

· 药材 ·

南方红豆杉芽愈伤组织的诱导和培养

苏应娟¹, 王 艇¹, 杨礼香², 李雪雁¹, 范国宽¹, 柯亚永¹, 朱建明¹, 吴惠勤³, 葛发欢^{4*}

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 华中师范大学生命科学学院, 湖北 武汉 430072 3. 广东省测试分析研究所, 广东 广州 510070 4. 广州市医药工业研究所, 广东 广州 510240)

摘要: 目的 为研究南方红豆杉芽愈伤组织诱导条件、最适培养基组成成分和紫杉醇含量的积累。方法 以南方红豆杉芽为外植体, 在 MS 培养基上, 试验不同种类、不同浓度的激素及其组合对其愈伤组织诱导的影响。结果 芽诱导的最适培养基是 MS 添加 2, 4-D 2.0 mg/L 和 NAA 0.5 mg/L; 对愈伤组织的增殖、驯化和紫杉醇含量的积累则以 B₅ 添加 2, 4-D 0.5 mg/L, NAA 1.0 mg/L 和 KT 0.5 mg/L 为最佳。结论 本研究为植物组织细胞培养生产紫杉醇提供实验依据。

关键词: 南方红豆杉; 愈伤组织; 激素; 紫杉醇

中图分类号: R282.13 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)07-0637-03

Induction and culture on callus of *Taxus chinensis* var. *mairei* budSU Ying-juan¹, WANG Ting¹, YANG Li-xiang², LI Xue-yan¹, FAN Guo-kuan¹,KE Ya-yong¹, ZHU Jian-ming¹, WU Hui-qin³, GE Fa-huan⁴

(1. School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou Guangdong 510275, China; 2. College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan Hubei 430072, China; 3. Guangdong Institute of Analysis, Guangzhou Guangdong 510070, China; 4. Guangzhou Institute of Pharmaceutical Industry, Guangzhou Guangdong 510240, China)

Abstract **Object** To study the induction conditions, optimal medium constitution and accumulation of paclitaxel content for callus growth. **Methods** Bud of *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu was selected as the explant. The influence of different hormones at different concentrations or in combination with different composition were studied for formation callus of *T. chinensis* var. *mairei* bud on MS medium. **Results** The best medium was MS with addition of 2, 4-D (2.0 mg/L) and NAA (0.5 mg/L) for bud induction, while B₅ medium with the addition of 2, 4-D (0.5 mg/L), NAA (1.0 mg/L) and KT (0.5 mg/L) gave optimal cell growth and paclitaxel content. **Conclusion** This study provided some reference for the production of paclitaxel by cell culture.

Key words *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu; callus; hormones; paclitaxel

紫杉醇 (paclitaxel) 是从红豆杉属植物中提取的一种萜类化合物, 对白血病、转移性乳腺癌、卵巢癌、恶性黑色素瘤、脑癌、颈癌和肺癌均有疗效, 是当今公认的有效抗癌活性成分之一^[1]。目前紫杉醇的价格非常昂贵, 主要从红豆杉类植物的树皮中提取, 但其原植物中的含量仅为干重的 0.003%~0.07%。由于红豆杉类植物多属珍稀物种, 生长又十分缓慢, 而全球每年需要紫杉醇 200~300 kg, 因而造成紫杉醇生产的原料供应极度匮乏, 需要进一步寻找新的植物资源和新技术生产紫杉醇^[2]。植物组

织细胞培养生产紫杉醇已成为目前的研究热点^[3~8]。

有关南方红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairei* (Lemee Lévl.) Cheng et L. K. Fu 愈伤组织诱导的外植体的研究有较多报道, 主要集中在 1~2 年生的枝条、叶、幼嫩茎段^[9~12]。本文以南方红豆杉的芽为外植体研究其诱导和培养条件及紫杉醇的含量变化, 并与幼嫩茎段的诱导条件相比较。

1 材料与方法

1.1 材料: 南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei*

* 收稿日期: 2000-07-31

基金项目: 国家自然科学基金 (39500013, 39700117) 和广东省自然科学基金 (950099, 970176) 资助项目, 广州市科委重点科技攻关项目
作者简介: 苏应娟, 女, 副教授, 硕士生导师。1988年毕业于湖北中医学院中药系, 获学士学位。1992年毕业于中国科学院武汉植物研究所, 获理学硕士学位。1995年毕业于中山大学生物系, 获理学博士学位。目前主要从事药用植物的研究与开发, 在国内外期刊上发表论文 40 余篇。

采自广东省连州市高山镇 于春、夏、秋季取当年生的嫩茎和芽。

1.2 方法

1.2.1 取芽和茎段(带叶柄),洗衣粉清洗干净,清水冲洗约 2 h,70%乙醇浸泡 3 s,放入 0.2%升汞溶液中轻摇 12 min,无菌水冲洗 5~6次 叶片尖端减去 1/2后,将茎切成 1~1.5 cm插入培养基中。芽则去除少部外鳞接入培养基 25℃黑暗培养,观察各种培养基中外植体产生愈伤组织的时间及愈伤组织的长势,20 d后统计各培养基中出现的愈伤组织块数,计算愈伤组织的诱导率(诱导率=愈伤组织的块数/接种的芽或茎段的个数)。

1.2.2 紫杉醇提取:愈伤组织培养物在 40℃干燥至恒重,研碎后,精确称重,150 mL氯仿 80℃索氏提取 4 h 回收氯仿,用甲醇定容至 10 mL,滤膜(孔径 0.45 μm)过滤备用。

标准品:紫杉醇对照品购自 Sigma公司(图 1)

仪器:HP1100高效液相色谱系统,浙大智能 N2000 工作站,紫外检测器(225 nm),色谱柱为 kr 100型, RP-C₁₈(4.5×250 mm)柱

试剂:甲醇为色谱纯品,水为二次蒸馏水

色谱条件:采用 C₁₈柱,流动相为甲醇-水(60∶40),流速 1 mL/min,检测波长 225 nm,每次进样 20 μL 采用面积外标法,计算出各样品紫杉醇的含量(图 2)。

表 1 南方红豆杉愈伤组织的诱导

培养基	激素的种类和浓度 (mg/L)	出愈时间 (d)		诱导率 (%)	
		茎段	芽	茎段	芽
MS1	2,4-D 2.0	10	7	88	97.6
MS2	2,4-D 2.0+ NAA 0.5	9	5	97	100
MS3	2,4-D 2.0+ NAA 0.5+ KT 0.2	12	7	82.7	43
MS4	2,4-D 2.0+ NAA 0.5+ KT 0.5	25	-	74	0
MS5	NAA 3.0	9	8	93.3	100
MS6	NAA 3.0+ 2,4-D 0.5	9	9	92	100
MS7	NAA 3.0+ 2,4-D 0.5+ KT 0.2	12	-	81	0
MS8	NAA 3.0+ 2,4-D 0.5+ KT 0.5	27	-	77	0

在 MS培养基上,试验不同种类、不同浓度的激素及其组合对南方红豆杉外植体愈伤组织诱导的影响 结果表明,芽的污染率很低,几乎为零;而茎段虽然是春季刚抽出来的,但其污染率仍为 25%左右。从表 1中可见,不同的激素种类和浓度对愈伤组织的诱导有较大差别 茎段诱导的最适培养基为 MS和 2,4-D的组合与 MS和 NAA的组合对茎段愈伤组织的诱导时间和诱导率的效应相似,均可在两周内产生愈伤组织。茎段愈伤组织的产生先是茎两端膨大,叶柄处产生愈伤组织,然后整个茎膨大,叶片也愈伤组织化,最后整个外植体可以全部转为愈伤组织,与其它报道一致^[5-7]。KT延迟了茎段愈伤组织的产生,且降低了诱导率,但低浓度的 KT对愈伤组织的质地有改善作用 KT对芽愈伤组织的诱导有很大影响,在 MS4 MS7 MS8 3种 KT组合中,芽无法产生愈伤组织,约 4周后,芽渐渐变成褐色而死亡。在 MS3中虽有愈伤组织产生,但很快褐化,生长极为缓慢 芽诱导的最适培养基为 MS2 茎段和芽相比,芽产生愈伤组织的时间早,诱导率高,愈伤组织生长速度快。这可能是由于芽的组织分化程度低,细胞分裂旺盛的原因。芽和茎段对 KT的反应不同,可能是两者内源激素水平不同所致。

2.2 愈伤组织增殖和驯化:虽然在 MS培养基上南方红豆杉的诱导率较高,但愈伤组织的生长却较差。所以以 B₅培养基为基础,研究激素的种类和浓度对芽愈伤组织的生长率和紫杉醇含量的影响 鉴于不同的激素配比对南方红豆杉愈伤组织的生长有影响,本实验在 B₅培养基中附加不同配比的激素,以选取较适合芽和茎段愈伤组织生长的培养条件。将疏松、浅绿色或白色的愈伤组织接种于含有不同激素种类和浓度的培养基中继代培养,观察激素对愈伤组织增殖的效果(图 3) 芽来源的愈伤组织可以直接转入增殖培养基中进一步扩大培养。茎段来源的愈伤组织则保留在外植体上继代培养 2~3次,让其充分愈伤组织化后,再挑选色浅的进行增殖 从表

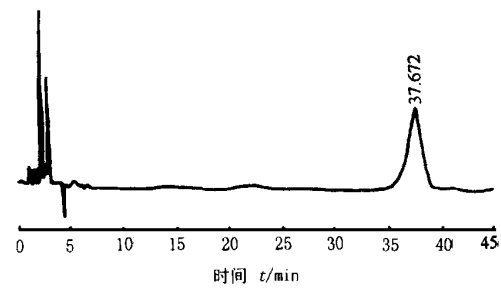


图 1 紫杉醇标样色谱图

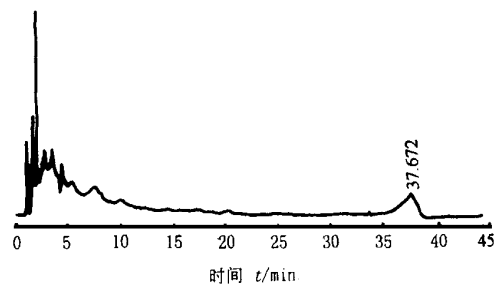


图 2 愈伤组织中紫杉醇的色谱图

2 结果与讨论

2.1 激素对愈伤组织诱导的影响:见表 1

2中可以看出,愈伤组织在不同激素作用下生长和紫杉醇积累差别较大,其中以 B₅(5)积累紫杉醇的量为最佳 在 B₅(5)上多次继代培养后,可形成较为均一、稳定的无性系 生长过程中,愈伤组织颜色逐渐加深,由浅黄到棕黄至深棕色,其中以 B₅(1)分泌褐色物较早、较多。

表 2 南方红豆杉芽的愈伤组织培养

培养基	激素的种类和浓度 (mg/L)	生长率 (g/L)	紫杉醇含量 (%)
B ₅ (1)	2,4-D 2.0 NAA 0.5	9.27	0.004 1
B ₅ (2)	2,4-D 2.0 NAA 0.5 KT 0.2	7.83	0.008 4
B ₅ (3)	NAA 3.0 2,4-D 0.5 KT 0.2	8.16	0.007 0
B ₅ (4)	2,4-D 0.5 NAA 1.5 KT 0.2	7.52	0.009 8
B ₅ (5)	2,4-D 0.5 NAA 1.0 KT 0.5	7.74	0.013 0
B ₅ (6)	NAA 0.5 KT 1.0	6.81	0.015 0

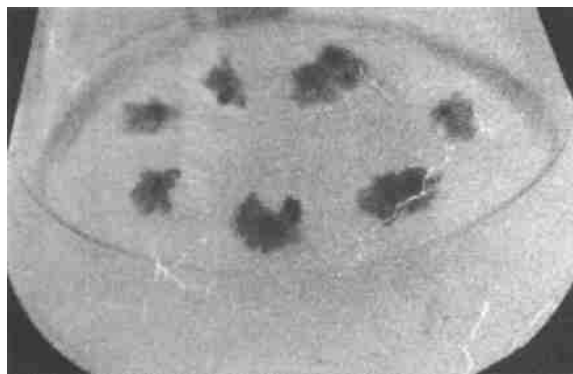


图 3 南方红豆杉芽的愈伤组织

2.3 愈伤组织的生长周期:南方红豆杉芽的愈伤组织的生长周期为 32 d 左右,延滞期较长,约 16 d,第 16~28 天为指数生长期和对数生长期,此后进入稳定期,大约第 32 天后,愈伤组织开始衰老 其生长曲线与红豆杉属其他植物愈伤组织的生长曲线基本相似(图 4)

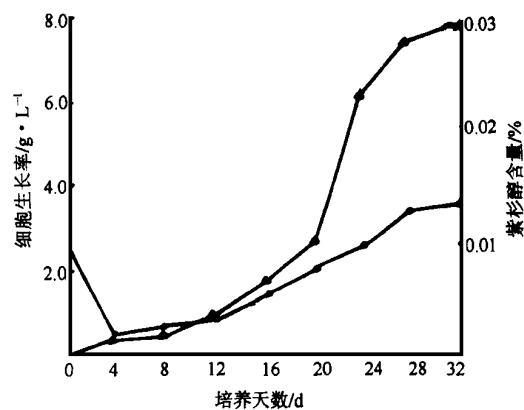


图 4 南方红豆杉芽愈伤组织的生长周期及紫杉醇含量变化

参考文献:

- [1] 刘本叶,叶和春,立国凤.抗癌新药紫杉醇的研究概况[J].植物学通报,1995,12(3): 8-14.
- [2] 刘 涤,章国瑛,王 晓,等.红豆杉资源与紫杉醇生产概况[J].植物资源与环境,1997,6(1): 48-53.
- [3] 罗建平,牛炳韬,罗敬芬,等.云南红豆杉培养细胞系的建立[J].生物工程学报,1997,13(3): 326-330.
- [4] 甘烦远,郑光植,彭丽萍,等.云南红豆杉细胞悬浮培养[J].植物生理学报,1997,23(1): 43-46.
- [5] 蔡朝晖,高山林,朱丹妮.东北红豆杉愈伤组织的诱导、生长及紫杉醇含量测定[J].药物生物技术,1995,2(3): 11-14.
- [6] 陈永勤,朱蔚华,吴蕴祺,等.不同种类红豆杉愈伤组织的诱导及紫杉醇含量的差异[J].中草药,2000,31(3): 216-218.
- [7] 甘烦远,彭丽萍,郑光植.云南红豆杉愈伤组织培养及其生长紫杉醇的研究[J].生物工程学报,1996,12(增刊): 308-311.
- [8] 陈永勤,朱蔚华,吴蕴祺,等.组培条件对云南红豆杉愈伤组织生长和形成紫杉醇的影响[J].中国中药杂志,2000,25(5): 269-271.
- [9] 盛长忠,王淑芳,王宁宁,等.南方红豆杉愈伤组织培养的研究[J].中草药,2000,31(2): 130-132.
- [10] 张宗勤,杨建英,吴耀武.南方红豆杉组织培养及紫杉醇的产生[J].西北植物学报,1998,18(4): 488-492.
- [11] 赵 芳,倪 良,耿 征,等.南方红豆杉组织培养研究I.愈伤组织诱导和培养条件优化[J].中草药,1999,30(3): 213-215.
- [12] 章国英,王 晓,刘 涤,等.南方红豆杉的组织培养和紫杉醇的含量测定[J].上海中医药杂志,1996,11: 43-44.

(上接第 636 页)

细胞继发性增多,血液粘稠度增加,血管内皮细胞损伤,特别是在急性期,因严重感染、酸中毒、免疫复合物沉积致使血管内皮损伤更重,胶原组织暴露激活凝血系统,终致血液粘滞性及凝固性增加,成为血栓形成的基础^[1]。中医认为慢性肺心病主要是血瘀所致,用活血化瘀药能降低血粘度,改善微循环,纠正缺氧,促进代谢,降低毛细血管通透性,减轻肺水肿,降低循环压力,达到改善心功能的目的^[2]。丹参具有抑制血小板聚集,解除小血管痉挛,增加肾脏微循环灌注,防治弥漫血管内凝血的作用,可促进代谢产物排泄,干扰脂质过氧化物代谢和清除过多氧自由基,

丹参能降低肺动脉高压,降低右心负荷,增加每搏心输出量,改善右心功能,此外尚有抗炎作用^[3]。复方丹参滴丸副作用小,疗效确切,但由于观察例数较少,且时间不长,对肺心病的长期疗效与实用价值尚待更多的实践加以验证

参考文献:

- [1] Jones R. Ultrastructural analysis of contractile cell development in lung microvessels in hyperoxic pulmonary hypertension. Fibroblasts and intermediate cell selectively reorganize nonmuscular [J]. Am J Pathol, 1992, 141: 1491-1505.
- [2] 邓晓航,李 健.活血化瘀法在肺心病治疗中的作用[J].中国中医急诊杂志,1998,8(增刊): 53-54.
- [3] 莫晓能,陈文彬.丹参防治肺动脉高压的研究[J].中国中西医结合杂志,1999,19(4): 252-253.