

东北红豆杉细胞培养生产紫杉醇的调控研究

周忠强, 梅兴国, 吴奇君, 常俊丽

(华中科技大学 生命科学与技术学院, 中国湖北 武汉 430074)

摘要: 研究了诱导子、前体及抑制剂的协调作用对东北红豆杉生产紫杉醇的影响。结果表明, 向培养基中加入 80 mg/L 水杨酸、80 mg/L 茉莉酸甲酯、0.5 mmol/L 乙酸钠、2 mmol/L 苯丙氨酸、0.5 mmol/L 丝氨酸、0.1 mmol/L 甘氨酸、10 mg/L 肉桂酸、0.5 mmol/L 苯甲酸钠、5 mmol/L 丙酮酸钠、10 mg/L 氯化氯胆碱和 1 mg/L 赤霉素可使紫杉醇含量提高 368.65%。并且证明交互作用对紫杉醇合成有显著作用。

关键词: 紫杉醇; 诱导子; 前体; 抑制剂; 交互作用; 细胞培养

中图分类号: Q81

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2001)03-0238-04

Regulation of Taxol Biosynthesis in Cell Suspension Culture of *Taxus cuspidata*

ZHOU Zhong-qiang, MEI Xing-guo, WU Qi-jun, CHANG Jun-li

(School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China)

Abstract: The effects of some elicitors, precursors and inhibitors on production of taxol in cell suspensions of *T. cuspidata* were studied. The results showed that the addition of 80 mg/L salicylic acid (SA), 10 mg/L chlorocholine chloride (CCC), 0.5 mmol/L sodium acetate, 2 mmol/L phenylalanine, 0.5 mmol/L Ser, 0.1 mmol/L Gly, 10 mg/L cinnamic acid, 0.5 mmol/L sodium benzoate, 5 mmol/L sodium pyruvate and 1 mg/L gibberellic acid (GA₃) into the cultures increased taxol yield by 368.65%, and their interactions dramatically promoted taxol biosynthesis as well.

Key words: taxol; elicitor; precursor; inhibitor; interaction; cell suspension

(*Life Science Research*, 2001, 5(3): 238 ~ 241)

紫杉醇是从红豆杉属植物中提取出来的具有很好抗肿瘤疗效的二萜生物碱^[1]。由于其天然资源稀少, 从天然生长的红豆杉属植物中提取紫杉醇远远不能满足市场需求, 多年来人们一直在寻找能替代直接从植物中提取紫杉醇的方法。红豆杉细胞培养技术具有不破坏自然资源和生态环境, 不受自然条件限制等优点, 是扩大紫杉醇来源的重要途径之一。水杨酸(SA)是植物体内普遍存在的一种酚类化合物, 已经证实它在植物体内具

有多种生理调节作用, SA不仅是植物产生过敏反应和系统获得性抗性所必需, 而且也是病原物侵染植物后活化一系列防卫反应的信号传递过程中的重要组成成分^[2,3]。前体饲喂可通过增加底物量来加快反应速度和提高产率: Strobel^[4]等用¹⁴C-苯丙氨酸、¹⁴C-亮氨酸及¹⁻¹⁴C-乙酸钠为前体, 饲喂短叶红豆杉无菌树皮小块, 证明苯丙氨酸、亮氨酸和乙酸钠都是紫杉醇的前体, 其中乙酸钠不仅掺入到乙酰基, 而且能掺入到苯环及紫

* 收稿日期: 2001-04-09; 修回日期: 2001-06-15

基金项目: 国家“九五”科技攻关重点资助项目(96-C02-03-01); 国家 863 资助项目(102-12-06-01)

作者简介: 周忠强(1974-), 男, 湖北孝感人, 博士研究生, 从事植物细胞培养代谢调控方面的研究; 梅兴国(1954-), 男, 湖北咸宁人, 医学博士, 华中科技大学教授, 博士生导师, 从事动植物细胞培养代谢调控及基因治疗方面的研究; 吴奇君(1978-), 男, 江西景德镇人, 硕士研究生, 从事植物细胞培养代谢调控方面的研究, Tel: +86-027-87543833.

杉烷骨架中. Fett-neto^[5]研究了不同浓度的苯丙氨酸、苯甲酸、N-苯甲酰甘氨酸、丝氨酸、甘氨酸对二年生 *T. cuspidata* 细胞生长及紫杉醇产量的影响. 丙酮酸钠的作用可能是促进了细胞中乙酰辅酶 A 的形成, 而乙酰辅酶 A 正是包括紫杉醇在内的各种萜类化合物生物合成的起始原料^[6]. 添加抑制剂能够反馈抑制分支路径而使物流向有利于紫杉醇合成的方向流动, 郭志刚^[7]等证实添加适量 GA₃ 和 CCC 有利于紫杉醇的合成. 本文通过添加诱导子、前体和抑制剂进行实验, 分别研究了 29 种因素的作用, 重点考察了水杨酸(SA)、乙酸钠、丙酮酸钠、丝氨酸、氯化氯胆碱(CCC)和赤霉素(GA₃)的交互作用对紫杉醇产量的影响.

1 材料与方 法

1.1 细胞株系

细胞株来自东北红豆杉(*T. cuspidata*)愈伤组织, 经多次筛选继代. 由本实验室提供, 代号为 TD8, 在 62 号培养基上继代培养.

1.2 红豆杉细胞的培养

试验瓶为 250 mL 的三角瓶, 每瓶装 100 mL 细胞培养液. 平均接种量为 10 g/L 鲜细胞. 培养在黑暗条件下进行, 培养室温度为 22 ± 2 . 液体培养在摇床上进行, 120 r/min.

1.3 诱导子、前体和抑制剂的添加

诱导子、前体和抑制剂均用过滤法灭菌, 其中水杨酸(SA)的浓度分别为 50 mg/L 和 80 mg/L;

氯化氯胆碱(CCC)的浓度分别为 10 mg/L 和 20 mg/L; 乙酸钠的浓度分别为 0.5 mmol/L 和 2 mmol/L; 苯丙氨酸的浓度分别为 1 mmol/L 和 2 mmol/L; 茉莉酸甲酯(MJ)的浓度分别为 30 mg/L 和 80 mg/L; 丝氨酸(Ser), 甘氨酸(Gly)和苯甲酸钠的浓度分别为 0.1 mmol/L 和 0.5 mmol/L; 肉桂酸的浓度分别为 10 mg/L 和 20 mg/L; 丙酮酸钠的浓度分别为 1 mmol/L 和 5 mmol/L; 赤霉素(GA₃)的浓度为 1 mg/L 和 5 mg/L.

各水平实验均作三种重复, 测试结果为各重复样的平均值. 细胞培养 28 d 后收获, 细胞抽滤后冷冻干燥.

1.4 紫杉醇的测定

细胞的紫杉醇合成能力, 以收获时单位体积培养液内紫杉醇的含量表示(mg/L). 紫杉醇含量的测定用 HPLC 外标法. HPLC 仪为法国 Gilson 公司制备分析两用式全自动产品, 流动相甲醇: 水为 7: 3, 流速为 1 mL/min, 采用苯基柱, 柱温 40 , 检测波长 227 nm.

2 结果与分析

2.1 正交实验的方案设计和测定结果

本实验采用 L₃₂(2³¹) 正交设计表即 31 种因素, 二水平浓度, 各因素添加浓度按正交实验随机原则设计. 添加诱导子、前体及抑制剂的正交设计实验结果见表 1~3.

表 1 紫杉醇含量
Table 1 Content of taxol

序号	紫杉醇含量	序号	紫杉醇含量	序号	紫杉醇含量	序号	紫杉醇含量
NO.	/ (mg · L ⁻¹)	NO.	/ (mg · L ⁻¹)	NO.	/ (mg · L ⁻¹)	NO.	/ (mg · L ⁻¹)
	Taxol yields		Taxol yields		Taxol yields		Taxol yields
1	3.02	10	1.77	19	2.35	28	5.22
2	4.37	11	2.51	20	7.34	29	1.38
3	1.76	12	2.86	21	1.51	30	1.35
4	2.88	13	1.48	22	1.64	31	2.33
5	2.21	14	2.41	23	1.95	32	1.24
6	3.02	15	1.75	24	2.66	空白	1.85
7	3.27	16	1.46	25	8.67	-	-
8	4.56	17	3.45	26	2.82	-	-
9	3.26	18	1.97	27	2.81	-	-

根据正交设计中方差分析可知: $F_{因} = (S_{因}/f_{因}) / (S_{误}/f_{误}) - F(f_{因}, f_{误})$, 在这里第 AA 列, 第

AE 列均未排因子,故 S_{AA}, S_{AE} 肯定为误差引起,因此 $S_{误} = S_{AA} + S_{AE} = 0.006$. 又水平数为 2, 即每列的自由度为 1, 而 $S_{误}$ 的自由度 $f_{误} = f_{AA} + f_{AE} = 2$.

查 F 分布表得 $F_{0.99}(1, 2) = 4999, F_{0.95}(1, 2) = 200, F_{0.90}(1, 2) = 49.5$. 由表得 $F_{D} > F_{0.99}(1,$

2), 故因子 D (乙酸钠) 的作用高度显著. 类似地可得出 A、B、C、E、F、J、K、L、O、R、V、X、Y、AB、AC、AD $> F_{0.95}(1, 2)$, 它们的作用都是显著的, H、I、M、P、Q、S、W 有一定影响, 而因子 G、N、T、U、Z 无显著作用.

表 2 实验结果统计分析

Table 2 Statistic analysis of results of orthogonal experiment factors

Factors	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
K1	42.59	47.96	50.91	57.06	36.49	40.54	46.41	44.33	47.44	41.37	49.72	48.55	47.06	45.27	52.38	43.71
K2	48.69	43.32	40.37	34.22	54.79	50.74	44.87	46.95	43.84	49.91	41.56	42.73	44.22	46.01	38.9	47.57
KK1	2.662	2.998	3.182	3.566	2.281	2.534	2.901	2.771	2.965	2.586	3.108	3.034	2.941	2.829	3.274	2.732
KK2	3.043	2.708	2.523	2.139	3.424	3.171	2.804	2.934	2.74	3.119	2.598	2.671	2.764	2.876	2.431	2.973
R	6.1	4.64	10.54	22.84	18.3	10.2	1.54	2.62	3.6	8.54	8.16	5.82	2.84	0.74	13.48	3.86
S	1.163	0.673	3.472	16.302	10.465	3.251	0.074	0.215	0.405	2.279	2.081	1.059	0.252	0.017	5.678	0.465
F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

A: 水杨酸/($mg \cdot L^{-1}$); B: 氯化氯胆碱/($mg \cdot L^{-1}$); C: 水杨酸 \times 氯化氯胆碱; D: 乙酸钠/($mmol \cdot L^{-1}$); E: 乙酸钠 \times 水杨酸; F: 乙酸钠 \times 氯化氯胆碱; G: 丙酮酸钠 \times 赤霉素; H: 前体加入时间/d; I: 丙酮酸钠 \times 茉莉酸甲酯; J: 肉桂酸 \times 赤霉素; K: 丙酮酸钠 \times 丝氨酸; L: 苯丙氨酸 \times 水杨酸; M: 苯丙氨酸/($mmol \cdot L^{-1}$); N: 抑制剂加入时间/d; O: 苯丙氨酸 \times 氯化氯胆碱; P: 茉莉酸甲酯/($\mu mol \cdot L^{-1}$).

A: SA/($mg \cdot L^{-1}$); B: CCC/($mg \cdot L^{-1}$); C: SA \times CCC; D: sodium acetate/($mmol \cdot L^{-1}$); E: sodium acetate \times SA; F: sodium acetate \times CCC; G: sodium pyruvate \times GA₃; H: the time of precursors addition/d; I: sodium pyruvate \times MJ; J: cinnamic acid \times GA₃; K: sodium pyruvate \times Ser; L: phenylalanine \times SA; M: phenylalanine/($mmol \cdot L^{-1}$); N: the time of inhibitors addition/d; O: phenylalanine \times CCC; P: MJ/($\mu mol \cdot L^{-1}$).

表 3 实验结果统计分析

Table 3 statistic analysis of results of orthogonal experiment Factors

Factors	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE
K1	43.5	38.65	47.56	46.17	46.52	42.07	47.06	53.2	38.95	45.38	45.53	54.42	39.21	42.04	45.47
K2	47.78	52.63	43.72	45.11	44.76	49.21	44.22	38.08	52.33	45.9	45.75	36.86	52.07	49.24	45.81
KK1	2.719	2.416	2.973	2.886	2.908	2.629	2.941	3.325	2.434	2.836	2.846	3.401	2.451	2.628	2.842
KK2	2.986	3.289	2.733	2.819	2.798	3.076	2.764	2.38	3.271	2.869	2.86	2.304	3.254	3.078	2.85
R	4.28	13.98	3.84	1.06	1.76	7.14	2.84	15.12	13.38	0.52	0.22	17.56	12.86	7.2	0.34
S	0.572	6.108	0.461	0.035	0.097	1.593	0.252	7.144	5.595	0.008	0.001	9.636	5.168	1.62	0.003
F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Q: 水杨酸 \times 茉莉酸甲酯; R: 丝氨酸/($mmol \cdot L^{-1}$); S: 甘氨酸/($mmol \cdot L^{-1}$); T: 肉桂酸/($mg \cdot L^{-1}$); U: 苯甲酸钠 \times 苯丙氨酸; V: 氯化氯胆碱 \times 肉桂酸; W: 诱导子加入时间/d; X: 苯甲酸钠/($mmol \cdot L^{-1}$); Y: 丙酮酸钠/($mmol \cdot L^{-1}$); Z: 赤霉素 \times 乙酸钠; AA: 空白; AB: 氯化氯胆碱 \times 赤霉素; AC: 乙酸钠 \times 丙酮酸钠; AD: 赤霉素/($mg \cdot L^{-1}$); AE: 空白.

Q: SA \times MJ; R: Ser/($mmol \cdot L^{-1}$); S: Gly/($mmol \cdot L^{-1}$); T: cinnamic acid/($mg \cdot L^{-1}$); U: sodium benzoate \times phenylalanine; V: CCC \times cinnamic acid; W: the time of elicitors addition/d; X: sodium benzoate/($mmol \cdot L^{-1}$); Y: sodium pyruvate/($mmol \cdot L^{-1}$); Z: GA₃ \times sodium acetate; AA: blank; AB: CCC \times GA₃; AC: sodium acetate \times sodium pyruvate; AD: GA₃($mg \cdot L^{-1}$); AE: blank.

2.2 诱导子、前体和抑制剂的协同作用对紫杉醇生产的影响

号为 A₂B₂D₁H₁M₂N₂P₁R₂S₁T₁W₁X₁Y₂AD₂, 即向培养基中加入 80 mg/L SA、10 mg/L CCC、0.5

mmol/L 乙酸钠、2 mmol/L 苯丙氨酸、80 mg/L

MJ、0.5 mmol/L Ser、0.1 mmol/L Gly、10 mg/L 肉桂酸、0.5 mmol/L 苯甲酸钠、5 mmol/L 丙酮酸钠和 1 mg/L GA₃ 可使紫杉醇含量提高 368.65%。而分析得出的最好条件为 A₂B₁D₁H₂M₁N₂P₂R₂S₁T₁W₁X₁Y₂A_D₂。根据 R 值可知在单独添加的物质中对细胞紫杉醇含量的影响次序为 D > X > R > Y > AD₂ > A > B > P > S > M > T, 与空白 AA 和空白 AE 相比它们的作用是非常的明显。由此说明这种协调作用产生的优化组合可以很好地提高紫杉醇的含量。

2.3 诱导子、前体和抑制剂的交互作用对紫杉醇生产的影响

本实验考查了 15 种交互作用, 根据表中的 R 值, 它们的影响次序是 E > AB > O > AC > C > F > J > K > V > L > Q > I > U > G > Z, 由以上方差分析可知因子 C、E、F、J、K、L、O、V、AB、AC 的作用是显著的, 因子 I、Q 有一定影响, 而因子 G、U、Z 无显著影响。

其中 C、J、O、V、AB 的交互作用要比它们各种单因素的作用都要大: J、V、AB 是三种抑制剂 (CCC、GA₃、肉桂酸) 之间的交互作用; C、O 是抑制剂 (CCC) 分别与诱导子 (SA) 和前体 (苯丙氨酸) 之间的交互作用。这说明不仅同类型的物质会互相作用, 而且不同类型之间也可能产生很大的影响。由此更好地证明有的物质不是单独的起作用, 有可能是其他物质的加入促进或减弱了它的作用。这为实验当中更好地调控添加物质起到一定的指导作用。

3 结论

由以上分析可知: 诱导子 (SA)、前体 (乙酸钠, Ser, 苯甲酸钠, 丙酮酸钠) 和抑制剂 (CCC, GA₃) 对紫杉醇的合成有显著的影响。本文通过添加诱导子、前体、抑制剂很好地促进了紫杉醇的

合成。从以上分析还可以看出: 各种物质之间的协调作用非常重要。有的物质之间会产生交互作用, 诱导子与诱导子之间、前体与前体之间、抑制剂与抑制剂之间, 可能是促进也可能是滞后。而目前仍未见有全面、系统地研究交互作用的报道。

参考文献 (References):

- [1] WANI M C, TAYLOR H L, WALL M E, *et al.* Plant antitumor agents VI: the isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. J Am Chem Soc, 1971, 93: 2325-2327.
- [2] DELANEY T P, UKNES S, VERNOOIJ B, *et al.* A central role of salicylic acid in plant disease resistance[J]. Science, 1994, 266 (5188): 1247-1250.
- [3] GAFFNEY T, FRIEDRICH L, VERNOOIJ B, *et al.* Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance[J]. Science, 1993, 261 (5122): 754-756.
- [4] STROBEL G A, STIERLE A. Factors influencing the in vitro production of radiolabeled taxol by pacific yew *Taxus brevifolia*[J]. Plant Science, 1992, 84: 65-74.
- [5] FETT-NEO A G, MELASAN S J, NICHOLSON S A, *et al.* Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell culture of *Taxus cuspidata*[J]. Biotech Bioeng, 1994, 44(8): 967-971.
- [6] 陈永勤, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 前体物质和化学诱导子对云南红豆杉细胞生长和产生紫杉醇的影响[J]. 湖北大学学报 (CHEN Yong-qin, ZHU Wei-hua, WU Yun-qi, *et al.* Effect of precursors and chemical elicitors on the growth and taxol production in cell suspensions of *Taxus yunnanensis*[J]. Journal of Hubei University), 2000, 22 (1): 91-94.
- [7] 郭志刚, 冯莹, 刘瑞芝. 生长调节物质对紫杉醇和紫杉烷类化合物合成的调控作用[J]. 天然产物研究与开发 (GUO Zhi-gang, FENG Ying, LIU Rui-zhi. Control of taxol and taxanes biosynthesis by growth regulators[J]. Natural Product Research and Development), 2000, 12(3): 22-26.