

- Shapiro (ed.), 1983. *Mobile Genetic Elements*, pp. 363—406. New York: Academic Press.
- [80] Bovcri, T., (ed.) *The Origin of Malignant Tumors*. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1929 (translated from the German volume of 1914).
- [81] Nusse, R., van Ooyen, A., Cox, D., Fung, Y. K. T., and Varmus, H. 1984, *Nature* 307: 131—136.
- [82] Iwata, K. K., Fryling, C. M., Knott, W. B., and Todaro, G. J. 1985, *Cancer Res.* 44: 2689—2694.
- [83] Fryling, C. M., Iwata, K. K., Johnson, P. A., Knott, W. B., and Todaro, G. J. 1985, *Cancer Res.* 45: 2695—2699.
- [84] Potter, H., Weir, L., and Leder, P. 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 7161—7165.
- [85] Stetten, G., Davidson, R. L., and Latt, S. A. 1977, *Exp. Cell Res.* 108: 447—452.
- [86] Noda, M., Selinger, Z., Scolnick, E. M., and Bassin, R. H. 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 5602—5606.
- [87] Der, C. J., and Stanbridge, E. J. 1981, *Cell* 26: 429—438.
- [88] Bicknell, D. C., Sutherland, D. R., Stanbridge, E. J., and Greaves, M. F. 1985, *Hybridoma* 4: 143—152.
- [89] Springer, G. F. T and Tn, 1984, *Science* 224: 1198—1206.

## 植物组织培养的次生代谢产物

### Ⅱ、生物碱(细胞筛选方法)\*

桥本 隆

#### 一、利用植物细胞培养筛选生物碱

生物碱主要存在于高等植物和某些微生物中，是一类含氮的碱性化合物，通常具有多环。这类化合物为自然界中所形成的最大一类的次生代谢产物之一，具有多种多样的化学结构。几乎与其它次生代谢产物一样，生物碱是特定器官在一定的发育时期合成的，形态上已脱分化的植物培养细胞可蓄积一系列生物碱与生物合成系列的部分生物碱。能这样生物合成生物碱的培养细胞的发现，可用于二个方面的研究。首先可用作生物碱生物合成系列的酶的研究实验系统，比用植物体有许多优点。长春花 (*Catharanthus roseus*) 系列，的各种细胞株中单萜类化合物吲哚生物碱的生物合成被从酶水平上加以阐明便是一个很好的例子。将来象类黄酮生物合成系列的酶的研究，对酶活性的机理可期望获得重要的见解。

其次，许多生物碱对人类和动物具有重要的生理活性，现在由于一些生物碱被作为药用，因此发展植物细胞培养来代替植物体生产这些有用物质，就成为医疗药品的新来源。以下将详述能用植物细胞培养系统生产生物碱方面的进展。

#### 二、高产细胞株的筛选

##### A. 筛选富含生物碱的植物体

若能在一个植物种内得到生物合成能力高的基因型的植物个体，则可预期从该个体诱导出愈伤组织，其产生生物碱的能力高于其它个体诱发的愈伤组织。例如烟草有四个合成烟碱能力不同的基因型(AABB、AA $bb$ 、aaBB、aabb)\*，由各不同基因型个体诱导发生各种愈伤组织，其植株中生物碱含量与愈伤组织中的含量成正比，即从高含量植株可得高含量的愈伤组织，从低含量植株则获得低含量的愈伤组织。在长春花细胞培养中来自高含量植物的液体培养系统，每1 ml培养基内吲哚生物碱的产量平均比来自低含量植株的系统高4—5倍。两个系统的细胞生长则并无差异。其它长春花的培养细胞和欧骆驼蓬(*Peganum harm-*

\* 本文摘译自山田康之编著(1984年)植物细胞培养マニユアル一书的59~69页

\* 生物碱含量低的烟草品种(LA Burley 21)，其生物碱总含量由二组纯合隐性基因(aabb)所决定。这一品种与生物碱含量正常的品种(Barley 21)(AABB)杂交，可得多种基因型的生物碱含量不同的植株。

*mala*)的培养细胞中,培养细胞和母体植物生物碱含量之间未观察到明确的相关。这些例子表明正确评价植物植株和培养细胞生物合成能力的相关性中出现的困难。但是从莨菪烷(*tropane*)的例子,也可以了解不同种植物能够合成同一化合物,则母体植物与其诱发愈伤组织之间生物碱的含量似乎并无相关。

#### B. 筛选生物碱产量高的培养细胞

在未分化状态的细胞具有生物合成生物碱能力的情况下,通常在细胞间或细胞块之间生物碱的含量均有差异。从含量不同细胞群中筛选出高含量的细胞进行培养,是达到稳定高产株为目标的妥当方针,现在报道几种筛选方法。

##### a. 依据视觉的筛选方法

以肉眼辨别培养细胞团中存在的各种表现型,容易分离出变异株(*variant*)。在筛选次生代谢产物时,若该产物具有颜色则筛选变异株就不成问题,遗憾的是多数生物碱无色或连弱色也不显示。但若生物碱具有荧光化合物时,在适当波长的紫外线照射下,用适当的滤光片于显微镜下观察,就可以识别生物碱高含量的细胞。丙种土耳其肉叶芸碱(*harman alkaloids*)和吲哚生物碱高产量的细胞株就可以用这种方法筛选。

对于无色同时无荧光的生物碱,可利用有色或荧光化合物作为筛选培养细胞的指标,以获得所需生物碱含量高的细胞。如在博落迥的培养细胞中将橙色[有色生物碱、血根碱(*Sanguinarine*)]和黄色(类胡萝卜素)作为指标化合物,筛选着色程度深的细胞则可获得无色生物碱、原鸦片碱(*protopine*)和异隐品碱(*alloycryptopine*)含量高的细胞株。关于生物碱以外的化合物也有可用作指标的报道。但是指标化合物和作为筛选目的无色化合物之间的生物化学及遗传的关系,还不完全明瞭。

##### b. 根据克隆(*clone*)分析的筛选方法

不适用上述筛选方法的大部分生物碱,必须将各个克隆生物碱的含量逐一分析定量。为此目的有几种快速生物碱定量方法的报道。细胞挤压法(*cell-squash method*)在大多数的细胞块样品中测定生物碱的精度差,但迅速。烟碱含量高的烟草细胞株与天仙子胺(*Hyoscyamine*)含量高的天仙子细胞株,可用这一筛选方法进行筛选(参阅实例1)。目前测定生物碱的效率佳、同时灵敏度高的分析方法系酶与放射免疫测定法。免疫法用于长春花培养细胞中吲哚生物碱的定量,已分离出含量非常高的细胞株。

[实例 I: 产生莨菪碱生物碱细胞株的筛选]

1. 将含有莨菪碱的三种茄科植物颠茄(*Atropa belladonna*)、曼陀罗(*Datura Stramonium*)与天仙子(*Hyoscyamus niger*)的灭菌叶片切块,植入添加 NAA  $5 \times 10^{-6} \sim 10^{-5} \text{mol/L}$ 、LBA  $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 、蔗糖 3%、琼脂 1% 的 LS 基本培养基上诱发愈伤组织,除已筛选出的高含量的植株外,诱发愈伤组织的亲本植物以用多个植株为佳。从一株叶片起源的愈伤组织作为 1 个系统。全部系统分别植入各个三角瓶内。

2. 愈伤组织块生长到直径 1.5 厘米左右时,用无菌镊子从各系统的愈伤组织块中取少量细胞(鲜重 60 毫克为宜),放在预先已有对半折痕的直径约 15 厘米的滤纸(东洋滤纸 № 2)的上半部分。每张滤纸置 20~30 个样品。

3. 将滤纸下半部分向上折回,用平板玻璃在滤纸上将样品强力压碎,在细胞完全破碎后,打开滤纸,清除细胞残渣。

4. 将生物碱显色剂德拉根道夫试剂(*Dragendorff's reagent*)喷在滤纸上有样品易沾染细胞液的地方。莨菪烷(*tropane*)的天仙子胺(*Hyosyamine*)与莨菪胺(*Scopolanine*)呈橙色,莨菪碱(托品, *tropine*)呈紫色。

5. 仅将天仙子的显示深橙色的几个系统的愈伤组织继代培养,保留压碎法测定时显色深的系统。依此反复筛选 4~5 次,筛选出—比较平均显深色反应的系统。这一细胞株蓄积的天仙子胺与莨菪碱用气相色谱—质谱仪进行鉴定。

##### 6. 耐受性株的利用。

对植物次生代谢的调节机理目前还非常缺乏理解,所以可提倡将生物化学变异作为目标来筛选高产株方法。利用氨基酸类似物耐性株进行生产是其中之一。

苯丙氨酸的类似物,对-氟苯丙氨酸(*p-DL-fluorophenylalanine, PEP*)的耐受性细胞株蓄积特异高含量的酚类化合物已有几个报道,对烟草 PEP 耐受性株的耐受性机理详细进行了研究,耐受性除由于细胞内吸收类似物减少之外,也是对 PEP 的分解、解毒化起着重要作用的苯丙氨酸解氨酶(*phenylalanine ammonia-lyase PAL*)活性增高的结果。这一耐性株中酚类化合物肉桂酰腐胺(*cinnamoyl putrescines*)的生物合成途径中的其它酶活性也提高了。已知高等植物及其培养细胞的初次代谢与次生代谢相联系的酶,能调节最后次生代谢产物生物合成的速率,所以某一次生代

谢系统经常存在其他酶的活性时以及生物合成系统有关的酶同时被诱导的情况下, 次生代谢的最初酶活性可能增高而促进目的化合物的产生。

以上两点联系起来, 就可作为高产株的初步筛选方法加以利用, 即由于次生代谢生物合成途径的初始酶的分解、解毒作用, 可对阻碍生长的物质(氨基酸类似物等)进行耐受株的筛选。基于这一筛选方法已获得肉桂酰腐胺的高生产株。筛选其它生物碱的例子有用长春花的培养细胞, 对吲哚系列生物碱的生物合成途径中起始酶、色氨酸脱羧酶(tryptophan decarboxylase)的底物, 来筛选色氨酸类似物的耐性株。4-甲基色氨酸耐性株均具有高活性的色氨酸脱羧酶, 在用8%蔗糖诱导产生生物碱的野生型作为亲本进行筛选时, 耐性株内有二株在非诱导条件下也产生了生物碱, 此时阿吗碱(N,N-二甲基色胺, ajmalicine)的产量比野生株在诱导条件下还多。此外, 耐性株比野生株蓄积L-色氨酸的量多2—6倍, 有报道说耐性株的氨基酸合成酶(Anthranilate synthetase)与野生株依赖L-色氨酸的反馈受到同样程度的阻碍。

氨基酸类似物耐受性的获得也存在其他机理。实际上植物培养细胞所筛选出的类似物耐受株, 差不多均获得对应氨基酸的大量产生, 因而获得了耐受性。高等植物的苯丙烷生物碱(phenylpropanoid)的蓄积, 是由于苯丙氨酸的供给而调节了PAL的活性, 微生物中虽没有作为氨基酸的前体物质, 但也已知道有作为次生代谢系统酶的诱导物质而起作用的事实。在植物培养细胞中也可期待同样的事例, 由于筛选耐氨基酸类似物的前体和某一氨基酸的高产株, 说不定可得到目标生物碱的高含量株。但是, 耐5-甲基色氨酸的长春花培养细胞株, 虽然色氨酸高产, 但在全部细胞中尚无这些吲哚生物碱和色氨(tryptamine)含量增加的结论。

采用这样的氨基酸类似物的筛选方法, 迄今为止尚未获得生物碱高含量的细胞株, 也许能期待从耐受细胞株分化的植物体内, 促进生物碱的生物合成。Collin等(1978)报道用诱变剂乙基甲基磺酸酯(EMS)处理烟草单倍体细胞, 筛选出耐烟酸的细胞株, 用再分化的二倍体植株诱发的愈伤组织, 比亲本植株的烟碱含量高4~5倍。

从微生物中能生物合成有毒的抗菌素, 且对其具有耐受性的个体中, 筛选出缺少抗菌素分解酶的二个突变体, 成功地大幅度增加了目标抗菌素的生产。植物培养的细胞也有同样的情况。Constable等(1978)报道

对具有阻碍细胞分裂作用的生物碱、长春灭瘟碱(Vinblastin)耐受株, 诱发愈伤组织后进行筛选, 继代培养后获得长春灭瘟碱生产能力并不减低的细胞株, 这一方案可以提倡。但此时的物质生产能力减低, 除对目标生物碱耐性减少以外, 其他主要因素可能起很大的作用。与微生物不同, 植物细胞去掉一部分酶, 也不向细胞外分泌酶。在微生物中广泛应用的方法照搬到植物中来, 提倡一下子立即应用于培养细胞, 会发生很多问题。

### 三. 筛选株的稳定性与再分化

为进行生物碱生物合成系统的基础研究, 以及进行大量培养商品规模的生产有用的生物碱, 所筛选出的细胞株必需稳定, 即细胞株在非筛选条件下培养, 生物碱的产量也不降低。迄今为止, 各种筛选方法所获得的高含量株, 并不全部都具有稳定的生产性(表1)。遗憾的是目前为获得稳定细胞株所采用的方法, 仅用单细胞或小细胞块作为筛选单位, 来重复筛选(参考第一节)。其中也有未能获得稳定细胞株的情况。例如Zenk研究室筛选含有高生物碱的长春花培养细胞株, 尽管所有的亲本植物有各种各样的变异, 但培养细胞株全都不稳定。这种不稳定是由于筛选的生物碱高产克隆, 不论什么时候都有回复原状的缺点, 这与多数培养细胞在诱导愈伤组织后, 物质生产能力的消失有所不同。

从高含量株再分化的植物, 由于所筛选性状的遗传的变异, 不仅要具有有关的知识。与变异的保存和有用植物的育种也有联系。从高含量株获得分化组织的实际事例, 由于几种理由而为数甚少(表2)。所有用未分化组织筛选出的次生代谢产物的高产性, 在分化组织中并未发现, 今后期望从许多高含量细胞株能再分化出再生植株。

[实例2: 用日本黄连培养细胞所筛选出小藜碱高产株及其稳定性]

1. 日本黄连(*Coptis Japonica*)悬浮培养细胞中各种大小的细胞块混合在一起, 因此用孔径500 $\mu\text{m}$ 与250 $\mu\text{m}$ 的尼龙网连续过滤, 收集在64 $\mu\text{m}$ 筛网上滤出的细胞块, 获得由1~30个细胞构成的小细胞块, 用这样的小细胞块悬浮于液体培养基中, 加入加热溶解后冷却到50°~60°C的琼脂培养基中, 不断地搅拌, 脂琼的最终浓度为0.7—0.8%, 细胞密度调整到约为 $10^4/\text{ml}$ (约1000个细胞块/ml)。在琼脂形成固体前, 在每一直径9厘米培养皿内, 分别注入15—20 ml。培养基用LS基本培养基, 加入 $10^{-5}\text{mol/L}$  NAA、 $10^{-3}$

表 1 生物碱高含量细胞株的事例

植物种	生物碱	含量	筛选方法*	稳定性	诱变剂处理
小檗属 <i>Berberis stolonifera</i>	药根碱 (Jatrorrhizine)	7% DW	C.A.(?)	稳定	无
长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	阿吗碱 (ajmalicine)	368 mg/每升 培养基	V.I.(荧光)	不明	无
	蛇根碱 (serpentine)	142 mg/每升 培养基	V.I.(荧光)	不明	无
	阿吗碱 + 蛇根碱	2.0 % DW	C.A.(RIA)	不明	γ射线照射 (2 KR)
	阿吗碱 + 蛇根碱	1.3 % DW	C.A.(RIA)	不稳定	无
	Strictosidine	0.15 % DW	C.A	稳定	无
	长春花碱 (Catharanthin)	0.005% DW	C.A.	稳定	无
	Strictosidine lactam	0.224% DW			
	阿吗碱(ajmalicine) 洛柯因(lochnericine)	0.04% DW 0.026% DW	C.A.	稳定	无
阿吗碱 N,N-二甲基色胺 (N,N-dimethyltry- ptamin)	0.03% DW 0.15% DW	C.A.	稳定	无	
阿吗碱 育亨宾(yohimbine) 长春花朵碱(vindolinine)	0.1% DW 0.06% DW 0.08% DW	C.A.	稳定	无	
日本黄连 <i>Coptis japonica</i>	小檗碱(黄连素) (berberine)	8.2% DW	C.A.	稳定	无
	药根碱 (jatrorrhizine)	7.2% DW	C.A.	不明	秋水仙素 0.05%
天仙子 <i>Hyoscyamus niger</i>	天仙子胺 (hyoscyamine)	0.04 —0.06% DW	C.A. (C.S.M.)	相当稳定	无
博落回 <i>Macleaya microcarpa</i>	原鸦片碱(protopine) + 异隐品碱(allocryptopine)	1% DW	V.I.用血根碱 作为指示因子	不明	无
	原鸦片碱 + 异隐品碱	0.35% DW	V.I.用类胡萝卜素 作为指示因子	不明	无
黄花烟草 <i>Nicotiana rustica</i>	烟碱(nicotine)	0.29% DW	C.A.	相当稳定	无
	烟碱	1.0—3.4% DW	C.A.(C.S.M.)	相当稳定	无
	烟碱	3.3—4.3% DW	C.A.(C.S.M)	相当稳定	紫外线照射
	烟碱	2.14% DW	C.A.	稳定	无
欧骆驼蓬 <i>Peganum harmala</i>	丙种土耳其肉叶芸碱 (harman alkaloids)	0.1% DW	V.I.(荧光)	不稳定	无
	5-羟色胺(serotonine)	0.1% DW	V.I.(荧光)		
蛇根木 <i>Rauwolfia Serpentine</i>	吲哚生物碱 (indole alkaloids)	0.48% DW	C.A.(?)	稳定	0.5 μu 芥子氮 30分钟

\* . C.A.克隆分析, V.I.目测检验, RIA.放射性免疫测定, C.S.M. 细胞压碎法,

表 2 高含量细胞株的再分化事例(也含有生物碱以外的化合物)

植物种	化合物	再分化	高含量特性的表达	
			分化组织中	从分化组织再诱导产生的愈伤组织中
曼陀罗属 ( <i>Datura innoxia</i> )	莨菪碱	植株	无	不明
胡萝卜 ( <i>Daucus carota</i> )	类胡萝卜素	植株	无	不明
天仙子 ( <i>Hyoscyamus niger</i> )	天仙子胺	植物根	无	无
烟草 ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	烟碱	植株	无	有

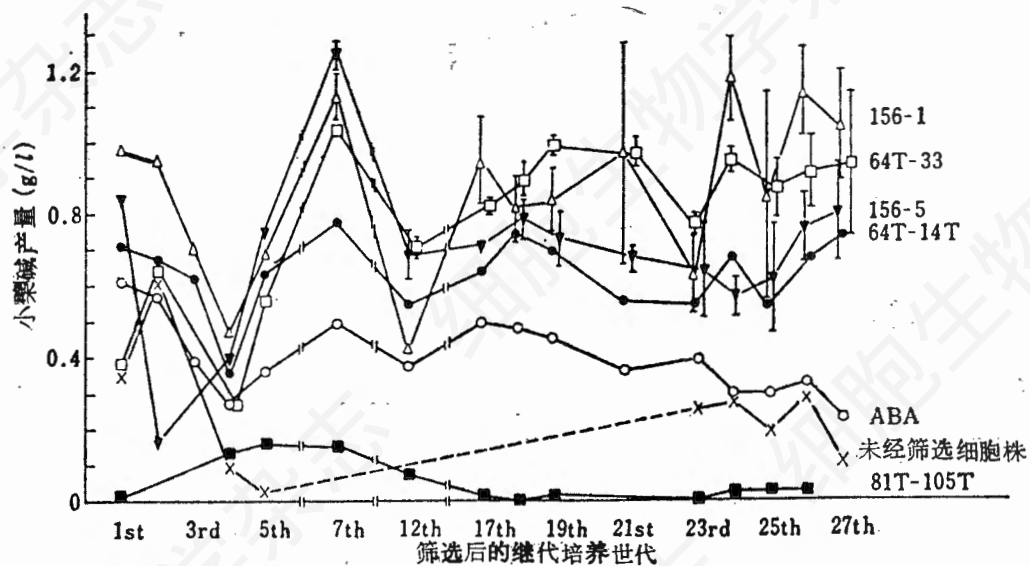


图 1 具有不同小藜碱产生能力的黄连细胞株的稳定性

BA及3%蔗糖,筛选时仅一部分培养基添加小藜碱的前体酪氨酸(0.1%, W/V),以期望对筛选高含量株的效果有所影响。

2. 1—2个月后直径1—2厘米的小细胞团显出均一的黄色,检取未分化出根的小细胞团,植入斜面培养及连续的液体培养。将液体培养的第一代和第二代各个克隆的小藜碱产量用高速液相色谱法定量。在各个克隆中辨认出小藜碱产量高者,并且各个克隆的第一代和第二代产量比较一致。

3. 为进一步获得稳定的高产株,将液体培养产生的第三代用上述克隆培养高产株的方法反复筛选,获得几个稳定性的小藜碱产生能力不同的细胞株(图1)。

#### 4. 生物碱生产的讨论

##### A. 生产培养基的研讨

生产用的培养基与细胞的生长和继代培养用的培养基有明显的区别(参见紫草宁的生产)。这里仅就多数研究者采用的生产单萜类化合物吲哚生物碱所用的培养基进行考察,来考虑其他生物碱一般的生产培养基。培养基中所有成份与培养条件(光照、通气等)对生物碱生产的影响可能有所区别,其中特别是植物激素、糖、磷酸仅有一般的影响,认为生产培养基比继代培养基所用糖浓度(2—3%)要高,磷酸浓度比MS培养基(1.25 mmol/L)为低,较为适宜的报道较多。详细情况请参阅 Dougall, D.K(1979)一文。

此外,在获得稳定的细胞株以前,应对所用的生

产培养基进行详细考察,如结果重复性不好,也不是理想的培养基。

#### B. 添加化合物提高生物碱的产量

a. 前体化合物,在培养基中添加前体化合物,有可能促进目标生物碱的产生,如转化效率高时可采用固定化的细胞。有效的前体化合物(氨基酸等),如价格比较低廉,可考虑干脆将其作为生产培养基的组成之一。添加前体化合物的效果与浓度的关系自不待言,同时也要注意效果因添加时期(培养初期、培养期中途)以及所用细胞株的差异而有所不同。

b. 其他化合物。阻碍次生代谢途径的特定酶反应,发现可诱导特定的次生代谢途径的化合物,不仅是为了次生代谢的调节、发现的基础性研究,而且也可用以控制培养细胞产生目标化合物的生物合成系统,或与将来开发筛选高产株的新的方法有关。PAL的抑制剂L-2-羟基氨基酸-β-苯丙酸,5-烯醇丙酮基莽草酸-3-磷酸合成酶的抑制剂镇草宁(glyphosate, N-磷酸甲基甘氨酸)\*\*\*,抑制植物甾醇生物合成各个阶段的一系列的抗菌素,抑制生物碱合成的几种除草剂和诱导生物碱合成的某种二级氨基酸等都为人们所熟知。其中有些化合物被认为对培养细胞可显示同样的作用。但遗憾的是有关生物碱生物合成系列的令人

感兴趣的化合物,尚未见报道。今后应重视这一方面的研究。

c. 分化与生物碱的合成。将未分化状态的植物细胞进行培养,以诱导目标化合物生物合成系统的分化,是用植物培养细胞进行物质生产的根本目的,但按化合物或植物种进行这样的生物化学的分化诱导的知识和技术,目前还不具备。在这种情况下,若某一植物组织或器官的分化是化合物的生物合成所必需的\*\*,可试行生长迅速的分化组织的大量培养。

用三升容积的大瓶进行茎、叶分化组织的大量培养,现已获得成功,根培养的大量培养则尚无报道,必需开发与未分化细胞培养有所不同的大瓶培养。(周荣仁译,周郑校)。

\*\* 仅一部分生物合成途径与分化有关。例如天仙子培养细胞中莨菪碱生物碱的天仙子胺的生物合成途径已被发现,获得天仙子胺含量较亲本植物为高的细胞株。植物体内主要的生物碱之一从天仙子胺向莨菪碱的氧化反应,虽然讨论了未分化细胞的筛选和培养条件,尚未有十分成功的发现。为了发现这一反应必须考虑根组织的分化。

\*\*\* 译者注:glyphosate系一种广谱性除草剂。中译名镇草宁或草甘膦。

## 造血干细胞发生学研究

### Ⅲ. 人胚脾和胸腺造血

施斐曼 刘永

(军事医学科学院基础医学研究所)

前已报道人胚肝、骨髓造血的研究资料<sup>[1,2]</sup>,对于该两组织造血发育的规律,实质细胞和间质细胞的相互联系,造血干细胞的可能来源等问题提出了一些设想和实验依据。而脾脏和胸腺在胚胎时期的一定阶段亦是造血功能的执行者,在这方面文献中涉及甚少,尤其是有关电子显微镜的资料更为缺乏。本文对此两种胚胎组织进行光镜和透射电镜的观察,以研究其造血发育过程及规律,各型造血实质和

间质细胞超微结构的特点。

#### 材料与 方法

我们收集人工引产和剖腹取胎的人胚的脾脏标本,从妊娠9周至足月(脑水肿胎儿穿颅术后)共12例,胸腺标本从妊娠13周至足月计8例。胎龄分布见下表。

胎龄计算方法:根据临床提供的妊娠妇女末次月经日期核算胎龄,对月经周期不规律或胎胚大小与胎龄不符的例子剔除不用。