

喜树胚轴细胞悬浮培养的优化和喜树碱的积累

潘学武, 刘欣, 吕应堂*

(武汉大学生命科学学院 植物发育教育部重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要:目的 优化喜树胚轴细胞悬浮培养体系生产喜树碱。方法 将由喜树种子下胚轴诱导的愈伤组织进行悬浮培养, 研究了基本培养基、激素和培养条件对培养物生长的影响, 测定了培养细胞生长和喜树碱积累的动态变化。结果 悬浮培养细胞在MS培养基中细胞生长良好, 细胞分散性和喜树碱积累优于在其他培养基中。最佳激素组合为2,4-D 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L, 细胞继代周期以12 d左右为宜, 悬浮细胞适合在22~26 °C, 120 r/min下生长。悬浮培养细胞在第4~20天为对数生长期, 细胞倍增时间为 $t(d)=3.92 d^{-1}$, 细胞干重至第20天达到最大, 为27.44 g/L。在细胞对数生长期, 喜树碱积累与细胞生长呈线性正相关性, 第20天喜树碱质量分数达到最大值 9.319×10^{-5} , 喜树碱产量为2.56 mg/L。结论 MS基本培养基适合喜树胚轴细胞悬浮培养, 细胞生长前20天内, 培养体系中喜树碱积累与细胞生长呈正线性相关性。

关键词:喜树; 喜树碱; 悬浮培养; 基本培养基; 培养条件

中图分类号:R282.13

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)08-1221-05

Optimization of cell suspension cultures in hypocotyls of *Camptotheca acuminata* and camptothecin accumulation

PAN Xue-wu, LIU Xin, LÜ Ying-tang*

(Key Laboratory for Plant Developmental Biology of Ministry of Education, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: **Objective** To optimize cell suspending culture system of callus initiated from hypocotyls in *Camptotheca acuminata* to produce camptothecin. **Methods** The callus initiated from hypocotyls of *C. acuminata* seeds were suspending-cultured, the effects of basic media, plant growth regulators and culture condition on cell growth were studied and the dynamic changes of cell growth and camptothecin accumulation were monitored. **Results** Suspension culture cells grew well in MS medium and cell homogeneity and camptothecin content were superior to those in other media. The optimum plant growth regulators were 2, 4-D 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L, proper subculture time was about 21 and suspension cells developed well in 22–26 °C at 120 r/min. The logarithm phase for cell growth was from 4th day to 20th day and during this time the double biomass accumulation time was 3.92 d. Meanwhile, during logarithm phase, camptothecin was positively linear correlative to cell growth. Consequently, at 20th day the maximum cell dry weight, camptothecin, and yield were 27.44 g/L, 9.319×10^{-5} , and 2.56 mg/L, respectively. **Conclusion** MS basic medium adapted to establish cell suspension culture system of callus initiated from hypocotyls in *C. acuminata* and camptothecin is positively linear correlative to cell growth during the cell growth until the first day.

Key words: *Camptotheca acuminata* Decaisne; camptothecin; suspension culture; basic medium; culture condition

喜树碱(camptothecin)是一种色氨酸衍生的萜烯类吲哚生物碱, 是美国的Wall博士于1966年从我国引种的特有树种喜树 *Camptotheca acuminata* Decaisne 茎的提取物中首次分离得到的抗癌活性物

质^[1], 而直到1985年, Hisang等发现喜树碱通过抑制肿瘤细胞内拓扑异构酶I (Topo I) 的活性而具抗癌效应^[2], 才真正引起众多研究者的兴趣, 因为喜树碱类药物是迄今为止发现的唯一一类专门通过抑

收稿日期: 2004-11-20

作者简介: 潘学武(1975—), 男, 湖北恩施人, 武汉大学在读博士研究生, 研究方向为植物次生代谢和植物细胞发酵工程。

* 通讯作者 吕应堂 Tel: (027)68752619 Fax: (027)87666380 E-mail: yingtlu@whu.edu.cn

制拓扑异构酶 I 发挥细胞毒性的抗癌药物。目前,喜树碱作为继紫杉醇之后又一木本植物来源的天然抗肿瘤植物药,已成为又一新的世界性热门研究课题^[3]。其中,喜树碱的两种衍生物 Irinotecan 和 Topotecan 已于 1996 年得到美国 FDA 的批准用于临床,同时,9-硝基喜树碱已由美国 SuperGen 公司完成针对晚期胰腺癌的 III 期临床研究,正向美国 FDA 提出新药申请。其他的如 10-羟基喜树碱、Exatecan (DX-8951f)、Lurtotecan (GG-211)等正处于各级临床实验。所有的衍生物都以喜树碱为原料而合成,据 Sudo 等 2002 年的估计^[4],喜树碱的全球年需求量约为 200 kg,喜树碱类药物全球年销售额大约是 10 亿美元,因此,作为一种原料药,喜树碱具有相当的研究价值。

利用植物细胞大规模培养技术生产高价值次生代谢产物在多种药用植物中取得了成功,随着人们对喜树碱类抗癌药物需求的增加,单纯靠从植株中提取喜树碱已不能满足市场的需求,利用植物细胞培养法生产喜树碱是一有益的新探索。在这方面,国外的一些研究小组率先进行了研究^[4~6],相比而言,国内虽有报道^[7]却大为滞后。悬浮培养体系的建立和优化是大规模培养的基础,因此,本实验以喜树胚轴来源的愈伤组织为材料,建立并优化细胞悬浮培养体系,研究了喜树碱积累的动力学过程,旨在为喜树细胞工程生产喜树碱类药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源:成熟的喜树种子于秋季采自武汉大学校园内成年大喜树。

1.2 下胚轴愈伤组织的诱导与继代培养:种子经常规方法表面消毒后,用接种针刺去种皮,切取下胚轴接入 MS+2,4-D 0.2 mg/L+蔗糖 2.5%+琼脂粉 0.8%,pH 5.8 诱导培养基中,材料置于(25±1)℃温室中暗培养 20 d 左右可成功诱导出愈伤组织,用上述培养基作继代培养基,培养条件不变,扩大培养愈伤组织,每 15 天继代 1 次。

1.3 悬浮培养的建立与优化:将继代培养 8~10 次左右的愈伤组织,接入装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,新鲜细胞接种量为 10%,蔗糖 40 g/L,黑暗中于(25±1)℃温室中在摇床上进行振荡培养。通过不同基本培养基的选择、激素的筛选、培养条件的改变等来优化喜树悬浮培养,细胞开始褐变时即 20 d 取样(特别说明除外)测定悬浮细胞生长速率和细胞聚集体的分配情况。

1.4 参数测定

1.4.1 细胞聚集体的分沾:参照文献的方法^[8],收获的新鲜细胞通过不同孔径的筛网,将细胞分沾成不同直径范围的细胞聚集体。

1.4.2 细胞生物量和培养液 pH 值的测定:将待测的悬浮细胞通过真空抽滤将培养液与细胞分开,用 pH 计测定培养液 pH 值,收获细胞于 50℃鼓风烘箱烘干至恒重后称质量,生长速率以每升培养液产生的细胞干重来表示。

1.4.3 喜树碱的测定:样品中喜树碱的提取和检测参照文献^[4,5]的方法稍加改进而成。精密称取干细胞 100 mg,研细加入甲醇 5 mL,超声 30 min,吸出甲醇层,重复 3 次,合并甲醇层干燥成结晶物。结晶物用 2 mL 氯仿-水(8:2)萃取 3 次,合并氯仿层成结晶即为喜树碱粗提物,1 mL 甲醇(色谱纯)溶解定容后用于 HPLC 分析。液相色谱分析采用 Agilent 1100 series 高效液相色谱仪,色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,Agilent 公司),流动相:甲醇-水=40:60,体积流量:1 mL/min,荧光检测(激发波长 365 nm,吸收波长 428 nm),定量参数为峰面积,喜树碱标准样品购自美国的 Sigma 公司,喜树碱的质量分数用愈伤组织干质量的百分数或每升培养基细胞产生的喜树碱总量来表示。

1.4.4 重复性:试验中各处理至少重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 适合喜树悬浮培养基本培养基的选择:将生长迅速,分裂旺盛,疏松易碎的淡黄色或无色愈伤组织接入不同的液体培养基中,本实验选取 4 种基本培养基:MS、B5、N6、H 和 WP,各附加 0.2 mg/L 的 2,4-D 和 40 g/L 的蔗糖。每 20 天继代 1 次,每继代 1 次测定细胞的生长速率(结果见图 1-A)。连续继代 4 次后,愈伤组织逐渐适应了液体培养环境,这时测定悬浮培养细胞在不同的基本培养基中细胞聚集体的分配情况(结果见图 1-B)和喜树碱(结果见图 1-C)的质量分数。从图中可以看出,在继代过程中,喜树细胞在 B5 培养基生长最快,细胞干重可达到 18.23 g/L,在 MS 培养基中生长其次,可达到 16.09 g/L,在 N6 培养基中最差,细胞干重仅有 11.07 g/L。在继代过程中,生长在 B5 和 N6 培养基中的细胞容易聚集成团,每次继代要去掉大部分细胞,而在其他几种基本培养基中,细胞分散性较好,因此,笔者在悬浮细胞继代到第 4 代时测定了细胞聚集体的分配情况,从图 1-B 中可以看出以上现象。在 MS 培养基中,悬浮细胞聚集体大多集中在 0~3

mm,而在 B5 培养基中细胞聚集体大多集中在 4 mm 以上。悬浮培养细胞喜树碱的合成能力在几种培养基中也各不相同,在 MS 培养基中质量分数可达 6.69×10^{-5} ,产量可达 1.055 mg/L,在 N6 培养基中最差。综合考虑,本实验选择 MS 培养基作为适合喜树细胞悬浮培养的基本培养基。

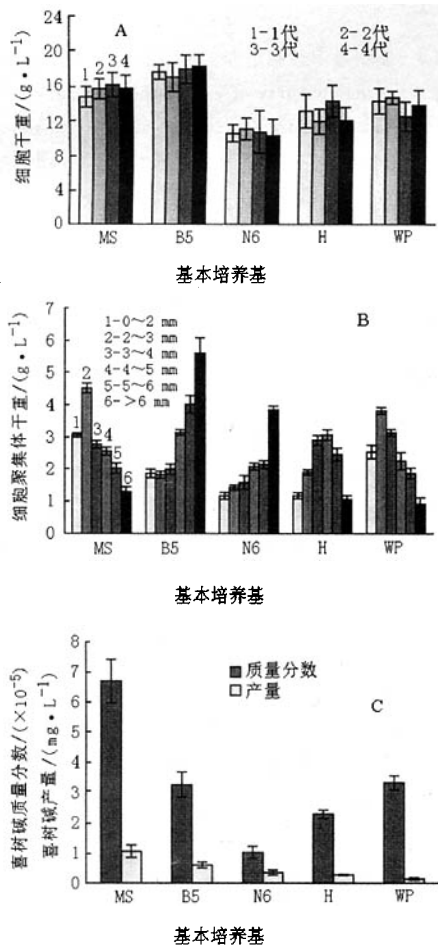


图 1 喜树悬浮培养细胞在不同基本培养基中的生长速率(A)、细胞聚集体大小(B)和喜树碱积累(C)
Fig. 1 Growth rates (A), cell aggregation sizes (B) and camptothecin accumulation (C) of suspension culture cells *C. acuminata* in various basic media

2.2 激素的筛选:在愈伤组织培养和细胞悬浮培养过程中,2,4-D 具有明显促进细胞分裂的作用,但高质量浓度的 2,4-D 也明显抑制了喜树碱的生物合成(数据未列出),因此,实验中 2,4-D 质量浓度不变,考察另外两种在实验中效果较好的激素,即生长素 NAA 和细胞分裂素 6-BA 的不同配比对细胞生长的影响,结果如表 1 所示。NAA 和 6-BA 都为 0.5 mg/L 时细胞生物量为最大值 25.82 g/L,高质量浓度的激素明显抑制细胞的生长。

2.3 继代时间,培养温度和摇床转速的影响:植物悬浮培养细胞在生长过程中,外部培养条件起着非常重要的作用。从图 2-A 可以看出,细胞继代时间不宜过长,以 21 d 左右为宜。喜树胚轴悬浮培养细胞对温度的适应范围相对较宽,在 22~26 ℃即细胞在(23±1) ℃和(25±1) ℃的温度条件下生长良好(图 2-B)。摇床转速对细胞生长影响明显,从图 2-C 中可以看出,细胞在低转速条件下生长迟缓,较高的转速抑制细胞生长,最适转速为 120 r/min。

2.4 喜树胚轴细胞悬浮培养的生长特性和喜树碱的动态积累:喜树胚轴悬浮培养细胞在 MS 培养基中,附加 2,4-D 0.2 mg/L,NAA 0.5 mg/L,6-BA 0.5 mg/L,蔗糖 40 g/L,在(25±1) ℃,120 r/min 条件下培养,每 4 天取样,测定悬浮培养细胞的生物量、培养液 pH 值和喜树碱的质量分数,结果如图 3、4 所示。喜树胚轴细胞悬浮培养的生长曲线近为“S”形(图 3)。细胞生长的延滞期约为 4 d,培养的第 4 天之后为对数生长期,细胞迅速增殖,细胞倍增时间 $t(d)=3.92 d^{-1}$,至第 20 天,细胞干重达最大值为 27.44 g/L。第 20 天后,细胞生长速度减慢,细胞干重缓慢下降。悬浮培养液 pH 值(图 3)在开始 4 d 内迅速下降,第 4 天为 5.28 g/L。然后缓慢回升,直到第 32 天达到最大值为 6.82 g/L。在此过程中,培养液 pH 值在第 16 天达到 5.7,接近培养基初始 pH 值 5.8。

图 4 表明,喜树细胞接入新鲜培养液后,培养物中喜树碱随细胞生长增殖而不断积累,第 20 天达最

表 1 NAA 和 6-BA 的不同比对细胞生长的影响
Table 1 Effects of different combinations of NAA and 6-BA on cell growth

NAA/(mg · L ⁻¹)	不同 6-BA 质量浓度时细胞生物量/(g · L ⁻¹)				
	0.3 mg/L	0.5 mg/L	1.0 mg/L	2.0 mg/L	3.0 mg/L
0.2	16.36±1.35	18.38±1.06	22.34±0.97	20.94±1.31	17.45±0.87
0.5	19.88±1.44	25.82±1.18	23.44±1.14	17.89±0.84	14.27±1.08
1.0	23.63±1.17	20.81±1.74	17.08±1.47	14.85±1.51	12.65±1.47
2.0	17.22±0.97	17.53±0.61	15.58±0.69	13.95±0.61	12.31±0.96

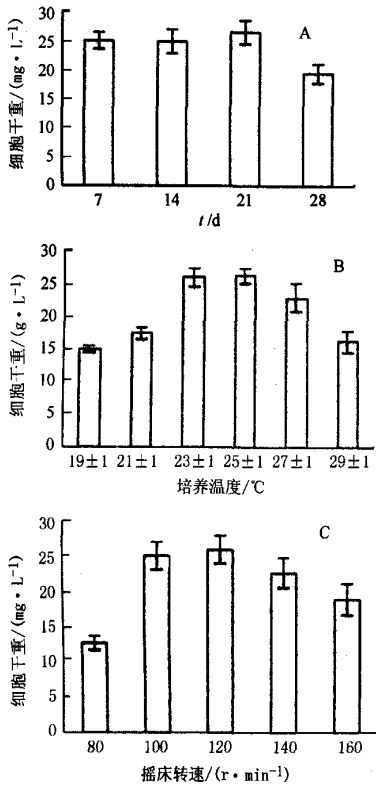


图 2 继代时间(A)、培养温度(B)和摇床转速(C)对细胞生长的影响

Fig. 2 Effects of subculture time (A), temperature (B), and shaking speed (C) on cell growth

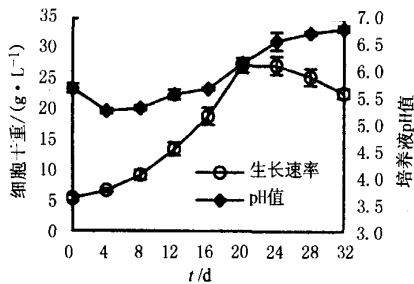


图 3 喜树悬浮培养细胞生长特性

Fig. 3 Cell growth characteristic in suspension culture of *C. acuminata*

大值,质量分数为 9.319×10^{-5} ,细胞生长进入稳定期,喜树碱迅速降低。在细胞生长前 20 d 内,喜树碱(Y)与细胞生长(X)呈正线形相关性, $Y = 0.0005X - 0.0022$, $R^2 = 0.9015$ 。喜树碱产量(Y)的变化趋势与含量趋势相同,也在细胞生长前 20 d 内与细胞生长呈正线形相关性, $Y = 0.1233X - 0.8198$, $R^2 = 0.984$,第 20 天达最大值,喜树碱产量为 2.56 mg/L。培养液中没有检测到喜树碱的产生,证明喜树悬浮培养细胞中喜树碱合成后贮存在细胞内,难以分泌到培养液中去。喜树碱质量分数($9.319 \times$

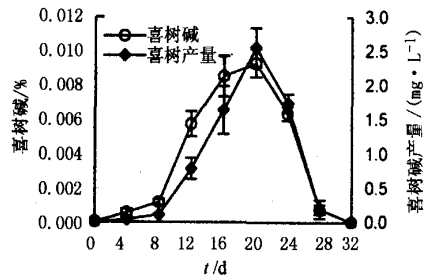


图 4 喜树悬浮细胞培养喜树碱积累的动力学曲线

Fig. 4 Dynamic curve of camptothecin accumulation in cell suspension culture of *C. acuminata*

10^{-5})低于来源植物,根据分析的组织不同,植株中喜树碱大约在 0.02%~0.5%^[9]。

3 讨论

据文献描述^[10,11],一个成功的悬浮培养体系必须满足如下条件:一是悬浮培养物分散性良好,细胞团较小;二是均一性好,细胞形状和细胞团大小大致相同;三是生长迅速。本研究结果表明,基本培养基的选择直接影响着建立的悬浮细胞系的质量。胚轴来源的喜树悬浮培养细胞虽然在 B5 培养基中生长旺盛,但是细胞的分散性和均一性较差。而在 MS 培养基中生长也很快,细胞分散性和均一性也优于在其他培养基中,因此,本实验采用 MS 培养基作为喜树悬浮培养的基本培养基。同时,细胞分散性和均一性较好的细胞在次生代谢产物合成能力也强于分散性和均一性较差的细胞,这在实验中(见图 1-C)和其他的实验中已得到证实^[8]。从试验中还可以看出,激素的配比,继代周期的长短,培养温度以及摇床转速等也是影响悬浮培养细胞生长的重要因素,这些条件的选择也会决定悬浮培养成功与否^[10~12]。

在喜树胚轴细胞悬浮培养体系中,生物量和喜树碱的积累均在第 20 天达最大值,此后,细胞进入稳定期,细胞生长逐渐停止并缓慢下降,而次生代谢物急剧下降,第 32 天几乎检测不到喜树碱的含量。与别的研究者^[5,7]所建立的喜树细胞悬浮培养体系相类似,悬浮培养液中没有检测到喜树碱的产生。植物细胞次生代谢物的生产和细胞生长之间存在偶联型、半偶联型和非偶联型 3 种关系^[10,13]。比较图 3 和 4 可知,喜树胚轴悬浮细胞中喜树碱的合成与细胞的生长呈紧密偶联型,喜树细胞中喜树碱的合成与细胞生物量积累趋势相同,这与 Van-Henge 等的报道相似^[5]。喜树细胞培养生产喜树碱在国内外都有报道,多数研究结果也表明^[5~7],细胞培养中喜树碱一开始很难达到或超过母本植株,只有 Wiedenfeld 等^[6]的部分细胞超过母本植株,质量分数高达

0.236%,但未见后续报道。本实验体系中喜树碱量仍低于野生植株,因此有必要从改进培养方式和代谢调控等诸多方面对喜树细胞悬浮培养体系进行深入研究以期提高其喜树碱量,为喜树细胞体外培养的工业化提供技术支持。

References:

- [1] Wall M E, Wani M C, Cooke C E, et al. Plant antitumor agents, the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukaemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Am Chem Soc*, 1966, 88: 3888-3890.
- [2] Hisang Y H, Herizberg R. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260: 14873-14878.
- [3] Hsiang Y H, Hertzberg R, Hecht S, et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260: 14873-14878.
- [4] Sudol H, Yamakawa T, Yamazaki M, et al. Bioreactor production of camptothecin by hairy root cultures of *Ophiorrhiza pumila* [J]. *Biotech Lett*, 2002, 24: 359-363.
- [5] Van-Hengel A J, Harkes M P, Wichers H J, et al. Characterization of callus formation and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1992, 28: 11-18.
- [6] Wiedenfeld H, Furmanowa M, Roeder E, et al. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1997, 49: 213-218.
- [7] Zhang D Y, Zhao X Q, Yu F, et al. Callus induction of *Camptotheca acuminata* and camptothecin production [J]. *J North East Normal Univ: Nat Sci Edit* (东北师大学报:自然科学版), 2002, 34(1): 45-48.
- [8] Zhao D, Huang Y, Jin Z, Qu W, et al. Effect of aggregate size in cell cultures of *Saussurea medusa* on cell growth and jaceosidin production [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21: 1129-1133.
- [9] López-Meyer M, Nesler C L, McKnight T D. Sites of accumulation of the antitumor alkaloid camptothecin in *Camptotheca acuminata* [J]. *Planta Med*, 1994, 60: 558-560.
- [10] Sun J S, Gui Y L. *Experimental Techniques in Plant Cell Biotechnology* (植物细胞工程实验技术) [M]. Beijing: Science Press, 1992.
- [11] Zhong C J, Li W D, Ge H B. Establishment and some influence factors of suspension cells in strawberry [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 2002, 38(1): 22-24.
- [12] Wu S X, Zu Y G, Wu M. High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis* [J]. *J Biotech*, 2003, 106: 33-43.
- [13] Zhang C R, Li L. Production of puerarin and other isoflavones in cell suspension cultures in leaves of *Pueraria lobata* seedling [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(7): 653-657.

罗汉果脱毒苗的快速繁殖研究

付长亮¹, 马小军^{1*}, 白隆华², 缪剑华², 宋经元¹

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所广西分所 广西药用植物园, 广西 南宁 530023)

摘要:目的 筛选适宜的罗汉果脱毒苗茎段增殖培养基, 研究培养温度与光照对茎段增殖培养的影响。方法 采用正交试验设计和完全随机实验设计筛选罗汉果脱毒苗茎段增殖培养基。正交 $L_9(3^4)$ 实验以在 MS+BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L 上培养 30 d 的罗汉果脱毒苗单芽姊妹系的单节茎段为外植体, 以培养基中 BA, NAA, IBA 及蔗糖为试验因子, 各因子设 3 个水平, 以在不同处理得到的增殖系数为测定指标; 在此基础上进一步研究了培养基中 BA 和蔗糖质量浓度对增殖效果的影响; 采用完全随机实验设计研究温度、光照对茎段增殖培养生成试管苗的影响。结果 通过对正交实验结果的极差分析及方差分析表明, 在 4 个因子中, 对罗汉果茎段增殖系数影响最大的是 BA, 其次是蔗糖的 NAA, IBA 的影响最小; BA, NAA, IBA 及蔗糖对增殖系数的影响都达到极显著。根据新复极差检验的结果, 当前研究得到的罗汉果离体茎段的最佳增殖培养基为 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L+IBA 0.1 mg/L+蔗糖 40 g/L, 罗汉果茎段在此培养基上培养 30 d 后增殖系数为 13.13; 不同浓度 BA 与蔗糖对茎段培养的研究结果表明, BA 在 1.0 mg/L 增殖系数最大。考虑为保持试管苗的遗传稳定性, BA 为 0.5 mg/L 为宜。增殖培养基中的蔗糖适宜质量浓度为 4.0%; 罗汉果茎段培养适宜条件为培养温度 25℃, 培养光强 1 000~3 000 lx。结论 增殖培养基的成功筛选及培养温度与光强的选择, 有助于实现罗汉果脱毒苗的工厂化生产。

关键词: 罗汉果; 脱毒苗; 茎段培养; 快速繁殖

中图分类号: R282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)08-1225-05

Rapid propagation of *Momordica grosvenori* virus-free plantlets

FU Chang-liang¹, MA Xiao-jun¹, BAI Long-hua², MIAO Jian-hua², SONG Jing-yuan¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,