

## 长春花细胞组织培养的影响因素

谢凝子<sup>1</sup>, 吴双桃<sup>1</sup>, 邱 罡<sup>1</sup>, 朱 慧<sup>2</sup>

(1. 韩山师范学院环境化学应用技术研究所, 广东 潮州 521041; 2. 韩山师范学院生物系, 广东 潮州 521041)

[摘 要] 长春花为重要的抗癌药用植物, 综述了长春花细胞组织培养中的一些影响其生物量及药用生物碱产量的因素。

[关键词] 长春花; 细胞组织培养; 影响因素

[中图分类号] Q 2

[文献标识码] A

[文章编号] 1003-5095(2008)06-0028-03

长春花 [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] 又名雁来红、日日新、四时春、山矾花、五瓣莲、夹竹桃科 (Apocynaceae), 长春花属植物。原产南亚、非洲东部及美洲热带。我国南方有部分野生, 在广东、广西及江南各地均有栽培<sup>[1]</sup>。长春花含有长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vindristine)、阿玛碱 (ajmali-cine)、蛇根碱 (serpentine)、文朵灵碱 (vindoline)、洛克定碱、洛克辛碱等 100 多种吲哚生物碱, 多数具有生物活性<sup>[2]</sup>。其中长春碱和长春新碱为目前应用最广泛的天然植物抗肿瘤药物成分, 可用于治疗何杰金氏病、恶性淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、绒毛上皮细胞癌等疾病, 其硫酸盐已广泛用于临床<sup>[3]</sup>。但植物体中长春碱和长春新碱的含量极其微小, 仅为百分之几至十万分之几, 化学合成和半合成也不太理想<sup>[4]</sup>, 因此这两种化合物的价格十分昂贵。通过长春花的组织培养、细胞培养等的一系列工作来获取有效成分, 才能更好地研究与开发长春花的药用价值和市场价值。

## 1 外植体选择

张秀省<sup>[5]</sup>等的研究表明长春花不同器官中吲哚生物碱的含量不同, 因此用不同器官作为外植体培养出的愈伤组织的生物碱的含量也有明显的差异, 子房愈伤组织阿玛碱的含量约为叶愈伤组织的 2.7 倍, 但生长缓慢, 并积累更多的生物碱。郑宗坤等<sup>[6]</sup>在长春花组织培养条件最优化的实验中得出, 以长春花的叶柄为外植体诱导率最高, 嫩叶次之, 而嫩茎和嫩根最

差, 不能作为诱导培养的最佳外植体。

## 2 细胞生长状况及药用生物碱成分含量的影响因素

## 2.1 植物生长调节物质

孙敏等<sup>[8]</sup>的实验结果表明较高浓度的 2, 4-D 易使外植体严重褐化死亡; 使用较低浓度的 2, 4-D 虽然可以获得疏松状愈伤组织, 但是生长缓慢, 而且培养一段时间后会褐化死亡; 单独使用 NAA 诱导愈伤组织, 诱导出的愈伤组织结构致密, 颜色偏黄, 生长缓慢; 加入适量的 ZT 可以减轻褐化程度。同一实验中发现 6-BA、NAA 和蔗糖这 3 个因子对长春花丛生芽诱导的影响都极为显著, 但影响程度的大小有较大差异, 对长春花丛生芽诱导的作用大小顺序依次为蔗糖、6-BA、NAA。过高或过低的 NAA 和 IBA 的浓度均不利于长春花丛生芽的生根, 蔗糖浓度的高低也是影响丛生芽生根的重要因子, 蔗糖浓度过高或过低对芽的生根均不利。郭胜娟<sup>[9]</sup>在长春花的细胞培养与组织快繁的实验中得出不同种类、不同浓度的植物生长调节物质具有不同的诱导和生长效应: 单独使用 NAA 浓度为 2.0 mg/L 时诱导率最高, 生长势亦较好, 而单独使用 2, 3-D 或 6-BA 效果都不理想, 单独使用 KT 时, 各浓度下均无愈伤组织产生。在使用组合激素 NAA 0.5 mg/L + 2, 4-D 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 时诱导率及生长势均最佳, 此时的愈伤组织是用作细胞培养的最佳材料。

张向飞<sup>[10]</sup>等的研究表明 1 g/L 的乙烯利最有利于长春质碱和阿玛碱的积累; 不同浓度 ASA 对吲哚总碱产量影响不大, 但 1 mg/L ASA 有利于阿玛碱积累, 而 2 mg/L ASA 使长春质碱含量增加 70%。这可能是由于不同浓度 ASA 引起不同吲哚生物碱之间的相互转化所致。而且外源 ABA、乙烯利和 ASA 对长春花细胞的生物量影响不大, 但吲哚总碱及其中阿玛碱和长

[基金项目] 韩山师范学院青年基金科研项目 (2005 年)

[收稿日期] 2008-03-17

[作者简介] 谢凝子 (1981-), 女, 研究实习员, 主要从事环境污染生态方面的研究工作。

春质碱含量均有明显提高。2, 4-D 的存在对吲哚总碱的积累有一定的抑制作用, 随 2, 4-D 浓度的增加而加强。NAA 和 IAA 的共同作用有利于吲哚总碱的积累。金屹等<sup>[11]</sup>则认为在生长阶段采用加 2, 4-D 的培养基, 在产碱时采用加 NAA 的培养基, 可以利于次级代谢物的产生。

## 2.2 光照条件

郑珍贵等<sup>[12]</sup>的实验结果表明, 24 h 光照和黑暗细胞生长相似, 生物量均在 10~12 d 时达到最大值, 在之后的下降过程中, 黑暗培养细胞生长速度下降较 24 h 光照迅速。而 12 h 光照的细胞生长非常缓慢。而阿玛碱含量则黑暗培养优于光照。光照时间对阿玛碱的释放没有显著影响。红光下细胞的生物量较蓝光下低。元英进等<sup>[13]</sup>的实验以白光为基准, 得出蓝光对细胞生长和生物碱积累均有促进作用, 红光、黄光影响程度在白光之下, 绿光有抑制作用。郭胜娟等<sup>[14]</sup>认为黑暗条件下长春花的生物总碱量较光照下产量稍高。

## 2.3 前体物的加入

适度添加生物合成中的前体物质可以提高次生代谢物的产量。Whitme 等<sup>[15]</sup>将裂环马钱子苷 (secologanin) 添加到带有 STR c DNA 的转基因细胞系 S 10 的培养物中, 在低 TDC 情况下, 色胺合成速率高, 只要有少量色胺存在即可提高裂环马钱子苷合成速率。色胺促进吲哚碱的合成, 前体物质供应不足影响 STR 的催化作用。

## 2.4 气体条件

溶解氧浓度 (DO) 与生物碱产率关系十分密切。Schlatmann 等<sup>[16]</sup>在 15 L 搅拌式反应器中高密度培养长春花细胞时, 发现当 DO 小于 29% 时, 阿玛碱产率小于 0.06 L/mol (g·d), DO 大于 43% 时, 阿玛碱产率恒为 0.2 L/mol (g·d), 而当 DO 在 29% 与 43% 之间时, DO 与阿玛碱产量显著相关。郑珍贵等<sup>[18]</sup>认为氧可能是直接作为这类生物碱合成中的底物而不是通过影响基础代谢或调节有关酶的活性来促进它们的合成。长春花在溶氧低于 15% 条件下, 阿玛碱合成被抑制, 升高溶氧至某一浓度, 阿玛碱迅速大量合成; 降低溶氧浓度, 阿玛碱合成又停止, 而合成阿玛碱的有关酶的活性在不同氧浓度时区别不大<sup>[19]</sup>。

CO<sub>2</sub> 对长春花阿玛碱产量影响不大, 但去除 CO<sub>2</sub> 导致阿玛碱大量分泌到胞外, 可能是由于 CO<sub>2</sub> 对培养液 pH 的降低的结果。而乙烯的加入和除去对长春花细胞的阿玛碱影响不大<sup>[20]</sup>。

## 2.5 诱变的影响

孙敏等<sup>[6]</sup>利用化学诱变剂 EMS 和秋水仙碱诱变的叶愈伤组织, 由于细胞的遗传物质发生了不同程度的变化, 代谢旺盛, 细胞生长速度和吲哚生物碱积累方面也发生了较大的变化, EMS 诱变的愈伤组织生长快, 而且吲哚总碱含量最高, 秋水仙碱诱变的愈伤组织长春质碱含量最高, 约为叶愈伤组织的 8 倍之多, 无疑化学诱变的愈伤组织是进行长春花细胞培养比较理想的材料。植物组织细胞培养技术与化学诱变相结合的立体诱变效果好。金屹等<sup>[11]</sup>的实验表明诱变也能使长春质碱产量提高, 他们以半致死量 40 s 紫外线照射为诱变剂量, 以盐酸色氨酸乙酯盐 (TEH) 作为选择压, 效果较好, 且未引起培养物和培养基的褐变反应, 与真菌诱发剂对愈伤组织的作用有所不同, 因而也不存在褐变反应和生物碱积累的关系。和原株相比, 突变株积累长春质的时间有所提前, 在整个培养周期中长春质的积累也是逐步增加的。孙敏等<sup>[21]</sup>采用 A<sub>4</sub> 和 R<sub>1000</sub> 两种发根农杆菌菌株分别感染长春花的愈伤组织、真叶叶片、叶柄及根, 诱导出毛状根。其结果为 A<sub>4</sub> 转化频率高于 R<sub>1000</sub>, 真叶叶片转化频率最高, 最佳预培养时间为 2~3 d; 最佳共培养时间 2~3 d; 以 100 mg/mL 的 As 同时加入共培养基中转化频率高达 86.25%。不同种类的培养基以及碳源、氮源对毛状根生长也有较大的影响。张向飞等<sup>[22]</sup>采用分别来源于镰刀菌 *Fusarium solani* 和黑曲霉 *Aspergillum niger* 的真菌诱导子 (fungal elicitors) 对长春花愈伤组织诱导后, 检测其中吲哚生物碱积累的影响。结果表明两种真菌诱导子对吲哚总碱及其中阿玛碱和长春质碱的积累均有显著的正向调节作用, 真菌诱导子最佳处理时间为 16 h, 可使其含量比对照增加近 3 倍。

## 3 展 望

自发现长春花中所含的多种次生代谢产物的药效以来, 越来越多的人对它的研究产生兴趣。目前利用生物技术在改良长春花品质、提高生物碱含量等方面已取得了一些成绩, 但细胞培养单位产出成本高, 高密度培养时生物碱含量降低, 利用遗传转化技术获得的转化体中尚未得到可用于工业化生产的高产株系。随着培养技术的不断改进和设计出更合理的反应器, 以及将控制长春碱、长春新碱和其前体物质文朵灵合成的关键酶基因克隆出来并转化成功, 利用生物技术获得高含量抗癌生物碱的优良变异克隆, 长春花抗癌生物碱的工业化生产和产业化开发将会成为现实。

## [参 考 文 献]

- [1]陈俊愉,程绪珂.中国花经[M].上海:上海文化出版社,1990,484.
- [2]高正航,李卫东.长春花生物碱类药物概述研究[J].贵州农业科学,2005,33(6):94-96.
- [3]卢 懿,侯世祥,等.长春花抗癌成分长春新碱研究进展[J].中国中药杂志,2003,28(11):1006-1009.
- [4]李晓蕾,任其龙,等.抗肿瘤药长春碱的提取纯化与分析方法研究概况[J].中国医药工业杂志,2004,35(4):247-250.
- [5]张秀省,张荣涛,等.长春花不同愈伤组织中吲哚生物碱积累的比较研究[J].中国中药杂志,2005,30(12):938-941.
- [6]孙 敏,伍春莲,等.多因子正交试验对长春花立体培养条件的筛选[J].西南师范大学学报(自然科学版),2002,27(2):202-205.
- [7]郑宗坤,程学俊.长春花组织培养条件的最优化[J].生物技术,2001,11(6):11-14.
- [8]张向飞,张秀省,等.植物生长调节物质对长春花细胞中吲哚生物碱积累的影响[J].植物生理学通讯,2004,40(3):303-304.
- [9]郭胜娟.长春花细胞培养与快速繁殖的初步研究[D].华中农业大学:中国优秀硕士学位论文,2004,5.
- [10]张向飞,张荣涛,等.不同因子对长春花愈伤组织中药用成分积累的影响[J].中国药理学杂志,2004,39(11):817-819.
- [11]金 屹,陶文沂.长春花愈伤组织的诱变和长春质的增产[J].无锡轻工大学学报,1997,2(6):32-36.
- [12]郑珍贵,缪 红,等.环境和环境因子对长春花激素自养型细胞生长和阿玛碱生成的影响[J].植物学报,1999,41(2):184-189.
- [13]元英进,胡宗定.光强和单色光对长春花愈伤组织培养的影响[J].植物生理学通讯,1993,29(6):471-473.
- [14]郭胜娟,刘树楠,等.黑暗和光照对长春花培养细胞生长和生理生化特性的影响[J].武汉植物学研究,2004,22(2):136-139.
- [15]Whitme Srape, Camilo Canel, Didier Hallard, et al. Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. [J]. Plant Physiology (Rockville), 1998, 116(2): 853-857.
- [16]Schlatmann J E, Koolhasas C M A, Vinke J L, et al. The role of glucose in ajmalicine production by *Catharanthus roseus* cell cultures [J]. Biotechnol Bioeng, 1995, 47(5): 525-534.
- [17]郑珍贵,刘 涿,胡之璧.长春花细胞大规模培养生产生物碱的研究现状[J].国外医药(植物药分册),1996,11(5):204-208.
- [18]Lechie F, Scragg A H. An investigation into the role of initial KLa on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus* [J]. Biotechnol Bioeng, 1991, 37, 364-370.
- [19]Schlatmann J E, Fonck E, TenHooopen H J G, et al. The negligible role of carbon dioxide and ethylene in ajmalicine production by *Catharanthus roseus* cell suspensions [J]. Plant Cell Rep., 1994, 14, 157-160.
- [20]孙 敏,汪 洪,等.长春花转化毛状根诱导及培养条件的优化[J].西南师范大学学报(自然科学版),2002,27(4),549-552.
- [21]张向飞,张荣涛,等.真菌诱导子对长春花愈伤组织中吲哚生物碱积累的影响[J].中草药,2004,25(2):201-204.

Research Advances in Cell and Tissue Culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. DonXIE Ning-zi<sup>1</sup>, WU Shuang-tao<sup>1</sup>, QIU Gang<sup>1</sup>, ZHU Hui<sup>2</sup>

(1. Research Institute of Environmental Chemistry and Technology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China;  
2. Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

**Abstract:** *Catharanthus roseus* is one of the important medicinal plants that applied in cancer cure. Research on the cell and tissue culture of *Catharanthus roseus* and the factors impact on the biomass and the alkaloid contents are introduced.

**Key words:** *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; cell culture; tissue culture; effect factors

## 《河北化工》征稿启事

## 来稿要求:

1. 文章应观点明确,内容新颖、真实可靠、文字精练、数据准确。2. 综述及科学实验论文须附中、英文摘要,关键词,并提供英文题目、作者姓名和单位名称。3. 要求使用国际法定计量单位。4. 文中插图和不便排版的复杂分子式和结构式需要用描图纸黑墨(深黑)按工程图要求描绘,照片应黑白清楚,原图中各种文字为6号宋体。5. 文中参考文献脚注序号应与文末所列参考文献序号一一对应,外文书刊名称应按照原文书写。6. 来稿请注明:第一作者出生年、性别、职称、从事何种工作或研究及联系电话,切勿一稿多投,两个月内如收不到录用通知可另行处理(来稿不退)。7. 所有来稿文责自负。本刊编辑部有权对文稿进行修改,若不同意修改请在来稿时说明。8. 稿件一经刊用,即按规定一次性付清稿酬,并寄送第一作者当期杂志两本。(论文要求2500字以上,否则不予发表)

《河北化工》1978年创刊,国内外公开发行,已被《中国期刊数据库》、《中文科技期刊数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》和我杂志社网站《北方化工网》全文收录。我刊诚征稿件。