

高山红景天致密愈伤组织颗粒内氧传递特性 与细胞活性的研究

谢 健 许建峰* 冯朴荪

(大连理工大学生化工程研究所 大连 116012)

摘 要 实验测定高山红景天致密愈伤组织颗粒(CCA)内部有效氧扩散系数很小,其值在 $0.34 \times 10^{-10} \sim 5.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ 之间,且随粒径的增大而增加;理论计算结果表明 CCA 颗粒内部处于严重氧枯竭状态。但实际测定 CCA 颗粒内部细胞活性很高,表明 CCA 颗粒内部存在着高效氧传递机制。颗粒内出现的管状分子等分化结构以及胞间连丝可能与氧在颗粒内部的传递机制有关。

关键词 高山红景天,愈伤组织,颗粒,有效氧扩散系数

学科分类号 Q942.6

利用高山红景天(*Rhodiola sachalinensis*)致密愈伤组织颗粒(Compact Callus Aggregates,简称 CCA)悬浮培养生产红景天甙其产量明显高于松散细胞悬浮培养,且培养液纯净,固液易分离及大规模培养中不出现“发泡”现象等特点而显示其诱人的应用前景^[1]。

但由于高山红景天 CCA 颗粒的尺寸较大(直径 2~5mm)且质地致密,因此氧在颗粒内的传递阻力有可能会成为颗粒内细胞生长的限制因素。通常氧在细胞组织内的扩散速率很小,如通过微电极测定泡沫固定的金鸡纳细胞颗粒中的氧浓度证实,颗粒内部存在很高的氧浓度梯度^[2];在微生物与动物细胞培养中,同样也发现了细胞团内这种氧扩散阻力的存在,结果使得细胞团中心的细胞活性大大降低,影响了细胞生长。

本文参照 Ita Ananta 测定自生固定化鸟茄(*Solanum aviculare*)细胞团中氧传递系数的实验方法^[3],研究高山红景天 CCA 颗粒内部的氧传递特性,着重探讨氧传递限制对颗粒内细胞活性的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 培养方法

高山红景天 CCA 悬浮培养系的建立与培养方法如文献[1]。

1.2 CCA 颗粒表观耗氧速率(*R*)的测定

参照 Sata 及 Toda 设计的 BOM 装置^[4],在一个 100ml 盛满液体的玻璃筒内挂有一网状小兜,兜里装有一定体积的 CCA 颗粒。玻璃筒置于磁力搅拌器上。一个溶氧电极插在

国家自然科学基金资助项目(No.29376227)。

通讯联系人,现在地址:中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室,北京 100080。

收稿日期:1997-04-28,修回日期:1997-09-23。

液体里测定溶氧浓度。该装置于 25℃ 的房间内操作。将无菌培养基及一定体积的 CCA 颗粒放入上述装置内,并向培养基中通空气 30min,使培养基中溶氧浓度达到稳定。然后停止通气,将玻璃筒密闭,注意排除里面的所有气泡。用平衡记录仪记录装置内溶氧浓度随时间的变化进程。得一直线,由直线斜率求得 R 值。25℃ 下培养基中的氧饱和浓度取 $8 \times 10^{-3} \text{kg/m}$ 。实验中选用了 4 个尺寸段的 CCA 颗粒进行了测定。由于 CCA 颗粒形状各异,因此每尺寸段的颗粒直径用下式来计算:

$$d = \left(\frac{6LW^2}{\pi} \right)^{1/3} \quad (1)$$

1.3 颗粒内有效氧扩散系数(De)的测定方法

同样采用上述 BOM 装置,测定前需将 CCA 颗粒中细胞灭活,以消除细胞呼吸对 De 测定的影响。灭活细胞时应避免使细胞组织分解或变性而影响氧的扩散过程。本实验中将 CCA 颗粒放在 1% 的 HgCl_2 溶液中浸泡 5h,然后用去离子水冲洗干净,便可达到灭活细胞而又不破坏颗粒组织结构的目的^[5]。将一定体积用 HgCl_2 处理过的颗粒放入网兜,将网兜置于一盛培养基的密闭烧杯中,然后往烧杯中通入氮气 1~2h,使颗粒内氧全部被氮气取代。然后迅速将网兜转入盛有氧饱和培养基的玻璃筒内,密封,磁力搅拌,监测装置内溶氧浓度的变化。

De 的计算采用 Crank 方程的修正式^[6]。当无氧状态的球状颗粒悬浮在初始氧浓度为 c_{b0} 的溶液中,忽略液相扩散的影响,则溶液中溶氧浓度随时间的变化可表示为:

$$c_b = \frac{\alpha c_{b0}}{1 + \alpha} \left[1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6(1 + \alpha) \exp(-D_e q_n^2 t / r^2)}{9 + 9\alpha + q_n^2 \alpha^2} \right] \quad (2)$$

若氧在颗粒内的分配系数均一,则 q_n 为方程:

$$\tan q_n = \frac{3q_n}{3 + \alpha q_n^2} \quad (3)$$

的非零正根,

在本文中,采用 Pu 等提出的将式(2)线性化处理的方法来估算 De 值^[7]。即在氧扩散进行时间较长的情况下,式(2)中 $n \geq 2$ 项可以忽略,这样便得:

$$\ln \left(\frac{c_b(1 + \alpha)}{c_{b0}\alpha} - 1 \right) = \ln \left(\frac{6(1 + \alpha)}{9 + 9\alpha + q_1^2 \alpha^2} \right) - \left(\frac{D_e q_1^2}{r^2} \right) t \quad (4)$$

式中 q_1 为式(3)的最小正根。由式(4)进行线性回归,便可由直线斜率求得 De 值。本实验中,液相与固相体积比 α 均取 3.12,这样 $q_1 = 3.397$,直线截距为 -1.80。

1.4 细胞本征耗氧速率(R^*)的测定

为进一步分析氧在 CCA 颗粒内的传递与消耗特性,需计算 CCA 细胞本征耗氧速率 R^* ,但首先需作如下几点假设:(1)氧在 CCA 颗粒内的扩散符合 Fick 定理;(2)颗粒内部是均一的;(3)忽略液相主体扩散的影响;(4)颗粒都为尺寸相同的球体;(5)颗粒内有效扩散系数为恒值。(6)颗粒内氧浓度梯度只在径向上存在。另外,还需假定细胞耗氧为零级速率反应过程,因为在临界氧浓度以上,细胞呼吸速率与氧浓度无关。

这样表观梯尔模数 Φ 可用下式计算^[8]:

$$\Phi = \left(\frac{r}{3} \right)^2 \frac{R}{D_e c_b} \quad (5)$$

内扩散有效因子 η 可用球体内零级反应的 $\eta \sim \Phi$ 图求得。当 $\Phi > 10$ 时, 零级反应的 $\eta \sim \Phi$ 曲线可用下式近似表示^[8]:

$$\eta = \frac{2}{\Phi} \quad (6)$$

于是细胞本征耗氧速率 R^* 便可由有效因子的定义式计算出:

$$R^* = \frac{R}{\eta} \quad (7)$$

这样便可从理论上计算 CCA 颗粒内不出现氧枯竭的最大颗粒直径 d_{\max} :

$$d_{\max} = 2\sqrt{\frac{6D_e c_b}{R^*}} \quad (8)$$

1.5 颗粒内细胞活性的测定

采用 TTC(氯化三苯四氮唑)染色法^[9]。定性测定是将颗粒切成约 1mm 厚的薄片, 置于 0.5% (w/v) 的 TTC 磷酸缓冲液中, 黑暗中处理 24h。有活性的细胞染成红色, 否则仍为黄色。定量测定^[10]时将一定体积的 CCA 颗粒切碎后置于试管中, 加入 3ml TTC 磷酸缓冲液, 黑暗中处理 24h。吸去 TTC 溶液, 细胞组织用蒸馏水清洗 2~3 次, 吸去水溶液, 再加入 95% 酒精 3ml。将试管放入 60℃ 水浴中加热 10min 抽提红色甲谱, 冷却后用 95% 酒精定容到 3ml, 摇匀于分光光度计 485nm 波长处测定光密度。以处于指数生长期的高山红景天单细胞作为对照, 以光密度的相对值来表示 CCA 颗粒的活性。

2 结果与讨论

2.1 表观耗氧速率 R

测定培养指数生长期(6d)与减速生长期(20d)不同尺寸段 CCA 颗粒的表观耗氧速率 R , 结果如图 1。表观耗氧速率随颗粒尺寸的增大而有一定程度的增加。处于指数生长期和减速生长期的 R 值, 在颗粒尺寸较小时 ($d < 2\text{mm}$) 有一定差别, 而在颗粒尺寸为 3~8mm 时, 几乎一致。

在测定表观耗氧速率时, 同时也能从记录溶氧随时间变化的图上, 大致估计 CCA 细胞生长的临界氧浓度 $c_{\text{临}} = 2 \times 10^{-3} \text{kg/m}$, 即 25% 培养基的饱和溶氧值, 且随颗粒尺寸的增加变化不大。

2.2 氧在 CCA 颗粒内的有效扩散系数 D_e

实验测得氧在指数生长期的 CCA 颗粒中的有效扩散系数如图 2。

图 2 表明, 氧在 CCA 颗粒中的扩散系数随颗粒直径的增加近似以线性升高, 其值在 $0.34 \times 10^{-10} \sim 5.4 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ 之间, 与氧在 25℃ 清水中的扩散系数 ($2.5 \times 10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$) 相比, 其值是非常低的。由于不同尺寸的 CCA 颗粒中, 其内部结构与分化程度是有较大差别的, 尺寸较大的 CCA 颗粒内部往往含有较多的空隙, 从而减小了氧的扩散阻力, 因此表现出 D_e 随颗粒直径的增加而上升的趋势。

2.3 本征耗氧速率 R^*

由图 2 中的氧扩散系数分别计算不同尺寸颗粒的表观梯尔模数 Φ 、内扩散有效因子 η 及 CCA 细胞本征耗氧速率 R^* , 结果如表 1。

表 1 表明, 本征耗氧速率 R^* 随颗粒尺寸的增大基本上为一常数, 其平均值约为 5.8

$\times 10^{-4} \text{kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{s})$ 。这样便可由式(8)从理论上计算出 CCA 颗粒内不出现氧枯竭的最大颗粒直径 d_{max} 。由于不同颗粒尺寸的氧扩散系数相差较大,因此 d_{max} 需分别计算,结果如表 2。表中另外也给出了假定氧在颗粒内的扩散系数 D_e 高达在清水中的值时的最大粒径 d'_{max} 。这里液相溶氧浓度 c_b 取 25℃ 时的饱和值 $8 \times 10^{-3} \text{kg}/\text{m}^3$ 。

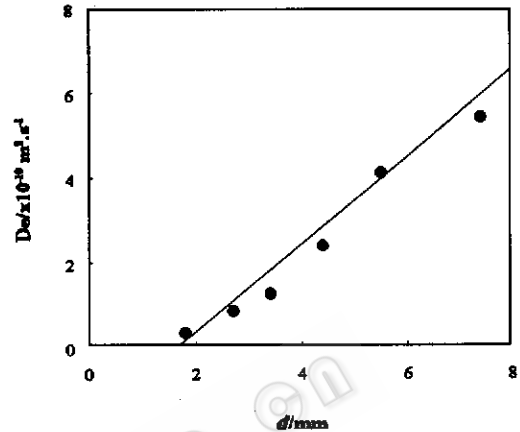
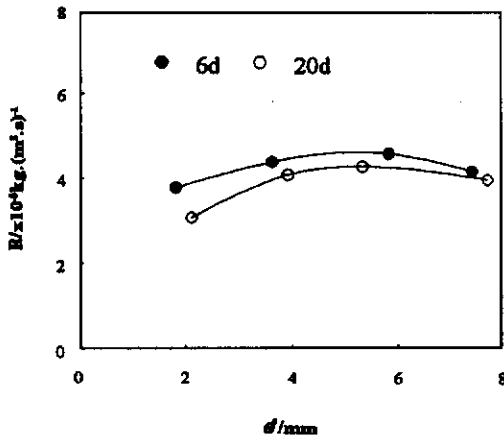


图 1 CCA 颗粒表现耗氧速率随颗粒尺寸的变化
Fig.1 The variation of the observed oxygen uptake rate with the aggregate size

图 2 有效扩散系数随颗粒直径的变化
Fig.2 Effective diffusivity of oxygen in CCA aggregates as a function of aggregate size

表 1 CCA 颗粒表现梯尔模数 Φ 、内扩散有效因子 η 及细胞本征耗氧速率 R^*

Table 1 Calculated values of the observed thiele modulus, effective factor and intrinsic oxygen uptake rate for each aggregate size

d/mm	Φ	η	$R^* / \times 10^{-4} \text{kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{s})^{-1}$
1.8	29	0.069	5.6
3.4	26	0.077	5.8
5.5	24	0.083	5.8
7.4	28	0.070	6.0

表 2 CCA 颗粒内不出现氧枯竭的最大粒径的计算值

Table 2 Calculated values of the maximum aggregate diameter for which the concentration of oxygen remains greater than zero throughout aggregates

d/mm	1.8	3.4	5.5	7.4
d_{max}/mm	0.11	0.12	0.37	0.42
$d'_{\text{max}}/\text{mm}$	4.3	1.9	1.1	0.95

表 2 表明,即使在液相溶氧浓度达到饱和值时,计算得到 d_{max} 值也是极小的,说明整个 CCA 颗粒几乎都处于氧枯竭状态,细胞的活性应该是很低的。

2.4 CCA 颗粒内的细胞活性

用 TTC 染色法观察颗粒内细胞活性发现,当粒径小于 5mm 时,颗粒内的细胞几乎都能染成红色;而当粒径为 6mm 时,颗粒中心能发现少量丧失活性的细胞;当粒径在 8mm 以上时,可以观察到围绕颗粒中心小孔的一薄层细胞已丧失活性。定量测定 CCA 细胞活性随粒径的变化如图 3。

图 3 表明,CCA 颗粒内细胞活性很好,即使在粒径高达 8mm 的颗粒中,细胞的成活

率还达 97% 以上。这与前面基于扩散理论计算所得颗粒内处于严重氧枯竭的情况完全不同。因此,我们可以肯定,氧在 CCA 颗粒内部的传递不仅仅是简单扩散过程,而是存在着另外的高效传递机制。前面图 1 中测得的表现耗氧速率 R 与颗粒直径之间的关系也证明了这一点。因为根据简单氧扩散理论, R 值应该随粒径增大而降低,但实际测定的结果正好相反。

实际上每个 CCA 颗粒都应该看作是一个有机整体,颗粒内部细胞接触紧密,呈现一定程度的组织分化(如图 4)。这些分化的结构可能为促进氧及其它营养物质的输送提供通道,而其动力则应该是来源于细胞的代谢过程。另外 CCA 颗粒中的细胞是经过有丝分裂增殖的,因此,他们之间很有可能存在胞间连丝,即细胞之间用来传递物质与信息的微小的胞质通道^[11]。但在灭活 CCA 细胞的过程中,细胞膜的破坏使得这些运输通道失活,因此丧失了输送能力。即使在灭活细胞的过程中,使细胞结构及其它特性保持完好,由于细胞代谢的停止,胞间物质输送的动力也会随之消失。因此实验测得 CCA 颗粒中的氧传递速率是非常低的。

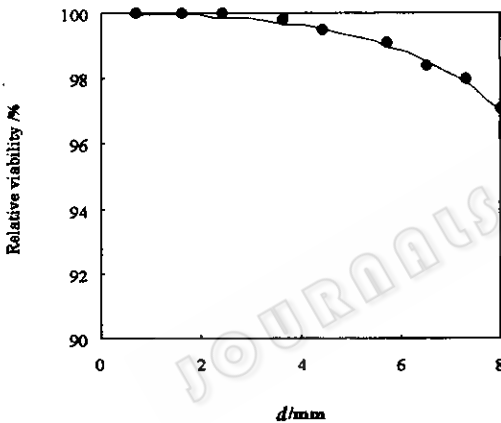


图 3 不同尺寸 CCA 颗粒中细胞的相对活性

Fig.3 The relative viability of cells within different sizes of CCA aggregates

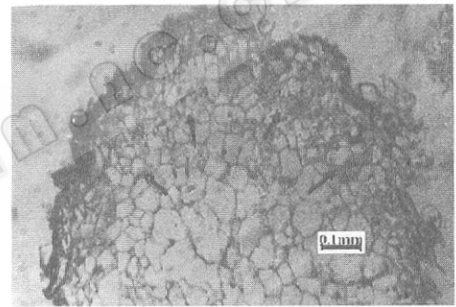


图 4 CCA 颗粒的内部结构

Fig.4 The interior of the CCA aggregates
Area of active cell division with small mitotic cells are evident mainly at the periphery of the aggregates as indicated by arrows

3 结 论

CCA 颗粒内有效氧扩散系数数值在 $0.34 \times 10^{-10} \sim 5.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ 之间,且随粒径的增大而增加。计算结果表明 CCA 颗粒内部处于严重的氧枯竭状态。

实际测定 CCA 颗粒内部细胞活性很高,细胞生长并没有显著地受到氧扩散限制的影响,表明 CCA 颗粒内部存在着高效氧传递机制。推测颗粒内出现的管状分子等分化组织结构以及胞间连丝可能与氧或其它营养物质在颗粒内的传递机制有关。

符号说明

c_{b0} 溶液中初始溶氧浓度/ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
 c_b 溶液中瞬时溶氧浓度/ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$

R^* 细胞本征耗氧速率/ $\text{kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{s})^{-1}$
 r 颗粒半径/mm

$c_{\text{临}}$ 临界溶氧浓度/ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$	t 时间/s
D_e 颗粒内有效扩散系数/ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	W 颗粒的宽度/mm
d 颗粒直径/mm	希腊字母:
d_{max} 颗粒内不出现氧枯竭的最大颗粒直径/mm	a 液相与固相体积比
L 颗粒的长度/mm	Φ 表观梯尔模数
R 细胞表观耗氧速率/ $\text{kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{s})^{-1}$	η 内扩散有效因子

参 考 文 献

- 1 许建峰, 韩爱明, 冯朴菘. 生物工程学报, 1996, 12(4):460~465
- 2 Robins R J, Parr A J, Richards S R *et al.* In: Morris P(ed). Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. 162~172
- 3 Ita Ananta, Subroto M A, Doran P M. Biotechnol Bioeng, 1995, 47:541~549
- 4 Sato K, Toda K. J Ferment Technol, 1983, 61:239~245
- 5 Pras N, Hesselink P G M, Guikema H. Biotechnol Bioeng, 1989, 33:1461~1468
- 6 Crank J. The Mathematics of Diffusion. 2th ed. London: Oxford University Press, 1956. 25~27
- 7 Pu H T, Yang R Y K. Biotechnol Bioeng, 1988, 32:891~896
- 8 Weisz P B. Science, 1973, 179:433~440
- 9 Towill L E, Mazur P. Can J Bot, 1975, 53:1097~1102
- 10 孙敬三, 桂耀林. 植物细胞工程实验技术. 北京: 科学出版社, 1995. p. 351
- 11 Sussex I M, Clutter M E. In Vitro, 1967, 3:3~12

Study on Oxygen Transfer Characteristics Within the Compact Callus Aggregates of *Rhodiola sachalinensis*

Xie Jian Xu Jianfeng Feng Pusun

(Institute of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

Abstract The effective diffusibility of oxygen in compact callus aggregates (CCA) of *Rhodiola sachalinensis* was extremely small, varying from 5.0×10^{-11} to $1.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ and increasing with the aggregate diameter. The calculated results indicated severe oxygen limitations occurred in CCA. However, the direct determination of the viability of the cells demonstrated that CCA contained a high fraction of viable cells. It was suggested that the tissue differentiation or plasmodesmata within CCA may provide channels for improved transport of oxygen and other nutrients.

Key words *Rhodiola sachalinensis*, callus, aggregates, oxygen transfer, effective diffusibility