

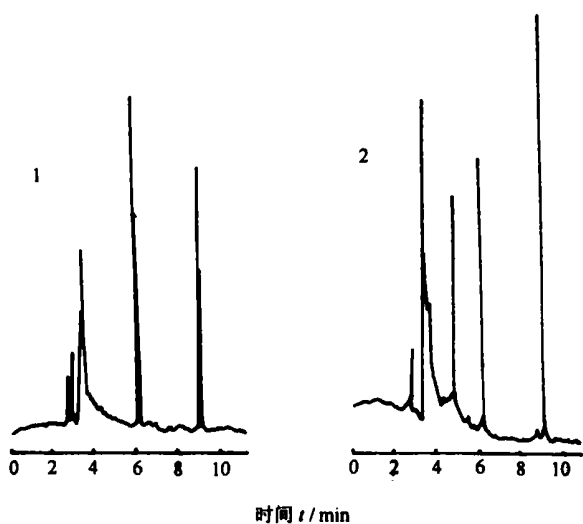


图 2 酸枣仁 (1)和缅枣仁 (2)的 CZE图谱

两者的显微特征基本相同,仅子叶表皮细胞中草酸钙晶体的含量及细胞的大小、多寡有别;薄层层析的斑点

基本一致,只是个别斑点的大小和荧光强度不同;在镇静、催眠方面也有相近的作用。因此,认为缅枣仁可以代替酸枣仁使用。本研究结果表明,缅枣仁与酸枣仁蛋白质的含量、氨基酸组成、SDS-PAGE及CZE图谱,在基本相似的基础上,尚有个别的差异存在。可以预见,两者在药理毒理作用方面,可能存在较多的相似之处和个别的差异,其具体的异同有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典 [S]. 1995年版,一部.
- [2] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用 (第七卷) [M]. 北京: 学苑出版社, 1997.
- [3] 方子年,郑玲. 缅枣仁与酸枣仁的比较 [J]. 中草药, 1987, 18(4): 29-30.
- [4] 赵文明. 种子蛋白质基因工程 [M]. 西安: 陕西科技出版社, 1995.
- [5] 宋治军,纪重光. 现代分析仪器与测试方法 [M]. 西安: 西北大学出版社, 1994.
- [6] [美] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1992.

悬浮培养过程中碳、氮、磷的补加对南方红豆杉细胞生长影响的研究

胡萍, 元英进, 苗志奇*

(天津大学化工学院 天然产物生化工程所, 天津 300072)

摘要: 目的 解决南方红豆杉生长缓慢的问题。方法 考察红豆杉细胞悬浮培养过程中磷的消耗, 并研究了碳、氮、磷对细胞生长及细胞活性的影响。结果 碳源在悬浮培养中期已经消耗殆尽, 后期碳源的缺乏限制了细胞的生长。结论 补加碳源组与对照组相比, 细胞生长率和细胞密度明显提高, 其中细胞生长率约提高了 83%。

关键词: 南方红豆杉细胞; 悬浮培养; 生长; 碳源

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)01-0028-04

Effects of fed-batch carbohydrate, nitrogen, phosphorus on growth of *Taxus chinensis* var. *mairei* cell during suspension culture

HU Ping, YUAN Ying-jin, MIAO Zhi-qi

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract **Object** To solve the problem that *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu grows slowly. **Methods** The consumption of phosphorus during the cell suspension culture and the effect of fed-batch carbohydrate, nitrogen and phosphorus on cell growth and living-cell activity were assayed. **Results** The carbohydrate was exhausted in the middle phase of suspension culture, deficiency of carbohydrate led to inhibition of cell growth in the late culture. **Conclusion** Compared with the control group, the cell growth rate and the cell density in the fed-batch carbohydrate group were increased significantly, and the cell growth rate was up to 83%.

Key words *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu; suspension culture; growth; carbohydrate

紫杉醇是一种有效的抗癌新药,红豆杉植物细胞培养生产紫杉醇是解决该药源紧缺的方法之一,但在植物细胞培养过程中,细胞生长缓慢是制约其工业化的一个重要因素,因此如何提高悬浮培养过程中植物细胞的生长速度成为国内外研究的热点^[1]。现有研究工作主要集中在初始培养基组成优化与培养条件优化两方面^[2],但由于间歇培养过程中营养组分的含量并不恒定,而是随培养过程的进行而下降,因此初始培养基组成优化不能在整个培养过程中一直保持最优的培养基组成^[2]。本文研究了培养过程中碳、氮、磷的消耗规律,并采用流加的方法,对整个培养过程中碳、氮、磷组成进行调整优化,从而大幅度提高细胞生长速率,并为后续的优化流加策略奠定了基础

1 材料

细胞株系为南方红豆杉细胞(细胞系 2D3A),在 B5固体培养基上继代培养。液体培养基为 B5培养基加 30 g/L蔗糖+ 3 g/L酪蛋白水解物+ 2 mg/L N A A + 0.5 mg/L 6-BA

2 分析方法

2.1 细胞量的测定:将培养液于 5 000 r/min转速下离心,收集沉淀的细胞,称量其鲜重,于 60℃烘干后,称其干重,计算出细胞生长率和比生长速率及培养密度;收集上清液,测量培养基组成^[3]。

2.2 细胞活性测定:氯化三苯四氮唑还原法(TTC法)测定^[4]。

2.3 培养液中剩余糖的测定:采用生物传感仪测定^[5]。

2.4 培养液中剩余磷的测定:采用钼蓝比色法。

3 实验方案

3.1 补加碳、磷的实验:将愈伤组织细胞(13± 1)g/L接种到装有 50 mL液体培养基的 250 mL摇瓶中,于 100 r/min 25℃、黑暗条件下培养,每一周补加一次营养成分,每瓶补加量均为 5 mL,补加液组成如表 1所示。培养周期为 20d 培养过程中每 2天取 1次样,测量其培养液中葡萄糖和无机磷的残留量、细胞干重及细胞活性

表 1 补碳、磷实验中添加液成分和浓度(g/L)

组别	蔗糖	NaH ₂ PO ₄
空白	0	0
碳源	220	0
磷源	0	1.65
碳源+ 磷源	220	1.65

3.2 补加氮源、碳源的实验:实验设计方法与补加碳、磷实验相同,其中补加液组成如表 2所示。培养

过程中每 3天取样 1次,测量细胞重量、细胞活性。

表 2 补氮、碳实验中添加液成分和浓度(g/L)

组别	蔗糖	(N H ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	水解酪蛋白
空白	0	0	0	0
有机氮	0	0	0	30
无机氮	0	13.4	40	0
碳源+ 有机氮	220	0	0	30

4 结果与总结

4.1 补加碳、磷的实验:培养过程中取样测量细胞密度、细胞活力、培养基残糖含量以及培养基中残磷含量,见图 1~ 4

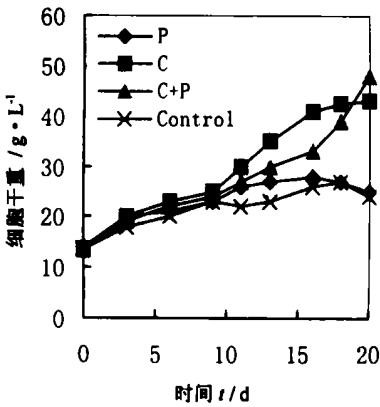


图 1 细胞干重随时间变化曲线

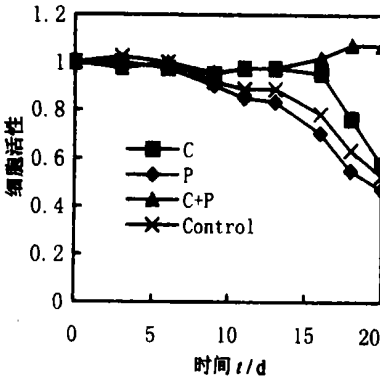


图 2 细胞活性随时间变化曲线

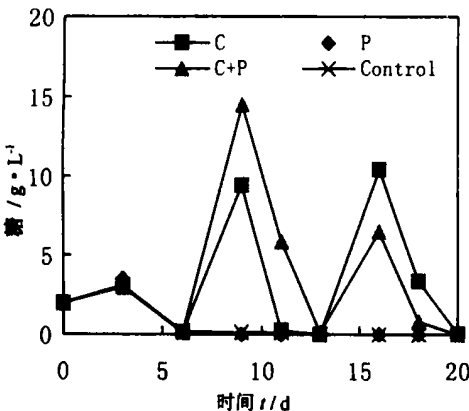


图 3 培养液中剩余糖含量曲线

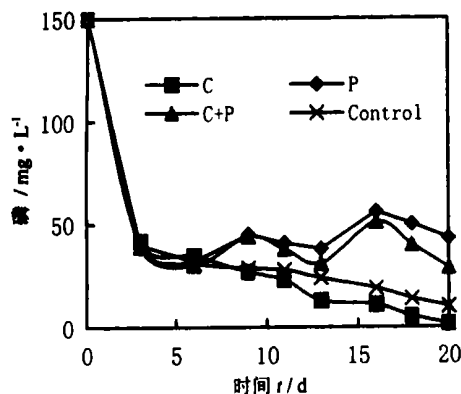


图 4 培养液中剩余磷含量曲线

4.1.1 细胞生长状况: 图 1 显示同时补加碳和磷的实验组中细胞量在整个培养周期内保持增长趋势, 对照组和补加磷的实验组中细胞在培养第 10 天后基本停止生长, 而单独补加碳源的实验组虽然在第 10 天仍保持继续生长趋势, 但第 15 天后, 细胞量增长停滞。

由于红豆杉细胞在碳源丰富的条件下会在细胞内形成淀粉颗粒, 作为能源储备, 而以细胞干重来表征生物量必然将这种胞内淀粉作为生物量来处理, 同时较高浓度的磷抑制这种淀粉形成过程, 所以在培养的前 17 d 同时补加碳和磷的细胞生长速率低于单独补加碳的实验结果, 但在培养 17 d 后, 同时补加碳和磷的红豆杉细胞继续保持增长, 而单独补加碳的细胞生长基本停止。

根据实验中细胞生物量数据, 可以计算在不同实验组中的细胞平均生长速率、比生长速率、倍增时间、生长倍数及干基密度数值, 见表 3。

表 3 细胞生长统计数据表

组别	生长速率 (g/L ² ·d)	比生长速率 (d ⁻¹)	倍增时间 (d)	干基密度 (g/L)
碳源	1.47	0.108	11	43
磷源	0.875	0.062	16	28
碳源+ 磷源	1.73	0.129	11	48
空白	0.75	0.056	18	27

4.1.2 细胞活性: 从图 2 中可以看出, 在培养的前 10 天各组实验中细胞活力基本相同, 约等于接种时的细胞活力, 而在培养的后 10 天, 对照组细胞活力迅速下降到一个较低的水平; 单独补加碳的实验组中细胞活力下降的现象出现在第 15 天, 表明单独补加碳源, 可以延续细胞的活力的下降, 但同样不能在整个培养周期内保持较高的细胞活力。同时补加碳和磷的实验组中细胞活力则继续保持在高水平上, 没有出现下降。补磷实验结果与对照组结果相似。以上实验现象说明加碳源可以抑制对照组中第 10 天

出现的细胞活力下降, 但在 15 d 后, 只有同时补加碳和磷, 才能维持较高的细胞活力。

4.1.3 碳、磷的消耗规律以及补碳对细胞生长的影响: 从图 3 中可见, B5 培养基中的糖在一周左右就随细胞生长代谢而消耗完毕, 培养基中基本测不到残糖的存在。而补加碳源或者同时补加碳、磷, 可以引起培养基中碳源含量的周期性阶跃上升, 然后随细胞代谢而下降。且同时补加碳、磷实验组中碳的消耗速率低于单独补加碳源的情况。

残磷的变化规律与残碳基本类似, 差别是培养基中磷的消耗速率比碳慢, 在对照组培养 15 d 后, 磷含量才下降到初始量的一半以下。

总结以上实验现象, 可以推测: B5 培养基中的碳源在 1 周左右就由于细胞生长代谢而消耗完结, 细胞利用胞内储存的淀粉, 可以继续维持代谢并保持高的细胞活力到 10 d 左右; 10 d 后, 由于碳源的缺乏, 细胞生物量停止生长, 细胞活力下降。由于此时培养基中的磷含量还足够维持细胞生长代谢, 因此若通过补加方式, 提高培养基中的碳源含量, 可以继续维持细胞的生长与活力。但在培养 15 d 后, 培养基中的碳源和磷源的含量都出现缺乏, 因此必须同时补加碳和磷才能继续维持细胞的生长与活力。

4.2 补加氮、碳的实验: 培养过程中取样测量细胞密度、细胞活力如图 5、6。

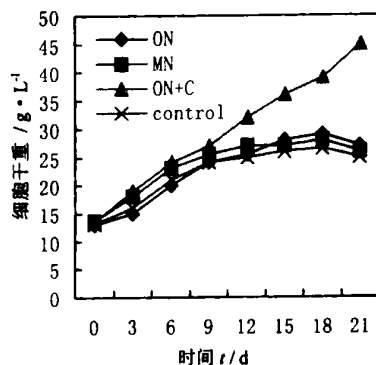


图 5 细胞干重随时间变化曲线

细胞生长状况: 图 5 显示, 同时补加碳和氮的实验组中细胞量在整个培养周期内保持增长趋势, 对照组细胞在培养第 10 天后基本停止生长。补充有机氮和无机氮源实验组中的细胞量相似, 均较对照组略有增加, 但不显著, 在第 10 天以后细胞生长也进入停滞期。

根据实验中细胞生物量数据, 可以计算在不同实验组中的细胞平均生长速率、比生长速率、倍增时间、生长倍数及干基密度数值, 见表 4。

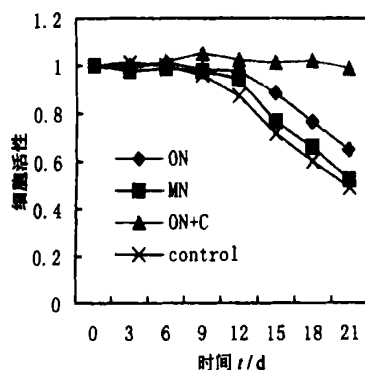


图 6 细胞活性随时间变化曲线

表 4 细胞生长统计数据表

组别	生长速率 (g/L·d)	比生长速率 (d ⁻¹)	倍增时间 (d)	干基密度 (g/L)
有机氮	0.89	0.064	14	29
无机氮	0.79	0.058	16	28
碳源+ 有机氮	1.58	0.117	11	45
空白	0.74	0.056	18	26

从图 6中可以看出,在培养的前 10 d各组实验中细胞活力基本相同,约等于接种时的细胞活力。而在培养的后 10 d,对照组细胞活力迅速下降到一个较低的水平;补加有机氮与补加无机氮实验组中细胞变化情况相似,活力下降的现象均出现在第 12 天,表明单独补加氮源对延缓细胞活力下降的作用有限。而同时补加碳氮的实验组中细胞活力则继续保持在高水平上,没有出现下降。补充碳源物质才是抑制对照组中第 10 天出现的细胞活力下降的有效手段。

总结以上实验现象,可以推测:培养 10 d后, B5 培养基中碳源消耗完毕,成为抑制细胞生长与细胞活力下降的主要原因。而此时培养基中氮源还比较充分,补充有机氮和无机氮对细胞生物量的增加和维持较高的细胞活性没有显著影响。

5 讨论

在南方红豆杉细胞悬浮培养过程中, B5 培养基中的各元素基本满足细胞生长需要,培养中后期氮源和磷源仍能满足细胞生长代谢的需要,因此补充氮、磷对细胞生长和细胞活力没有显著影响;但碳源物质却消耗完毕,成为制约细胞生长的主要因素,所以补充碳源则可以克服在培养后期培养基中出现的碳源缺乏现象,使细胞维持较高的生长速率和细胞活性,为采用流加的方式进行大规模红豆杉细胞悬浮培养做了初步的尝试。

参考文献:

- [1] 元英进,刘家新,卢伟伸. 大规模细胞培养生产紫杉醇的潜力. 第九届全国化学工程科技报告会论文集 [C]. 1998.
- [2] Fett-Neto A G, Melanson S J, Sakata K, et al. Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification [J]. Bio/Technol, 1993, 11(6): 731-734.
- [3] Fett-Neto A G, Zhang W Y, Dicosmo F. Kinetics of taxol production, growth and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44(2): 205-210.
- [4] 孙敬三,桂耀林. 植物细胞工程实验技术 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1995.
- [5] 刘家新. 红豆杉细胞培养 pH 值调控与生化反应器操作策略研究 [D]. 天津大学硕士论文.

水飞蓟素固体分散体中总黄酮的测定

李凤前,胡晋红,朱全刚*

(第二军医大学长海医院 药学部,上海 200433)

摘要:目的 测定水飞蓟素固体分散体制剂中总黄酮。方法 采用一阶导数紫外分光光度法。结果 以 1:3, 1:6 和 1:9 药物/载体比例处方制成的固体分散体中总黄酮的量分别为 27.72%、15.59% 和 10.98%。结论 该法可避开空白 PEG-6000 载体对固体分散体中总黄酮测定的干扰,操作简便,结果准确可靠。

关键词:水飞蓟素;固体分散体;黄酮;一阶导数紫外分光光度法

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)01-0031-03

Quantitation of flavonoids in silymarin loaded solid dispersion system

LI Feng-qian, HU Jin-hong, ZHU Quan-gang

(Department of Pharmaceutical Sciences, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

* 收稿日期: 2001-03-13

作者简介: 李凤前 (1970-),男,理学博士,现于第二军医大学长海医院进行博士后研究,研究方向: 药物新型给药系统