

东北红豆杉细胞两液相培养生产紫杉醇的研究[△]

天津大学化工学院天然产物生化工程所(300072) 吴兆亮* 元英进** 胡 萍 胡宗定

摘 要 反应-分离耦合技术是红豆杉细胞培养生产紫杉醇的关键技术。作者采用两液相培养技术,深入研究有机溶剂的种类、浓度、加入时间和相毒性对红豆杉细胞悬浮培养细胞生长和产生的影响。结果表明油酸和邻苯二甲酸二丁酯适合作此体系两液相培养的有机溶剂,合适的浓度为8%,加入时间为第7日~10日,与对照组相比,两液相培养的紫杉醇产量提高4倍。

关键词 紫杉醇 两液相培养 红豆杉细胞

紫杉醇是目前最新的具有很好疗效的一种抗癌药物,它的长期稳定的大量的供应已经引起各国研究者的极大关注。目前利用植物细胞培养生产紫杉醇是解决紫杉醇来源的一个重要方法。为了提高植物细胞培养生产紫杉醇的产量,各国研究者从各个方面进行了研究,比如培养基^[1~4]和操作条件^[5,6]的优化、前体饲喂^[7,8]、加诱导子^[2~9]、连续培养^[10]和半连续培养^[11]。然而紫杉醇在培养液中的溶解度很低,其最大溶解度仅为20 mg/L^[12]。另一方面由于紫杉醇的微管聚合作用,对植物或动物的细胞形态有明显的改变^[13],因此对其自身的细胞生长也有影响。根据我们的实验结果,低产紫杉醇的红豆杉细胞生长快,而高产紫杉醇的红豆杉细胞生长慢。所以要提高紫杉醇产量,一个关键的技术是植物细胞培养-分离耦合。因为采用植物细胞培养-分离耦合技术^[14],可打破次生代谢产物在胞外水相和胞内的平衡,促使生产更多的胞内产物并释放到胞外水相中,进而被萃取剂吸收。从而减少了代谢产物的反馈抑制作用;保护产物免受培养基中酶分解和简化下游处理过程。但这方面的研究报道很少。

我们采用两液相培养技术,深入研究有机溶剂种类(烷烃、有机酸、醇和酯)、浓度、加

入时间和相毒性对红豆杉细胞悬浮培养细胞生长和产生的影响,初步获得了红豆杉细胞两液相培养生产紫杉醇的工艺条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株系:东北红豆杉细胞株系(TCL-91#),是从长白山原始森林中东北红豆杉幼茎诱导而来,并在B₅固体培养基上继代培养。

1.1.2 液体培养基:B₅液体培养基,其中Vit B₁、Vit B₆、烟酸、肌醇浓度加倍,蔗糖浓度为25 g/L,并附加6-BA 0.5 mg/L和水解酪蛋白2 g/L。

生产培养基为B₅液体培养基,其中蔗糖浓度为60 g/L,并附加6-BA 0.5 mg/L和水解酪蛋白1 g/L。

1.1.3 有机溶剂:两液相培养中选择有机溶剂最重要的两点是:与细胞尽可能是生物相容的;对产物有可能大的分配系数。研究表明log P值(P为有机溶剂在辛醇和水两相体系中的分配系数)能很好预测有机溶剂的生物相容性^[15],一般来说,log P值大于4的有机溶剂是疏水的并且基本上是生物相容的。不同的有机溶剂log P值由文献^[15,16]查得。紫杉醇在有机溶剂和培养液中的分配系数由实

* Address: Wu Zhaoliang, Department of Biochemical Engineering, Tianjin University, Tianjin

现在河北工业大学化工系工作 ** 通讯联系人

△ 国家教委“跨世纪优秀人才培养计划”基金和天津市重点攻关项目“大规模细胞培养生产紫杉醇”资助。

验测定。因此根据有机溶剂的 log P 值和紫杉醇的分配系数,确定所用的有机溶剂是十六烷、油酸、癸醇和邻苯二甲酸二丁酯,它们的 log P 值和体积质量及紫杉醇在此体系中的分配系数见表 1。

表 1 两液相培养体系中有有机溶剂物理性质

有机溶剂	log P	分配系数	(g/mL)
十六烷	8.7	5.72	0.771
癸 醇	4.0	311	0.831
油 酸	7.7	154	0.893
邻苯二甲酸二丁酯	5.4	1036	1.046

1.2 培养条件:红豆杉细胞两液相培养在 25 ℃、100 r/min 的摇床上无光中进行。250 mL 三角烧瓶中最初加入的生长培养基和细胞体积总和为 36 mL,其中湿细胞 6.11 g、对应的干细胞 0.264 g。第一段培养(生长培养阶段)时间为 10 d,第 10 日加入生产培养基 10 mL;第二段培养(生产培养阶段)为 6 d。除做有机溶剂的相毒性实验外,所用的有机溶剂都经预处理,即在加入摇瓶中培养液之前,都与相应的生长培养基完全混合,然后分离出待用。

1.3 分析方法

1.3.1 胞外培养液中紫杉醇含量分析:将分析样品经离心分出细胞、胞外培养液和有机溶剂,用高效液相色谱仪进行测定,C₁₈反相硅胶柱(Kromasil C₁₈ 5μm 200 mm×4.6 mm),流动相采用乙腈-水(47:53),流速为 1 mL/min,洗脱时间为 40 min,在 227 nm 下用紫外检测器检测,外标法定量,每次进样量为 10 μL。

1.3.2 胞内紫杉醇含量分析:将上述分出的细胞放入冰箱于-20 ℃冷冻 5 d,然后转入研钵加环己烷研碎,研磨约 10 min,弃去环己烷,然后加入 20 mL 甲醇进行超声振荡,离心,分出甲醇,再加入 10 mL 甲醇进行超声振荡,离心,进行 3 次,合并甲醇用高效液相色谱仪测定紫杉醇含量。

1.3.3 有机溶剂中的紫杉醇含量分析:采用高效液相色谱仪测定,正向硅胶柱(5 μm, 200 mm×4.6 mm),流动相采用环己烷-丙

酮(77:23),操作条件同上。

2 结果和讨论

2.1 不同溶剂对细胞生长和生产的影响:培养体系中有有机溶剂浓度为 8%,有机溶剂第 10 日加入。实验结果见表 2 和表 3。

表 2 不同溶剂对细胞生长的影响

有机溶剂	湿重(g/L)	干重(g/L)	细胞水含量(%)	对比值 ^B
对照组 ^A	285	19.6	93.1	1.000
十六烷	243	18.9	92.2	0.964
癸 醇	135	11.4	91.6	0.582
油 酸	223	18.1	91.9	0.923
邻苯二甲酸二丁酯	212	17.3	91.8	0.883

A-未加有机溶剂的细胞悬浮培养。下同。
B-加有机溶剂的干重与对照组的干重比值。下同

表 3 不同溶剂对细胞生产的影响

有机溶剂	紫杉醇产量(mg/L)				对比值 ^C
	胞内	胞外培养液	有机溶剂	总产率	
对照组	1.56	1.04		2.60	1.00
十六烷	1.09	0.808	2.35	4.25	1.63
癸 醇	0.415	0.377	7.99	8.78	3.38
油 酸	0.967	0.744	10.37	12.08	4.65
邻苯二甲酸二丁酯	0.690	0.597	10.06	11.35	4.35

C-加有机溶剂的紫杉醇总产量与未加有机溶剂的紫杉醇总产量比值。下同。

2.2 溶剂浓度对细胞生长和生产的影响:采用油酸和邻苯二甲酸二丁酯,浓度分别为 4%、6%和 8%,有机溶剂第 10 日加入,实验结果见表 4 和表 5。

表 4 溶剂浓度对细胞生长的影响

有机溶剂名称	浓度(%)	湿重(g/L)	干重(g/L)	细胞水含量(%)	对比值 ^B
对照组		285	19.6	93.1	1.000
油 酸	4	234	18.8	92.0	0.959
	6	223	18.1	91.9	0.923
	8	181	16.6	90.8	0.847
邻苯二甲酸二丁酯	4	252	17.7	93.0	0.903
	6	212	17.3	91.8	0.883

表 5 溶剂浓度对细胞生产的影响

有机溶剂名称	浓度(%)	紫杉醇产量(mg/L)				对比值 ^C
		胞内	胞外培养液	有机溶剂	总产量	
对照组		1.56	1.04		2.60	1.00
油 酸	4	0.913	0.761	7.70	9.37	3.60
	6	0.967	0.744	10.37	12.08	4.65
	8	0.468	0.390	12.54	13.39	5.15
邻苯二甲酸二丁酯	4	0.735	0.612	7.07	8.42	3.24
	6	0.690	0.597	10.06	11.35	4.37

2.3 溶剂加入时间对细胞生长和生产的影响:采用油酸和邻苯二甲酸二丁酯,加入的时间为第1日、第7日和第10日,有机溶剂浓度为8%。实验结果见表6和表7。

表 6 溶剂加入时间对细胞生长的影响

有机溶剂		湿 重	干重	细胞含水量	对比值 ^B
名称	加入时间	(g/L)	(g/L)	(%)	
对照组		285	19.6	93.1	1.000
油 酸	第 1 日	148	15.1	89.8	0.770
	第 7 日	223	18.1	91.9	0.923
	第 10 日	210	18.3	91.3	0.934
邻苯二甲酸二丁酯	第 1 日	144	12.7	91.2	0.648
	第 7 日	212	17.3	91.8	0.883
	第 10 日	228	17.4	92.4	0.888

表 7 溶剂加入时间对细胞生产的影响

有机溶剂		紫杉醇产量(mg/L)				对比值 ^C
名称	加入时间	胞 内	胞外培养液	有机溶剂	总产量	
对照组		1.56	1.04		2.60	1.00
油 酸	第 1 日	0.578	0.689	5.52	6.79	2.61
	第 7 日	0.967	0.744	10.37	12.08	4.65
	第 10 日	0.893	0.750	10.65	12.39	4.77
邻苯二甲酸二丁酯	第 1 日	0.541	0.536	5.90	6.98	2.68
	第 7 日	0.690	0.597	10.06	11.35	4.37
	第 10 日	0.939	0.782	11.67	13.39	5.15

2.4 溶剂相毒性对细胞生长和生产的影响:所谓有机溶剂的相毒性指的是在培养体系中,有机溶剂所形成的一相^[9]溶解培养液中的微量组分而影响细胞生长和生产。这方面的实验所用的有机溶剂是油酸和邻苯二甲酸二丁酯,有机溶剂浓度为8%,加入时间是第10日,实验结果见表8、9。

表 8 溶剂相毒性对细胞生长的影响

有机溶剂		湿 重	干重	细胞含水量	对比值 ^D
名称	预处理 ^D	(g/L)	(g/L)	(%)	
对照组		285	19.6	93.1	1.000
油 酸	未预处理	157	14.0	91.1	0.714
	预处理	223	18.1	91.9	0.923
邻苯二甲酸二丁酯	未预处理	195	15.3	92.2	0.781
	预处理	212	17.3	91.8	0.883

D-将有机溶剂与相应的生长培养基充分混合后分离待用。下同。

表 9 溶剂相毒性对细胞生产的影响

有机溶剂		紫杉醇产量(mg/L)				对比值 ^C
名称	预处理状况	胞 内	胞 外培养液	溶剂	总产量	
对照组		1.56	1.04		2.60	1.00
油酸	未预处理	0.552	0.502	9.65	10.71	4.12
	预处理	0.967	0.744	10.37	12.08	4.65
邻苯二甲酸二丁酯	未预处理	0.396	0.360	7.68	8.44	3.25
	预处理	0.690	0.597	10.06	11.35	4.37

3 结论

3.1 不同溶剂对东北红豆杉悬浮培养细胞生长和生产有显著影响。两液相培养的细胞湿重、干重和水含量低于对照组的细胞湿重、干重和水含量,十六烷的两液相培养体系减少得最少,油酸和邻苯二甲酸二丁酯次之,癸醇最大。对于紫杉醇产量,十六烷的两液相培养体系最低,癸醇次之,油酸和邻苯二甲酸二丁酯最高。因此油酸和邻苯二甲酸二丁酯可作为红豆杉两液相培养体系好的有机溶剂。

3.2 溶剂浓度对东北红豆杉悬浮培养细胞生长和生产有较大影响。随着有机溶剂浓度提高,细胞湿重、干重和水含量有所下降,但紫杉醇产量有所提高。随着有机溶剂浓度进一步提高,紫杉醇产量增加速率有所下降。因此有机溶剂浓度为8%较为合适。

3.3 溶剂的加入时间对东北红豆杉悬浮培养细胞生长和生产有较大的影响。在细胞对数生长中期或未期加入时,细胞湿重和干重及紫杉醇产量较高。对于东北红豆杉两液相培养,有机溶剂第7日~10日加入较为合适。

3.4 溶剂相毒性对东北红豆杉悬浮培养有一定的影响。与未处理的有机溶剂两相培养体系相比,处理过的有机溶剂的两相培养体系中,细胞湿重、干重和紫杉醇产率都有所增加。

参 考 文 献

1 Christen A G, *et al.* U S Patent, 5019504, 1991; May: 28

2 Fett-Neto A G, *et al.* Biotechnol. and Bioeng, 1994; 44: 205

3 Pestchanter L J, *et al.* Enzyme and Microbial Technology, 1996; 19: 256

4 Wickremesinke E R M, *et al.* Tissue and Organ Culture, 1993; 35: 18

5 Wang H Q, *et al.* Biotech Lett, 1997; 19: 352

6 Mirjalili N, *et al.* Biotech and Bioeng, 1995; 48: 123

7 Zamir L O, *et al.* Tetrahedron Lett, 1992; 33: 5135

8 Stroebe G A, *et al.* Plant Sci, 1992; 86: 65

9 Lee B, Son S. W O Patent 9502-063

10 Selii M, *et al.* Journal of Chemical Engineering of Japan, 1995; 28: 488

- 11 Choi H K, *et al.* W O Patent 9634-110
12 Gibson O M, *et al.* Taxol Science and Applications. C R C Press, 1995; 71
13 Manfredi J J, *et al.* Cell Cycle Effects of Drugs, 1986; 287
14 Cen P L, *et al.* Sep Technol, 1993; 3(4): 58
15 Laonne C, *et al.* Biotech and Bioeng, 1987; 30: 8
16 Vermus M, *et al.* Biotech and Bioeng, 1993; 42: 747
(1998-02-16 收稿)

Studise on the Two-liquid-phase Culture of Japanese Yew (*Taxus cuspidata*) for the Production of Paclitaxel

Wu Zhaoliang, Yuan Yingjin and Hu Zongding (Department of Biochemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract The integrated cultivation-separation of plant cells is a key technology in cell culture of *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. for the production of paclitaxel. Through the two-liquid-phase culture, effects of different organic solvents, their volume percentages, time of addition and phase toxicity on the growth of cells and yield of paclitaxel in cell culture of *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. Results showed that oleic acid and dibutylphthalate were suitable organic solvents. Suitable volume percentage of organic solvents was 8%, and time for the addition of organic solvent was at day 7 to day 10. Yield of paclitaxel in the two-liquid-phase culture was four times more than that of the control.

Key words paclitaxel two-liquid-phase culture cell of *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.

四妙勇安汤中阿魏酸的含量分析

中国药科大学天然药化教研室(南京 210038) 蒋建勤* 梁敬钰 杭亚军**

摘 要 利用薄层扫描法与薄层层离-分光光度法分析古方四妙勇安汤中阿魏酸的含量, 采用硅胶 G-0.8%-CMC-Na 薄层板, 以苯-乙酸乙酯-甲醇(16:4:1)外加 3 滴甲酸为展开剂, 分别用岛津 CS-9000 型薄层扫描仪和 752 型紫外分光光度计测定四妙勇安汤中阿魏酸的含量, 两种方法所测得的结果比较接近。

关键词 薄层扫描法 薄层层离-分光光度法 四妙勇安汤 阿魏酸 含量分析

四妙勇安汤(SMYAT)源于清代鲍相璈《验方新编》^[1], 该方及其加味方用于红斑性肢痛症、动脉硬化性坏疽、坐骨神经痛、类风湿性关节炎等, 是治疗血栓闭塞性脉管炎的有效验方。为研究该方的有效成分, 我们利用薄层扫描法及薄层层离-分光光度法^[2]测定了其醇提液中阿魏酸(FLA)的含量。

1 薄层扫描法

1.1 仪器与试剂: 日本岛津 CS-9000 双波长薄层扫描仪, 微量注射器, 玻璃薄板(20 cm

×20 cm, 20 cm×10 cm), 双槽玻璃层析缸, 紫外灯, 薄层层析硅胶 G(青岛海洋化工厂); 阿魏酸标准品(中国药品生物制品检定所), 所用药材由南京药材公司提供, 经鉴定符合 1990 年版中国药典规定。

1.2 薄层板的制备: 硅胶 G 10 g 加入 0.8% CMC-Na 溶液 30 mL, 研磨至适合粘度, 在 20 cm×20 cm 洁净玻板上铺成均匀薄层, 晾干后 70℃~80℃活化 0.5 h 置干燥器内备用。

* Address: Jiang Jianqin, Department of Phytochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing

蒋建勤 女, 硕士研究生, 副教授。主要从事天然药物化学的教学和研究工作。参与完成国家自然科学基金资助项目 3 项。目前负责国家自然科学基金资助项目 1 项。已发表学术论文(第一、第二作者)10 余篇。

** 本校 97 届毕业生