccatin reference substance (A) and sample (B)

2 结果与分析

2.1 CaCl₂ 对云南红豆杉细胞生长和 10-DAB 形成的影响:如表 1 所示, B₅ 培养基中 CaCl₂ 质量浓度在 75 ~ 300 mg/L 对细胞生长无显著影响。但是, CaCl₂ 对 10-DAB 合成与释放有较大影响,质量浓度为 75 mg/L 时,能够显著促进 10-DAB 合成与释放,达到 0.701 3 mg/L,是对照的 1.5 倍; CaCl₂ 质量浓度过高或过低都不利于 10-DAB 合成与释放。因此,从细胞生长和 10-DAB 合成与释放来分析, B₅ 培养基中 CaCl₂ 质量浓度以 75 mg/L 为宜。

表 1 CaCl₂ 质量浓度对云南红豆杉细胞生长和 10-脱乙酰巴卡亭 质量分数的影响

Table 1 Effect of various concentration of CaCl₂ on cell growth and 10-deacetyl baccatin content of *T. yunnanensis*

CaCl ₂ / (mg · L ⁻¹)	细胞生长量/g	10-脱乙酰巴卡亭 / (mg · g ⁻¹)
37.5	0.430 7 ± 0.005 7 c	0.159 4 ± 0.000 6 d
75	0.612 0 ± 0.043 6 a	0.701 3 ± 0.003 5 a
150(CK)	0.598 7 ± 0.014 1 a	0.483 6 ± 0.002 6 b
300	0.626 6 ± 0.015 0 a	0.458 2 ± 0.002 7 c
600	0.509 8 ± 0.016 3 b	0.153 8 ± 0.003 3 d

不同字母表示差异显著,下表同。

Different letters within columns represent significant differences, following tables are same

2.2 NaH₂PO₄ 对云南红豆杉细胞生长和 10-DAB 形成的影响:如表 2 所示, B₅ 培养基中随着 NaH₂PO₄ 质量浓度升高细胞生长量逐渐增加,当 NaH₂PO₄ 为 300 mg/L 时,细胞生长量达到最高; NaH₂PO₄ 质量浓度再升高,细胞生长量呈递减趋势。10-DAB 的量随着 NaH₂PO₄ 质量浓度的升高而降低,当 NaH₂PO₄ 为 75 mg/L 时,能够显著促进 10-DAB 合成与释放,量达到最高,是对照的 1.4 倍; NaH₂PO₄ 过低时,不适宜 10-DAB 合成与释放。因此, B₅ 培养基中适宜细胞生长的 NaH₂PO₄ 为 300 mg/L,适宜 10-DAB 合成与释放的质量浓度为 75 mg/L。

表 2 NaH₂PO₄ 质量浓度对云南红豆杉细胞生长和 10-脱乙酰巴卡亭 质量分数的影响

Table 2 Effect of various concentration of NaH₂PO₄ on cell growth and 10-deacetyl baccatin content of *T. yunnanensis*

NaH ₂ PO ₄ / (mg · L ⁻¹)	细胞生长量/g	10-脱乙酰巴卡亭 / (mg · g ⁻¹)
37.5	0.440 8 ± 0.004 8 e	0.107 3 ± 0.008 1 e
75	0.518 2 ± 0.008 1 d	0.659 8 ± 0.001 4 a
150(CK)	0.598 7 ± 0.014 1 b	0.483 6 ± 0.002 6 b
300	0.728 6 ± 0.007 2 a	0.459 1 ± 0.007 9 c
600	0.540 7 ± 0.002 5 c	0.235 3 ± 0.003 4 d

2.3 (NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 对云南红豆杉细胞生长和 10-DAB 形成的影响:如表 3 所示, B₅ 培养基只添加 (NH₄)₂SO₄ 时,有利于 10-DAB 合成与释放,但是对细胞生长有明显的抑制作用; B₅ 培养基只添加 KNO₃ 时,对 10-DAB 合成与细胞生长都有明显的抑制作用。随着 (NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 质量浓度升高,细胞生长量逐渐增加, (NH₄)₂SO₄ 为 268 mg/L、KNO₃ 为 5 000 mg/L 时,细胞生长量达到最高; (NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 质量浓度过高或过低都不

适宜细胞生长。随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KNO_3 质量浓度升高,10-DAB 的量逐渐降低,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为33.5 mg/L、 KNO_3 为625 mg/L时,能显著促进10-DAB 合成与释放,质量分数高达1.149 mg/g,是对照的2倍。因此,适宜细胞生长的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为268 mg/L、 KNO_3 为5 000 mg/L,适宜10-DAB 合成与释放的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为33.5 mg/L、 KNO_3 为625 mg/L。

表3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KNO_3 质量浓度对云南红豆杉细胞生长和10-脱乙酰巴卡亭 质量分数的影响

Table 3 Effect of various concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and KNO_3 on cell growth and 10-deacetyl baccatin content of *T. yunnanensis*

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / (mg · L ⁻¹)	KNO_3 / (mg · L ⁻¹)	细胞生长量 / g	10-脱乙酰巴卡亭 / (mg · g ⁻¹)
134	0	0.068 8 ± 0.001 9 e	0.429 9 ± 0.043 1 d
0	2 500	0.129 0 ± 0.049 4 d	0.175 4 ± 0.012 7 e
33.5	625	0.256 9 ± 0.010 7 c	1.149 0 ± 0.006 2 a
67	1 250	0.405 5 ± 0.014 7 b	0.804 9 ± 0.102 0 b
134(CK)	2 500(CK)	0.598 7 ± 0.014 1 a	0.483 6 ± 0.002 6 c
268	5 000	0.623 5 ± 0.010 4 a	0.184 2 ± 0.002 6 e
536	10 000	0.139 1 ± 0.049 9 d	0.078 1 ± 0.001 8 f

3 讨论

钙、磷和氮是植物组织培养基中的大量元素,在植物组织培养过程中具有重要的生理作用^[9],对植物组织生长和分化具有重要的影响,但是,有关培养基中钙、磷和氮对植物细胞培养次生代谢产物量的影响研究较少。从本实验的结果可知: B₅培养基中氯化钙在较大质量浓度范围内(75 ~ 300 mg/L)对云南红豆杉细胞生长没有显著影响;低质量浓度的氯化钙(75 mg/L)能显著促进10-DAB 形成与释放,主要原因可能是在红豆杉细胞培养过程中低质量浓度的Ca²⁺更能激活参与10-DAB 合成酶的活性,其次低质量浓度的Ca²⁺更容易与钙调素结合作为第二信使,诱导与植物抗病毒有关基因组的启动,从而能够促进植物细胞产生与抗病毒有关的次生代谢产物,因此,能够显著促进红豆杉细胞中与抗病毒有关的次生代谢产物10-DAB 合成与释放。B₅培养基中磷酸二氢钠质量浓度较高(300 mg/L)时,有利于云南红豆杉细胞生长,这与胡萍等^[10]在悬浮培养过程中磷的补加对南方红豆杉细胞生长和细胞活力没有显著影响的研究结果相反;磷酸二氢钠质量浓度(75 mg/L)较低时,能够促进10-DAB 合成与释放,主要原因可能是10-DAB 生物合成的第一步是由二甲基丙烯基焦磷酸合成香叶基焦磷酸开

始,适宜浓度的磷酸二氢钠在10-DAB 生物合成过程中起着重要作用。B₅培养基中氮源对云南红豆杉细胞生长和10-DAB 合成有重要影响:铵态氮(NH₄⁺)有利于10-DAB 的合成,硝态氮(NO₃⁻)有利于细胞生长。陈永勤等^[11]的研究也发现:提高培养基中NH₄⁺浓度,能够显著提高红豆杉细胞培养物中紫杉醇的量,提高培养基中NO₃⁻浓度有利于愈伤组织的生长。培养基中硫酸铵(268 mg/L)和硝酸钾(5 000 mg/L)较高时,有利于10-DAB 合成与释放;培养基中硫酸铵(33.5 mg/L)和硝酸钾(625 mg/L)较低时,有利于10-DAB 合成与释放。

从本实验结果与讨论可知: B₅培养基中NaH₂PO₄、CaCl₂、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KNO_3 质量浓度分别在300、75 ~ 300、134 ~ 268、2 500 ~ 5 000 mg/L有利于细胞生长; B₅培养基中NaH₂PO₄、CaCl₂、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KNO_3 分别为75、75、33.5、625 mg/L时,最有利于10-DAB 合成与释放。而有关B₅培养基中这4种物质具体的作用机制及其协同作用效果,有待进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] 徐任生. 天然产物化学 [J]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [2] Christen A A, Gibson D M, Bland J. Production of taxol or taxol-like compounds in cultures [P]. US Patent: 5019504, 1991.
- [3] Mondher J, Abdessi A M Z, Guo Y W, et al. Taxus sp. cell tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 1996, 46(1): 59-75.
- [4] 孙彬贤, 张国英, 刘 涤, 等. 红豆杉细胞培养与紫杉醇生产 [J]. *植物生理学通讯*, 1999, 35(2): 135-140.
- [5] 庄晓蕾, 张秀清, 于树宏, 等. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇的研究 [J]. *中草药*, 2000, 31(10): 794-798.
- [6] 曾建飞, 刘淑琴. 云南植物志 [J]. 北京: 科学出版社, 1986.
- [7] Qiami N M. *Production of Useful Plant Metabolites by Plant Cell Culture Technology* [M]. Tokyo: Cast Managur-munt Corparatian, 2000.
- [8] 李海峰, 赵志莲, 刘光明, 等. 高效液相法测定云南红豆杉细胞培养物中10-脱乙酰巴卡亭 的含量 [J]. *大理学院学报*, 2008, 2: 33-34.
- [9] 李合生. *现代植物生理学* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [10] 胡 萍, 元英进, 苗志奇. 悬浮培养过程中碳、氮、磷的补加对南方红豆杉细胞生长影响的研究 [J]. *中草药*, 2002, 33(1): 28-31.
- [11] 陈永勤, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 云南红豆杉细胞培养和紫杉醇生产 [J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2001, 23(4): 266-269.