

2.2.2 毛细管气相色谱法:

以往人们采用填充色谱柱气相色谱法分析农药残留,由于柱效太低,使某些组分不能得以完全分离,采用毛细管气相色谱法有效的解决了这一难题。在中药材以及其它植物有机氯农药残留分析中,常使用的毛细管柱多为非极性和弱极性的,长度 25~30m,口径 0.25mm~0.32mm,固定液有 OV-1701, SE-54, PB-701 等。

王元鸿等以环氧七氯为内标,选用 SE-54 弹性毛细管石英柱,测定人参中有机氯农药含量,使有机氯农药六六六的四种异构体, DDT 的四种异构体、六氯苯、五氯硝基苯、七氯、氯甲桥萘等 12 种欲测组分与内标之间以及与非测组分之间均达到基线分离,检测结果表明,人参须中有机氯农药残留量远较人参其它部位高^[21]。

袁兰等采用的是 OV-1701 石英毛细管柱,也成功地分离了人参中有机氯农药五氯硝基苯和四种六六六的异构体^[23]。

王会丽等建立了西洋参中有机氯农药残留量的气相色谱的分析方法,样品以丙酮提取,在 NaCl 存在下,以二氯甲烷进行液分配,提取液以浓 H₂SO₄ 净化,采用 SE-54 弹性石英毛细管柱, GC-ECD 检测有机氯农药的残留量,最低检测浓度为 3.2 × 10⁻² ng/g~1.4 ng/g,添加回收率在 80%~133.18%,并对北京及东北产西洋参药材进行了实际残留量测定,发现六六六、DDT 在不同产地的药材中均有检出,其中东北产西洋参中六六六残留总量为 196.9 35ng/g, DDT 残留总量为 170.54ng/g,远远高于国家有关人参中六六六及 DDT 的残留限量(六六六 < 0.1μg/g, DDT ≤ 0.07μg/g) 在被检药材中, β-BHC 的残留量最

高,目前我国种植和贮存中药材用来防治其病虫害所选择的农药品种,施用方法,残留限量等问题尚无法律性规定^[24]。

高天兵等选用 PE-5 石英毛细管柱,程序升温测定了中药材中拟除虫菊酯类农药残留量,该法灵敏度高,选择性强,拟除虫菊酯类农药残留量检测报道很少,作者建立了一种药材前处理使样品净化并富集拟除虫菊酯类农药。

综上所述,重金属和农药残留问题是影响中药现代化和影响中药出口的重要问题,建立灵敏、可靠、规范的检测标准已势在必行,研究发现,下述问题值得注意:

1. 2000 版药典对一些药物规定了检查有机氯农药的残留量,但有机氯农药早已被禁止使用,其它种类的农药在中药中残留检测的研究还很少。

2. 中药生产厂家工艺参差不齐,很多厂家生产工艺落后,生产过程中交叉污染严重,是引起重金属超标的主要因素之一。为了使中药与中成药早日与国际接轨,各新药研制单位和生产厂家必需提高认识,加强制药过程中的全程质量控制,严把原料关,设备关,环境关和检验关。

3. 中药材的种植基地应选择远离矿区污染少的地带,种植期间应合理施用农药,药材炮制,贮存过程也应规范管理,防止进一步污染。

4. 使重金属和农药残留检测标准早日科学化、仪器化、与国际接轨,为中药及其制剂的出口创造方便条件。
参考文献(略)

收稿日期: 2000-08-28

红豆杉的生物工程研究进展

茹贤, 王 昊, 许铁峰, 张汉明(第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要: 红豆杉中的紫杉醇为有效的抗肿瘤活性成分,但一般的提取、合成方法不仅得率很低,而且对资源的需求过大,因此需要找到更好的方法取而代之。本文综述国内外近年来有关通过细胞生物工程生产紫杉醇的方法,包括细胞培养,农杆菌转化和内寄生真菌生产,现对这些方法的研究进展进行总结。

关键词: 红豆杉; 紫杉醇; 细胞培养; 农杆菌转化; 内寄生真菌

关键词: 植物培养物; 生物转化; 糖基化; 外源化合物

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2000)05-0274-03

紫杉醇(taxol)是 70 年代由 Wani 等^[1]从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 树皮中提取出来的具有独特抗癌作用的天然产物,被认为是治疗卵巢癌的首选药物,是一种非常具有发展前途的抗癌新药。到目前为止,发现紫杉醇只存在于裸子植物红豆杉科的红豆杉属 *Taxus L.* 和澳洲红豆杉属种中。由于红豆杉数量稀少,生长缓慢,紫杉醇的含量又非常低,所以靠砍伐树木提取的方法远不能满足人

们对紫杉醇日益增长的需要。

迄今为止,人们已从各个方面研究了紫杉醇的来源问题。全合成,半合成和栽培法虽然取得了一定的成果,但其结果不能令人满意。我们需要高效、稳定、简便的方法来取得紫杉醇,在这方面较好的方法主要有细胞培养,农杆菌转化和内寄生真菌生产等,本文将综述这几种方法近年来的研究进展。

1 细胞培养

利用组织和细胞培养方法代替砍伐天然红豆杉来提取紫杉醇,已成为近年来红豆杉研究的一个重要课题。一般来讲,用细胞培养法生产紫杉醇的一般步骤为:诱导愈伤组织→继代培养→建立悬浮培养→扩大培养。

1.1 诱导愈伤组织

红豆杉属植物由于其本身所具有的特殊性质,诱导其愈伤组织是比较困难的。各种条件均对愈伤组织的诱导产生不同程度的影响。

1.1.1 外植体条件的影响 到目前为止,被用来作为诱导红豆杉愈伤组织外植体的有针叶、幼茎、树皮、形成层、种子及假种皮等。一般而言,以幼茎、形成层或树皮诱导愈伤组织的效果最好,诱导率亦高,其他的外植体诱导能力较差或根本诱导不到愈伤组织。Fett - Neto 等^[2]和 Ghislén 等^[3]的研究表明,不同种属有不同优选的组织作为外植体。另外有人认为应该选用紫杉醇含量较高的外植体。Cibson^[4]在实验中发现,外植体中紫杉醇的含量对于愈伤组织的诱导及以后的继代培养均无抑制作用,所以首先便是要筛选紫杉醇含量高的外植体作为诱导材料。

1.1.2 培养基及培养条件的影响 许多培养基在添加蔗糖及外源激素等时均可诱导外植体形成愈伤组织。其中,以培养基 B5、SH 及 6、7 - V 为较佳,诱导率也较高。培养基中激素组成及其浓度和组合对愈伤组织的诱导起着重要的作用。一般来讲,培养基中含 1.0~ 2.0mg/L 2, 4 - D 或含有 2, 4 - D 的激素组合,对愈伤组织的诱导极为有利。甘烦远等^[5]在研究中发现,在 MS 培养基中附加 1.0mg/L NAA + 1.0mg/L KT 的植物激素,红豆杉嫩枝条的愈伤组织诱导率达到 100%,针叶的诱导率也达到 84%。

培养基中的碳源一般为蔗糖,浓度是 1.0% ~ 3.0% (w/v)。一般在固体培养基上进行,使用的凝固剂是 0.6% ~ 1.0% 的琼脂。可 Cino 等^[6]认为用液体培养基进行愈伤组织的诱导,可以缩短从诱导到悬浮培养的生产周期。但这种方法的产量较低,还有待进一步改进。

无论使用什么培养基诱导红豆杉的何种外植体,它的最佳诱导条件都为 20~ 25℃、黑暗、培养基灭菌前 pH 为 5.5~ 5.8。

1.2 愈伤组织继代培养

在继代培养中,细胞的生长情况与外植体来源,培养基及培养条件密切相关。

1.2.1 外植体的影响。Gibson^[4]的研究结果表明,外植体来源对细胞生长的影响很大。细胞生长受细胞株系影响最大,其次才是激素类型和浓度。

1.2.2 愈伤组织早期形成时间的影响。研究表明,愈伤组织早期生长时间对培养会产生显著的影响。Gibson^[4]在研究中发现,2 周内的愈伤组织在继代培养时,细胞并

不增殖,而且组织会发生褐化以至坏死。在诱导培养基上培养 4 周~ 4 个月形成的愈伤组织中,以经 1~ 3 月才开始形成的愈伤组织的继代培养存活率最高。

1.2.3 培养基及培养条件的影响。对于愈伤组织的培养及维持其正常生长来说,用的培养基都是基本的或改良的 B5 培养基,其他培养基的效果都不是很好。一般认为,培养基中氮源的还原态和氧化态的相对含量对细胞生长影响较大。在培养基中添加高含量的 NH₄NO₃ 可以明显提高培养细胞的生长速率。培养基中生长调节素的添加一直是人们研究的热点。一般来讲,培养基中含有 1.0~ 2.0mg/L 左右的 NAA,或含有上述浓度的 2, 4 - D 或 NAA 的激素组合,对愈伤组织的正常生长是必需的。另外,赤霉素(GA₃)的添加对细胞的生长也能产生很大影响。Fett - Neto 等^[7]发现,向 B5 中补充 0.5mg/L 的 GA₃ 时,可使东北红豆杉的生长量提高近 1 倍左右。红豆杉属细胞培养的生理碳源一般选用蔗糖^[8],也可选用果糖,葡萄糖,麦芽糖等。糖类的浓度对细胞生长的影响很大。和诱导的条件相似,介于 20~ 25℃ 之间的温度适于红豆杉愈伤组织的培养。

1.2.4 红豆杉属细胞在生长过程中会分泌一些不利生长的酚类物质,这些物质的积累会导致组织褐化,细胞死亡。研究表明,在培养基中添加一些还原剂或酚类吸收剂等可以部分解决这一问题^[9]。

1.3 细胞的悬浮培养

有许多文献报道,成功地建立了红豆杉属植物的悬浮培养细胞系,在培养过程中它们均可向培养基中不断分泌紫杉醇等次生代谢物。同时也存在很多的影响因素。

1.3.1 有人认为外植体应该选用针叶和分生组织,其中以仅有 1 个月的新生针叶为最适合的材料。Gibson^[4]的研究表明树皮也适合建立悬浮培养系统。

1.3.2 从培养基组成及培养条件的来看。一般用于愈伤组织及继代培养的基本培养基亦适用于细胞悬浮培养。悬浮培养一般仍以蔗糖为碳源。Saito^[10]在研究植物生长调节剂的影响中发现,只有在补充 5mg/L NAA 的培养基上时,生物量才能有较多增长。许多文献报道,多数培养基都需补充 CA(酪蛋白氨基酸),实验证明培养基中附加 CA 能显著提高红豆杉培养细胞的生长;甘烦远等^[5]认为,附加 CM(椰子汁)比 CA 更有效。

在有光、无光两种条件下,黑暗无光有利于细胞的生长,但紫杉醇的含量则截然相反。在光照条件下培养的细胞生成的紫杉醇的在黑暗中的 2.8 倍,而且胞外紫杉醇的分泌量也比黑暗中的明显提高,分别为 76% 和 56%。培养的温度范围仍为 20~ 25℃,pH 优选 5.8。

1.3.3 气态组分的影响。氧气、二氧化碳、乙烯等气态组分对悬浮细胞的生长和紫杉醇的生产有显著影响。有文献报道,向培养基中补充二氧化碳气体时可以使细胞

维持较高的生长速率^[9]。对于浆果红豆杉 *T. baccata* 的悬浮细胞,在培养基中维持低浓度的二氧化碳并移走乙烯,同时提供充足的氧气促进细胞生长,可以促进紫杉醇的生产。

1.4 提高细胞中紫杉醇含量的方法

紫杉醇产率太低,使生产成本十分昂贵。对于解决这一难题,各国学者提出了一些新技术,新方法,并取得了很大进展。

1.4.1 前体饲喂。研究表明,向培养基中添加前体物,例如羟甲基戊酸,乙酸, phe 可望提高紫杉醇的产量。Stierle^[11]在研究短叶红豆杉树皮产生的愈伤组织时指出,异亮氨酸是提高紫杉醇含量的最佳前体。

1.4.2 诱导子的使用。针对红豆杉属的细胞培养,适用的诱导子主要分以下两类^[12]: 1) 生物诱导子: 主要指以高压灭活的真菌,细菌和酵母的细胞壁萃取物,滤液或孢子中得到的物质,其有效成分一般认为是葡萄糖。2) 非生物诱导子: 包括化学协调物质和一些原先来源于生物,后来由人工合成的化合物。研究表明,在细胞生长的指数期间加入诱导子最为有利。

1.4.3 产物的原位提取(ISPR)。此项技术可以快速地培养中移走产物,清除产物与细胞间的相互干扰,从而提高产量。针对红豆杉属细胞培养,人们主要从以下两方面进行研究: 1) 在培养过程中更换培养基。2) 两相培养技术^[3],即在培养基中引入第二相,使目的产物在第二相中富集,减轻了产物对东道反馈抑制,从而使产量提高。

2 农杆菌转化

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)含有 Ri 质粒, Ri 质粒的 T- DNA 插入植物基因组后引起植物产生瘤性“毛状根”。由于毛状根生长速度大大超过正常植物及悬浮培养细胞的生长速度,产物产量高,而且稳定,因此利用毛状根培养生产植物的次生代谢产物具有极大潜力。

用发根农杆菌 A4 诱导短叶红豆杉形成的毛状根培养物具有生长速度快,合成紫杉醇能力强,可以向培养液中分泌一定的紫杉醇并且无需补加外源性激素的特性。有专利报道利用发根农杆菌 A4, 15834 等菌株能转化红豆杉(*Taxus chinensis*)和短叶红豆杉愈伤组织细胞,使其紫杉醇含量最多提高 50 倍。

在实验过程中发现,不同因素对毛状根转化率有影响^[13]。菌株 A4 对短叶红豆杉的芽有较高的转化率。其他菌株对短叶红豆杉不敏感,植物的其他部位也不能被转化形成毛状根。光照和在诱导培养基中添加 100 μ mol/mL 的乙酰丁香酮(acetosyringone) 和 10mg/mL 甜菜碱(betaine)能提高毛状根的转化率。低浓度的 6- BA 对毛状根的转化率影响不大,但浓度高于 2.5mg/L 时能诱导植物形成愈伤组织。

在毛状根的培养过程中发现,不同株系的毛状根紫

杉醇含量有较大差异,不同株系的毛状根生长速度也有较大差异。所以,不同的毛状根细胞系在液体悬浮培养时,生物量及紫杉醇含量相差较大,因此为了提高紫杉醇的产量,必须对毛状根细胞进一步筛选,以获得生长速度快和紫杉醇含量高的细胞系用于大规模生产。

利用毛状根培养物来生产紫杉醇,为紫杉醇的药源供应提供了一条新的途径。

3 内寄生真菌生产

利用红豆杉内寄生真菌来生产紫杉醇是近年来新的研究方向,现已发现几种可利用的内寄生真菌能生产紫杉醇。

3.1 短叶红豆杉内寄生真菌 *Taxomyces andreanae*

用质谱学,免疫化学,色谱学及放射化学技术证实了该菌培养 3 周后能产生紫杉醇及其相关化合物。实验证明^[14],真菌有机提取物中紫杉醇占总紫杉烷含量的 15% ~ 20%。经过测试表明,真菌产生的紫杉醇的立体构型与树皮提取的紫杉醇极为相似,并且具有相同的免疫和细胞毒活性。

通常为 *T. andreanae* 产生的紫杉醇含量很低,大约为 24~ 25ng/L。当培养液中含 1% 针叶水提取物时,紫杉醇产率即可提高到 95~ 200ng/L,紫杉烷可达 800~ 1000ng/L。若在上述 1% 针叶水培养基中培养 21 天,紫杉醇产率即可达到 2000~ 3000ng/L,紫杉烷产率亦可提高 2 倍。加入 2% 针叶提取物,两者产率将会更高^[15]。这种方法打开了借助发酵技术实现使紫杉醇资源取之不尽的大门。

3.2 小孢盘多毛孢 *Pestalotiopsis microspora*

该内寄生真菌是从喜马拉雅山脉海拔 1500~ 3000m 丘陵地带的西藏红豆杉小枝的内皮中分离得到的。将此真菌置 MID 培养基中静止培养,于 23 $^{\circ}$ C 培养 2~ 3 周后,紫杉醇含量可达高值。聚积在菌丝体中的紫杉醇约 20%~ 30% 可分泌至培养基中。在 1L 培养物中紫杉醇的总产量约 60~ 70 μ g,这一产量比从安德列亚真菌中提取高 1000 倍,但仅为从红豆杉树皮中提取量的 1/10^[6]。

由于这种方法在培养物中紫杉醇的积聚量每升可达微克级水平,所以在用微生物发酵制备紫杉醇的设计中,应首选小孢盘多毛孢真菌。

4 结束语

紫杉醇以其独特的抗癌机制而引人注目,然而有限的资源和日益增长的需求量,使寻找生产紫杉醇的新方法成为有待解决的问题。利用红豆杉生产紫杉醇的方法还有很多,随着克隆技术的发展和研究的深入,我们相信大规模生产紫杉醇不久将成为现实。紫杉醇作为一种有效的抗癌药物将会为人类作出更大的贡献。

参考文献(略)