

东北红豆杉细胞两液相培养中紫杉醇释放行为研究

吴兆亮 邸进申

(河北工业大学生物工程系 天津 300130)

元英进 胡宗定

(天津大学生物化工系 天津 300072)

摘 要 在东北红豆杉细胞悬浮培养中,分别研究了稀土化合物(硫酸铈铵)有机溶剂(油酸和邻苯二甲酸二丁脂)和稀土化合物与有机溶剂的协同作用对紫杉醇释放的影响。在此基础上深入研究了在东北红豆杉细胞两液相培养中,紫杉醇释放率随不同的有机溶剂(烷烃、有机酸、醇和脂)有机溶剂的体积分数、有机溶剂的加入时间和有机溶剂相毒性的变化规律。结果表明分别加入稀土化合物和有机溶剂都明显促进紫杉醇的释放,特别是有机溶剂更显著促进紫杉醇的释放。但在东北红豆杉细胞两液相培养中,稀土化合物加入不能进一步促进紫杉醇的释放。因此两液相培养中有机溶剂本身就是很好的产物释放剂。紫杉醇的释放率由对照组的 40% 提高到 75% 以上。

关键词 释放 红豆杉细胞 两液相培养 稀土化合物

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0500-05

紫杉醇是目前最新的具有很好疗效的一种抗癌药物,利用植物细胞培养是解决紫杉醇来源的一个重要方法,越来越多研究者对其进行了研究^[1-3],取得了一定的进展。

在红豆杉细胞悬浮培养过程中,虽然紫杉醇在胞外培养液中的溶解度很低^[4],但紫杉醇仍大部分储存在胞内,胞外培养液中的紫杉醇浓度远没有达到饱和和溶解度。因此采用植物细胞悬浮培养的产物释放技术有助于紫杉醇更多释放到胞外,从而在一定程度上提高紫杉醇产量。元英进和胡国武等^[5]利用稀土化合物对东北红豆杉细胞悬浮培养紫杉醇释放影响进行了研究,取得了良好的效果。

针对其他植物细胞悬浮培养,一些研究者对采用加树脂的两相培养产物释放进行研究^[6-7]。对于红豆杉细胞两液相培养,由于有机溶剂的萃取,打破了紫杉醇在胞内和胞外的平衡,使得更多的紫杉醇释放到胞外。然而这种释放行为的研究还未见报道。对于其它植物细胞悬浮培养,一些研究者采用氯仿、苯乙醇^[8]和乙醚^[9]等有机溶剂作为细胞渗透剂,虽然这些有机溶剂可使细胞膜的通透性显著增加,但细胞活性严重地受到影响。

本文研究稀土化合物对东北红豆杉细胞悬浮培

养及其两液相培养紫杉醇释放的影响。在此基础上深入探索在红豆杉细胞两液相培养中,紫杉醇释放率随不同的有机溶剂(烷烃、有机酸、醇和脂)有机溶剂体积分数、有机溶剂加入时间和相毒性的变化规律。

1 材料与方法

细胞株系是东北红豆杉细胞。有关液体培养基、有机溶剂、培养条件和分析方法(包括胞内、胞外培养液和有机溶剂中的紫杉醇含量分析)见文献^[10]。根据东北红豆杉细胞生长动力学研究^[11],前 2 天为生长延迟期,第 3 天进入生长对数期,到第 10 天结束。因此本文所有实验中,生产培养基第 10 天加入。第二段培养时间为 6 d,第 16 天收获细胞并进行紫杉醇含量分析。

2 结果和讨论

2.1 红豆杉细胞悬浮培养中紫杉醇的释放

2.1.1 稀土对紫杉醇释放的影响:在元英进和胡国武等^[5]研究基础上,进一步考察在东北红豆杉细胞两段培养中,稀土化合物对紫杉醇释放的影响,所加入的稀土化合物为硫酸铈铵,浓度为 10 mg/mL,

加入量为 1 mL(50 mL 培养液),稀土化合物第 10 天随生产培养基一同加入。结果见表 1。

表 1 东北红豆杉细胞悬浮培养中硫酸铈铵对紫杉醇释放率的影响

Table 1 Effects of ammonium cerium sulfate on release percentage of taxol

	Taxol production/(mg/L)			Release percentage of taxol ^B /%
	Cells	Free-cell medium	Total	
Control ^A	1.56 ± 0.16	1.04 ± 0.08	2.60 ± 0.24	40.0 ± 4.4
Ammonium cerium sulfate	1.12 ± 0.13	2.56 ± 0.15	3.68 ± 0.28	69.6 ± 3.8

A. Control means cell suspension cultures of *Taxus cuspidata* without rare earth compounds or organic solvents. The control presented in other Tables or Figures below is all this meaning.

B. Release percentage of taxol is taxol production in free-cell medium divided by total taxol production.

在东北红豆杉细胞两段培养中,与对照组相比,稀土化合物硫酸铈铵对紫杉醇释放率仍有明显的提高,对紫杉醇总产量也有一定的提高。因此,硫酸铈铵对细胞的通透性有进一步的提高,而且这种提高

有利于紫杉醇的合成,提高紫杉醇产量。

2.1.2 有机溶剂对紫杉醇释放的影响:有机溶剂为油酸和邻苯二甲酸二丁酯,培养体系中有机溶剂体积分数为 0.06(V/V),第 10 天随生产培养基一同加入。结果见表 2。

在东北红豆杉细胞两段培养中,与对照组相比,有机溶剂对紫杉醇释放率有更显著的提高;与加入稀土化合物比较(见表 1),有机溶剂对紫杉醇释放率也有进一步提高。其主要原因是在两液相培养中,由于有机溶剂的萃取,打破了紫杉醇在胞内外的平衡,使紫杉醇大部分储存在有机溶剂中。从而进一步促进了紫杉醇的合成,使得紫杉醇产量更高。

2.1.3 稀土化合物和有机溶剂的协同作用对紫杉醇释放的影响:上面研究结果表明,单独加入稀土化合物或有机溶剂都能促进紫杉醇释放,提高紫杉醇产量。在此基础上考察稀土化合物和有机溶剂的协同作用对紫杉醇释放的影响。稀土化合物为硫酸铈铵,浓度为 10 mg/mL,加入量为 1 mL(50 mL 培养液),有机溶剂为油酸和邻苯二甲酸二丁酯,培养体系中有机溶剂体积分数为 0.06(V/V),第 10 天随生产培养基一同加入。结果见表 3。

表 2 东北红豆杉细胞两液相培养中有机溶剂对紫杉醇释放率的影响

Table 2 Effects of organic solvents on release percentage of taxol

	Taxol production/(mg/L)				Release percentage of taxol ^C /%
	Cells	Free-cell medium	Organic solvents	Total	
Control	1.56 ± 0.16	1.04 ± 0.08		2.60 ± 0.24	40.0 ± 4.4
Oleic acid	0.97 ± 0.10	0.74 ± 0.09	10.37 ± 0.93	12.08 ± 1.12	92.0 ± 1.6
Dibutylphthalate	0.69 ± 0.11	0.60 ± 0.05	10.06 ± 0.64	11.35 ± 0.76	93.9 ± 1.3

C. Release percentage of taxol is taxol production in free-cell medium plus in organic solvent divided by total taxol production.

表 3 稀土化合物和有机溶剂的协同作用对紫杉醇释放率的影响

Table 3 Effects of the integrated function of ammonium cerium sulfate and organic solvents on release percentage of taxol

	Taxol production/(mg/L)				Release percentage of taxol ^C /%
	Cells	Free-cell medium	Organic solvents	Total	
Control	1.56 ± 0.16	1.04 ± 0.08		2.60 ± 0.24	40.0 ± 4.4
Oleic acid	0.91 ± 0.13	0.76 ± 0.09	10.11 ± .80	11.78 ± 1.02	92.3 ± 1.7
Dibutylphthalate	0.93 ± 0.15	0.88 ± 0.12	11.82 ± 1.18	13.63 ± 1.45	93.2 ± 1.9

在东北红豆杉细胞两液相培养中,与没有加稀土化合物两液相培养(见表 2)相比,加入稀土化合物对紫杉醇释放没有进一步的促进作用,对紫杉醇合成速率和产量也没有进一步提高。因此在红豆杉细胞悬浮培养中,由于采用两液相培养技术的有机溶剂对促进紫杉醇释放强于采用加入稀土化合物技

术促进紫杉醇释放,所以在其两液相培养中,加入的稀土化合物起不了作用,没有必要采用加入稀土化合物的释放技术。

2.2 东北红豆杉细胞两液相培养中紫杉醇的释放

2.2.1 不同有机溶剂对紫杉醇释放的影响:两液相培养中选择有机溶剂除了有机溶剂对产物有尽可能

表 5 有机溶剂体积分数对紫杉醇释放率、紫杉醇总产量和细胞干重的影响

Table 5 Effects of volumetric fraction of organic solvents on release percentage and total production of taxol and cel(k dwt)

Volumetric fraction/(V/V)		Release percentage of taxol ^C /%	Total taxol production/(mg/L)	Cel(k dwt)/(g/L)
Control		40.0 ± 4.4	2.60 ± 0.24	19.6 ± 1.2
	0.04	90.3 ± 2.1	9.37 ± 0.95	18.8 ± 1.4
Oleic acid	0.06	92.0 ± 1.7	12.08 ± 1.12	18.1 ± 0.9
	0.08	93.5 ± 2.0	13.39 ± 1.21	16.6 ± 0.7
Dibutylphthalate	0.04	91.2 ± 2.1	8.42 ± 1.01	17.7 ± 1.0
	0.06	93.2 ± 1.9	11.35 ± 0.76	17.3 ± 1.2

表 6 有机溶剂的加入时间对紫杉醇释放率、细胞干重和紫杉醇总产量的影响

Table 6 Effects of addition time of organic solvents on release percentage and total production of taxol and cel(k dwt)

	t/d	Release percentage of taxol ^C /%	Total taxol production/(mg/L)	Cel(k dwt)/(g/L)
Control		40.0 ± 4.4	2.60 ± 0.24	19.6 ± 1.2
	1	92.8 ± 2.0	6.69 ± 0.80	15.1 ± 1.1
Oleic acid	7	92.4 ± 1.8	11.77 ± 1.41	18.0 ± 1.2
	10	92.0 ± 1.7	12.08 ± 1.12	18.1 ± 0.9
Dibutylphthalate	1	94.9 ± 1.9	6.78 ± 1.02	12.7 ± 0.6
	7	94.0 ± 2.0	10.89 ± 1.51	17.2 ± 1.2
	10	93.2 ± 1.9	11.35 ± 0.76	17.3 ± 1.4

在东北红豆杉细胞两液相培养中,有机溶剂加入时间对紫杉醇释放有一定的影响。有机溶剂第 1 天加入时紫杉醇释放率比第 7 天或第 10 天加入时紫杉醇释放率稍大些,这与有机溶剂加入时间对细胞培养所产生的毒性变化规律一致。有机溶剂第 1 天加入时对细胞产生的毒性影响比有机溶剂在细胞生长对数期中期至末期对细胞产生的毒性影响大,因此有机溶剂第 1 天加入的紫杉醇释放率大于有机溶剂在细胞生长对数期中期至末期加入时的紫杉醇释放率。但由于与对照组相比有机溶剂促使紫杉醇释放率提高已很大,因此有机溶剂不同加入时间对紫杉醇释放率影响不是很大。

2.2.4 有机溶剂相毒性对紫杉醇释放的影响:所

谓有机溶剂相毒性指的是在培养体系中,有机溶剂萃取培养基中微量组分,使培养基中微量组分浓度下降而影响细胞生长和产物生产^[14]。减少有机溶剂相毒性一个重要方法是将有机溶剂进行预处理,即将有机溶剂与相应培养基充分混合,静止分相分离出有机溶剂(分离出的培养基不用)再加入培养液中,从而减少有机溶剂萃取培养基中微量组分。

有机溶剂为油酸和邻苯二甲酸二丁酯,培养体系中有有机溶剂体积分数为 0.06,第 10 天随生产培养基一同加入。结果见表 7。

在东北红豆杉细胞两液相培养中,有机溶剂相毒性对紫杉醇释放有一定的影响。未经预处理的有机溶剂体系中,其紫杉醇释放率稍高于经预处理的

表 7 有机溶剂相毒性对紫杉醇释放率、紫杉醇总产量和细胞干重的影响

Table 7 Effects of phase toxicity of organic solvents on release percentage and total production of taxol and cel(k dwt)

		Release percentage of taxol ^C /%	Total taxol production/(mg/L)	Cel(k dwt)/(g/L)
Control		40.0 ± 4.4	2.60 ± 0.24	19.6 ± 1.2
	Without pretreatment	94.8 ± 2.1	10.71 ± 0.86	16.0 ± 1.0
Oleic acid	Pretreatment	92.0 ± 1.7	12.08 ± 1.12	18.1 ± 0.9
	Without pretreatment	95.3 ± 2.1	8.44 ± 0.91	15.3 ± 1.0
Dibutylphthalate	Pretreatment	93.2 ± 1.9	11.35 ± 0.76	17.3 ± 1.4

有机溶剂体系中紫杉醇释放率。这就表明未经预处理的有机溶剂因萃取培养液中的微量组分而影响细胞的生长,从而也使得细胞膜的渗透性增强,提高紫杉醇释放率。

3 结 论

在东北红豆杉细胞悬浮培养中,两液相培养技

术本身是很有效的代谢产物释放技术。有机溶剂的 $\log P$ 值越小,紫杉醇释放率越大。随着有机溶剂体积分数的增加,紫杉醇释放率有所增加。有机溶剂第 1 天加入紫杉醇释放率最大,有机溶剂在细胞生长对数中期至末期加入时的紫杉醇释放率有所下降。未经预处理的有机溶剂体系中,其紫杉醇释放率稍高于经预处理的有机溶剂体系中紫杉醇释放率。

参 考 文 献

- [1] Christen A G, Gibson D M, Bland J. U S Patent 5019504, May 28, 1991
- [2] WANG H Q, ZHONG J J, YU J T. *Biotech letters*, 1997, **19**: 353~355
- [3] Pestchanker L J, Roberts S C, Shuler M L. *Enzyme and Microb Technol*, 1996, **19**: 256~260
- [4] Gibson D M, Ketchum R E B, Hirasuna T J *et al.* Taxol: Science and Application. C R C Press Inc, 1995. pp. 71~91
- [5] 元英进, 胡国武, 王传贵等. 中国稀土学报. 1998, **16**(1): 56~60
- [6] Payne G F, Shuier M L. *Biotechnol Bioeng*, 1988, **31**: 922~928
- [7] Byun S Y. *Phytochemistry*, 1990, **29**(10): 3135~3139
- [8] Brodekus P. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **27**: 561~566
- [9] Felix H. *Analytical Biochemistry*, 1982, **120**: 211~234
- [10] 吴兆亮, 元英进, 胡 萍等. 中草药, 1998, **29**(8): 589~592
- [11] 元英进, 许 晖, 王传贵等. 中草药, 1997, **28**(增刊): 9~11
- [12] Lane C, Boeyen S, Vos C *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1987, **30**: 81~87
- [13] Kim D J, Chang H N. *Biotechnol Bioeng*, 1990, **36**: 460~466
- [14] Vermue M, Sikkema J, Verheul A *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1993, **42**: 747~758

Study on Taxol Release in the Two-liquid-phase Cultures of *Taxus cuspidata*

WU Zhao-Liang DI Jin-Shen

(Department of Bioengineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130)

YUAN Ying-Jin HU Zong-Ding

(Department of Biochemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract Effects of rare earth compound (ammonium sulphate), organic solvents (oleic acid and dibutylphthalate) and the integrated function of the rare earth compound and organic solvents were studied on taxol release in the *Taxus cuspidata* suspension cultures. And then effects of different organic solvents (paraffin, organic acid, alcohol and ester), their volumetric fraction and phase toxicity were studied on taxol release in the two-liquid-phase cultures of *Taxus cuspidata*. The results showed that the addition of the rare earth compound or the organic solvents could strengthen obviously taxol release, especially the organic solvents. But the addition of the rare earth compound could not strengthen further taxol release in the two-liquid-phase cultures of *Taxus cuspidata*. Therefore the organic solvents were very good permeabilizing reagents, which could enhance obviously secondary metabolite in the two-liquid-phase cultures of plant cells. Release percentage of taxol was increased into more than 75% from 40% of the control.

Key words Release, *Taxus cuspidata*, two-liquid-phase culture, rare earth compound