

长春花生物碱高产细胞株的筛选

涂桂洪* 李宝健

(中山大学生物系)

目前已在长春花中分离出90多种生物碱^[1],并且已经证实其中的长春碱等四种二聚吲哚生物碱具有抗癌活性,有些已在临床上广泛应用^[2]。由于植物中抗癌生物碱含量极微而且因栽培环境和品种的不同而有相当大的差异^[3]。人们很早就企图通过细胞培养方法大规模工业生产这些生物碱,并且做了大量的研究工作。但目前仍存在着细胞株的稳定性、离体培养细胞生物碱合成能力等问题,要克服这些障碍还必须作出多方面的努力。

本研究在前人工作^[3-8]的基础上对长春花细胞株筛选、培养条件的选择等方面进行了探讨。

材料与 方法

一、实验材料

长春花(*Catharanthus roseus*)幼苗,栽培于广州食品厂内。

二、愈伤组织培养

培养基:MS大量元素与微量元素,每升培养基补加2,4-D 1 mg,6 BA 0.5 mg,水解酪蛋白 300 mg,蔗糖 40 g,琼脂 10 g, pH 6.0。分装于100 ml三角烧瓶中,每瓶约20—30 ml。用一层锡箔和一层牛皮纸封口,1 kg/cm²,120℃高压灭菌30分钟。

按常规操作把小块经表面消毒的叶片置于培养基表面,叶面向上,轻压一下使叶片充分接触培养基。24℃恒温培养30天左右。取小块愈伤组织转入新鲜的具有相同组份的培养基中进行继代培养。继代培养改用20×200 mm试管。

三、悬浮细胞培养

取小块愈伤组织置于装有50 ml液体培养基(与上同,略去1%琼脂)的250 ml三角瓶中,轻压成碎块。在转速为180 rpm的旋转式摇床上24℃培养10天左右,取出小部分(约10—15 ml)含有游离单细胞和小细胞团的培养液移入含有相同组份的新鲜培养基中进行继代培养。经3—4次继代培养即可获得分散均匀的细

胞悬浮培养物。

四、长春花总生物碱的测定

参照文献^[10,11],取新鲜样品约1 g,加入0.5 g NaCl与10 ml 95%乙醇,用细胞匀浆器研磨破碎,4000 rpm离心10分钟,取上清液于带塞比色管中蒸至近干,加入pH 4.6柠檬酸缓冲液5 ml, pH 4.6的0.04%溴甲酚绿溶液2 ml,氯仿10 ml。剧烈振摇3分钟,静置10分钟。分层后用吸管小心吸取5 ml下层氯仿液移入另一带塞比色管中,加入含有1%NaCl的0.2% NaOH溶液10 ml,振摇3分钟,静置10分钟,分层后取上层水相用721型分光光度计于波长620 nm处测定O.D值,并用下式计算样品生物碱含量:

$$\mu\text{g} = \frac{\text{O.D}}{0.00188} - 7.91$$

式中:0.00188为每μg生物碱的消光值,7.91为校正系数,均由实验结果求得。

五、细胞株平板分离技术

把8—10 ml MS固体培养基倒在平板上,冷却凝固后取4—5 ml细胞培养液均匀分布于培养基上。培养皿略为倾斜,24℃恒温培养,20天左右把长出的小细胞团分别移入试管培养基中培养,继续培养至30—40天取出分别测定细胞鲜重及生物碱含量。

实验结果

图2、4、5、8的数值为三个样本的平

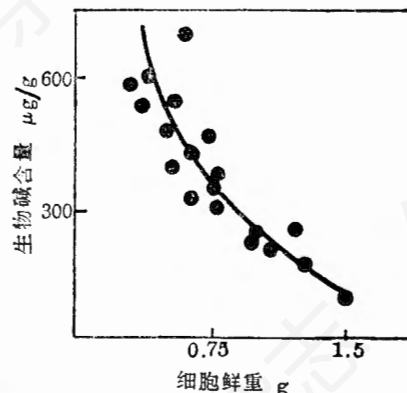


图1 细胞增殖与生物碱含量的关系

* 现在工作单位:暨南大学生物系。

均值,其余均为一个样本值之和。在预备试验时已注意到,细胞培养物到30天后,湿重和生物碱的量已经稳定,并可一直维持到40天或稍后一点时间,因此各组试验的培养时间基本控制在30-40天内。

一、高产细胞株 NS 20 的细胞增殖与生物碱的合成

用平板技术分离到54个细胞株。观察到各细胞株间不仅在外观形态上,而且在增殖速度和产物生成量方面都有很大差别。并且观察到生物碱含量随细胞增殖速度加快而下降(图1)。大部分细胞株生物碱含量偏低。其中的NS 20细胞株在适宜条件下培养34天,其生物碱含量可达820.51 $\mu\text{g/g}$ (见表1),折以干重计算为2.05%,超过分化植株(实验测定:幼茎0.48%,老茎0.53%,叶1.39%,三部分平均为0.79%)的1.6倍。

一般说来在所分离出的54个细胞株中,结构松散、黄白色的细胞株增长较快,生物碱含量偏低;结构紧密、黄褐色的细胞株增长较慢,但生物碱含量较高。

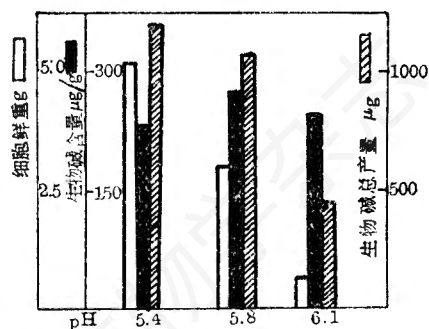


图2 pH值对生长与生物碱产量的影响

二、固体培养基成分对 NS 20 细胞株的细胞增殖及生物碱合成的影响

1. pH 值

图2结果表明,NS 20在pH 5.4中生长最好,生物碱总产量最高。随着pH升高,虽然生物碱的含量($\mu\text{g/g}$)并未降低,但由于细胞生长量降低以致生物碱总产量下降。pH高于6.2则严重地抑制生长。本实验未有证明,更低的pH值是否更有利于NS 20的生长与生物碱的

生成。

2. 2,4-D

图3结果表明,NS 20的生长与生物碱产量显著受2,4-D影响。当每升培养基中加入1.64 mg 2,4-D时,生长量增加1.4倍,但每克鲜重培养物的生物碱含量同时下降了71%。

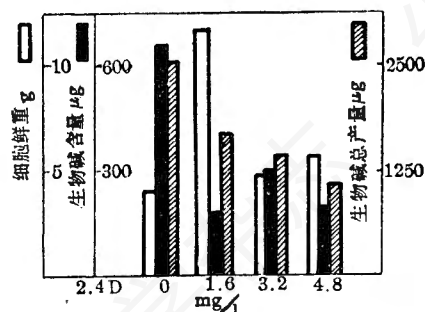


图3 2,4-D对生长与生物碱产量的影响

继续增加培养基中的2,4-D含量,则细胞增长与生物碱的合成均受抑制。

3. 6 BA

图4的结果表明,在不添加6 BA的对照

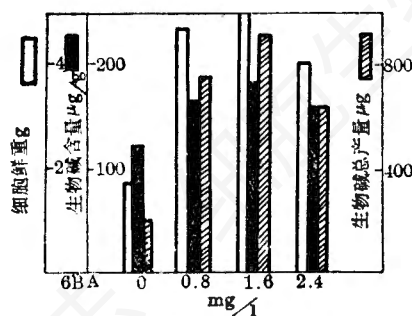


图4 6 BA对生长与生物碱产量的影响

组中细胞增长与生物碱生成明显受抑制,有两组完全不长。每升培养基中添加1.6 mg 6 BA可有效地促进细胞增长与生物碱生成,细胞鲜重比对照组增加2倍;生物碱总产量增加3.6倍。但继续增加6 BA的含量,生长与生物碱生成均受抑制。

4. NAA

图5的结果表明,每升培养基加入4-8 mg NAA时,NS 20生长受到强烈抑制,细胞鲜重减少了73.7%,而每克鲜重细胞的生物碱含量增加了2.4倍。但值得注意的是,三个组

合的生物碱总产量几乎没有差别。

5. 水解酪蛋白

图 6 的结果表明,每升培养基中加入 3.2 g 水解酪蛋白,可使生物碱总产量增加 46.5%,细胞鲜重略有增加。继续增加水解酪蛋白的含量对生长与生物碱生成有抑制作用。

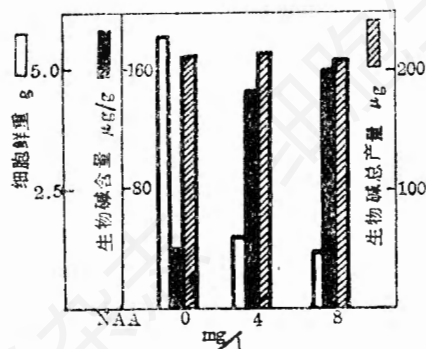


图 5 NAA 对生长与生物碱产量的影响

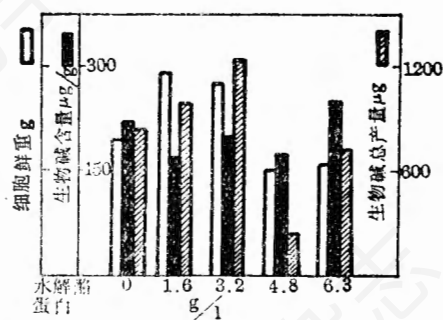


图 6 水解酪蛋白对生长与生物碱产量的影响

6. 人参乙醇抽提物

市售人参用 50% 乙醇反复抽提几次,抽提液合并,过滤,滤液浓缩至 24 Bx(折光浓度单位,100 克干人参可得浓缩液约 300 克左右),放于 2-4℃ 冰箱中 3-4 天。取不同量上清液加入到培养基中。图 7 的结果表明,每升培养基加入 24 Bx 人参乙醇抽提物 6.2 ml,对生长与生物碱生成均有促进作用,生物碱总产量比对照组增加 2.3 倍。

7. KH_2PO_4

图 8 的结果表明,补加一定量 KH_2PO_4 可促进细胞增长,但生物碱含量下降,对生物碱总产量影响不明显。每升培养基补加 3.1 g KH_2PO_4 时,细胞鲜重增加 2.2 倍。在以增加

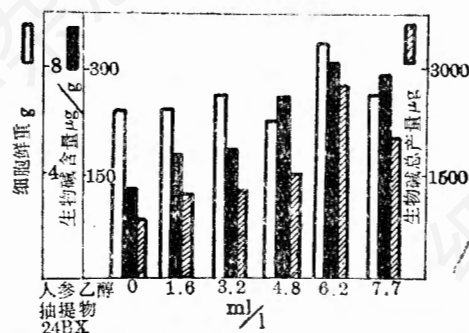


图 7 人参乙醇抽提物对生长与生物碱产量的影响

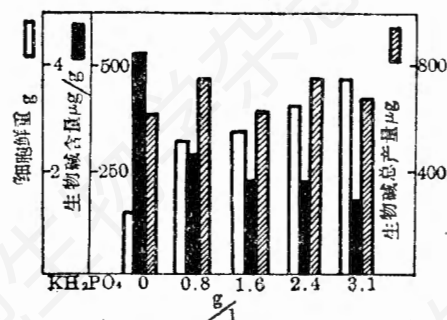


图 8 KH_2PO_4 对生长与生物碱产量的影响

细胞数量为目的时,适当补加一定量的 KH_2PO_4 是有益的。

综合上述各项研究结果,我们设计了对于长春花细胞培养可能更为适合的培养基:每升 MS 基本培养基补加蔗糖 40 g,水解酪蛋白 3.2 g, 6 BA 1.6 mg, 24 Bx 人参乙醇抽提物 6.2 ml, KH_2PO_4 3.1 g, pH 5.4。为叙述方便,以后把这种修改过的 MS 培养基简称为 mMS 培养基(modified MS medium)。在以继代培养或以增加细胞数量为目的的培养基中,加入 2,4-D 1 mg/l;在以产生生物碱为目的的培养基中省去 2,4-D,必要时加入少于 1 mg 的 NAA。

为了证实这个综合结果是否符合实际,把改进了的 mMS 培养基与原来的 MS 培养基作了对照试验,结果列于表 1。

结果表明,NS 20 在 mMS 培养基中的生物碱总产量比在通常的 MS 培养基中高出 2 倍多。除非特别说明,在以后的各种研究中均采用 mMS 培养基。

三、悬浮细胞培养中激素种类与种龄、种量对 NS 20 细胞株的细胞增殖及生物碱生成的影响

1. 几种激素对悬浮培养细胞增长与生物碱生成的影响, 结果列于表 2。

表中的结果说明: ① 2,4-D 的存在与否不影响 NS 20 悬浮培养细胞的生长速度。但有 2,4-D 时生物碱产量下降了 35.2%; ② NAA 强烈抑制 NS 20 的生长, 其细胞鲜重为对照组

(-2,4-D) 的 50%, 但生物碱总产量增加了 57.6%。值得注意的是, 在添加 NAA 的培养基中, 细胞释放到介质中的生物碱总量比对照组多 3.4 倍; ③ IAA 对细胞生长与生物碱生成没有明显影响。

2. 种龄对细胞增殖与生物碱产量的影响, 结果列于表 3。

实验表明, 所试种龄对细胞产量影响不大, 但对生物碱生成有显著影响。年老的接种物比

表 1 NS 20 在两种培养基上生长与生物碱产量的比较

mMS, - 2, 4-D			MS, + 2, 4-D 1 mg/l		
细胞鲜重 g	生物碱含量 μg/g	生物碱总量 μg	细胞鲜重 g	生物碱含量 μg/g	生物碱总量 μg
2.5	582.75	1456.9	1.7	317.00	538.9
4.8	582.75	2797.2	2.3	126.96	292.0
5.8	512.82	2974.4	2.7	221.00	596.7
1.8	820.51	1476.9	3.2	218.30	698.4
2.5	779.49	1948.7	1.6	215.00	344.0
1.5	783.22	1174.8	1.9	160.00	304.0
1.8	722.61	1300.7	3.4	175.00	595.0
2.2	652.68	1435.9	3.4	237.76	808.4
4.1	531.47	2179.0	2.9	170.41	492.2
0.7	805.86	564.1	3.0	155.82	467.5
Σ 27.7	624.86	17308.6	26.1	196.82	5137.7

表 2 几种激素对悬浮培养细胞增殖与生物碱产量的影响

mMS + 激素	细胞鲜重 g	*生物碱总产量 μg	生物碱产率 μg/g	培养液中生物碱总量 μg
- 2, 4-D	34.5	3960.6	114.8	753
2, 4-D(1 mg)	30.7	2566.0	83.6	1014
NAA(1 mg)	17.3	6239.3	360.7	3282
IAA(4 mg)	29.6	3233.7	109.2	387

* 生物碱总产量等于培养细胞与培养液中生物碱之和。

年青的接种物, 其生物碱产量几乎减少了一半。

3. 接种量对细胞增殖与生物碱生成的影响, 结果列于表 4。

实验表明, 所试接种量对细胞增长没有明显的影响, 但加大接种量可使生物碱增产 33.7%。

表 3 种龄对 NS 20 细胞增殖与生物碱产量的影响

*种龄 天	细胞鲜重 g	生物碱总产量 μg	生物碱产率 μg/g
10	30.7	2566	83.58
30	32.2	1466	45.53

* 种龄指的是用作接种物的培养时间。

讨 论

我们用平板技术分离到 54 个细胞株, 虽然它们的来源相同, 但它们各自不仅在形态上而且在生长速度和生物碱生成能力上都有很大的差别, 这与 Kurz^[4]以及 Zenk^[3]等人的结果是一致的。这些差异可能是由遗传上的或者生理上的原因引起的。我们通过细胞株分离筛选出

NS 20 高产细胞株及其在继代培养基中保持生物碱的生产能力的事实,再次表明在今后的细胞培养中细胞株筛选工作的重要性。

但有研究表明,次生产物的生成与植物的发育阶段有关并具有组织的特异性^[12]。到目前

表 4 种量对 NS 20 细胞增长与生物碱产量的影响

*种量 %	细胞鲜重 g	生物碱总产量 μg	生物碱产率 μg/g
16	29.0	2419.6	83.44
30	29.6	3233.7	109.25

* 种量指的是转移到新鲜培养基中接种物的重量与培养基重量之比,以%表示。

为止只在分化了的不具增殖能力的细胞中才发现有次生产物的积累^[13]。我们的研究也表明,在具有诱导细胞脱分化的植物生长素(2,4-D)的培养基中,可以获得最大的细胞产量,但生物碱含量急剧下降(图 3);相反在含有诱导细胞分化的激素(NAA)的培养基中,生物碱含量却可显著增加,但细胞增长速度明显下降(图 5,表 2)。我们曾把分离出来的低产细胞株(NS 4)与 NS 20 同时在含有 2,4-D 培养基上进行几次培养后,再转移到诱导生物碱合成的培养基上,发现其生物碱生成能力与 NS 20 几乎没有差别,只是在生长速度及其它方面不及 NS 20。这一结果表明,最初由同一外植体而来的各细胞株其生物碱含量高低并不完全真正反映它们在产物合成能力方面遗传本质上的差异,而可能只表明它们在分化程度上的不同。因此我们认为,在细胞株筛选时必须注意要在分化程度基本一致的情况下进行,这样才有可能选出真正具有优良种性的细胞株。

对于长春花细胞培养条件已有很多研究^[3,14]。这些研究和我们的研究都证明,影响培养细胞的增殖和次生产物——生物碱含量的因素是很复杂的。本研究注意到,对于细胞增殖和产物积累两个不同目的而言,培养条件(包括培养基,特别是其中的激素和含量)应当

是不同的。并且在大多数情况下,有利于细胞增殖的条件一般不利于产物的积累,或者相反(图 3、5、8,表 2)。考虑到植物培养细胞的这种特点,在进一步的研究中应把细胞增殖和产物积累两个阶段严格区分开来,在技术措施上作出不同的处理。我们的研究和 Zenk 等人^[8]的研究都证明,这样做对于解决细胞增殖与产物积累之间的矛盾,提高产物产量是显著有效的。

参 考 文 献

- [1] Taylor, W. I., et al.(eds); The Catharanthus alkaloids, New York, 1975, Marcel Dekker, Inc.
- [2] 林启寿。1977。中草药成分化学。科学出版社。pp 771。
- [3] Zenk, M.H., et al., 1977, Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application. W. Barz et al. (eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp 27—43.
- [4] Kurz, W. G. W., et al., 1980, *Phytochemistry*, 19:2583—2587.
- [5] Kutney, J. P. et al., 1980, *Phytochemistry*, 19:2589—2595.
- [6] Kutney, J. P., et al., 1980, *Heterocycles*, 14:756—758.
- [7] Kurz, W. G. W., et al., 1980, *Helv. Chim. Acta*, 63:1891—1896.
- [8] Kutney, J. P., et al., 1981, *Lloydia*, 44:536—540.
- [9] Stockigt, J., et al., 1980, *Planta medica*, 40: 22—30.
- [10] 中国医科院药物所。1972。中草药有效成分的研究(第一分册)。人民卫生出版社。pp316—317。
- [11] 金蓉鸾等。1981。南京药学院学报, 第一期, 第9页。
- [12] Westekemper, P., et al., 1980, *Planta medica*, 39:24—37.
- [13] Wiermann, R., 1981, Secondary plant products and cell and tissue differentiation. In: The Biochemistry of plants. Academic Press, New York, London, Vol. 7, pp 86—112.
- [14] Carew, D. P., et al., 1977, *Lloydia*, 44:326—336.