

几种真菌诱导子对云南红豆杉细胞产生紫杉醇的影响

陈永勤* 朱蔚华** 吴蕴祺 胡 秋

(中国医学科学院 中国协和医科大学 药物研究所 北京 100050)

关键词 云南红豆杉, 悬浮细胞培养, 真菌诱导子, 紫杉醇

分类号 Q813.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0522-24

自 1993 年以来, 紫杉醇(Taxol)已成为临床上治疗乳腺癌和卵巢癌的重要药物。由于其药源植物—红豆杉属植物(*Taxus L.*)生长非常缓慢, 体内紫杉醇含量很低, 且资源有限, 所以人们一直在寻找解决紫杉醇药源短缺的方法。用红豆杉属植物组织培养技术生产紫杉醇被认为是一种有潜力的方法之一, 受到人们的高度重视。虽然有关这方面的报道较多^[1], 但该研究仍处在试验阶段, 还未见用此方法商业化生产紫杉醇的报道。其重要原因是目前红豆杉属植物离体细胞的紫杉醇产量还比较低, 而且不稳。人们仍在继续寻找提高紫杉醇产量的方法。

真菌能产生一些促进植物细胞次生代谢的化合物, 因此在植物细胞培养中常被用作诱导子来提高次生代谢物的产量^[2]。本文报道了几种真菌诱导子对云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)悬浮细胞产生紫杉醇的影响。

1 材料与方 法

1.1 细胞系的建立

取云南红豆杉(本所栽培植株, 来自云南省林业科学院植物园)当年生茎段洗净后, 先后用 70% 乙醇消毒 2min 和 0.1% HgCl₂ 消毒 20min。用无菌水漂洗 6 次后, 剪成小段, 接种在诱导培养基上进行愈伤组织的诱导; 愈伤组织形成后, 转到增殖培养基上进行继代培养。悬浮细胞培养是通过将愈伤组织接种在液体增殖培养基中、在摇床上震荡培养建立起来的。

基本培养基为 B₅ 培养基^[3]的无机盐、100 mg/L 肌醇、1.25 mg/L 烟酸、1.0 mg/L 维生素 B₁、0.5 mg/L 维生素 B₆、20.0 g/L 蔗糖、0.1 mg/L BAP(6-苄基腺嘌呤)和 1.0 mg/L 2,4-D。诱导培养基中加有 1.0 g/L 水解乳蛋白。增殖培养基中添加了 2.0 mmol/L 的 L-谷氨酰胺。固体培养基中琼脂浓度为 8.0 g/L。培养基 pH 为 5.8。培养温度为 24℃ ± 2℃, 黑暗。摇床转速 120 r/min。

1.2 诱导子的制备

将桔青霉(*Penicillium citrinum*)、灰绿犁头霉(*Absidia glauca*)、鲁氏毛霉(*Mucor rouxianus*)和灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)的菌丝接种在液体改良 PDA 培养基(100.0 g/L 土豆, 20.0 g/L 葡萄糖, 3.0 g/L KH₂PO₄, 1.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 1.0 mg/L V_{B1})中。在摇床上(120 r/min)暗培养 7d 后, 将各菌培养物过滤, 取菌丝, 用蒸馏水冲洗 2 次, 在 121℃ 消毒 25 min, 即为诱导子。

1.3 诱导试验

取 5 瓶悬浮细胞, 静置 2 min 后, 倒出上层培养液, 剩下的细胞培养物同 1500 mL 加有 1.0 mmol/L 苯丙氨酸的增殖培养基混匀, 再分装到 500 mL 三角瓶中, 每瓶 130 mL。真菌诱导子在培养至 12d 时加

* 现在湖北大学生命科学院工作, 武汉 430062。

** 联系人。

收稿日期: 1998-08-24, 修回日期: 1998-12-14。

入,每瓶 30 mL。对照瓶加 30 mL 无菌蒸馏水。每处理 2 个重复。桔青霉的用量为 3.1 g/L 干菌丝、灰色梨头霉为 3.42 g/L 干菌、鲁氏毛霉为 3.25 g/L 干菌丝和灰葡萄霉为 2.78 g/L 干菌丝。继续培养至 15d 时结束,离心收集细胞,烘干后测定干重和紫杉醇含量。

不同桔青霉菌加入量和诱导时间的试验操作同上。桔青霉菌培养物也在悬浮细胞培养至 12d 时加入,加入量分别为每瓶 15 mL、30mL 和 50mL(分别相当于干菌丝 1.55、3.1 和 5.2 g/L),对照瓶加 30 mL 无菌蒸馏水。诱导时间分别为 3d 和 5d。各处理重复 3 次。

1.4 紫杉醇的测定

细胞中紫杉醇含量的测定按 Wu 等^[4]的 HPLC 法进行。色谱柱为 Plantinum C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm, Alltech, USA),流动相为甲醇-乙腈-水(25:35:45),流速 1.0 mL/min,检测波长 227 nm。细胞样品中紫杉醇含量通过外标法计算,以细胞干重表示。

2 结果与讨论

本试验的云南红豆杉悬浮细胞系为淡黄色,多呈小米大小的颗粒状,生长周期为 18d。细胞中产生的紫杉醇经紫外吸收图谱和质谱确证。

在两组试验中,在细胞快速生长期的末期(第 12d)加入真菌诱导子对细胞干重的影响不显著(资料略),但对细胞中紫杉醇的含量影响很大。

2.1 不同真菌诱导子对云南红豆杉细胞产生紫杉醇的影响

在所试验的真菌诱导子中,以含桔青霉菌丝的处理(Pen1)效果最好,其紫杉醇含量和产量分别比对照高 113.2%和 104.0%(图 1),达 0.0356%(干细胞)和 5.06 mg/L。其次是灰葡萄孢霉菌,处理后紫杉醇含量和产量分别比对照提高了 58.7%和 51.2%。鲁氏毛霉和灰绿梨头霉对云南红豆杉悬浮培养细胞形成紫杉醇的促进作用不显著。虽然桔青霉菌的培养液也能提高细胞中紫杉醇的含量,但效果不如菌丝的显著。

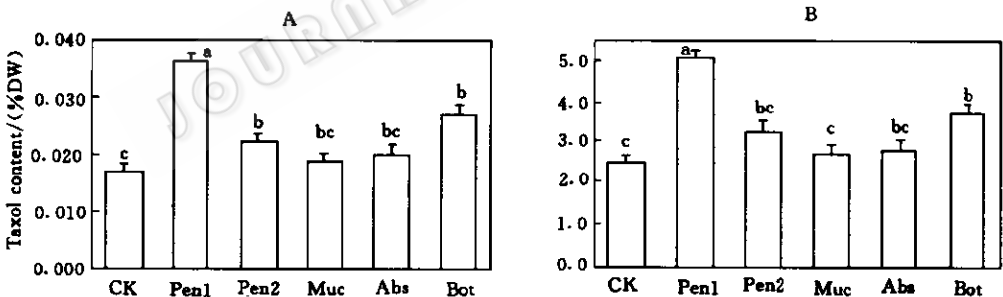


图 1 真菌诱导子对云南红豆杉悬浮细胞产生紫杉醇的影响

A: Taxol content (% DW); B: Taxol yield (mg/L). CK. Control, Pen1. *Penicillium citrinum* culture, Pen2. Filtrate of *Penicillium citrinum* culture, Muc. *Mucor rouxianus* culture, Abs. *Absidia glauca* culture, Bot. *Botrytis cinerea* culture. Bars represent standard errors of the means. Columns sharing the same letters do not differ from each other at $P=0.05$ by a LSR test.

2.2 桔青霉菌诱导子的加入量和诱导时间对云南红豆杉细胞产生紫杉醇的影响

不同桔青霉菌丝加入量对云南红豆杉细胞产生紫杉醇的影响较大。在 3 种浓度处理中,以 3.1 g/L 的效果最好,其紫杉醇的含量和产量分别比对照提高了 2 倍以上(图 2)。从诱导时间来看,以加入诱导子后继续培养 3d 的效果最好,延长诱导时间反而会使紫杉醇含量和产量有所下降。

大幅度提高红豆杉属植物离体培养细胞的紫杉醇产量是实现用植物细胞培养技术商业化生产紫杉醇的关键。本试验的结果表明,在细胞快速生长末期加入真菌诱导子可以促进云南红豆杉悬浮细胞产

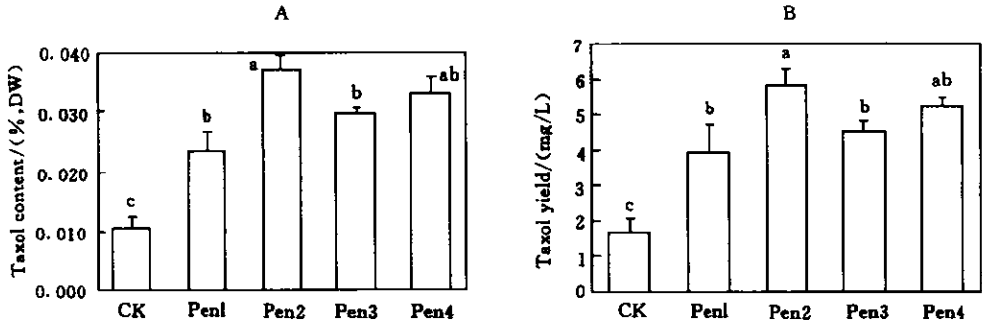


图2 不同桔青霉培养物加入量和诱导时间对云南红豆杉悬浮细胞产生紫杉醇的影响

A: Taxol content (% DW); B: Taxol yield (mg/L). CK: Control, Pen1: Treated by addition of 1.55 g/L mycelium for 3 days, Pen2: Treated by addition of 3.1 g/L mycelium for 3 days, Pen3: Treated by addition of 5.2 g/L mycelium for 3 days, Pen4: Treated by addition of 3.1 g/L mycelium for 5 days. Bars represent standard errors of the means. Columns sharing the same letters do not differ from each other at $P:0.05$ by a LSR test.

生紫杉醇,但不同真菌的效果差异很大。因此,通过大量筛选,有可能得到促进作用更强的菌种。

致 谢 本所方唯硕博士提供了紫杉醇标准品,姚庆强博士代测紫杉醇的紫外吸收图谱,中国科学院生态环境研究中心蒋 可研究员和赵国林高级工程师代做 APCI 质谱,特致谢意。

参 考 文 献

- [1] 陈永勤,朱蔚华. 植物生理学通讯,1997,33:213~219.
- [2] F. DiCosmo, M. Misawa. *Trends in Biotechnology*, 1985, 3: 318~322.
- [3] O. L. Gomborg, R. A. Miller, K. Ojima. *Exp. Cell. Res.*, 1968, 50: 148~151.
- [4] Wu Y. Q., Zhu W. H., Ling. J. *Chromatogr & Related Technol.*, 1997, 20: 3147~3151.

Effects of Fungus Elicitors on Taxol Production in Suspension Cells of *Taxus yunnanensis*

Chen Yongqin Zhu Weihua Wu Yunqi Hu Qiu

(Institute of Material Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050)

Abstract The effects of the cultures of *Penicillium citrinum*, *Absidia glauca*, *Mucor rouzianus* and *Botrytis cinerea* on the growth and taxol production in suspension cells of *Taxus yunnanensis* were investigated. The results showed that the addition of the cultures of *Penicillium citrinum* or *Botrytis cinerea* into the suspension cell cultures of *T. yunnanensis* at the final stage of fast-growing phase (the 12th day of culture) did not inhibited the cell growth, but dramatically increased taxol yield; The best result was obtained in the elicitation with *Penicillium citrinum* (3.1 g/L dry mycelium) for 3 days, in which the taxol yield was increased by 1~2 times.

Key words *Taxus yunnanensis*, suspension cell culture, fungus elicitor, taxol