

# L-谷氨酰胺和桂皮酸对云南红豆杉

## 愈伤组织生长的影响

中国协和医科大学 药物研究所(北京 100050) 陈永勤\* 朱蔚华\*\* 吴蕴祺 胡秋  
中国医学科学院

**摘要** 研究了不同化合物对褐化严重的云南红豆杉愈伤组织生长的影响。结果表明,在培养基中添加 0.29 mg/L L-谷氨酰胺和 0.074~0.22 mg/L 桂皮酸后能有效地抑制愈伤组织和培养基的褐化,显著改善愈伤组织的生长,并对紫杉醇的含量影响不大;桂皮酸浓度在 0.30 mg/L 以上时,则抑制愈伤组织的生长,但能提高其紫杉醇含量。

**关键词** 云南红豆杉 愈伤组织褐化 紫杉醇

紫杉醇(taxol)是从红豆杉属植物(*Taxus L.*)中分离出来的一个具有抗肿瘤活性的二萜生物碱,自 1993 年以来,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,体内紫杉醇含量很低,所以紫杉醇的药源问题一开始就受到人们的高度关注,至今未得到很好的解决。用红豆杉属植物组织培养技术生产紫杉醇被认为是一种有潜力的方法,已成为研究热点,并取得一些进展<sup>[1]</sup>。但该研究仍处在试验阶段,还未见用此方法商业化生产紫杉醇的报道。

在进行红豆杉属植物组织培养时,愈伤组织的褐化是一个非常普遍的现象。褐化严重时,愈伤组织的生长会受到显著的抑制,甚至不能继代培养成功<sup>[2]</sup>。因此,寻找克服愈伤组织褐化的有效方法在红豆杉属植物组织培养的研究中具有非常重要的意义。

### 1 材料与方 法

1.1 愈伤组织的诱导与培养:云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* 当年生枝条洗净后,剪成小段,分别用 70%乙醇消毒 2 min 和 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 20 min。用无菌水漂洗 6 次后,将

茎段剪成长约 1.5~2.0 cm 的小段,斜插在诱导培养基上进行愈伤组织的诱导;愈伤组织形成后,将愈伤组织转到增殖培养基上进行继代培养。

1.2 培养条件:基本培养基为 B<sub>5</sub> 培养基<sup>[3]</sup>的无机成分,100.0 mg/L 肌醇、1.25 mg/L 烟酸、1.0 mg/L 维生素 B<sub>1</sub>、0.5 mg/L 维生素 B<sub>6</sub>、20.0 g/L 蔗糖、6-苄基氨基嘌呤(BAP)0.1 g/L、1.0~3.0 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和 8.0 g/L 琼脂。愈伤组织诱导培养基中加有 1.0 g/L 水解乳蛋白,增殖培养基同基本培养基,2,4-D 浓度为 1.0 mg/L。后来为了改善一些褐化严重的愈伤组织系的生长,在培养基中分别添加了 1.0 g/L 的水解乳蛋白、1.0 g/L 蛋白胨、1.0 g/L 水解酪蛋白、1.5%聚乙烯吡咯烷酮、100.0 mg/L 抗坏血酸、0.29 mg/L L-谷氨酰胺和 0.074~0.22 mg/L 桂皮酸。所有培养基的 pH 值均为 5.8。除抗坏血酸、L-谷氨酰胺和桂皮酸为过滤灭菌外,其余培养基成分均为高温灭菌。

试验在黑暗中进行,培养室温度为(22±2)°C。

\* Address:Chen Yongqin, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing

陈永勤 男,博士。湖北大学生命科学学院副教授。曾从事兰科植物、杜仲和红豆杉组织与细胞培养的研究。现正从事药用植物组织培养与有效成分及其它经济植物的快速繁殖技术的研究。现在工作单位:湖北大学生命科学院(武汉 430062)

\*\* 联系人

1.3 愈伤组织生长量和紫杉醇含量的测定：愈伤组织生长量以生长指数表示。在本试验中，生长指数=(收获愈伤组织干重-接种愈伤组织干重)/接种愈伤组织干重。

愈伤组织中紫杉醇含量的测定按 Wu 等<sup>[4]</sup>建立的 HPLC 法进行。色谱柱为 Plantinum C<sub>18</sub> 柱，流动相为甲醇-乙腈-水(25:35:45)，流速为 1.0 mL/min，检测波长为 227 nm。用外标法计算样品中紫杉醇含量，以干重百分比表示。

## 2 结果

2.1 愈伤组织的诱导和培养：在本试验的诱导条件下，来自 5 株云南红豆杉的茎段都比较容易形成愈伤组织，诱导成功率均在 80% 以上。将所形成的愈伤组织转到增殖培养基上以后，有 3 个愈伤组织系褐化程度较轻，一直增殖较好，但另两个(TY6 和 TY5)在继代培养 6 个月后发生严重褐化，愈伤组织和培养基均呈深褐色至棕红色，长势显著减弱。虽然其新生的组织为淡黄色，但不久就变成棕褐色、老化、停止增殖。

为了改善一些褐化严重的 TY6 和 TY5 愈伤组织系的生长，在培养基中分别添加了水解乳蛋白、蛋白胨、水解酪蛋白(各 1 g/L)、1.5% 聚乙烯吡咯烷酮或 100.0 mg/L 抗坏血酸。这些物质均不能有效地抑制这两个愈伤组织系的褐化。但添加 0.15~0.29 mg/L L-谷氨酰胺的培养基上，这两个愈伤组织

系的生长周期延长、颜色变浅、增殖较多。通过挑选新生的、颜色浅的愈伤组织块进行继代，经过 3 至 4 次继代培养就可形成生长良好的愈伤组织系。在有谷氨酰胺时，添加一定浓度(0.15~0.22 mg/L)的桂皮酸能有效地抑制愈伤组织和培养基变红，并能改善愈伤组织的生长。

2.2 L-谷氨酰胺和桂皮酸对云南红豆杉愈伤组织系(TY6)生长和紫杉醇含量的影响：将原来在加有谷氨酰胺的增殖培养基上继代生长的 TY6 愈伤组织再转到无谷氨酰胺的培养基上后，其生长速率有所下降，而且培养基的棕红色较深；而在有谷氨酰胺(0.15 mg/L 和 0.29 mg/L)的培养基上，愈伤组织增殖很好，培养基的棕红色较浅。同无谷氨酰胺的处理相比，有谷氨酰胺的处理的紫杉醇含量有所下降，但不显著。

在无谷氨酰胺时，0.15 mg/L 的桂皮酸对 TY6 愈伤组织的生长有强烈的抑制作用；在有谷氨酰胺时，较低浓度(0.074~0.22 mg/L)的桂皮酸对愈伤组织的生长有一定的促进作用，但浓度达到 0.30 mg/L 和更高时则抑制愈伤组织的生长，培养基变红的程度随桂皮酸浓度的增加而减轻。当浓度达到 0.22 mg/L 时，培养基变红的现象完全被抑制。虽然高浓度的桂皮酸会抑制愈伤组织的生长，但可提高愈伤组织中紫杉醇的含量(表 1)。

表 1 L-谷氨酰胺和桂皮酸对云南红豆杉愈伤组织系(TY6)生长和紫杉醇含量的影响

处 理		收获干愈伤组织 (g/L)	生长指数	紫杉醇含量 (%)	紫杉醇产量 (mg/L)
谷氨酰胺(mg/L)	桂皮酸(mg/L)				
0.0	0.0	9.67±1.04	1.132±0.276 <sup>a</sup>	0.0218±0.0017 <sup>a</sup>	2.11
0.15	0.0	12.21±0.98	1.238±0.178 <sup>a</sup>	0.0207±0.0014 <sup>a</sup>	2.53
0.29	0.0	12.42±1.15	1.331±0.183 <sup>a</sup>	0.0210±0.0016 <sup>a</sup>	2.56
0.0	0.15	6.85±0.77	0.787±0.315 <sup>a</sup>	0.0389±0.0008 <sup>b</sup>	2.66
0.29	0.074	11.80±0.72	1.405±0.238 <sup>a</sup>	0.0189±0.0018 <sup>a</sup>	2.23
0.29	0.15	11.90±1.02	1.366±0.355 <sup>a</sup>	0.0191±0.0011 <sup>a</sup>	2.28
0.29	0.22	11.38±1.03	1.187±0.191 <sup>a</sup>	0.0237±0.0014 <sup>c</sup>	2.70
0.29	0.30	9.60±0.92	0.884±0.169 <sup>a</sup>	0.0278±0.0021 <sup>c</sup>	2.67
0.29	0.44	7.23±1.48	0.412±0.238 <sup>b</sup>	0.0355±0.0013 <sup>b</sup>	2.57

注：数据为  $\bar{x} \pm s$ 。生长数据  $n=6$ ，紫杉醇含量和产量的  $n=3$ 。数据间的差异性用 LSR 测验， $P<0.05$ ，具有相同字母的数据表示相互之间没有显著性差异。

谷氨酰胺和桂皮酸克服愈伤组织的褐化和促进生长的作用在 TY5 愈伤组织系上也得到了证实(资料略)。

### 3 讨论

用红豆杉属植物细胞大规模培养方法商业化生产紫杉醇是当今植物次生代谢研究中的一个热点。因为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。Fett-Neto 等<sup>[5]</sup>认为红豆杉属植物愈伤组织的褐化是由于愈伤组织形成的酚类物质氧化所致。但在我们的试验中,培养基中添加酚类物质的吸附剂(聚乙烯吡咯烷酮)和抗氧化剂(抗坏血酸)等并没有能有效地抑制 2 个褐化严重的云南红豆杉愈伤组织系的褐化、改善其生长,而同时添加 0.30 mg/L L-谷氨酰胺和 0.074~0.22 mg/L 桂皮酸则效果很好。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<sup>[5]</sup>。因此,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。我们的试验结果表明,在培养基中添加 0.30 mg/L L-谷氨酰胺和 0.074~0.22 mg/L 桂皮酸可以改善愈伤组织的严重褐化现象而使其能长期培养继代。

致谢:紫杉醇标准品由本所方唯硕博士提供。

### 参考文献

- 1 陈永勤,等. 植物生理学通讯,1997,33(3):213
- 2 Wickremesinhe ERM, et al. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 38:181
- 3 Gamborg OL, et al. Exp. Cell Res, 1968, 50:151
- 4 Wu YQ, et al. J. Liq Chromatogr & Related Technol, 1997, 21:3147
- 5 Fett-Neto AG, et al. Bio/Technology, 1992, 10:1572
- 6 Bolwell GP, et al. Planta, 1986. 169:97

(1998-08-24 收稿)

## 杜仲露天新法土插研究

湘西民族教育学院(吉首 416000) 刘建成\* 陈先玉

**摘要** 杜仲露天新法枝插技术<sup>[1]</sup>,解决了杜仲枝插难以成活或不能成活的难题,杜仲露天新法土插初试成功,既改进了插穗切口封闭技术,又改砂床为土床,降低了成本,减少了投资,使杜仲露天新法枝插技术更具有实用性及可推广性。

**关键词** 杜仲 露天 枝条 土插

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 为名贵中药材。杜仲枝条露天土插,我们曾于 1991 年 5 月、1993 年 3 月和 1994 年 4 月在湖南吉首地区多次进行试验,发现扦插后 1~2 个月内,插穗虽然都能抽芽或部分展小叶,但

后期随着气温的升高和多雨季节的到来,以及寒冬的到来,则全部烂心枯死,为解决杜仲枝条露天土插不能成活或难以成活的难题,我们采用露天新法土插技术,即对插条上端切口采用石蜡等物封闭,初步解决了这一难

\* Address: Liu Jiancheng, Xiangxi Education College for Nationalities, Jishou

刘建成 副教授,1966 年毕业于湖南大学生物系植物学专业。现在湘西民族教育学院生物学系任教植物形态解剖学及植物生理学课程。多年来主要从事松乳菇、红汁乳菇驯化利用、植物露天新法扦插及珍稀药用植物组培等研究,发表及被收录论文 30 余篇。