

长春花细胞组织培养研究进展

车秀芬, 杨小波

(海南大学生命科学与农学院, 海南海口 570228)

摘要: 综述了长春花组织培养中的一些关键因素及目前此方面研究的主要进展。

关键词: 长春花; 组织培养; 研究进展

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^[1]。长春花含有长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vindristine)、阿吗碱 (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^[2]。其中长春碱和长春新碱是目前应用最广泛的天然植物抗肿瘤药物的成分, 可用于治疗何杰金氏病、恶性淋巴瘤等疾病, 其硫酸盐已广泛用于临床^[3-4]。目前主要从天然植物中提取长春碱和长春新碱, 但是它们在植物体中的含量极其微小, 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^[5]。因此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, 才能更好地进行长春花的研究与开发, 从而挖掘更大的市场潜力。

长春花细胞培养的研究已有很多年, 主要进行细胞悬浮培养、植株再生、成分分析、以及对提取的次生代谢物的研究^[6]。本文就长春花的细胞组织培养进展情况做一综述。

1 基本培养基与外植体的选择

以前的实验中有人先后在 B₅、White、Wo-L、WoNiK₅-L 培养基上诱导出长春花愈伤组织, 且在其上的继代培养也获成功。葛枫^[7]在 Ms 培养基上诱导出长春花茎的愈伤组织, 黄勇^[8]在 Ms 培养基上利用长春花种子诱导出愈伤组织, 郭胜娟^[9]等也在 Ms 培养基上利用长春花叶片诱导出愈伤组织; 元英进等^[10]将 1L 固体愈伤组织培养基的剩余培养基作为附加成分加入 1L 改进的 SH 培养基 A 中, 形成含剩余培养基的愈伤组织培养基 B, 培养基 B 上的愈伤组织生长速度比 A 上的快, 并积累更多的生物碱。郑宗坤等^[11]在长春花组织培养条件最优化的实验中得出利用 Ms+10%椰子汁培养基, 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 细胞生长及细胞培养物中药用成分含量的影响因素

长春花作为特殊的药用植物, 其细胞组织培养具有特殊的目的, 其中诱导产物的药用成分含量是我们所关注的主要问题之一。长春花细胞组织培养及细胞生长和生物碱的合成受内部机制与外部环境共同调控, 培养基组成、光、温度、pH 值、外源激素、前体物质、诱导子和通气状况、流变学特征、培养方式等都有影响。

2.1 植物生长调节物质 在培养基的各组分中, 对细胞生长和产碱最有影响的因素之一是植物激素。在长春花细胞培养中, 常用激素有 2,4-D, 激动素 (KT), 萘乙酸 (NAA), 苄基腺嘌呤 (6-BA)。郭胜娟^[12]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 2.0mg/L 时诱导率最高, 生长势亦较好, 而单独使用 2,4-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 NAA0.5mg/L+2,4-D0.5mg/L+6-BA2.0mg/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。孙敏等^[13]用多因子正交实验筛选出 MS+2,4-D0.8mg/L+NAA1 mg/L+ZT0.2mg/L 固体培养基诱导愈伤组织出愈率快、诱导出的愈伤组织生长旺盛、颜色为浅黄色或白色、形状疏松呈细颗粒状, 为筛选出的最佳愈伤组织诱导培养基。杨玉敏等^[14]用正交实验法研究不同浓度 6-BA、NAA 和间苯三酚对长春花细胞分化的影响, 获得高分化率的最优配比为: 6-BA7.0mg/L, NAA0.5mg/L, 间苯三酚 1.0~5.0mg/L。张向飞等^[15]在长春花的继代培养的悬浮液中加入不同浓度的外源 ABA、乙烯利和 ASA, 培养 24h 测得吲哚总碱及其中阿玛碱和长春质碱含量均有明显提高。赵剑等^[16]在诱导长春花愈伤组织的过程中使用不同种类和水平的激素对生物碱的合成影响较大, 发现 2,4-D 显著抑制生物碱合成。金屹等^[17]实验表明在生长阶段采用加 2,4-D 的培养基, 细胞生长

基金项目: 教育部热带海洋与陆生生物资源研究及利用重点实验室资助。第一作者简介: 车秀芬, 1980 年出生, 山东泰安人, 在读硕士研究生, 方向为作物遗传育种。E-mail: cx73@126.com。收稿日期: 2005-12-21。

农业生物技术

最快,在产碱时采用加入 NAA 的培养基,以利于次级代谢物的生产。郑宗坤等^[11]的实验采用 2,4-D:KT 的激素配方,不仅诱导率最高,诱导时间短,而且诱导出来的组织细胞群生长良好、快速,组织结构呈乳白色,疏松呈颗粒状,适合后面的继代培养和大量繁殖,用于诱导长春花叶柄的愈伤组织细胞较为理想。这一结论与 M H Zenk 等^[12]、赵剑等^[13]的结论相符。大规模培养细胞时生物碱产量往往很低^[14],Drapeau 等^[20]人认为是接种时带进 2,4-D 所致。

2.2 前体物质的添加 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 等人^[21]将裂环马钱子苷(secologanin)添加到带有 STR cDNA 的转基因细胞系 S10 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。

2.3 光照条件 光照时间和光质都会影响细胞生长和生物碱类的积累。郑宗坤^[11]的实验中暗培养 10d 后,采用 12h/d 光照条件培养,效果理想。光照对愈伤组织培养的影响:在后指数期光强对细胞生长有些影响,而对生物碱含量无明显影响^[14];以白光为基准,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^[22]。一般认为光对阿吗碱/蛇根碱比值具有调节作用。郑珍贵等^[23]认为光照显著减少了阿吗碱生成量,但光照时间对阿吗碱含量和释放量影响不大,每天光照 12h 比 24h 生成的蛇根碱多^[24],而阿吗碱正相反^[25]。

2.4 诱导及诱变作用 Claudine 等人^[26]用低浓度腐霉菌 pythium 培养产生的诱导子处理长春花悬浮细胞,发现可以刺激生物碱的产生,诱导子与生物碱合成可能存在一种长期效应。Gregorio 等人^[27]用 PC2500 感染长春花得到的肿瘤细胞进行液体培养,在得到的细胞悬浮系中分别加入不同浓度(0.5~2.0mmol/L)的诱导子乙酰水杨酸(ASA),1mmol/LASA 促使总碱含量增加 5.05 倍、总酚含量增加 15.78 倍、呋喃香豆素类增加 14.76 倍。ASA 与匀浆的曲霉素及反肉桂酸联用并未显著提高次生代谢产物含量。王淑芳^[28]研究了 6 种不同来源的诱导子对培养了 15d 的长春花冠瘿瘤细胞次级代谢产物的刺激效果,发现均不同程度地促进了细胞总吲哚生物碱的积累。其中在 100ml 细胞培养液中加入 5ml 大丽花轮枝孢菌制备的诱导子效果最好。此外,用二乙氨基二氯苯酰、5-氮胞苷、真菌多糖、甘露醇等物质作为诱导子也有报道。可见诱导子在很多情况下不仅能提高某些次生代

谢产物的产量,有时有的还能产生新的化合物。

金屹^[16]等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 40s 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。

3 发根的影响因素

利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)诱导药用植物产生毛状根,并对毛状根进行离体培养,是药用资源植物可持续发展的有效途径之一。由于毛状根基本上具有正常根的生长功能,与细胞培养相比,具有生长速度快,激素自养,分化程度高以及遗传性能相对稳定等优点,已成为一种新的培养系统。

长春花丛生芽的生根受多种因子的影响,植物生长物质和蔗糖是影响其丛生芽生根的主要因子。过高或过低的 NAA 和 IBM 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。此外,培养基种类,碳源种类,氮源种类等也会影响生根效果。孙敏等^[28]用发根农杆菌 A4 和 R₁₀₀₀2 个菌株转化长春花产生毛状根,并对毛状根的培养条件进行了优化,筛选到长春花丛生芽生根的最佳培养基为:1/2MS+0.2mg/LNAA+0.2mg/LIBA+30g/L 蔗糖。用这种培养基进行长春花丛生芽生根繁殖幼苗,不受季节气候等客观条件的限制,大大缩短繁殖周期,降低种苗成本。

4 长春花细胞组织培养的前景展望

自 20 世纪 50 年代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。至今已在长春花细胞和组织培养物中共发现多种次生代谢产物,使长春花成为研究吲哚生物碱合成的模式植物^[29]。由于原植物中的有效成分含量较低,人们在细胞培养方面对长春花进行了大量的研究,使之成为植物细胞工程学的模式系统^[30]。随着对长春花细胞培养实验室小试研究的不断深入,通过植物细胞工程途径产业化的关键步骤——细胞大规模培养的研究已逐渐上升到了科研的日程。曹阳等^[31]采用 70L 环形通气搅拌生物反应器对长春花细胞的大规模悬浮培养进行了初步研究,2 次培养取得成功,培养周期 15d,最大 PCV 值达 52%,生物量鲜重 205.6g/L,使我国对长春花植物细胞工程的研究向产业化前进了一大步。

一般致密的、聚集组织的细胞培养物比松散的、无

组织的细胞培养物积累更多的次生代谢产物。这可能是由于培养物细胞的组织化,使细胞间紧密接触,有利细胞间的联络,形成光照、营养物质、机械压力等物理、化学上的梯度,接近于整体植物细胞代谢环境,从而有利于次生代谢产物的积累^[22]。J.Zhao^[23]等也研究了外力,生物调节物质及前体物质对长春花致密愈伤组织产生生物碱的影响。而长春花的细胞培养系中生物碱的合成能力比母体植株中低很多,而且不能直接得到长春碱,只能得到其前体物^[24]。赵剑等^[25]研究发现长春花培养细胞中缺乏在长春花植物中所含有的某些酶,导致某些生物碱的合成发生障碍,可能是长春花培养细胞不能合成长春碱和长春新碱的直接原因。在获得快速生长的组织细胞系后,研究不同理化因子对长春花愈伤组织生理生化特性尤其是生物碱积累的影响,利用现代细胞培养技术诱发细胞由单纯的细胞增殖和营养生长向次生代谢产物的生产转化已经成为一个重点。

目前利用细胞工程和遗传工程等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,但是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^[26]。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、文多灵合成的关键酶基因克隆出来并转化成功,筛选出优良无性系,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取得更大的进步。

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 中国科学院北京植物研究所.中国高等植物图鉴(第3册)[M].北京:科学出版社,1974.
- 3 季宇彬.中药有效成分药理与应用[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1995.
- 4 Johnson J S, Wright H F, Svoboda G H. Experimental basis of clinical evaluation of antitumor principles derived from Vincarosea L. J Lab Clin Med, 1959, 45: 830
- 5 陈敏,廖志华,孙敏,等.生物技术在长春花中的应用[J].中草药,2001,32(1):78-81
- 6 Moreno P R H, Van Der Heijden R, Verpoorte R, et al. Cell and tissues of *Catharanthus roseus*: A literature survey, updating from 1988 to 1993. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1995, 42: 1-25
- 7 葛枫,盖宏伟.长春花愈伤组织诱导[J].特产研究,2001,(4):19-20
- 8 黄勇,郭善利.长春花的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2000,36(1):39
- 9 郭胜娟,杨春燕.长春花愈伤组织的诱导和增殖[J].华中师范大学学报(自然科学版),2004,38(2):228-230
- 10 元英进,胡宗定.剩余培养基对长春花愈伤组织和细胞培养的影响[J].植物生理学通讯,1993,29(3):85-187
- 11 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
- 12 郭胜娟.长春花细胞培养与快速繁殖的初步研究[J].华中农业大学:中国优秀硕士学位论文,2004.5

- 13 孙敏,伍春莲,汪洪,等.多因子正交试验对长春花离体培养条件的筛选[J].西南师范大学学报(自然科学版),2002,27(2):202-205
- 14 杨玉敏,元英进.正交实验法优化长春花分化培养基[J].天然产物开发与研究,1993,5(3):34-47
- 15 张向飞,张秀省.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
- 16 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,1997,16(2):32-36
- 17 W 巴尔茨, E 赖因哈德, M H 岑克.植物组织培养及其在生物技术上的应用[M].北京:科学出版社,1983.1-10
- 18 赵剑,朱蔚华.长春花叶片愈伤组织诱导及生物碱合成类型的变化和调节[J].中草药,1999,(7):533-537
- 19 Schlattmann J E, Moreno P R H, TenHoopen H J G, et al. Effect of oxygen and nutrient limitation on ajmalicine production and related enzyme activities in high density cultures of *Catharanthus roseus*[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44(4): 461-468
- 20 Drapeau D, Blanch H W, Wilke C R. Ajmalicine, serpentine and catharanthine accumulation in *Catharanthus roseus* bioreactor cultures. *PlantaMed*, 1987, 53: 373-376
- 21 Whitme Srape, Camilo Canel, Didier Hallard, et al. Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology (Rockville)*, 1998, 116(2): 853-857
- 22 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
- 23 郑珍贵,缪红,杨文杰,等.营养和环境因子对长春花激素自养型细胞生长和阿吗碱生成的影响[J].植物学报,1999,41(2):184-189
- 24 郑珍贵,刘涤.长春花细胞大规模培养生产生物碱的研究现状.国外医药□植物药分册,1996,11(5):204-208
- 25 Claudine N C, Marie-France P, Pierr T, et al. Long term effect to fapythium elicitor treatment on the growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* cell suspension [J]. *PlantaMed*, 1994, 60(2): 149-152
- 26 Gregorio Godoy Hernandez, Victor M. Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 287-290
- 27 王淑芳,王宁宁. Elicitor 对长春花冠瘿细胞次级代谢的影响[J].南开大学学报(自然科学版),1996,29(1):107-109
- 28 孙敏,汪洪,王颖,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
- 29 周煜.溶氧浓度对长春花培养细胞的影响[D].上海:上海中医药大学,2000.
- 30 郑珍贵.长春花细胞大规模培养和外界因质的影响[D].上海:上海中医药大学,1997.
- 31 曹阳,侯军,郑珍贵,等.长春花细胞大型生物反应器培养的初步研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(2):87-90
- 32 Simdal K, Koskimies K. Comparison of glycolipids and plastids in callus cells and leaves of *Alnus* and *Betula*. *Plant & Cell Physiol*, 1984, 25(8): 1329-1340
- 33 Zhao J, Hu Q, Guo Y Q, et al. Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55: 693-698
- 34 孙震晓,马清温.抗癌植物药及其植物组织培养研究进展[J].生物学通报,2000,35(8):11-12
- 35 赵剑,朱蔚华.长春花生物碱生物合成途径和相关酶及其基因调控的研究进展[J].植物生理学通讯,1999,35(1):60-68
- 36 Van der Heijden R, Verpoorte R, ten Hoopen J G. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1989, 18: 231-280