

南方红豆杉愈伤组织培养及其紫杉烷二萜类成分的分析

姚 晓¹, 步 达¹, 陈建伟^{1,2*}, 李 祥^{1,3}, 汤 彬¹

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210023

3. 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210023

摘 要: **目的** 研究南方红豆杉愈伤组织的出愈时间、诱导率、生长率、生长状态、褐变程度, 比较愈伤组织中紫杉醇等 5 种紫杉烷二萜类成分的量。 **方法** 采用单因素比较、正交试验设计, 研究影响南方红豆杉愈伤组织诱导和生长的各种因素; 采用 HPLC 法测定不同来源愈伤组织中 10-脱乙酰基巴卡丁 III (10-DAB)、巴卡亭 III、三尖杉宁碱、紫杉醇和东北红豆杉素 5 种紫杉烷二萜类成分的量; 采用加权评分综合考虑以上各因素优选组织培养条件。 **结果** 外植体脱分化形成愈伤组织的能力, 以完整叶片及茎段最好; 暗培养有利于紫杉醇等 5 种萜类成分的富集; 愈伤组织诱导的最适培养基为 B5+2, 4-D 3.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L。 **结论** 南方红豆杉愈伤组织诱导、培养与外植体种类、培养基种类、光照有较大关联, 紫杉醇等 5 种紫杉烷二萜类成分的富集受植物生长调节剂种类及浓度影响显著。

关键词: 南方红豆杉; 愈伤组织; 加权评分; 紫杉醇; 紫杉烷二萜类

中图分类号: R931.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)18-2696-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.023

Tissue culture and analysis on taxane diterpenoids in callus of *Taxus chinensis* var. *mairei*

YAO Xiao¹, BU Da¹, CHEN Jian-wei^{1,2}, LI Xiang^{1,3}, TANG Bin¹

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Key Laboratory for TCM Formulae Research, Nanjing 210023, China

3. Jiangsu Key Laboratory for Chinese Material Medica Processing, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate some factors which could influence the tissue culture of callus from *Taxus chinensis* var. *mairei* such as the culturing callus time, callus induction rate, callus development rate, growth rate, and browning degree. Then, the five taxane diterpenoids including paclitaxel in callus were studied and compared. **Methods** The factors which influence the *T. chinensis* var. *mairei* callus induction and growth rate were studied by single factor analysis and orthogonal test design. The five taxane diterpenoids including paclitaxel in callus from different sources were determined by HPLC analysis. The weighted score for each of the above factors mentioned would be taken account to optimise the tissue culture conditions. **Results** Among the explants, the stems intacted leaves would exhibit the best ability of dedifferentiation to form callus. The enrichment dark culture was conducive to paclitaxel and other five kinds of terpene constituents. The most optimum culture medium of the callus induction was B5 + 2, 4-D 3.0 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L + KT 0.5 mg/L. **Conclusion** The callus culture conditions for *T. chinensis* var. *mairei* have indicated greater association with different types of the explantation, nutrient medium, and light illumination. The five kinds of enrichment taxane paclitaxel diterpenoids would be significantly affected by the type and concentration of the plant growth regulators. This study has shown some references value for *T. chinensis* var. *mairei* tissue culture and for the screening of high-yielding cell lines.

Key words: *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Levl) Cheng et L. K. Fu; callus; synthetic weighted; paclitaxel; taxane diterpenoids

红豆杉科 (Taxaceae) 红豆杉属 *Taxus* L. 植物含 具有抗肿瘤活性, 尤其以紫杉醇 (Taxol) 活性最强^[1], 有多种紫杉烷类二萜化合物, 其中有 10 余个化合物 临床试验表明其对乳腺癌、卵巢癌有显著疗效, 此

收稿日期: 2014-03-19

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (YSXK2010); 中药学优势学科开放课题 (2011ZYX6-008)

作者简介: 姚 晓 (1988—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药品质评价及生物技术。Tel: (025)85811280 E-mail: 462956308@qq.com

*通信作者 陈建伟, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源化学及品质评价研究。Tel: (025)85811280 E-mail: chenjiw695@126.com

外,对肺癌、恶性黑色素瘤和肉瘤、转移性绒毛膜癌、神经胶质瘤、前列腺癌、食管癌、宫颈癌等10多种实体瘤^[2-4]也表现出一定的疗效,FDA于2007年批准紫杉醇可用于治疗类风湿性关节炎,并可作为心脏支架涂层^[5]。最新报道紫杉醇对胰腺囊肿有显著的治疗效果^[6]。因而紫杉醇是当前公认的广谱、活性强的一线抗肿瘤药物^[7]。然而,由于红豆杉生长较缓慢,资源贫乏,天然植物体内紫杉醇的量又非常低,要提供临床应用需要大量砍伐红豆杉植株,危及生态平衡,也会使红豆杉植物面临灭绝的危险。目前,一种有希望能提供抗肿瘤化合物的大量原料就是植物组织培养法,因而利用植物细胞大规模培养生产紫杉醇是一条可行途径。南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl) Cheng et L. K. Fu 是红豆杉的一个变种^[8]。分布于广西、广东北部至河南西北部、甘肃南部、四川盆地北缘至云南东北部,是红豆杉属中分布最广、生长最快的一群植物。红豆杉枝叶中除含有紫杉醇外,还含有10-乙酰巴卡亭 III (10-DAB)、巴卡亭 III 等^[9-10],其本身也具有抗癌活性,而且还可以合成紫杉醇及拥有更好疗效及治疗指数的多西紫杉醇 (docetaxel); 三尖杉宁碱和东北红豆杉素在枝叶中的量也较高,因此选择这类紫杉烷类二萜化合物评价其药用资源的利用价值具有重要意义。本实验对南方红豆杉愈伤组织的诱导生长进行了初步探讨,并采用多指标综合加权评分对南方红豆杉组培条件进行优选。可望为今后细胞大规模培养生产紫杉醇等多种紫杉烷类二萜化合物提供些实验依据。

1 材料与仪器

公示材料于2011年11月,由无锡红豆杉种植基地提供,栽种于南京中医药大学药苑,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为红豆杉属植物南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl) Cheng et L. K. Fu。10-DAB 对照品 (质量分数>98%,批号 12602/2011),巴卡亭 III 对照品 (质量分数>98%,批号 12199/2011) 购自上海同田生物对照品公司;紫杉醇对照品 (质量分数>99%,批号 100382-201102),三尖杉宁碱对照品 (质量分数>98%,批号 100926-201102) 购自中国食品药品检定研究院;东北红豆杉素为本实验室从南方红豆杉枝叶中分离所得,经 UV、IR、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 鉴定结构 (质量分数>98%)。乙醇、二氯甲烷 (分析纯,南京化学试剂有限公司);甲醇 (色谱纯,美国

天地公司);纯净水 (纯水仪,南京易普易达科技发展有限公司);其他试剂均为分析纯。

Agilent1100 液相色谱仪,自动进样器,HT—230A 柱温箱 (HENG AOT & D),Agilent-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm);HH—S 恒温水浴锅 (江苏国胜实验仪器厂),FA—1004 电子分析天平 (上海天平仪器厂),LIBRORAE—40SM 电子分析天平 (SHIMADZU),YXQ—SG41—280 型高压灭菌锅,SW—CJ—1B 型净化工作台,PHS—29A 数显 pH 计,GZP—300B 型智能全自动光照培养箱,WSB—E2 型温湿度表。

2 方法

2.1 样品处理

将南方红豆杉叶及茎段用漂白粉浸泡 5 min 用自来水冲洗 15~30 min,在超净工作台中,用 70% 乙醇消毒 30~60 s,放入质量分数为 0.1% HgCl₂ 溶液中灭菌 6~10 min,用无菌水冲洗 3~5 次,每次 1~2 min,放入内有无菌滤纸的无菌培养皿中,最后将灭菌的外植体剪成 1 cm 左右的小段,接种到培养基中。

2.2 组织培养生长的指标

计算组织生长率和诱导率,并进行综合评分,参照文献方法^[11-12]进行改良:综合评分=100×2/3 (0.5×诱导率/最高诱导率+0.4×生长率/最高生长率+0.3×生长状态/最佳生长状态-0.2×褐变程度/最大褐变程度-0.1×出愈时间/最长出愈时间)+100×1/3 (0.5×紫杉醇量/紫杉醇最高量+0.4×10-DAB 量/10-DAB 最高量+0.3×巴卡亭 III 量/巴卡亭 III 最高量+0.2×三尖杉宁碱量/三尖杉宁碱最高量+0.1×东北红豆杉素量/东北红豆杉素最高量)。

接种鲜质量=接种后瓶质量-接种前瓶质量

收获鲜质量=收获前瓶质量-收获后瓶质量

生长率=收获鲜质量 / 接种鲜质量

诱导率=产生愈伤组织的外植体数 / 接种外植体总数

2.3 培养基与培养条件

愈伤组织诱导培养基以 B5 (基本培养基试验除外) 为基本培养基,进行不同种类和水平植物生长物质及其配比对愈伤组织诱导影响实验,外植体为叶片上半部,选用 2, 4-D (A)、6-BA (B)、NAA (C)、KT (D) 4 因素 3 水平正交设计 L₉(3⁴),见表 1。比较实验均采用由正交试验所得 2, 4-D 3.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 激素条件,并添加 2% 蔗糖、0.8% 琼脂, pH 值均为 5.80~

表1 因素水平表

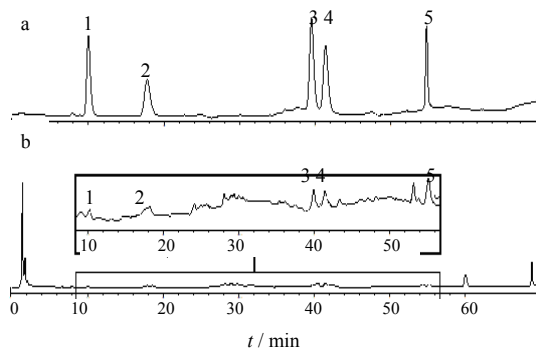
Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A/(mg·L ⁻¹)	B/(mg·L ⁻¹)	C/(mg·L ⁻¹)	D/(mg·L ⁻¹)
1	0.5	0	0	0
2	1.5	0.1	1.0	0.5
3	3.0	1.0	3.0	1.0

6.20, 温度均为(25±2)℃, 暗培养(光照试验除外), 外植体为叶片上半部(外植体试验除外), 接种量为(1.00±0.25)g。以上每个处理10瓶, 每瓶5~7个接种点, 30 d后分别观察记录愈伤组织诱导结果。单因素考察不同外植体(完整叶片、叶片上半部、叶片下半部、茎段), MS、B5 2种基本培养基, 光照(光培养以日光灯为光源, 每天连续光照12 h, 光强为1 000 lx)与暗培养对愈伤组织诱导的影响。

2.4 5种紫杉烷二萜类化合物的HPLC分析

2.4.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱: 0~22 min, 46% A; 22~26 min, 46%~64% A; 26~44 min, 64% A; 44~56 min, 64%~80% A; 56~62 min, 80% A; 62~70 min, 80%~100% A; 体积流量1.0 mL; 柱温30℃, 检测波长227 nm, 进样量10 μL。色谱图见图1。



1-10-DAB 2-巴卡亭 III 3-三尖杉宁碱 4-紫杉醇 5-东北红豆杉素
1-10-DAB 2-baccatin III 3-cephalomannine 4-paclitaxel 5-taxacin

图1 混合对照溶液(a)与南方红豆杉愈伤组织样品(b)的HPLC图

Fig. 1 HPLC of reference standard solution (a) and sample (b)

2.4.2 供试品溶液的制备 将南方红豆杉愈伤组织冷冻干燥至恒定质量研碎(过40目筛), 精密称取0.5 g, 加入85%乙醇30 mL, 50℃回流浸提1 h, 共3次。合并提取液, 50℃减压浓缩至无醇味, 用45 mL蒸馏水-二氯甲烷(1.25:1)萃取, 共萃取3次, 合并二氯甲烷层, 于40℃减压回收溶剂至干, 用1 mL甲醇定容, 0.45 μm滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.4.3 对照品和混合对照品溶液的制备 分别精密称取对照品10-DAB、巴卡亭 III、三尖杉宁碱、紫杉醇和东北红豆杉素适量, 分别加甲醇溶解并定容, 即得质量浓度分别为1.04、0.58、0.94、1.74、1.37 mg/mL的对照品溶液。取对照品10-DAB、巴卡亭 III、紫杉醇、三尖杉宁碱和东北红豆杉素适量, 精密称定, 置于同一5 mL量瓶中, 甲醇定容。制成10-DAB、巴卡亭 III、紫杉醇、三尖杉宁碱、东北红豆杉素浓度分别为0.522、0.464、0.490、0.510、0.262 mg/mL的混合对照品溶液。

2.4.4 标准曲线的绘制 分别精密移取“2.4.3”项下各对照品溶液适量(表2), 置于10 mL量瓶中, 用甲醇定容至刻度。按“2.4.1”项下的色谱条件, 分别进样10 μL, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X), 进行线性回归, 得到10-DAB、巴卡亭 III、紫杉醇、三尖杉宁碱及东北红豆杉素线性回归方程及线性关系(表3)。

2.4.5 精密度试验 取混合对照品溶液, 在“2.4.1”项色谱条件下连续进样6次, 10-DAB、巴卡亭 III、三尖杉宁碱、紫杉醇和东北红豆杉素色谱峰面积的RSD分别为0.46%、1.22%、1.23%、1.17%、0.79%表明仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 取同批供试品溶液, 室温下放置, 分别于0、2、4、6、8、10 h进样测定, 记录峰面积。10-DAB、巴卡亭 III、三尖杉宁碱、紫杉醇和东北红豆杉素色谱峰面积的RSD分别为1.75%、1.70%、1.30%、1.83%、1.05%。

表2 5种对照品溶液的用量

Table 2 Amount of five reference standard stock solutions

对照品	溶液用量 / mL						
10-DAB	0.15	0.50	1.50	3.00	4.50	6.00	7.50
巴卡亭 III	0.15	0.50	1.50	3.00	4.50	6.00	7.50
三尖杉宁碱	0.10	0.20	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
紫杉醇	0.15	0.50	1.50	3.00	4.50	6.00	7.50
东北红豆杉素	0.01	0.03	0.10	0.30	1.00	3.00	9.00

表 3 南方红豆杉中 5 种成分的回归方程和线性范围

Table 3 Regression equations and linear ranges of five components in *T. chinensis* var. *mairei*

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / (mg·mL ⁻¹)
10-DAB	$Y=3\ 068.8 X+5.58$	0.999 8	0.015 6~0.780
巴卡亭 III	$Y=6\ 297.0 X-12.48$	0.999 3	0.008 7~0.435
三尖杉宁碱	$Y=2\ 835.9 X+62.93$	0.999 7	0.017 4~1.392
紫杉醇	$Y=3\ 447.8 X-8.69$	0.999 3	0.014 1~0.705
东北红豆杉素	$Y=11\ 297.0 X+58.03$	0.999 2	0.001 4~1.233

2.4.7 重复性试验 取同批供试品溶液 6 份, 在“2.4.1”项色谱条件下连续进样测定 10-DAB、巴卡亭 III、三尖杉宁碱、紫杉醇和东北红豆杉素色谱峰面积的 RSD 分别为 2.17%、1.78%、2.23%、2.75%、1.54%, 表明方法重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 取同批供试品溶液 6 份 10-DAB、巴卡亭 III、三尖杉宁碱、紫杉醇和东北红豆杉素质量浓度分别为 0.133、0.138、0.576、0.260、0.219 mg/mL, 每份 5 mL, 分别加入 10-DAB、巴卡亭 III、三尖杉宁碱、紫杉醇和东北红豆杉素对照品 0.67、0.69、2.88、1.30、1.10 mg, 按“2.4.1”项色谱条件测定, 结果 10-DAB、巴卡亭 III、三尖杉宁碱、紫杉醇和东北红豆杉素平均回收率分别为 99.8%、99.7%、100.5%、100.3%、99.3%, RSD 分别为 2.34%、2.50%、2.85%、2.79%、1.62%。

2.4.9 样品测定 分别精密吸取供试品溶液 10 μL, 在上述色谱条件下进样, 记录峰面积, 并根据外标法中的标准曲线法计算质量分数。

3 结果与分析

3.1 植物生长调节剂对愈伤组织生长及紫杉醇等萜类化合物量的影响

采用正交试验法对愈伤组织诱导的条件进行优选。以不同种类的激素及配比作为考察因素, 将 30 d 内愈伤组织出愈时间、诱导率、生长率、生长状态、褐变程度及 5 种萜类成分量综合评分为评价指标, 选用 $L_9(3^4)$ 正交设计表安排试验。因素水平见表 1, 正交试验结果见表 4, 方差分析结果见表 5。对表 4 进行数据处理, 各因素的主次顺序为 $A>B>C$ 。其中, A、B、C 因素经方差分析表明对愈伤组织的诱导有显著性的影响。愈伤组织在不同生长调节剂配比的培养基中, 其出愈时间、诱导率、生长率、生长状态、褐变程度及 5 种萜类成分量均有差异 (图 2)。愈伤组织在含有 2, 4-D 3.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 的培养基上诱导率、生长

状态、褐变程度、紫杉醇量均达到最优值, 分别为 94.59%、3、0 和 0.537 3 mg/g, 并且呈现出黄绿色鲜亮、疏松颗粒状的愈伤组织, 但其 5 种萜类成分量不高; 愈伤组织虽然在含有 2, 4-D 1.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 的培养基上 3 种萜类成分量达到最大值或次最大值, 分别是 10-DAB 为 1.397 7 mg/g、三尖杉宁碱为 0.932 9 mg/g 和紫杉醇为 0.333 3 mg/g, 但其诱导率相对较低 (56.67%), 并且褐变程度严重, 愈伤组织为浅黄色兼有褐色大颗粒状, 有的呈块状。通过多重比较结合正交设计助手软件效应曲线图分析, 确定愈伤组织的最佳培养条件为 $A_3B_3C_2D_2$, 即 B5+2, 4-D 3.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L。

3.2 单因素考察对愈伤组织生长及紫杉醇等萜类成分量的影响

外植体来源不同, 愈伤组织的出愈时间也会不同: 茎段出愈时间最早 (13.00 d) 且诱导率较高 (96.77%); 外植体对诱导率有一定影响, 完整叶片、茎段诱导率较高分别为 100.00%和 96.77%; 外植体对生长率也有一定影响, 茎段最高 ($4.317 5 \pm 0.178 0$) %, 叶片上半部最低 ($2.467 5 \pm 0.504 0$) %; 外植体对生长状态、褐变程度影响不显著; 外植体对成分影响较为显著, 叶片上半部分除 10-DAB 为第 2 高外, 其余量均为最高。基本培养基不同, 影响出愈时间, MS 较 B5 早; 基本培养基的不同对诱导率影响较大, B5 为 88.89%, 而 MS 仅为 76.83%; 基本培养基对生长率、生长状态、褐变程度影响不明显; 萜类成分富集与基本培养基有较大关联, B5 各成分的量约为 MS 的 2 倍。研究发现, 光照对出愈时间基本无影响; 光照对诱导率、生长率影响较低; 虽然光照下基本无褐变, 但其生长状态最差, 有的成块状, 且愈伤组织较少; 暗培养有利于 5 种萜类成分的富集, 暗培养各成分是光照培养的 2 至 5 倍 (表 6 和图 2)。

表4 植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响 ($n=3$)Table 4 Effects of different plant growth regulators on callus induction ($n=3$)

编号	A	B	C	D	出愈时间 / d	诱导率 / %	生长率 / %	生长状态	褐变程度	10-DAB /
1	1	1	1	1	21.00	33.33	$3.442\ 5\pm0.105\ 2$	1	6	$1.330\ 2\pm0.092\ 8$
2	1	2	2	2	19.67	82.05	$2.260\ 9\pm0.345\ 9$	2	6	$0.147\ 3\pm0.020\ 1$
3	1	3	3	3	17.75	70.83	$5.461\ 3\pm0.373\ 1$	2	7	—
4	2	1	2	3	22.25	83.33	$3.422\ 3\pm0.203\ 7$	3	5	$0.278\ 8\pm0.059\ 0$
5	2	2	3	1	18.00	62.07	$2.637\ 7\pm0.336\ 9$	1	7	$0.109\ 5\pm0.060\ 6$
6	2	3	1	2	21.50	56.67	$5.281\ 9\pm0.654\ 0$	2	7	$1.397\ 7\pm0.093\ 2$
7	3	1	3	2	21.67	66.67	$4.992\ 5\pm0.894\ 0$	3	7	$0.527\ 3\pm0.083\ 9$
8	3	2	1	3	22.00	50.00	$5.488\ 7\pm0.133\ 3$	3	5	$0.362\ 3\pm0.059\ 2$
9	3	3	2	1	23.33	94.59	$4.093\ 9\pm0.610\ 8$	3	4	$0.374\ 6\pm0.083\ 1$

编号 A B C D 巴卡亭 III / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 三尖杉宁碱 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 紫杉醇 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 东北红豆杉素 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 综合评分

1	1	1	1	1	$0.023\ 7\pm0.009\ 8$	$0.286\ 6\pm0.088\ 3$	$0.189\ 2\pm0.060\ 5$	$0.681\ 4\pm0.069\ 8$	44.65
2	1	2	2	2	$0.047\ 1\pm0.015\ 9$	$0.089\ 0\pm0.059\ 9$	$0.303\ 1\pm0.087\ 9$	$1.786\ 8\pm0.370\ 1$	58.51
3	1	3	3	3	—	$0.771\ 0\pm0.028\ 9$	$0.184\ 0\pm0.078\ 6$	$0.513\ 4\pm0.035\ 5$	58.60
4	2	1	2	3	—	$0.122\ 5\pm0.091\ 9$	$0.004\ 8\pm0.004\ 8$	$0.323\ 2\pm0.004\ 8$	59.48
5	2	2	3	1	$0.057\ 5\pm0.045\ 8$	$0.471\ 9\pm0.018\ 0$	$0.226\ 7\pm0.022\ 5$	$0.441\ 0\pm0.040\ 1$	45.72
6	2	3	1	2	—	$0.932\ 9\pm0.077\ 4$	$0.333\ 3\pm0.060\ 9$	$0.157\ 7\pm0.041\ 3$	70.12
7	3	1	3	2	$0.060\ 4\pm0.026\ 6$	$0.135\ 9\pm0.046\ 4$	$0.203\ 5\pm0.097\ 0$	$0.689\ 7\pm0.061\ 7$	68.26
8	3	2	1	3	$0.046\ 4\pm0.035\ 7$	—	$0.207\ 9\pm0.022\ 6$	$0.352\ 9\pm0.060\ 5$	69.06
9	3	3	2	1	$0.093\ 9\pm0.031\ 4$	$0.136\ 3\pm0.066\ 7$	$0.537\ 3\pm0.178\ 9$	$1.750\ 0\pm0.352\ 5$	101.04

K_1 53.9257.4661.28 61.80

K_2 58.4457.7673.01 65.63

K_3 79.4576.5957.53 62.38

K 25.5319.1215.48 3.25

“—” 未检测到 1-黄白色, 长势弱, 少量, 质地致密 2-浅黄色, 长势较强, 中等量, 质地较疏松 3-黄绿色, 长势旺盛, 量多, 质地疏松
4-无褐变 5-部分褐变 6-轻度褐变 7-严重褐变

“—” not detected 1-yellow-whit, grew weak, yield was low, with dense callus 2-light yellow, growing strong, yield was medium, with more loose callus
3-yellow green, vigorous growth, yield was high, with loose callus 4-no browning 5-part of browning 6-mild browning 7-serious browning

表5 方差分析

Table 5 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	1 113.94	2	556.97	69.95	<0.05
B	720.11	2	360.06	45.22	<0.05
C	391.47	2	195.74	24.58	<0.05
误差	15.93	2	7.97		

$F_{0.1}(2, 2) = 9.00$, $F_{0.5}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

4 讨论

利用组织培养是解决中药资源短缺问题的重要途径之一, 很多植物愈伤组织都能产生植物本身的某些次生代谢产物, 如半夏、人参等, 而且

很多植物愈伤组织的次生代谢产物往往高于植物本身^[13-14]。本实验室对南方红豆杉枝叶紫杉烷二萜类成分的分析可知, 其 10-DAB、巴卡亭 III、三尖杉宁碱、紫杉醇、东北红豆杉素的量分别为 0.204 6、



A-完整叶片+B5+暗培养 B-叶片上半部+B5+暗培养 C-茎段+B5+暗培养 D-叶片下半部+B5+暗培养 E-叶片下半部+B5+光照培养 F-叶片下半部+MS+暗培养 1~9- $L_9(3^4)$ 正交试验 9 种不同激素条件下的组织
A-whole leaves + B5 + dark culture B-upper half leaves + B5 + dark culture C-stem fragments + B5 + dark culture D-lower half leaves + B5 + dark culture E-lower half leaves + B5 + light culture F-lower half leaves + MS + dark culture 1—9- $L_9(3^4)$ nine different hormone conditions

图 2 南方红豆杉的组织培养

Fig. 2 Callus induction of *T. chinensis* var. *mairei*

表 6 不同外植体和基本培养基及光照条件对愈伤组织诱导及萜类化合物量的影响 ($n = 3$)

Table 6 Effects of different explantation, nutrient media, and illumination on callus induction ($n = 3$)

外植体来源、培养基及 光照条件	出愈时 间 / d	诱导 率 / %	生长率 / %	生长 状态	褐变 程度	10-DAB 量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	巴卡亭量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	三尖杉宁碱 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	紫杉醇 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	东北红豆杉素 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	综合 评分
完整叶片+B5+暗培养	19.75	100.00	$3.199 0 \pm 0.161 3$	3	2	$0.041 8 \pm 0.012 8$	$0.029 4 \pm 0.009 0$	$0.052 0 \pm 0.015 9$	$0.038 6 \pm 0.011 9$	$0.086 7 \pm 0.026 6$	61.48
叶片上半部+B5+暗培养	22.00	87.50	$2.467 5 \pm 0.504 3$	3	1	$0.182 6 \pm 0.010 6$	$0.210 6 \pm 0.071 4$	$0.391 8 \pm 0.139 7$	$0.299 0 \pm 0.109 6$	$0.771 7 \pm 0.316 4$	100.18
茎段+B5+暗培养	13.00	96.77	$4.317 5 \pm 0.178 0$	3	1	$0.196 9 \pm 0.006 7$	$0.071 1 \pm 0.034 1$	$0.072 6 \pm 0.020 1$	$0.085 5 \pm 0.052 4$	$0.158 1 \pm 0.152 4$	91.76
叶片下半部+B5+暗培养	22.25	88.89	$3.415 4 \pm 0.330 5$	2	1	$0.068 1 \pm 0.006 3$	$0.062 6 \pm 0.011 0$	$0.115 1 \pm 0.020 7$	$0.087 3 \pm 0.015 9$	$0.218 9 \pm 0.042 6$	66.08
叶片下半部+B5+光照培养	22.25	83.33	$3.258 5 \pm 0.231 2$	1	0	$0.027 9 \pm 0.021 9$	$0.015 4 \pm 0.009 7$	$0.027 3 \pm 0.013 7$	$0.020 3 \pm 0.008 4$	$0.045 5 \pm 0.012 5$	52.32
叶片下半部+MS+暗培养	15.75	76.83	$3.885 0 \pm 0.460 6$	2	1	$0.035 9 \pm 0.029 6$	$0.033 5 \pm 0.023 1$	$0.061 6 \pm 0.015 4$	$0.027 7 \pm 0.011 4$	$0.116 5 \pm 0.038 4$	58.67

0.121 2、0.805 5、0.394 7、0.270 3 mg/g ，10-DAB、紫杉醇、东北红豆杉素的量均明显低于愈伤组织，仅巴卡亭 III 量相当。因此，利用组织培养技术，研究南方红豆杉愈伤组织中紫杉醇及其紫杉烷二萜类次生代谢产物的生成和调控具有重要的理论与实际应用价值。

本实验建立了 HPLC 测定南方红豆杉愈伤组织培养物中 10-DAB、巴卡亭 III、三尖杉宁碱、紫杉醇和东北红豆杉素 5 种紫杉烷二萜类成分的方法，

选择 227 nm 为其共有检测波长。经不同流动相组成（甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水）以及各流动相不同配比洗脱，考察其对细胞培养物供试品中 5 种成分分离度的影响，结果发现以甲醇-水为流动相梯度洗脱，5 种成分可获得良好的分离，且操作简便、重复性好、灵敏度高，可用于南方红豆杉组织培养次生代谢产物生成的调控研究。本实验从物种和环境保护的角度，采用紫杉烷二萜多指标加权评分优选南方红豆杉组织培养条件，为南方红豆杉

资源利用提供了实验依据^[11-12]。

本研究结果还表明,细胞系的紫杉醇量与其颜色、质地和生长率有一定的关系。生长状态差,颜色深、生长较慢、干质量/鲜质量比值高的细胞系往往有较高的紫杉醇量。生长状态良好,水分高、颜色浅绿翠绿亮,质地疏松的细胞系,5种成分不是很高,但5种成分量较稳定处于中间水平。愈伤组织紫杉醇量差异原因可能与不同外植体、不同基因型、愈伤组织的异质性,萜类成分合成途径中相关基因表达水平相关^[15-16]。由于紫杉醇等萜类量高的细胞往往生长比较缓慢,要维持、提高细胞系的萜类含量,对细胞系进行持续不断的选择是十分必要的。紫杉醇等萜类成分量低、但生长快的细胞,可以考虑添加诱导物质提高细胞系的萜类量^[17]。

参考文献

- [1] Suffness M, Cordell G A. *Antitumor alkaloids* [A] // in *The Alkaloids. Vol XXV* [M]. New York: Academic Press, 1985.
- [2] 张珂, 钱磊, 赵云雪. 紫杉醇载药体系及其抗肿瘤活性和临床应用 [J]. 生物物理学报, 2012, 28(3): 200-211.
- [3] Amikura T, Aoki Y, Banzai C, et al. Metastatic choriocarcinoma successfully treated with paclitaxel and carboplatin after interstitial lung disease induced by EMA-CO [J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 102: 573-575.
- [4] Naraharisetti P K, Ong B Y S, Xie J W, et al. In vivo performance of implantable biodegradable preparations delivering paclitaxel and etanidazole for the treatment of glioma [J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 886-894.
- [5] Fu Y, Li S, Zu Y, et al. Medicinal chemistry of paclitaxel and its analogues [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(29): 1-13.
- [6] Raja S G. Drug-eluting stents and the future of coronary artery bypass surgery: facts and fiction [J]. *Ann Thoracic Surg*, 2006, 81(3): 1162-1171.
- [7] Oh H C, Seo D W, Song T J, et al. Endoscopic ultrasonography-guided ethanol lavage with paclitaxel injection treats patients with pancreatic cysts [J]. *Gastroenterology*, 2011, 142(1): 172-179.
- [8] 凡利, 王义强, 王启业. 南方红豆杉培养中生产紫杉醇的研究进展 [J]. 经济林研究, 2012, 30(2): 134-139.
- [9] 谢志慧, 杜玲玲, 李效贤, 等. 南方红豆杉研究新进展 [J]. 中国药业, 2009, 18(15): 3.
- [10] 郝大程, 肖培根, 彭勇, 等. 红豆杉药物资源的生物学和化学研究进展及趋势分析 [J]. 药学学报, 2012, 47(7): 827.
- [11] 陶菊春, 吴建民. 综合加权评分法的综合权重确定新探 [J]. 系统工程理论与实践, 2001, 21(8): 43-48.
- [12] 杨小多. 温郁金组培快繁体系的建立及质量初步评价研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.
- [13] 陶米林, 刘清波, 黄红梅. 半夏组织培养体系的建立 [J]. 北方园艺, 2013, 35(4): 113-117.
- [14] 杨金玲, 高丽丽, 朱平. 人参皂苷生物合成研究进展 [J]. 药学学报, 2013, 48(2): 170-178.
- [15] 张芳芳, 王鹏, 姬丹丹, 等. 南方红豆杉愈伤组织培养条件的优化及紫杉醇积累的基因表达效应分析 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2058-2062.
- [16] 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.
- [17] 高明波, 张卫, 李兴泰, 等. 中国红豆杉细胞经重复诱导和蔗糖饲喂后云南紫杉烷C生产的相应基因表达变化 [J]. 生物工程学报, 2011, 27(1): 101-107.