

真菌诱导子对悬浮培养南方红豆杉细胞态势及紫杉醇合成的影响

张长平¹ 李春¹ 元英进^{1*} 孙安慈² 胡昌序²

¹(天津大学化工学院生化工程系 天津 300072) ²(中国科学院植物研究所 北京 100093)

摘 要 在南方红豆杉细胞悬浮培养过程中,研究了在指数生长期的末期加入真菌诱导子(尖孢镰刀菌的胞壁组分粗提物)对细胞态势及紫杉醇合成的影响。结果表明,真菌诱导子能在短期内激发细胞的防御性应答反应而产生氧迸发,细胞的氧化还原态势发生了明显的变化,培养基发生碱化现象,表征酶含量的蛋白质含量明显提高,SOD、POD、CAT 的活力出现波动性变化,并具有一定的时序性。同时,南方红豆杉悬浮培养体系中产次生代谢途径中重要的酶 PAL 的活力得到提高,紫杉醇的合成被加强,产量得到了显著提高,达到了对照组的 5 倍左右。

关键词 真菌诱导子,紫杉醇,悬浮培养,氧迸发,SOD,POD,CAT

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2001)04-0436-05

紫杉醇是一种新型的抗癌药,它是一种从红豆杉科红豆杉属植物的树皮及针叶等组织中提取出来的次生代谢产物,然而其天然资源极其有限。有关紫杉醇生产的研究,已有不少文献报道^[1,2],在众多的生产方法中,细胞培养生产紫杉醇是解决这个供需矛盾的最佳途径,是最具有前途的一种生产方式^[3]。近年来,利用植物细胞生产次生代谢产物已成为普遍关注的新方法,而在培养体系中加入诱导子来提高特定产物的产量,又成为研究热点^[4]。

真菌诱导子在与植物的相互作用中,能快速、高度专一和选择性地诱导植物特定基因的表达^[5],从而提高特定产物的积累。本文采用的诱导子为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*,简记为 Fo,胞壁成分的粗提物在本文图表中以 MF 代表)。Fo 是作者在众多真菌中筛选出来的诱导效果较好的一种。本文主要研究了真菌诱导子 Fo 对悬浮培养南方红豆杉细胞生理状态的改变及对紫杉醇合成的影响。为提高植物细胞生产紫杉醇的产量提供了一种新奇而有效的方法。

1 材料与方法

1.1 细胞株系及其培养

南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairiei*)悬浮培养 Y-901 细胞系 25℃,110r/min,黑暗振荡培养,采用改

良的 B₅^[2]液体培养基,继代培养 5 代以上,作为细胞种子,分别接于装有 50mL 新鲜 B₅ 培养基的 250mL 三角瓶中。

1.2 真菌的培养

尖孢镰刀菌采用液体马铃薯-葡萄糖培养基,25℃,100~110r/min 普通摇床振荡培养,待菌丝体生长 8d 后收获。

1.3 诱导子的制备及其含量的标定

收获的菌丝体经甲醇:氯仿(1:1V/V)溶液、磷酸盐缓冲液洗涤,再经匀浆、抽滤、高温灭菌后即为诱导子粗提物,其浓度标定采用糖及蛋白质两种成分共同度量,采用蒽酮比色法测定糖含量,为 973.64μg/mL;采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质的含量,为 781.4μg/mL。

1.4 实验设计

诱导组中,诱导子的添加量以糖来计量,经优化实验确定剂量标准为 60μg/mL,在培养的指数生长末期的第 18 天加入,取样时刻为加入诱导子后的第 0.5、1、2、4、8、12、24、36h。每组实验设 3 个平行组。对照组中,加入与诱导组中添加的诱导子溶液等体积的灭菌蒸馏水。

1.5 细胞生理态势检测指标及其表征

取胞外培养液的离心上清液(4℃)为胞外待测液;取 1g 冷冻的细胞,加入 0.01gPVP,2mL 由

0.1mol/L 磷酸盐缓冲液配制而成的含有 0.2mol/L EDTA,DTTO.4mmol/L 的细胞提取液,低温(4℃)离心后取上清液为胞内待测液。

1.5.1 培养液 pH 的测定:采用 PHS-2 型精密酸度计(上海雷磁仪表厂)测定。

1.5.2 细胞内总活性氧相对含量的测定:细胞经冷冻干燥后,取一定量细胞干粉用 ESR-SPECTROMETER 检测其顺磁共振图谱,以 MnO_2 为标准校准磁场。测定条件为:微波功率,1mW;扫场时间 8min/360mm;调制幅度 2G;响应时间 0.01s;调制频率 100KHz。以每毫克干细胞引起的 ERP 信号强度的绝对值表示细胞内总活性氧的相对含量。

1.5.3 蛋白质含量的测定:采用考马斯亮蓝染色法,取 1mL 待测液加入 3mL 考马斯亮蓝染色液,以蒸馏水为对照,600nm 下测量其吸光度。

1.5.4 胞外过氧化物酶(POD)酶活分析:在 50mL,100mmol/L 的磷酸盐缓冲液中加入 28 μ L 愈创木酚,溶解冷却后加入 19 μ L 30%的 H_2O_2 做为 POD 反应液。取 0.5mL 待测液与 2mL POD 反应液和 1mL,0.2mol/L 的磷酸二氢钾反应,于 470nm 处每隔 1min 测其吸光度,以 $\Delta A_{470}/\Delta t$ 表示酶活大小^[6]。

1.5.5 胞内过氧化氢酶(CAT)酶活分析:50 μ L 待测液中加入 3mL,0.6%的过氧化氢后,于 240nm 处测 15s、30s 时的吸光度,以 $\Delta A_{240}/\Delta t$ 表示酶活大小^[7]。

1.5.6 超氧化物歧化酶(SOD)酶活分析:取 0.25mL 胞内待测液,加入 1mL,0.05mol/L,pH = 7.8 的磷酸盐缓冲液、1mL 2.45mmol/L NBT 后,于 400Lux 荧光灯下照射 20min,在 560nm 处测量其吸光度,以 $\Delta A/\Delta t = 0.1/20min$ 为一个酶活单位。

1.6 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活力的测定

取 1mL 胞内待测液,加入 2mL 0.01mol/L 的 H_2BO_4 缓冲液,1mL 0.02mol/L 的苯丙氨酸和 1mL 蒸馏水,混匀后于 30℃ 恒温水浴中反应 60min,在 290nm 处测量吸光度,以 0.01mL 蒸馏水为对照。以 $\Delta A/\Delta t = 0.1/60min$ 为一个酶活单位。

1.7 胞内、外紫杉醇的提取及测定^[8]

将培养液在 6000r/min 条件下离心 20min,细胞作为提取胞内紫杉醇的材料,离心后的上清液用于胞外紫杉醇的提取。即取 8mL 上清液,加入 10mL 二氯甲烷,然后静置 8h,收集二氯甲烷相,上相再重复提取共 3 次,之后合并二氯甲烷相,于室温下风干。用于高效液相色谱法(HPLC)分析。

将离心后所得的细胞,用液氮迅速冷冻,再进行

冷冻干燥,所得的细胞干粉用于胞内紫杉醇的提取。称取 100mg 干细胞,在研钵中研成粉末状,加入 5mL 环己烷,研磨后加入 20mL 环己烷,将混合液倒入离心管中静置 0.5h,弃去环己烷相,向沉淀中加入 10mL 甲醇和 10mL 二氯甲烷,超声振荡萃取 30min,然后加入 20mL 蒸馏水充分混匀并静置 10h,收集二氯甲烷相,对上相再重复提取 2 次,合并二氯甲烷相,于室温下风干。用于 HPLC 分析。

紫杉醇的测定采用 HPLC,将所得的样品用 1mL 色谱甲醇溶解,在 C-18 反相硅胶柱(Kromalil C_{18} 5 μ m 250 × 4.6mm)上进行恒速洗脱。流速控制在 1mL/min,流动相为色谱甲醇:水(65:35)的溶液。检测波长为 227nm,总洗脱时间为 40min。

2 结果与讨论

2.1 真菌诱导子对胞内、外蛋白质的影响

真菌诱导子能引起细胞的代谢变化,它不仅使细胞积极合成了植物防卫的次生代谢物质,如植保素、木质素等,同时也启动或加强了特定的次生代谢途径,而这些过程的发生主要是通过酶类的调控来实现的。蛋白质的含量变化正反应了这些酶类的量变过程。本文在加入诱导子 Fo 后,蛋白质的量发生了明显的变化。如图 1 所示,诱导组胞内蛋白的含量出现了先高于后低于对照组的现象,这很可能是细胞膜通透性改变及蛋白质合成速率发生变化共同作用的结果。而胞外蛋白,如图 2 所示,其含量诱导组始终高于对照组,诱导初期,细胞生长速率相对还仍然较大,因此胞外蛋白质含量呈下降趋势。而诱导子的加入一般都会导致细胞生长的停止甚至死亡,因此在加入诱导子后 8h 左右胞外蛋白含量达到低峰,当细胞逐渐进入平稳期时,与各种次生代谢相关酶相继合成,使胞外蛋白含量平稳上升。诱导末期,由于诱导作用使细胞的死亡率增大造成胞内蛋白的外泄,使这种趋势加剧。

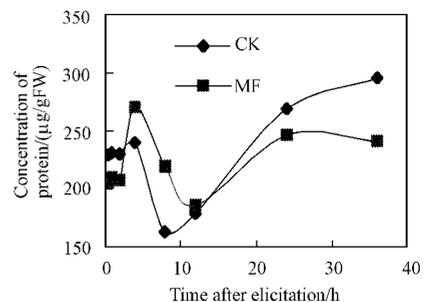


图 1 胞内蛋白质含量的变化

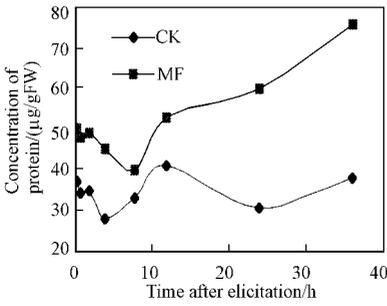


图 2 胞外蛋白含量的变化

Fig.2 Changes of extracellular protein content induced by Fo

2.2 真菌诱导子对红豆杉悬浮培养体系 pH 的影响

真菌诱导子的加入,使细胞培养体系发生了碱化,如图 3 所示。一般植物细胞对 pH 具有较强的自我调控能力,而诱导作用引起了质子的内流,因此推测 pH 的改变很可能是诱导子对植物细胞独特的诱导机制所致。真菌诱导子对细胞进行诱导时,作为一种信号分子,它本身不能进入细胞内部,只能依靠信号转导途径来调节细胞的生长、代谢和在环境中的生存能力。如 Ca^{2+} 的跨膜运输就是细胞信号转导的重要途径之一,而其所需的能量正是由质子的流动及电化学梯度所提供的。

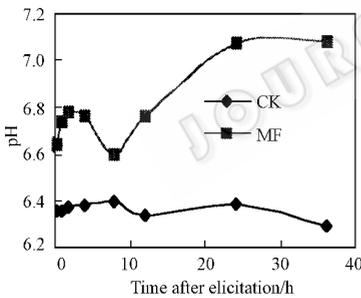


图 3 Fo 对体系酸碱度的影响

Fig.3 Effects of Fo on the pH

2.3 真菌诱导子诱导的氧迸发

氧迸发是植物细胞受到真菌诱导子刺激后所发生的很重要的一个防御反应。所谓氧迸发是指细胞中反应性氧的快速、短时间大量释放的现象。这些活性氧组分主要包括 H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , 它们是在植物细胞受侵染时,侵染信号可能经 G 蛋白介导,活化质膜氧化还原反应,从而在细胞表面迅速产生的。当 Fo 被加入到红豆杉细胞培养体系后,总活性氧在 4h 时达到高峰,如图 4。但过多的活性氧对细胞是有害的,自由基具有很强的氧化能力,很不稳定,能持续进行连锁反应,对许多功能分子有破坏作用。

如自由基能引发蛋白质(或酶、核酸)功能分子的二聚作用和歧化反应而影响蛋白质的结构和功能,而且二聚作用还能导致 DNA 的损伤。因此,诱导子加入到细胞培养体系后,大量自由基的产生诱发了自由基防御体系中酶保护系统的显著变化,以实现细胞自身的保护。

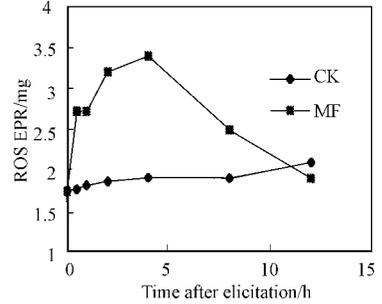


图 4 Fo 对氧迸发的影响

Fig.4 Effects of Fo on the oxygen burst

2.4 真菌诱导子对自由基清除系统保护酶的影响

受到真菌诱导子的刺激后,细胞通过启动或加强抗氧化酶类的表达,以及时清除有害的自由基。真菌诱导子 Fo 对南方红豆杉细胞的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性的影响如图 5、图 6、图 7 所示。活性氧对细胞既有有利的一面,同时对细胞也有毒害作用。加入诱导子后,3 种酶活先后均有提高,但有明显的时间顺序。首先, SOD 活性得到提高,在诱导 4h 左右就达到了高峰。在生物体内,它是一种重要的自由基清除剂,对生物体有保护作用, SOD 使 $O_2^{\cdot-}$ 得到快速清除,转化为 H_2O_2 和 O_2 , 催化反应式为 $2H^+ + O_2^{\cdot-} \rightarrow O_2 + H_2O_2$ (SOD 催化)。由图 5 可知,在诱导的前期, SOD 高于对照组,这主要是由于诱导子的介入,引发了大量自由基产生所致,细胞为了维持胞内生存环境的相对稳定性,通过提高 SOD 活性来消除 $O_2^{\cdot-}$ 对细胞造成的危害。

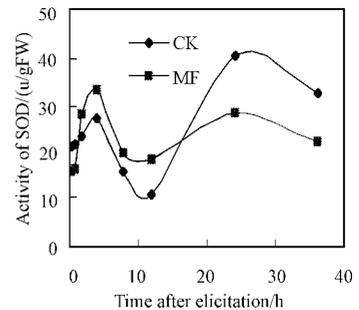


图 5 胞内 SOD 活力变化

Fig.5 Effects of Fo on the activity of SOD

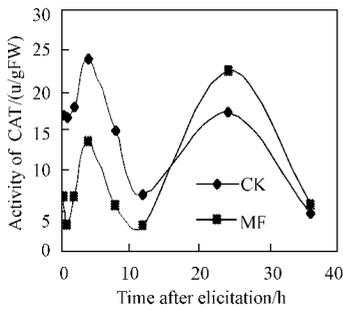


图 6 胞内 CAT 活力变化

Fig. 6 Effects of Fo on the activity of CAT

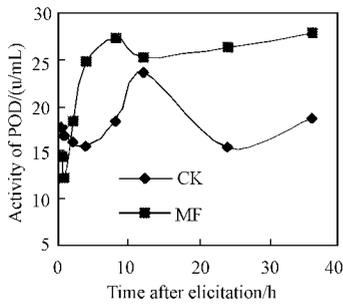


图 7 胞内 POD 活力变化

Fig. 7 Effects of Fo on the activity of POD

CAT 能够消除过量的 H_2O_2 对细胞造成的伤害, 它能催化如下的反应 $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (CAT 催化)。如图 6 所示, CAT 的活性在前期受到抑制, 低于对照组, 这使得 H_2O_2 能在一段时间内维持一定的浓度。 H_2O_2 是与细胞的信号转导有关的, 它能作为胞内第二信使。但是, 过量的 H_2O_2 也会对细胞产生毒害作用。在诱导后期, CAT 的活力高于对照组, 出现了峰值, 来消除多余的 H_2O_2 对细胞的毒害作用。

POD 在健康的细胞中也有 POD, 而诱导之后 POD 的活力增加且 8h 左右达到峰值, 并一直维持在较高的活力, 高于对照水平。一般认为这是由于 POD 的同工酶的合成被启动而引起了总 POD 活力的升高。POD 主要有两方面作用, 其一, POD 与膜外表面紧密结合, 能氧化外环境中的 NADH 产生 H_2O_2 和 O_2^- , O_2^- 又可以自发或在超氧歧化酶的作用下生成 H_2O_2 , 在细胞信号转导中发挥重要作用。因此在诱导的前期, POD 活力升高。它能促进 H_2O_2 的形成, 并使其维持在一定的浓度。其二, POD 对细胞具有抵御过氧化物破坏的保护功能。在后期, POD 仍然保持较高的活性, 它的主要作用是用来消除过量的过氧化物对细胞的损害作用。LOOH(过氧

化物) $\rightarrow LOH + H_2O$ (POD 催化)。

由此可见, 活性氧组分的产生及清除引起了自由基清除系统中氧化还原酶活力的波动性变化, 从而改变了细胞的氧化还原态势, 进而刺激了细胞的生物功能及代谢结构的变化。

2.5 真菌诱导子对紫杉醇合成的影响

一般认为, 调节连接初生代谢和次生代谢、次生代谢分支途径的关键酶的活性和酶量与特定的代谢途径的活化及相关产物的积累呈正相关性。由图 8 可知, 诱导子处理后, 4h 时苯丙烷类代谢途径中重要的酶 PAL 的活性就达到了峰值。PAL 是桂皮酸途径的定速酶, 苯丙氨酸经 PAL 脱羧作用产生紫杉醇的侧链物质苯甲酸, 从而加强了紫杉醇的生物合成。

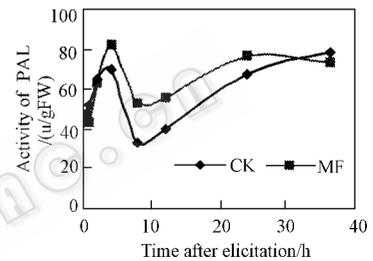


图 8 PAL 的活力变化

Fig. 8 Changes of Activity of PAL

相应的, 紫杉醇的产量在 36h 内也有了明显的提高, 如图 9 所示。由此可见, 细胞态势改变的同时伴随着代谢路径的活化和紫杉醇合成能力的提高, 而包括紫杉醇在内的次生代谢产物的形成正是细胞对外界刺激积极防御的表现和细胞态势改变的表征。诱导子对次生代谢产物形成的诱导存在时间性。据报道, 使 mRNA 达到足够的量大约需要 30min^[9], 因此推测, 紫杉醇真正形成的最高峰很可能需要更长的时间, 本文延长了对紫杉醇的监测时间, 发现此峰值出现在诱导后第 4 天, Taxol 产量提高了 5 倍左右, 达到 67mg/L。由实验结果可知, 在南方红豆杉悬浮培养体系中, 细胞的氧化还原态势的改变与紫杉醇的合成具有一定的时序性, SOD、POD、CAT、PAL 的活性的峰值分别出现在诱导后的第 4、8、20、4h, 而紫杉醇含量的峰值出现在第 96h。细胞态势对诱导子的响应时间相对较短, 正是这短暂的动态变化改变了细胞的生理状态及其代谢结构, 使紫杉醇的产量得到了提高。诱导与产物的合成具有时间过程, 并且诱导使细胞的生理态势逐步向有利于次生代谢产物形成方向转变。

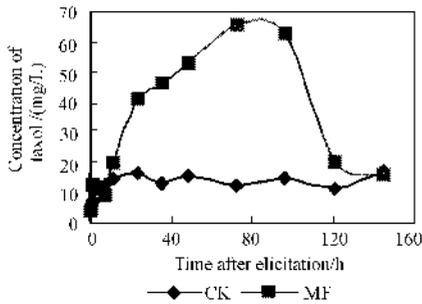


图9 F_{010} 对紫杉醇合成的影响

Fig.9 Effects of F_0 on the production of taxol

3 结 论

真菌诱导子引起了悬浮培养南方红豆杉细胞的快速应答反应,发生了氧迸发现象,细胞的氧化还原态势发生了改变,在自由基的释放和清除过程中一些特定的信号转导途径被激活,一些特定的次生代谢途径,苯丙烷类代谢途径和紫杉烷类代谢途径被开启或加强,路径中酶的表达从转录和翻译水平上相继被加强,紫杉醇产量得到了明显的提高,达到了对照组的5倍左右。因此,细胞态势的改变导致了细胞代谢结构的改变,使流向紫杉醇合成的代谢物流增加。可见,真菌诱导是提高紫杉醇产量的一种新奇有效的方法。

Effects of Fungal Elicitor on Cell Status and Taxol Production in Cells Suspension Cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*

ZHANG Chang-Ping¹ LI Chun¹ YUAN Ying-Jin^{1*} SUN An-Ci² HU Chang-Xu²

¹(Department of Biochemical Engineering, School of chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

²(Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract Effects of fungal elicitor on cell redox status and taxol production were studied in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* in the late exponential stage. The results show that fungal elicitor induced oxygen burst, changes of the cell redox status, alkalization of medium and the fluctuation of the activity of redox enzymes with a sequence. The content of protein representing the quantity of enzymes increased. The activity of SOD increased quickly after treatment by fungal elicitor and that of POD could be kept at a higher level in contrast to the control. The activity of CAT was inhibited at first and followed by an obvious increase, while the activity of PAL was promoted. The taxol yield was 5 folds of the control, reaching to 67mg/L.

Key words fungal elicitor, taxol, suspension culture, oxygen burst, SOD, POD, CAT

REFERENCES (参考文献)

- [1] Luis J Pestchanker, Suxan C Roberts, Michael L Shuler. Kinetics of taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and a Wilson-type bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, **19**: 256 ~ 260
- [2] WU Z I (吴兆亮), YUAN Y J (元英进), LIU J X (刘家新) et al. Study on enhanced production of taxol from *Taxus chinensis* var. *Mairei* in biphasic-lipuid culture. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1999, **41**(10): 1108 ~ 1113
- [3] XING J M (邢建民), ZHA L H (查丽杭), LI Z H (李佐虎) et al. Advances in the study on Taxol production by plant cell culture. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 1997, **14**(3): 22 ~ 29
- [4] David R Threlfall et al. In "manipulating secondary metabolism in culture", Cambridge University Press, 1988, **118**: 1065 ~ 1078
- [5] Udo Eilert. Elicitation: Methodology and aspects of application. *Cell Culture and Somatic Genetics of Plants*, 1987, **4**: 52 ~ 196
- [6] Charles S Bestwick, Lan R Brown, John W Mansfield. Localized changes on peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiology*, 1998, **118**: 1065 ~ 1078
- [7] Hugo EA. Caralase. In: Bergmeyer HV (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd Edition, Weinheim: Verlag Chemi, 1983, **3**: 273
- [8] YUAN Y (元英进), HU G W (胡国武), WANG C Q (王传贵). Effects of Rare Earth on the Culture of *Catharanthus roseus*. *Chinese Journal of Rare Earths* (中国稀土学报), 1998, **16**(1): 56 ~ 60
- [9] Kombrink E, Hahlbrock K. Dependence of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Cell Report*, 1986, **4**: 277 ~ 280

Received: October 17, 2000

This work was supported by grant from National Natural Sciences Foundation of China (29976032).

* Corresponding author. Tel: 86-22-27401149; Fax: 86-22-27403888; E-mail: yjyuan@public.tpt.tj.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>