

· 药材 ·

南方红豆杉悬浮培养细胞团区域化及营养功能分化的研究[△]

天津大学生化工程系 (300072) 李 春* 张长平 元英进* 胡宗定

摘 要 对南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* 细胞悬浮培养过程中的分化、细胞团区域化及营养功能分化等现象进行了研究。通过光学显微镜和电子显微镜对细胞团切片及淀粉颗粒染色从形态学上进行系统观察,发现悬浮培养细胞团从外向里呈明显的 3 个区域:表层细胞由成年细胞组成,中层细胞是由增殖能力旺盛的细胞组成,中心区域的细胞细胞核已消失,出现分化的管状分子。在电镜下可见胞间连丝。通过对细胞内淀粉含量及其代谢、可溶性蛋白含量、细胞生物量和总紫杉醇产量的测定结果,可以初步判断 3 部分区域各自承担着不同的功能,细胞团是功能化的细胞结合体。

关键词 细胞团区域化 功能分化 紫杉醇 细胞培养 南方红豆杉

Function Differentiation and Compartmentalization of Cell Aggregates in Cell Suspension Culture of *Taxus chinensis* var. *mairei*

Department of Biochemical Engineering, Tianjin University (Tianjin 300072) Li Chun, Zhang Changping, Yuan Yingjin and Hu Zongding

Abstract The structure of *Taxus chinensis* var. *mairie* (Lé n é e et Lé v l.) Cheng et L. K. Fu cell aggregates in suspension culture was studied by observing the section of cell aggregates under optical microscopy. By measuring the content of starch grains, soluble protein, biomass and total taxol, the results showed that there were three distinct compartments the surface, middle and central layers in cell aggregates. A few plasmodesmas were observed by electron microscopy. The starch grains were mainly distributed in the surface layer and the cells in the middle area showed higher proliferative activity. Preliminary judgement revealed that each of these compartments may have their own different functions, and it was proposed that the nutrient gradient was an important factor for the differentiation of morphology and function of cell compartments in cell aggregates.

Key words compartmentalization function differentiation taxol plant cell culture *Taxus chinensis* var. *mairei*

紫杉醇作为一种有效的新型天然抗肿瘤药物,由于其红豆杉天然药源极其有限,研究红豆杉细胞悬浮培养生产紫杉醇已得到越来越多的重视^[1]。大多数的植物细胞以细胞团方式在培养液中生长和代谢,这势必导致细胞团中由表层细胞到中心区域的细胞形成一定的营养浓度梯度,而在整个培养过程中浓度梯度伴随着细胞的增殖与分化,分化过程中细胞对碳源的利用也会影响细胞合成次生代谢产物。而对于植物细胞分化的研究大多集中在植物个体的组织细胞发育过程的分化^[2],很少见有关培养过程中细胞分化的研究,植物细胞悬浮培养中物质的传递类似于丝状微生物的菌球模型,近些年来图像分析软件在微生物发酵领域不断的发展和应用,人们已经注意到形态的分化与次生代谢产物的关

系,并在在线控制中加以利用^[3],然而植物细胞培养过程中的分化与次生代谢产物产生的进一步关系还未阐明。本文正是针对红豆杉细胞培养过程中细胞团区域化及细胞内淀粉代谢功能的差异问题进行了探索性的研究工作。

1 材料与方法

1.1 实验材料:南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* 悬浮培养 Y-901 细胞系,采用 B₅ 液体培养基培养,其中蔗糖浓度为 3%,细胞继代培养五代以上,25℃,110 r/min 黑暗振荡培养,随培养时间 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 d 取样,共 3 个平行组。

1.2 生物量的测定:所取悬浮细胞经滤纸吸干培养液后称鲜重,60℃ 烘干至恒重后在室温下称干重。

1.3 光学显微镜观察:采用 P-KI 试剂染色细胞团

* Address: Li Chun, Department of Biochemical Engineering, Tianjin University, Tianjin

** 通讯联系人

[△]教育部“跨世纪优秀人才培养计划”基金和天津市重点攻关项目资助

观察细胞形态和淀粉粒的分布情况 采用常规苏木精-伊红细胞固定染色法(HE法),收集细胞团,经4%的中性甲醛固定,乙醇脱水,常规石蜡包埋,HE染色,中性树脂封片,镜检并拍照。

1.4 电子显微镜观察胞间连丝:收集细胞,用吸水纸充分吸干培养液,置于2.5%戊二醛磷酸缓冲液(含0.05 mol/L二甲砷酸钠 pH 7.2)中前固定,再用1%锇酸磷酸缓冲液后固定12 h,乙醇逐步脱水,双氧环丙烷包埋、切片、经醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色,在JEM100C透射电镜下观察照相。

1.5 胞内淀粉和可溶性蛋白含量的测定:见文献^[4]。

1.6 细胞次生代谢产物紫杉醇的提取及测定:见文献^[5,6]。

2 结果

2.1 光学显微镜观察结果:细胞团经I-KI试剂染色后,表层细胞颜色变深,胞内含深褐色淀粉粒主要集中在细胞团的表层,在培养周期呈一定的规律变

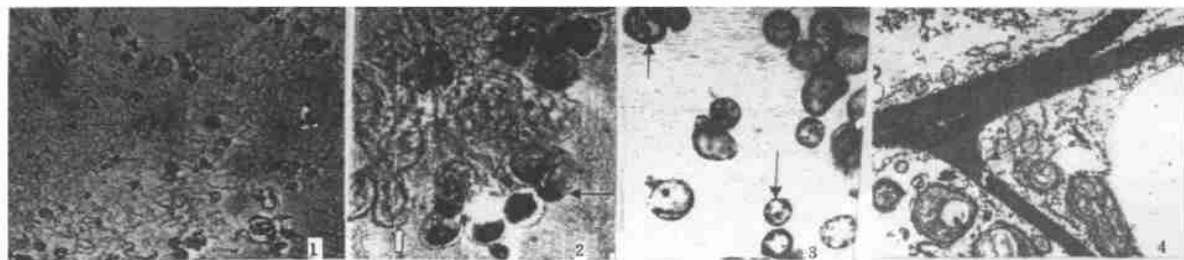
化,即培养前7 d呈增多的趋势,然后开始下降,到第10天又开始升高,14 d后逐渐下降。淀粉粒染色见图1-2,3。

细胞团经HE染色切片观察后(图1-1),细胞团从里到外明显呈3个区域,中心区域细胞几乎没有细胞核并出现分化的管状分子,中层细胞的细胞核完整均一,细胞体积较其它区域小繁殖能力旺盛,表层细胞部分有细胞核,体积较其它区域大,并伴有不同程度的细胞破裂,细胞质浓度极稀,含淀粉颗粒的细胞多分布在次区。

2.2 电子显微镜观察结果:通过超薄切片观察,细胞团各区域细胞的紧密程度不同,表层细胞较松散,胞间空隙较大,中层和中心区域的细胞较紧凑,且有少量的胞间连丝,宽度在40~60 nm(图1-4),中心区域的细胞大部空间已被液泡所占据。

2.3 细胞培养过程中各项指标的测定结果:测定3个平行组,结果的平均值见表1。

从表1可以看出胞内淀粉含量的变化规律与细



1细胞团横切面 2、3胞内淀粉粒染色结果 4胞间连丝的电镜照片

→所示各图版观察结果 ⇒示不含淀粉粒的细胞

图1 细胞团及淀粉粒的分布

表1 几个相关指标的测定结果

| 培养时间 (d) | 细胞干重 (g/mL) | 可溶性蛋白 (mg/g干重) | 胞内淀粉 (mg/g干重) | 总紫杉醇 (mg/L) |
|-------------|----------------|-------------------|------------------|----------------|
| 1 | 0.011 | 12.32 | 1.584 | 2.3 |
| 2 | 0.013 | 10.08 | 2.097 | 3.0 |
| 4 | 0.019 | 11.72 | 2.475 | 3.8 |
| 6 | 0.011 | 12.08 | 3.989 | 5.9 |
| 8 | 0.011 | 11.12 | 2.524 | 4.0 |
| 9 | 0.013 | 13.70 | 2.646 | 3.1 |
| 10 | 0.015 | 16.00 | 2.237 | 5.9 |
| 12 | 0.016 | 10.06 | 2.880 | 6.0 |
| 14 | 0.014 | 6.66 | 1.633 | 6.5 |
| 16 | 0.015 | 3.92 | 1.575 | 8.4 |

胞生物量的增长相关程度很高,延迟期细胞生长缓慢,需碳源物质少,表层细胞将同化物葡萄糖以淀粉的形式贮存细胞内,淀粉颗粒增多,细胞干重增加,细胞以形成大小不同的团粒增殖,到细胞生长的指数期,细胞消耗葡萄糖增大,淀粉颗粒减少,到静止

期,淀粉含量又增加,在细胞生长衰亡期,细胞开始合成紫杉醇,需碳源量又增大,淀粉含量逐步减少。从可溶性蛋白含量变化情况看,在细胞培养前期,细胞活力旺盛,DNA复制及RNA的转录都非常活跃,也是细胞区域分化的主要时期,培养中后期,细胞内可溶性蛋白含量的减少,说明细胞的区域分化已基本完成,细胞团是功能化的细胞有机体,可以看成多细胞生物体,其中细胞个体发育是按照时空次序进行的,每个特定区域的细胞具有其特定的生理功能。

3 讨论

植物细胞悬浮培养的一个重要特征是细胞在生长过程中形成大小不等的细胞团,细胞团不但使悬浮培养体系流变特性复杂化,而且难以在培养中实现高密度培养,同时在细胞团的不同部位形成了动

量、热量和物质传递梯度,这就会对不同部位的细胞产生不同的影响

从图片 1-1 和图片 1-2 的淀粉粒的分布情况,发现悬浮培养细胞团从外向里呈明显的 3 个区域:表层细胞由成年细胞组成,含大量的淀粉颗粒,中层细胞是由增殖能力旺盛的细胞组成,是完整且均一的细胞区,中心区域的细胞细胞核已消失,出现分化的管状分子,在电镜下可见胞间连丝,从功能上讲表层细胞能将周围的环境中的同化物很快在体内以淀粉颗粒的形式贮存起来,这与植物组织某些细胞积累淀粉的特点相一致。从营养物浓度梯度变化的角度分析,各区域的细胞之间已经存在类型的分化。离体细胞在长期液体培养驯化过程中,细胞的功能也会随着区域化的出现而发生改变,胞内可溶性蛋白质含量的变化体现了遗传信息的表达以及专一性生理生化反应的结果从而导致了细胞的分化,这与 Ozeki 和 Komamine 在体细胞分化中证实蛋白质的含量和种类的变化相一致^[7],因此,我们认为在细胞团的分化过程中,中层细胞是生长最旺盛的地方,中心细胞是分化最活跃的区域,表层细胞是贮存碳源和能源的场所。从电镜观察结果看,离体培养细胞之间的胞间连丝要比植物组织细胞少得多,胞间连丝的存在是植物细胞培养以聚集方式为主的重要原因,张伟成等报道植物细胞的胞间连丝有以下 3 种状态存在:正常的、开放的和封闭的,随着生理状态和发育过程的变化,胞间连丝可以从一种状态变为另一种状态^[3],那么在培养的植物细胞之间的胞间连丝的生理变化,以及胞间连丝的共质体的物质运输与信息的交流在离体细胞之间所占的分额有多少还有待于以后进一步弄清楚。

在紫杉醇的合成方面,红豆杉植株体内各个部位有所不同,其中树皮中紫杉醇的含量最高^[8],但 Strobell 等人研究结果表明,紫杉醇合成最活跃的部位是树皮内层韧皮部和白色的形成层组织^[9]。根据石蜡切片细胞团的图像和淀粉颗粒染色观察,可以推测液体培养的红豆杉细胞团的区域化是导致细胞功能分化的主要原因,以淀粉粒观察及分布情况

看,表层细胞具有快速吸收和贮存碳源和能源的功能,称库细胞,中层细胞是繁殖及代谢最活跃的地方,也可能是细胞培养中后期紫杉醇合成的主要场所,最终将紫杉醇贮存在中心分化程度比较高的区域,从电镜观察看细胞之间仍存在胞间连丝,李明义报道紫竹梅雄蕊毛组织细胞在衰亡时胞间连丝可以转化为胞间通道加大细胞间的物质传递^[10],胞间连丝使细胞群体成为一个整体,它的存在为细胞团内部细胞间小分子物质及胞间信号传递提供了有力的结构基础。细胞生长、形态发生和形成方式以及细胞分化均可通过细胞间信号分子的传递来调节,其中有些功能是胞间连丝调节的。由此可见,悬浮培养南方红豆杉细胞团的形成是因为细胞分裂形成,并非单细胞在培养过程中因其它因素聚集而成,并且可以认为细胞团是南方红豆杉细胞赖以生存的形式,如破坏此形式将会同时破坏细胞与细胞之间、细胞与外界环境之间的物质及信息传递,细胞难以生存。因此我们初步认为悬浮培养南方红豆杉细胞过程中细胞成团生长是其赖以生存的形式,细胞团是功能化的细胞机体,可以看成多细胞生物体,其中细胞个体发育是按照时空次序进行的,因此形成了多层次的系统,这是细胞社会化的表现,每个特定区域的细胞具有其特定的生理功能,植物细胞的液体培养过程的细胞团的区域化及细胞的功能分化很可能是植物细胞生产次生代谢产物的前提

参考文献

- 1 Luis J P, Susan C R, Michael L S. *Enzyme Microbial Technology*, 1996, 19(9): 256
- 2 张伟成,严文梅,姜成后. *中国科学 B 辑*, 1985, 6: 527
- 3 Drouin J F, Louvel L, Vanhoutte B. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11(11): 819
- 4 张志良. *植物生理学实验指导*. 北京: 高教出版社, 1982: 183
- 5 Wang H Q, Zhong J J, Yu J T. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(4): 353
- 6 吴兆亮,元英进,胡平. *中草药*, 1998, 29(8): 589
- 7 Ozeki Komamine A. *Physiol Plant*, 1981, 53: 570
- 8 Vidensek N, Lim P, Campbell A, *et al.* *J Nat Prod*, 1990, 53(6): 1609
- 9 Serobel G A, Stierle A, Van Kuijk F J G M. *Plant Science*, 1992, 84: 65
- 10 李明义. *植物学通报*, 1997, 14(增刊): 36

(2000-09-23 收稿)

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括: 1974~ 1976 年, 1978 年, 1979 年, 1985 年, 1986 年, 1988~ 1990 年, 1992~ 1994 年 (50 元/年); 1995~ 1997 年 (102 元/年); 1998 年 (120 元); 1999 年 (130 元); 1996 年增刊 (50 元); 1997 年增刊 (45 元); 1998 年增刊 (55 元); 1999 年增刊 (70 元)。欢迎来函来电订购,电话: 022- 27474913