

- 15 张宗勤,杨建英,吴耀武. 西北植物学报, 1998, 18(4): 488
- 16 Hrasuna T J, Peatchanker L J, Srinivasan V, *et al.* Plant Cell Tiss and Org Cul, 1996, 44 95
- 17 Fett-Neto A G, Melanson S J, Sakata K, *et al.* Bio Technol, 1993, 11 731
- 18 Fett-Neto A G, Zhang W Y, Dicosmo F, Biotech Bioeng, 1994, 44 205
- 19 Wickremesinha E R M, Arteca R N, J Plant Physiol, 1994, 144 183
- 20 甘烦远,郑光植,袁丽萍,等. 植物生理学报, 1997, 23(1): 43
- 21 Ketchum R E B, Gibson D M. Plant Cell Tiss Org Cul, 1996, 46 9
- 22 Mirjalili N, Linden J C. Biotech Bioeng, 1995, 48 123
- 23 Biringi V, Prakash G. WO Patent 17121, 1993
- 24 吴兆亮,元英进,胡 萍,等. 中草药, 1998, 29(9): 589
- 25 Fett-Neto A G, Melanson S J, Nicholson S A, *et al.* Biotech Bioeng, 1994, 44 967
- 26 Dai Q L, Xingguo M ei, Lu Ming Bo. 华中理工大学 1997年研究生学术年会优秀论文集, 1997 170
- 27 李家儒,曹孟德,刘曼西,等. 植物研究, 1999, 19(3): 356
- 28 甘烦远,彭丽萍,郑光植. 云南植物研究, 1996, 18(4): 451
- 29 Yukihiro Y, Tabata H, Higashi Y, *et al.* Nature Biotech, 1996, 14 1129
- 30 Ciddi V, Srinivasan V, Shuler M J. Biotech Lett, 1995, 17 (12): 1343
- 31 Christen A A, Gibson D M, Bland J. US Patent 5019504, 1991
- 32 元英进,董 芳,韩金玉,等. 迎接 21 世纪新的挑战——第七届全国生物化工学术会议论文集. 北京: 北京工业出版社, 1996 537
- 33 李家儒,刘曼西,曹孟德,等. 植物研究, 1998, 18(1): 78
- 34 荆迎军,刘曼西,柯 铁,等. 生物技术, 1998, 8(4): 21
- (1999-12-14 收稿)

药用植物发根培养及发根培养器[△]

广州暨南大学生物工程系 (510632) 徐明芳*

摘 要 分析了发根培养技术生产次级代谢产物及发根培养器(反应器)在中药领域的国内外研究动态,表明药用植物发根培养的基础理论研究已远远超过了发根培养器的应用研究,而药用植物发根培养生产次级代谢产物的工业化前景则主要取决于多功能发根培养器的研制成功。

关键词 发根培养 药用植物 发根培养器

80年代后期,在植物细胞培养技术领域发展中起来一项发状根(hairy roots)培养的新技术。它是发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 含有的 Ri-质粒中的 T-DNA 片段整合到植物细胞的 DNA 上,诱导出发状根,从而建立起毛状根培养系统。目前世界上许多国家如美国、英国、日本、韩国及中国等都对中药植物和农用植物进行了大量深入的发根培养的基础理论研究。实验证明,毛状根培养系统具有发根生长迅速、不需要外源性生长激素、生产次级代谢物高和遗传特性稳定等特点,这是细胞培养和一般器官培养所不能兼备的,因此,几乎所有双子叶植物中由根部合成的次级代谢物大多数都可以用毛状根来生产,为利用发根培养技术生产药用重要植物次级代谢物(如紫杉醇、抗疟疾青蒿素等药物)及食品天然色素、香精香料开辟了新的途径^[1]。然而利用发根培养器对毛状根培养研究却远远落后于发根培养的基础研究,目前除日本、英国、南朝鲜等各国研究人员在发根培养器方面进行了一些基本的实验研究外^[2-5],发根培养用于大规模生产药用植物次级代谢产物并正向工业化的发展方向几乎为空白,

因此中药植物发根培养生产药用植物次级代谢产物能否实现产业化,则关键取决于发根培养器的研制成功。发根培养器已成为制约发根生物技术应用与医药和农业领域的关键因素,大规模植物发根培养生物反应器的研究迫在眉睫。

1 药用植物发根培养系统与次级代谢物生产

植物细胞培养的最大问题是培养中的细胞遗传和生理的高度不稳定性,细胞间的不一致性,在培养过程中高产菌株不能实现高产率,且易形成遗传变异产生其他代谢产物,造成生长周期长,收得率低,生产成本低,阻碍了其工业化的发展前景。然而,自80年代后期国内外大力开展研究发根培养技术生产次级代谢产物以来,由于发根处于器官化的分化状态,这往往有利于次生代谢物的形成和积累,并能够合成许多悬浮细胞所不能合成的物质,生理生化、遗传特性也相当稳定,在医药行业受到广泛的重视^[6]。目前已有不少的药用植物被诱导并产生了发根,且次生代谢物的含量与植物细胞培养相比也大大提高。

天花粉为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kir-*

* Address: Xu Mingfang, Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou

徐明芳 副教授,博士后,1996年毕业于华南理工大学食品与生物工程学院,获工学博士学位,1996-1998年在华南师范大学生物学博士后工作站专职研究两年,现任暨南大学生物工程系教师。主要研究方向是光生物反应器及其在生物领域中的应用和环境生物生物技术等。

[△]本项目由广东省科学基金资助 (NO: 980022)

ilowii 的根,近年来研究发现,天花粉蛋白 (trichosanthin) 能抑制绒毛膜上皮癌细胞的生长和调节免疫反应^[7],尤其是天花粉蛋白 GLQ223能够选择性地抑制 HIV 在感染的免疫系统细胞内的复制,减低免疫细胞中受病毒感染的活细胞数^[8]。文献^[9~13]报道了利用栝楼发根生产一些生理活性物质及天花粉蛋白的研究,其结果表明,由于栝楼发根的生长速度比人工栽培栝楼块根的生长速度快几十倍,因此,从栝楼发根中得到的天花粉蛋白的量显著高于从人工栽培栝楼块根中的提取量,而且,也高于用基因工程方法得到的天花粉蛋白^[14,15],可见栝楼发根生产天花粉蛋白具有明显的优越性^[13]。文献分别报道了利用发根农杆菌转化短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 和 *T. chinensis* 及短叶红豆杉愈伤组织细胞形成毛状根生产紫杉醇^[16,17],经紫杉醇单克隆抗体酶联免疫反应检测,其紫杉醇含量比用组织和细胞培养方法最多提高 50倍。黄遵锡^[18]等人对云南短叶红豆杉也进行了此项研究,表明利用发根农杆菌 A4诱导毛状根培养物生长速度快,合成紫杉醇能力强,与细胞培养相比,由于毛状根生长速度快,分支多,毛状根本身处于器官化水平,产物产量高。因此利用毛状根培养生产植物次级代谢产物具有极大的生产潜力,将为紫杉醇的药源提供新的途径。黄花蒿 *Artemisia annua* L. 性寒味苦,为传统清热解暑药物。其有效成分青蒿素 (artemisinin) 是抗疟疾有效单体,已成为世界卫生组织推荐的产品^[19,20]。用青蒿发根培养及青蒿素的生物合成,经过 25 d 的培养,青蒿素产量为 223.3 mg/L^[21~24],为青蒿素的工业化生产开辟新的途径。大黄是含蒽醌类成分的常用生药,现代药理实验表明,许多蒽醌衍生物,如大黄素、大黄酸、大黄素-1-甲醚、大黄素-8-甲醚都具有上皮生长因子受体酪氨酸蛋白激酶抑制剂活性,因而用植物发根培养法生产蒽醌化合物有可能为开发新的抗癌药物提供一个新的途径。常振战等人进行天山大黄 *Rheum wittrochii* L. 和掌叶大黄 *R. palmatum* L. 发根培养并与愈伤组织、悬浮细胞培养中的蒽醌类成分分析对比,结果表明采用发根农杆菌 9402 所含 Ri 质粒遗传转化大黄以诱导发根,用纸电泳法检测发根中冠醚碱的存在,用 HPLC 法测定,发现其中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素-8-甲醚的含量高于原植物中的含量^[25]。赛莨菪类 *Scopolia lurida* 植物如颠茄、洋金花具有麻醉、止痛、解痉的功效,尤其是在微循环研究上的应用,已获人们的重视^[26];张荫麟^[27~31]是我

国医药界较早开展药用植物发根培养及其有效药用成分研究的工作组,他们先后对赛莨菪类、金荞麦、丹参、甘草这几种药用植物进行了发根农杆菌的 Ri 质粒转化和发根培养研究,结果表明,通过几种药用植物的发根培养,无论在毛状根生物量的增加或药用有效成分的积累方面,都显示了发根培养系统其独特的优越性。利用 14 L 搅拌式生物反应器, Hilton 等进行了曼陀罗 *Datura stramonium* 发根培养,研究了天仙子胺合成的最佳培养基组成和培养条件^[32];黄炼栋^[33]等对青蒿、丹参、小蔓长春花 *Catharantus minor*、穿心莲 *Andrographis paniculata*、刺果甘草和三七等 6 种药用植物发根进行了研究;费厚满^[34]利用发根农杆菌对绞股蓝的转化并对毛状根中的皂苷进行了研究;刘树楠^[35]进行了银杏发根的转化及其悬浮培养无性系的建立;玄谷正男^[36]对黄芪毛状根及甘草毛状根的研究,各项研究表明,尽管发根培养技术的发展历史较短,但许多的发根培养植物已建立,亲本植株能合成的次生代谢物都可以应用发根培养技术生产,主要的次级代谢物有生物碱类(如吲哚、喹林、莨菪烷、喹啉烷等)、苷类(如人参皂苷、甜菜苷等)、黄酮类、醌类(如紫草宁等),以及蛋白质(如天花粉蛋白等)等药物和天然色素、香料、天然调味品,因此发根培养技术的出现是次生代谢物研究领域的一次重大飞跃,并将成为次生代谢物生产应用中的一条可靠和有效的途径。

2 药用植物发根培养器

目前的研究大部分局限于采用传统的摇瓶培养和光照培养箱等小型试验培养。然而,生物反应器(培养器)是植物组织培养生产次级代谢物走向工业化和商业化的关键环节。90年代初期,世界上开展生物反应器用于植物发根培养研究工作^[2~5]的国家主要有日本、英国、韩国等,Nuutila^[37]比较了 3 种类型的生物反应器对长春花发根培养和吲哚生物碱的合成,结果表明长春花发根培养和吲哚生物碱的合成在喷射(空)气流(Air-Sparged)式反应器中最好,发根在搅拌(Stirred)式反应器和培养液环流(Medium Circulation)式反应器中则不能生长,一方面是由于发根容易受到剪切力或叶轮转动的机械损伤,另一方面则是由于发根生长迅速,反应器的发根密度较高,供氧困难,因而这两种生物反应器都不适合发根培养。固定转动滚筒式反应器(Immobilized Rotating Drum Reactor)^[38]既可以供给足够的氧气,又能避免较高的剪切力,比较适合发根培养。Weathers^[39]首次应用超声雾化反应器进行植物发

根培养以来,各种不同类型的超声雾化反应器进行植物发根培养普遍受到关注。中科院化冶所刘春朝^[32]也设计了一种内环流超声雾化生物反应器进行青蒿发根培养。从国内外的生物反应器的研究表明,发根培养器的结构及其培养系统的研究主要集中在一是尽可能减低机械剪切力对发根的损伤(减少搅拌);二是提高气液传质速率,增加溶氧量(超声雾化)。然而许多研究也表明,对有些植物,光对发根的诱导或次级代谢物的形成具有决定作用。蔡国琴^[22]考察了光对青蒿发根生长及青蒿素的形成,结果说明无光条件,无论是在 MS 还是在 L 培养基中,都不能产生青蒿素;黄遵锡^[19]比较不同光照条件下的发根试验,发现对短叶红豆杉在全天 24 h 光照时,紫杉醇的合成含量较高;但国内外对发根生物反应器及其光源的研究几乎空白,国内外也未见报道光生物反应器应用于发根培养,因此开发研究程控集成光中药植物发根培养器,研究植物发根光合作用下的代谢机制,必将为今后发根培养用之于大规模生产药用植物次级代谢产物并向工业化的发展方向迈进奠定基础。

3 双功能光生物反应器应用前景

随着植物细胞培养技术的发展和以农杆菌的 Ti 质粒的一段 DNA 在植物细胞基因组的整合和表达导致发根转化系统的建立,不仅大大推动了植物遗传转化的研究,为遗传工程改良植物抗病毒、抗蚜虫、抗旱、抗冻等抗性和品质改良提供十分有效的途径,为高产优质品种的选育创造条件;而且发根生长迅速、具激素自主性、分化水平高、遗传特性稳定、合成能力强,现已发展成为继细胞培养技术之后的又一新的培养技术生产次级代谢产物,发根培养器的研制成功必将大大加快发根培养技术在中药和农业领域应用的产业化进程,因此开展本项研究具有特别重要的现实意义。

植物发根在生物反应器的大规模培养过程中,不可避免地存在制约发根培养成功的许多因素,其中最关键的,一是强化溶氧传质,避免发根因长期液体浸泡培养而带来的玻璃化和畸形化现象;二是控制机械剪切力的大小,避免因机械剪切力造成培养物发根的去器官化和愈伤组织的形成,使生产率降低;三是程控集成复合光源对植物发根次级代谢物的调控和代谢作用机制,由此可见,要实现溶氧性能好且剪切力低的特点,超声雾化方式可使营养液在反应器中能迅速扩散,分布均匀,反应器中供氧充

足;程控复合光源的研究和设计,国外未见报道,但我们已进行了一些研究,各色单光源的选择、复合及程控将是发根培养反应器的又一研究关键所在,因此程控集成光-超声雾化双功能型生物反应器将是培养发根的理想反应器。

参考文献

- 1 Hamill J D, Parr A J, Rhodes M J C, *et al.* Biotechnology, 1987, 5: 800
- 2 Rodniguez-Mendiola M A, Stafford R, Cresswell, *et al.* Enzyme Microb Technol, 1991, 13: 697
- 3 Whitney P J. Enzyme Microb Technol, 1992, 14: 13
- 4 Seng Han Woo, Jong Moon Park. J Chem Technol Biotechnol, 1996, 66: 355
- 5 刘春朝,王玉春,郭晨,等.应用与环境生物学报,1998,4(3): 216
- 6 Edgington S M. Bio/Technol, 1991, 9: 993
- 7 Leung K N, Yeung H W, Leung S O. Asian Pacific J Allergy Immunol, 1986, 4: 111
- 8 McGrath M S, Hwang K M, Caldwell S E. PNAS USA, 1989, 86: 2844
- 9 Tsao S W, Yan K T, Yeung H W. Toxicon, 1986, 24: 831
- 10 Savary B J, Flores H. Plant Physiol, 1991, 96(suppl): 31
- 11 Wang P, Flores H E, Humphrey A E. Biotech Lett, 1994, 16: 955
- 12 Takeda T, Kondo T, Mizukami H, *et al.* Chem Pharm Bull, 1994, 42: 730
- 13 邱德有,朱激,朱自清.植物学报,1996,38(6): 439
- 14 Shaw P C, Yung M H, Ho K, *et al.* Gene, 1997, 97: 267
- 15 Kumagai M H, Turpen T H, PNAS USA, 1993, 90: 427
- 16 Richard N. WO Patent, 23555, 1993
- 17 Hamada H, Mikuni K, Takahashi H T. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP07-289, 1996
- 18 黄遵锡,幕跃林,周玉敏,等.云南植物研究,1997,19(3): 292
- 19 许杏详,朱杰,周维善.有机化学,1982,6: 447
- 20 Klayman D L. Science, 1985, 228: 1049
- 21 Weather P J, Cheetham R D, Follansbee E, *et al.* Biotechnol Lett, 1994, 16(2): 1281
- 22 蔡国琴,李国珍,叶和春,等.生物工程学报,1995,11(4): 315
- 23 刘春朝,王玉春,欧阳藩.植物学报,1998,40(9): 813
- 24 刘本叶,叶和春,李国凤,等.生物工程学报,1998,14(4): 401
- 25 常振战,沈昕,果德安,等.北京医科大学学报,1998,30(5): 413; (6): 500
- 26 肖培根.中草药,1985,16: 19
- 27 张荫麟.植物学报,1988,30(4): 368
- 28 张荫麟,宋经元,祁建军,等.中国中药杂志,1997,22(5): 274
- 29 张荫麟,宋经元,吕桂兰,等.中国中药杂志,1995,20(5): 269
- 30 张荫麟,吕桂兰,周新华,等.植物学报,1992,34(8): 603
- 31 张荫麟,周新华,杨岚,等.中草药,1990,21(12): 22
- 32 Hilton M G, Rhodes M C. Applied Microbiol Biotechnol, 1990, 31: 131
- 33 黄炼栋,胡之璧,章国瑛,等.上海中医药杂志,1995,8: 41
- 34 费厚满,梅康凤,沈昕,等.植物学报,1993,35(8): 626
- 35 刘树楠,孙天恩,李保根,等.武汉大学学报(自然科学版),1998,44(2): 238
- 36 谷正男,古谷力,芮和恺.中药材,1996,19(2): 63; 1992, 15(12): 3
- 37 Nuttle L, Toivonen O, Kauppinen V. Biotechnol Techniques, 1994, 8(1): 61
- 38 Uozumi N, Kohketsu K, Kondo O, *et al.* J Ferment Bioeng, 1991, 72(6): 457
- 39 Weathers P J, Cheetham R D, Follansbee K, *et al.* Biotechnol Techniques, 1997, 11: 155

(2000-02-14收稿)