

## 研究報告

## 喜樹腫瘤細胞培養與喜樹鹼生產

張淑華<sup>1)</sup> 何政坤<sup>1,2)</sup> 蔡錦瑩<sup>1)</sup> 陳國峰<sup>1)</sup> 黃芷雲<sup>1)</sup>

## 摘 要

本研究建立喜樹葉片轉殖野生型農桿腫瘤菌A 208 (*Agrobacterium tumefaciens* A 208)之方法，當農桿菌A208的菌液濃度為 $1 \times 10^{8-9}$  cells mL<sup>-1</sup>，菌液添加200 μM acetosyringone，與葉片共同培養2天，葉片的轉殖率可達最高的55.2%。每個葉片產生的腫瘤細胞最少1個，最多可達15個以上。以南方墨點分析法(Southern blot)證明農桿腫瘤菌的*nops*基因確實插入腫瘤細胞。腫瘤細胞可在不含植物生長調節劑的MS培養基中生長快速，在固體培養基培養30天，細胞鮮重可增加4.3~6.4倍；以液體培養基培養，細胞生長更快，培養20天細胞鮮重可增加7~8倍。利用HPLC分析10個不同轉殖系的喜樹鹼含量，最高可達0.0385% (細胞乾重)，最低則趨近於0，顯示不同腫瘤的喜樹鹼含量差異很大，因此廣泛篩選轉殖系是很重要的。

關鍵詞：喜樹、農桿腫瘤菌、腫瘤細胞培養、喜樹鹼。

張淑華、何政坤、蔡錦瑩、陳國峰、黃芷雲。2007。喜樹腫瘤細胞培養與喜樹鹼生產。台灣林業科學 22(4):413-22。

## Research paper

Crown Gall Culture and Camptothecin Production  
of *Camptotheca acuminata*Shu-Hwa Chang,<sup>1)</sup> Cheng-Kuen Ho,<sup>1,2)</sup> Jeen-Yin Tsay,<sup>1)</sup>  
Kuo-Fong Chen,<sup>1)</sup> Chih-Yun Huang<sup>1)</sup>

## 【 Summary 】

Crown gall cultures of *Camptotheca acuminata* were established by infecting in vitro leaf explants with *Agrobacterium tumefaciens* strain A 208. The highest transformation frequency of 55.2% was obtained when explants were co-cultured in medium containing  $1 \times 10^{8-9}$  bacterial cells mL<sup>-1</sup> and 200 μM acetosyringone for 2 d. At least 1 crown gall was induced from an explant, and in some cases, 16 galls per explant also occurred. Integration of T-DNA into the host genome was proven using Southern blotting as probed by the *nops* gene. Transformed galls grew rapidly in hormone-free MS medium. Their fresh weight increased up to 4.3~6.4 times on solid medium after 30

<sup>1)</sup> 林業試驗所育林組，10066台北市南海路53號 Division of Silviculture, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nanhai Rd., Taipei 10066, Taiwan.

<sup>2)</sup> 通訊作者 Corresponding author, e-mail:ckho@tfri.gov.tw

2007年6月送審 2007年7月通過 Received June 2007, Accepted July 2007.

d of culture, while it increased up to 7~8 times in liquid medium after 20 d of culture. The contents of camptothecin (CPT) of 10 gall strains were analyzed by high performance liquid chromatography. The highest percent CPT of the dry weight of cells was 0.0385%, while the lowest was nearly 0%, indicating that variation in CPT production in transformed galls was great, and extensive selection of gall lines is necessary to produce maximum camptothecin levels.

**Key words:** *Camptotheca acuminata*, *agrobacterium tumefaciens*, crown gall culture, camptothecin.  
**Chang SH, Ho CK, Tsay JY, Chen KF, Huang CY. 2007.** Crown gall culture and camptothecin production of *Camptotheca acuminata*. *Taiwan J For Sci* 22(4):413-22.

## 緒言

喜樹鹼(camptothecin, 簡稱CPT), 在1966年時由Wall et al.在喜樹的木材分離出來, 1971~1972年間首先證實對消化系統腫瘤及黑色素瘤等癌症具有療效, 但因嚴重副作用而中止開發。直到日本研發出CPT半合成衍生物CPT-11 (成分名為irinotecan)。由於CPT-11比喜樹鹼的抗癌活性強、更具水溶性, 且毒性較低, 安全範圍較廣, 目前已成功的用於治療大腸癌、卵巢癌、肺癌, 對胃癌、小細胞肺癌等亦具療效, 也證實可抑制HIV病毒複製(Priel et al. 1991)。

喜樹鹼主要來自喜樹(*Camptotheca acuminata* Decne.)與青脆枝(*Nothapodytes foetida*), 喜樹鹼含量在植物體很低, 且依部位而異, 如喜樹幼葉為0.01~0.1% (植物體乾重), 枝條為0.012%, 根為0.02%, 心材為0.05% (Wiedenfeld et al. 1997)。此外不同樹齡、季節等因子也會影響喜樹鹼含量(Liu et al. 1998)。由於喜樹鹼衍生藥物的全球產值高達20億美元, 許多科學家希望利用細胞培養方式生產喜樹鹼, 如癒合組織培養(Wiedenfeld et al. 1997, Park et al. 2003, Chang et al. 2006)、細胞培養(Pan et al. 2004)、毛狀根培養(Lorence et al. 2004)方面, 均有相關研究報告。唯目前喜樹鹼原料藥之來源仍以農場栽培為主, 利用組織培養生產喜樹鹼雖仍在開發階段, 但被視為極具商業開發價值。

可提供作為轉基因用的土壤野生型農桿菌有兩大類, 一為農桿腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*), 一為農桿叢根菌(*A. rhizogenes*), 兩者在感染植物的受傷部位時, 會分別將Ti

(tumor-inducing)與Ri (root-inducing)質體上之T-DNA插入植物基因組內, 為一個很有效的基因轉殖系統。野生型農桿腫瘤菌之T-DNA, 可使寄主植物產生高含量的植物生長調節劑(aux-ins)、細胞分裂素(cytokinins)、乙烯(ethylene)及合成opines, 在農桿腫瘤菌會誘導植物體產生腫瘤(crown gall), 在農桿叢根菌則誘導毛狀根(hairy root)的產生(Gelvin 2000)。腫瘤與毛狀根因具有植物生長調節劑基因, 因此與未轉殖的癒合組織或根不同, 可以快速的生長於不含植物生長調節劑的培養基。另外, 由於腫瘤細胞與毛狀根不論在遺傳與生化上都都很穩定。近年來, 已運用於許多植物二次代謝物的生產。在腫瘤細胞方面, 已成功用於生產奎林quinoline (Payne et al. 1987), tanshinine (Chen and Chen 2000), forskolin (Mukherjee et al. 2000), trichosanthin (Lei et al. 2006)等二次代謝物。本研究在建立喜樹之農桿腫瘤菌A208轉殖方法, 誘導與培養喜樹腫瘤細胞, 並調查不同腫瘤細胞的喜樹鹼含量, 以期篩選生長快速、喜樹鹼含量高的腫瘤細胞, 評估利用轉基因細胞培養生產喜樹鹼的可行性。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

在2004年採集生長於台北植物園的喜樹(1949引自中國, 樹齡估計約50年以上)種子, 以70%酒精消毒1分鐘, 再置於添加0.01% Tween 20的1%次氯酸鈉溶液, 在超音波震盪器

消毒15分鐘，以無菌水清洗3~4次，將種子切除種皮取出胚，播種於添加30 g L<sup>-1</sup>蔗糖之MS (Murashige and Skoog 1962)培養基。約2~3週後種子開始發芽，將種子苗每1.5~2個月繼代培養一次，繼代時將小苗的莖部切成約2 cm含有兩個節以上的莖段，以微體扦插方式繼續培育成苗。取上述培養1年的試管苗之葉片作為試驗材料。此階段苗木的培養環境為溫度25±2℃，光照條件為16 h光照、8 h黑暗，光度為45 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>的培養室。

## 二、農桿腫瘤菌的培養

將野生型農桿腫瘤菌A208以YEB培養基 (Van Larebeke et al. 1977)，在200 rpm轉速之旋轉式震盪器，於28℃、黑暗中過夜培養(約16小時)。接種前，菌液以2500 rpm離心20 min，吸去上層的培養液，將沈澱的A208農桿菌再懸浮於MS培養基，菌數調整成1×10<sup>6-10</sup> mL<sup>-1</sup>，並添加0~400 μM的不同酚類化合物(acetosyringone, syringic acid, syringaldehyde)於震盪器中再培養1 h之後，進行葉片與農桿菌的接種工作。

## 三、接種與殺菌

喜樹葉片切成0.5×0.5 cm<sup>2</sup>大小，以不同菌數之菌液浸泡5分鐘後，取出葉片並以無菌濾紙吸去多餘的菌液，將葉片與農桿腫瘤菌，共同培養(接種)於添加3%蔗糖的MS固體培養基1~4天，使農桿腫瘤菌基因轉移到喜樹的葉片。

接種後之葉片，以無菌水在超音波震盪器中清洗3次，每次5 min，去除農桿腫瘤菌。接著以0.5 g L<sup>-1</sup> timetin殺菌劑浸泡1 hr後，將葉片培養於含有1~400 mg L<sup>-1</sup> timetin的MS液體培養基，以100 rpm轉速之震盪器培養1週後，移入相同培養基組成但添加洋菜粉的MS固體中再培養3週，以殺死農桿腫瘤菌。殺菌的4週中，每週均需更換新鮮配製的培養基。

## 四、腫瘤細胞培養

殺菌後，將葉片移入不含殺菌劑與植物生長調節劑之MS固體培養基中培養，每個月繼代培養一次。在培養1.5個月時，調查與記錄腫瘤

的形成率。

取3個月大的腫瘤細胞與經NAA誘導產生之葉片癒合組織(Chang et al. 2006)進行細胞生長調查。固體培養時，在每個培養皿放入0.5 g細胞，培養1個月後，記錄鮮重；液體培養則於50 mL三角瓶中加入20 mL MS培養基及0.5 g鮮重的細胞，每2天收1次記錄細胞鮮重，共計20天。

試驗所用之培養基，除了timetin因高溫滅菌會破壞而需以過濾方式加入外，其它的化合物均於滅菌前加入。全部培養基的pH值均以1 N KOH或HCl校正，除了YEB培養基pH為7.2±0.05外，其餘培養基之pH均校正為5.7±0.05。固體培養基需添加0.75%的洋菜粉(Difco agar)，配製好之培養基以121℃，1.05 kg cm<sup>-2</sup>大氣壓高溫高壓消毒15 min。添加timetin時，將消毒後之培養基置於無菌操作台冷卻，timetin以水溶解，待培養基溫度冷卻至50℃左右，經0.22 μm過濾膜過濾，加入培養基充分攪拌均勻，分裝於培養器皿。每個試驗均重複3次。接種與腫瘤細胞都培養於溫度25±2℃，黑暗的培養室。

試驗結果用SAS (Statistic Analysis System) 套裝軟體之GLM (general linear model)程式分析其差異顯著性(SAS Institute 1995)。

## 五、DNA萃取、聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, 簡稱PCR)與南方墨點分析法(Southern blot analysis)

喜樹葉片與轉殖農桿腫瘤菌基因之腫瘤細胞，分別以DNeasy plant mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)萃取DNA，用*nops1*: 5'-ATGGCAATTACCTTATCCGCAACTTCTTTA-3'與*nops2*: 5'-CGAAAGACGCTTTCATTCCTTGATGTTGA-3'作為引子(Bevan et al. 1983)，PCR (GeneAmp PCR System 9700, aluminum block, Applied Biosystems, CA, USA)條件為94℃ 5 min, 94℃ 15 s, 50℃ 10 s, 72℃ 1 min, 40個循環, 72℃ 5 min, 最後以4℃保存在PCR中。PCR產物以1%洋菜膠電泳分析後利用ethidium bromide染色，以UV光檢測。

南方墨點分析法，取10 µg DNA用EcoRI與Hind III限制酶切後，以1%洋菜膠電泳分離。分離的DNA轉移至nylon membrane (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)，再以UV crosslinker (Stratagene UV Stratalinker 1800, CA, USA)固定。以*nops*基因作為探針 (probe)，詳細南方墨點分析法與步驟依據DIG (digoxigenin) Kit (Roche Molecular Biochemicals)與McCabe et al. (1997)。

## 六、喜樹鹼分析

稱取約2 g鮮重之腫瘤細胞，進行喜樹鹼含量分析，每個處理重複3次。將細胞置於研鉢加入液態氮磨碎，以冷凍乾燥機去除水分，加入10 mL甲醇(methanol)，在超音波震盪器中萃取30 min，以2000 rpm離心5 min後收集上清液，沈澱物再以10 mL甲醇萃取1次，將2次萃取液合併備用。用0.2 µm濾膜(AcrodiscR Lc 13 PVDF)過濾萃取液後，以自動取樣器取10 µL溶液以高效能液相層析儀(HPLC, Series 600 controller pump, 717 plus autosampler, Waters, Milford, MA, USA)，經光電二極體偵測器(2996 Photodiode Array Detector, Waters)分析CPT含量。層析所用的管柱為RPC-18 (150×4.6 mm, particle size: 5 µm, Supelco Discovery, Bellefonte, PA, USA)，移動相(mobile phase)之組成為0.03 M ammonium acetate: acetonitrile = 60: 40，流速為1 mL min<sup>-1</sup>，偵測波長為254 nm。CPT之定量係以購自Sigma (St. Louis, MO, USA)標準品作

成之濃度檢量曲線計算出來，並以吸收光譜與樣品進行比對確認。癒合組織喜樹鹼與含量之測定，係以細胞乾重所含喜樹鹼百分比表示。乾重的測定係將研磨萃取後之細胞渣，在60°C烘箱中乾燥48 h後所秤得乾重，作為收率計算之基礎。

## 結果與討論

### 一、接種條件與腫瘤細胞形成的關係

#### (一)菌濃度(菌數)對腫瘤形成的影響

農桿腫瘤菌A208經隔夜培養，將菌濃度調整成 $1 \times 10^{6-10}$  cells mL<sup>-1</sup>，加入200 µM aceto-syringone (簡稱AS)，再震盪培養1小時後進行接種，葉片經與A208共同培養2天、殺菌及MS培養基培養1.5個月後，調查培植體之腫瘤形成率(即轉殖率transformation frequency)。結果顯示接種時之菌液濃度會影響接種的轉殖率，喜樹葉片的腫瘤形成率在每mL菌液含有 $1 \times 10^{8-9}$ 個農桿菌效果最好，可達51.7~55.2%，菌液之菌數高或低於此濃度，腫瘤形成率都會大大降低(Table 1)。此結果與Bondt et al. (1994)及Clough and Bent (1998)相同，都認為接種時的菌數會影響轉殖效率，活性高且適當的菌數證實有助於提高轉殖效率。

#### (二)酚類化合物與腫瘤形成的關係

將培養1夜，菌數為 $1 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>之

**Table 1. Effect of different concentrations of *Agrobacterium tumefaciens* A208 in MS medium used to infect leaf explants of *Camptotheca acuminata* for 2 d on the transformation frequency of cultures**

<i>Agrobacterium</i> concentrations (cells mL <sup>-1</sup> )	No. of explants cultured	Transformation frequency <sup>1)</sup> (%)
$1 \times 10^6$	29	24.1
$1 \times 10^7$	28	25.0
$1 \times 10^8$	29	55.2
$1 \times 10^9$	29	51.7
$1 \times 10^{10}$	28	39.3

<sup>1)</sup> The transformation frequency is the proportion of cultures that induced crown galls.

A208菌液，加入AS、syringic acid (簡稱SA)、syringaldehyde (簡稱SAD)等3種酚類化合物以活化農桿菌，震盪培養1小時後再與葉片進行共同培養2天。經殺菌與培養1.5個月後，調查腫瘤形成率。結果以AS與SA處理，都可提高喜樹葉片接種A208的腫瘤形成率，尤其是以200  $\mu\text{M}$  AS處理效果最佳，與對照組比較，腫瘤形成率可由14.3%提高至55.2%，而添加100~200  $\mu\text{M}$ 的SAD，對喜樹葉片腫瘤的產生不但不會幫助反而有抑制作用(Table 2)。

由一些受傷的雙子葉植物細胞所產生的酚類化合物，在自然界裡已被證實可促進野生型農桿菌Ti質體上*vir* gene基因的活化及表現，使農桿菌之T-DNA轉移至植物體的DNA，進而增加轉殖率，尤其是以AS的相關研究最多(Joao and Brown 1993, Lai et al. 2006)，在有些植物AS不只可以提高轉殖率，還可以增加轉基因在植物體的複製數目(copy number)，使得基因表現更強(Joao and Brown 1993)。在木本植物的農桿菌基因轉殖，也有很多以AS來提升農桿菌的轉殖效率的成功例子，唯每個樹種最適合的AS濃度並不相同，例如在橡膠樹為20 mM (Venkatachalam et al. 2006)，在楊樹為25~75  $\mu\text{M}$  (Lin and Huang 1995)，在茶樹為400  $\mu\text{M}$  (Lopez et al. 2004)。

### (三) 接種時間的測定

喜樹葉片與菌數為 $1 \times 10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$ 且經

200  $\mu\text{M}$  AS活化處理之A208共同培養於MS培養基1~4天，經殺菌與培養1.5個月後調查腫瘤的形成率，結果除了共同培養1天的轉殖率較低(37.5%)以外，其餘處理差異不大，轉殖率都在50~55%之間(Fig. 1)。雖然共同培養2~4天間轉殖率沒有差異，但共同培養時間越長，農桿菌生長過多，會使得隨後的殺菌困難，因此仍以接種2天後進行殺菌最佳。

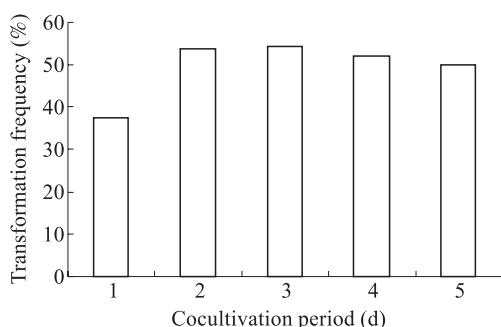
農桿菌*vir*基因的活化與T-DNA的轉移需要時間，因此培植體與農桿菌的共同培養時間也是影響轉殖率的重要因子。一般共同培養時間大都為2~5天，雖然延長共同培養時間可能可以提高轉殖效率，但過度生長的農桿菌卻可能成為另一個影響因子(Dong and McHughen 1993)。

### 二、殺菌與腫瘤細胞誘導

喜樹葉片與農桿菌共同培養後，以無菌水在超音波震盪器洗去農桿菌，再以0.5 g  $\text{L}^{-1}$  timetin浸泡1 h後，移入添加200 mg  $\text{L}^{-1}$  timetin的MS培養基培養4週，第1週以液體培養基培養，後3週則以固體培養基培養，每週均需更換新鮮的培養基，此殺菌方法可去除95%以上農桿菌。殺菌第1週採液體震盪方式培養，可使殺菌更完全，提高殺菌效率。Timetin由 $\beta$ -lactam和 $\beta$ -lactamase組成，比起一般常用的殺菌劑carbenicillin價格便宜10倍以上，以此抗生素配合殺菌方法來殺菌有效且經濟。每種植物

**Table 2. Effects of different types and concentrations of phenolic compounds in MS medium containing  $1 \times 10^8$  bacterium cells  $\text{mL}^{-1}$  used to infect leaf explants of *Camptotheca acuminata* for 2 d on the transformation frequency of cultures**

Phenolic compound	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	No. of explants cultured	Transformation frequency (%)
Control	-	28	14.3
Acetosyringone	100	30	36.7
Acetosyringone	200	29	55.2
Acetosyringone	400	29	34.5
Syringic acid	100	28	28.6
Syringic acid	200	29	27.6
Syringaldehyde	100	30	10.0
Syringaldehyde	200	28	7.1



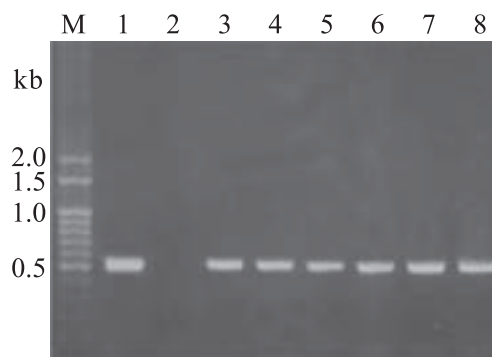
**Fig. 1.** Effect of the cocultivation period of leaf explants of *Camptotheca acuminata* in MS medium containing  $1 \times 10^8$  bacterium cells  $\text{mL}^{-1}$  on the transformation frequency of cultures.

對timetin的容忍度不同，在本試驗之測試濃度中( $100\sim 400 \text{ mg L}^{-1}$ )，以 $200 \text{ mg L}^{-1}$ 可有效殺死A208，同時不會影響喜樹葉片與腫瘤的生長。

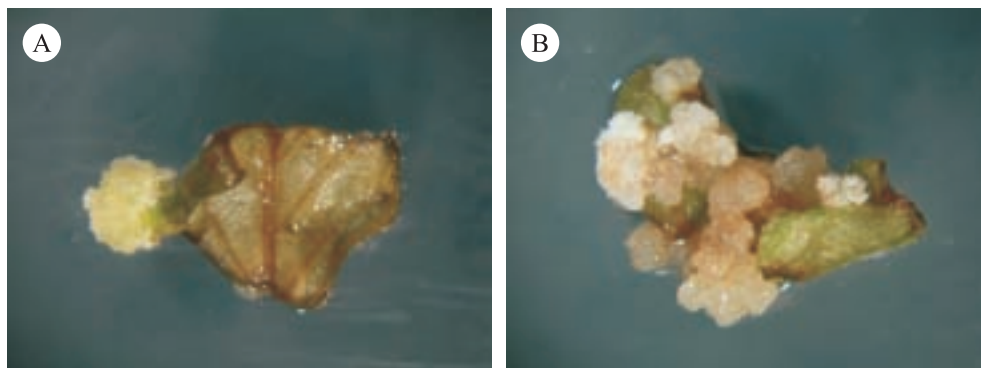
殺菌後之葉片在不含植物生長調節劑的MS培養基培養10天左右，開始有腫瘤的形成，腫瘤細胞大部分由葉片切口的葉脈處產生，其次由葉片表面的葉脈產生，每葉片可產生的腫瘤數有很大的差異，最少1個最多可達16個以上(Fig. 2)。將每個腫瘤逐一編號，個別培養，進行基因鑑定與喜樹鹼含量分析。

### 三、腫瘤細胞農桿菌基因之確認

隨機選來自6個不同葉片的腫瘤細胞，以PCR與南方墨點分析法來確認其DNA含有農桿菌基因。由喜樹葉片、腫瘤細胞與農桿菌A208之質體抽取DNA進行PCR分析，結果如Fig. 3。農桿菌的*nops*基因(520 bp)證實存在於轉殖的腫瘤細胞與農桿菌的DNA，但不存在於正常的喜



**Fig. 3.** Detection of the *nops* gene in 6 transgenic *Camptotheca acuminata* gall strains by PCR. Lane M, DNA size marker; lane 1, positive control (plasmid); lane 2, leaf tissue without transformation; and lanes 3~8, 6 gall strains induced from leaf explants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* A208.



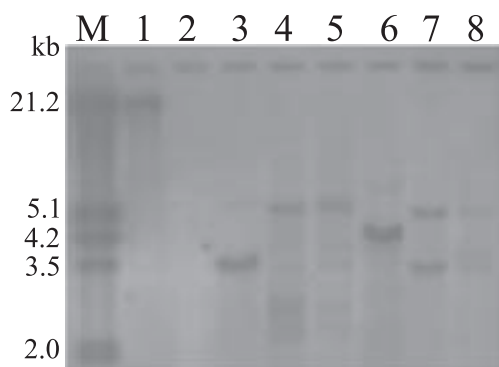
**Fig. 2.** Crown gall formation from leaf explants of *Camptotheca acuminata* after transformation with *Agrobacterium tumefaciens* A208. A, crown gall induced from the wounded vein of a leaf explant; B, 16 crown galls induced from the surface of a leaf explant.

樹組織。進一步用南方墨點分析法來確認轉殖成功，將DNA以*Eco*R1與*Hind*III限制酶分離後與520-bp *nops*基因雜交，除證實所有喜樹的腫瘤細胞都含有農桿菌的*nops*基因外，插入的基因也呈現多型性(Fig. 4)。

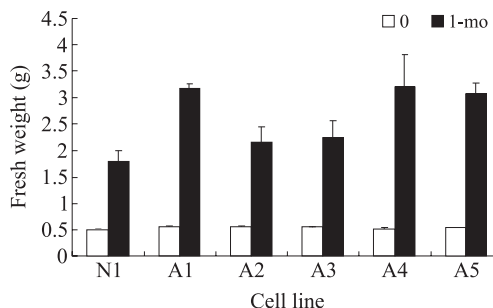
#### 四、腫瘤細胞的培養

腫瘤細胞跟正常癒合組織不同，可以在不含生長激素的培養基中快速生長。取3個月大的腫瘤細胞進行細胞生長量調查，結果顯示，腫瘤細胞的生長量在不同轉殖系中略有差異，但都比正常由auxin誘導產生的癒合組織生長快速。在不含植物生長調節劑的MS固體培養基，每個月腫瘤細胞的鮮重可由起初培養的0.5 g增加至2.15~3.2 g，約可增加4.3~6.4倍；相較於未轉殖來自葉片由MS添加3 mg L<sup>-1</sup> NAA誘導產生的癒合組織，鮮重每個月增加3.6倍，高出許多(Fig. 5)。

腫瘤細胞培養在不照光的環境下，顏色為淺綠、淺黃到白色，很少有褐化的現象(Fig. 6)，細胞的結構大致可分成易碎(friable)與瘤狀(nodule)的組織。兩種不同組織在固體培養時，



**Fig. 4. Southern blot analysis of crown galls.** *Hind*III and *Eco*R1-digested DNA samples were hybridized with a 520-bp *nops* gene fragment. Lane M, DIG-labeled DNA marker; lane 1, DNA of the A208 plasmid; lane 2, DNA of leaf tissue; and lanes 3~8, 6 gall strains showing different inserts and copies of the *nops* gene.

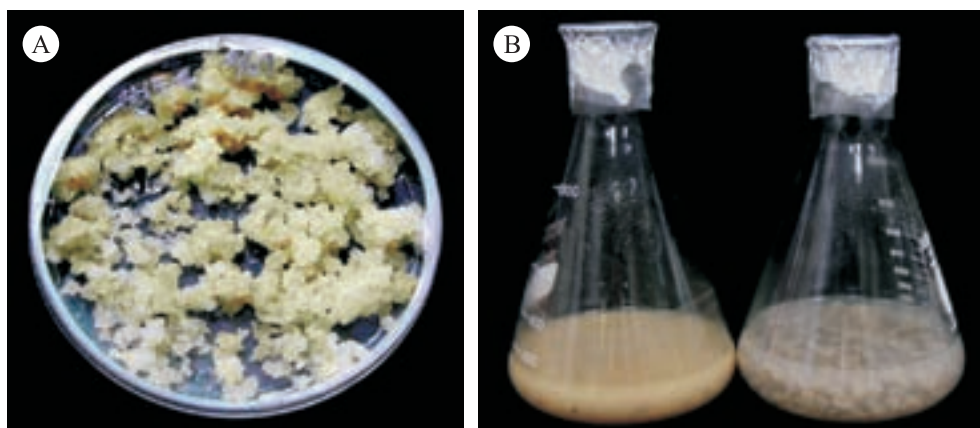


**Fig. 5. Biomass increments of crown gall strains (A1~5) cultured in hormone-free MS medium for 1 mo compared to normal cell cultures (N1) in MS containing 3 mg L<sup>-1</sup> NAA for the same culture period. Each treatment represents the mean of 3 replicates. Bars represent standard errors.**

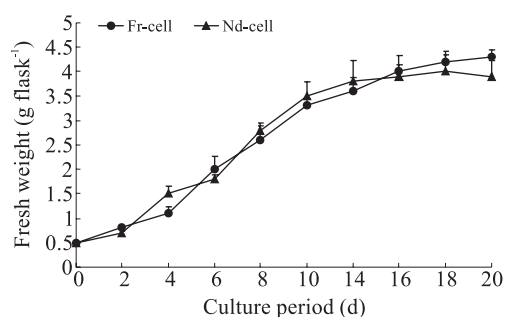
並沒有任何差異。以液體培養腫瘤細胞，其生長比固體培養更快速，細胞加倍時間為3~4天，每20天細胞鮮重可增加7~8倍(Fig. 7)。Friable與nodule兩種腫瘤細胞的生長量雖然差異不大，但易碎的腫瘤細胞容易形成懸浮細胞培養，而瘤狀的腫瘤細胞進行液體培養時，細胞不易分散而形成中間空心的大細胞團，有些瘤狀組織甚至可以長成直徑1~1.5 cm大之細胞團(Fig. 6)。

#### 五、喜樹鹼含量調查

腫瘤細胞每30天定期繼代培養於新鮮的MS固體培養基，3個月後取樣分析喜樹鹼含量。結果顯示腫瘤細胞的結構與喜樹鹼含量沒有相關，但不同轉殖系的腫瘤喜樹鹼含量差異很大，在分析的10個腫瘤細胞喜樹鹼最高為0.0385% (385 ppm)，最低則趨近於0 (Table 3)。喜樹鹼含量高於0.01%的只有3個，而低於0.001%的則有6個，佔全部的60%，其中還有4個含量趨近於0，顯示大部分喜樹轉殖A208之腫瘤細胞的CPT含量都不高，且在細胞系間的含量變異很大，此結果與喜樹癒合組織培養相似(Wiedenfeld et al. 1997, Chang et al. 2006)。因此高CPT產量的腫瘤細胞篩選工作，將成為成功利用細胞生產喜樹鹼的關鍵。



**Fig. 6.** Crown gall cultures of *Camptotheca acuminata*. The performances of fast-growing crown gall strains cultured in hormone-free solid (A) and liquid (B) MS medium. The left flask in B was a cell suspension established from friable cultures, while the right flask was from nodular cultures.



**Fig. 7.** Cell growth cycles of 2 crown gall strains cultured in shaking flasks containing MS liquid medium for 20 d. Fr-cell, friable-structure crown gall cultures; Nd-cell, nodular-structure crown gall cultures. Data represent the mean of 3 replicates with standard error bars.

轉殖野生型農桿菌基因，依基因型的不同，轉殖細胞會產生腫瘤或毛狀根。喜樹的毛狀根培養已經有成功例子，其毛狀根的喜樹鹼含量為0.1% (Lorence et al. 2004)，目前我們誘導的腫瘤細胞喜樹鹼含量雖然低於它，但其毛狀根液體培養的細胞加倍時間為7~10天，我們的腫瘤細胞為3~4天，生長速度高於毛狀根。若能進一步的篩選高量的喜樹鹼且屬於易碎組織

**Table 3.** Variations of camptothecin contents based on the dry weight among various crown gall strains

Crown gall strain	Structure of tumor cells	CPT content (%)
A1	friable	~0.0000 e <sup>1)</sup>
A2	friable	~0.0000 e
A3	friable	0.0135 b
A4	friable	0.0386 a
A5	friable	0.0010 d
A6	friable	0.0036 c
A7	friable	~0.0000 e
A8	nodule	0.0007 d
A9	nodule	0.0159 b
A10	nodule	~0.0000 e

<sup>1)</sup> Means with different letters within treatments significantly differ according to Tukey's test at the  $p < 0.05$  level.

的腫瘤細胞進行培養，仍深具潛力應用於大量生產喜樹鹼。

## 結論

喜樹含有喜樹鹼，可半合成製成CPT-11



用於治療癌症與抑制HIV病毒複製。喜樹鹼在植物體的含量低，利用細胞培養被認為是相當有希望成為生產喜樹鹼的另一途徑。唯一般細胞長期培養在富有植物生長調節劑與添加物的培養基中，細胞很難維持穩定的二次代謝物生產。經轉殖農桿腫瘤菌Ti質體或農桿叢根菌Ri質體產生之腫瘤細胞或毛狀根，可在不含植物生長調節劑的培養基自行分裂生長，近幾年已成為利用組織培養生產二次代謝物的研究趨勢。

就目前文獻索引顯示，本研究是首度報導利用農桿菌轉殖獲得喜樹腫瘤細胞的研究報告。因此本研究探討農桿菌A208接種菌數、酚類化合物種類、共同培養時間與殺菌方法等因素，對喜樹腫瘤細胞轉形率的影響。所誘導出的轉殖細胞可在不含植物生長調節劑的培養基中生長，且其生長速度比未轉殖的癒合組織細胞(需添加NAA)還快。目前腫瘤細胞的喜樹鹼含量，雖然比Lorence et al. (2004)培育的毛狀根含量低，也與未轉殖癒合組織的喜樹鹼產量相當。但腫瘤細胞具有比前二者都高的生長率，及變異頗大的細胞系可供篩選，未來也可配合喜樹鹼合成關鍵基因的轉殖，具有商業研發的發展潛力。

## 謝誌

本研究承行政院農委會林業試驗所公務預算科技計畫95農科-6.1.3-森-G3經費補助，特此致謝。

## 引用文獻

**Bevan M, Barnes WM, Chilton MD. 1983.** Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res* 11:369-85.

**Bondt AD, Eggermont K, Druart P, Vil MD, Goderis I, Vanderleyden J, et al. 1994.** *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of

factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Rep* 13:587-93.

**Chang SH, Tsay JY, Hsui YR, Ho CK. 2006.** Callus culture and camptothecin production of *Camptotheca acuminata*. *Taiwan J For Sci* 21:513-21.

**Chen H, Chen F. 2000.** Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. *Process Biochem* 35:837-40.

**Clough SJ, Bent AF. 1998.** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-43.

**Dong JZ, McHughen A. 1993.** An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci* 88:61-71.

**Gelvin SB. 2000.** *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:223-56.

**Joao KHL, Brown TA. 1993.** Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58 C1RIF-R PGSFR1161 in the presence of acetosyringone. *Plant Cell Rep* 12:422-5.

**Lai EM, Shih HW, Wen SR, Cheng MW, Hwang HH, Chiu SH. 2006.** Proteomic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* response to the vir gene inducer acetosyringone. *Proteomics* 6:4130-6.

**Lei H, Qi J, Song J, Yang D, Wang Y, Zhagn Y, Yang J. 2006.** Biosynthesis and bioactivity of trichosanthin in cultured crown gall tissues of *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz. *Plant Cell Rep* 25:1205-12.

**Lin XY, Huang FH. 1995.** Effects of acetosyringone, pH and concentration of *Agrobacterium tumefaciens* on putative transient *gus* gene expression in *Populus*. 23<sup>rd</sup> Southern Forest Tree Improvement Conference; 20~22 June

- 1995; Asheville, NC. p 220-6.
- Liu Z, Carpenter SB, Bourgeois WJ, Yu Y, Constatin RJ, Falcon MJ, et al. 1998.** Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata*. *Tree Physiol* 18:265-70.
- Lopez SJ, Kumar RR, Pius PK, Muraleedharan N. 2004.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze). *Plant Mol Biol Rep* 22:201a-j.
- Lorence A, Medina-Bolivar F, Nessler CL. 2004.** Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots. *Plant Cell Rep* 22:437-41.
- McCabe MS, Power JB, de Laat AMM, Davey MR. 1997.** Detection of single-copy genes in DNA from transgenic plants by non-radioactive Southern blot analysis. *Mol Biotechnol* 7:79-84.
- Mukherjee S, Ghosh B, Jha S. 2000.** Establishment of forskolin yielding transformed cell suspension cultures of *Coleus forskohlii* as controlled by different factors. *J Biotechnol* 76:73-81.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15:473-9.
- Pan XW, Xu HH, Liu X, Gao X, Lu YT. 2004.** Improvement of growth and camptothecin yield by altering nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminata*. *Biotechnol Lett* 26:1745-8.
- Park YG, Kim MH, Yang JK, Chung YG, Choi MS. 2003.** Light-susceptibility of camptothecin production from in vitro culture of *Camptotheca acuminata* Decne. *Biotechnol Bioproc E* 8:32-6.
- Payne J, Rhodes MJC, Rovins RJ. 1987.** Quinoline alkaloid production by transformed cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Planta Med* 53:367-72.
- Priel E, Showalter SD, Blair DG. 1991.** Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV-1) replication in vitro by non-cytotoxic doses of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor. *AIDS Res Hum Retrov* 7:65-72.
- SAS Institute. 1995.** SAS/STAT user's guide, release 6.11. Cary, NCL: SAS Institute.
- Van Larebeke N, Genetello CH, Hernalsteens JP, De Picker A, Zacnen I, Messens E, et al. 1977.** Transfer of Ti plasmids between *Agrobacterium* strains by mobilization with the conjugative plasmid RP4. *Mol Gen Genet* 152:1119-24.
- Venkatachalam P, Jayashree R, Rekha K, Sushmakumari S, Sobha S, Kumari JP, et al. 2006.** Rubber tree (*Hevea Brasiliensis* Muell. Arg.). *Methods Mol Biol* 344:153-64.
- Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH. 1966.** Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin—a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc* 88:3888-90.
- Wiedenfeld H, Furmanowa M, Roeder E, Guzewska J, Gustowski W. 1997.** Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 49:213-8.