

植物生长调节剂对东北矮紫杉愈伤组织中次生代谢物质的影响

刘同祥¹, 何冬云², 张宗申^{2*}

(1. 中央民族大学 中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081; 2. 大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要:目的 使用植物生长调节剂提高东北矮紫杉愈伤组织中紫杉醇和 10-去乙酰巴卡亭 III 的量。方法 以东北矮紫杉幼茎为外植体, 运用正交试验优选 NAA、2,4-D 和 6-BA 3 种植物生长调节剂组合培养植物愈伤组织, HPLC 法测定愈伤组织中紫杉醇和 10-去乙酰巴卡亭 III 的量。结果 植物生长调节剂对东北矮紫杉愈伤组织中紫杉醇和 10-去乙酰巴卡亭 III 合成的影响顺序是: NAA > 6-BA > 2,4-D。结论 利用东北矮紫杉愈伤组织培养生产紫杉醇和 10-去乙酰巴卡亭 III 的最佳培养基为: B₅ + NAA 2.0 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L。

关键词: 东北矮紫杉; 植物生长调节剂; 紫杉醇; 10-去乙酰巴卡亭 III

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-2067-04

Effect of plant growth regulators on major secondary metabolite accumulation in callus of *Taxus cuspidata*LIU Tong-xiang¹, HE Dong-yun², ZHANG Zong-shen²

(1. China Minority Traditional Medical Center, Minzu University of China, Beijing 100081, China; 2. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Objective To increase the contents of Taxol and 10-deacetylbaccatin III in the callus of *Taxus cuspidata* through the application and combination of various plant growth regulators. **Methods** Young stems of *T. cuspidata* were taken as explants and then their effects of NAA, 2,4-D, and 6-BA on the accumulation of Taxol and 10-deacetylbaccatin III were examined with the method of orthogonal design. **Results** NAA exhibited the largest effect on the yields of both total Taxol and 10-deacetylbaccatin III, and followed by 6-BA, 2,4-D. **Conclusion** The optimal medium for production of total Taxol and total 10-deacetylbaccatin III is: B₅ + NAA 2.0 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L.

Key words: *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.; plant growth regulators; Taxol; 10-deacetylbaccatin III

东北矮紫杉 *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. 属红豆杉科 (Taxaceae) 红豆杉属 *Taxus* L. 植物, 为东北红豆杉 *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. 的变种^[1,2], 含有紫杉醇 (Taxol) 及其他紫杉烷类化合物, 这些成分都是具有独特抗肿瘤活性的二萜类化合物^[3]; 其前体化合物 10-脱乙酰巴卡亭 III (又称 10-脱乙酰基浆果紫杉素 III, 10-deacetylbaccatin III, 10-DAB III) 不仅自身具有抗癌活性, 还可将其通过化学半合成的方法得到紫杉醇和比紫杉醇有更高抗癌活性的多烯紫杉醇 (Taxotere)^[4]。但是, 由于紫杉醇及 10-脱乙酰巴卡亭 III 在植物体内量甚微, 并且由于对红豆杉过度砍伐、开采, 致使资源日益匮乏, 多年来人们试图通过其他方法获得原材料, 以解决其供应不足的问题^[5,8]。利用植物细胞培养技术获得紫杉醇及 10-脱乙酰巴卡亭 III, 具有保护

种质资源、品质易控及不受季节、病虫害等因素限制的优点, 是未来获得天然化合物的重要手段。本研究研究了不同植物生长调节剂组合对愈伤组织产生次生代谢产物紫杉醇和 10-去乙酰巴卡亭 III 产量的影响, 以期对东北矮紫杉组织细胞培养生产紫杉醇及 10-脱乙酰巴卡亭 III 提供理论与技术依据。

1 仪器、试剂和材料

1.1 仪器: Waters 600—2996 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), Waters 2996 检测器, Empower 色谱工作站; Milli-Q 超纯水纯化系统 (美国 Millipore 公司); Mettler Toledo AL104 电子天平 (瑞士 Mettler 公司); KQ—500 E 型超声波清洗器 (功率 500 W, 频率 40 kHz, 昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试剂: 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)、6-苄基氨基嘌呤 (6-BA)、 α -萘乙酸 (NAA) 为天津光复精细化

收稿日期: 2010-04-26

基金项目: 教育部创新团队资助项目 (IRT0871); 辽宁省科技厅重点实验室资助项目 (2008s018)

作者简介: 刘同祥 (1968—), 男, 副教授, 河南省郸城人, 中央民族大学民族医药应用研究所所长, 硕士研究生导师, 从事民族医药的教学、科研工作。Tel: (010) 68933254-801 Fax: (010) 68939905 E-mail: liutongxiangbj@126.com

* 通讯作者 张宗申 Tel: (0411) 86323646 E-mail: zhangzs@dlpu.edu.cn

工研究所产品;紫杉醇(批号 100382-200301)由中国药品生物制品检定所提供;10-去乙酰巴卡亭 III(批号 09021823)由上海同田生物技术有限公司提供;甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Fisher Chemical),水为超纯水,氯仿等其他试剂为分析纯。

1.3 材料:东北矮紫杉取自大连工业大学校园内,经张宗申教授鉴定为红豆杉科植物东北矮紫杉 *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.。

2 方法与结果

2.1 正交试验优选植物生长调节剂:采用 $L_9(3^4)$ 正交设计,采用 B_5 基本培养基,其中含 30 g/L 的蔗糖和 7 g/L 的琼脂, pH 5.5。以 NAA (A)、2,4-D (B) 和 6-BA (C) 等 3 种植物生长调节剂为因素,研究对东北矮紫杉愈伤组织产生紫杉醇和 10-去乙酰巴卡亭 II 的影响。因素水平见表 1。

表 1 生长调节剂因素与水平

Table 1 Factors and levels of plant growth regulators

水平	因 素		
	A (NAA)/(mg · L ⁻¹)	B (2,4-D)/(mg · L ⁻¹)	C (6-BA)/(mg · L ⁻¹)
1	0.5	0.5	0.05
2	1.0	1.0	0.1
3	2.0	1.5	0.2

2.2 愈伤组织诱导与增殖培养:取东北矮紫杉幼茎,除去叶片,用自来水冲洗,进行 75% 酒精消毒 30 s, 0.1% HgCl₂ 消毒 7~8 min,再用无菌水冲洗 3~4 次,无菌滤纸吸干水分,切成 1~1.5 cm 的茎段,接种在愈伤组织诱导培养基 (B_5 +NAA 1.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+3% 蔗糖+0.7% 琼脂+0.05 g/L 抗坏血酸, pH 5.5) 上,在 (24±1) °C 下暗培养。

取培养 25 d 后质地松散、生长良好和无褐变的愈伤组织,称质量后接种在正交设计的 9 种培养基上,在 (24±1) °C 下暗培养,培养 24 d 后收获,冷冻干燥,称质量。

2.3 HPLC 法测定紫杉醇和 10-去乙酰巴卡亭 II^[9]。

2.3.1 色谱条件: C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL; 测定紫杉醇的流动相为: 乙腈-水 (55:45), 检测波长 227 nm; 测定 10-去乙酰巴卡亭 II 的流动相为: 乙腈-水 (30:70), 检测波长 230 nm。色谱图见图 1 和 2。

2.3.2 对照品溶液制备:精密称取紫杉醇对照品 1.7 mg, 置 25 mL 量瓶中,用色谱甲醇定容,配制成 68 μg/mL 紫杉醇标准溶液。10-去乙酰巴卡亭 II 对

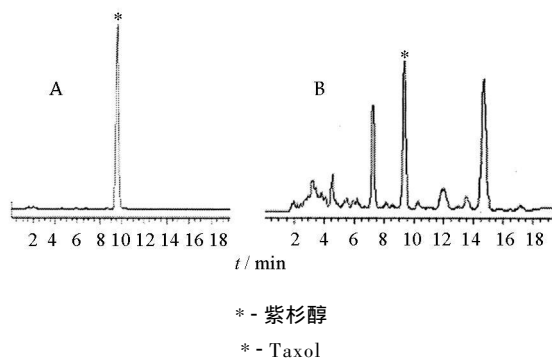


图 1 紫杉醇对照品 (A) 和东北矮紫杉愈伤组织 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of Taxol reference substance (A) and *T. cuspidata* callus (B)

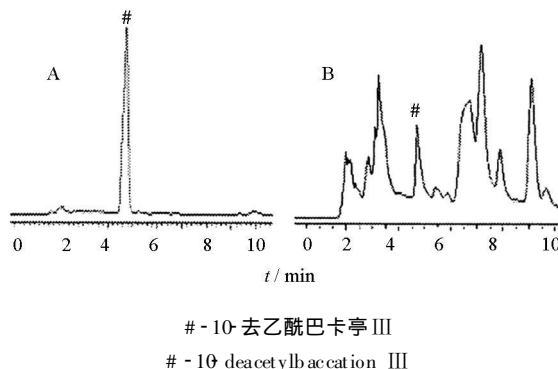


图 2 10-去乙酰巴卡亭 III 对照品 (A) 和东北矮紫杉愈伤组织 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of 10-deacetylbaicalin III reference substance (A) and *T. cuspidata* callus (B)

照品 1.0 mg, 置 25 mL 量瓶中,用色谱甲醇溶解并定容,制成 40 μg/mL 的 10-去乙酰巴卡亭 II 对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液制备:参照文献方法^[10],准确称取经冷冻干燥的愈伤组织培养物 10 g,加入 30 mL 甲醇-氯仿 (1:1) 混合溶液,超声波处理 30 min 后,于 40 °C 水浴中浸提 6 h,收集滤液;滤渣用 20 mL 甲醇-氯仿 (1:1) 混合溶液,按相同方法再提取 1 次,合并两次的滤液。滤液经减压蒸干,用甲醇定容至 25 mL,0.45 μm 滤膜过滤,作为供试品溶液。

2.3.4 样品测定:精密称取 9 份正交试验样品,制备成供试样品溶液,进行测定。在相同条件下每个样品重复测定 3 次,取平均值。通过外标法计算样品中紫杉醇和 10-去乙酰巴卡亭 II 的量,折算成愈伤组织中的量和每升培养基的产量。

2.4 正交试验设计与结果分析

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,以愈伤组织中的紫杉醇、10-去乙酰巴卡亭 II 的量和每升培养基的产量为检测指标,结果见表 2。

表 2 正交试验设计表及结果

Table 2 Design and result of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	干质量增量/ (g·L ⁻¹)	紫杉醇/ (mg·g ⁻¹)	紫杉醇产量/ (mg·L ⁻¹)	10DAB/ (mg·g ⁻¹)	10DAB 产量/ (mg·L ⁻¹)
1	1	1	1	1	6 562 6	0 033 1	0 217 2	0 068 5	0 449 7
2	1	2	2	2	8 501 4	0 027 4	0 232 9	0 100 0	0 850 1
3	1	3	3	3	11 186 4	0 044 7	0 500 1	0 137 0	1 532 5
4	2	1	2	3	12 143 7	0 060 0	0 728 6	0 134 0	1 627 3
5	2	2	3	1	6 692 4	0 070 0	0 468 5	0 174 0	1 164 5
6	2	3	1	2	9 134 1	0 053 4	0 487 8	0 181 0	1 653 3
7	3	1	3	2	14 333 9	0 066 4	0 951 8	0 170 0	2 436 8
8	3	2	1	3	13 044 1	0 034 1	0 444 8	0 106 0	1 382 7
9	3	3	2	1	14 488 0	0 048 0	0 695 4	0 128 0	1 854 5
紫杉醇产量	K1	0 951	1 899	1 149	0 460				
	K2	1 686	1 146	1 656	0 556				
	K3	2 091	1 683	1 920	0 558				
	R	1 140	0 753	0 771	0 153				
10DAB 产量	K1	2 832	4 515	3 486	1 156				
	K2	4 446	3 396	4 332	1 647				
	K3	5 673	5 040	5 133	1 514				
	R	2 841	1 644	1 647	0 491				

结果显示,东北矮紫杉愈伤组织在不同培养基中的生长状态不同,生物产量有较大差异,其中组合 9 (A₃B₃C₂) 最有利于愈伤组织的生长,干质量增量为 14.48 g/L。不同培养基中培养的愈伤组织紫杉醇和 10-去乙酰巴卡亭 III 的量及产量亦不相同,其中紫杉醇量和紫杉醇产量最高的组合分别是组合 5 (A₂B₂C₃) 与组合 7 (A₃B₁C₃),其量和产量分别为 0.07 mg/g 和 0.95 mg/L; 10-去乙酰巴卡亭 III 量和产量最高的水平组合分别是组合 6 (A₂B₃C₁) 与组合 7 (A₃B₁C₃),其量为 0.181 mg/g,产量为 2.44 mg/L。

2.5 有利于紫杉醇积累的最佳植物生长调节剂组合:选择 B₅ 为基本培养基,按照表 1 设计试验 2、4-D、6-BA 和 NAA 不同质量浓度和组合对愈伤组织产生紫杉醇的影响,然后进行极差分析和方差分析,结果见表 2、表 3。

极差分析表明,3 种植物生长调节剂对愈伤组织生产紫杉醇影响的顺序为: A > C > B; 即植物生

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

	误差	SS	V	MS	F 值	P 值
紫杉醇产量	A	0.223	2	0.111 5	11.737	< 0.05
	B	0.100	2	0.05	5.263	< 0.05
	C	0.102	2	0.051	5.368	< 0.05
	D	0.020	2	0.01		
10-DAB III 产量	A	1.354	2	0.677	3.508	< 0.05
	B	0.469	2	0.234 5	1.215	< 0.05
	C	0.453	2	0.226 5	1.174	< 0.05
	D	0.390	2	0.195		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

长调节剂 NAA 对紫杉醇产量影响较大,影响最小的是 2、4-D。

对上述指标进行方差分析表明,3 种植物生长调节剂对愈伤组织中紫杉醇产量的差异均无显著性。生产紫杉醇的最佳植物生长调节剂组合为 A₃B₁C₃,即 NAA、2、4-D、6-BA 的量分别为 2.0、0.5、0.2 mg/L 时,其紫杉醇产量最高。

2.6 生产 10-去乙酰巴卡亭 III 的最佳植物生长调节剂组合的选择:从极差 R 值可看出,以 B₅ 为基本培养基,NAA 对生产 10-去乙酰巴卡亭 III 的影响最大,而 6-BA、2、4-D 对生产 10-去乙酰巴卡亭 III 的影响较小。由表 3 方差分析结果可知,3 种植物生长调节剂对生产 10-去乙酰巴卡亭 III 均无显著性。植物生长调节剂最佳组合为 A₃B₃C₃,即最佳植物生长调节剂组合为 NAA 2.0 mg/L+ 2、4-D 1.5 mg/L+ 6-BA 0.2 mg/L,生产 10-去乙酰巴卡亭 III 的产量最高。

3 讨论

红豆杉为红豆杉科红豆杉属植物,是世界公认的濒临灭绝的天然珍稀植物,已列为国家一级重点保护野生植物。因其中含独特抗肿瘤成分“紫杉醇”而被国际上认为是目前最有效的抗癌药物之一,紫杉醇全世界年需量 4 800 kg 以上,而实际年生产量只有 250 kg 左右,中国国内的紫杉醇需求量每年在 1 000 kg 以上,而中国的紫杉醇原液产量只有 50 kg 左右,还主要出口欧洲、美国和日本。紫杉醇原料药之所以无法进一步扩大产量,这与紫杉醇在红豆杉树皮中的量太低有关,一般仅为干质量的

0.005%~0.07%,基本上每 10 000 kg 红豆杉树皮才能提取 1 kg 紫杉醇原料药,按现在的提取纯化技术,全世界每年需要 25 000 t 树皮,相当于 75 万株树龄 60 年以上的红豆杉的树皮;从树皮中获得紫杉醇必然会对红豆杉这一濒危资源造成毁灭性破坏。因此利用植物细胞培养法生产紫杉醇已成为一个有效可取的途径。

从实验结果看,东北矮紫杉愈伤组织的形成较容易,特别是根与茎在含 2,4-D 的培养基上基本都能形成,生长速度也较快,继代培养后速度更快。NAA 对东北矮紫杉愈伤组织中紫杉醇和 10-乙酰巴卡亭 II 的合成均有促进作用,且 10-乙酰巴卡亭 II 的量均比紫杉醇高。本研究运用正交试验得到了生产紫杉醇和 10-去乙酰巴卡亭 II 的最佳植物生长调节剂组合,此研究为解决药用植物东北矮紫杉资源短缺及实验室生产紫杉醇和 10-乙酰巴卡亭 II 提供了实验依据,对今后以组培细胞技术生产东北矮紫杉原材料具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 王关林,方宏筠,胡风庆,等.东北矮紫杉组织、细胞培养及其紫杉醇生成的研究[J].中国农业科学,2001,4(4):373-378
- [2] Vidensek N, Lith P, Cathpbell A, et al. Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several taxus species[J]. J Nat Prod, 1990, 53(6): 1609-1610
- [3] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxol brevifolia* [J]. Am Chem Soc, 1971, 93: 2325
- [4] Chattopadhyay S K, Sharma R P, Kumar S. Process for the production of important taxol analogues 10-deacetyl taxol A, B, and C [P]. US 6028206, 2000-02-22
- [5] 刘万宏,姚波,祝顺琴,等.紫杉醇前体生物合成途径及生物技术研究进展[J].中草药,2009,40(8):1327-1331
- [6] 赵锐,赵玮玮.抗癌植物药紫杉醇研究进展与动态[J].中草药,2009,40(7):1172-附2
- [7] 韩金玉,肖剑,王华,等.紫杉醇的提取与纯化技术[J].中草药,2000,31(10):789-792
- [8] 李干雄,张京维,骆雪兰,等.促进剂组合对中国红豆杉细胞悬浮培养紫杉醇合成的影响[J].中草药,2010,41(9):1552-1555
- [9] 张艳平,刘同祥.高效液相色谱法测定东北红豆杉愈伤组织中紫杉醇的含量[J].贵阳中医学院学报,2009,31(6):81-82
- [10] 何法霖,卢建伟,赵锐,等.HPLC 测定加拿大红豆杉浸膏中紫杉醇的含量[J].中国中药杂志,2007,32(8):753-754

手性流动相添加剂法测定积雪草中积雪草总苷的量及其总苷特征图谱

郑征伟,毛秀红,陈 钊,王 柯,季 申*

(上海市食品药品检验所,上海 201203)

摘要:目的 以 β -环糊精为流动相添加剂,拆分积雪草药材及其总苷中羟基积雪草苷和积雪草苷,建立羟基积雪草苷和积雪草苷的定量测定方法,同时建立积雪草总苷的高效液相色谱特征图谱。方法 采用 Dikma Diamonsil™ C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱;流动相为乙腈 2 mmol/L β -环糊精溶液(24:76);柱温 30℃;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 205 nm;理论塔板数按积雪草苷峰计算应不低于 4 000。结果 β -环糊精的加入很好地分离积雪草药材及其总苷中的羟基积雪草苷和积雪草苷,满足了定量分析的要求,其中有效成分羟基积雪草苷和积雪草苷的线性范围分别为 0.181~18.1 μ g ($r=0.999\ 98$) 和 0.195~19.5 μ g ($r=0.999\ 98$),积雪草药材的平均加样回收率($n=9$) 分别为 101.2% 和 101.6%,积雪草总苷的平均加样回收率($n=9$) 分别为 100.3% 和 99.3%,11 批次的积雪草总苷样品的高效液相色谱特征图谱中确定 6 个共有峰作为定性的指标峰。结论 本法简便快速、结果准确、重现性好,可用于积雪草药材及其总苷的质量控制。

关键词:积雪草药材;积雪草总苷;羟基积雪草苷;积雪草苷

中图分类号:R286.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)12-2070-05

Quantitative analysis and HPLC specific chromatogram of *Centellae Herba* and its total glucosides by chiral mobile phase additives

JIA Zheng-wei, MAO Xiuhong, CHEN Ke, WANG Ke, JI Shen

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To separate the isomers of madecassoside in *Centellae Herba* and its total glucosides, determine madecassoside and asiaticoside in them, and establish an HPLC specific chromatogram for

收稿日期:2010-02-16

作者简介:郑征伟(1979—),男,上海市人,药师,硕士,主要从事中药质量控制研究。

Tel: (021) 38839906 26126 E-mail: jiazhengwei1979@gmail.com

* 通讯作者 季 申 Tel: (021) 50798195 E-mail: jishen2008@gmail.com