

红豆杉离体细胞四倍体的诱导

李丽琴, 付春华, 王 圣, 栗茂腾, 余龙江*

(华中科技大学 生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要: 细胞大规模培养被认为是目前生产紫杉醇最有希望的替代途径之一, 获得更高产的细胞系, 可降低细胞大规模培养生产紫杉醇的成本, 加速其产业化进程。药用植物多倍体与二倍体相比具有根、茎、叶和花果的巨型性, 抗逆性强, 次生代谢产物含量提高等特性。本研究通过同步化培养和秋水仙素诱导处理, 成功建立了红豆杉四倍体细胞系并且经过 7 个周期的继代证明了该细胞系的稳定性。结果显示, 用浓度为 750 mg/L 的秋水仙素处理 3 d 可以得到稳定传代的四倍体细胞系, 其四倍体细胞比例稳定在 62.5%。进一步对其次生代谢产物紫杉醇的检测显示该四倍体细胞比对照二倍体细胞具有更高的合成紫杉醇的能力。

关键词: 红豆杉细胞; 秋水仙素; 四倍体; 染色体; 紫杉醇

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)01-0121-05

Tetraploid induction of *in vitro* *Taxus chinensis* cell

LI Li-Qin, FU Chun-Hua, WANG Sheng,

LI Mao-Teng, YU Long-Jiang*

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

Abstract: Large-scale culture of *Taxus* cell is considered to be one of the most promising alternative methods to produce taxol. Heavy producing cell line can cut down the cost of taxol production and promote the process of industrialization. Compared with diploid, multiploid medicinal plant has the characteristics of giantism, which express in roots, stems, leaves, flowers and fruits, strong antireversion force and high contents of secondary metabolites. This research established tetraploid *T. chinensis* cell line by the methods of synchronization culture and inducing treatment of colchicine. Through 7 cycles subcultures, stability was demonstrated. Results showed that treating the *T. chinensis* cells with 750 mg/L colchicine could get stable tetraploid cell line whose tetraploid cell rate maintained in 62.5%. Further to detect taxol, its secondary metabolite, tetraploid cell line had stronger ability to produce taxol compared with diploid cell line.

Key words: *Taxus chinensis* cell; colchicine; tetraploid; chromosome; taxol

紫杉醇(*Taxol*)为红豆杉属(*Taxus*)植物中分离出的一种二萜类生物碱化合物, 具特殊的抗癌药效, 以其独特的抗癌机制、优良的疗效以及尖锐的供需矛盾备受世人关注(De Furia, 1997; Augusto 等, 2005; Michael 等, 2005)。紫杉醇主要靠化学半合成法获得, 但半合成前体仍需依赖有限的红豆杉资源, 因此, 细胞大规模培养被认为是目前生产紫杉醇最有希望的替代途径之一(Oksman 等, 2004)。但目前细胞大规模培养尚未用于紫杉醇的生产, 因为细胞大规模培养生产紫杉醇的成本仍高于天然提取, 这也是目前世

界相关领域研究共同面临的问题(Oksman 等, 2004; Vanisree 等, 2004)。因此, 要提高红豆杉细胞大规模培养生产紫杉醇的市场竞争力, 最终实现产业化生产, 必须获得更高产的细胞系。

染色体是基因的载体, 由于染色体数目的增加, 基因重新组合并通过酶的作用会影响到一系列蛋白质的合成及其各种性状, 多倍体与二倍体相比具有根、茎、叶和花果的巨型性, 抗逆性强等特性(张爱民等, 2005)。药用植物染色体倍性的变化往往会导致次生代谢产物含量的变化, 这就有可能获得有效成分

收稿日期: 2006-04-10 修回日期: 2006-12-23

基金项目: 中国博士后基金(2003034490)[Supported by Science Foundation for Postdoctor of China(2003034490)]

作者简介: 李丽琴(1979-), 女, 湖北咸宁人, 硕士研究生, 研究方向为植物细胞培养。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: yulongjiang@hust.edu.cn)

含量较高的药用植物新类型。我国于20世纪70年代开始将这一技术用于药用植物的品种改良,在实践中发现,大多数多倍体中次生代谢产物的含量都有所增加。高山林等(1996)在研究丹参多倍体性状和药树质量的关系时报道,丛根类型的丹参多倍体品性不仅产量增加,而且丹参酮的平均含量远高于对照组。刘选明等(1995)对获得的同源四倍体黄花菜进行分析后认为,四倍体的蛋白质含量、含糖总量等比相应的二倍体大幅度提高。王建军等(1998)报道,四倍体莼菜氨基酸含量及叶绿素含量均比二倍体高。相对于诱发多倍体植株而言,离体组织细胞染色体加倍由于具有容易控制实验条件和重复实验结果,提高工作效率,减少嵌合体等优势而逐渐受到重视(李贤等,1998;郭启高等,2000)。因此本研究拟利用秋水仙素对中国红豆杉悬浮细胞进行诱导培养,希望能得到高产紫杉醇的红豆杉四倍体细胞系,为大规模细胞培养生产紫杉醇提供合适的材料。

1 材料和方法

1.1 供试细胞株及培养条件

取华中科技大学生命科学学院资源生物与生物技术实验室继代培养的,分散性良好,同一来源的中国红豆杉(*Taxus chinensis*)悬浮培养细胞,培养基为改良MS培养基。

1.2 同步化处理及细胞有丝分裂指数的测定

同步化的处理采用梅兴国等(2001)的方法,即固体培养7d后在4℃处理24h,再转入液体培养基恢复培养24h时。同步化的水平用细胞有丝分裂指数进行评价,在同一时期细胞有丝分裂指数越高可以认为细胞同步化水平越高(陈超等,2005)。细胞有丝分裂指数的测定:取红豆杉细胞用碱性品红染色,压片,于显微镜下观察细胞时相,每个样本计数1000个以上细胞,分别计数分裂期和非分裂期细胞,最后分别计算分裂指数。细胞分裂指数(%) = 分裂期细胞数/全部细胞数 × 100%。

1.3 秋水仙素处理

采用三种秋水仙素浓度(终浓度):500、750、1000 mg/L。具体步骤:红豆杉细胞经同步化处理,在正常条件下恢复培养24h,然后分别用含有三种不同浓度的秋水仙素的液体培养基悬浮培养,2~3d后用新鲜液体培养基清洗细胞3次,重新接种到新鲜液体培养基中继续悬浮培养。每隔20d继代1次。

1.4 细胞染色体倍性的鉴定

用0.004 mol/L 8-羟基喹啉室温下预处理3h,0.0075 mol/L KCl前低渗处理30min,盐酸室温下酸解15min,卡诺氏固定液(乙醇:冰醋酸=3:1)固定材料3~5h,最后用碱性品红染色5min,压片,镜检,拍照。随机观察40个分裂相细胞。加倍率 = 四倍体细胞数/40个分裂相细胞数。

1.5 细胞生长率的测定

以继代培养7次后的细胞为实验材料,培养20d为一周期,每3d取样一次称量细胞干重(mDW)。细胞干重(mDW)即新鲜细胞放入40℃烘箱里烘至恒重的数值,每个数值均为3个平行样的平均值。

1.6 细胞死亡率的测定

以液体悬浮培养20d为一周期,每4d取样一次分析,参见梅兴国等(2001)进行。取细胞悬浮液在砂芯漏斗过滤。1g细胞在0.05% Evans Blue浸泡10min。用蒸馏水洗至无色,在4mL 1% SDS(50%甲醇配成)50℃保温30min,加入2mL蒸馏水稀释。振荡后在8000 r/min离心3min。取上清液,以600nm处的吸光值为细胞死亡率。Evans Blue对衰老或死亡的细胞具有很好的染色效果,而对健康或活力高的细胞基本不染色,因此,常用于鉴定细胞的死亡程度。

1.7 培养细胞中紫杉醇含量的测定

使用HPLC测定细胞中紫杉醇含量,具体方法参见余龙江等(2000)。将鲜细胞冷冻干燥至恒重,称取100mg干细胞,用3mL CH₃OH-CH₂Cl₂混合液(1:1)浸泡,超声处理10min,取出浸提液,向其中加入CH₂Cl₂ 2.0mL、水8.0mL、(NH₄)₂SO₄饱和溶液1.0mL,振荡萃取,收集CH₂Cl₂层液体,40℃下真空干燥,最后用1.0mL CH₃OH重新溶解蒸干残留物后进行HPLC检测。HPLC仪为法国Gilson公司全自动高效液相色谱仪,色谱柱为C-18反相柱,柱温为25℃,流动相为甲醇:水=7:3,流速为1.0mL/min,紫杉醇标准品由美国NCI提供。第一次测定是在秋水仙素处理后恢复培养的第24h。其它均在继代培养的第20天取样分析。

2 结果与分析

2.1 低温处理对细胞同步化和细胞死亡的影响

在预实验中,红豆杉细胞没有经过同步化处理而直接用秋水仙素诱导,结果获得四倍体的比例并

不理想,即使用终浓度为 1 000 mg/L 的秋水仙素处理 5 d,得到的四倍体比例也已达 60%。由于秋水仙素处理的浓度过高,时间过长,对细胞的毒害作用较大而导致细胞死亡率增加,细胞生长量明显减少。秋水仙素的作用机理是通过与微管蛋白结合,抑制微管蛋白聚集成纺锤丝,从而干扰细胞的正常有丝分裂,因此只对处于分裂期的细胞有加倍的作用。如果细胞的分裂指数不高则只有通过增加秋水仙素的浓度和作用时间来达到提高加倍率的目的,但同时又会导致秋水仙素对细胞的毒害作用增强,不利于细胞的恢复培养。因此本实验考虑用同步化的方法来使细胞达到同步分裂,提高细胞的分裂指数,从而提高红豆杉细胞的加倍率。

细胞同步化主要有化学方法(如磷酸盐饥饿法和羟基脲阻滞法)和物理方法(如低温和辐射等)。据梅兴国等(2001)、周爱文等(2001)、刘华等(2000)报道,低温诱导红豆杉细胞不仅可达到较高的细胞分裂指数而且对细胞的毒害作用最小。本实验中,红豆杉细胞经低温处理使细胞分裂指数提高到 8.5%(对照组 5.2%),同步化水平增高。恢复培养 24 h 后细胞死亡程度与对照相比没有明显区别。

2.2 秋水仙素处理浓度和处理时间对加倍效果的影响

从表 1 看出,随着秋水仙素的浓度在一定范围内增高和处理时间的延长,加倍率逐渐升高。但是秋水仙素浓度在 1 000 mg/L 时,随着处理时间的延长,加倍率反而降低。因此,在低浓度短时间的处理下,由于对细胞的伤害并不严重,所以加倍率逐渐升高,而在高浓度长时间的秋水仙素处理下,细胞受害严重,从而导致了加倍率的降低。

1、2 号处理方式得到的四倍体细胞比例小于 50%,在以后的继代过程中,占多数比例的二倍体细胞可能会在生长中占优势从而抑制四倍体细胞的生长,因此并不是得到可以稳定遗传的四倍体细胞系的理想材料。由 3、4、5、6 号 4 种处理方式得到的细胞的四倍体比例均大于 50%,本实验选择这 4 种方式处理的细胞进行继代培养,以检验通过这 4 种细胞在继代过程中染色体的稳定性,最终获得四倍体比例长期稳定的细胞系。

以后的 7 次继代培养过程中,在每个周期的第 5 天取样进行染色体倍性的鉴定(根据实验经验,液体悬浮培养第 5~7 天的细胞获得中期有丝分裂相的几率最高)。3 号处理方式的细胞的四倍体细胞比例逐渐减少至 50% 以下。图 1 是 4、5、6 号处理

方式的细胞在 7 次继代过程中四倍体比例的变化,四倍体的比例最后都稳定在 50% 以上。图 2 为红豆杉细胞二倍体与四倍体的染色体数目的比较。

表 1 不同浓度秋水仙素和处理时间下红豆杉细胞加倍率
Table 1 Ploidy effect of different density and inducing time of colchicine on *Taxus chinensis* cell

编号 No.	秋水仙素浓度 Concentration (mg/L)	处理时间 Time (d)	加倍率 Double rate (%)
1	500	2	30.0±2.3
2	500	3	40.0±3.4
3	750	2	54.0±3.9
4	750	3	70.0±5.2
5	1000	2	77.5±5.1
6	1000	3	70.0±5.3

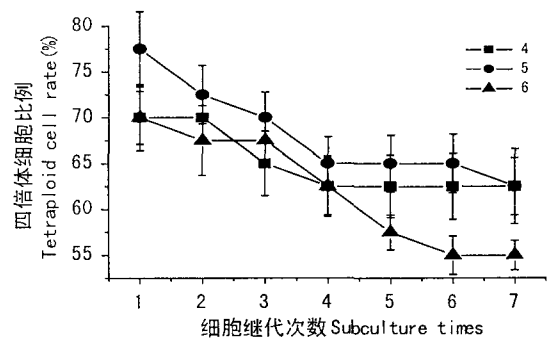


图 1 继代过程 3 种处理方式的细胞四倍体比例变化
Fig. 1 Variation of tetraploid cell rate inducing by 3 kinds of different methods during subcultures

2.3 秋水仙素处理对细胞死亡率和细胞生长量的影响

由图 3、4 可知,用第 5、6 种方式处理的细胞其生长量与对照相比明显下降,细胞死亡率升高,且观察细胞和培养基颜色变黄,粘度增大;用第 4 种方式处理的细胞其生长量和死亡率与对照无明显差别。说明秋水仙素高浓度长时间的处理会导致细胞代谢机能紊乱从而迅速导致细胞大量死亡,而适量浓度的秋水仙素处理一定时间对细胞的生长不会产生太大的影响,因此第 4 种处理方式,即 750 mg/L 处理 3 d,是最适宜的得到红豆杉细胞四倍体的方法。

2.4 秋水仙素处理对细胞中紫杉醇含量的影响

由图 5 可知,秋水仙素处理 24 h 后,用 3 种方式处理的细胞的紫杉醇含量与对照组相比均有显著的提高,以第 6 种处理方式的含量最高。在以后的继代过程中,3 种处理方式的细胞的紫杉醇含量均逐渐减少,第 6 种处理方式的细胞的紫杉醇含量下降得最快,最终稳定在 0.18 mg/g。第 4 种处理方式的细胞虽然在一开始产生的紫杉醇没有其他两种



图 2 红豆杉细胞二倍体与四倍体染色体数目比较
Fig. 2 Comparison of chromosome number between diploid and tetraploid of *Taxus chinensis* cell
a. 二倍体 $2n=2x=24$ ($\times 400$); b. 四倍体 $2n=4x=48$ ($\times 400$).

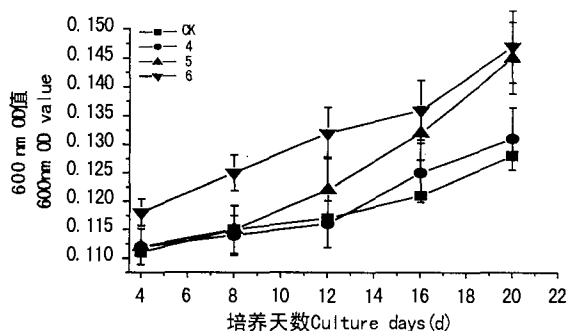


图 3 秋水仙素处理后的细胞死亡率
Fig. 3 Cell death rate after inducing by colchicine

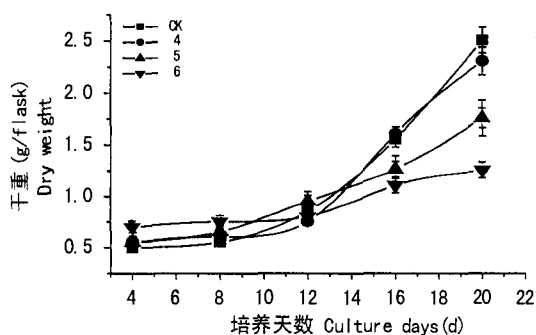


图 4 秋水仙素处理后的细胞生长曲线
Fig. 4 Cell growth curve after inducing by colchicine

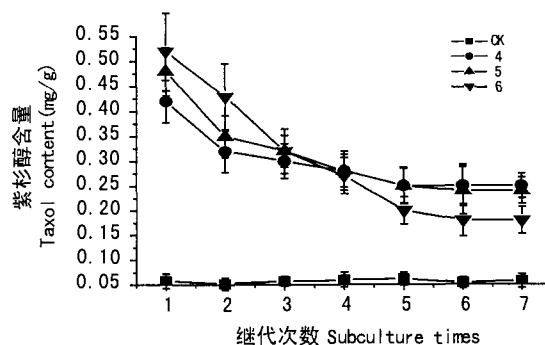


图 5 继代过程中紫杉醇含量的变化
Fig. 5 Variation of taxol during the process of subcultures

倍体红豆杉细胞系的方法。

3 讨论

利用秋水仙素进行染色体加倍具经济、方便、诱变作用专一性强等特点,在多种植物上曾获得成功,并育成了一些优良品种。对离体培养的细胞或组织进行诱变处理,产生的变异效果更加明显。本实验通过对离体培养的中国红豆杉细胞系进行同步化和秋水仙素处理,得到了四倍体细胞数稳定在 62.5% 的红豆杉四倍体细胞系。不同浓度及时间的秋水仙素处理对红豆杉细胞的染色体倍性有显著影响,随浓度或时间的增加,获得四倍体细胞系的比例也增大。在统计检验中,二者虽不存在显著的交互效应,但试验结果大体表现为随处理时间和浓度的同步递增。

在秋水仙素处理后 24 h,红豆杉细胞中紫杉醇的产量提高了近 10 倍。引起这种现象的原因可能是秋水仙素对细胞分裂的抑制导致了细胞代谢紊乱,引起细胞死亡率的增加。紫杉醇含量的增加是红豆杉细

多,但是在以后的继代过程中紫杉醇含量下降趋势比较缓慢,最终稳定在 0.25 mg/g,高于其他两种处理方式的细胞。用第 4 种方式,即用浓度为 750 mg/L 的秋水仙素处理 3 d 可最终得到四倍体比率稳定在 62.5% 的四倍体红豆杉细胞系。利用这种方式处理的细胞相对于其它几种方法而言,细胞生长量最高,死亡率最低,产生紫杉醇的能力最强,继代稳定性较好,是较为理想的获得高产紫杉醇的四

胞应激性抗病反应的结果。四倍体细胞比例稳定在 50% 以上的细胞系的紫杉醇含量升高可能有两方面的原因: 第一, 红豆杉细胞与其他的植物细胞相比有其明显的特殊性, 能合成紫杉醇。紫杉醇作为一种抗有丝分裂剂, 在有丝分裂过程中, 能促进微管蛋白迅速聚集成纺锤丝, 并阻止纺锤体的解聚, 从而干扰细胞的正常分裂, 因而具较好的抗肿瘤细胞的作用 (Woo 等, 1994)。秋水仙素也是一种抗有丝分裂剂, 但其作用机理与紫杉醇却刚好相反, 它是通过与微管蛋白结合, 抑制微管蛋白聚集成纺锤丝, 并抑制纺锤体的形成, 从而干扰细胞的正常有丝分裂 (Oriol 等, 2004)。秋水仙素的处理会引起红豆杉细胞紫杉醇产量明显增加的原因也可能是红豆杉细胞自身产生的紫杉醇对于纺锤体的作用与秋水仙素相反, 外源秋水仙素的添加会促使细胞生产更多的紫杉醇与秋水仙素的作用相拮抗, 以减少秋水仙素对细胞的毒害作用。据周嘉裕 (2002) 和余龙江等 (2002) 的报道, 离体组织材料加倍中, 秋水仙素使用的最适浓度为 0.01% ~ 0.05%, 但在我们的预实验中, 低于 0.05% 的浓度的秋水仙素几乎不能引起红豆杉四倍体细胞的出现。这从另一个方面佐证了我们的这个推测。第二, 刘宝等 (2000) 在研究中发现, 多倍体在形成过程中通过甲基化水平对基因的表达进行调控, 实现遗传二倍化。因此, 在药用植物次生代谢过程中则有可能使某些基因沉默, 导致某些次生代谢水平降低, 从而向着另外的次生代谢产物的方向发展。

本研究通过同步化培养和秋水仙素诱导处理, 成功建立了红豆杉四倍体细胞系并经 7 个周期的继代证明了该细胞系的稳定性。结果显示用浓度为 750 mg/L 的秋水仙素处理 3 d 可得到稳定传代的四倍体细胞系, 其四倍体细胞比例稳定在 62.5%。进一步对其次生代谢产物紫杉醇的检测显示该四倍体细胞比对照二倍体细胞有更高的合成紫杉醇的能力。并成功获得了产量达 0.25 mg/g 的高产细胞系, 为推动细胞大规模培养生产紫杉醇提供了很好的原材料; 在后面的研究中, 可利用这一材料通过进一步对细胞培养过程中甲基化水平及紫杉醇合成过程中关键酶类如 HMGCoA 还原酶 (HMGR)、GGPP 合酶、紫杉二烯合酶、细胞色素 P450 氧化酶等的表达活性进行分析, 更深入地探索细胞多倍体提高紫杉醇产量的机理。

参考文献:

- 王建军, 殷丽青, 张伟萍, 等. 1998. 苜蓿四倍体的特征及田间耐热性[J]. 上海农业学报, 14(2): 35—40
- 李贤, 钟仲贤. 1998. 植物离体组织细胞染色体加倍技术在育种中的应用[J]. 上海农业学报, 14(3): 99—101
- 刘宝, 胡波, 董玉柱, 等. 2000. 多倍体小麦物种形成可诱发稳定遗传的胞嘧啶甲基化变异[J]. 自然科学进展, 10(8): 710—715
- 周嘉裕, 卿人韦, 兰利琼, 等. 2002. 辣椒离体细胞多倍体的诱导研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 39(4): 746—749
- 张爱民, 常莉, 薛建平. 2005. 药用植物多倍体诱导研究进展[J]. 药用中药杂志, 30(9): 645—649
- 高山林, 朱丹妮, 蔡朝晖, 等. 1996. 丹参多倍体性状和药材质量的关系[J]. 植物资源与环境, 5(2): 1—4
- 刘华, 钟阳. 2000. 悬浮培养红豆杉细胞分裂同步化诱导[J]. 湖北农学院学报, 20(2): 161—163
- 郭启高, 宋明. 2000. 植物多倍体诱导育种研究进展[J]. 生物学通报, 35(2): 8—10
- 梅兴国, 周爱文. 2001. 红豆杉细胞同步化的研究[J]. 生物技术, 11(3): 9—11
- 陈超, 付春华, 姜革民, 等. 2005. 红豆杉细胞中的酚类化合物含量与紫杉醇产量之间的关系[J]. 华中农业大学学报, 24(1): 83—87
- 周爱文, 柯铁, 梅兴国, 等. 2001. 低温诱导红豆杉细胞同步化的研究[J]. 武汉化工学院学报, 23(1): 12—14
- Augusto J, Rodrigues R, Humberto M S, et al. 2005. A highly enantioselective chemoenzymatic synthesis of syn-3-amino-2-hydroxy esters; key intermediates for Taxol side chain and phenyl-norstatine[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16: 3 099—3 106
- DeFuria M D. 1997. Paclitaxel (Taxol): a new natural product with major anticancer activity[J]. *Phytomedicine*, 4: 273—282
- Liu XM(刘选明), Zhou PH(周朴华), He LZ(何立珍), et al.. 1995. Changes of the bud properties and nutritive components of the autotetraploid Dailily(四倍体黄花菜花蕾性状和营养成分分析)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 22(2): 191—192
- Michael C, Naill, Susan C Roberts. 2005. Culture of isolated single cells from *Taxus suspensions* for the propagation of superior cell populations[J]. *Biotechnology Letters*, 27: 1 725—1 730
- Oksman Caldentey K-M, Inzéd, Oresík M. 2004. Connecting genes to metabolites by a systems biology approach[J]. *PNAS*, 101(27): 9 949—9 950
- Oriol Pineda, Jaume Farras, Laura Maccari. 2004. Computational comparison of microtubule-stabilising agents laulimalide and peloruside with Taxol and colchicines[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14: 4 825—4 829
- Vanisree M, Lee C Y, Lo S F, et al. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures[J]. *Bot Bull Acad Sin* 45: 1—22
- Woo D DL, Miao SYB, Pelayo J C, et al. 1994. Taxol inhibits progression of congenital polycentric kidney disease[J]. *Nature*, 368: 750—753
- Yu LJ(余龙江), Cai YJ(蔡永君), Lan WZ(兰文智). 2002. Research on the stability of taxol yield of *Taxus chinensis* suspension cultures(红豆杉细胞培养生产紫杉醇产量稳定性的探讨)[J]. *Guihaia*(广西植物), 22(1): 85—88
- Yu LJ(余龙江), Li W(李为), Liu XF(刘幸福), et al.. 2000. An initial study on elicitation of basidiomycetes and its lignocellulose biodegradation broth on *Taxus* cells culture(担子菌及其木质素降解液在红豆杉细胞培养中的作用)[J]. *Acta Bot Boreali-Occiden Sin*(西北植物学报), 20(6): 992—996