

## 药用植物细胞培养代谢全能性 及产物检测技术的研究进展

# Progress of Researches on the Totipotency of Metabolism in Cultural Cells of Pharmaceutical Plants and Techniques of Its Products Detecting

朱西儒

雷光富

Zhu Xiru

Lei Guangfu

(中国科学院华南植物研究所 广州 510650)

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou, 510650)

**摘要** 回顾“植物培养细胞次级代谢全能性”理论的发展和应用,为开辟一条新的生产途径和一个新型产业提供参考依据。同时报道如何简便、快速、灵敏、专一性强,适于植物组织和细胞培养物中次生代谢物的检测新方法,以便大规模地进行细胞系筛选。

**关键词** 药用植物细胞培养 次级代谢全能性 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

中图法分类号 Q 944.6

**Abstract** The development and application of “the totipotency of secondary metabolism in the cultural cells” were reviewed in this paper, so a basis was provided for opening up the new path of production and industry. At the same time, new methods of the rapid simple sensitive special and suitable to detecting the products from secondary metabolism in the cultural tissue or cells of pharmaceutical plants were reviewed, so that the lines of plants were screened in large scale.

**Key words** cell culture of pharmaceutical plant, totipotency of secondary metabolism, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

根据“植物培养细胞次级代谢全能性”的理论,即在适宜的人工培养条件下,任何植物离体细胞都具有亲本次级代谢物的合成能力。次级代谢物合成所必须的遗传的、生理的基础都存在于一个离体培养的细胞内。如果将植物细胞培养技术引入有用化学物质生产,把细胞作为一个“活的工厂”,便可改变原来靠大面积栽培或野生资源来获得原料的传统习惯<sup>[1~7]</sup>。

植物组织与细胞培养生产有用的次生代谢产物已是生物技术的重要内容<sup>[3]</sup>, 成为植物组织培养生产应用研究的二大主流之一。它的优越性有: (1) 不受地区、季节、土壤及有害生物 (包括病虫害) 的影响; (2) 细胞生长控制和代谢过程合理调节, 可降低成本和提高生产率<sup>[3,4]</sup>; (3) 有利于细胞筛选, 生物转化, 寻找新的有效药用成分<sup>[5]</sup>; (4) 个体差异小, 试验周期短, 设备简单, 能节省人力、物力<sup>[2,6]</sup>; (5) 减少大量用于种植原材料的农田, 以便进行粮食作物的生产<sup>[3,4,7]</sup>。

因此, 有必要回顾总结, 为进一步大力发展该领域的产业化研究与应用, 使现代农业高新技术深入推广, 不断提高经济效益和社会效益。

## 1 植物次级代谢细胞工程的回顾

1902年, Haberlandt 首先提出在营养液中培养植物细胞的设想<sup>[8,9]</sup>。后来, 美国 Routier 和 Nickell (1956)<sup>[3,10]</sup> 提出植物细胞培养合成天然产物的专利, 企图不受自然因素限制, 在人工条件下, 利用细胞大量培养方法工业化生产各种药物。

直至本世纪 50 年代, 植物次级代谢物细胞工程的研究甚少, 可以说是启蒙时期。培养组织的次级代谢物未能检测确定, 仅限愈伤组织培养阶段。Arreguin 和 Bonner (1950)<sup>[2]</sup> 开始诱导和培养了橡胶 (*Hevea brasiliensis* Muell-Arg) 茎愈伤组织, 试图获得橡胶但未成功。直到 1957 年, 进行颠茄 (*Atropa belladonna*) 的离体培养, 但其中有无“阿脱品”尚未定论。

到 60 年代, 可以说是初期阶段, 研究报告不超过 20 篇。在我国, 罗士韦首先对人参组织培养作了研究, 未能连续而中断<sup>[2]</sup>。

随后, Kaul 和 Staba (1967) 从牙签草 (*Ammi visnaga*) 愈伤组织细胞悬浮培养和发酵物中分离出呋喃色酮 (furanochromones) 结晶, 并经鉴定证明为目的次级代谢物; 对三角叶薯蓣 (*Dioscorea deltoidea*) 中的薯蓣皂甙元 (diosgenin) 进行研究<sup>[2]</sup>, 得到理想结果。

在 70 年代, 植物次级代谢细胞工程的研究飞速发展, 论文比前 20 年增长 10 倍以上<sup>[3,11-13]</sup>。主要进展是:

- (1) 开展生长快、次级代谢物含量高而稳定的优良系<sup>[3]</sup>筛选, 并获成功;
- (2) 将生物转化成功地用于植物次级代谢物细胞工程<sup>[14]</sup>, 并肯定其价值;
- (3) 细胞培养的规模已达中试水平。如人参已达 13 t 的发酵罐, 毛地黄 (*Digitalis sp.*) 培养也达 300 L 的发酵罐<sup>[9,10,15]</sup>;

- (4) 培养物中的次级代谢物含量超过或接近原有植物, 培养技术有了较大提高。

据不完全统计, 有 20 多种植物获得成功。例如三七 (*Anisodus acutangulus*)<sup>[16]</sup>、云南萝芙木 (*Rauwolfia yunnanensis*)<sup>[17]</sup>、盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis*)<sup>[18]</sup>、人参 (*Panax ginseng*)<sup>[2,3]</sup>、延胡索 (*Corydalis sp.*)<sup>[2]</sup>、水仙 (*Narcissus sp.*)、粗榧 (*Cephalotaxus sinensis*)、水飞蓟 (*Silybum marianum*) 等。

80 年代是植物次级代谢物细胞工程研究有重大突破的黄金时代, 仅 1980 年~1986 年发表论文数比前 30 年的总数还多。据不完全统计, 有 40 种以上的资源植物次级代谢物细胞工程首次成功, 且近中试程度。在优良培养系的选育方面, 有 20 多种以上的资源植物获得突破性进展<sup>[3,10-13,15,19,20]</sup>, 如:

- (1) 一些资源植物代谢物细胞工程研究已实现了工业生产, 如人参、毛地黄、紫草

(2) 许多濒危、经济价值高的资源植物次级代谢物细胞工程研究达到了工厂中试水平。如人参根培养达 2 000 L 规模, 长春花 (*Catharanthus roseus*) 培养也达 200 L<sup>[3]</sup>; Hashi-moto (1982)<sup>[2]</sup>用 20 L 罐培养烟草 (*Nicotiana tabacum*) 细胞; 郑光植 (1986) 在 10 L 罐中培养了三七细胞<sup>[3]</sup>; Smart (1987) 用气升式培养红花细胞, 也都达到中试阶段<sup>[9, 15]</sup>;

(3) 植物次级代谢物细胞工程研究正在向工厂化过渡。如 Anderson (1987)<sup>[3]</sup>在臭椿 (*Ailanthus altissima*) 细胞悬浮培养中, 生物碱含量高达干重的 1.2%, 为原植物的 100 多倍。候嵩生 (1986)<sup>[4]</sup>从九连小檗 (*Berberis julianae*) 的培养细胞中分离到产率高达干重 1% 的药根碱 (jatrorrhizine) 结晶;

(4) 在次级代谢物的检测和培养技术方面, 得到进一步改进提高。普遍使用薄层层析、气相层析、高压液相色谱、红外、紫外、核磁、质谱等常规手段, 测试和鉴定次级代谢物。超微量方法, 如 Hall 等 (1982)<sup>[2, 4]</sup>用体内分光光度法测定胡萝卜和长春花培养的单细胞中的花色甙。培养技术中, 固定培养、两步培养、半连续、连续、看护、微宝、多级、低稀释速、抗细胞切变等方法, 以及气升式新型发酵培养等等<sup>[10, 12]</sup>;

(5) 优良培养系的筛选普遍, 并取得显著效果。如郑光植 (1986) 用<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线诱变三七愈伤组织, 得到变异体的生长速率是亲本的 4 倍, 东莨菪碱含量比亲本提高 30%<sup>[3]</sup>。Yoshikawa (1986) 选出红花 (*Cathamus tinctorius*) 细胞系的生长速率比亲本高 2 倍<sup>[4]</sup>, 维生素 E 含量增长 5 倍。23 个毛地黄细胞突变无性系的筛选, 得到一个具高选择性, 在 12 位碳 U-羟基作用的优良细胞系。

除上述研究外, 还进行了当归 (*Angelica sinensis*)<sup>[7]</sup>、青蒿 (*Artemisia annua*)<sup>[4]</sup>、长春花、延胡索等的优良培养系研究。迄今, 已培养过的植物种类愈 400 种, 所得产物也已超过 600 种, 包括几十个类别。其中紫草素、甲基地高辛已投入商业化生产<sup>[8, 10, 12]</sup>。

## 2 植物细胞代谢多途径理论的研究

在 90 年代中, 国内外植物次级代谢产物细胞工程的研究进入了工业化的新阶段, 它与基因工程、快速繁殖形成了三大主流。除了继续在生物合成途径方向和其中间产物分析鉴定方面广泛研究外, 研究者们开始了次级代谢途径、作用机理方面深入研究, 为细胞培养走向工厂化提供理论依据<sup>[5, 10, 13]</sup>。

代谢是生物具有的生命过程, 植物的代谢可分为初级代谢和次级代谢。后者大多与植物的存在和繁育无直接关系, 又不参与主要代谢过程, 在代谢中不起主要作用。同时, 由于它的途径和产物的种类和结构的多样性和复杂性, 它的研究远不如初级代谢深入、清楚<sup>[3, 8, 21]</sup>。

生物合成途径方面及其中间产物分析鉴定<sup>[21]</sup>的研究表明, 次级代谢也同初级代谢一样, 有“多条途径”即: 同一底物可通过不同的代谢途径合成不同的代谢产物; 同一产物可由同一底物通过不同途径产生, 也可由不同底物通过不同途径形成<sup>[22-24]</sup>。

影响培养细胞生长和有用化学物质积累的因素有: (1) 植物本身的特性, 如组织的来源、生长状况、形态分化; (2) 培养条件 (化学因素), 如碳水化合物、氮素、维生素、植物激素、前体、培养基、营养成分; (3) 环境条件 (物理因素), 如温度、pH 值、光; (4) 生物因素, 如继代周期、继代培养代数; (5) 内部因素, 如初级代谢对次生代谢的调节、次级代谢的酶促调节<sup>[14, 25]</sup>。

条件的控制,就会使代谢朝所需终产物方向增强,达到提高次级产物含量的目的<sup>[17]</sup>。作者在研究次生代谢产物——印楝素合成适宜条件中的结果也证实了这一点<sup>[1,26]</sup>。

### 3 印楝素及其提取物杀虫作用和印楝细胞培养

具杀虫作用的植物,已报道的达1600种以上(赵善欢,美国植保科研的特点与杀虫剂毒理学的研究方向.广州市科技情报研究所,1979.1~8.)其中,最受关注的就是印楝(*Azadirachta indica* A. Juss) 1980年至1994年,先后召开4次国际印楝会议,专题研究和讨论印楝的杀虫活性物质及其机理和应用<sup>[21,27]</sup>。

目前,化学合成杀虫剂在农业病虫害防治中仍然居于主导地位,导致害虫产生抗药性、环境污染、人畜中毒和破坏生态平衡等问题,与综合防治理论相悖<sup>[1]</sup>。从而,引起举世的关注。试图从各个途径来解决日益突出的农药公害问题,如生物防治、农业技术防治、培育抗性品种等等<sup>[16]</sup>。从天然产物中寻找生物活性成分,已在国内外广泛研究,并已取得较大的成就。植物性农药(杀虫剂)来源于自然,对昆虫作用机制特异,对人畜和有益生物比较安全,对农作物无药害、无残留、不污染环境及农产品,害虫不易产生抗药性,能较好地与综合防治相匹配,有着很大应用前景<sup>[28]</sup>。

印楝又名“印度丁香”,为楝科楝属热带乔木,原产于缅甸,在亚洲南部、非洲和南美洲的许多地区都有分布和栽培。我国没有印楝的自然分布,在80年代,华南农业大学昆虫毒理室赵善欢教授曾成功地引种于海南省,但是目前发展的数量极少,远远不能满足现实需要<sup>[21]</sup>。

印楝具有多种杀虫作用,特别是抑制害虫取食和干扰害虫生长发育更为突出。早在几十年前,人们就发现了印楝对昆虫有奇特的拒食作用,并对它的活性成分做了研究。先后从印楝的树皮、根、叶和种子分离出印楝素等7种对昆虫有活性的化合物(Cox, 1981)<sup>[16]</sup>。

据初步统计,印楝素和印楝提取物,至少对70多种农业、仓库和卫生害虫具有显著的拒食、抑制生长发育、忌避、毒杀、内吸和不育等活性。印楝素对200多种昆虫具有其它植物杀虫剂无法比拟的高生物活性,几乎包括了所有的重要农业、仓库和卫生害虫<sup>[27]</sup>。

国内的研究结果也证实印楝素和印楝提取物对防治亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)、菜青虫(*Pieris rapae*)、斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)、柑桔红蜘蛛(*Panonychus citri*)、稻瘿蚊(*Pachydiplasis oryzae*)和稻褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)等多种农作物害虫有显著的防效<sup>[7]</sup>。印楝素及印楝提取物主要作用机制是扰乱昆虫神经内分泌系统,降低蜕皮激素的释放量,作用于咽侧体、小侧体及脑细胞神经肽。此外,还可以阻止表皮几丁质的形成。印楝不影响胆碱酯酶活性,对人及其它高等动物是安全的<sup>[16,27]</sup>。

印楝的组织 and 体细胞培养是一项新的研究课题,最近,雷光富和朱西儒等较深入、全面地研究了印楝的体细胞培养脱分化条件及各种影响因素,初步掌握了印楝愈伤组织理想培养基配方<sup>[1]</sup>。他们的结果表明,收获干重达到每瓶0.14g~0.16g。在液体培养条件下,其生长速率每日升产量(干重)为0.28g~0.36g。经灵敏度高的ELISA方法测定,培养细胞(干重)的印楝素达0.63mg/gDW~0.68mg/gDW;合计其产率为2.99~3.53。这就使杀虫植物细胞的大量培养成为可能,克服因受自然环境生长季节限制、存在资源不足的困难。

### 4 次级代谢物的免疫法检测技术研究进展

就是植物小分子物质测定内容之一<sup>[18, 28, 29]</sup>。

早在 70 年代, Zehk (1975) 等就用放射免疫试验 (Radioimmunoassay, RIA) 检测了长春花培养细胞中的阿吗碱 (ajmalicine) 和蛇根碱 (Serpentine)<sup>[2]</sup>。利用 RIA 测定毛花洋地黄叶片或培养细胞中异羟基毛地黄毒甙含量成功后, 使 RIA 在植物中的应用得到深入发展<sup>[30]</sup>。

Nickel (1997) 用 RIA 测定了毛花洋地黄培养细胞中的卡烯内酯类化合物含量<sup>[3]</sup>。Arens (1978) 为了选择细胞培养用的材料, 也用 RIA 检测了多种植物的阿吗碱和蛇根碱的含量。但 RIA 有几个难以克服的缺点: 对操作者及环境有毒害作用; 放射标记抗原的合成比较困难; 测定使用的仪器比较昂贵。

为了寻找能替代 RIA 的新的免疫测定方法 Van weeman 和 Engvall 等 (1971) 创立了利用酶作为标记的酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 技术。该技术安全性好, 酶标物较易制备且可贮藏 1 年~ 2 年, 要求条件较简单, 在植物病毒检验等领域中已广泛应用<sup>[26, 28, 31, 32]</sup>。

此外, ELISA 测定是在聚苯乙烯塑料反应板或试管中进行, 这种塑料可吸附蛋白质。且通过洗涤使游离相与固定相中蛋白分开, 无非特异性干扰, 灵敏度高。它的应用范围迅速扩大, 并有超过 RIA 的趋势<sup>[33, 34]</sup>。

Robins 等人 (1985) 首次利用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 技术测定植物细胞培养物中的次生物质含量, 测定了美洲苦木 (*Picrasma javanica*) 培养细胞中苦木素的含量, 并进行高产细胞系筛选<sup>[34]</sup>。最近, 我们应用 ELISA 技术, 成功地测定了印楝体细胞培养物中的印楝素的含量, 建立了 DAS-ELISA (双抗体夹心法) 检测程序<sup>[26, 31]</sup>。结果表明: 以牛血清蛋白为载体, 用二环己基碳二亚胺合成免疫原, 制备抗血清获得的效价为 1: 2 560。以辣根过氧化物酶为标记酶, 用“过碘酸盐氧化法”合成酶标抗体。使用抗体的最适包被浓度为  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 标记抗体为  $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 可测抗原最低浓度为  $10 \text{ ng}/\text{mL}$ 。此方法简便、快速、灵敏、专一性强、用样少且不需预先纯化。在组织和细胞培养物中, 可大规模地进行细胞系筛选。

## 5 结语

面临 21 世纪的挑战, 如何尽最大能力开拓生物工程领域, 充分利用和大规模地工厂化生产天然有价值物质? 这是人们热衷于研究的焦点之一。

“植物细胞代谢多途径和全能性”理论和高灵敏度、强专一性、快速、简便、既可定性又能相对定量的 ELISA 等技术之发展, 将会大大促进细胞工程迈向产业化、商品化、集团化。然而, 其中许多问题, 如细胞代谢产率和稳定性的提高; 以及工艺改良的各种影响因素等, 尚有待进一步研究解决, 以达到人工调控和预期应有的指标。

## 参考文献

- 1 雷光富, 朱西儒等. 添加剂和激素对印楝脱分化及印楝素含量的影响. 中国科学院研究生院学报, 1998, (1): 21- 25.
- 2 罗士韦. 人参组织培养. 植物生理学通讯, 1964, (2): 26.
- 3 郑光植. 植物次生代谢细胞工程研究的新进展: 第六届国际植物组织与细胞培养会议评述. 植物生理学通讯, 1987, (2): 75- 79.

- 5 郑光植. 三七愈伤组织的培养. 云南植物研究, 1989, 11 (3): 255~ 262.
- 6 贺锡纯等. 青蒿愈伤组织的诱导分化及表萜素含量的变化. 植物学报, 1983, 25 (1): 87~ 90.
- 7 顾静文. 当归组织培养的研究. 药学学报, 1982, 17 (2): 131~ 138.
- 8 Cheng K C, Cheng L. Callus cultures of the three well-known Chinese herbs and their medicinal contents. In Proc of Symp on Plant Tissue Culture. Beijing, 1978, 469~ 479.
- 9 Chu W H. Callus cultures of the well-known Chinese herbs and their medicinal contents. In Proc of Symp on Plant Tissue Culture. Beijing, 1978, 309~ 312.
- 10 Zenk M H et al. In Barz W, Reinhard E, Zenk M H Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application. 1977, 27~ 43. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg, New York.
- 11 Weiler E W, Zenk M H. Phytochemistry, 1976, 15 1537~ 1544.
- 12 Zheng G Z. Plant cell culture and its secondary metabolism (1). Yunnan University Press, 1992.
- 13 Zenk M H, Ei-Shangi H, Schulte U. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Planta Medica, 1975, suppl, 79~ 101.
- 14 Jaziri M et al. Proc 7th Int Plant Tissue and Cell Cultures Congress, June 24~ 30. Amsterdam, 1990, 318.
- 15 Zenk M H et al. Plant tissue culture and its bio-technological application. Berlin Springer Verlag Press, 1977, 27~ 43.
- 16 赵善欢. 植物杀虫剂最近研究进展. 华南农学院学报, 1983, 10 (1): 28~ 29.
- 17 方德秋等. 免疫测定技术及在高产细胞系筛选中的应用. 植物学通报, 1994, (11) (增刊): 83~ 88.
- 18 吴颂如等. 植物小分子物质的免疫测定技术. 植物生理学通讯, 1989, (5): 68~ 72.
- 19 Soners D A et al. With intern cong plant tissue and cell culture. Minnesota. 1986, 251.
- 20 Zheng G Z. With intern cong plant tissue and cell culture. Minnesota, 1986 251.
- 21 赵善欢等. 印楝引种试验初报. 华南农业大学学报, 1989, 10 (2): 34~ 39.
- 22 Loo S W. Callus cultures of the well-known Chinese herbs and their medicinal contents. In Proceedings of Metabolism (1). Yunnan University Press, 1978.
- 23 Mizukame H et al. Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. Phytochemistry, 1977, 16 (8): 1183.
- 24 Moorgan M R A et al. Planta medica, 1986, 51 237~ 241.
- 25 Kaul B, Staba E J. *Ammi vesnaga* (L) Lan. tissue culture multiliter suspension for *Panax ginseng* cells in far fermenters. J Nat Prod Plant Cell Reports, 1967, 5 423~ 426
- 26 朱西儒, 雷光富, 张海保. 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测印楝愈伤组织的印楝素含量. 华南热带作物学报, 1998, (1): 18~ 24.
- 27 赵善欢. 参加第三届国际印楝会议的收获. 农药译丛, 1987, 9 (1): 1~ 4.
- 28 朱西儒, 张海保. 植物抗病毒基因工程与香蕉束顶病毒 (BBTV) 分子生物学的研究进展. 广西热作科技, 1997, (1): 40~ 41.
- 29 吴少伯等. 植物激素脱落酸的放射免疫测定. 植物生理学通讯, 1985, (1): 44~ 45.
- 30 Hurn B A L, Chantler S M. Production of reagent antibodies. In Methods in Enzymology, Academic Press, 1980, 70 (Part A): 104~ 121.
- 31 张海保, 朱西儒等. 香蕉花叶病的酶联免疫检测技术的研究. 植物病理学报, 1994, 24 (4): 323~ 327.
- 32 张海保, 朱西儒等. 应用单克隆抗体检测香蕉束顶病. 植物保护学报, 1995, 22 (1): 75~ 79.
- 33 Robin R J. In Linskens H F & Jackson J F. Immunology in Plant Science, Springer Verlag, 1986, 86.
- 34 Robins R et al. Immunoassay in food analysis. Elsevier, Amsterdam, 1985, 197~ 211.