

红豆杉细胞培养产物提取策略及其对紫杉醇的影响*

罗杰, 刘凌, 胡道伟

(华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要: 研究了硫酸铈铵及原位提取对红豆杉细胞悬浮培养过程中细胞生长、紫杉醇合成及释放的影响。红豆杉细胞悬浮培养过程中培养第 12 d 添加 2 mg/L 硫酸铈铵能获得最大紫杉醇产量 8.3 mg/L, 其中 2.4 mg/L 释放到细胞外, 分别为对照组的 4 倍及 12 倍。同时添加 2 mg/L 硫酸铈铵、5% 油酸(v/v)时胞外紫杉醇产量达到 9 mg/L, 为对照组的 45 倍。将硫酸铈铵及原位提取与补料培养相结合, 最高紫杉醇产量可达 24.5 mg/L, 其中 60% 释放到胞外。

关键词: 红豆杉; 紫杉醇; 硫酸铈铵; 原位提取

中图分类号: Q 813.1⁺ 1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X (2003) 02-0165-05

Influence of Taxol Production by Product Extraction Strategies in Cell Cultures of *Taxus chinensis*

LUO Jie, LIU Ling, HU Dao-Wei

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

Abstract: The effects of product release and *in situ* extraction on cell growth and taxol release and accumulation in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* were investigated. A ddition of 2 mg/L ammonium cerous sulphate on day 12 gave the greatest taxol production at 8.3 mg/L, among which 2.4 mg/L was released out of the cell, which was 4 and 12 times that of the control culture. Extracellular taxol production reached 9 mg/L when 2 mg/L ammonium cerous sulphate and 5% oleic acid (v/v) were added together, which was 45 times that of the control culture. The highest taxol accumulation of 24.5 mg/L with the release ratio of 60% was obtained when 2 mg/L ammonium cerous sulphate, 5% oleic acid (v/v) and feeding solution with 20 g/L sucrose were added.

Key words: *Taxus*; Taxol; Ammonium cerous sulphate; *in situ* extraction

紫杉醇(Taxol)是一种来源于红豆杉属植物的二萜类生物碱, 自 1992 年被 FDA 批准用于治疗转移性卵巢癌以来, 已经被成功地应用于多种恶性肿瘤及非肿瘤性疾病, 成为目前公认的最有希望的治疗癌症的药物之一^[1]。目前用于紫杉醇生物合成的红豆杉细胞株绝大多数属于非分泌型。因此对于植物细胞悬浮培养生产紫杉醇而言, 传统的提取方法是进行细胞破碎后再采用有机溶剂提取。由于紫杉

醇是一种细胞毒素, 有明显的抑制细胞分裂的作用, 其在细胞内的大量积累势必影响细胞本身的生理代谢。如果能在基本不降低细胞活性及紫杉醇合成能力的情况下促使紫杉醇向细胞外分泌, 不但能够减少其对细胞的毒害, 而且有利于提高紫杉醇产量, 同时也便于实现连续生产。要实现紫杉醇的胞外释放, 必须向培养体系中加入适当的促释放剂。常用的化学方法有加入 DM SO、甘露醇等; 物理方法有调节

收稿日期: 2002-08-28, 修回日期: 2002-11-12。

* 基金项目: 国家“863”高技术发展计划项目(102-12-06-01)。

作者简介: 罗杰(1971-), 男, 博士, 讲师, 主要从事植物及微生物细胞培养及分子生物学研究。

培养体系的 pH 值等^[2]。采用有机溶剂对代谢产物进行原位提取是提高培养过程次生代谢产物产量的另一条有效途径。一般采用向培养体系中加入非极性的有机溶剂的方法, 在基本不影响细胞活性的前提下实现对产物的富集^[3]。笔者利用一种稀土元素硫酸铈铵[NH₄Ce(SO₄)₂]和油酸进行产物释放及原位提取对红豆杉细胞悬浮培养过程中紫杉醇的合成及释放影响进行了研究。

1 材料与方法

1.1 红豆杉细胞株及其悬浮培养

所用中国红豆杉(*Taxus chinensis*)细胞株来自红豆杉幼茎诱导的愈伤组织。具体诱导方法、培养基及悬浮培养方法见文献[4]。补料培养时向每个 250 mL 摆瓶中(含 100 mL 培养基)添加 10 mL 补料培养基。补料培养基的组成为: 6-BA 10 mg/L, 2, 4-D 4 mg/L, LH 10 g/L, 蔗糖 200 g/L, 其余成分的浓度为 B5 培养基的 5 倍。

1.2 第二相(有机溶剂相)的预处理

有机相(油酸)在使用前首先进行培养基成分的预饱和: 有机相与 5 倍其体积的新鲜培养基搅拌过夜, 静置分层后除去培养基相(水相)。上述处理是为了降低由于有机相吸附培养基中细胞生长所必需的微量成分或生长因子而导致对细胞生长的损害。

1.3 细胞鲜重、干重的测定

收获的细胞经过砂芯漏斗减压抽滤后, 滤饼用蒸馏水洗涤 3 次以除去残余的培养基。再次减压抽滤后称其鲜重。将上述抽滤的细胞冷冻干燥至恒重后称其干重。

1.4 紫杉醇的提取及测定

紫杉醇的提取及测定见文献[4]。紫杉醇产量为胞内紫杉醇产量与胞外紫杉醇产量之和。

表 1 不同浓度硫酸铈铵对紫杉醇合成及分泌的影响(D4 细胞系)

Table 1 Effects of ammonium cerous sulphate at different concentrations on taxol production and excretion in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* (cell line D4)

硫酸铈铵(mg/L) Ammonium cerous sulphate	第 12 d 时紫杉醇产量 Total		第 24 d 时紫杉醇产量 Total		
	总产量(mg/L) In medium	胞外产量(mg/L) In medium	总产量(mg/L) In medium	胞外产量(mg/L) In medium	释放率(%) Release ratio
0	0.7	0	1.9	0.2	10
0.5	1.0	0.1	2.5	0.3	12
1	1.8	0.3	3.4	0.9	26.5
2	2.8	0.6	4.6	1.8	39.1
5	3.2	0.8	1.8	0.8	44.4
10	1.3	0.9	0.8	0.5	62.5

2 结果与讨论

2.1 硫酸铈铵浓度对细胞生长、紫杉醇合成及释放的影响

为了研究不同浓度硫酸铈铵对红豆杉细胞悬浮培养过程中细胞生长及紫杉醇合成的影响, 在培养开始时向培养体系中分别加入 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 mg/L 硫酸铈铵, 结果见图 1 及表 1。由图 1 可见细胞生长随硫酸铈铵浓度的变化比较复杂。在培养开始时加入低浓度(0.5, 1 及 2 mg/L) 硫酸铈铵对细胞生长有一定的促进作用, 这种促进作用在培养前期更为明显。继续提高硫酸铈铵的浓度则对细胞生长有一定的抑制。添加不同浓度硫酸铈铵, 培养第 12 及第 24 d 时紫杉醇产量见表 1。硫酸铈铵的添加不仅有效地促进了紫杉醇的胞外释放, 而且在较低

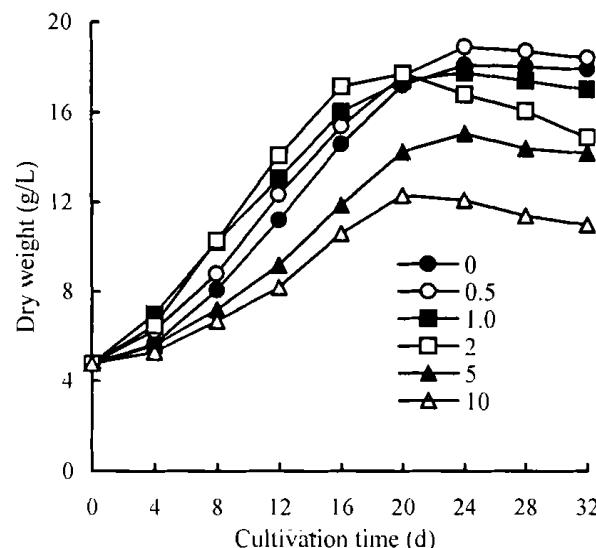


图 1 不同硫酸铈铵浓度下(mg/L)中国红豆杉细胞培养过程中细胞干重的动态变化(D4 细胞系)

Fig. 1 Time courses of cell growth in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* (cell line D4) at different ammonium cerous sulphate concentrations(mg/L)

浓度($< 10 \text{ mg/L}$)时还能显著提高紫杉醇产量。紫杉醇的释放率随着硫酸铈铵浓度的提高而增加。培养24 d时, 未添加硫酸铈铵的仅有10%的紫杉醇释放到胞外, 而添加 10 mg/L 硫酸铈铵时紫杉醇的释放率则超过60%。添加 2 mg/L 硫酸铈铵得到的紫杉醇产量最高, 为 4.6 mg/L 。Nie等^[5]曾报道低浓度的稀土元素有利于生物合成及有丝分裂, 我们的结果也显示低浓度的硫酸铈铵对红豆杉细胞悬浮培养过程中细胞生长及紫杉醇合成均有一定的促进作用。紫杉醇分泌的增加可能是由于硫酸铈铵对细胞膜通透性产生影响的结果。由于稀土元素的离子半径及化学性质与 Ca^{2+} 相似, 所以在生物体中往往能够作为 Ca^{2+} 的拮抗剂, 对膜上的 Ca^{2+} 通道产生影响, 细胞膜的微结构发生变化, 改变细胞膜的通透性。而较高浓度的稀土元素则会造成膜损伤。

2.2 硫酸铈铵添加时间对细胞生长、紫杉醇合成及释放的影响

于培养过程中第0, 8, 12, 16, 20 d加入 2 mg/L 硫酸铈铵, 第24 d收获细胞, 胞外紫杉醇及总紫杉醇产量见图2。在培养过程中第12及16 d(即对数生长中、后期)加入硫酸铈铵对紫杉醇合成的促进作用最大, 此时总紫杉醇产量分别为 8.3 mg/L 及 7.1 mg/L 。在细胞培养开始时(第0 d)、对数生长前期(第8 d)及稳定期(第20 d)加入硫酸铈铵对紫杉醇的合成也有一定的促进作用, 但与对数中后期加入硫酸铈铵相比效果较差。硫酸铈铵的添加时间对紫杉醇的胞外释放也有较大影响。紫杉醇的释放率

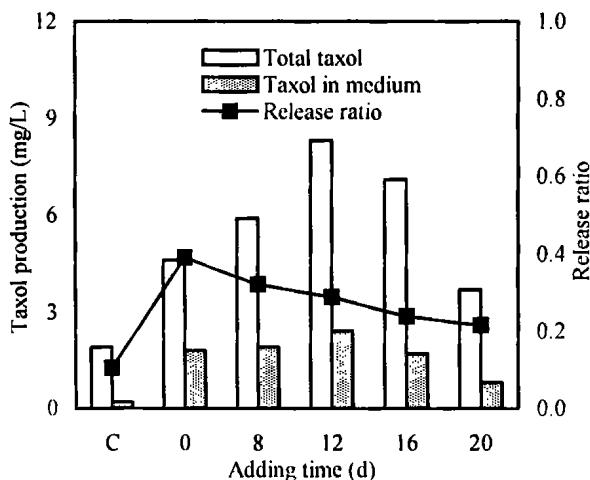
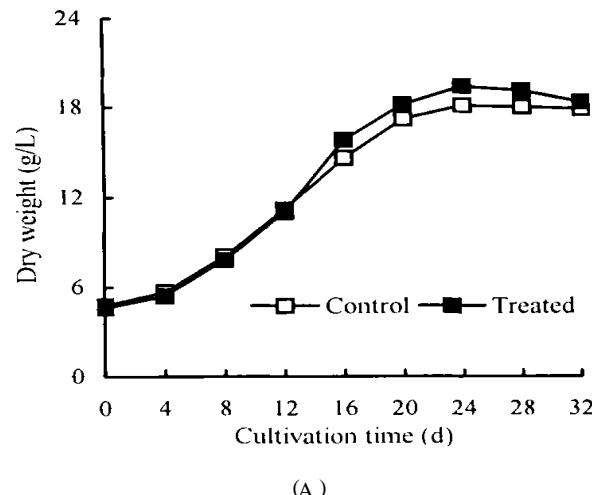


图2 硫酸铈铵添加时间对中国红豆杉细胞培养过程紫杉醇合成及分泌的影响(D4细胞系)

Fig. 2 Effects of ammonium cerous sulphate addition at different culture stages on taxol production and excretion in cell suspension culture of *Taxus chinensis* (cell line D4)

随硫酸铈铵作用时间的延长而增加。第0 d加入硫酸铈铵时紫杉醇胞外释放率为39%, 第20 d加入硫酸铈铵时释放率为22%。

红豆杉细胞培养过程中第12 d加入 2 mg/L 硫酸铈铵, 细胞生长、紫杉醇合成及胞外释放的动态过程(见图3:A)显示, 第12 d添加 2 mg/L 硫酸铈铵对细胞生长有一定的促进作用, 与未加硫酸铈铵的对照组相比细胞干重略有增加, 两者最大细胞干重分别为 19.4 g/L 及 18.1 g/L 。另外, 添加硫酸铈铵组的细胞干重在培养过程的最后12 d中下降较快, 而对照组中细胞干重基本维持不变, 这可能是由于培养后期营养物质缺乏造成硫酸铈铵对细胞的毒害作用增强所致, 因此培养中后期进行补料培养可能有利于细胞干重的进一步增加及紫杉醇产量的提高。图3:B为培养第12 d添加 2 mg/L 硫酸铈铵时紫



(A)

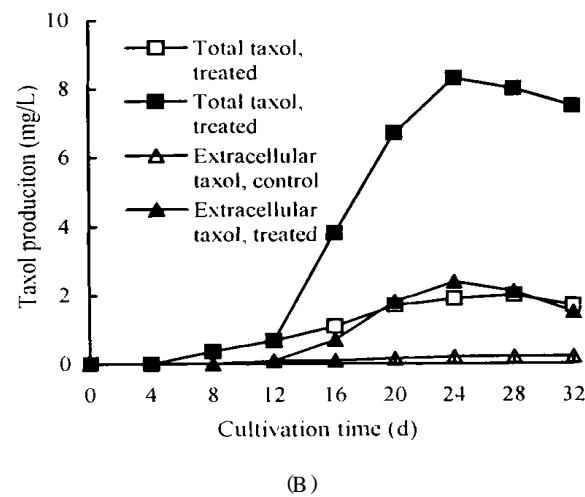


图3 第12 d添加硫酸铈铵时细胞干重(A)、紫杉醇合成及分泌(B)的动态变化

Fig. 3 Time courses of cell growth (A), taxol production and excretion (B) in cell suspension culture of *Taxus chinensis* (cell line D4) with ammonium cerous sulphate added on day 12

杉醇合成及胞外释放的动态过程。培养第 12 d 添加 2 mg/L 硫酸铈铵时总紫杉醇及胞外紫杉醇产量均在第 24 d 时达到最高, 分别为 8.3 mg/L 及 2.4 mg/L。此后总紫杉醇产量及胞外紫杉醇产量均出现下降, 说明紫杉醇可能并非最终代谢产物。胞外紫杉醇产量降低的部分原因可能是由于胞外酶或细胞自溶后释放的胞内酶水解胞外紫杉醇所致。Ketchum^[6]曾报道过紫杉醇的水解, 并认为紫杉醇能被有选择性地水解为 baccatin III, 因此如果能够避免或减少紫杉醇的水解, 则有可能进一步提高紫杉醇产量。硫酸铈铵的添加使最高总紫杉醇产量由未添加时的 1.9 mg/L 提高到 8.3 mg/L, 提高了近 3 倍。

2.3 硫酸铈铵添加与原位提取及补料培养联合应用的影响

采用两相培养对胞外紫杉醇进行原位提取, 一方面可以将释放到细胞外的紫杉醇富集到第二相中, 从而减少紫杉醇的胞外降解。同时, 将胞外释放与原位提取相结合也可以改变紫杉醇的合成以及释放的动态平衡, 解除由于胞内紫杉醇浓度过高造成的反馈抑制, 从而提高紫杉醇产量。植物细胞两相培养过程中的一个重要因素是加入的第二相(有机相)对细胞的毒性问题, 另外紫杉醇应在有机相中有较高的分配系数。有机相(有机溶剂)对细胞/酶的活性影响的研究在近 20 年中取得了很大的进展。对于有机溶剂生物毒性(或生物相容性)的量度参数, 目前广泛采用的是溶剂的 logP 值(溶剂在辛烷及水中的分配系数之比)。当溶剂的 logP 值大于 4 时, 溶剂对细胞的毒害作用较低^[7]。油酸的 logP 值及对紫杉醇的分配系数分别为 7.7 及 154, 较适合作为第二相使用。考虑到紫杉醇主要在对数后期及稳定期大量合成, 所以确定将油酸在对数后期(培养第 16 d)加入。

到目前为止, 不少研究者都对利用两相培养进行原位提取来提高次生代谢产物进行了研究^[8]。图 4 为加入不同体积的油酸对生物量、紫杉醇合成及释放的影响。油酸体积分率的增加使生物量略有下降。Buitelaar 等^[9]曾对由于在水/油界面失活而导致的有机溶剂细胞毒性问题进行了研究, 结果表明这种失活所造成的影响较小。另一方面有机溶剂可能会溶解部分细胞生长所必需的培养基成分, 从而对细胞生长产生影响。由于我们已经在使用有机相之前对其进行了培养基成分的预饱和, 所以这种影响作用也被减小。另外, 油酸体积分率对胞内紫杉醇产量的影响也较小。加入 5% (v/v) 的油酸时总紫杉醇及胞外紫杉醇含量均最高, 分别为 5.4 mg/L 及

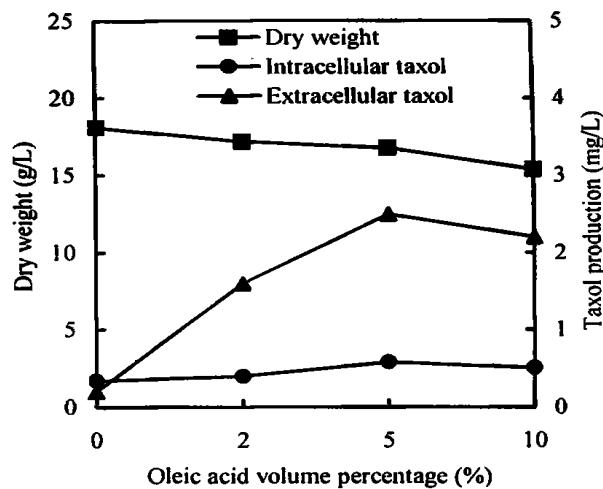
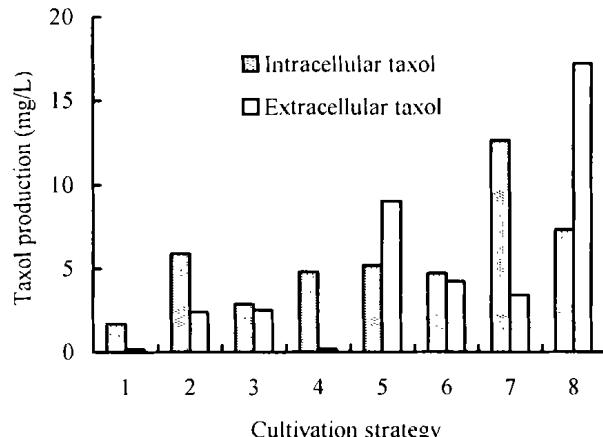


图 4 油酸的体积百分比对细胞生长、紫杉醇合成及分泌的影响(D4 细胞系)

Fig. 4 Effects of oleic acid volume percentage on cell growth, taxol production and excretion in cell suspension culture of *Taxus chinensis* (cell line D4)

2.5 mg/L。

图 5 为胞外释放(添加硫酸铈铵)、原位提取(添加油酸)及补料培养(添加含蔗糖的补料培养液)对紫杉醇合成及释放的影响。添加硫酸铈铵使细胞内、外紫杉醇产量都有较大的提高, 说明硫酸铈铵除了



1. 对照; 2. 第 12 d 加入 2 mg/L 硫酸铈铵; 3. 第 16 d 加入 5% 油酸; 4. 第 16 d 加入 补料培养液(含 20 g/L 蔗糖); 5. 同时添加硫酸铈铵及油酸; 6. 同时补料及添加油酸; 7. 同时补料及添加硫酸铈铵; 8. 同时补料、添加硫酸铈铵及油酸

1. control; 2. 2 mg/L ammonium cerous sulphate added on day 12; 3. 5% oleic acid added on day 16; 4. feeding solution with 20 g/L sucrose added on day 16; 5. ammonium cerous sulphate and oleic acid added; 6. oleic acid and sucrose added; 7. ammonium cerous sulphate and sucrose added; 8. ammonium cerous sulphate, sucrose and oleic acid added

图 5 不同红豆杉细胞培养策略对紫杉醇的合成与分泌的影响(D4 细胞系)

Fig. 5 Influence of different culture strategies on taxol production and excretion in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* (cell line D4)

能改变细胞通透性, 增加紫杉醇胞外释放外, 对紫杉醇的合成也有一定的诱导作用。油酸的添加对胞内紫杉醇产量的提高作用较小(提高 50%), 但却使胞外紫杉醇产量提高了近 10 倍。添加有机相提高紫杉醇产量的原因可以归结为: 有机相对有毒代谢产物的原位提取减少了产物的分解; 改变了胞内/外产物分配平衡^[10]。补料培养使胞内紫杉醇产量提高近 3 倍, 达到 4.8 mg/L, 但对胞外紫杉醇产量几乎没有影响。硫酸铈铵与油酸联合使用时胞外紫杉醇产量达到 9 mg/L, 为对照组的 45 倍; 硫酸铈铵与补料培养联合使用时胞内紫杉醇产量达到 12.6 mg/L, 为对照组的 7.4 倍。将产物释放、原位提取及补料培养三者联合使用时胞内、胞外紫杉醇产量分别达到 7.3 mg/L 及 17.2 mg/L, 总紫杉醇产量达到 24.5 mg/L, 且 60% 的紫杉醇释放到胞外。实验结果表明, 通过这些方法, 可以使细胞部分转化为分泌型细胞。这样既有利于解除胞内产物抑制, 促进紫杉醇的大量合成, 又有利于工业化生产紫杉醇的下游提取。

参考文献

- [1] Choy H. Taxanes in combined modality therapy for solid tumors [J]. *Critical Review Oncol Hematol*, 2001, **37**: 237–247.
- [2] Zhong J J, Meng X D, Zhang Y H, et al. Effective release of ginseng saponin from suspension cells of *Panax notoginseng* [J]. *Biotechnol Tech*, 1997, **11** (4): 241–243.
- [3] Knowl C, Yoo Y J, Lee J H, et al. Enhancement of taxol production by *in situ* recovery of product [J]. *Proc Biotech*, 1998, **33**: 701–707.
- [4] Luo J, Liu L, Wu C D. Enhancement of Taxol production by abscisic acid in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* [J]. *Biotechnol Lett*, 2001, **23**: 1345–1348.
- [5] Nie Y, Chen Y, Zhang S. Effect of compounds of La, Sm, Eu and Yb on human body cell culture *in vitro* [J]. *J Rare Earths*, 1990, **8** (4): 350–355.
- [6] Ketchum R E B, Gibson D M, Croteau R B, et al. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **62**: 97–105.
- [7] Laane C, Boeren S, Vos K, et al. Rules for optimization of biocatalysts in organic solvents [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **30**: 81–87.
- [8] Dornenburg H, Knoor D. Semicontinuous processes for anthraquinone production with immobilized *Cucurbita glabra* cell cultures in a three-phase system [J]. *J Biotechnol*, 1996, **50**: 55–62.
- [9] Buitelaar R M, Vemula M H, Schlatmann J E, et al. The influence of various organic solvents on the respiration of free and immobilized cells of *Tagetes minuta* [J]. *Biotechnol Tech*, 1990, **14**: 415–418.
- [10] Freeman A, Woodley J M, Liley M D. *In situ* product removal as a tool for bioprocessing [J]. *Biotechnol*, 1993, **11**: 1007–1012.