

南方红豆杉愈伤组织生长动力学及紫杉醇代谢动力学研究

张翔宇, 杜亚填*, 龚雪元

吉首大学 林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南 张家界 427000

摘要: **目的** 通过愈伤组织细胞生长及其紫杉醇代谢动力学的研究, 筛选确定南方红豆杉愈伤组织培养生产紫杉醇的最佳培养基配方与最佳收获期。 **方法** 以改良 MS 为基本培养基添加不同质量浓度的 IBA、6-BA、GA₃ 组合诱导培养南方红豆杉愈伤组织, 通过测定愈伤组织鲜质量进行生长动力学研究, 采用 HPLC 法检测不同生长阶段愈伤组织中紫杉醇的积累量, 进行紫杉醇代谢动力学研究。 **结果** 改良 MS+0.2 mg/L IBA+0.05 mg/L 6-BA+0.3 mg/L GA₃、MS+0.2 mg/L IBA+0.01 mg/L 6-BA+0.7 mg/L GA₃ 及 MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L GA₃ 培养条件均较有利于南方红豆杉愈伤组织的诱导培养, 且紫杉醇的积累量也较高, 最高可达 0.037 76%。 **结论** 在添加 IBA 及 6-BA 的基础上适当增补 GA₃ 可使南方红豆杉愈伤组织诱导提前启动, 缩短出愈时间, 促进生长, 降低褐变程度, 增加愈伤组织中紫杉醇的积累量。愈伤组织的生长曲线呈 S 型, 紫杉醇的积累呈线型增加, 是一个逐渐积累的过程, 但积累到一定程度就不再增加, 且伴随着愈伤组织不断褐变。

关键词: 南方红豆杉; 愈伤组织; 生长动力学; 紫杉醇; 代谢动力学

中图分类号: R282.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)05-0990-05

Dynamic research on growth and paclitaxel metabolic dynamics of *Taxus chinensis* var. *mairei* callus

ZHANG Xiang-yu, DU Ya-tian, GONG Xue-yuan

Key Laboratory of Hunan Province Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China

Abstract: Objective Through study on the growth of *Taxus chinensis* var. *mairei* callus culture and its metabolic dynamic research on the paclitaxel, the optimum media and the best harvest time for the callus of *T. chinensis* var. *mairei* to produce paclitaxel were screened and determined. **Methods** *T. chinensis* var. *mairei* callus were induced and cultured by taking the improved MS as basic medium supplemented with IBA, 6-BA, and GA₃, the growth kinetic research of the callus was carried out by measuring fresh weight of the callus, and the paclitaxel accumulation in the callus at different growth stages was detected by HPLC analysis to study the paclitaxel metabolic dynamics. **Results** The three kinds of media, the improved MS + 0.2 mg/L IBA + 0.05 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L GA₃, the modified MS + 0.2 mg/L IBA + 0.01 mg/L 6-BA + 0.7 mg/L GA₃, and the improved MS + 0.2 mg/L IBA + 0.1 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L of GA₃ were more favorable to *T. chinensis* var. *mairei* callus culture and made the paclitaxel accumulation up to 0.037 76%. **Conclusion** On the basis of IBA and 6-BA appropriately added to the GA₃ in the improved MS medium, the bourgeon of *T. chinensis* var. *mairei* explant callus is enabled early to start, the time of culturing callus shorten, the growth and the browning degree promoted, and the amount of the accumulation of paclitaxel in the callus increased. Callus growth curve is S-shaped and the accumulation of paclitaxel showed a linear increase which is a gradual process of accumulation, but no further increase when accumulated to a certain extent, while along with constantly browning of callus.

Key words: *Taxus chinensis* (pilger) Rehd. var. *mairei* Cheng et L. K. Fu; callus; growth dynamics; paclitaxel; metabolic dynamics

南方红豆杉 *Taxus chinensis* (pilger) Rehd. var. *mairei* Cheng et L. K. Fu 是红豆杉在中国的一个变种^[1], 为国家一级保护树种。从红豆杉植物中提取的紫杉醇 (paclitaxel) 制备的抗癌药物 Taxol, 是治

疗肺癌、卵巢癌、乳腺癌的一线临床用药, 且对恶性黑色素瘤、头颈部肿瘤、白血病、结肠癌等也有明显疗效^[2-3], 是当前最热门的抗癌药物之一。采用红豆杉植物外植体诱导愈伤组织的研究报道较多,

收稿日期: 2011-10-16

基金项目: 湖南省科学技术厅科技计划项目 (2010TP4007-2); 湖南省科学技术厅科研条件创新专项 (2010TC2002); 湖南省高校“林产资源化学与林化产品开发”科技创新团队支持计划资助 (湘教通 (2010) 212 号)

作者简介: 张翔宇 (1986—), 男, 贵州遵义人, 硕士研究生, 主要研究方向为林产资源工程。Tel: 15174490494 E-mail: 304626335@qq.com

*通讯作者 杜亚填 Tel: 13974468866 E-mail: duyatian6688@163.com

如不同树种^[4-5]、不同部位^[4-6]外植体愈伤组织的诱导,诱导培养基^[5,7-11]的筛选等均已取得一定进展,且诱导与生产培养基本分步进行,均需转换培养基。有关红豆杉愈伤组织诱导与培养一步化培养基的优化、愈伤组织生长及其紫杉醇的积累代谢规律,如何根据愈伤组织生长和紫杉醇代谢的动力学规律来确定愈伤组织的最佳收获时间等方面的研究报道则极少。本实验以南方红豆杉一年生茎尖及茎段为外植体,对愈伤组织诱导与培养的一步化培养基进行优化,并对愈伤组织生长及其紫杉醇代谢的动力学进行研究,为南方红豆杉愈伤组织的大量诱导培养产生紫杉醇的工业化生产提供一定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

南方红豆杉一年生茎尖及茎段^[6,12],于2011年4月采于吉首大学张家界校区后山林产化工工程湖南省重点实验室红豆杉课题组红豆杉种苗基地,约20年生红豆杉树当年新梢,由中南林业科技大学祁承经教授鉴定为红豆杉科植物南方红豆杉 *Taxus chinensis* (pilger) Rehd. var. *mairei* Cheng et L. K. Fu。

紫杉醇对照品(美国 Sigma 公司),醋酸乙酯、丙酮(天津市富宇精细化工有限公司)分析纯,甲醇、乙腈(天津市科密欧化学试剂有限公司)色谱纯,自制重蒸水。

1.2 仪器

高效液相色谱仪(LC-20AT,日本岛津),紫外检测器(SPD-20A,日本岛津),LCsolution 色谱数据工作站(日本岛津公司),MetaChem Taxsil 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)美国迪马公司生产,AEL-40SM 十万分之一天平(日本岛津),AEG-220 万分之一天平(日本岛津)。

2 方法与结果

2.1 外植体灭菌

将南方红豆杉茎尖及茎段用水洗 1~2 min 后用水冲洗 3~4 h,然后于超净工作台中将其放入灭菌的三角瓶中,用无菌水冲洗 2 次后,用 75%乙醇浸洗 30 s,再用无菌水冲洗 3~4 次后用 0.2%升汞溶液灭菌 8~10 min,用无菌水冲洗 5~6 次,最后将灭完菌的外植体剪成 2 cm 左右的小段,接种到培养基中。

2.2 培养基

改良的 MS 为基本培养基,添加不同浓度的外源植物生长调节剂(IBA、6-BA、GA₃),通过不同

组合配方后作为培养基配方。

2.3 培养条件

将接种后的培养瓶放入人工气候箱中,于(25±2)℃,相对湿度(85±5)%下培养,光培养和暗培养以 12 h 交替进行。

2.4 愈伤组织生长动力学指标测定

以愈伤组织鲜质量为指标。采用称量法,每 5 d 在超净工作台中将各组配方诱导的愈伤组织无菌取出,称鲜质量,称量完成后再将其放回原培养瓶中继续培养。

2.5 愈伤组织中紫杉醇代谢动力学指标测定

愈伤组织中紫杉醇代谢动力学以愈伤组织中紫杉醇量为指标,通过从原愈伤组织上切取少量的愈伤组织并采用 HPLC 法检测紫杉醇量,由于愈伤组织中紫杉醇的生物合成需要的时间较长,故紫杉醇量检测从愈伤组织形成后 15 d 开始,每 15 d 检测 1 次。

2.5.1 色谱条件 色谱柱 MetaChem Taxsil (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(1:1); 进样量 20 μL; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30℃; 检测波长 227 nm。采用外标法计算出各组愈伤组织中紫杉醇的量,色谱图见图 1。

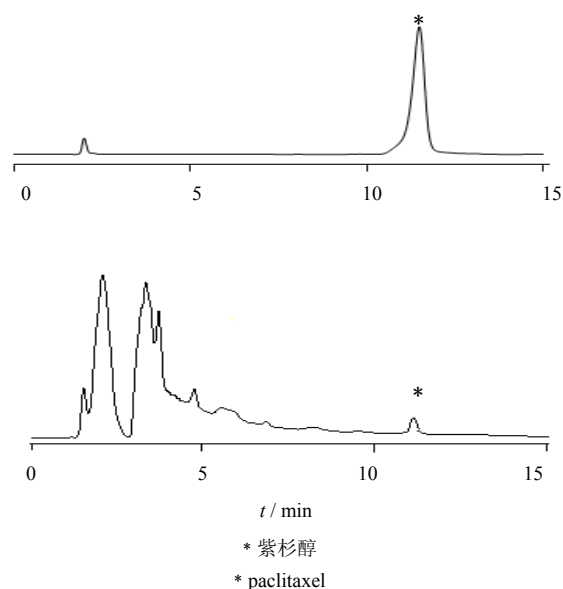


图1 紫杉醇对照品(A)和愈伤组织样品(B)的HPLC色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of paclitaxel reference substance (A) and callus sample (B)

2.5.2 愈伤组织检测溶液的制备 将切下的愈伤组织准确称取后置于三角瓶中,加入 10 倍量醋酸乙酯-丙酮(1:1),48 h 后于 25℃超声 30 min,滤过,残渣再加入 5 倍量醋酸乙酯-丙酮(1:1)

浸提 12 h 后 25 ℃ 超声 30 min 滤过, 残渣再次重复以上过程, 收集合并 3 次滤液加入 2 倍体积的石油醚, 置于分液漏斗中充分摇匀后于铁架台上静置自然分层, 收集下层液, 重复萃取 2 次, 将所收集下层萃取液置于旋转蒸发仪中浓缩至干, 后用少量甲醇充分洗出浓缩瓶中固形物于 10 mL 量瓶中, 并用甲醇定容至 10 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 滤过至 Tube 管中, 备用。

2.5.3 对照品溶液的制备 精确称取 6.31 mg 紫杉醇对照品于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容后得对照品储备液, 置于冰箱中冷藏备用。

2.5.4 线性关系考察 精确吸取对照品储备液 1、2、3、4、5 mL 分别于 10 mL 量瓶中, 用色谱级甲醇定容滤过, 按“2.5.1”项色谱条件测定。得到以紫杉醇量 (Y) 为纵坐标、以峰面积 (X) 为横坐标的回归方程 $Y=6 \times 10^{-6} X - 1.2463$, $r=0.9999$ 。

2.5.5 精密度试验 精确吸取 252.4 μg/mL 紫杉醇对照品储备液 20 μL, 重复进样 5 次, 测得紫杉醇峰面积的 RSD 为 0.61%。

2.5.6 稳定性试验 精确吸取 252.4 μg/mL 紫杉醇

对照品 20 μL, 每 2 h 进样 1 次, 连续进样 6 次, 通过峰面积计算 RSD 为 0.72%。

2.5.7 重复性试验 精确称取 B8 号愈伤组织 5 份各 0.1g, 按“2.5.2”项操作制备样品溶液, 进样测得紫杉醇质量分数的 RSD 为 0.57%。

2.5.8 加样回收率试验 精确称取已测定 B8 号样品 5 份, 分别置于 50 mL 锥形瓶中, 分别准确加入 0.21 mg 紫杉醇对照品, 按“2.5.2”项操作处理进样, 计算得紫杉醇回收率为 95.06%, RSD 为 0.93%。

2.6 愈伤组织的诱导

2.6.1 不同质量浓度的 IBA 和 6-BA 组合对南方红豆杉愈伤组织诱导的影响 将无菌茎尖及茎段插接种到表 1 的培养基中, 按“2.3”项条件进行培养。15 d 左右, 在茎段远离培养基一端产生白色疏松状的愈伤组织, 外植体未插入培养基部分膨胀, 第 25 天于膨胀处长出愈伤组织, 颜色呈浅绿色, 第 35 天统计愈伤组织诱导率 (表 1)。

从表 1 可以看出, 当 IBA 质量浓度一定时, 低质量浓度的 6-BA 对愈伤组织的诱导率比高浓度时要好, 但是效果不是很明显, 诱导率均不是很高, A7

表 1 IBA 与 6-BA 组合对南方红豆杉愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of IBA and 6-BA combinations on induction of *T. chinensis* var. *mairei* callus

培养基	IBA / (mg·L ⁻¹)	6-BA / (mg·L ⁻¹)	接种外植体数 / 个	出愈数 / 个	出愈时间 / d	愈伤组织			诱导率 / %
						15 d	25 d	35 d	
A1	0.10	0.10	24	12	13	浅白	黄绿	黄绿	50.0
A2	0.10	0.05	24	15	14	黄绿	黄绿	浅褐	62.5
A3	0.10	0.01	24	15	14	黄绿	黄绿	浅褐	62.5
A4	0.15	0.05	24	14	15	浅白	浅白	浅褐	41.6
A5	0.15	0.01	24	12	15	浅白	黄绿	浅褐	50.0
A6	0.15	0.10	24	14	14	黄绿	黄绿	黄绿	58.3
A7	0.20	0.05	24	17	14	黄绿	黄绿	黄绿	70.8
A8	0.20	0.01	24	15	14	黄绿	黄绿	浅褐	62.5
A9	0.20	0.10	24	14	16	黄绿	黄绿	浅褐	58.3

最佳组合。

2.6.2 不同质量浓度的 IBA、6-BA 及 GA₃ 组合对南方红豆杉愈伤组织诱导的影响 将无菌茎尖及茎段插接种到表 2 的培养基中, 按“2.3”项条件进行培养。12 天, 部分配方中的外植体开始在接近培养基的中部产生黄绿色愈伤组织, 随着培养时间的增加, 外植体中部开始膨胀, 第 30 天统计愈伤组织诱导率时, 其已全部长成愈伤组织 (表 2)。

从表 2 可以看出, 在表 1 配方的基础上添加 GA₃ 后, 南方红豆杉愈伤组织的诱导率明显提高。在第

35 天, 愈伤组织颜色变褐的程度比未加 GA₃ 的低, 最佳诱导培养基配方为 MS+0.2 mg/L IBA+0.05 mg/L 6-BA+0.3 mg/L GA₃, 且 MS+0.2 mg/L IBA+0.01 mg/L 6-BA+0.7 mg/L GA₃ 及 MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L GA₃ 的诱导效果也比较好。这 3 个配方的出愈时间均较未加 GA₃ 配方的要早, 于第 10 天即开始萌动, 且所产愈伤组织为黄绿色, 利于继代培养, 结果见表 2。

2.7 愈伤组织生长动力学研究

2.7.1 添加不同质量浓度的 IBA 和 6-BA 各培养

基中的愈伤组织 根据图 2 可以看出, 虽然各配方都能诱导产生愈伤组织, 但出愈时间迟, 愈伤组织生长较缓慢。外植体在第 15 天才开始产生愈

伤组织, 约第 20 天进入快速生长期, 但期间愈伤组织生长量增幅并不大, 到第 35 天进入生长停止期, 部分愈伤组织开始出现褐变, 整体的生长曲

表 2 IBA、6-BA 及 GA₃ 组合对南方红豆杉愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of IBA, 6-BA, and GA₃ combinations on induction of *T. chinensis* var. *mairei* callus

培养基	IBA / (mg·L ⁻¹)	6-BA / (mg·L ⁻¹)	GA ₃ / (mg·L ⁻¹)	接种外植体 数 / 个	出愈数 / 个	出愈时 间 / d	愈伤组织			诱导率 / %
							15 d	25 d	35 d	
B1	0.10	0.01	0.3	24	15	12	浅白	黄绿	黄绿	62.5
B2	0.10	0.05	0.5	24	12	12	浅白	黄绿	黄绿	50.0
B3	0.1	0.01	0.7	24	15	12	黄绿	黄绿	黄绿	62.5
B4	0.15	0.01	0.5	24	13	15	浅白	黄绿	浅褐	54.1
B5	0.15	0.05	0.7	24	12	15	浅白	黄绿	浅褐	50.0
B6	0.15	0.10	0.3	24	15	15	浅白	黄绿	黄绿	62.5
B7	0.20	0.01	0.7	24	17	10	黄绿	黄绿	黄绿	70.8
B8	0.20	0.05	0.3	24	20	10	黄绿	黄绿	黄绿	83.3
B9	0.20	0.10	0.5	24	17	10	黄绿	黄绿	黄绿	70.8

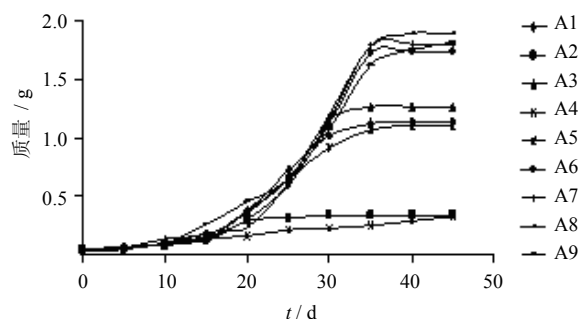


图 2 A1~A9 配方中愈伤组织的生长动力学曲线

Fig. 2 Growth dynamic curves of callus in A1—A9 media

线呈类似 S 型。

2.7.2 添加不同质量浓度的 IBA、6-BA 和 GA₃ 各培养基中的愈伤组织 据图 3 可以看出, 添加 GA₃ 后, 各愈伤组织的生长曲线均呈现出较为明显的 S 型, 启动快, 出愈早, 在第 10 天即进入快速生长期, 且期间生长量的增幅较表 1 配方中愈伤组织的要大, 说明 GA₃ 具有加速南方红豆杉愈伤组织诱导启动、促进南方红豆杉愈伤组织生长的作用。结合图 2 可以看出, 添加 GA₃ 后所诱导产生愈伤组织的质量比未添加的要高, 愈伤组织的褐变程度要轻, 说明 GA₃ 不仅能有效促进愈伤组织细胞的生长, 而且能降低南方红豆杉愈伤组织的褐变程度, 延长褐变的时间, 这对于采用大规模培养愈伤组织生产有用次生代谢产物、建立较稳定的愈伤组织细胞系都具有较重要的生物学意义。

2.8 愈伤组织中紫杉醇代谢动力学研究

以培养时间为横坐标, 以各培养时期愈伤组

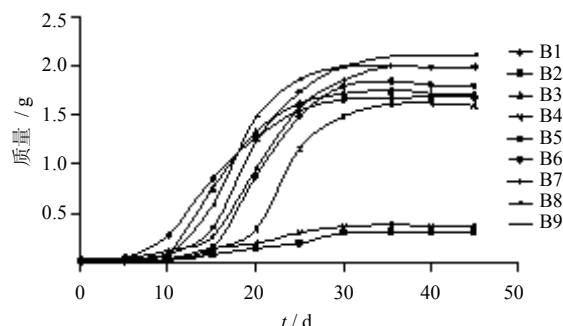


图 3 B1~B9 配方中各愈伤组织的生长动力学曲线

Fig. 3 Growth dynamic curves of callus in B1—B9 media

织中紫杉醇的量为纵坐标作图对各配方中愈伤组织紫杉醇的代谢动力学进行研究后发现, 各配方所诱导产生愈伤组织中紫杉醇的量随时间变化的积累情况呈现出如图 4 和 5 中所示的趋势, 说明愈伤组织中紫杉醇是一个逐渐积累的过程, 在培养第 20 天前紫杉醇的积累比较少, 虽然在第 10~15 天已有愈伤组织形成, 但却没有紫杉醇的积累, 随着培养时间及继代次数的增加, 约在第 40 天, 愈伤组织中开始有紫杉醇积累, 以后积累量呈线型增加。但是, 当继代培养到第 90 天后, 愈伤组织中紫杉醇的量变化开始趋于平稳, 紫杉醇积累量增加极显著降低。增补 GA₃ 各配方的愈伤组织中紫杉醇的积累量比不加 GA₃ 要略高 0.01%, 说明 GA₃ 还具有一定促进紫杉醇生物合成的作用。

3 讨论

本研究通过南方红豆杉愈伤组织诱导培养过程中生长动力学及紫杉醇代谢动力学规律的分析, 对

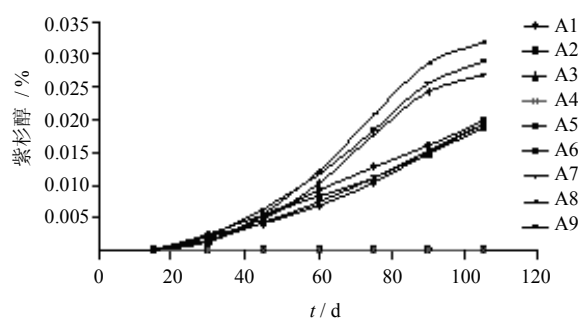


图 4 A1~A9 配方中愈伤组织紫杉醇的代谢动力学曲线

Fig. 4 Metabolic dynamic curves of paclitaxel of callus in A1—A9 media

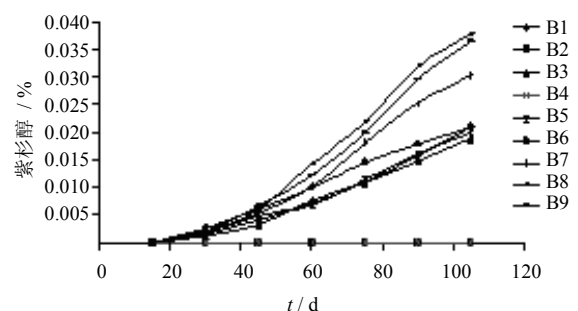


图 5 B1~B9 配方中愈伤组织紫杉醇的代谢动力学曲线

Fig. 5 Metabolic dynamic curves of paclitaxel of callus in B1—B9 media

所设计多个培养基配方中关键因素的生物学效应进行了考察,筛选获得了南方红豆杉愈伤组织诱导、培养较好的通用培养基配方 B7、B8、B9。同时发现南方红豆杉愈伤组织的生长曲线与细胞生长的 S 曲线基本一致,GA₃ 具有加速南方红豆杉愈伤组织诱导启动、加快愈伤组织生长、降低愈伤组织褐变程度、增加愈伤组织中紫杉醇的积累等生物学作用。未添加 GA₃ 的培养基中外植体启动基本在 15 d 后,添加 GA₃ 培养基中的外植体启动基本在 10 d 左右。陈惠等^[13]利用自制 B5 III 培养基进行南方红豆杉细胞悬浮培养研究,发现添加一定量的 GA₃ 对南方红豆杉悬浮细胞系的生长积累也较有利,这说明 GA₃ 对南方红豆杉离体培养物的生物学作用相对比较独立,与基本培养基无交互作用。这可能因为南方红豆杉是裸子植物,自身缺乏内源 GA₃,从而对外源 GA₃ 较为敏感。因此,为了增强南方红豆杉愈伤组织培养的稳定性和高效性,有必要对南方红豆杉内源激素进行进一步深入研究。

本研究还发现,随着紫杉醇积累量的增加,愈伤组织的继代时间亦需越来越短,因愈伤组织褐变的速度越来越快,极易由最初的黄绿色逐渐变为褐色,且到 100 d 之后,无论继代时间多么短,愈伤组织的颜色基本不能恢复到黄绿色,且一旦继代时间没把握好,愈伤组织会迅速褐变坏死。出现这一结果的原因,可能与愈伤组织中紫杉醇或其他次生代谢产物的积累有关。愈伤组织中紫杉醇的积累是一个逐渐增加的过程,但并不随着时间的增加而不断增加。这对工业化中如何获得稳定的愈伤组织细胞系、制定合理的愈伤组织收获时间等均具有重要意义。

参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所编辑委员会. 中国植物志 (第七卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] 夏洪平. 癌症的克星. 植物抗癌药紫杉醇 [J]. 食品与药品, 2005, 7(7A): 52-53.
- [3] 傅喆敏, 袁杰, 黄雄伟, 等. 植物抗癌药紫杉醇的研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(3): 58-61.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 李柏林, 赵群华, 卢山, 等. 红豆杉植物愈伤组织的培养及其紫杉醇形成的初探 [J]. 南京大学学报, 1995, 31(3): 424.
- [7] 孙崑, 胡正海. 红豆杉愈伤组织的诱导培养及紫杉醇的产生 [J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2000, 30(1): 55-59.
- [8] 苏应娟, 王艇, 杨礼香, 等. 南方红豆杉芽愈伤组织的诱导和培养 [J]. 中草药, 2001, 32(7): 637-639.
- [9] 浩仁拓本, 赵颖. 东北红豆杉的组织培养技术研究 [J]. 内蒙古林业科技, 2004, 11(3): 11-13.
- [10] 李志良, 李干雄, 饶秋容, 等. 红豆杉细胞培养中紫杉醇高产细胞株的筛选及稳定性研究 [J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(1): 62-65.
- [11] 杜亚填, 陈建华, 徐建宇, 等. 植物生长调节剂对南方红豆杉愈伤组织培养和紫杉醇合成的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 569-576.
- [12] 刘丽萍, 张立莹, 贾景明. 东北红豆杉组织培养的研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 1998, 29(4): 302.
- [13] 陈惠, 王文科, 赵杰宏. 根皮苷和 GA₃ 对南方红豆杉愈伤组织和细胞悬浮培养物生长的影响 [J]. 山西师范大学学报: 自然科学版, 2000, 14(4): 59-63.