

# 苯丙氨酸、蔗糖和甘露醇对杂种红豆杉细胞的生长及形成紫杉醇、巴卡亭 III 和 10-去乙酰基巴卡亭 III 的影响

陈永勤 吴蕴祺 胡 秋 朱蔚华\*

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

**摘要** 研究了苯丙氨酸、蔗糖和甘露醇对杂种红豆杉悬浮细胞的生长及形成紫杉醇、巴卡亭 III 和 10-去乙酰基巴卡亭 III 的影响。结果表明, 培养基中添加  $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  或  $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  苯丙氨酸和在培养 28 d 时同时补加  $73.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖和  $137.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  甘露醇能显著地促进细胞的生长和这 3 种紫杉烷的形成。同对照相比, 有苯丙氨酸又补加蔗糖和甘露醇的细胞生物量增加了 0.6~0.8 倍, 紫杉醇的产量增加了 9~10 倍, 巴卡亭 III 的产量增加了 2.5~3.0 倍, 10-去乙酰基巴卡亭 III 的产量增加了 7 倍。在培养 28 d 时补加  $73.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖能显著地促进细胞的生长, 但对细胞中这 3 种紫杉烷的含量没有显著的影响。

**关键词** 杂种红豆杉; 细胞悬浮培养; 紫杉醇; 巴卡亭 III; 10-去乙酰基巴卡亭 III

紫杉醇 (taxol) 最初是从短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 的树皮中分离出的有抗肿瘤活性的二萜生物碱<sup>[1]</sup>。自 1992 年以来, 紫杉醇已在许多国家成为治疗卵巢癌和乳腺癌的重要药物。由于紫杉醇的药源植物—红豆杉属植物生长缓慢, 紫杉醇含量很低 (约为干重的 0.015%), 而现有的资源又有限, 因而紫杉醇的供应一开始就受到人们的关注。多年来人们一直在寻找能替代直接从植物中提取紫杉醇的方法。紫杉醇的化学全合成虽已完成<sup>[2,3]</sup>, 但路线复杂, 目前无商业价值。Denis 等<sup>[4]</sup>以 10-去乙酰基巴卡亭 III (10-deacetylbaaccatin III) 为原料半合成紫杉醇的工作在一定程度上为缓解紫杉醇的供求矛盾打下了基础。通过红豆杉属植物的组织和细胞培养生产紫杉醇被认为是一种有前途的方法之一, 受到了人们的高度重视, 许多国家投入大量资金从事这方面的研究。迄今已有多种红豆杉被离体培养过, 其培养物也能产生紫杉醇, 但尚未见用该技术商业化生产

紫杉醇的报道。重要原因之一是在离体条件下红豆杉属植物的细胞生长也比较缓慢, 紫杉醇含量低, 工业化生产成本太高。近些年来, 人们一直在寻找提高培养细胞中紫杉醇含量的方法, 并取得了一些进展, 如 Fett-Neto 等<sup>[5]</sup>发现在培养基中添加芳香羧酸和氨基酸可显著提高东北红豆杉 (*T. cuspidata*) 细胞中紫杉醇的含量。Hirasuna 等<sup>[6]</sup>在培养过程中补加果糖能提高欧洲红豆杉 (*T. baccata*) 细胞中紫杉醇的含量, Mirjalili 等<sup>[7]</sup>通过改变培养环境中二氧化碳、氧气和乙烯的比例来促进东北红豆杉细胞中紫杉醇的形成, Seki 等<sup>[8]</sup>采用固定化细胞培养方法能使东北红豆杉细胞持续生产紫杉醇。本文报道了苯丙氨酸、蔗糖和甘露醇对杂种红豆杉 (*T. media*) (欧洲红豆杉 × 东北红豆杉) 细胞的生长及产生紫杉醇、巴卡亭 III (baaccatin III) 和 10-去乙酰基巴卡亭 III 的影响。

## 材 料 与 方 法

**细胞系的建立** 杂种红豆杉当年生枝条洗净后, 分别用 70% 的乙醇消毒 2 min 和 0.1%

本文于 1997 年 7 月 21 日收到。

\* 联系人

的氯化汞消毒 20 min。经无菌水漂洗 6 次后,将茎段剪成 1.5~2.0 cm 长的小段,并剪去其上的叶片,接种在固体诱导培养基上。愈伤组织形成后继代在增殖培养基上,每 28 d 继代一次。悬浮培养通过将愈伤组织接种在液体增殖培养基中建立,每 21 d 继代一次。

**紫杉烷生产试验** 根据苯丙氨酸的浓度,紫杉烷生产培养基分 3 种:0.0 mmol·L<sup>-1</sup>, 1.0 mmol·L<sup>-1</sup>和 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>。为了使各处理内的试验材料一致,每处理用 5 瓶悬浮细胞,同生产培养基混匀后再分装到试验瓶中。试验瓶为 500 ml 的三角瓶,每瓶装 150 ml 细胞培养液。平均接种量为 6.26 ± 0.12 g·L<sup>-1</sup>干细胞。培养至 28 d 时,各处理取出 6 瓶,其中 3 瓶加入蔗糖,另 3 瓶加入蔗糖和甘露醇。蔗糖和甘露醇先在 121℃ 下灭菌 20 min,分别按 73.0 mmol·L<sup>-1</sup>和 137.3 mmol·L<sup>-1</sup>的量加入。试验至 38 d 结束。细胞离心收集,在 50℃ 下烘至恒重。

**培养基和培养条件** 基本培养基为 B<sub>5</sub> 培养基<sup>[9]</sup>的无机元素,蔗糖浓度为 58.4 mmol·L<sup>-1</sup>,肌醇为 555.1 μmol·L<sup>-1</sup>,烟酸为 10.2 μmol·L<sup>-1</sup>,维生素 B<sub>1</sub> 为 3.0 μmol·L<sup>-1</sup>,维生素 B<sub>6</sub> 为 2.4 μmol·L<sup>-1</sup>,6-苄基氨基嘌呤(BAP)为 0.44 μmol·L<sup>-1</sup>。诱导培养基为基本培养基加 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 6.7 μmol·L<sup>-1</sup>;增殖培养基为基本培养基加 2,4-D 13.3 μmol·L<sup>-1</sup>;紫杉烷生产培养基为基本培养基加 2,4-D 4.4 μmol·L<sup>-1</sup>,不加或加 1.0 mmol·L<sup>-1</sup>或 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>的苯丙氨酸。固体培养基加 8.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂。所有培养基在 121℃ 下灭菌 25~35 min。培养基的 pH 在灭菌前用 HCl 和 KOH 调至 5.8。苯丙氨酸过滤灭菌后再加入培养基中。

培养在黑暗条件下进行,培养室温度为 22 ± 2℃。液体培养在摇床上进行,120 r·min<sup>-1</sup>。

**紫杉烷的测定** 紫杉烷的测定按 Wu 等<sup>[10]</sup>建立的方法进行。干细胞样品研细后用甲醇浸泡 1 d,然后超声提取 30 min。提取液过

滤、蒸干后溶于一定体积的甲醇中。取少量的甲醇溶液注于 Sep-Pak 柱(Waters, USA)的上端,分别用水、30% 和 80% 甲醇洗脱。收集 30%~80% 甲醇部分的洗脱液,蒸干后定容于一定体积的优级纯甲醇中,用高效液相色谱仪测定其中的紫杉烷含量。无细胞的培养基用等量的二氯甲烷萃取。二氯甲烷部分蒸干后溶于一定体积的甲醇中,其后的处理过程同细胞样品。

Shimadzu LC-6A 高效液相色谱仪, Shimadzu SPD-6A 紫外检测器, Rheodyne 7125 进样阀和 Shimadzu C-R3A 积分仪。色谱柱为 Plantinum C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Alltech, USA)。流动相为甲醇—乙腈—水(25:35:45),流速为 1.0 ml·min<sup>-1</sup>,检测波长为 227 nm。

**数据处理** 细胞生长指数为细胞收获量(g·L<sup>-1</sup>干重)与接种量(g·L<sup>-1</sup>干重)之差与接种量(g·L<sup>-1</sup>干重)的比值,样品中紫杉烷的含量通过外标法计算得出。用 LSR 检验统计各处理数据间的差异显著性。

## 结 果

### 1 苯丙氨酸、蔗糖和甘露醇对杂种红豆杉细胞生长的影响

在 3 种苯丙氨酸浓度处理中,试验后期补加 73.0 mmol·L<sup>-1</sup>蔗糖或 73.0 mmol·L<sup>-1</sup>蔗糖和 137.3 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇均能显著地促进杂种红豆杉悬浮细胞的生长,这种促进作用在有苯丙氨酸的处理中更明显(表 1)。其它条件相同时,培养基中添加 1.0 mmol·L<sup>-1</sup>或 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>的苯丙氨酸对细胞的生长也有一定的促进作用,但只在补加蔗糖的处理中达到了显著性。

### 2 苯丙氨酸、蔗糖和甘露醇对杂种红豆杉细胞形成紫杉醇、巴卡亭 III 和 10-去乙酰基巴卡亭 III 的影响

由表 2 可见,在 0 号和 1 号生产培养基中,单独补加蔗糖对提高紫杉醇、巴卡亭 III 和 10-去乙酰基巴卡亭 III 产量(mg·L<sup>-1</sup>)的促进作

**Tab 1 Effect of phenylalanine, sucrose and mannitol on the growth of *Taxus media* suspension cells**

Treatment*	Harvested dry cell weight (g•L <sup>-1</sup> )	Growth index**	
0	14.18±3.46	1.27±0.55	b
0S	15.02±2.26	1.40±0.36	b
0SM	20.33±3.09	2.25±0.64	a
1	17.08±4.14	1.73±0.66	b
1S	24.86±2.22	2.97±0.35	a
1SM	25.92±0.23	3.14±0.04	a
2	15.78±1.42	1.52±0.23	b
2S	23.75±3.47	2.64±0.57	a
2SM	22.80±1.11	2.64±0.18	a

*n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \* 0, 1 and 2 mean that the concentrations of phenylalanine were 0.0 mmol•L<sup>-1</sup>, 1.0 mmol•L<sup>-1</sup> and 2.0 mmol•L<sup>-1</sup>, respectively; S means that sucrose was added to the medium at the 28<sup>th</sup> day of culture, SM means that sucrose and mannitol were added to the medium at the 28<sup>th</sup> day of culture; \*\* different letters mean that the data are significantly different from each other. *P* < 0.01.

用多半不明显,但在 2 号培养基中加蔗糖对紫杉醇和巴卡亭 III 的产量有显著的促进作用;在 3 种生产培养基中同时补加蔗糖和甘露醇均大大地提高了这 3 种紫杉烷的产量,紫杉醇的

产量为相应对照的 4~7 倍,巴卡亭 III 为 2~3 倍,10-去乙酰基巴卡亭 III 为 4 倍。

培养基中添加苯丙氨酸提高了紫杉醇、巴卡亭 III 和 10-去乙酰基巴卡亭 III 的产量,并在补加蔗糖和甘露醇的处理中达到了显著差异。但这 3 种紫杉烷的产量在苯丙氨酸浓度为 1.0 mmol•L<sup>-1</sup>和 2.0 mmol•L<sup>-1</sup>的 2 种处理之间差异不显著。

以细胞干重为基础的紫杉烷百分含量代表了细胞合成紫杉烷的能力。从试验结果(表 2)来看,单独补加蔗糖对杂种红豆杉悬浮细胞中合成紫杉醇、巴卡亭 III 和 10-去乙酰基巴卡亭 III 的能力没有显著的影响,但同时补加蔗糖和甘露醇能大大地促进这 3 种紫杉烷的形成,这种促进作用在有苯丙氨酸的处理中特别显著。在苯丙氨酸浓度为 1.0 mmol•L<sup>-1</sup>和 2.0 mmol•L<sup>-1</sup>的处理中,这种处理使细胞合成紫杉醇的能力提高了约 3.5 倍,合成巴卡亭 III 的能力提高了约 1.0 倍,合成 10-去乙酰基巴卡亭 III 的能力提高了约 1.6 倍。

**Tab 2 Effect of phenylalanine, sucrose and mannitol on the production of taxol, baccatin III and 10-deacetyl baccatin III in the suspension cells of *Taxus media***

Treatment*	Taxol		Baccatin III		10-Deacetyl baccatin III	
	Yield (mg•L <sup>-1</sup> )	Content (%)**	Yield (mg•L <sup>-1</sup> )	Content (%)**	Yield (mg•L <sup>-1</sup> )	Content (%)**
0	0.462±0.105 c	0.0033±0.0001 c	3.180±0.217 c	0.0264±0.0068 b	1.154±0.190 c	0.0082±0.0008 d
0S	0.509±0.068 c	0.0034±0.0002 c	3.967±0.536 c	0.0265±0.0067 b	1.087±0.323 c	0.0071±0.0011 d
0SM	1.789±0.472 b	0.0087±0.0011 b	6.233±1.599 b	0.0304±0.0021 b	4.683±1.410 b	0.0227±0.0033 b
1	0.664±0.167 c	0.0039±0.0004 c	5.637±0.741 b	0.0226±0.0011 b	2.456±0.596 c	0.0144±0.0013 c
1S	0.996±0.167 c	0.0036±0.0007 c	6.837±2.068 b	0.0275±0.0018 b	3.594±0.749 bc	0.0144±0.0020 c
1SM	4.720±0.934 a	0.0182±0.0073 a	11.277±2.966 a	0.0435±0.0110 a	9.660±0.762 a	0.0373±0.0027 a
2	0.781±0.122 c	0.0050±0.0008 bc	3.823±0.420 c	0.0243±0.0029 b	2.530±0.447 c	0.0160±0.0016 c
2S	2.001±0.243 b	0.0089±0.0017 b	7.157±0.958 b	0.0291±0.0022 b	3.498±0.194 bc	0.0152±0.0012 c
2SM	5.043±0.598 a	0.0221±0.0021 a	12.540±0.588 a	0.0552±0.0049 a	9.429±1.079 a	0.0414±0.0045 a

*n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \* 0, 1 and 2 mean that the concentrations of phenylalanine were 0.0 mmol•L<sup>-1</sup>, 1.0 mmol•L<sup>-1</sup> and 2.0 mmol•L<sup>-1</sup>, respectively; S means that sucrose was added to the medium at the 28<sup>th</sup> day of culture, SM means that sucrose and mannitol were added together to the medium at the 28<sup>th</sup> day of culture; \*\* content was on the basis of dry cell weight; different letters mean that the data are significantly different from each other. *P* < 0.01.

### 讨 论

在黑暗条件下,培养基中的糖是细胞生长最主要的碳源。随着培养时间的延长,培养基中的糖将逐渐减少,从而影响细胞后来的生长。

培养过程中补加糖分将有助于维持细胞的生长。Godoy-Hernandez 等<sup>[11]</sup>发现在培养中期补加蔗糖和甘露醇使长春花细胞的干重在 3 d 内比对照增了 38%。红豆杉属植物的细胞在离

体条件下生长比较缓慢,其干重增倍时间长达 20 d<sup>[12]</sup>。这除与该属植物本身的特点有关外,也与其培养条件有关。培养中、后期碳源不足可能是影响细胞生长的一个重要因素。Fett-Neto 等<sup>[12]</sup>在培养东北红豆杉细胞时发现培养基中的糖在培养 20 d 后就被消耗殆尽、细胞的干重在此以后逐渐下降的结果及本试验在培养后期补加碳源能显著地促进杂种红豆杉细胞生长的结果都说明了这一点。

苯丙氨酸是植物的一种必需氨基酸,它可以通过参与蛋白质的合成和作为碳源来影响细胞的生长。在植物细胞的次生代谢中,苯丙氨酸又是一个很重要的代谢中间体,它是合成一些生物碱、木质素、黄酮、异黄酮及香豆素等次生物质的前体<sup>[13]</sup>。Fleming 等<sup>[14]</sup>证明苯丙氨酸参与了紫杉醇 C-13 侧链的合成,故它也是紫杉醇生物合成的前体。Zenk 等<sup>[15]</sup>在培养鞘蕊花 (*Coleus blumei*) 细胞时发现 3 mmol·L<sup>-1</sup> 的苯丙氨酸既促进细胞的生长,又使细胞中迷迭香酸含量增加一倍。袁宗泉等<sup>[16]</sup>发现 0.9~1.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的苯丙氨酸对银杏 (*Ginkgo biloba*) 细胞的生长有一定的抑制作用,但大大提高细胞中银杏黄酮的含量。我们的试验结果表明 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> 和 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> 的苯丙氨酸对杂种红豆杉细胞的生长也有一定的促进作用,并显著地促进了细胞中紫杉醇的合成,这与 Fett-Neto 等<sup>[5]</sup>在东北红豆杉愈伤组织和悬浮细胞上得到的结果一致。但巴卡亭和 10-去乙酰基巴卡亭是无 C-13 侧链的紫杉烷,苯丙氨酸对它们的合成也有促进作用,这表明苯丙氨酸在紫杉烷的生物合成过程中有着更为复杂的作用。

细胞的生长量和合成紫杉烷的能力是影响细胞培养物中紫杉烷产量的两个因素。单独补加蔗糖虽然对杂种红豆杉细胞合成紫杉醇、巴卡亭和 10-去乙酰基巴卡亭的能力没有显著的影响,但补加蔗糖能促进细胞的生长,因而可提高紫杉烷的产量。

植物细胞的许多代谢过程受到细胞水势变化的调节。人们常通过提高糖的浓度来造成植

物细胞的渗透胁迫,改变其水势,促进次生代谢物质的形成<sup>[17]</sup>。但渗透胁迫促进次生代谢的确切机理尚不清楚。Tholakalabavi 等<sup>[18]</sup>发现用葡萄糖和甘露醇构成的渗透胁迫大大提高了加拿大杨树悬浮细胞中花色苷的产量,Godoy-Hernandez 等<sup>[11]</sup>用 73.0 mmol·L<sup>-1</sup> 的蔗糖和 137.3 mmol·L<sup>-1</sup> 的甘露醇构成的渗透胁迫处理长春花悬浮细胞,结果使细胞中生物碱含量增加了 3 倍以上。在培养后期,我们用这种强度的渗透胁迫处理杂种红豆杉悬浮细胞不仅促进了细胞的生长,而且也显著地促进了紫杉烷的形成,从而大大地提高了紫杉烷的产量。苯丙氨酸和渗透胁迫在促进杂种红豆杉细胞的生长和紫杉烷的形成等方面有显著的协同作用。同没有苯丙氨酸又未补加蔗糖和甘露醇的处理相比,有苯丙氨酸又补加了蔗糖和甘露醇的处理的细胞生物量增加了 0.6~0.8 倍,紫杉醇的产量增加了 9~10 倍,巴卡亭 III 的产量增加 3 倍,10-去乙酰基巴卡亭 III 的产量增加 7 倍。

杂种红豆杉细胞形成的紫杉烷有 90% 以上留在细胞内,分泌到培养基中的量很少,尤其是紫杉醇(表 3)。这与东北红豆杉和欧洲红豆

**Tab 3 Distribution of taxol, baccatin III and 10-deacetyl baccatin III between the cell and the medium in different treatments**

Treatment*	Taxol		Baccatin III		10-Deacetyl baccatin III	
	Cell	Medium	Cell	Medium	Cell	Medium
0	100.0	0.0	94.9	5.1	93.9	6.1
0S	100.0	0.0	97.0	3.0	96.2	3.8
0SM	100.0	0.0	89.2	10.8	87.3	12.7
1	100.0	0.0	91.8	8.8	93.6	6.4
1S	100.0	0.0	93.7	6.7	94.6	5.4
1SM	94.1	5.9	86.9	13.1	87.4	12.6
2	100.0	0.0	93.0	7.0	93.0	7.0
2S	100.0	0.0	93.9	6.1	96.5	3.5
2SM	89.7	10.3	79.6	20.4	74.1	25.9

Each datum in the table, mean of 3 replicates, is a percentage of the total amount of the taxane; \*0, 1 and 2 mean that the concentrations of phenylalanine were 0.0 mmol·L<sup>-1</sup>, 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> and 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>, respectively; S means that sucrose was added to the medium at the 28<sup>th</sup> day of culture, SM means that sucrose and mannitol were added together to the medium at the 28<sup>th</sup> day of culture.

杉的细胞显著不同,这两种红豆杉细胞形成的紫杉醇分别有 34% 和 90% 被分泌到培养基中<sup>[6,12]</sup>。在有苯丙氨酸时,渗透胁迫能促进杂种红豆杉细胞形成的紫杉烷向培养基中分泌。

致谢 试验材料由本所植化室方起程研究员从加拿大带回,方唯硕博士提供了紫杉烷的标准品。

### 参 考 文 献

- 1 Wani MC, Taylor HL, Wall ME, *et al.* Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 1971, **93**:1609
- 2 Nicolaou KC, Ueno H, Liu JJ, *et al.* Total synthesis of taxol. 4. The final stage and completion of the synthesis. *J Am Chem Soc*, 1995, **117**:653
- 3 Holton RA, Somoza C, Kim HB, *et al.* The total synthesis of paclitaxel starting with camphor. *ACS Symp Ser 583C (Taxane Anticancer Agents)*, 1995:228
- 4 Denis JN, Greene AE, Guenard D, *et al.* A highly efficient practical approach to natural taxol. *J Am Chem Soc*, 1988, **110**:5917
- 5 Fett-Neto AG, Melason SJ, Nicholson SA, *et al.* Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell culture of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**:966
- 6 Hirasuna TJ, Pestchanker LS, Srinivasan V, *et al.* Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1996, **44**:95
- 7 Mirjalili N, Linden JC. Gas phase composition effects on suspension cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol and Bioeng*, 1995, **48**:123
- 8 Seki M, Ohzora C, Takeda M, *et al.* Taxol (Paclitaxel) production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol and Bioeng*, 1997, **53**:214
- 9 Gamborg OL, Miller RA, Ojima A. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 1968, **50**:151
- 10 Wu YQ, Zhu WH. High performance liquid chromatographic determination of taxol and related taxanes from *Taxus* callus cultures. *J Lig Chromatogr & Related Technol*, 1997, **20**:3147
- 11 Godoy-Hernandez G, Loyola-Vargas VM. Effect of fungal homogenate, enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharanthus roseus* Cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 1991, **10**:537
- 12 Fett-Neto AG, Zhang WY, DiCosmo. Kinetics of taxol production, growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**:205
- 13 欧阳光察, 薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及调控. *植物生理学通讯*, 1988, **3**:9
- 14 Fleming PE, Mocek U, Floss HG. Biosynthesis of taxoids. Mode of formation of the taxol side chain. *J Am Chem Soc*, **115**:805
- 15 Zenk MH. Production of rosmarinic acid by cell suspension cultures of *Coleus blunei*. *Natur-wissens Chafte*, 1977, **64**:585
- 16 袁宗泉, 刘淑兰, 吴正道, 等. 细胞生长期、苯丙氨酸和放线菌素-D 对银杏黄酮产量的影响. 韩碧文教授论文选集—植物生长发育. 北京: 中国农业大学生物学院编辑, 1996:322
- 17 Mantel SH, Smith H. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue culture. In: Mantel SH, Smith H eds. *Plant Biotechnology*. New York: Cambridge University Press, 1983:75
- 18 Tholakabavi A, Zwiazek JJ, Thorpe TA. Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations, and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var. *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. *In Vitro Cell Developmental Biology*, 1994, **30p**:164

# EFFECTS OF PHENYLALANINE, SUCROSE AND MANNITOL ON THE GROWTH AND PRODUCTION OF TAXOL, BACCATIN III AND 10-DEACETYLBACCATIN III IN SUSPENSION CELLS OF *TAXUS MEDIA*

Chen Yongqin(Chen YQ), Wu Yunqi(Wu YQ), Hu Qiu(Hu Q) and Zhu Weihua(Zhu WH)

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences  
and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

**ABSTRACT** The effects of phenylalanine, sucrose and mannitol on the cell growth and the production of taxol, baccatin III and 10-deacetylbaccatin III in the suspension cells of *Taxus media* were studied. The results showed that phenylalanine  $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  or  $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  initially added into the medium, and sucrose  $73.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  and mannitol  $173.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  added into the medium at the 28<sup>th</sup> d of culture strongly promoted the cell growth and the formation of the three taxanes in the suspension cells. Compared with those of the control, the cell biomass of the treatments supplemented with phenylalanine and added with sucrose and mannitol at the 28<sup>th</sup> d of culture increased by 0.6~0.8-fold, taxol yield by 9~10-fold, baccatin III yield by 2.5~3.0-fold, and 10-deacetylbaccatin III yield by 7-fold. Addition of sucrose  $73.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  at the 28<sup>th</sup> d of culture significantly promoted the cell growth, but showed little effect on the contents of the three taxanes in the suspension cultures.

**KEY WORDS** *Taxus media*; Suspension cell culture; Taxol; Baccatin III; 10-Deacetylbaccatin III