

YAOYONG ZHIWU DE

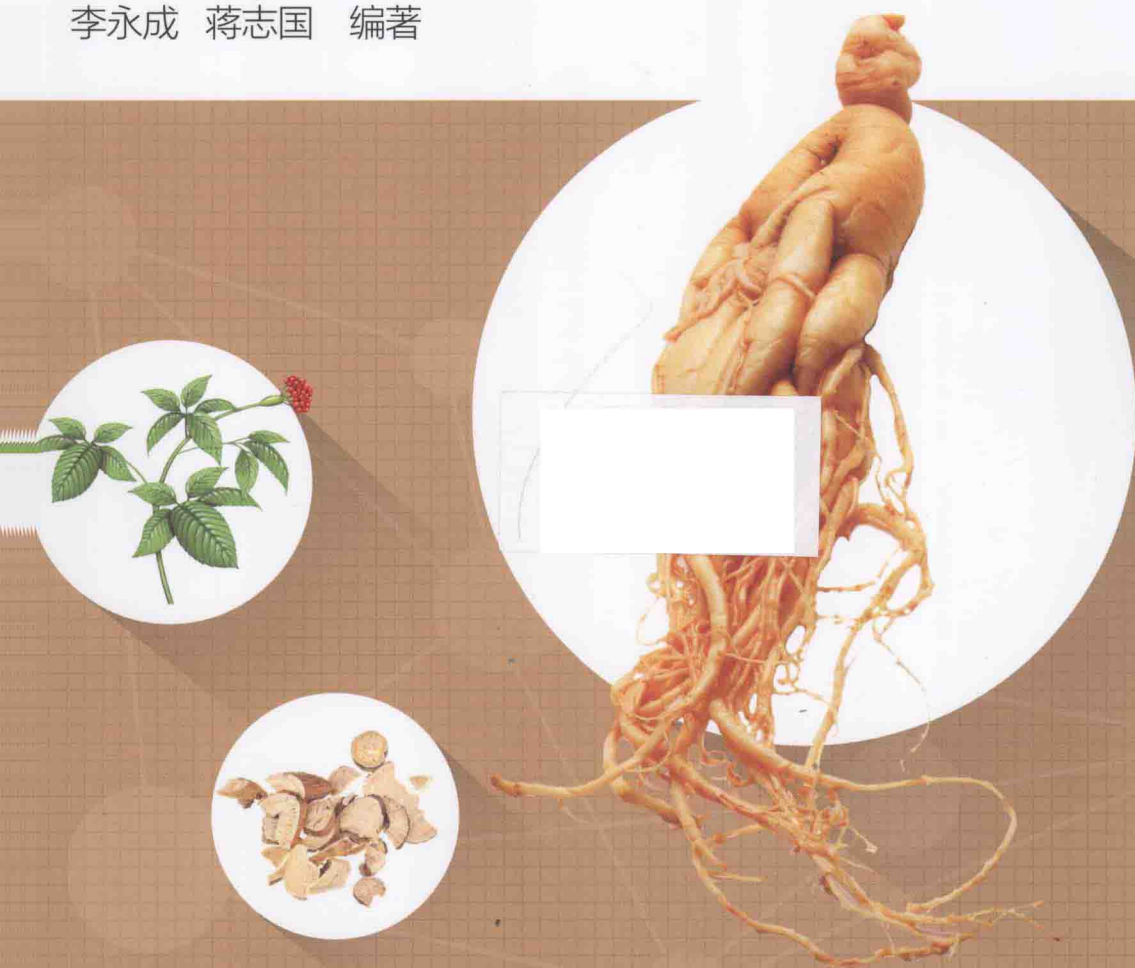
XIBAO XUANFU PEIYANG JISHU YU YINGYONG

药用植物

的

细胞悬浮培养技术与应用

李永成 蒋志国 编著



化学工业出版社

YAORYONG ZHIWU DE

XIBAO XUANFU PEIYANG JISHU YU YINGYONG

药用植物

的 细胞悬浮培养技术与应用

李永成 蒋志国 编著



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

药用植物的细胞悬浮培养技术与应用/李永成, 蒋志国编著. —北京: 化学工业出版社, 2015. 1

ISBN 978-7-122-22188-9

I. ①药… II. ①李… ②蒋… III. ①药用植物-细胞-悬浮培养-研究 IV. ①Q943

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 252504 号

责任编辑: 傅四周

装帧设计: 史利平

责任校对: 李 爽

出版发行: 化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市宇新装订厂

710mm×1000mm 1/16 印张 14 $\frac{3}{4}$ 字数 279 千字 2015 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 69.00 元

版权所有 违者必究

前言

PREFACE

近年来,随着天然药物化学的发展,人们从各种植物中发现了很多天然活性成分,这些活性成分具有重要的医疗价值。如红豆杉植物中的紫杉醇,粗榧科植物中的三尖杉酯类碱,它们都具有很好的抗癌作用。由于其药源植物生长缓慢、活性成分含量也很低,这些重要抗癌药物的供需矛盾日益突出。不少地方这些植物资源被过度开发,引起的生态破坏受到人们的普遍关注。如,20世纪90年代初,由于紫杉醇的大量需求,在云南有人疯狂地剥红豆杉的皮,用于提取紫杉醇,造成了云南红豆杉的极大破坏。随着发现海南粗榧的抗癌效果后,海南粗榧被大肆砍伐,致使其生存受到了极大的威胁,目前数量越来越稀少。我国拥有世界上最丰富的中药资源,中药是我国的民族之宝。全国中药企业达万余家。然而,我国中药资源可持续发展还存在很多问题。在药用植物资源保护、中药活性成分的标准化等方面与先进国家还有很大差距,这些问题阻碍中药的开发利用。

生物技术的兴起,特别是植物细胞工程技术的发展,使人们不但可以不依靠天然植物资源,而且还使标准化生产那些有重要作用的天然活性成分成为可能。这为中药的可持续发展与产业升级提供了一个全新的技术。近年来,人们对利用植物细胞悬浮培养技术合成天然植物活性成分进行了十分广泛而深入的研究,并且不少已实现了工业化的生产。全世界已有千余种植物被用作植物组织或细胞培养的对象来生产次生代谢产物。在悬浮培养的植物细胞中,半数以上的次生代谢产物的含量超过了野生植物的含量。如红豆杉细胞培养生产紫杉醇,粗榧植物细胞培养生产三尖杉酯碱,紫草细胞培养生产萘醌类化合物,长春花细胞培养生产生物碱,青蒿细胞培养生产青蒿素,喜树细胞培养生产喜树碱,苦瓜细胞培养生产类胰岛素,三七细胞培养生产皂苷和丹参细胞培养生产丹参酮等。与大田栽培生产中药相比,植物细胞悬浮培养具有很多优点,如不受地理环境、土壤条件、季节因素的限制;可提供一个“良好作业规范”(GMP)式的标准化生产环境,生产连续、产品质量稳定与标准可控;生产周期短,不占用土地资源;产品无农药残留等。因此,植物细胞悬浮培养技术将对我国中药资源开发的技术进步具有十分重要的意义,为名贵药材的生产提供一种先进技术,具有广阔的

发展前景。

要实施药用植物的细胞工程，首先要有一个先进而适合植物细胞生长的生物反应器，通过一系列对反应器的单元操作、有效的细胞生长与产物合成调控策略，才能提高中药有效成分含量。通过对有效成分含量的标准化，可提供与天然中药材具有相同药理作用的中药原料产品。其次运用生化工程技术分离和提取中药有效成分，实现产品高产与有效成分的稳定。

本书结合编著者的一些科研成果，针对植物细胞工程中的细胞悬浮培养技术进行了专门总结与梳理。书中包含植物细胞悬浮培养的一般操作技术、植物细胞生物反应器、促进有效成分合成的调控与产物的分离提取技术等几大块内容。全书共分七章，由海南大学李永成负责整体内容的策划、统稿与审稿。其中第二~六章由李永成编写，第一及第七章由海南大学蒋志国编写。本书力图反映植物细胞悬浮培养领域的最新研究进展与技术，以供读者参考。

本书得到国家自然科学基金（No. 21166007）资助。在编写过程中，参考了大量的国内外学术刊物文章，同时本研究室的研究生王成韬、龙晓娟与陈林等同学提供了很多科研数据，在此，对这些原文作者与研究生致以诚挚的谢意！

由于编者水平有限，不妥之处，敬请批评指正。

编著者

2014年11月

目录

CONTENTS

第一章 概论	1
第一节 植物细胞悬浮培养技术对药用植物产业开发的意义	1
第二节 植物细胞及其生长特点	3
一、植物细胞的结构与功能	3
二、植物细胞生长特点	5
第三节 植物细胞悬浮培养的应用与发展趋势	11
一、植物细胞悬浮培养技术的优点	11
二、植物细胞悬浮培养在中药现代化中的应用	11
三、植物细胞悬浮培养的发展趋势	12
参考文献	13
第二章 药用植物组织培养的基本方法	14
第一节 植物组织培养的基本设备	14
一、无菌室与超净工作台	14
二、培养室	16
三、玻璃器皿	16
四、化学试剂	17
第二节 植物组织培养的基本技术与方法	18
一、培养基	18
二、外植体	28
三、愈伤组织的诱导与继代培养	31
参考文献	37
第三章 药用植物细胞的大规模悬浮培养	38
第一节 细胞株的获取与扩大培养	38
一、单细胞的获得	38
二、单细胞扩大培养	40
三、影响单细胞生长的因素	42
第二节 植物细胞的悬浮培养	42
一、植物细胞悬浮培养方法	43

二、植物细胞悬浮培养设备	46
三、影响细胞悬浮培养的因素	57
第三节 高产植物细胞株的选育	60
一、筛选高产细胞系	61
二、诱变育种	64
参考文献	66
第四章 提高药用植物悬浮细胞活性成分的方法	68
第一节 培养条件的优化	68
一、优化培养基的组成	68
二、优化培养环境条件	70
第二节 诱导子的使用	70
一、诱导子诱导的植物细胞防御反应中的常见生理反应	72
二、常用的一些诱导子	75
第三节 代谢抑制剂的添加与前体物饲喂	77
一、添加抑制剂	77
二、前体饲喂	77
第四节 培养方式与新型生物反应器	78
一、培养方式	78
二、新型生物反应器的使用	80
参考文献	80
第五章 一些药用植物细胞的悬浮培养方法	82
第一节 红豆杉细胞悬浮培养生产紫杉醇	82
一、紫杉醇的化学结构与理化性质	82
二、紫杉醇的作用	82
三、紫杉醇的生产方法	83
四、红豆杉细胞悬浮培养生产紫杉醇工艺	86
第二节 人参细胞悬浮培养生产人参皂苷	92
一、人参皂苷与其生理活性	92
二、人参细胞的悬浮培养	95
三、西洋参毛状根和冠瘿瘤的培养	98
四、产物提取与分析	98
第三节 海南粗榧细胞悬浮培养生产抗癌生物碱	99
一、海南粗榧简介	99
二、海南粗榧碱与其功能	99
三、粗榧碱的生物合成途径	100

四、海南粗榧细胞悬浮培养生产抗癌生物碱	101
第四节 紫草细胞悬浮培养生产紫草素	108
一、紫草素及其生理活性	108
二、紫草素及其衍生物的生物合成途径	109
三、紫草细胞悬浮培养合成紫草素及其衍生物	110
参考文献	113
第六章 植物细胞悬浮培养的研究方法	116
第一节 植物悬浮细胞常用生理指标分析方法	116
一、细胞生物量的测定	116
二、细胞活力测定	116
三、细胞死亡率测定	117
四、底物消耗测定	117
五、细胞褐变与酚积累测定	119
第二节 植物细胞防御反应的研究方法	120
一、pH	121
二、活性氧迸发研究	121
三、苯丙氨酸解氨酶	125
四、酚	126
五、糖代谢途径一些关键酶的测定	127
第三节 内生真菌与植物悬浮细胞的耦合培养	128
一、耦合培养设备	129
二、耦合培养方法	130
三、影响耦合培养的因素研究	131
参考文献	134
第七章 产物提取与分析	136
第一节 样品前处理	137
一、液-液萃取	138
二、固相萃取	138
三、固相微萃取	139
四、液相微萃取	140
五、色谱衍生化技术	142
六、膜分离技术	143
七、超临界流体萃取	143
八、微波辅助萃取	144
九、超声辅助萃取	145

十、浊点萃取	145
第二节 薄层色谱扫描法	146
一、薄层色谱的固定相	147
二、展开剂的选择	151
三、薄层色谱扫描法及仪器	153
四、薄层色谱扫描法的定量方法	155
五、分析实例	156
第三节 气相色谱与气-质联用技术	159
一、气路系统	159
二、进样系统	160
三、分离系统	161
四、检测系统	162
五、气-质联用技术	164
六、分析实例	172
第四节 高效液相色谱法和液-质联用技术	176
一、HPLC 的关键部分——色谱柱	176
二、检测器	180
三、流动相	185
四、液-质联用	187
五、分析实例	190
第五节 毛细管电泳仪	194
一、毛细管电泳仪基本结构	194
二、毛细管电泳的基本分离原理	195
三、常用分离模式	195
四、毛细管柱	201
五、检测方法和检测器	202
六、分析实例	203
第六节 离子色谱	211
一、离子色谱的基本原理	212
二、离子色谱系统组成	215
三、离子色谱的分离系统	216
四、离子色谱的抑制系统	216
五、离子色谱的衍生系统	218
六、离子色谱的检测系统	218
七、应用实例	219
参考文献	226

第一节 植物细胞悬浮培养技术 对药用植物产业开发的意义

当今,植物在新药开发与疾病治疗方面都有重要作用。据统计,至少有20000种高等植物可用于疾病治疗。我国是世界上使用药用植物资源最多的国家,现有有记载的药用植物10000多种。几千年来,药用植物对中华民族的健康事业作出了巨大贡献。中医药产业的迅速发展导致药用植物资源过度开发,生物多样性遭到极大破坏,相当一部分珍稀药物植物资源濒临灭绝,如20世纪80年代后期,我国的甘草资源比50年前减少了60%,我国的红豆杉(*Taxus chinensis*)自其中的抗癌药物紫杉醇被发现与应用后就遭到了极大破坏,我国海南的海南粗榧(*Cephalotaxus mannii*)含有抗癌成分三尖杉酯碱,引起人们的过度采伐与毁灭性利用,现只有零星分布,处于濒临灭绝边缘。另外一些珍贵中药材的传统栽培面临很多困难,如生长周期长、有效成分低、难以标准化与有农药残留等问题,制约了产业的快速发展与进入国际市场。因此应当采用一些新的生物工程技术,如植物细胞工程技术、基因工程技术等代替或改良传统方法,对中药产业的可持续发展与产业升级有重要作用。

药用植物的有效成分(如抗癌药物、生物碱、香料、色素等)都属于植物次生代谢物,它们都是在植物细胞内通过植物的次生代谢合成的。这些种类众多的植物次生代谢物,为植物所特有,用动物或微生物细胞生产不了,也很难用化学方法来合成,它们大多具有相当强的生物活性,因此可为人类提供丰富的药物资源。

植物细胞悬浮培养是在植物组织培养的基础上,利用微生物发酵工程技术,从一小片植物叶片或一小段植物嫩茎等植物组织中获得植物离体的单个细胞,然后将其培养在液体悬浮培养基中,并合成目的植物活性次生代谢物。与微生物培

养技术相比，植物细胞悬浮培养技术更为复杂。自从 1956 年 Routier 和 Nichell 首次在一篇专利中提出利用植物细胞培养合成次生代谢产物之后，近 60 年来，采用植物细胞悬浮培养技术生产次级代谢物的研究取得了飞速的发展。已经对 400 多种植物进行过研究，从悬浮培养细胞中分离到 600 多种次级代谢产物，其中 60 多种在含量上超过或等于其原植物，20 种以上超过干重的 1%。这些植物次生代谢产物很多具有生物活性，是植物药的重要成分。如今大部分植物药通过大田栽培获得。但大田栽培往往存在农药残留、季节限制、受栽培条件影响、生产周期长、与农作物争地等问题。植物细胞悬浮培养技术可有效解决这些问题，与大田栽培相比，它具有很多优点，如植物组织培养不受地理环境、土壤条件、季节因素的限制；可提供一个 GMP 式的标准化生产过程，生产连续、产品质量稳定可控；生产周期短，不占用土地资源；产品无农药残留；可以有目标地生产目的化合物等。因此，植物悬浮培养技术将对我国中药资源开发的技术进步具有十分重要的意义，为名贵药材的生产提供一项先进技术，具有广阔的发展前景。例如，人们已成功利用红豆杉植物细胞悬浮培养工业化生产抗癌药物——紫杉醇，不但提高了紫杉醇的产量与品质，还很好地保护了宝贵的红豆杉资源免被破坏。另外如人参、紫草、洋地黄、黄连等通过细胞培养生产药用成分实现了工业化生产。表 1-1 列出了一些植物的有效成分。

表 1-1 一些植物来源的重要药物

产 品	用 途	植 物
阿吗碱(ajmalicine)	抗高血压	长春花(<i>Catharanthus roseus</i>)
青蒿素(artemisinin)	抗疟	青蒿(<i>Artemisia annua</i>)
黄连素(berberine)	肠疾	长裂旋花(<i>Calystegia japonica</i>)
喜树碱(camptothecin)	抗肿瘤	喜树(<i>Camptotheca acuminata</i>)
辣椒素(capsaicin)	反刺激剂	小米椒(<i>Capsicum frutescens</i>)
可待因(codeine)	镇静剂	罂粟(<i>Papaver somniferum</i>)
秋水仙碱(colchicine)	抗肿瘤	秋水仙(<i>Colchium autumnale</i>)
地高辛(digoxin)	心脏刺激剂	毛花洋地黄(<i>Digitalis lanata</i>)
毛鱼藤素(ellipticine)	抗肿瘤	<i>Orchrosia elliptica</i>
毛喉菇(<i>forskolin</i>)	支气管哮喘	毛喉鞘蕊花(<i>Coleus forskohlii</i>)
人参皂苷(ginsenoside)	滋补	人参(<i>Panax ginseng</i>)
吗啡(morphine)	镇静剂	罂粟(<i>Papaver somniferum</i>)
鬼臼毒素(podophyllotoxin)	抗肿瘤	足叶草(<i>Podophyllum petalum</i>)
奎宁(quinine)	抗疟	金鸡纳(<i>Cinchona ledgerinana</i>)
血根碱(sanguinarine)	抗瘟疫	美洲血根草(<i>Sanguinaria canadensis</i>)

续表

产 品	用 途	植 物
紫草素(shikonin)	抗菌	紫草(<i>Lithospermum erythrosizon</i>)
紫杉醇(paclitaxel)	抗癌	红豆杉(<i>Taxus spp.</i>)
长春新碱(vincristine)	抗白血病	长春花(<i>Catharanthus roseus</i>)
长春碱(vinblastine)	抗白血病	长春花(<i>Catharanthus roseus</i>)
黄芩苷(baicalin)	抗炎、降压	黄芩(<i>Scutellaria baicalensis</i>)
葛根素(puerarin)	抗冠心病	野葛(<i>Pueraria lobata</i>)
龙血素 B(loureirin B)	镇痛、抗血栓	龙血树(<i>Dracaena spp.</i>)

注：引自：高文远等，2005。

但植物细胞培养真正实现工业化的例子却不多，其面临的主要困难有：①植物生长缓慢，发酵时间很长；②代谢机制复杂，很多产物合成途径不明，难以从根本上解决问题；③目的产物往往含量很低，后提取困难，缺乏经济的可行性；④工程方面的问题，如发酵过程易染菌、植物细胞对剪切力敏感、细胞聚集成团、高黏度的非牛顿型流体，使通气与传质过程困难、反应器放大困难等。

第二节 植物细胞及其生长特点

一、植物细胞的结构与功能

植物细胞培养的特性、营养要求、培养条件等培养参数均由植物细胞的结构、组成与功能所决定，因此首先我们应当对植物细胞的结构及其功能有一个基本了解。

(一) 植物细胞的化学组成

植物细胞中含量最多的有 6 种元素，它们分别是碳 (C)、氢 (H)、氧 (O)、氮 (N)、磷 (P) 与钙 (Ca)，它们约占整个细胞组成的 98%。细胞组成的最基本元素是碳元素。根据含量的多少，可分为基本元素 (C、H、O、N)、大量元素 (C、H、O、N、P、S、K、Ca、Mg) 与微量元素 (Fe、Mn、B、Zn、Cu、Mo 等)。

由这些化学元素形成了构成植物细胞的各种化学成分，植物细胞的主要化学成分有水 (约占 60%~90%)、糖类、蛋白质、核酸、脂类、多肽与氨基酸，此

外还有果胶、纤维素、半纤维素、淀粉与一些金属离子 (K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 等)。其中水、糖类、蛋白质、核酸、脂类是构成细胞的最基本成分,果胶、纤维素、半纤维素是构成植物细胞壁的成分,淀粉是植物细胞光合作用的产物。金属离子参与酶的活性调节、细胞内 pH 的稳定与维持一定的渗透压。

(二) 植物细胞的大小与形态

尽管植物多样,形态各异,但均由细胞构成,植物细胞是植物的基本结构与功能单位。在植物体内,来源相同的细胞形成执行特定功能的组织,如分生组织与次分生组织。而多种组织发育形成执行复杂功能的器官,如根、茎、叶、花、果实等。

植物细胞形态各异,可主要分成两大类,一类近球形——细胞的直径相等,往往形成多面体或球形。用于悬浮培养的细胞属于这类。另一类似长形——细胞的长轴比直径长很多。细胞的形态主要由其本身的遗传性与它的生理功能决定,同时,也受外界环境条件的影响。

高等植物细胞的大小相差很大,与它的遗传特性、生理机能、组织种类与分化程度等有关。如苧麻科 (Urticaceae) 的纤维细胞长度可达 20~550mm。悬浮培养的细胞的大小在数十个微米左右。

处于悬浮培养状态的细胞,属于离体细胞,不同于植物组织中的细胞,其形态与大小还受培养条件的影响,如培养基的渗透压、转速与培养温度等。

(三) 植物细胞的基本结构

典型的植物细胞是由坚硬的细胞壁包裹原生质体,原生质体包括细胞膜、细胞质、细胞核、细胞器与内含物。

1. 细胞壁 (cell wall)

植物细胞壁是存在于植物细胞外围的一层厚壁,是区别于动物细胞的主要特征之一,由胞间层、初生壁、次生壁三部分构成。细胞壁主要成分是纤维素和果胶。细胞壁参与维持细胞的一定形态、增强细胞的机械强度,并且还与细胞的生理活动有关。与微生物细胞壁比较,植物细胞壁坚硬,但缺乏弹性,因而较脆,对剪切力比较敏感。在植物细胞悬浮培养中,应当考虑植物细胞对剪切力的敏感性,采用剪切力低的反应器与转速。

胞间层又称为中胶层,位于两个相邻细胞之间,为两相邻细胞所共有的一层膜,主要成分为果胶质。有助于将相邻细胞粘连在一起且还与细胞间的信号传递有关。悬浮培养中,数个或数十个细胞通过胞间层聚集在一起,形成一定直径大小的聚集体。过大或过小的聚集体都不利于悬浮培养与产物的形成,对于过大的

聚集体可添加适当浓度的果胶酶处理。

2. 细胞膜 (cell membrane)

细胞膜呈流动镶嵌双分子层结构。磷脂双分子层作为骨架,蛋白质有两种,第一种贯穿磷脂层作为载体蛋白,又称为跨膜蛋白或内在蛋白,它与细胞内外物质的运输有关。第二种蛋白通过静电作用或离子键等非共价键与膜脂或膜内在蛋白相连,分布在膜的内外表面,它具有细胞间识别功能。细胞膜有重要的生理功能,如控制细胞内外物质的进出;参与细胞壁的合成与装配;维持胞内环境的稳定;控制细胞生长与分化;环境信号的识别与相邻细胞间的连接等。

3. 细胞器 (organelle)

是细胞内一般由各种膜包被的功能性结构,是真核细胞的典型结构特征之一。在细胞质内含有大小与形状各异的细胞器,如液泡 (vacuole)、溶酶体 (lysosome)、内质网 (endoplasmic reticulum)、高尔基体 (golgi apparatus)、线粒体 (mitochondria)、质体 (plastid)、微体 (microbody) 等。它们各自具有特定的生理功能,并协调完成很多复杂的代谢反应与生理过程。植物细胞特有的细胞器是液泡与叶绿体 (chloroplast)。

4. 细胞核 (nucleus)

植物细胞除成熟的筛管细胞外,均具有细胞核。细胞核是 DNA 存在的场所。它控制植物的遗传、基因表达,调节细胞的代谢、生长发育。是细胞遗传与代谢调控的中心。

二、植物细胞生长特点

植物细胞生长 (growth) 是指原生质的增加而引起植物细胞体积或质量的增加,是通过细胞分裂增加细胞数量和细胞体积长大来实现的,宏观表现为悬浮培养液中生物量的增加。

(一) 植物细胞的分裂

1. 细胞分裂周期

处于分裂阶段的植物细胞,原生质稠密,细胞体积大,细胞核大,无液泡或液泡小而少,细胞壁薄,合成代谢旺盛。从上次分裂结束到下次再分裂成两个子细胞的过程,称为细胞周期 (cell cycle),包括分裂间期 (interphase) 和分裂期 (mitotic stage) 两个阶段。分裂间期主要是为分裂期做物质与能量上的准备,表

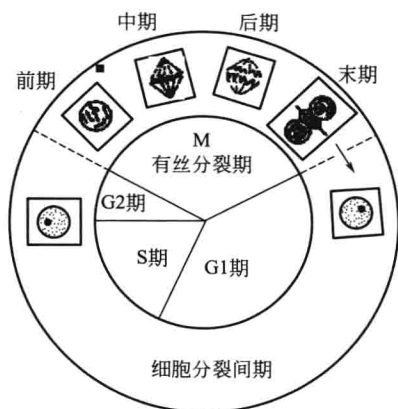


图 1-1 细胞周期

现为体积增大，合成代谢旺盛，主要有 DNA 复制、RNA 的合成、有关酶的合成及 ATP 的合成。细胞周期可细分为 4 个时期（见图 1-1）。

① G1 期：主要合成 RNA，最明显的细胞学指标是核仁由于积累了大量的 RNA 而迅速增大，合成的大分子包括 mRNA、tRNA、rRNA 和蛋白质。

② S 期：是 DNA 合成复制阶段，DNA 的含量增加一倍。

③ G2 期：DNA 合成结束，只合成少量的蛋白质。

④ M 期：有丝分裂期，最后形成两个新细胞。

2. 细胞分裂的调节

细胞分裂调节的关键是依赖细胞周期蛋白（cyclin）的蛋白激酶（cyclin-dependent protein kinase, CDK）。植物细胞分裂周期受本身的遗传物质控制，但受外界条件，如温度、水分、化学试剂、光照等影响。植物激素在细胞分裂过程中有重要影响，它主要是通过控制 CDK 的活性而调控细胞周期不同阶段间的转化。如赤霉素可促进水稻 G2/M 间的转化，加速细胞分裂与伸长。蔗糖、维生素、矿物元素、温度等也会影响细胞周期的进程。蔗糖除作能源外，还是一种重要的信号分子，对细胞周期有重要调节作用。在培养基中缺少蔗糖，可以阻断培养细胞 G1/S 期和 G2/M 期的转化，抑制蛋白质合成，使细胞分裂停止。钙离子作为胞内的第二信使分子，在细胞周期 G0/G1、G1/S、G2/M 等转换中有重要作用。维生素 B₁、维生素 B₆ 与烟酸（维生素 B₃）等 B 族维生素，也能促进细胞分裂。因此在植物细胞培养基中应适当添加。在一定范围内，增温可加速细胞分裂。光照对细胞生长有明显影响，但在悬浮培养状态下，一般情况下不需要光照，有光反而抑制细胞生长，而暗培养则有利于悬浮细胞的生长与分裂。

（二）细胞的伸长

细胞分裂后，部分细胞继续分裂，部分细胞停止分裂，过渡到细胞伸长阶段。在细胞伸长阶段，细胞大量吸水，体积不断增大，同时伴随旺盛的合成代谢与呼吸作用，蛋白质、核酸与纤维素等有机物大量增加。

植物激素对细胞伸长有重要的调节作用：细胞分裂素可促进细胞的横向生长；而生长素与赤霉素则影响细胞壁的可塑性，使细胞壁变松弛，从而促进细胞

伸长；乙烯和脱落酸对细胞伸长有抑制作用。

（三）细胞的分化与其全能性

细胞分化（cell differentiation）是指由分生组织细胞发育而成具有各种形态与生理功能的成熟细胞的过程。植物从受精卵开始，不断分化，形成各种细胞、组织与器官，最后形成植物体。

德国植物学家 Haberlandt 在 1902 年提出细胞全能性的概念。细胞全能性（totipotency）是指植物体的每个细胞都携带有一套完整的基因组，具有发育成完整植株的潜在能力。分化完成后，细胞保持相对的稳定性。一旦脱离母体环境，在适当条件下就会表现出全能性，生长发育成一个完整植株。全能性的实现细胞包括脱分化与再分化两个过程。已分化的细胞和组织，在一定培养条件下（主要是外源激素）逐步丧失其特有的分化能力的过程，称为脱分化（dedifferentiation）。新形成的细胞群称为愈伤组织。已脱分化的愈伤组织，在一定激素诱导下，再分化为各种植物的器官，形成完整植株，这个过程称为再分化（redifferentiation）。激素种类与搭配对细胞全能性的实现有重要作用。

细胞全能性理论为植物细胞悬浮培养提供了理论依据。首先，在外源激素的作用下，通过脱分化作用，形成植物愈伤组织。植物愈伤组织是获得悬浮培养单细胞的主要来源。由于细胞具有全能性，每个单细胞中均具有亲本植物合成目标次生代谢物的全部遗传信息，这为植物细胞培养生产活性次生代谢物提供了可能。

（四）细胞程序性死亡

植物细胞生长发育到一段阶段或遇到不良环境条件，会引起死亡。细胞死亡是其新陈代谢的结果。细胞死亡分成两种类型，即细胞坏死（necrosis）和程序性细胞死亡（programmed cell death, PCD）。细胞坏死是一般物理、化学损伤的结果，是细胞在遭受极度刺激时引起的以原生质膜破裂为特征的被动非正常死亡。而 PCD 则是植物细胞在内外因子的诱导下，由基因控制的一种主动死亡过程，是植物发育过程的一种普遍现象，是生命活动的基本特征之一，PCD 也是植物自我保护与对外胁迫反应的一种机制。

在植物细胞悬浮培养中，为了提高目的产物的产量，往往使用各种诱导子，在提高产量的同时会引起细胞的程序死亡，因此诱导子量与添加时间的把握至关重要。PCD 的分子生物学特征是细胞 DNA 片段化，即细胞 DNA 降解，形成小片段，这些小片段在凝胶电泳上可形成梯形的 DNA 条带（DNA ladder），这被认为是植物细胞程序死亡的标志。

（五）植物悬浮细胞生长特点

尽管植物细胞悬浮培养的很多技术来自于微生物培养技术，但它既不同于微生物细胞的生长，同时它属于离体细胞，也不同于正常植物的在体细胞的生长。有其自身的特点，因此要建立植物细胞悬浮培养体系，必须要了解植物悬浮细胞的有关性质与特点。

1. 植物悬浮细胞的形态

植物细胞要比微生物细胞大很多，其形态大多为球形或椭圆形。但在培养过程中，其形态与大小会发生改变，一般大小在 $10\sim 100\mu\text{m}$ ，比细菌与真菌要大 $10\sim 100$ 倍。在细胞培养的中期和对数生长期，细胞聚集成团，大小在 $350\sim 400\mu\text{m}$ ，大的细胞团含有上百个细胞，其大小有数毫米（见图 1-2）。细胞成团的主要原因

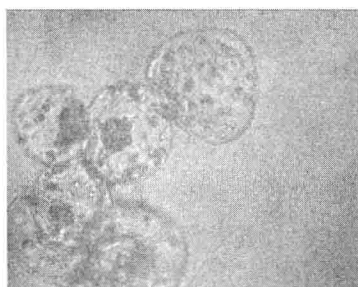


图 1-2 红豆杉悬浮培养的细胞聚集形态

主要原因是细胞分裂后不能很好地分开，另外生长后期分泌的多糖物质也有助于成团。培养过程中，细胞团的大小会影响产物的形成与营养物质的吸收。传代次数越多，细胞分散好，细胞团很小，影响产物的形成。而过大的细胞团容易下沉，造成混合困难，影响传质，使中心营养和供氧不足，也会影响产物的合成。适合大小的细胞团使颗粒中心至表面形成一个传质梯度，起到一个类似细胞分化的作用，利于产物形成。细胞团的大小受细胞系、培养阶段

与培养条件的影响。另外，植物细胞结团的特性给植物悬浮细胞的大规模培养带来影响，如它往往会引起管道的堵塞。

2. 植物细胞液流变学的特点

植物细胞比微生物细胞要大，植物细胞悬浮培养时接种量大，因此培养液的生物量浓度高，每升培养液能达 70g 细胞干重，另外细胞在生长过程中往往会分泌胞外多糖。因此整个液体黏度很高。且随细胞生长，浓度的升高，培养液黏度会明显上升，如烟草细胞对数生长期的培养液的黏度为培养初期的 30 倍。总体来说，植物细胞悬浮培养液为非牛顿型的假塑性流体。根据这性质，设计植物细胞培养器时，要选择适当的搅拌叶轮，以满足液体混合的需要。如可选择双螺旋形带状叶轮。

3. 植物细胞悬浮培养对氧的需求

尽管植物细胞悬浮培养液属高黏度液体，不利于氧的传递。植物细胞生长的