

Effect of Sucrose and Inoculating Quantity Combination on the Indole Alkaloids Synthesis of *Catharanthus roseus* Culture Cell

Nan Zhao, Wen Chen, Zhigang Guo*

Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing
Email: *guozhig@mail.tsinghua.edu.cn

Received: Mar. 21st, 2012; revised: Apr. 14th, 2012; accepted: Apr. 28th, 2012

Abstract: The experimental results show that, the initial pH of 6.5 is the optimum condition to the accumulation of cell biomass and the synthesis of indole alkaloids. When inoculation rate is at 20%, the content of indole alkaloids increase with the sucrose concentration increased, add 90 g/L sucrose, the content of vinblastine reached 1.7 mg/g dry cell. When the inoculation rate increased to 25% or 30%, a lower concentration of sucrose is conducive to the synthesis of indole alkaloids. 60 g/L sucrose and 25% of the inoculation rate combination is conducive to the cell biomass accumulation.

Keywords: *Catharanthus roseus*; Cell Culture; Vinblastine; Terpene Indole Alkanoid

蔗糖与接种量组合对长春花培养细胞吲哚生物碱合成的影响

赵楠, 陈文, 郭志刚*

清华大学化学工程系, 北京
Email: *guozhig@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2012年3月21日; 修回日期: 2012年4月14日; 录用日期: 2012年4月28日

摘要: 实验结果表明, 初始 pH 为 6.5 时有利于细胞生物量积累和吲哚生物碱的合成。接种量在 20% 时, 随着蔗糖浓度的提高吲哚生物碱的含量也提高, 添加 90 g/L 蔗糖时, 长春碱的含量达到了 1.7 mg/g 干细胞。当接种量提高到 25% 或 30% 时, 较低浓度的蔗糖有利于吲哚生物碱的合成。60 g/L 蔗糖与 25% 接重量组合有利于细胞生物量的积累。

关键词: 长春花; 细胞培养; 长春碱; 萜类吲哚生物碱

1. 引言

长春花植物体中的长春碱和长春新碱的含量仅有百万分之几或十万分之几^[1], 但是, 由于长春碱或长春新碱的特殊抗癌疗效, 人们不得不花费巨额成本从长春花植物体分离长春碱或长春新碱。为了降低长春碱的生产成本, 科学家想通过长春花细胞培养, 提高细胞中的长春碱或长春新碱含量, 以实现长春碱或

长春新碱的稳定生产。近 30 年来, 研究者在长春花高产细胞系的筛选^[2-4], 不同植物器官的培养与培养条件优化^[5-7], 通过诱变剂诱导和筛选抗性细胞株培养^[8-11], 通过液液两段培养, 在产物合成阶段通过添加代谢前体和诱导子等^[12-17]各个方面进行了大量研究。也确实大幅度提高了蛇根碱、阿玛碱或长春质碱的含量。但是绝大多数研究不能从培养细胞中获得长春碱或长春新碱。Parr^[7]等从转化的发根中检测到了长春碱的存在, 但在离体培养的根中却检测不到长春碱。

*通讯作者。

Miura 和 Okazaki^[18]在长春花细胞培养中得到了微量的长春碱。但是到目前为止,还没有长春花细胞培养可以获得更高长春碱含量的报告。

根据我们的前期实验得知,在细胞培养液中添加蛇根碱合成途径的酶抑制剂可以有效地抑制蛇根碱的合成,同时大幅度提高了长春质碱的含量^[19],在此基础上再添加长春碱合成途径中的前体和诱导子等进行综合调控,就能促进长春碱的合成。本文在以上研究的基础上,再次探讨 pH、接重量、培养基含糖量对长春碱及其他吲哚类生物碱合成的影响。

2. 材料与方法

2.1. 细胞培养方法

长春花细胞系是本实验室诱导并驯化培养 2 年的 C03 细胞系,实验采用固-液两步法。继代或细胞扩增培养基为改良 Murashige & Skoog(MS)固体培养基,添加 0.5 mg/L BA(6-苄氨基嘌呤),0.5 mg/L NAA(萘乙酸),30 g/L 蔗糖,5.5 g/L 琼脂,pH 调节为 5.6~5.8。继代培养采用 50 mL 培养基/200 mL 三角瓶,在 12℃ 高压灭菌 18 分钟后冷却备用,每瓶接种 6~7 块大小均匀且处于生长旺盛期的细胞团,接种量为鲜重 1.5 g ± 0.1 g/瓶。25℃,避光培养,每 3 周继代培养一次。实验用细胞是通过扩增培养获得的生长旺盛的长春花细胞。

长春碱合成培养采取细胞悬浮培养方式,合成培养基采用 1/2 改良 MS 培养基,添加 0.5 mg/L BA,0.5 mg/L NAA,30 g/L 蔗糖,100 mg/L 色氨酸、50 mg/L 丙酮酸钠、50 mg/L 马钱子苷和 30 mg/L 氯化铯,再在无菌条件下利用 0.42 μm 孔径的无菌过滤膜过滤加入 0.6 mg/L 维生素 C、5 μg/L 乙酰辅酶 A、20 μg/L 过氧化氢、0.5 μM/L 苯丙三氮唑和 8.4 mg/L 萘普生等代谢调节因子后备用。

2.2. pH 实验设计

将上述长春碱合成培养液 750 mL 分成 5 组,分别将其 pH 值在无菌条件下调整为 4.5、5.0、5.5、6.0 和 6.5,然后将每组 150 mL 培养液分装在三个 200 mL 三角瓶中,既 50 mL/瓶,在超静工作台每瓶接种 10 g 细胞,之后固定在 110 rpm 旋转培养装置上进行悬浮培养,培养周期为 5 天,培养温度为 25℃ ± 1℃。

2.3. 细胞接种量和蔗糖添加量的均匀实验设计

在 1/2 改良 MS 培养基中,添加 0.5 mg/L BA,0.5 mg/L NAA 和 2.1 中所列出的代谢前体、诱导子和酶抑制剂的基础上,选取了三种接种量 20%、25%、30%,三种蔗糖含量 30 g/L、60 g/L、90 g/L,进行均匀实验设计(见表 1),实验分为九个组合,pH 分别调整为 6.5,每组实验为 3 个 200 mL 三角瓶,每瓶分装 50 mL 培养液,每瓶接种 10 g 细胞,之后固定在 110 rpm 旋转培养装置上进行悬浮培养,培养周期为 5 天,培养温度为 25℃ ± 1℃。

2.4. 长春花生物碱的提取

采用超声萃取与摇床萃取相结合的方法对长春花吲哚生物碱进行提取,条件如下:收获上述各实验处理的细胞,经冷冻干燥至恒重并称干重,然后研磨,精确称取样品 200 mg,置于 25 mL 磨口锥形瓶内,加入 5 mL 甲醇,摇匀,用超声提取 30 min,放在摇床上抽提 12 h(100 rpm, 25℃),离心获取上清液。同时将细胞残渣再次加入 5 mL 萃取液,重复第一次抽提步骤。合并二次萃取液,旋转蒸发至干,再用 5 mL 色谱级甲醇稀释并定容为 5 mL,再用 0.45 μm 微孔滤膜过滤到分析用小瓶中待测。

2.5. 长春花生物碱的检测

本实验利用 HPLC 对长春花细胞中的吲哚生物碱进行定量分析。HPLC 分析条件如下:利用 SHIMADZU-CLASS-10Avp 型高效液相色谱,色谱柱为岛津公司 Shim-pack C18 反相柱 PREP-ODS (H)KIT (4.6 × 250 mm),流动相:A:含有 3.1 g/L 乙酸铵和 5 mL/L 甲酸的纯水溶液,B:为色谱级甲醇,等比洗脱:A:B = 1:1,流动相流速:0.8 mL/min,紫外检测器检测波长:260 nm,柱箱温度:40℃。

长春质碱、文多灵、长春碱、它波宁的标准品购于上海康爱生物制品有限公司,样品纯度大于 98%。

Table 1. Uniform experimental combination of sucrose content and inoculation rate
表 1. 蔗糖含量和接种量的均匀实验组合

Inoculation rate	30 g/L sucrose	60 g/L sucrose	90 g/L sucrose
20%	1	2	3
25%	4	5	6
30%	7	8	9

3. 结果与讨论

3.1. pH 对细胞生长和吲哚类生物碱合成的影响

如图 1 所示, 当初始 pH 降低到 4.5 或 5.0 时, 鲜细胞重量有所减少。当初始 pH 调整在 5.5~6.5 时, 鲜细胞和干细胞的重量均有所增加, 而且随着 pH 的升高而增加。实验结果表明, 较高的初始 pH 值有利于长春花细胞的生物量积累。

图 2 表示了不同初始 pH 条件对吲哚生物碱合成的影响。在初始 pH 为 5.5 时, 各种吲哚生物碱的含量均较低。当初始 pH 值为 4.5 或 6.5 时, 长春碱的含量达到最高的 0.16 mg/g, 是其他 pH 值处理的 2~6 倍。长春碱在较低或较高 pH 条件下合成能力增强的原因还需要进一步研究。长春质碱在初始 pH 为 5.0 时的

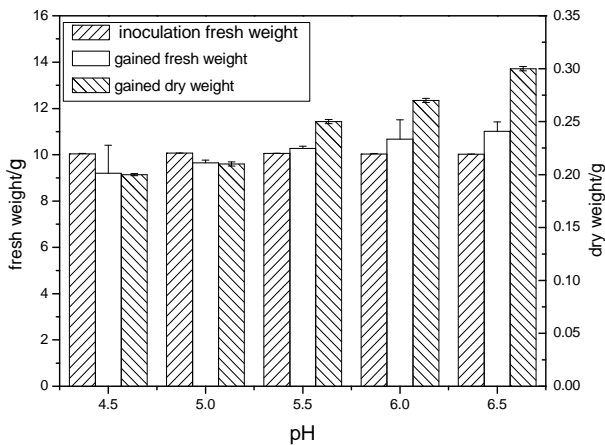


Figure 1. Effect of different initial pH on cell growth of *Catharanthus roseus*

图 1. 不同初始 pH 对长春花细胞生长的影响

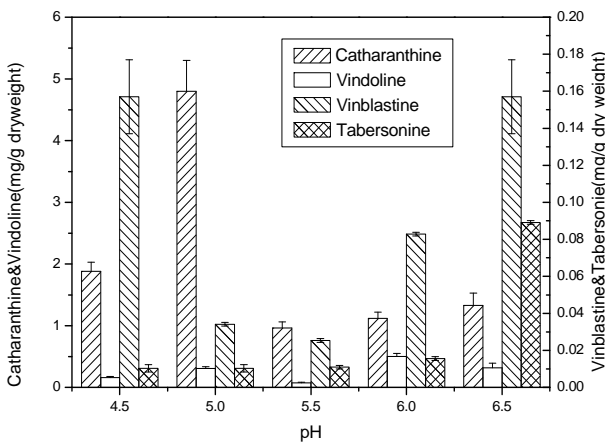


Figure 2. Effect of different initial pH on *Catharanthus roseus* indole alkaloid synthesis

图 2. 不同初始 pH 对长春花吲哚生物碱合成的影响

合成量最多, 是其他 pH 处理的 2.5~3 倍, 表现出极大的 pH 偏好性。但在此 pH 条件下其他生物碱的合成量均较少。这可能是由于长春质碱合成途径中的相关酶在 pH 为 5.0 时活性较高, 由于长春质碱的合成与它波宁和文多灵分别在两个不同的分支途径, 长春质碱的过量合成, 反而会抑制文多灵或长春碱的合成。文多灵虽然在初始 pH 为 6.0 时合成量最高, 但是由于文多灵是合成长春碱的前体, 所以各 pH 处理之间没有显著性差异。它波宁是合成文多灵的前体, 在 pH 为 6 以下时其合成量没有显著差异, 在初始 pH 为 6.5 时合成量较多。根据以上实验结果, 为了提高最有经济价值的长春碱含量, 兼顾到其他生物碱的含量以及生物量的积累, 长春花生物碱合成的最佳初始 pH 应该设定在 6.5 左右。

3.2. 细胞接种量和培养基糖含量对吲哚类生物碱合成的影响

蔗糖不仅为细胞提供碳源, 而且在提高培养液渗透压, 维持细胞内外渗透压平衡以及物质传质等起着重要作用。细胞的接种量不但会直接影响到生物碱的总产量, 同时也会影响到培养液的渗透压。因此细胞接种量和蔗糖的交互作用, 会影响细胞生物量积累和吲哚生物碱的合成。为了优化出接种量和蔗糖浓度的最佳参数, 我们采取了二因素三水平的均匀试验设计。

细胞接种量和蔗糖浓度组合对于长春花细胞生长的影响如图 3, 可以明显看到随着接种量的增加, 生物量(干细胞)也有所增加。在含糖量相同的情况下,

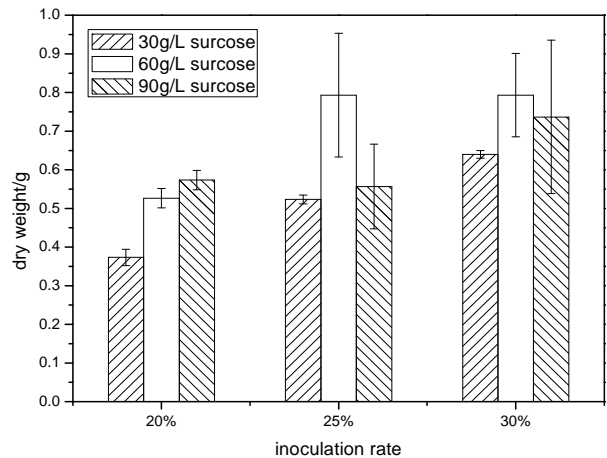


Figure 3. Effect of inoculation rate and sucrose content on cell biomass

图 3. 不同接种量和蔗糖浓度对细胞生物量的影响

例如添加 30 g/L 蔗糖时, 25%接种量处理的生物量(0.52 g/瓶)比 20%接种量处理(0.37 g/瓶)提高了 1.4 倍(接种量提高了 1.25 倍); 30%接种量处理的生物量(0.64 g/瓶)比 20%接种量处理(0.37 g)提高了 1.7 倍(接种量提高了 1.5 倍)。因此说明 25%和 30%的接种量均促进了生物量积累。当蔗糖含量为 60 g/L 时, 25%接种量处理的细胞干重(0.8 g/瓶)与 30%接种量处理基本相同, 比 20%接种量处理(0.52 g/瓶)提高了约 1.5 倍。结果表明 25%接种量较有利于生物量积累。结合接种量和蔗糖浓度进行分析, 在细胞接种量为 20%时, 随着蔗糖浓度的提高, 生物量积累有所增加。表明在接种量较低的情况下, 提高蔗糖浓度, 不但可以为细胞提供更充分的营养物质, 而且由于培养液渗透压的改善而促进了生物量积累。但是其影响效果并非成正比。也就是说, 当蔗糖浓度提高到 90 g/L 时, 其生物量并没有按比例增加。当细胞接种量提高到 25%或 30%时, 在培养液中添加 60 g/L 蔗糖更有利于生物量积累, 而添加 90 g/L 蔗糖的生物量反而有所减少。这可能与过高的蔗糖浓度会过度提高培养液的渗透压有关。实验结果表明, 培养液中添加 60 g/L 蔗糖有利于生物量积累。从接种量考察, 在添加 60 g/L 蔗糖时, 25%和 30%接种量的处理之间没有显著差异。说明 30%接种量处理由于细胞密度的增加所造成的营养竞争以及渗透压升高而不适合生物量积累。因此, 25%接种量与 60 g/L 蔗糖组合比较有利。

细胞接种量与培养液含糖量对长春花细胞吲哚生物碱合成的影响如图 4~6。从图 4 可以看到, 在蔗糖浓度为 30 g/L 的前提下, 四种生物碱的含量随着接种量的提高而增加。当接种量提高到 30%时(2.2 mg/g 干重), 长春质碱的含量是 20%接种量(0.5 mg/g 干重)的 4 倍多。而接种量为 25%(0.8 mg/g 干重)时的含量也是 20%接种量的 1.6 倍。文多灵在三种不同的接种量处理中(20%、25%、30%), 后一组相对于前一组均提高了 2 倍。长春碱和它波宁的含量则随着接种量的提高而显著增加。两者在 30%接种量时的长春碱和它波宁含量分别比 20%接种量处理提高了约 7 倍(为 0.54 mg/g 干重)和 9 倍(为 0.84 mg/g 干重)。实验结果表明, 在含糖量较低情况下, 增加细胞的接种量能够促进长春花吲哚生物碱的合成。

图 5 表示了蔗糖浓度为 60 g/L 时吲哚类生物碱的

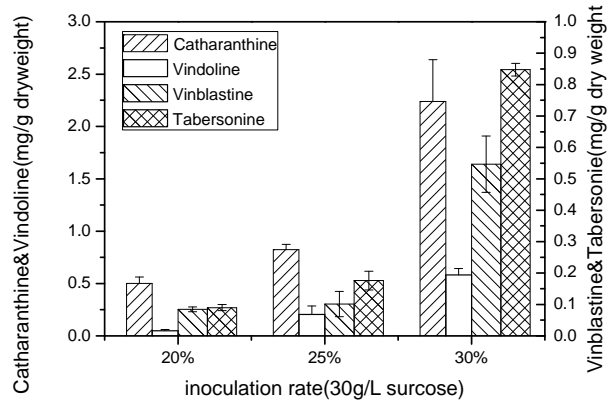


Figure 4. When sucrose is 30 g/L, effect of different inoculation rate on alkaloid synthesis

图 4. 蔗糖含量为 30 g/L 时不同接种量对生物碱含量的影响

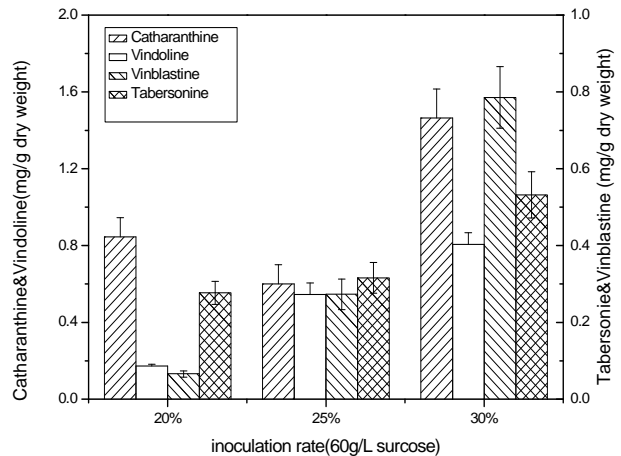


Figure 5. When sucrose is 60 g/L, effect of different inoculation rate on alkaloid synthesis

图 5. 蔗糖含量为 60 g/L 时不同接种量对生物碱含量的影响

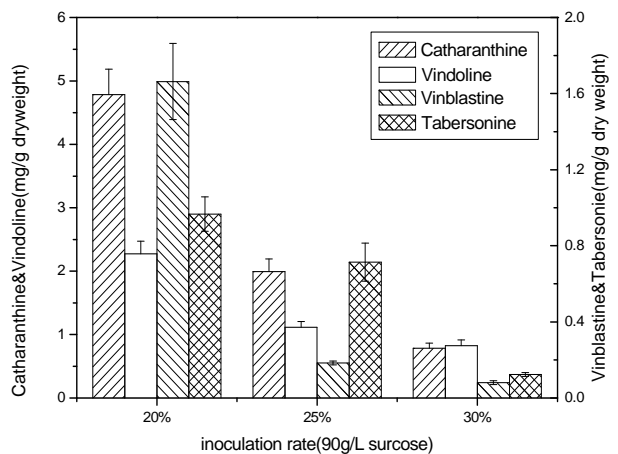


Figure 6. When sucrose is 90 g/L, effect of different inoculation rate on alkaloid synthesis

图 6. 蔗糖含量为 90 g/L 时不同接种量对生物碱含量的影响

合成情况。结果表明, 吲哚生物碱的含量除长春质碱

外,均随着接种量的提高而增加。这可能与长春质碱的合成与其他三种生物碱的合成分别在不同的代谢支路有关。文多灵的含量在30%和25%接种量处理时分别比20%接种量处理提高了大约5倍(为0.8 mg/g干重)和3倍(为0.54 mg/g干重)。而长春碱的含量在30%和25%接种量处理时分别比20%接种量处理提高了大约13倍(为0.78 mg/g干重)和5倍(为0.27 mg/g干重)。实验结果表明,60 g/L蔗糖浓度与30%接种量组合有利于各种长春花吲哚生物碱的合成。

当蔗糖浓度达到90 g/L时,长春花吲哚生物碱的含量随着接种量的增加而降低(图6)。20%接种量处理大幅度提高了各种生物碱的含量。如长春质碱的含量提高到4.8 mg/g,文多灵的含量达到2.2 mg/g,长春碱的含量提高到1.7 mg/g,它波宁的含量达到了0.95 mg/g。

以上实验结果结合生物量积累(图3)可以看到,在蔗糖浓度达到90 g/L时,20%接种量处理的细胞生长几乎不受抑制,但接重量提高到25%或30%时,细胞的生长受到了抑制,同时吲哚生物碱的含量也随之减少。这是由于高糖浓度和高接种量组合大幅度提高了培养体系的渗透压以及造成细胞之间发生营养竞争,从而严重影响了细胞的物质代谢能力。此外,由于高糖浓度增加了培养液的粘性而影响了气体传质;而细胞量的增加过度地消耗了溶液中的溶氧而引起供氧不足,因此就严重影响了长春花细胞吲哚生物碱的合成。虽然,60 g/L蔗糖与30%接种量组合有利于生物量积累,但是90 g/L蔗糖和20%接种量组合更有利于长春碱的合成。

此外,我们再纵向观察上述实验结果(图4~6),并结合细胞的生物量积累可以看到,当接种量为20%时,随着蔗糖浓度的提高,各类生物碱的含量均大幅度提高。而接种量增加到25%或30%时,这种规律则被打破。比如在25%或30%接种量处理时,它波宁的含量随着蔗糖浓度的增加而减少。长春碱最大峰值出现在60 g/L蔗糖浓度处理。在接种量为25%时,长春质碱的含量随着蔗糖浓度的升高而增加,而在接种量为30%时,其含量却随着蔗糖浓度的升高而降低。文多灵虽然在接种量相同的情况下,其含量随着蔗糖浓度的提高而增加,但是其增加幅度很有限。本实验证明,接种量和蔗糖浓度与长春花细胞的生物碱合成密

切相关。其原因可能是通过渗透压调节细胞对物质的吸收、通过培养体系的粘度而影响气体传质、通过细胞的耗氧量而影响细胞代谢能力等多因素综合调控长春花细胞的生物碱合成。

4. 结论

实验结果表明,初始pH在6.5时有利于细胞生物量积累以及各类吲哚类生物碱的合成。初始pH为5.0有利于长春质碱的合成。接种量与蔗糖浓度具有互补作用。当接种量在20%时,提高蔗糖浓度有利于长春花吲哚类生物碱的合成。当接种量提高到25%或30%时,较低的蔗糖浓度有利于吲哚类生物碱的合成。虽然60 g/L蔗糖与25%接重量组合有利于细胞生物量的积累,但是在此条件下的生物碱合成能力较弱。综合考虑90 g/L蔗糖与20%接种量组合最适合于长春碱等吲哚类生物碱的合成。

参考文献 (References)

- [1] 刘红蕾,张玉臻,陶文沂. 营养及环境因子对农杆菌诱导的长春花发根生长和生物碱生成的影响[J]. 药物生物技术, 2003, 10(2): 155-158.
- [2] S. Brown, R. C. Cresswell. Selection study on *Catharanthus roseus*. *Physiol Veg*, 1984, 22: 254-271.
- [3] 孙祥海. 植物次生代谢物的细胞培养技术研究进展[J]. 龙岩学院学报, 2005, 23(6): 60-67.
- [4] 郭胜娟,杨春燕,冯玲玲等. 长春花愈伤组织的诱导与增殖[J]. 华中师范大学学报, 2004, 38(2): 228-230.
- [5] 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.
- [6] 黄小龙,谢达平. 植物代谢工程的研究现状[J]. 生物学杂志, 2003, 20(2): 11-14.
- [7] A. J. Parr, A. C. J. Peerless and J. D. Manill. Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Report Plant Cell*, 1988, 7(5): 309-312.
- [8] A. Pietrosiuk, M. Furmanowa and B. Łata. *Catharanthus roseus*: Micropropagation and *in vitro* techniques. *Phytochemistry Reviews*, 2007, 6(2-3): 459-473.
- [9] J. A. Morgan, J. V. Shanks. Determination of metabolic rate-limitations by precursor feeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Journal of Biotechnology*, 2000, 79(2): 137-145.
- [10] A. Dutta, J. Batra, S. Pandey-Rai, et al. Expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Planta*, 2005, 220(3): 376-383.
- [11] 谢从华,柳俊. 植物细胞工程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 74-149.
- [12] M. El-Sayed, R. Verpoorte. Methyljasmonate accelerates catabolism of monoterpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* during leaf processing. *Fitoterapia*, 2005, 76(1): 83-90.
- [13] K. H. Jung, S. S. Kwak. Development of 2-Stage culture process by optimization of inorganic salts for improving catharanthine production in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1994, 77(1): 57-61.

- [14] M. J. Xu, J. F. Dong. Nitric oxide stimulates indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures through a protein kinase-dependent signal pathway. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37(1): 49-53.
- [15] M. J. Xu, J. F. Dong. O_2^- from elicitor-induced oxidative burst is necessary for triggering phenylalanine ammonia-lyase activation and catharanthine synthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(2-3): 280-284.
- [16] Z. J. hao, W. H. Zhu and H. Qiu. Enhanced catharanthine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 28(7-8): 673-681.
- [17] 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.
- [18] Y. Miura, K. Hirata, N. Kurano, et al. Alkaloid production in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*. *Biological Chemistry*, 1987, 51(5): 611-614.
- [19] Z. G. Guo, Y. Liu and X. H. Xing. Enhanced catharanthine biosynthesis through regulation of cyclooxygenase in the cell suspension culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Process Biochemistry*, 2011, 46(3): 783-787.