

提高长春花冠瘿细胞中吲哚生物碱含量的研究

南开大学生命科学学院(天津 300071) 王淑芳* 王宁宁 王 勇 田俊英

摘 要 研究了长春花冠瘿细胞接种物年龄与接种量对悬浮培养细胞生物产量的影响,探讨了以大丽花轮枝孢菌的匀浆物为外源刺激物处理冠瘿细胞,对细胞生长和吲哚生物碱积累的作用。确立了外源刺激物产生效应的最适条件。

关键词 长春花冠瘿细胞 外源刺激物 吲哚生物碱

夹竹桃科植物长春花 *Catharanthus roseus* 是一种重要的中草药。从它的根、茎、叶、种子中可分离出 70 余种生物碱,其中三分之一是属吲哚类化合物。它们均具有抗癌活性,其作用是抑制细胞有丝分裂,阻碍纺锤体形成,使其分裂中期中止。其中长春碱、长春新碱已用于临床治疗急性白血病、绒毛膜上皮癌等,对其它肿瘤也有一定疗效^[1]。目前这些药物主要是从整体植株获得。但植物中该成分含量很低,生长受自然条件限制,周期长,原料来源困难。因此利用细胞培养技术生产吲哚生物碱的研究倍受国内外专家的高度重视。这方面的工作国外已取得了很大进展,比如加拿大用长春花愈伤细胞培养生产阿吗碱,德国用长春花愈伤细胞生产蛇根碱已达到中试或工业化生产水平。

细胞培养技术中也存在很多亟待解决的问题。其中之一是愈伤细胞培养基中,除加入必需的营养成分外,还需加入适量生长素和细胞分裂素,否则,细胞不能生长。而外源植物激素会干扰植物的次级代谢产物的积累,导致药用成分含量降低。为此,改为以冠瘿细胞为材料更为理想。长春花冠瘿细胞是将长春花愈伤细胞与土壤农杆菌 C_{58} 共培养时,该细菌中 T-DNA 片段将会移入到愈伤细胞核 DNA 中去,长出冠瘿细胞来。因为 T-DNA

片段中含有对合成生长素和细胞分裂素的必需基因,所以冠瘿细胞在无任何激素培养基中能正常增殖。而且该组织生长迅速不易分化。在适宜条件下,其生长和吲哚生物碱含量比愈伤细胞高得多^[2]。

目前,外源刺激物(licitors)对植物次级代谢影响的研究倍受国内外普遍关注。外源刺激物是指一些生物(多为真菌提取物)或非生物分子(如无机盐等),它们能够通过信号传导途径去刺激植物发生防御反应,诱导植物特定的刺激代谢产物的形成和积累。1986年 U. Eilert 等人研究了不同来源真菌匀浆物对长春花愈伤细胞吲哚生物碱含量的影响,效果很好^[3]。

本文在原来工作的基础上,进一步探讨了细胞悬浮培养中的接种物最适年龄的接种量,研究了大丽花轮枝孢菌匀浆物对吲哚生物碱积累的影响,以期为大规细胞培养生产吲哚生物碱提供理论和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 长春花冠瘿细胞培养:细胞在加有 100 mL MS 培养液的 500 mL 三角瓶中摇床(100~120 r/min)培养,培养液中不加任何植物激素,培养温度为 25℃~27℃。

1.1.2 外源刺激物制备:按照 U. Eilert 方

* Address: Wang Shufang, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin

王淑芳 女,1969年毕业于南开大学生物系获学士学位。毕业后留校任教至今,副教授。主讲《植物生理学》,主要科研方向《利用植物细胞培养技术获取贵重药用有效成分》,自1994年以来在国内外生物核心刊物上发表论文18篇。

法^[3],将大丽花轮枝孢菌接种于MS培养基中悬浮培养7 d后高压灭菌备用。

1.2 方法

1.2.1 冠瘿细胞生长的测定:收获悬浮培养细胞,真空抽滤至不滴水后称其鲜重(取3瓶细胞鲜重平均值),表示培养过程中细胞生长的变化。

1.2.2 冠瘿细胞个数的测定:准确吸取细胞均匀分布的悬浮液适当稀释后,放在计算盘中,在显微镜下记数(取3次平均值)。

1.2.3 吲哚生物碱含量的测定:按照 Morris 等^[4]的方法测定了细胞内吲哚生物碱的含量。

2 结果与讨论

2.1 接种物年龄及接种量对悬浮培养生物产量的影响:植物细胞培养过程中,接种物年龄和接种量对继代培养生物产量影响很大。为提高细胞生长速率,我们对适宜接种物年龄和接种量进行了选择。

2.1.1 适宜悬浮培养接种物年龄的选择:取不同天数悬浮培养细胞分别接种于相同量的液体培养基中,使原始细胞密度为10万/毫升左右。悬浮培养18 d后收获,结果如图1所示:悬浮培养细胞年龄为16 d时进行继代扩大培养生物产量最高。

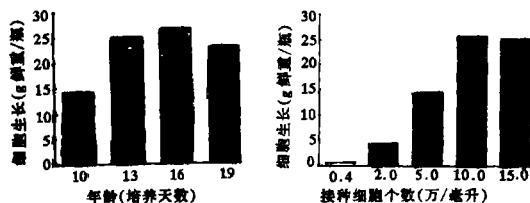


图1 悬浮培养接种物年龄与生物产量的关系

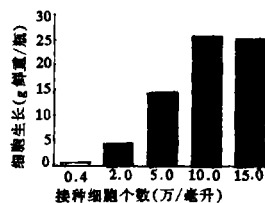


图2 悬浮培养接种量与生物产量的关系

2.1.2 悬浮培养接种量与生物产量的关系:取不同量的培养15天的悬浮培养细胞接种于相同量的液体培养基中,使原始细胞密度(万/毫升)分别为0.4、2.0、5.0、10.0、15.0。悬浮培养18 d收获,称鲜重结果如图2所示:初始细胞密度小于2万/毫升时,生物产

量很低,密度超过2万/毫升时,细胞增殖速率与接种量呈正相关关系,密度超过10万/毫升时,细胞个数不再增加。

2.2 外源刺激物对悬浮培养细胞的刺激作用:比较几种真菌匀浆物对冠瘿细胞刺激作用,得知以适量大丽花轮枝孢菌制备的外源刺激物能明显提高吲哚生物碱的积累。为确立刺激效果的最适条件,我们作了以下实验。

2.2.1 外源刺激物对不同年龄细胞中吲哚生物碱含量的影响:于悬浮培养不同天数的细胞培养液中分别加入5 mL外源刺激物,对照加5 mL水,继续培养18 h后收获细胞,称其鲜重并进行吲哚生物碱含量的分析。结果表明:外源刺激物对细胞生物产量无多大影响。而吲哚生物碱的含量均有明显提高,如图3所示,一般比对照提高1倍左右,其中以培养15 d的细胞对外源刺激物处理最为敏感,吲哚生物碱积累最多,是对照的2倍。

2.2.2 外源刺激物处理时间对细胞中吲哚生物碱含量的影响:取5 mL外源刺激物加入到培养15 d的细胞培养液中,每隔2 h取样一次测定吲哚生物碱含量。结果如图4所示:处理18 h效果最好,时间增加反而下降,对照变化不大,结果与国外以 elicitors 刺激长春花愈伤细胞的报道是一致的^[4]。

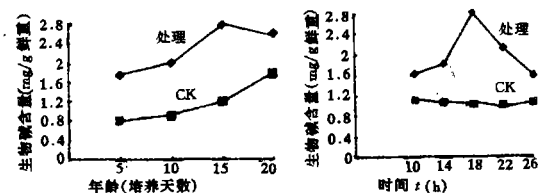


图3 外源刺激物对同年龄细胞中吲哚生物碱含量的影响

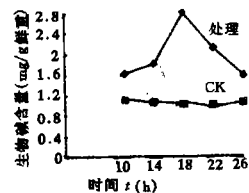


图4 外源刺激物处理时间对细胞中吲哚生物碱含量的影响

2.2.3 外源刺激物剂量对细胞中吲哚生物碱含量的影响:取不同剂量的外源刺激物加入到培养15 d龄的细胞培养液中处理18 h,收获细胞并测定吲哚生物碱含量,结果如图5所示。与对照相比,不同剂量的外源刺激物的加入都程度不同地提高了吲哚生物碱的含

量。其中以 5 mL 剂量为最好,细胞中吲哚生物碱含量提高 2 倍多。

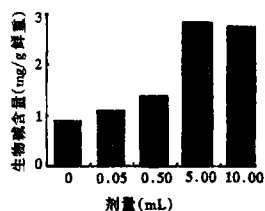


图 5 外源刺激物剂量对细胞中吲哚生物碱含量的影响。从我们这些研究结果可以看出,长春花冠瘿对大丽花轮枝孢菌匀浆物的刺激反应比较敏感,这种外源刺激物的冠瘿细胞的次级代谢活动产生了明显的调节作用。在本文描述的实验条件下,以 5 mL 外源刺激物加入的培养 15 d

的细胞培养系统处理 18 h,能显著提高细胞中吲哚生物碱含量,比对照提高 2 倍多,有关外源刺激物提高长春花冠瘿细胞药用成分的研究尚未见过报道。

参考文献

- 1 常敏毅. 抗癌药物. 长沙:湖南科学技术出版社,1996: 118
- 2 王宁宁,等. 生物工程学报,1994,10(3):244
- 3 Eilert U, et al. J Plant Physiology, 1986,126:11
- 4 Morris P, et al. Plant Cell Culture—a practical approach. 1985:127

(1998-08-26 收稿)

Studies on the Enhancing Accumulation of Indole Alkaloids in Crown Gall Cells of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*)

Wang Shufang, Wang Ningning, Wang Yong, et al. (College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Influences of cell age (at inoculation) and the amount inoculated on the biological mass production of cultured cells in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don suspension were investigated. Effects of treatment by *Verticillium dahliae* homogenate as elicitor on the cell growth and accumulation of indole alkaloids in the crown gall cells were studied and the optimal stimulation conditions were determined.

Key words *Catharanthus roseus* (L.) G. Don elicitor indole alkaloids

贯叶连翘组织培养及植株再生研究

陕西师范大学生命科学学院(西安 710062) 徐元红* 李发荣 王喆之

摘要 在国内首次研究了贯叶连翘胚轴和子叶的培养方法,分别通过器官型和器官发生型途径获得了大量再生植株,部分可移栽成活。实验表明,在 BA 和 2,4-D 不同组合的 MS 培养基上,愈伤组织易于诱导,繁殖速度快,并且通过初步检测证明了愈伤组织中金丝桃素存在的可能性。再生植株产生极容易,繁殖系数高。

关键词 贯叶连翘 组织培养 愈伤组织再生植株 金丝桃素

贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 是藤黄科金丝桃属植物,为多年生草本,在民间已有 2 400 余年的药用历史。80 年代后期,由于发现其植物体内含具有显著抗 DNA、RNA 病毒繁殖作用的化合物——金丝桃素 (hypericin)^[1]而引起人们对该植物的广泛兴

趣。目前,金丝桃素已作为药物在德国、英国等国家上市,主要用于治疗抑郁症^[2,3]、甲型肝炎、乙型肝炎^[4,5]及艾滋病^[6,7]。国内外对贯叶连翘的研究主要集中在化学成分^[8,9]、药理^[4,5,10]等方面。由于金丝桃素的广泛应用前景,国内外各个公司对贯叶连翘野生资源进

* Address: Wang Shufang, College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Xi-an

徐元红 女,31 岁,硕士研究生,讲师。陕西师范大学植物生理教研室任教,并于植物细胞工程实验室从事植物组织、细胞培养等研究工作。先后发表《关于伊贝母微体繁殖植株再生途径的研究》、《伊贝母与平贝母胚状体诱导条件的比较》等论文。